

# **Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluoreszens***

Biochemische Charakterisierung und die Untersuchung von  
Struktur-Funktionsbeziehungen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
**Elena Janzen**  
aus Nowosibirsk

Jülich, 2002

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

Referentin: Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula

Korreferenten: Herr Prof. Dr. Hanns Weiss

Frau Priv.-Doz. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Juni 2002 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula durchgeführt.

Die Arbeit wurde durch die Konrad-Adenauer-Stiftung im Rahmen eines Stipendiums (Deutsche Graduiertenförderung) finanziell gefördert.



*In Liebe und Dankbarkeit,  
meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	Enzyme in der organischen Synthese	1
I.2	Anwendung der Enzyme für die Bildung von C-C-Bindungen	4
2.1	Bildung von C-C-Bindungen mit Aldolasen und Oxynitrilasen	4
2.2	Bildung von C-C-Bindungen mit ThDP-abhängigen Enzymen	5
2.2.1	Transketolase	5
2.2.2	Dihydroxyaceton Synthase	6
2.2.3	Desoxyxylulosephosphat Synthase	7
2.2.4	$\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen	7
2.2.4.1	Pyruvatdecarboxylase	7
2.2.4.2	Benzoylformiatdecarboxylase	8
2.2.4.3	Phenylpyruvatdecarboxylase	10
2.2.5	2-Hydroxyketone – Produkte der Ligasereaktion der ThDP-abhängigen Enzyme	10
I.3	Thiamindiphosphat (ThDP)-Katalyse	12
3.1	Die Katalyse von ThDP im freien Zustand	14
3.2	Die Katalyse von ThDP im enzymgebundenen Zustand	15
I.4	Die Benzaldehydlyase	17
II.	Motivation und Zielsetzung	19
III.	Ergebnisse und Diskussion	20
III.1	Darstellung der rekombinanten Benzaldehydlyase (BAL) aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
1.1	Expression der BAL in <i>E. coli</i>	20
1.2	Aufreinigung der BAL über Anionenaustauschchromatographie (AAC)	20
1.3	Optimierung des Aktivitätstests	22
III.2	Darstellung der rekombinanten Benzaldehydlyase (BAL) als Hexahistidin-fusionsprotein (BALHis)	25
2.1	Konstruktion des Expressionsplasmids pBALHis	25
2.2	Korrektur der veröffentlichten Gensequenz	30
2.3	Expression und Aufreinigung der BALHis	31
2.3.1	Optimierung des Expressionssystems	31
2.3.2	Reinigung der BALHis über IMAC	32
2.3.3	Hochzell-dichte-Kultivierung von <i>E. coli</i> SG13009 [pBALHis] im 15 L-Maßstab	33
III.3	Proteinchemische Charakterisierung der BALHis	35
3.1	Bestimmung des Molekulargewichts der BALHis	35
3.2	Bestimmung des isoelektrischen Punkts der BALHis	37
III.4	Stabilitätsuntersuchungen der wt-BALHis	38
4.1	Stabilität der wt-BALHis gegenüber Denaturierungsmitteln, Vergleich des Fusionsproteins wt-BALHis mit der wt-BAL ohne His-Tag	38
4.2	Temperaturstabilität der wt-BALHis	41
4.3	Stabilität der wt-BALHis im Bezug auf pH-Wert und Puffersalz	44
4.4	Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die Aktivität und Stabilität der wt-BALHis	46
4.5	Stabilität der wt-BALHis in Anwesenheit organischer Lösungsmittel	51
III.5	Charakterisierung der katalytischen Aktivitäten der wt-BALHis	53
5.1	Lyaseaktivität	53
5.1.1	Lyaseaktivität gegenüber Benzoin	53
5.1.1.1	pH-Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis	55
5.1.1.2	Temperaturabhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis	56

5.1.2	Das Substratspektrum der Lyaseaktivität der wt-BALHis	58
5.1.3	Lyaseaktivität der wt-BALHis ausgehend von ( <i>R</i> )-Hydroxypropiofenon	59
5.2	Ligaseaktivität	61
5.2.1	Synthese von Benzoin ausgehend von Benzaldehyd	61
5.2.1.1	Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Ligasereaktion	61
5.2.1.2	Abhängigkeit der Ligaseaktivität vom pH-Wert	63
5.2.1.3	Abhängigkeit der Ligaseaktivität von der Benzaldehydkonzentration	64
5.2.1.4	Ligaseaktivität in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln	66
5.2.2	Synthese von Hydroxypropiofenon ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd	68
5.2.3	Synthese ausgehend von Benzoin und Acetaldehyd als Substrate	68
5.2.4	Das Substratspektrum der Ligasereaktion der wt-BALHis	69
5.3	Untersuchung der Decarboxylaseaktivität der wt-BALHis ausgehend von Benzoylformiat	73
5.4	Der Katalysemechanismus der BAL	74
III.6	Darstellung der BALHis-Muteine	76
6.1	Planung der gezielten Mutagenese	76
6.2	BFD als Modell für die gezielte Mutagenese der BAL	80
	Die funktionswichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum der BFD	80
6.3	Gezielte Mutagenese mittels PCR	83
6.4	Expression und Reinigung der Muteine über IMAC	86
6.4.1	Hochzelldichte-Fermentation (HZD) des <i>E. coli</i> SG13009 [pBALA28Shis] im 15 L - Maßstab	87
III.7	Untersuchungen zur katalytischen Aktivitäten und Stabilität der Muteine BALA28SHis, BALH286AHis, BALA480IHis, BALF484IHis im Vergleich zur wt-BALHis	88
7.1	Lyaseaktivität	88
7.1.1	Vergleichende Charakterisierung der Lyaseaktivität ausgehend von Benzoin	88
7.1.2	Vergleichende Charakterisierung der Lyaseaktivität ausgehend von ( <i>R</i> )-Hydroxypropiofenon	91
7.2	Decarboxylaseaktivität	93
7.2.1	Untersuchung der Decarboxylaseaktivität der Muteine ausgehend von Benzoylformiat	93
7.2.2	pH-Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität der BALA28SHis	95
7.2.3	Substratspektrum der Decarboxylaseaktivität der BALA28SHis	96
7.3	Ligaseaktivität	98
7.4	Stabilitätsuntersuchungen der Muteine	99
7.4.1	Bindungsstabilität der Cofaktoren bei Muteinen im Vergleich zur wt-BALHis	99
7.4.2	Temperaturstabilität der BALA28SHis im Vergleich zur wt-BALHis	101
IV.	Zusammenfassung	104
V.	Material und Methoden	109
V.1	Material	109
1.1	Geräte	109
1.2	Chemikalien	110
1.3	Mikroorganismen	111
1.4	Vektoren	111
1.5	Medien	111
1.6	Kits für die Molekularbiologie	114
1.7	Oligonukleotidprimer	114
1.8	Software	115
V.2	Mikrobiologische Methoden	116
2.1	Konservierung mikrobiologischer Stämme	116

2.2 Kulturführung .....	116
2.2.1 Plattenkulturen .....	116
2.2.2 Zellkultivierungen in Schüttelkolben .....	116
2.2.2.1 Expression der wt-BAL in <i>E.coli</i> .....	116
2.2.2.2 Expression der wt-BALHis und der BALHis-Muteinen in <i>E.coli</i> .....	116
2.2.3 15 L-Fed-batch-Zellkultivierungen .....	117
2.3 Zellernte .....	118
2.4 Bestimmung des Zellwachstums durch Messung der optischen Dichte .....	118
2.5 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> – Zellen .....	119
2.6 Zellaufschluss und Herstellung eines zellfreien Rohextraktes .....	119
2.6.1. Mechanischer Zellaufschluss .....	119
2.6.2 Zellaufschluss per Ultraschall .....	119
V.3 Molekularbiologische Methoden .....	120
3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	120
3.1.1 Amplifikation des wt-BAL-Gens .....	120
3.1.2 Einführung der Mutationen mittels PCR .....	121
3.2 Berechnung der Schmelztemperatur von Primern .....	122
3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	122
3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	123
3.5 DNA-Restriktion .....	123
3.5.1 Partialverdau durch sukzessive Verdünnung der Restriktionsendonuklease .....	123
3.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA .....	124
3.7 Ligation .....	124
3.7.1 Ligation von überstehenden Enden („sticky ends“) .....	124
3.7.2 Ligation von glatten Enden („blunt-ends“) .....	124
3.8 Präparation von Plasmid DNA .....	124
3.8.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA .....	124
3.8.2 Plasmid DNA Präparationen mittels kommerzieller Kits .....	125
3.9 Transformation von Bakterien .....	125
3.10 Ethanolfällung .....	126
V.4 Proteinchemische Methoden .....	126
4.1 Proteinreinigung .....	126
4.1.1 Anionenaustauschchromatographie .....	126
4.1.2 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) .....	127
4.1.3 Gelpermeationschromatographie .....	128
4.1.3.1 Sephadex G-25 .....	128
4.1.3.2 Superdex G-200 .....	128
4.2 Konzentrierung von Proteinlösungen .....	130
4.3 Lagerung der Proteine .....	130
4.4 Proteinbestimmung nach Bradford .....	130
4.5 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	131
4.6 Isoelektrische Fokussierung .....	132
4.7 MALDI-TOF-MS (Matrix-Assited Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry) .....	134
4.8 Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln .....	135
4.9 Bestimmung des $T_M$ -Werts .....	136
4.10 Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	136
4.10.1 Direkter Enzymtest zur Bestimmung der Lyaseaktivität .....	136
4.10.2 Direkter Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität .....	139
4.10.3 Gekoppelter Enzymtest zur Bestimmung der Lyase- und Decarboxylaseaktivitäten .....	139

4.10.3.1 Untersuchung des Substratspektrums der Lyaseaktivität.....	141
4.10.3.2 Bestimmung der kinetischen Konstanten im Microtiterplattenlesegerät .....	141
V.5 Biotransformationen.....	142
5.1 Benzoin synthese .....	142
5.1.1 Analytische Synthese des Benzoins ausgehend von Benzaldehyd .....	142
5.1.1.1 Synthese des Benzoins ausgehend von Benzaldehyd mit der wt-BAL .....	142
5.1.1.2 Synthese des Benzoins ausgehend von Benzaldehyd mit der wt-BALHis .....	143
5.1.2 Präparative Synthese des Benzoins ausgehend von Benzaldehyd mit der wt-BALHis .....	143
5.1.3 Synthese der Benzoinderivate mit der wt-BALHis.....	144
5.1.4 Isolierung des ( <i>R</i> )-Benzoins.....	144
5.1.5 Analytische Daten des Benzoins und Benzaldehyds .....	144
5.1.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC) .....	144
5.1.5.2 Quantifizierung von Benzaldehyd und Benzoin mittels RP-HPLC .....	145
5.1.5.3 Chirale HPLC.....	146
5.2 Synthese von ( <i>R</i> )-2-Hydroxypropiophenon mit der wt-BALHis .....	147
5.2.1 Analytische Synthese des ( <i>R</i> )-2-HPP ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd .....	147
5.2.2 Präparative Synthese ausgehend von Aldehyden.....	147
5.2.3 Aufreinigung von ( <i>R</i> )-2-HPP .....	147
5.2.4 Analytische Daten des ( <i>R</i> )-2-HPP.....	148
5.2.4.1 Chirale HPLC.....	148
VI. Literaturverzeichnis.....	149
VII. Anhang.....	162
7.1 Codon Usage in <i>Escherichia coli K12</i> .....	162
7.2 DNA- und Proteinsequenz der BALHis.....	163
7.3 MALDI-TOF-MS.....	165

## Abbildungsverzeichnis

Abb. I-1:	Von der Transketolase katalysierte Transferasereaktion. ....	6
Abb. I-2:	Vergleich des Produktspektrums der BFD und der PDC bezüglich der Carboligation der Substrate Acetaldehyd und Benzaldehyd. ....	10
Abb. I-3:	2-Hydroxyketone als chirale Bausteine in der organischen Synthese. ....	11
Abb. I-4:	Struktur des Thiamindiphosphats. ....	13
Abb. I-5:	Allgemeines Reaktionsschema ThDP-abhängiger Enzymreaktionen. ....	13
Abb. I-6:	Stetter-Reaktion. ....	15
Abb. III-1:	Silbergefärbte SDS-PAGE (12,5 %) der Anionenaustauschchromatographie der BAL. ....	21
Abb. III-2:	BAL-katalysierte Spaltung der Acyloinbindung des Benzoin. ....	22
Abb. III-3:	Optimierung des gekoppelten Assays bezüglich des pH-Werts. ....	24
Abb. III-4:	Konstruktion des Expressionsvektors pBAL <sub>his</sub> . ....	26
Abb. III-5:	PCR-Primer zur Amplifikation des BAL-Gens und Einführung einer C-terminalen <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle unter Deletion des Stopcodons. ....	27
Abb. III-6:	Verifizierung und Orientierung des BAL-Gens im Plasmid pBAL durch <i>Pst</i> I- Verdau. ....	28
Abb. III-7:	Partialverdau des linearisierten Plasmids pBAL mit <i>Nco</i> I. ....	29
Abb. III-8:	Restriktionsanalyse des Expressionsplasmids pBAL <sub>his</sub> . ....	29
Abb. III-9:	Vergleich des neu sequenzierten BAL-Gens (oben) GI:9965497 [Janzen & Pohl, 2000] mit dem Eintrag in der GenBank GI:451540 [Hinrichsen et al., 1993]. ..	30
Abb. III-10:	Vergleich der Expressionsrate der wt-BALHis in unterschiedlichen <i>E. coli</i> - Stämmen. ....	31
Abb. III-11:	SDS-PAGE (12,5 %) der IMAC-Reinigung der BALHis. ....	32
Abb. III-12:	Bestimmung des isoelektrischen Punkts der wt-BALHis. ....	37
Abb. III-13:	Änderung der Aktivität und des Fluoreszenzmaximums der BALHis in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration. ....	39
Abb. III-14:	Änderung des Fluoreszenzmaximums der BALHis und der Aktivität von BAL und BALHis in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. ....	40
Abb. III-15:	Temperaturstabilität der wt-BALHis in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen. ....	42
Abb. III-16:	Bestimmung des $T_M$ -Werts- für wt-BALHis. ....	43
Abb. III-17:	Stabilität der wt-BALHis im Bezug auf pH-Wert und Puffersalz. ....	44
Abb. III-18:	Abhängigkeit der Cofaktorbindung vom pH-Wert. ....	46
Abb. III-19:	Rekonstitution des Holoenzym der wt-BALHis nach der cofaktorfreen Aufreinigung. ....	47
Abb. III-20:	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ThDP-Konzentration in Anwesenheit von unterschiedlichen $Mg^{2+}$ -Konzentrationen. ....	48
Abb. III-21:	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der $Mg^{2+}$ -Konzentration in Gegenwart von 0,1 mM ThDP. ....	49

Abb. III-22: Rekonstitution des Holoenzym der wt-BALHis nach verschiedener Inkubationszeiten in Gegenwart von 0,5 $\mu\text{M}$ ThDP und 0,025 mM $\text{Mg}^{2+}$ .....	50
Abb. III-23: Stabilität der wt-BALHis in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen .....	51
Abb. III-24: Stabilität der wt-BALHis in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln. ....	52
Abb. III-25: Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis von der Benzoinkonzentration. ....	54
Abb. III-26: Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis vom pH-Wert. ....	55
Abb. III-27: Temperaturabhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis. ....	56
Abb. III-28: Arrhenius-Plot. Temperaturabhängigkeit der Lyaseaktivität. ....	58
Abb. III-29: Substratspektrum der Lyaseaktivität der wt-BALHis. ....	59
Abb. III-30: Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis von der ( <i>R</i> )-2-HPP-Konzentration. ....	60
Abb. III-31: Von der BAL katalysierte Reaktionen der Benzoinspaltung und Benzoin synthese. ....	61
Abb. III-32: Zeitlicher Verlauf der Benzoin synthese bei zwei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen. ....	62
Abb. III-33: Einfluss der Proteinkonzentration auf den zeitlichen Verlauf der Benzoin synthese. ....	63
Abb. III-34: pH-Abhängigkeit der Ligaseaktivität der wt-BALHis. ....	64
Abb. III-35: Abhängigkeit der Ligaseaktivität der wt-BALHis von der Benzaldehydkonzentration. ....	65
Abb. III-36: Stabilität der wt-BALHis in Abhängigkeit von der Benzaldehydkonzentration. ....	66
Abb. III-37: Ligaseaktivität der wt-BALHis in Anwesenheit von PEG und DMSO. ....	67
Abb. III-38: Darstellung von ( <i>R</i> )-2-HPP ausgehend von Aldehyden mittels BAL-Katalyse. ....	68
Abb. III-39: Darstellung von ( <i>R</i> )-2-HPP und ( <i>S</i> )-Benzoin mittels BAL-Katalyse ausgehend von racemischem Benzoin. ....	69
Abb. III-40: Darstellung von ( <i>R</i> )-Benzoinderivaten mittels BAL-Katalyse. ....	69
Abb. III-41: Darstellung von 2,2'-Furoin mittels BAL-Katalyse. ....	70
Abb. III-42: Darstellung von ( <i>R</i> )-2-HPP-Derivaten mittels BAL-Katalyse ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehydderivaten. ....	71
Abb. III-43: Darstellung von ( <i>R</i> )-2-HPP-Derivaten und ( <i>S</i> )-Benzoinderivaten mittels BAL-Katalyse ausgehend von substituiertem racemischem Benzoin und Acetaldehyd als Substraten. ....	72
Abb. III-44: Durch wt-BALHis zugängliche 2-Hydroxyketone. ....	73
Abb. III-45: Potentieller Katalysemechanismus der BAL. ....	75
Abb. III-46: Sequenzvergleich der BAL aus <i>Ps. fluoreszens</i> mit der Konsensus-Sequenz aus dem Vergleich der 24 ThDP-abhängigen Enzyme. ....	76
Abb. III-47: Sequenzvergleich der BAL aus <i>Ps. fluoreszens</i> und ALS aus <i>E. coli</i> . ....	78
Abb. III-48: Sequenzvergleich der BAL aus <i>Ps. fluoreszens</i> und BFD aus <i>Ps. putida</i> .....	79
Abb. III-49: Einführung der Mutationen A28S und T73H in den pBALhis. ....	84
Abb. III-50: PCR-Fragmente zur Klonierung der Muteine mit Mutationen A28S und T73H. ....	85

Abb. III-51: Orientierung des mutierten PCR-Fragments im Expressionsplasmid pBALA28Shis. ....	86
Abb. III-52: Vergleich der Lyaseaktivitäten der verschiedenen Muteine und der wt-BALHis.	88
Abb. III-53: Abhängigkeit der Lyaseaktivität der Muteine von der Benzoinkonzentration. ..	89
Abb. III-54: Abhängigkeit der Lyaseaktivität der Muteine von der (R)-2-HPP-Konzentration. ....	91
Abb. III-55: Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität der BALA28SHis von der Benzoylformiatkonzentration. ....	93
Abb. III-56: Abhängigkeit der Decarboxylasereaktion der BALA28SHis vom pH-Wert. ....	95
Abb. III-57: Vergleich der Raumerfüllung von Benzaldehyd und Pentanal. ....	97
Abb. III-58: Bindungsstabilität der Cofaktoren bei Muteinen im Vergleich zur wt-BALHis.	99
Abb. III-59: Rekonstitution der Holoenzyme von wt-BAL und Muteinen. ....	100
Abb. III-60: Bestimmung des T <sub>M</sub> -Werts der BALA28SHis im Vergleich zu der wt-BALHis. ....	102
Abb. III-61: Proteinaggregation der wt-BALHis und BALA28SHis in Abhängigkeit von der Temperatur. ....	103
Abb. V-1: Schema zur Mutagenese mittels PCR nach der Methode der “overlapping extension“ . ....	121
Abb. V-2: Spezifische Bindung des Histidininfusionsproteins an der Ni-NTA-Matrix. ....	127
Abb. V-3: Eichgerade der G-200 zur Molekulargewichtsbestimmung. ....	130
Abb. V-4: Eichgerade zur Bestimmung des pI-Werts mittels isoelektrischer Fokussierung. ....	133
Abb. V-5: Lyaseaktivität der BAL. ....	136
Abb. V-6: Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd und Benzoin im Assaypuffer. ....	137
Abb. V-7: Bestimmung der Anfangsaktivitäten der wt-BALHis bei unterschiedlichen pH-Werten. ....	143
Abb. V-8: Eichgerade zur Quantifizierung von Benzoin mittels HPLC bei 250 nm. ....	145
Abb. V-9: Eichgerade zur Quantifizierung von Benzoin mittels HPLC bei 263 nm. ....	146
Abb. V-10: Eichgerade zur Quantifizierung von Benzaldehyd mittels HPLC bei 250 nm. ....	146
Abb. VII-1: MS-Kalibrierung: Massenspektrum des BSA. ....	165
Abb. VII-2: Massenspektrum der BALHis mittels MALDI-TOF-Analysator. ....	165

## Tabellenverzeichnis

Tab. I-1:	Klassifizierung von Enzymen .....	4
Tab. I-2:	Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme .....	14
Tab. III-1:	Ergebnisse der Anionenaustauschchromatographie der BAL in verschiedenen Puffern .....	22
Tab. III-2:	Ergebnisse der Aufreinigung der BALHis über IMAC. ....	33
Tab. III-3:	Ergebnisse der 15 L HZD-Fermentation von <i>E. coli</i> SG13009 [pBALhis]. ....	34
Tab. III-4:	Molekulargewichtsbestimmungen der BAL und BALHis mit verschiedenen Methoden .....	36
Tab. III-5:	Darstellung von symmetrischen ( <i>R</i> )-Benzoinen ausgehend von Benzaldehydderivaten mittels wt-BALHis-Katalyse .....	70
Tab. III-6:	Darstellung von ( <i>R</i> )-2-HPP-Derivaten ausgehend von Benzaldehyd-Derivaten und Acetaldehyd mittels wt-BALHis-Katalyse .....	71
Tab. III-7:	Darstellung von ( <i>R</i> )-2-HPP-Derivaten und ( <i>S</i> )-Benzoinderivaten mittels wt-BALHis-Katalyse ausgehend von substituiertem racemischem Benzoin und Acetaldehyd als Substraten. ....	72
Tab. III-8:	Spezifische Lyaseaktivitäten der Muteine im Rohextrakt und nach der Reinigung über IMAC und Gelfiltration im Vergleich zu denen des Wildtyps. ....	87
Tab. III-9:	Ergebnisse der 15 L HZD-Fermentation des <i>E. coli</i> SG13009 [pBALA28Shis].	87
Tab. III-10:	Vergleich der kinetischen Konstanten der wt-BALHis und der Muteine bezüglich der Spaltung von Benzoin. ....	90
Tab. III-11:	Vergleich der kinetischen Konstanten von wt-BALHis und der Muteine bezüglich der Spaltung von ( <i>R</i> )-HPP .....	92
Tab. III-12:	Kinetische Daten für die Decarboxylierung von Benzoylformiat mittels BALA28SHis .....	95
Tab. III-13:	Substratspektrum der Decarboxylierungsreaktion der BALA28SHis. ....	96
Tab. III-14:	Spezifische Carboligaseaktivität der BAL-Muteine im Vergleich zum Wildtyp.	98
Tab. V-1:	pO <sub>2</sub> -Regelungssequenz für die Sauerstoffsättigung im Fermenter. ....	117
Tab. V-2:	Eichproteine für die G-200 und die Elutionsvolumina. ....	129
Tab. V-3:	Eichproteine für die isoelektrische Fokussierung .....	134

## Abkürzungsverzeichnis

Abs.	Absorption
ADH	Alkoholdehydrogenase
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
as	antisense
Aq. bidest.	bidestilliertes Wasser
Aq. demin.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAL	Benzaldehydlyase
BALHis	Hexahistidinfusionsprotein der Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
3D	dreidimensional
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
EBI	European Bioinformatics Institute
E.C.	enzyme catalog
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
FDH	Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i>
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GC	Gaschromatographie
GI	GenBank Identifikation
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
Glc	Glucose
Hefe-ADH	Alkoholdehydrogenase aus Hefe
HL ADH	Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPP	Hydroxypropiofenon
HZD-Medium	Hochzelldichtemedium
InDC	Indolpyruvatdecarboxylase

---

IPTG	1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
$k_{cat}$	katalytische Konstante
kDa	Kilodalton
$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
KPi	Kalium-Phosphat Puffer
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekular Weight
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NCBI	National Center for Biological Information
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Quelle	Stickstoff-Quelle
$OD_x$	Optische Dichte bei $\lambda=x$
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PEG	Polyethylenglycol
PhDC	Phenylpyruvatdecarboxylase
POX	Pyruvatoxidase
ppm	parts per million
<i>Ps.fl.</i> BAL	BAL aus <i>Pseudomonas fluoreszens</i>
<i>Ps. p.</i> BFD	BFD aus <i>Pseudomonas putida</i>
<i>rec</i> BAL	recombinant wt-BAL
( <i>R</i> )-PAC	( <i>R</i> )-Phenylacetylcarbinol
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	sense
SAMP	Schrimp Alkaline Phosphatase
<i>S. cerevisia/S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Shine Dalgarno
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. uvarum /S.u.</i>	<i>Saccharomyces uvarum</i>
TE	Tris-EDTA Puffer

## Abkürzungsverzeichnis

---

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ThDP	Thiamindiphosphat
TK	Transketolase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur eines Primers
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UN	über Nacht
UTR	5'-Untranslated Region
UV	Ultraviolett
Vit	Vitamin
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
v/v	Volumenanteil pro Volumen
VVM	Volumen pro Fermentervolumen pro Minute
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
wt	Wildtyp
YPDC	Pyruvatdecarboxylase aus Hefe
<i>Z. m.</i> PDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>



# I. Einleitung

## I.1 Enzyme in der organischen Synthese

Dank der reichen Vielfalt der Reaktionen, die in der Zelle von Enzymen katalysiert werden, stellt die Nutzung biologischer Systeme für die Stoffumwandlung in der chemischen Industrie (Biotransformationen) ein großes Potenzial dar [Drauz & Waldmann, 1995]. Sie erlangt immer größere Bedeutung in der organischen Synthese: seit Ende der 80er Jahre werden durchschnittlich ca. 600 Artikel jährlich veröffentlicht, die Biotransformationen gewidmet sind [Faber & Patel, 2000]. Die Biotransformationen werden sowohl mit ganzen Zellen, als auch mit isolierten Enzymen durchgeführt.

Enzyme sind überwiegend Proteine. Eine Ausnahme stellen die seit 1982 bekannten Ribozyme dar, diese sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, mit deren Hilfe einige wenige Umsetzungen in der Zelle durchgeführt werden [Beyer & Walter, 1991]. Enzyme sind die effektivsten bekannten Katalysatoren. Sie können eine Reaktion um den Faktor  $10^7$  bis  $10^{14}$  beschleunigen und müssen daher nur in geringen Konzentrationen der Reaktion zugegeben werden. Im allgemeinen werden chemische Katalysatoren in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mol % bei chemischen Reaktionen eingesetzt. Enzymatische Reaktionen können mit einer Katalysatorkonzentration von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  mol % mit guten Ausbeuten durchgeführt werden [Faber, 1997]. Im Gegensatz zur chemischen Katalyse besteht bei der enzymatischen Katalyse eine Spezifität, die sich sowohl auf Struktur und Stereochemie der Substrate und Produkte als auch auf die Art der katalysierten Reaktion bezieht. Hohe katalytische Aktivitäten werden unter milden Reaktionsbedingungen erreicht, d.h. in einem Temperaturbereich von 20 bis 40 °C, bei annähernd neutralen pH-Werten und bei atmosphärischem Druck. Dies vermindert den Energieeinsatz und reduziert unerwünschte Nebenreaktionen wie Umlagerung, Isomerisierung oder Zersetzung der Edukte bzw. Produkte [Jones, 1986]. Nachteilig für enzymatisch katalysierte Reaktionen wirken sich oft die geringe Löslichkeit der Substrate in wässrigem Medium, in dem die meisten Enzyme ihre maximale Aktivität entfalten, ein enges Substratspektrum, wie auch die Inhibition durch Substrate und Produkte aus [Gais & Hemmerle, 1990].

Die Enantioselektivität stellt eine entscheidende Fähigkeit der Enzyme dar. Die Enantiomere chemischer Verbindungen unterscheiden sich in ihrer chiralen Umgebung, die auf der molekularen Ebene bei allen lebenden Organismen vorhanden ist, und weisen häufig

unterschiedliche biologische Aktivität auf. Enantiomere können z.B. recht unterschiedliche Dufteindrücke vermitteln. So beruhen die charakteristischen Aromen von Pfefferminze- und Kümmelöl auf den beiden verschiedenen Enantiomeren von Carvon [Fox & Whitesell, 1995]. Im ungünstigsten Fall hat das eine Enantiomer eine gewünschte biologische Wirkung, während das andere für Organismen toxisch ist. Ein Beispiel dafür ist Contergan (Thalidomid), ein antidepressives Medikament, das in den 50er Jahren als Racemat verkauft wurde. Das (*R*)-Enantiomer des Wirkstoffs wirkt beruhigend, das (*S*)-Enantiomer ist aber unglücklicherweise ein Teratogen [Fox & Whitesell, 1995]. Die große Relevanz der Verwendung enantiomerenreiner Verbindungen insbesondere im pharmazeutischen Bereich aber auch in der Agrochemie, im Bereich von Geschmacks- und Riechstoffen, Pheromonen etc. ist daher offensichtlich.

Enzyme bestehen aus Aminosäuren gleicher absoluter Konfiguration, d.h. sie sind enantiomerenreine Makromoleküle, die ihre chirale Information während der Reaktion übertragen. Da die Chiralität des Substrates die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes beeinflusst, reagieren die beiden Enantiomere des racemischen Substrats mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und ermöglichen eine kinetische Racematspaltung. Die Höhe der Differenz der Aktivierungsenergie beider Reaktionsrichtungen ist entscheidend für die Enantioselektivität der katalysierten Reaktion. Die Stereoselektivität vieler Enzyme ist so ausgeprägt, dass meist nur ein Enantiomer als Substrat erkannt wird.

Die kinetische Racematspaltung liegt zur Zeit der überwältigenden Mehrheit der stereoselektiven Biotransformationen zugrunde [Strauss et al., 1999], obwohl sie einige wichtige Nachteile hat. Der theoretische Umsatz kann nicht höher als 50 % sein, die Trennung des erwünschten Produkts von dem nicht umgesetzten Enantiomer des Edukts kann problematisch sein. Außerdem sinkt der Enantiomerenüberschuss von Substrat und/oder Produkt bei der Annäherung an einen 50 %-igen Umsatz.

Die andere grundlegende Möglichkeit zur Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen ist die asymmetrische Synthese, bei der ein prochirales Substrat durch die chirale Umgebung im aktiven Zentrum des Enzyms in ein enantiomerenreines Produkt überführt wird. Als Beispiel kann hier die reduktive Aminierung von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren zu L-Aminosäuren durch Aminosäuredehydrogenasen herangezogen werden [Krix et al., 1997].

Aufgrund ihrer hohen Selektivität werden die Enzyme in zunehmendem Maße in die klassische organische Synthese, meistens für die Herstellung von chiralen Bausteinen, integriert [Johnson & Wells, 1998; Liese & Filho, 1999; Schulze & Wubbolts, 1999; Faber & Patel, 2000]. Zum größten Teil werden sie bei der Herstellung von Feinchemikalien

eingesetzt. Allerdings, kann auch der Einsatz von Biokatalysatoren bei der industriellen Produktion von Grundchemikalien im großen Maßstab zu einem günstigeren Prozess führen [Bommarius et al., 1998]. Als Beispiel ist hier die Produktion von Fruktose mit Hilfe der Glukoseisomerase zu nennen, die  $10^6$  t jährlich ausmacht [Ogawa & Shimizu, 1999].

Der Fortschritt in der Biochemie und Molekularbiologie hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von neuen Technologien in der enzymatischen Synthese geführt. Es wurde z. B. die Benutzung von Multienzym-Systemen beschrieben, die eine Regeneration von wertvollen Cofaktoren gewährleisten [Chenault & Whitesides, 1987; Kula & Wandrey, 1987; Chenault et al., 1988; Kula, 1994]. Eine andere effektive Methode ist der gleichzeitige Einsatz von Stämmen, die bestimmte Enzyme überexprimieren, mit anderen Stämmen, die die erforderlichen Substrate aus preiswerten Ausgangsmaterialien synthetisieren. Dadurch ergibt sich ein künstlicher Stoffwechselweg, der auf unterschiedliche Mikroorganismen verteilt ist [Hashimoto & Ozaki, 1999]. Diese biotechnologischen Methoden, wie auch die Anwendung der gezielten Mutagenese, bzw. der gerichteten Evolution [Bruhn et al., 1995; Fagain, 1995; Pohl, 1997; Bornscheuer & Pohl, 2001; Powell et al., 2001], mit deren Hilfe die Enzyme für die Anwendung in der organischen Synthese optimiert werden können, führten dazu, dass die Biokatalyse nicht nur ein wichtiges Werkzeug, sondern auch oft die preisgünstigste Methode geworden ist [Petersen, 1999].

Das Potenzial der Biokatalysatoren ist noch längst nicht ausgeschöpft. Von mehr als 3500 bekannten Enzymen sind nur ca. 10 % kommerziell erhältlich [Schomburg & Stephan, 1997]. Enzyme werden nach dem von ihnen katalysierten Reaktionstyp in sechs Klassen eingeteilt (Tab. I-1), [IUBMB, 1992]. Die überragende Bedeutung für die organische Synthese haben die Hydrolasen, die in ca. 65 % der Anwendungen genutzt werden, die Oxidoreduktasen und Lyasen werden in ca. 25 % der Synthesen angewandt. Die Enzyme aus den anderen Klassen haben einen Anteil von jeweils weniger als 5 % [Theil, 1997].

**Tab. I-1:** Klassifizierung von Enzymen.

Enzymklasse	Reaktionstyp und Beispiele der katalysierten Reaktionen
1. Oxidoreduktasen	Oxidations- und Reduktionsreaktionen Epoxidierungen
2. Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen: Acyl-, Phosphat-, Glykosyl-, Carboxyl- und Alkylgruppen
3. Hydrolasen	Hydrolysereaktion: Spaltung und Bildung von Estern, Amiden, Peptiden und Glykosiden
4. Lyasen	Eliminierung unter Ausbildung von Doppelbindungen oder Addition an Doppelbindungen oder Spaltungsreaktionen.
5. Isomerasen	Isomerisierung: E/Z-Isomerisierung und Racemisierung, intramolekulare Oxidation und Reduktion
6. Ligasen	Bildung kovalenter Bindungen unter Energieverbrauch. Verknüpfung von zwei Molekülen unter Bildung einer C-C-, C-N-, C-O- oder C-S-Bindung

## I.2 Anwendung der Enzyme für die Bildung von C-C-Bindungen

Die Knüpfung von C-C-Bindungen ist das zentrale Problem der organischen Synthese zum Aufbau chiraler aliphatischer und carbocyclischer Verbindungen. Unter den Enzymen, die in der chemoenzymatischen Synthese für die Bildung der C-C-Bindungen benutzt werden, sind vor allem die Aldolasen, Oxynitrilasen und Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Enzyme wie z. B. Transketolasen und  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen zu nennen.

### 2.1 Bildung von C-C-Bindungen mit Aldolasen und Oxynitrilasen

Die von Aldolasen oder Aldehydlyasen (EC 4.1.2) katalysierte Aldolreaktion führt zur stereospezifischen Knüpfung einer C-C-Bindung zwischen zwei Carbonylverbindungen unter Bildung einer  $\beta$ -Hydroxycarbonylverbindung (Aldol) [Wong & Whitesides, 1995]. Die

Aldolasen besitzen meistens eine ausgeprägte Spezifität bezüglich des Donorsubstrates: es werden Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)-abhängige Aldolasen (Typ A), pyruvatspezifische (Typ B) und acetaldehydspezifische Aldolasen (Typ C) unterschieden [Theil, 1997]. Das Spektrum der Aldehyde, die als Akzeptoren fungieren, ist dagegen ziemlich breit [Wong & Whitesides, 1995]. Es ist hier auch die Transaldolase zu erwähnen, die eine Übertragung einer C-3-Einheit („Dihydroxyaceton“) von einem Donorsubstrat auf einen Hydroxyaldehyd-akzeptor katalysiert [Sprenger et al., 1995].

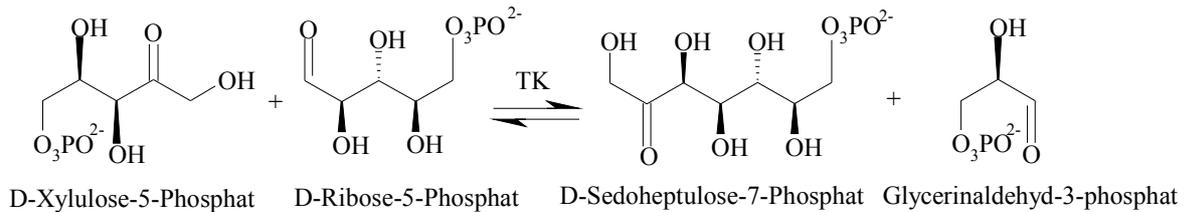
Die natürliche Funktion der Oxynitrilasen oder Hydroxynitril-Lyasen (EC 4.1.2.10) ist die Katalyse der Cyanogenese – der Spaltung von Cyanhydrinen unter Freisetzung der toxischen Blausäure, die einen Abwehrmechanismus von Organismen darstellt. In der organischen Synthese werden Oxynitrilasen für die Katalyse der Rückreaktion benutzt, in der Cyanhydrine durch die stereospezifische Addition von Blausäure an die Carbonylverbindung gebildet werden. Je nach Quelle akzeptieren Oxynitrilasen entweder Aldehyde und/oder Ketone, wobei das Substratspektrum sehr breit sein kann [Effenberger, 1994; Förster et al., 1996].

## **2.2 Bildung von C-C-Bindungen mit ThDP-abhängigen Enzymen**

Von den unterschiedlichen ThDP-abhängigen Enzymen werden zur Zeit in der Biokatalyse am häufigsten die Transketolase und die verwandten Transferasen – Dihydroxyaceton Synthase (DHAS) und 1-Desoxyxylulose-5-phosphat Synthase (DXPS), wie auch die  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) eingesetzt [Sprenger & Pohl, 1999].

### **2.2.1 Transketolase**

Die Transketolase (TK) (EC 2.2.1.1) kommt im Pentosephosphatweg einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen vor, wie z.B. Hefe, Spinat, Säugetiere [Schenk et al., 1998]. Die natürliche Funktion der TK ist die reversible Übertragung eines Hydroxyacetaldehyd-Äquivalents von einer Ketose (C2-Donor) auf eine Aldose (C2-Akzeptor), wodurch ein Ketol unter Kettenverlängerung und Bildung eines zusätzlichen stereospezifischen Zentrums entsteht. Das Donorsubstrat wird dabei in den entsprechend verkürzten Hydroxyaldehyd umgewandelt (Abb. I-1) [Theil, 1997].



**Abb. I-1:** Von der Transketolase katalysierte Transferasereaktion.

Die TK akzeptiert ein breites Spektrum von Aldehydmolekülen (u.a. auch aromatische Aldehyde), was dieses Enzym interessant für die Anwendung in der Biokatalyse macht. Auch nicht hydroxylierte Aldehyde können von der TK umgesetzt werden [Schorken & Sprenger, 1998]. Anstelle des  $\alpha$ -Hydroxyketons kann bei einer von der TK aus *E.coli*, Hefe und Spinat katalysierten Reaktion auch  $\alpha$ -Hydroxypyruvat als Donor fungieren, dessen Verwendung in der Biotransformation wegen des irreversiblen Charakters der Reaktion bevorzugt ist. Unter Anwendung von  $\alpha$ -Hydroxypyruvat als C-2-Donor konnten mittels TK-Katalyse chirale Synthone von unterschiedlichen wertvollen natürlichen Produkten, wie z.B. das Pheromon  $\alpha$ -exo-Brevichomin [Myles et al., 1991], der als Lebensmittelzusatz benutzte Geschmackstoff Furaneol [Hecquet et al., 1996], oder der Glukosidaseinhibitor Fagomin [Schorken & Sprenger, 1998] synthetisiert werden.

Die Produkte der enzymatischen Reaktionen der TK und der Aldolase haben die gleiche Stereochemie. Allerdings hat die TK einige wichtige Vorteile im Vergleich zu den Aldolasen. Im Unterschied zu Aldolasen besitzt die TK eine Stereoselektivität im Bezug auf Akzeptoren: Es werden nur 2-(*R*)-Hydroxyaldehyde akzeptiert. Daher können mit der TK Reaktionen ausgehend von den billigeren Racematen durchgeführt werden. Dabei können auch 2-(*S*)-Hydroxyaldehyde als Nebenprodukt durch kinetische Spaltung des Racemats erhalten werden [Effenberger et al., 1992; Kobori et al., 1992]. Außerdem ermöglicht TK eine direkte Synthese von nicht phosphorylierten Kohlenhydraten, da auch nicht phosphorylierte Aldehyde von ihr umgesetzt werden können [Schorken & Sprenger, 1998].

### 2.2.2 Dihydroxyaceton Synthase

Die Dihydroxyaceton Synthase (DHAS) (Formaldehyd Transketolase) wurde aus Peroxisomen der methylotrophen Hefe *Candida boidinii*, wie auch aus dem Methanol umsetzenden Bakterium *Acinetobacter sp.* DSM 3083 isoliert. Ihre natürliche Reaktion ist eine C-2-Übertragung von Xylulose-5-phosphat auf Formaldehyd, dem ersten Metabolit der

Methanoloxidation. DHAS akzeptiert, wie die TK, viele unnatürliche Aldehyde mit oder ohne Hydroxyfunktion in der  $\alpha$ -Position. Als Donorsubstrat konnten neben Xylulose-5-phosphat, Hydroxypyruvat, Fructose-6-phosphat und, im Fall des bakteriellen Enzyms, Ribulose-5-Phosphat eingesetzt werden [Yanase et al., 1995].

### 2.2.3 Desoxyxylulosephosphat Synthase

Die 1-Desoxyxylulose-5-phosphat Synthase (DXPS), ein mit der TK verwandtes Enzym, wurde vor kurzem aus *E. coli* isoliert [Sprenger et al., 1997]. DXPS katalysiert eine Ligasereaktion zwischen Glyceraldehyde, bzw. Glyceraldehydphosphat (Acylakzeptor) und Pyruvat (Acyldonor) unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$ , was zur Bildung von 1-Desoxyxylulose oder 1-Desoxyxylulose-5-phosphat (DXP) führt.

### 2.2.4 $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen

#### 2.2.4.1 Pyruvatdecarboxylase

Die erste bekannte Biotransformation mit Hilfe von ThDP-abhängigen Enzymen, die im industriellen Maßstab etabliert wurde, und eines der ersten großtechnischen, biotechnologischen Verfahren allgemein, ist das Herstellungsverfahren von (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) mittels Hefe-Zellen, das bis heute angewandt wird (Fa. Knoll) [Hildebrandt & Klavehn, 1932; Tripathi et al., 1997]. (*R*)-PAC ist ein  $\alpha$ -Hydroxyketon, das sich durch reduktive Aminierung in L-Ephedrin überführen lässt. Dies ist ein seit Jahrhunderten bekanntes Heilmittel, das heute als Husten- und Asthmaheilmittel eingesetzt wird. Die enzymatische Synthese des PAC durch die Fermentation der Hefe *S. cerevisiae* unter Zugabe von Benzaldehyd wurde schon 1921 beschrieben [Neuberg & Hirsch, 1921]. Es wurde inzwischen festgestellt, dass die Ligasereaktion zwischen Acetaldehyd und Benzaldehyd, die zur Bildung von (*R*)-PAC führt, von der Pyruvatdecarboxylase (PDC) (EC 4.1.1.1) katalysiert wird. Die PDC ist ein weitverbreitetes ThDP-abhängiges Enzym, das in Hefen, Pflanzen und in dem obligat anaeroben Bakterium *Zymomonas mobilis* (*Z.m.*) vorkommt [Pohl, 1997]. Die PDC spielt eine Schlüsselrolle bei der Gärung von Glukose zu Ethanol und  $\text{CO}_2$ . Sie katalysiert die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd, der im weiteren Verlauf durch die

Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert wird. Neben ihrer Hauptreaktion zeigt die PDC auch die Fähigkeit zur C-C-Verknüpfung im Sinne einer Acyloinkondensation, indem der ThDP-gebundene „aktive Aldehyd“, der nach der Abspaltung des Kohlendioxids vom Pyruvat gebildet wird, auf das zweite Aldehydmolekül übertragen wird, wodurch ein 2-Hydroxyketon entsteht. Die natürlich vorkommende Acyloinkondensation der PDC als Konkurrenzreaktion der Acetaldehydsynthese führt zu Acetoin, dem Kondensationsprodukt zweier Acetaldehydmoleküle. Das Acetoin wird racemisch synthetisiert und dient vermutlich als Redoxpuffer zur Regeneration der Cofaktoren, das nach Bedarf zum Diol reduziert oder zum Diketon oxidiert werden kann [Crout et al., 1986].

Trotz des großen Spektrums von 2-Ketocarbonsäuren, die von der PDC decarboxyliert werden können, können nur wenige der resultierenden Aldehyde auf das zweite Aldehydmolekül unter Bildung von 2-Hydroxyketonen übertragen werden. Neben Acetaldehyd konnten nur Propionaldehyd und Butyraldehyd in Gegenwart von Bäckerhefe nach der Decarboxylierung der entsprechenden 2-Ketocarbonsäure an Benzaldehyd addiert werden [Funganti et al., 1988; Csuk & Glänzer, 1991]. Auch freie Aldehyde, die im Vergleich zu den 2-Ketocarbonsäuren die preiswerteren und leichter verfügbaren Edukte sind, können an das aktive Zentrum der PDC gebunden werden und einen „aktiven Aldehyd“ bilden, so dass die Synthese der 2-Hydroxyketone auch über diesen ökonomisch günstigeren Weg möglich ist [Iding et al., 1998]. Die am besten untersuchten PDCs aus *S. cerevisiae* und *Z. mobilis* weisen ein breites Substratspektrum von unterschiedlichen aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Aldehyden auf, die als Acyldonoren akzeptiert und zu den entsprechenden 2-Hydroxyketonen umgesetzt werden [Iding, 1998].

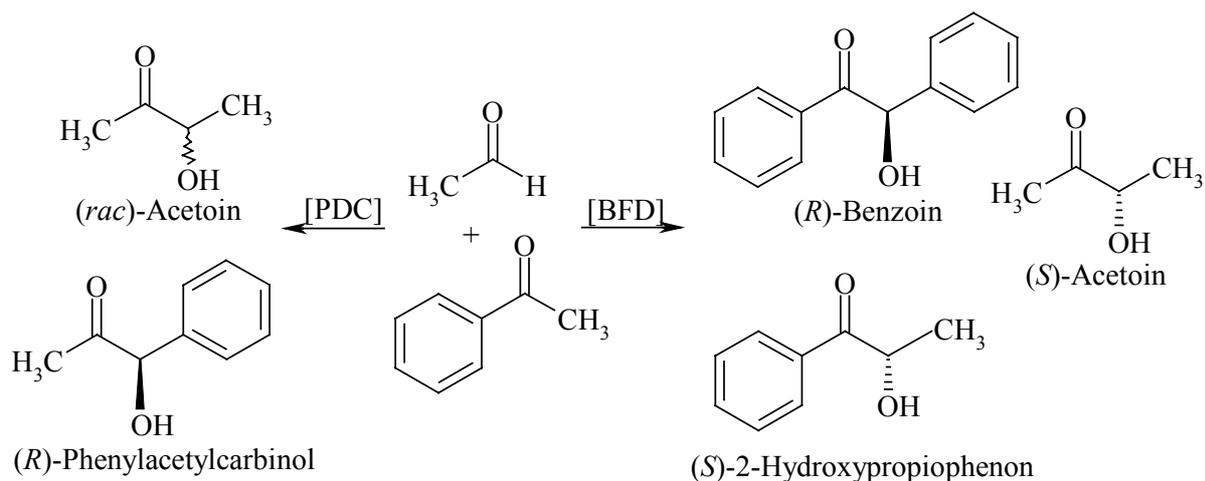
#### 2.2.4.2 Benzoylformiatdecarboxylase

Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) (EC 4.1.1.7) besitzt ebenfalls das Potenzial zur Synthese von 2-Hydroxyketonen. BFD ist das dritte Enzym im Mandelsäurekatabolismus, in dem Mandelsäure zu Benzoesäure abgebaut wird. Benzoylformiatdecarboxylaseaktivität wurde bisher nur in Bakterien wie *Pseudomonas putida* [Hegeman, 1966a; Hegeman, 1966b; Hegeman, 1970], *Pseudomonas aeruginosa* [Barrowman et al., 1986] und *Acinetobacter calcoaceticus* [Barrowman & Fewson, 1985] gefunden, die aromatische Verbindungen metabolisieren und mit diesen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können. Die Hauptreaktion der BFD ist die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und Kohlendioxid. Analog zur PDC zeigt auch die BFD als Nebenreaktion, deren mögliche physiologische Rolle nicht bekannt ist, eine C-C-Verknüpfung im Sinne der

Acyloinkondensation. Wie PDC weist die BFD Carboligaseaktivität auch ausgehend von zwei Aldehydmoleküle auf. So wird von der BFD ausgehend von Benzoylformiat oder Benzaldehyd und Acetaldehyd (*S*)-2-Hydroxypropiophenon ((*S*)-2-HPP) gebildet. Die stereoselektive Synthese des (*S*)-2-HPP gelang mit der BFD aus *Ps. putida* mit einem Enantiomerenüberschuss von 90-96 % (*S*) [Wilcocks & Ward, 1992; Wilcocks et al., 1992] oder mit der BFD aus *Acinetobacter calcoaceticus* mit einem ee >98 % (*S*) [Prosen & Ward, 1994]. Außerdem hat die BFD auch das Potenzial zur Darstellung von Benzoin, da auch Benzaldehyd neben Acetaldehyd als weniger effektiver Acylakzeptor fungieren kann. Sowohl die Reaktion ausgehend von Benzoylformiat und Benzaldehyd, als auch die Ligation zweier Benzaldehydmoleküle führten zu einem enantiomerenreinen (*R*)-Benzoin mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % [Iding, 1998].

Das synthetische Potenzial der BFD aus *Ps. putida* ausgehend von zwei Aldehyden als Substrate wurde unter Verwendung des rekombinanten Enzyms [Tsou et al., 1990] sehr ausführlich untersucht [Dünnwald & Müller, 2000; Iding et al., 2000]. Eine Acyloinkondensation des Acetaldehyds (Acylakzeptor) mit verschiedenen, unterschiedlich substituierten, aromatischen, heteroaromatischen und sogar zyklischen aliphatischen und konjugierten, ungesättigten Aldehyden als Acyldonor konnte gezeigt werden. Allerdings zeigte sich dabei, dass Acetaldehyd als einziger aliphatischer Acylakzeptor von der BFD angenommen wird. Der Acetaldehyd kann auch am aktiven Zentrum der BFD gebunden und anschließend mit einem weiteren Molekül Acetaldehyd unter Bildung von (*S*)-Acetoin ligiert werden [Iding, 1998]. Diese Reaktion weist allerdings nur eine niedrige Enantioselektivität (ee=89 %), wie auch eine sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeit auf. Die stereoselektive Synthese von Benzoinderivaten ausgehend von unterschiedlich substituierten aromatischen Aldehyden wurde vor kurzem beschrieben [Demir et al., 1999].

Die PDC, die hochspezifisch für Acetaldehyd als Acyldonor ist, und die BFD, die bevorzugt aromatische Substrate als Acyldonoren annimmt, ergänzen sich als Biokatalysatoren, da sie die Synthese der tautomeren Produkte entgegengesetzter Chiralität katalysieren. Dies wird am Beispiel des Produktspektrums dargestellt, das ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd mit Hilfe der beiden  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen verfügbar ist (Abb. I-2) [Sprenger & Pohl, 1999].



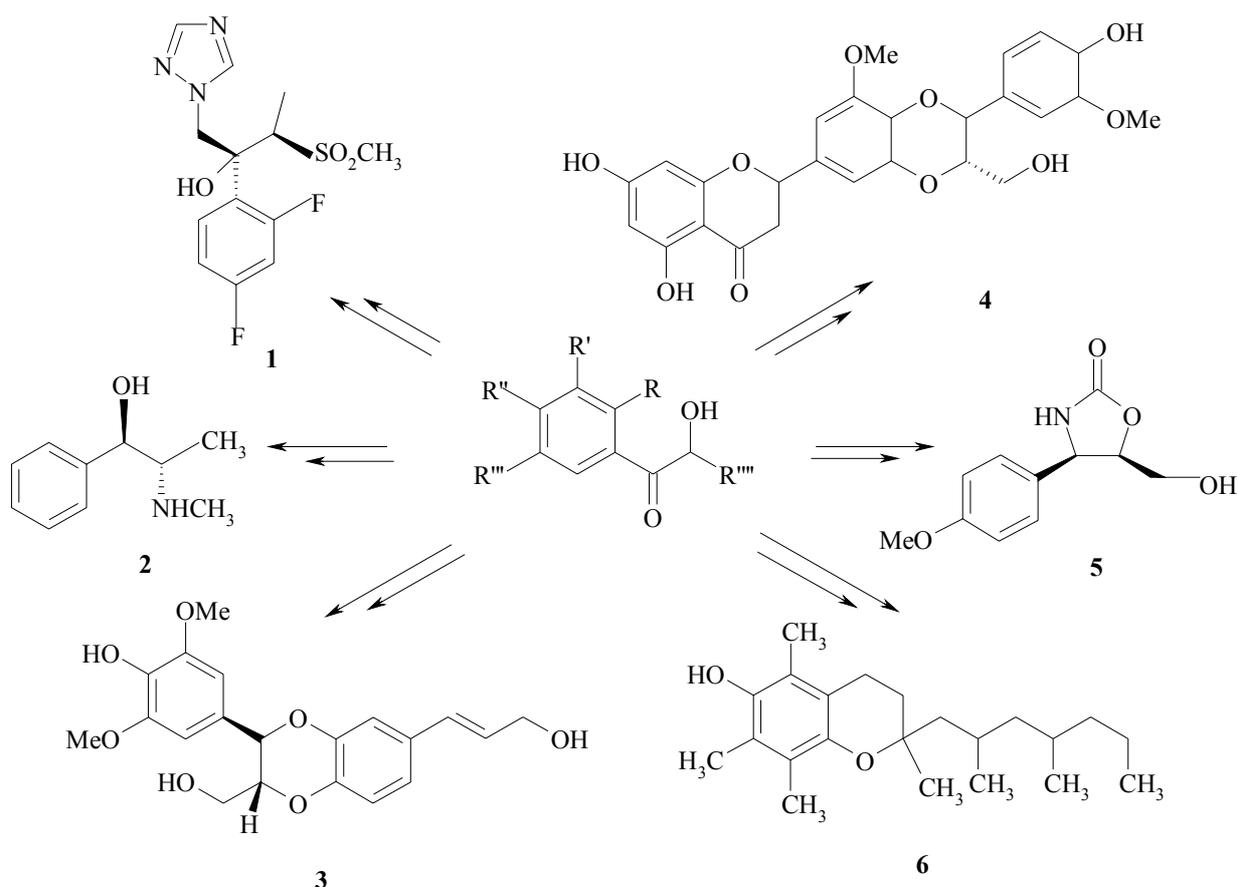
**Abb. I-2:** Vergleich des Produktspektrums der BFD und der PDC bezüglich der Carbolylation der Substrate Acetaldehyd und Benzaldehyd.

### 2.2.4.3 Phenylpyruvatdecarboxylase

Die Phenylpyruvatdecarboxylase (PhDC) (4.1.1.43) ist eine seit langem bekannte ThDP-abhängige nicht-oxidative Decarboxylase [Asakawa et al., 1968], deren synthetisches Potenzial erst vor kurzem beschrieben wurde [Guo et al., 1999; Guo et al., 2001]. PhDC wird bei Bakterien aus den Gattungen *Achromobacter*, *Acinetobacter* und *Thauera*, beim Wachstum auf Phenylalanin, Tryptophan und Mandelsäure induziert. Ihre natürliche Funktion ist die Katalyse der Decarboxylierung von Phenylpyruvat zu Phenylaldehyd, die einen Bestandteil des Katabolismus aromatischer Verbindungen darstellt [Ward & Singh, 2000]. Es wurde gezeigt, dass Zellen von *Achromobacter eurydice*, *Pseudomonas aromatica* und *Ps. putida*, die auf L-Phenylalanin haltigem Medium gewachsen sind, auch die stereoselektive Acyloinkondensation von Phenylpyruvat und Acetaldehyd katalysieren, die zu (R)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon führt. Die Synthese dieses chiralen  $\alpha$ -Hydroxyketons wurde auch mit teilweise gereinigter PhDC durchgeführt [Guo et al., 1999; Guo et al., 2001].

### 2.2.5 2-Hydroxyketone – Produkte der Ligasereaktion der ThDP-abhängigen Enzyme

Chirale 2-Hydroxyketone sind wichtige chirale Synthone in der organischen Synthese, die vor allem als Vorstufen bei der Synthese natürlicher Stoffe ihre Verwendung finden. In Abb. I-3 sind einige, aus pharmakologischer Sicht interessante Zielverbindungen gezeigt, die ausgehend von 2-Hydroxyketonen dargestellt werden können.



**Abb. I-3:** 2-Hydroxyketone als chirale Bausteine in der organischen Synthese.

1) Das Fungizid Sch42427(R,R) wird bei der Behandlung von AIDS-Patienten eingesetzt. [Gala et al., 1996].  
 2) L-Ephedrin wirkt blutdrucksteigernd und zugleich anregend auf das sympathische Nervensystem [Beyer & Walter, 1991] und wird hauptsächlich in Bronchien erweiternden Mitteln verwendet. 3) Nitidanin ist ein HolZRindeninhaltsstoff der Heilpflanze *Silybum marianum*, die in der Volksmedizin für die Heilung von Leberkrankheiten verwendet wird [Morazzoni & Bombardelli, 1995]. 4) 5-Methoxyhydrnocarpin wird als potenzieller Inhibitor der MDR (multidrug resistant)-Pumpe der mikrobiellen Zellen zusammen mit einem Antibiotikum eingesetzt [Stermitz et al., 2000]. 5) (-)-Cytosazon ist ein potenzieller Inhibitor der Cytokinproduktion, der in der Immunoterapie eingesetzt werden kann [Kakeya et al., 1999; Seki & Mori, 1999]. 6) Vitamin E [Fuganti & Grasseli, 1982].

In der organischen Chemie werden 2-Hydroxyketone vom Benzointyp seit langem durch die C-C-knüpfende Benzoinreaktion unter Verwendung von Thiazoliumsalzen als Katalysatoren synthetisiert [Kuebrich et al., 1971]. In der letzten Zeit werden Methoden auf der Basis anderer chemischer Reaktionen entwickelt, die chirale 2-Hydroxyketone mit Hilfe von chiralen chemischen Katalysatoren herstellen [Hashiyama et al., 1992; Adam et al., 1994; Adam et al., 1995; Koike et al., 2000].

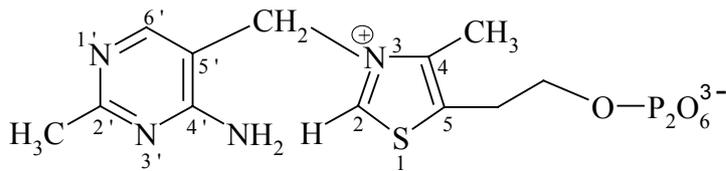
Alternativ können enantiomerenreine 2-Hydroxyketone mit Hilfe der enzymatischen Katalyse dargestellt werden, die ohne die Verwendung von Schutzgruppenstrategien, die zeit- und kostenaufwendig sind, durchgeführt werden kann. So wurde z.B. die Herstellung von 2-

Hydroxyketonen durch Reduktion von Diketonen mit Hefezellen beschrieben [Nakamura et al., 1996], die aber wegen ihrer niedrigen Regio- und Chemoselektivität eine Mischung der beiden möglichen Hydroxyketone und des vicinalen Diols lieferte. Chirale 2-Hydroxyketone konnten auch durch kinetische Spaltung von 2-Hydroperoxyketonen mittels Peroxidase [Adam et al., 1995] und 2-Hydroxy- [Adam et al., 1996] oder 2-Acetoxyketonen [Gala et al., 1996; Demir et al., 1998] mittels Lipasen hergestellt werden. Diese Reaktionen zeigen allerdings die charakteristischen Nachteile der kinetischen Racematspaltung: der Umsatz beträgt maximal 50 %, die Trennung des erwünschten Produkts vom nicht umgesetzten Enantiomer des Edukts kann problematisch sein und der Enantiomerenüberschuss sinkt bei Annäherung an den 50 %-Umsatz. Die asymmetrische Synthese mit ThDP-abhängigen  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen (Kapitel I-2.2.4) lässt diese Probleme umgehen und ermöglicht die Herstellung enantiomerenreiner 2-Hydroxyketone mit hohem Umsatz.

### **I.3 Thiamindiphosphat (ThDP)-Katalyse**

Die katalytische Aktivität vieler Enzyme ist abhängig von Cofaktoren. Das können Metallionen oder organische Moleküle - sogenannte Coenzyme - sein. Ein Apoenzym, d.h. ein cofaktorabhängiges Enzym in Abwesenheit der Cofaktoren, ist inaktiv. Erst durch die Bindung der Cofaktoren bildet sich ein Holoenzym - ein katalytisch aktiver Komplex aus Enzym und Cofaktor. Nach der Art ihrer Wechselwirkung mit dem Apoenzym unterscheidet man lösliche Coenzyme von prosthetischen Gruppen. Die löslichen Coenzyme werden nur vorübergehend an die Enzyme gebunden. Sie werden während der Enzymreaktion, an der sie beteiligt sind, verändert und müssen zur Vollendung des katalytischen Zyklus durch eine weitere unabhängige Reaktion in den Ausgangszustand zurückgebracht werden. Hingegen werden die als prosthetische Gruppe bezeichnete Cofaktoren permanent mit dem Enzym assoziiert oder sogar kovalent an das Enzym gebunden.

Viele Organismen können bestimmte essentielle Cofaktoren nicht selbst vollständig synthetisieren, deswegen müssen die Cofaktoren oder ihre Vorstufen mit der Nahrung als Vitamine aufgenommen werden. So wird das Thiamindiphosphat (ThDP) (Abb. I-4) von Menschen und Tieren in Form von Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) aufgenommen, dessen Defizienz zu der seit 1000 Jahre bekannten Beri-Beri-Krankheit führt [Lehninger, 1987].

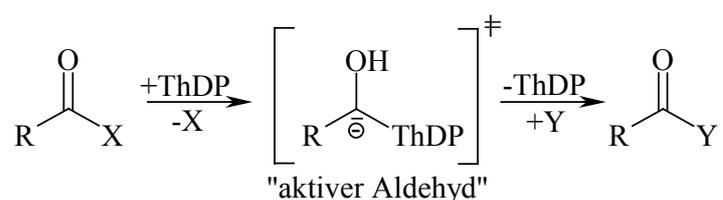


**Abb. I-4:** Struktur des Thiamindiphosphats.

ThDP-abhängige Enzyme kommen in unterschiedlichen Organismen (Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere), sowie Stoffwechselwegen vor.

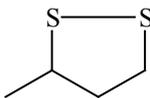
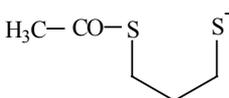
So sind z.B. die Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) und die Oxoglutaratdehydrogenase (EC 1.2.4.2) Bestandteile von Multienzymkomplexen (Oxosäure-Dehydrogenasen), die eine oxidative Decarboxylierung von 2-Oxosäuren und die Übertragung des gebildeten Acylrestes auf CoA katalysieren. Der Pyruvatdehydrogenasekomplex dient der Synthese von Acetyl-CoA, und der 2-Ketoglutaratdehydrogenasekomplex katalysiert die Synthese von Succinyl-CoA – einem Intermediat des Citronensäurezyklusses [Robinson & Chun, 1993]. Die Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1), die ein Schlüsselenzym bei der alkoholischen Gärung darstellt, katalysiert dagegen die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO<sub>2</sub> [Lehninger, 1987]. Während die Phenylpyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.43), am Phenylalaninkatabolismus [Costacurta et al., 1994] beteiligt ist, spielt die Acetolactatsynthase (EC 4.1.3.18) eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin, indem sie die Vorstufen dieser Aminosäuren 2-Acetolactat bzw. 2-Aceto-2-Hydroxybutyrat synthetisiert [Schloss, 1984; Oh et al., 2001].

Trotz der unterschiedlichsten Reaktionen, die von den ThDP-abhängigen Enzymen katalysiert werden (Tab. I-2 aus [Schellenberger, 1998]), liegt allen Reaktionen ein gemeinsamer Reaktionsmechanismus zugrunde, in dem das ThDP eine Hauptrolle spielt (Abb. I-5). Die Bindung von ThDP an den Carbonylkohlenstoff des Substratmoleküls führt zu der Abspaltung der Abgangsgruppe X unter Bildung eines hoch aktiven Intermediats – des sog. „aktiven Aldehyds“, der anschließend auf das Akzeptormolekül Y übertragen, bzw. durch Proton freigesetzt wird. Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme haben damit die Fähigkeit zur Spaltung wie auch zur Bildung von C-C-Bindungen.



**Abb. I-5:** Allgemeines Reaktionsschema ThDP-abhängiger Enzymreaktionen.

**Tab. I-2:** Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme.  
 R-CO-X=Substrat; X=Abgangsgruppe; Y=Akzeptormolekül; R-CO-Y=Produkt.

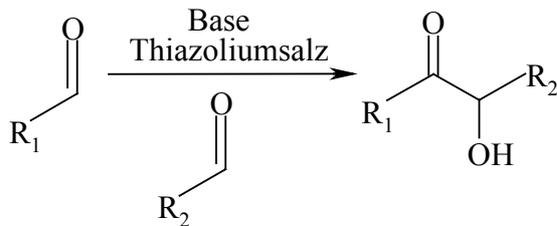
Enzym [EC-Nummer]	R-CO-X	Y	R-CO-Y	X
Pyruvatdecarboxylase [4.1.1.1]	$\text{CH}_3\text{-CO-CO}_2^-$	$\text{H}^+$	$\text{CH}_3\text{-CO-H}$	$\text{CO}_2$
Benzoylformiat- decarboxylase [4.1.1.7]	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CO}_2^-$	$\text{H}^+$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-H}$	$\text{CO}_2$
Indolpyruvat- decarboxylase [4.1.1.74]	$\text{C}_8\text{H}_6\text{N-CH}_2\text{-CO}_2^-$	$\text{H}^+$	$\text{C}_8\text{H}_6\text{N-CH}_2\text{-CO-H}$	$\text{CO}_2$
Phenylpyruvat- decarboxylase [4.1.1.43]	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CO-CO}_2^-$	$\text{H}^+$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CO-H}$	$\text{CO}_2$
Glyoxylatcarboligase [4.1.1.47]	$\text{H-CO}_2^-$	$\text{OCH-CO}_2^-$	$\text{OCH-CH}_2\text{O-CO}_2^-$	$\text{CO}_2$
Benzaldehydlyase [4.1.2.38]	$\text{Ph-COCHO-Ph}$	$\text{H}^+$	$\text{Ph-CHO}$	$\text{Ph-CHO}$
Acetolactatsynthase [4.1.3.18]	$\text{CH}_3\text{-CO-CO}_2^-$	$\text{CH}_3\text{-CO-}$ $\text{CO}_2^-$	$\text{CH}_3\text{-CO-}$ $\text{COH(CH}_3\text{)CO}_2^-$	$\text{CO}_2$
Transketolase [2.2.1.1]	$\text{CH}_2\text{OH-CO-}$ $\text{CHOH-R}^1$	$\text{R}^2\text{-CHO}$	$\text{CH}_2\text{OH-CO-}$ $\text{CHOH-R}^2$	$\text{R}^1\text{-CHO}$
Pyruvatoxidase [1.2.3.3]	$\text{CH}_3\text{-CO-CO}_2^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{CH}_3\text{-CO-OPO}_3^{2-}$	$\text{CO}_2$
Dehydrogenasen (z.B. Pyruvatdehydrogenase) [1.2.4.1]	$\text{CH}_3\text{-CO-CO}_2^-$		$\text{H}_3\text{C-CO-S}$ 	$\text{CO}_2$

### 3.1 Die Katalyse von ThDP im freien Zustand

Der katalytische Mechanismus der ThDP-abhängigen Enzyme lässt sich als eine cyanidähnliche Umpolungskatalyse beschreiben [Breslow, 1956; Breslow, 1958; Breslow & McNelis, 1959]. Diese beruht auf einer ziemlich hohen Acidität des Wasserstoffatoms am Thiazoliumring ( $\text{pK}_a$  des freien ThDP liegt zwischen 17 und 18 [Kluger, 1987]), und auf der Fähigkeit des Thiazoliumrings, eine negative Ladung an dem ThDP-gebundenen Kohlenstoffatom des Substrats durch Delokalisation zu stabilisieren.

Ein chemisches Pendant der durch die ThDP-abhängigen Enzyme katalysierten Umsetzungen ist die Stetter-Reaktion (Abb. I-6) [Stetter et al., 1976; Knight & Leeper, 1998], in der

Thiazoliumsalze für die Verknüpfung von Aldehyden eingesetzt werden. Es handelt sich bei dieser Reaktion um eine Variante der Benzoinkondensation (Staudinger, 1913). Allerdings können in der Stetter-Reaktion sowohl aromatische als auch aliphatische Aldehyde umgesetzt werden, während die von Cyanid katalysierte Benzoinkondensation auf aromatische Benzaldehyde beschränkt ist.



**Abb. I-6:** Stetter-Reaktion.

Eine Deprotonierung des C-2 des Thiazoliumringes führt zu einem ThDP-Ylid, in dem die negative Ladung am Kohlenstoff durch die positive Ladung am benachbarten Stickstoffatom stabilisiert wird. Dies wird in der nicht enzymatischen Reaktion durch eine starke Base in der nicht wässrigen Lösung erreicht. Als ein lokalisiertes Carbanion kann ein Ylid, das eine katalytisch aktive Form des ThdP darstellt, als Analogon des Cyanids betrachtet werden. Das hohe nukleophile Potenzial des im Kontakt mit den d-Elektronen des Schwefelatoms stehenden Carbanions<sup>1</sup> ermöglicht eine Umpolung der elektrophilen Reaktivität am Carbonylkohlenstoff des Substrates und Bildung des Edukt-ThDP-Komplexes.

### 3.2 Die Katalyse von ThDP im enzymgebundenen Zustand

Die NMR-Analyse des <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H Austauschs der C2-H Bindung hat gezeigt, dass die Bildung der aktiven Form des ThDP durch Deprotonierung des Thiazoliumrings im enzymgebundenen Cofaktor mindestens um 4 Größenordnungen höher ist als im freien Cofaktor [Kern et al., 1997]. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise diese Steigerung der Dissoziationsgeschwindigkeit in der Proteinumgebung erreicht wird. Dies wurde durch die Analyse der ThDP Konformation im aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme und des Zusammenwirkens des ThDP mit dem Apoenzym untersucht.

<sup>1</sup>dieser Kontakt erwies sich als unentbehrlich: ein Austausch des Schwefelatoms gegen das Stickstoffatom führt zu einem völligen Aktivitätsverlust [Schellenberger, 1998].

Im Laufe der letzten 10 Jahre wurden die 3D-Strukturen verschiedener ThDP-Enzyme aufgeklärt. Dies sind die Transketolasen (TK) aus *Saccharomyces cerevisiae* [Lindqvist et al., 1992; Nikkola et al., 1994] und *Escherichia coli* [Littelchild & Turner, 1995; Schneider & Lindqvist, 1998], die Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus planarum* (*L. p.* POX) [Müller et al., 1993; Müller et al., 1994], die PDC aus *Saccharomyces uvarum* [Dyda et al., 1993], *Saccharomyces cerevisiae* [Arjunan et al., 1996] und *Zymomonas mobilis* (*Z. m.* PDC) [Dobritzsch et al., 1998] und die BFD aus *Pseudomonas putida* (*Ps. p.* BFD) [Hasson et al., 1998].

Die Polypeptidkette einer Untereinheit dieser Enzymen ist in drei Domänen unterteilt. Die aminoterminal Domäne ( $\alpha$ -Domäne) bindet den Pyrimidinring des ThDP, während die carboxyterminale ( $\gamma$ -) Domäne der benachbarten Untereinheit den Diphosphatrest des Cofaktors bindet, so dass jedes von vier aktiven Zentren von zwei Monomeren gebildet wird. Hierbei wird die Rolle des ThDP als verbindende Komponente zwischen zwei Monomeren zu einem Dimer deutlich. Die mittlere ( $\beta$ -) Domäne vermittelt den Kontakt zwischen den Dimeren. Die TK stellt ein Dimer mit zwei aktiven Zentren dar, während bei anderen ThDP-Enzymen durch Bindung von 2 Dimeren ein Homotetramer (PDC und BFD) oder ein Heterotetramer (POX) mit 4 aktiven Zentren gebildet wird [Müller et al., 1993; Hasson et al., 1998]. Die an der ThDP-Bindung beteiligten Domänen sind bei allen ThDP-Enzymen ähnlich [Hasson et al., 1998].

Das ThDP liegt in ThDP-Enzymen tief verborgen in einer hydrophoben Tasche zwischen zwei Monomeren. Es ist nicht kovalent an die Enzyme gebunden. Untersuchungen zur Bindung von unterschiedlichen ThDP-Analoga haben gezeigt, dass die Wasserstoffbindungen zwischen den Stickstoffatomen des Aminopyrimidinrings und den Aminosäureresten im aktiven Zentrum eine Nebenrolle bei der Cofaktorbindung spielen: die Bindung des ThDP erfolgt vor allem durch die Beteiligung des ThDP an der Komplexbildung von zweiwertigen Metallionen (meistens  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) mit den Aminosäuren des Apoenzyms. Die an der Bindung des Metallions beteiligten Aminosäuren sind ein Teil des hoch konservierten Strukturmotivs in ThDP-Enzymen [Hawkins et al., 1989].

Das ThDP ist im aktiven Zentrum in einer sog. „V-Konformation“ gebunden [Shin et al., 1977]. Diese wird neben Wasserstoffbrücken des Aminopyrimidinrings durch van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Seitenkette einer hydrophoben voluminösen Aminosäure (z.B. *Z. m.* PDC1415, *Ps. p.* BFDL403) stabilisiert [Guo et al., 1998]. Obwohl diese Konformation im Vergleich mit anderen, durch Drehung der beiden Ringebenen um die Methylbrücke möglichen ThDP-Konformationen energetisch ungünstig ist [Shin et al., 1977; Friedemann & Neef, 1998], ist sie evolutionär bevorzugt, weil dadurch ein aktives Zusammenwirken zwischen zwei Ringelementen des Cofaktors gewährleistet wird. Eine Protonierung des N1-

Atoms des Aminopyrimidinrings durch Wechselwirkung mit dem Glutamatrest, der ebenso in allen untersuchten aktiven Zentren konserviert ist, führt zu der Verlagerung der positiven Ladung auf die 4'-Aminogruppe und Stabilisierung der tautomeren Iminoform. Da diese durch die V-Konformation des ThDP dem reaktiven C-2 Atom des Thiazoliumrings direkt benachbart ist, wird die Steigerung der Dissoziationsgeschwindigkeit der C2-H-Bindung durch das naheliegende freie Elektronenpaar der Iminogruppe gefördert [Schellenberger, 1998].

Überraschenderweise wurden keine weiteren Aminosäuren neben Glutamat und den an der ThDP-Bindung beteiligten Aminosäureresten gefunden, die in den aktiven Zentren der verschiedenen ThDP-abhängigen Enzyme, inklusive der verwandten BFD und PDC, konserviert sind [Hasson et al., 1998]. Dies kann durch die essentielle Rolle des Cofaktors im katalytischen Mechanismus dieser enzymatischen Familie erklärt werden. Außerdem aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität und Katalyseschritte unterscheiden sich Übergangszustände, die in verschiedenen Enzymen stabilisiert werden sollen. Dies führt zu den Unterschieden in den aktiven Zentren.

## I.4 Die Benzaldehydlyase

Die ThDP-abhängige Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) wurde bisher nur in dem Bakterium *Pseudomonas fluoreszens* gefunden [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Der Stamm *Pseudomonas fluoreszens* Biovar I, der aus Holzresten einer Zellulosefabrik isoliert wurde, zeigte die Fähigkeit, ligninähnliche Verbindungen, wie Benzoin oder Anisoin zu metabolisieren und auf ihnen als einziger Kohlenstoff- und Energiequellen zu wachsen. Es stellte sich heraus, dass die Benzaldehydlyaseaktivität für den Katabolismus dieser aromatischen  $\alpha$ -Hydroxyketone unerlässlich ist. Die BAL aus *Pseudomonas fluoreszens* (*Ps. fl.* BAL) katalysiert die Spaltung der Acyloin-Bindung von Benzoin, bzw. Anisoin in die jeweiligen Aldehyde, die anschließend wahrscheinlich in einem für aromatische Verbindungen gemeinsamen  $\beta$ -Ketoacidweg abgebaut werden [Stanier & Ornston, 1973]. Die natürliche Funktion der BAL und der metabolische Weg, an dem sie beteiligt ist, sind zur Zeit unbekannt.

Neben Benzoin wurden als mögliche Substrate symmetrische und unsymmetrische Derivate des Benzoins, wie auch heteroaromatische Verbindungen untersucht. Die Aktivität konnte

aber nur ausgehend von Benzoin und Anisoin nachgewiesen werden. Weder die getesteten Diketone und Diole noch das aliphatische 2-Hydroxyketon Acetoin werden von der BAL gespalten [Gonzalez & Vicuna, 1989].

Die Benzaldehydlyase wurde als Aldolase klassifiziert [EMBL], dies scheint jedoch nicht korrekt zu sein. Wie im Kapitel I-2.1 beschrieben wurde, katalysieren die Aldolasen die reversible C-C-Verknüpfung zweier Carbonylverbindungen, was zur Bildung einer  $\beta$ -Hydroxycarbonylverbindung führt, während die BAL die katalytische Aktivität ausgehend von  $\alpha$ -Hydroxyketonen aufweist.

Die von Gonzalez und Vicuna beschriebene katalytische Aktivität der *Ps.fl.* BAL beschränkte sich im Gegensatz zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen nur auf die Spaltung der C-C-Bindung von aromatischen  $\alpha$ -Hydroxyketonen [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Die Rückreaktion konnte nicht nachgewiesen werden.

Das BAL kodierende Gen (*bzl*) wurde 1994 kloniert und sequenziert [Hinrichsen et al., 1994].

## II. Motivation und Zielsetzung

Da die BAL bisher kaum charakterisiert ist, stand die Untersuchung der proteinchemischen und enzymologischen Eigenschaften des Enzyms im Vordergrund. Dazu sollte zunächst die rekombinante Verfügbarkeit des Enzyms gewährleistet werden. Den Ausgangspunkt für diese Arbeiten bildete das von dem Herrn Prof. Vicuna (Pontificia Universidad Catolica de Chile, Santiago) zur Verfügung gestellte BAL-Gen. Durch den Zugang zu dem BAL-Gen war die Möglichkeit der Darstellung der BAL als Hexahistidin-fusionsprotein gegeben, die ein einfaches einstufiges Reinigungsverfahren zu homogenen BAL-Präparation aus dem Rohextrakt erlauben würde und die Charakterisierung des Enzyms erleichtern konnte. Wichtige Parameter bei den Untersuchungen betreffen die Bestimmung von

- nativem Molekulargewicht,
- pI-Wert,
- pH-Aktivitäts- und Stabilitätsoptima,
- Temperaturstabilität,
- struktureller Stabilität in Gegenwart von Denaturierungsmitteln,
- Einfluss zugesetzter Cofaktoren auf die Stabilität des Enzyms.

Darüberhinaus sollte die von Gonzalez und Vicuna nur sehr unzureichend untersuchte Lyasereaktion des Enzyms [Gonzalez & Vicuna, 1989] näher charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Etablierung eines funktionalen Testsystems
- kinetische Untersuchungen
- Untersuchungen zum Substratspektrum
- Bestimmung der Enantioselektivität der Lyasereaktion

Ergänzend hierzu war es von Interesse, das Potenzial der BAL zur Katalyse weiterer für ThDP-abhängige Enzyme typischer Reaktionen zu bestimmen. In Frage kamen hier die Ligasereaktion als Umkehrreaktion der Lyasereaktion und die Decarboxylierung von 2-Ketocarbonsäuren. Beide Reaktionstypen zeigen die ebenfalls ThDP- und  $Mg^{2+}$ -abhängigen  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen.

Sequenzvergleiche sollten weitere Aufschlüsse über mögliche Ähnlichkeiten geben und auch die Basis für Mutagenesestudien liefern, anhand derer für die Katalyse relevante Aminosäurereste identifiziert werden sollten.

### III. Ergebnisse und Diskussion

#### III.1 Darstellung der rekombinanten Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluoreszens*

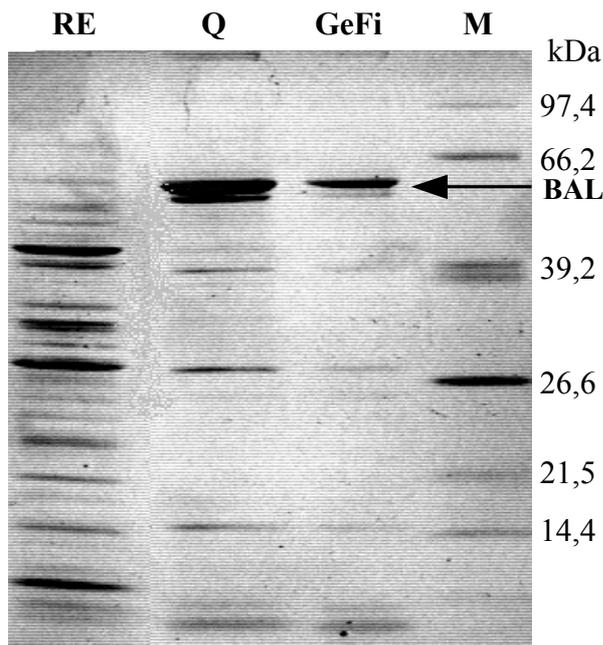
##### 1.1 Expression der BAL in *E.coli*

Das am Anfang dieser Arbeit zur Verfügung stehende Plasmid pUC18/*bzl* [Hinrichsen et al., 1994] ermöglichte eine rekombinante Expression der wt-BAL aus *Pseudomonas fluoreszens* in *E.coli*. Das Plasmid stellt einen Klonierungsvektor pUC18 dar, der ein DNA-Fragment aus *Pseudomonas fluoreszens* mit dem vollständigen BAL-Gen (*bzl*) beinhaltet. Die Initiation der Genexpression erfolgt durch den IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor des Klonierungsvektors. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde in dem *E.coli*-Stamm DH5- $\alpha$  im 1 L – 1,5 L Maßstab durchgeführt. Die typische Zellausbeute lag bei ca. 4 g Zellfeuchtmasse / 1 L Vollmedium.

Der Zellaufschluss erfolgte entweder durch Vermahlen mit Glasperlen in einem Desintegrator oder durch Ultraschall-Behandlung der Zellsuspension in Tris oder KPi-Puffer. Der Wechsel des Aufschlusspuffers von Tris-Puffer, pH 8,0 zu KPi-Puffer pH 6,5 erbrachte eine Steigerung der spezifischen Aktivität im Rohextrakt vom 1,3 U/mg auf 2,8 U/mg (Tab. III-1). Die zellspezifische Aktivität unter Verwendung von KPi - Puffer betrug 130 U/g Zellen. Der Anteil der rekombinanten BAL am löslichen Protein ließ sich im silbergefärbten SDS-Gel im Vergleich zu einer bekannten aufgetragenen Proteinmenge als ca. 5 % abschätzen (Abb. III-1).

##### 1.2 Aufreinigung der BAL über Anionenaustauschchromatographie (AAC)

Eine Anionenaustauschchromatographie (AAC) wurde als effizienter Reinigungsschritt zur Aufreinigung der BAL aus *Ps. fluoreszens* beschrieben [Gonzalez & Vicuna, 1989] und konnte auch in dieser Arbeit für die Aufreinigung der rekombinanten wt-BAL aus *E.coli* erfolgreich eingesetzt werden. Mit einer SDS-PAGE wurde eine wesentliche Anreicherung der BAL nach diesem Aufreinigungsschritt gezeigt (Abb. III-1).



**Abb. III-1:** Silbergefärbte SDS-PAGE (12,5 %) der Anionenaustauschchromatographie der BAL. **RE** - Rohextrakt; **Q** - Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose; **GeFi** - Gelfiltration; **M** - Molekulargewichtstandard [Roche Molecular Diagnostics].

Allerdings erwies sich die BAL im Unterschied zu den Literaturangaben [Hinrichsen et al., 1994] als instabil in Tris-Puffer, pH 8,0. Daher führte dieser Puffer bei der Aufreinigung zu großen Aktivitätsverlusten. Durch Verwendung von KPi-Puffer mit pH 6,5 gelang es, diese Verluste zu vermeiden. Die erzielten Ausbeuten der Aufreinigung lagen bei 70-75 %. Die Ergebnisse der AAC mit KPi-Puffer im Vergleich zu AAC mit Tris-Puffer pH 8,0 sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. III-1).<sup>1</sup>

Die AAC unter optimierten Bedingungen erbrachte einen Aufreinigungsfaktor von 7. Daher konnten mit diesem Aufreinigungsschritt die geeigneten Enzymchargen für die Etablierung des Enzymaktivitätstests und für die vergleichenden Stabilitätsuntersuchungen der wt-BAL mit dem C-terminalen Hexahistidininfusionsprotein aufgereinigt werden. Die Enzympräparationen wurden anschließend über Gelfiltration entsalzt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei -20 °C gelagert.

---

<sup>1</sup>Die Aktivitätsmessungen wurden bei diesen Aufreinigungen mit dem in der Literatur beschriebenen Substratpuffer (0,1 mM Benzoin in Tris, pH 8,0) ausgeführt und können zwar untereinander, aber nicht mit den weiteren Aktivitäten verglichen werden, die mit einer Benzoinkonzentration von 1,5 mM durchgeführt wurden. Denn bei kinetischer Messungen (s. Kapitel III-5.1.1) wurde festgestellt, dass  $V_{\max}$  der BAL bei einer Substratkonzentration von 0,1 mM nicht erreicht wird.

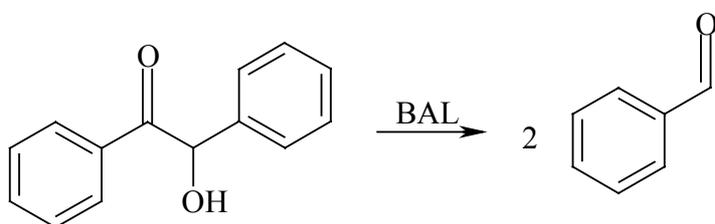
**Tab. III-1:** Ergebnisse der Anionenaustauschchromatographie der BAL in verschiedenen Puffern.

wt-BAL	Tris-Puffer, pH 8,0	KPi-Puffer, pH 6,5
Rohextrakt [U / mg ]	1,3	2,8
nach Anionenaustauscher (Q-Sepharose) [U / mg ]	4	19
Reinigungsfaktor	3	7
Aktivitätsausbeute [%]	18	72

### 1.3 Optimierung des Aktivitätstests

Die BAL katalysiert die Spaltung der Acyloin-Bindung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen, wodurch die doppelte molare Menge des entsprechenden Aldehyds gebildet wird (Abb. III-2).

Als Standardsubstrat für die Charakterisierung der Lyaseaktivität der BAL und der Muteine wurde Benzoin verwendet. 1 U der Lyaseaktivität der BAL wird als die Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol Benzoin bei 30 °C in einer Minute umsetzt, definiert.

**Abb. III-2:** BAL-katalysierte Spaltung der Acyloinbindung des Benzoins.

Es wurde in der Literatur ein direkter photometrischer Test beschrieben, mit dem die katalytische Aktivität der BAL anhand der Produktzunahme ermittelt werden kann [Gonzalez & Vicuna, 1989] (siehe auch Kapitel V-4.10.1).

Allerdings hat der direkte Enzymtest einige wesentliche Nachteile, die seine Anwendung beschränken. Sowohl Edukt als auch Produkt der BAL-Reaktion haben neben sehr ähnlichen Absorptionsspektren das Absorptionsmaximum bei der gleichen Wellenlänge von 250 nm und vergleichbare Extinktionskoeffizienten. Im Laufe der Benzoinspaltung nimmt die Absorption mit der Zunahme der Produktkonzentration zu, weil zwei Moleküle des Produkts aus jedem Molekül des Substrats gebildet werden. Dadurch kann die enzymatische Reaktion bei 250 nm

direkt verfolgt werden. Da der photometrische Aktivitätstest aber bei hohen Absorptionswerten nicht anwendbar ist, führt die Erhöhung der Substratkonzentration im Assay zu einer Verkleinerung des Messbereichs und folglich zu einer Beschränkung der Enzymaktivität, die gemessen werden kann. So muss z.B. bei einer Substratkonzentration von 0,15 mM die zu messende Enzymaktivität unter 0,5 U/ml liegen, um eine Messzeit von 1 min zu gewährleisten.

Der direkte Aktivitätstest kann auch dadurch erschwert werden, dass die BAL möglicherweise auch die Benzoinbildung aus Benzaldehyd katalysiert (was in dieser Arbeit überprüft werden sollte). In diesem Fall kann der Zeitraum des Aktivitätstests für Lyaseaktivität in Abhängigkeit von den kinetischen Daten der Ligasereaktion abgekürzt werden, da die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Benzoinspaltung nur solange gemessen werden kann, wie die Rückreaktion wegen der niedrigen Benzaldehydkonzentration zu vernachlässigen ist und die Absorptionsänderung sich nur aus der Hinreaktion ergibt.

Die Anwendung des gekoppelten Enzymtests für die Charakterisierung der Lyaseaktivität hat folgende Vorteile im Vergleich zum direkten Test: 1. durch eine enzymatische Folgereaktion werden die gebildeten Aldehyde aus der Reaktionsmischung entfernt und die von der BAL katalysierte Lyasereaktion kann nur in einer Richtung ablaufen; 2. die Messung der Absorptionsänderung im Laufe der Reaktion erfolgt bei einer Wellenlänge, bei der weder Edukt noch Produkt ihre Absorptionsmaxima haben. Hierbei wurde als Hilfsenzym eine Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber eingesetzt, die den gebildeten Benzaldehyd unter äquimolarem Verbrauch des NADH zu Benzylalkohol reduziert. Die Konzentrationsänderung an NADH kann bei einer Wellenlänge von 340 nm spektrophotometrisch verfolgt werden.

Durch einen Überschuss der Alkoholdehydrogenase wird die Reaktion, in der der Aldehyd gebildet wird, limitierend und die Abnahme des NADH ist direkt proportional der Lyaseaktivität der BAL.

Um die Assaybedingungen zu optimieren, wurde die katalytische Aktivität der BAL bei unterschiedlichen pH-Werten in zwei verschiedenen Assaypuffer verglichen (Abb. III-3). Die Cofaktorkonzentrationen (0,1 mM  $MgCl_2$ ; 0,01mM ThDP) und die Substratkonzentration von 0,1 mM Benzoin) im Assay wurden aus der Literatur übernommen.

Der Assaypuffer mit 50 mM Tris; 0,1 mM  $MgCl_2$ ; 0,01mM ThDP pH 8.0 erwies sich als optimal für den gekoppelten enzymatischen Test und wurde in weiteren Versuchen für die Aktivitätsmessung benutzt.

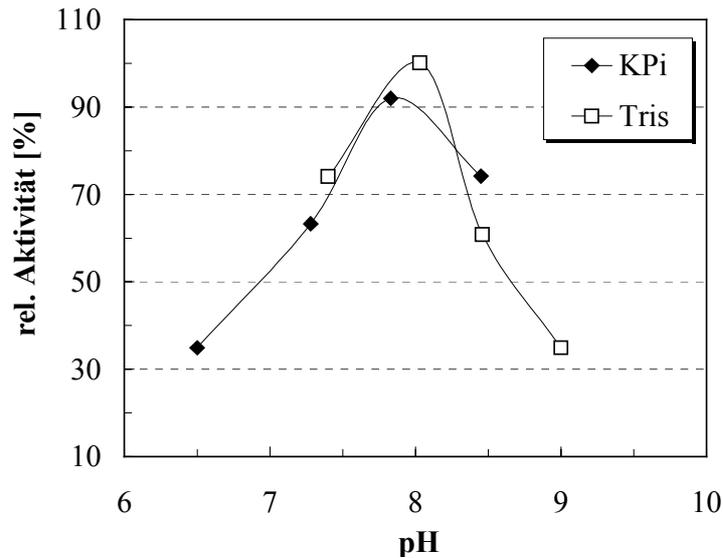


Abb. III-3: Optimierung des gekoppelten Assays bezüglich des pH-Werts.

Nach den Literaturangaben beschränkt sich die Substratspezifität der BAL auf Benzoin und Anisoin (p-Methoxybenzoin) [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Da die Löslichkeit der beiden aromatischen Verbindungen in wässrigen Lösungen sehr niedrig ist, konnte die Substratkonzentration im Assay nicht höher als 0,15 mM eingestellt werden. Diese Substratkonzentration wurde durch Rühren bei 60 °C während 30 min gelöst. (Wenn die Sättigungskonzentration bei 0,15 mM nicht erreicht wird, könnten Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmessungen wegen Variation der Substratkonzentration in den unterschiedlichen Versuchsreihen auftreten.)

Durch den Zusatz von organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser gut mischbar sind, wie z. B. PEG oder DMSO, gelingt es, höhere Substratkonzentrationen im Reaktionsansatz zu lösen, die die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit innerhalb eines größeren Zeitraums ermöglichen. Um herauszufinden, ob der gekoppelte enzymatische Test in Gegenwart dieser Lösungsmittel anwendbar ist, wurde die Abhängigkeit der Aktivität des Hilfsenzym HL-ADH von der Konzentration des PEG-400 bzw. DMSO im Assaypuffer (50 mM Tris, pH 8,0) untersucht. Während die HL-ADH-Aktivität von PEG bis zu einer Konzentration von 15 Vol. % nicht beeinflusst wurde, zeigt die HL-ADH in Gegenwart von 15 Vol. % DMSO nur 5 % ihrer Aktivität in KPi-Puffer ohne Zusätze. Also hätte der Zusatz der DMSO ins Assay zu dem größeren Aufwand der HL-ADH geführt. Daher wurde für die Untersuchung der Lyaseaktivität der BAL mit gekoppeltem enzymatischem Test der Assaypuffer mit 15 Vol. % PEG-400 in 50 mM Tris, pH 8,0 etabliert. Die Benzoinkonzentration, die in diesem Puffer bei 30 °C gelöst werden konnte, betrug 1,5-1,8 mM.

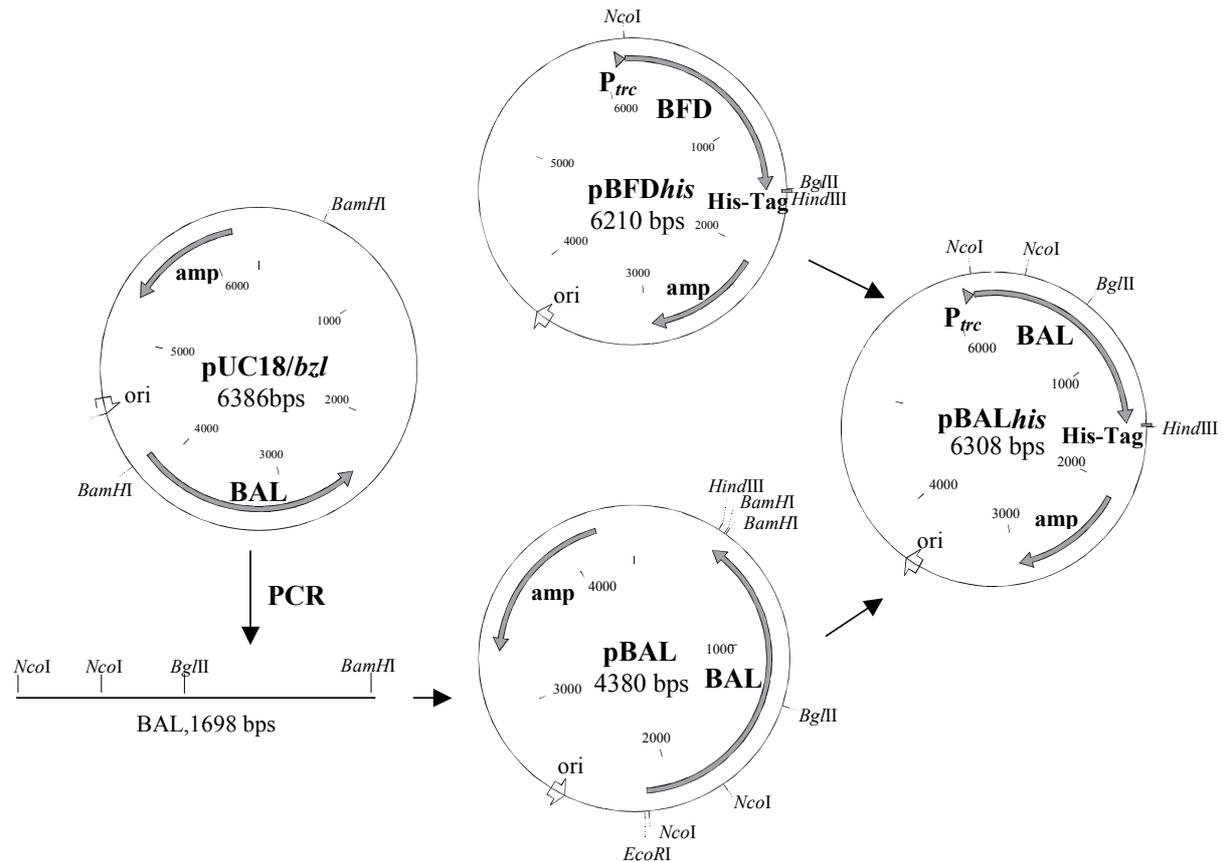
## III.2 Darstellung der rekombinanten Benzaldehydlyase (BAL) als Hexahistidininfusionsprotein (BALHis)

### 2.1 Konstruktion des Expressionsplasmids pBALhis

Durch die Expression als Fusionsprotein mit einem exponierten Hexahistidinrest kann das Zielprotein aus einem zellfreien Rohextrakt mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) homogen isoliert werden [Hochuli & Doblí, 1992]. Dies sollte eine effektive Aufreinigung des Enzyms in einem chromatographischen Schritt ermöglichen. Die Mutagenese zu einem Hexahistidininfusionsprotein kann durch Umklonierung in einen entsprechenden Expressionsvektor, der eine für einen Hexahistidinrest kodierende Sequenz enthält, durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde für diesen Zweck das rekombinante Plasmid pBFDhis benutzt (Abb. III-4).

Das Plasmid pBFDhis, das auf der Basis des Expressionsvektors pKK233-2 hergestellt wurde [Tsou et al., 1990; Iding, 1998], beinhaltet die für das carboxyterminale Hexahistidininfusionsprotein der BFD kodierende Sequenz. Das Gen enthält eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende, in der das Initiationskodon der Gensequenz liegt, und eine *BglII*-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, die sich direkt vor dem His-Tag befindet. Das BFD-Gen kann also mittels *NcoI* und *BglII*- Verdau aus dem Plasmid herausgeschnitten werden und durch eine andere Gensequenz ersetzt werden, die dadurch um einen Hexahistidinrest am C-Terminus verlängert wird. Die *NcoI*-Schnittstelle, die zur Klonierung genutzt wird, liegt hinter der Ribosomenbindungstelle des *lacZ*-Gens, so dass der optimale Abstand des Startkodons von der Shine-Dalgarno-Sequenz [Shine & Dalgarno, 1975] vorliegt. Eine Überexpression des rekombinanten Proteins wird außerdem durch einen IPTG-induzierbaren  $P_{trc}$ -Promotor gewährleistet, der ein Hybrid aus den *trp*- und *lacUV5*-Promotoren darstellt und eine elffache, bzw. dreifache Effizienz bezogen auf die parental Promotoren aufweist [Stader, 1995].

Das Plasmid enthält das für die Ampicillinresistenz kodierende  $\beta$ -Lactamasegen, das eine Selektion der rekombinanten Bakterienzellen über Ampicillin ermöglicht.



**Abb. III-4:** Konstruktion des Expressionsvektors pBALhis.

Als Ausgangsmaterial zur Klonierung des BAL-Gens stand das rekombinante Plasmid pUC18/*bzl* zu Verfügung [Hinrichsen et al., 1994]. Das Plasmid beinhaltet ein 3,7 kb-großes DNA-Fragment aus *Pseudomonas fluoreszens* mit dem BAL-Gen (*bzl*) inklusive nichtkodierender Regionen. Das rekombinante Plasmid pUC18/*bzl* wurde als Template bei einer PCR eingesetzt, bei der über die Primer die Schnittstellen für die Klonierung in den Expressionsvektor pBFDhis eingeführt werden sollten. Auf der Basis der bekannten DNA-Sequenz [Hinrichsen et al., 1994] wurden die PCR-Primer so konstruiert, dass das 5'-Ende des Gens die *NcoI* Schnittstelle erhält, in der das Startcodon ATG des BAL-Gens liegt (Abb. III-5). Die Nukleotidsequenz am 3'-Ende des *bzl* wurde durch die Wahl des PCR-Primers so geändert, dass das Stopcodon deletiert und eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt wird. Das resultierende PCR-Fragment sollte in die *NcoI* und *BglIII* Schnittstellen des Expressionplasmids ligiert werden. Das PCR-Fragment erhält eine *BamHI*-Schnittstelle und keine *BglIII*-Schnittstelle, da eine *BglIII*-Schnittstelle in der Sequenz des *bzl* vorliegt. Die *BamHI*-Restriktionsendonuklease erzeugt jedoch kohäsive Ende, die mit denen von *BglIII* kompatibel sind.

Durch die geänderten Basen im C-terminalen PCR Primer (in Abb. III-5 kursiv dargestellt) wird ein Alaninrest in der BAL-Proteinsequenz zu einem Glycinrest. Außerdem erhält sie einen zusätzlichen Serinrest, der durch die Klonierung in die *Bg/III*-Schnittstelle des Expressionsvektors entsteht.

PCR-Primer:

BAL-s 5´-CCA TGG CGA TGA TTA CAG GCG GCG AA-3´  
NcoI

BAL-as 5´-GGA TCC GAA GGG GTC CAT GCC GAT CAG AA-3´  
BamHI

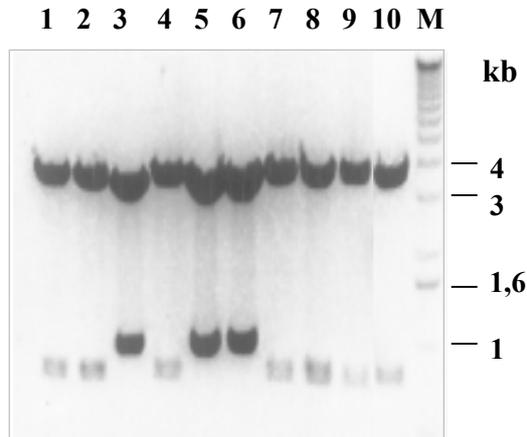
**Abb. III-5:** PCR-Primer zur Amplifikation des BAL-Gens und Einführung einer C-terminalen *BamHI*-Restriktionsschnittstelle unter Deletion des Stopcodons.

Mit diesen Primern wurde ein 1,7 kb großes Fragment amplifiziert, das im ersten Klonierungsschritt in einen mit *SmaI* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pUC18 kloniert wurde. Dazu wurden die Enden des PCR-Fragments mit Klenow Polymerase aufgefüllt und phosphoryliert. Das aus der Ligation resultierende Plasmid wurde als pBAL bezeichnet.

Die Klonierung des PCR-Fragments in pUC18 wurde durchgeführt, um den *NcoI*-Verdau des BAL-Gens zu ermöglichen. Eine Restriktionsschnittstelle für *NcoI* ist auch in der Gensequenz erhalten. Damit würde der einfache *NcoI*-Verdau zum Ausschneiden des Genfragments zwischen zwei *NcoI*-Schnittstellen führen. Um das vollständige Gen zu isolieren, sollte das Plasmid pBAL mit *BamHI* linearisiert und anschließend mit *NcoI* partiell verdaut werden.

Da der Vektor pUC18 auch eine *BamHI*-Schnittstelle besitzt, konnte das Plasmid pBAL nur dann linearisiert werden, wenn die *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende des PCR-Fragments direkt neben der *BamHI*-Schnittstelle des Vektors liegt, ansonsten würde das Plasmid in zwei Fragmente zerschnitten werden. Die Orientierung des BAL-Gens im pUC18 konnte mit einem *PstI*-Verdau bestimmt werden, da die *PstI*-Schnittstelle in der Gensequenz in einem unterschiedlichen Abstand von den Gen-Enden liegt. Die Voraussagen über die zu erwartenden Fragmentlängen waren unter Berücksichtigung der bekannten Nukleotidsequenzen des Gens und Vektors mit Hilfe des Computer-Programms *Clone Manager* möglich. Die tatsächlichen Fragmentverteilungen in einem Agarosegel zeigt

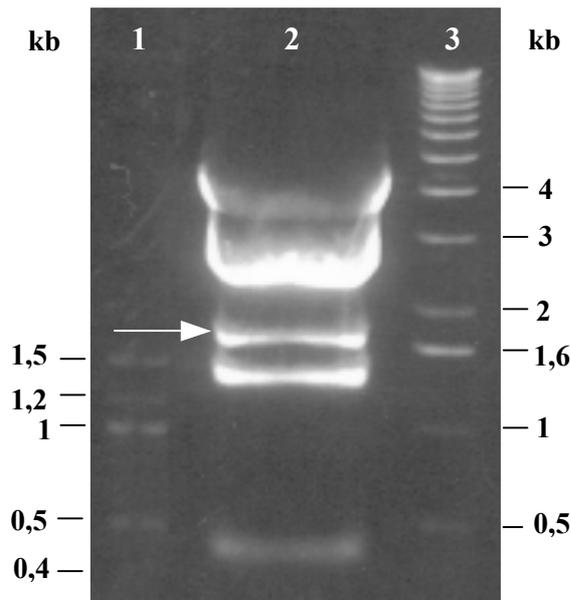
Abbildung 3-6. Lag das Gen in der gewünschten Orientierung im Plasmid pBAL vor, ergab der *Pst*I-Verdau Fragmente der Größe 3,7 kb und 0,6 kb (Abb. III-6, Spur 1, 2, 4, 7-10). Lag das *bzl* in der umgekehrten Orientierung vor, wurde das Plasmid in Fragmente der Größe 0,96 kb und 3,4 kb zerschnitten (Abb. III-6, Spur 3, 5, 6).



**Abb. III-6:** Verifizierung und Orientierung des BAL-Gens im Plasmid pBAL durch *Pst*I-Verdau.  
**1-10:** Restriktionsanalyse verschiedener Klone mit *Pst*I; **M**-1 kb-Marker [Gibco].

Das Plasmid pBAL mit der gewünschten Orientierung des Inserts wurde mit *Bam*HI linearisiert und anschließend dem Partialverdau mit *Nco*I unterworfen. Dazu wurden Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen der *Nco*I-Endonuklease angesetzt. Nach dem gleichzeitigen Abstoppen der Reaktion wurden alle Reaktionsansätze vereinigt und die Restriktionsfragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. III-7). Die Größen der Restriktionsfragmente von 3,1 kb, 2,7 kb, 1,7 kb, 1,3 kb und 0,36 kb stimmten mit den Größen überein, die unter Berücksichtigung der Gensequenz vorausgesagt wurden.

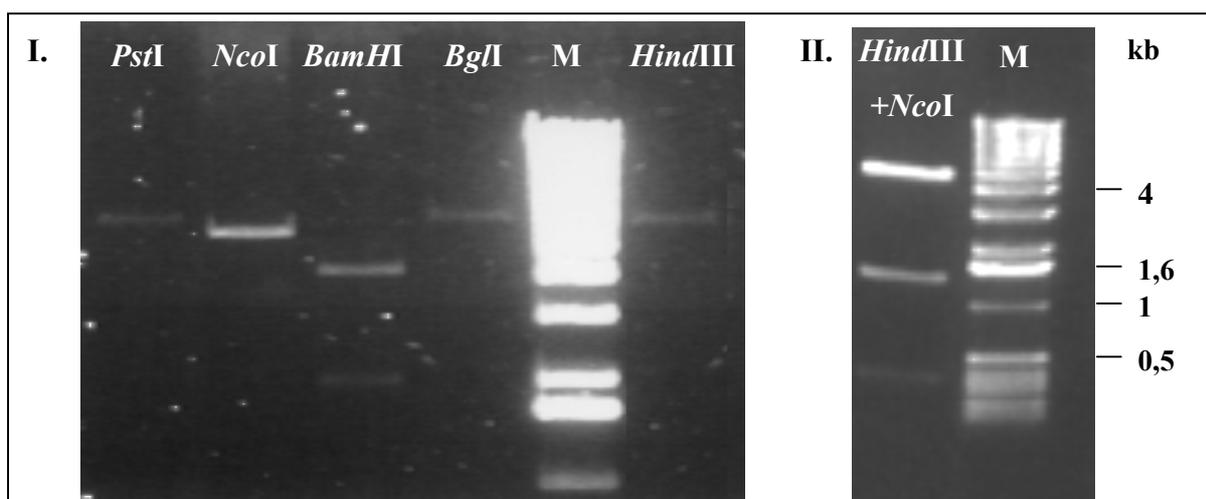
Aus dem Plasmid pBFD*his* wurde das BFD-Gen mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bgl*III herausgeschnitten und der linearisierte Vektor wurde anschließend mit dem 1,7 kb DNA-Fragment des *Nco*I-Partialverdaus ligiert. Die Ligation führte zu einem Plasmid mit der Größe von 6,3 kb, das pBAL*his* genannt wurde.



**Abb. III-7:** Partialverdau des linearisierten Plasmids pBAL mit *NcoI*.

1. 100 bp-Marker [NEB], 2. Partialverdau des Plasmids pBAL mit *NcoI*; 3. 1 kb-Marker [Fa. Gibco]. Das Zielfragment von 1,7 kb ist mit einem Pfeil markiert.

Das Plasmid konnte mit *PstI*, *BglII* und *HindIII* linearisiert werden, während mit *NcoI* ein 360 bp-Fragment und mit *BamHI* das ganze BAL-Gen aus dem Expressionsplasmid herausgeschnitten wird (Abb. III-8, I). Die Restriktionsanalyse mit *HindIII* und *NcoI* ergab drei Fragmente: das Fragment von 4,6 kb (was der Größe des verwendeten Vektors entspricht) und zwei Fragmente mit der Größe von 0,3 kb und 1,4 kb (BAL-Gen) (Abb. III-8, II).



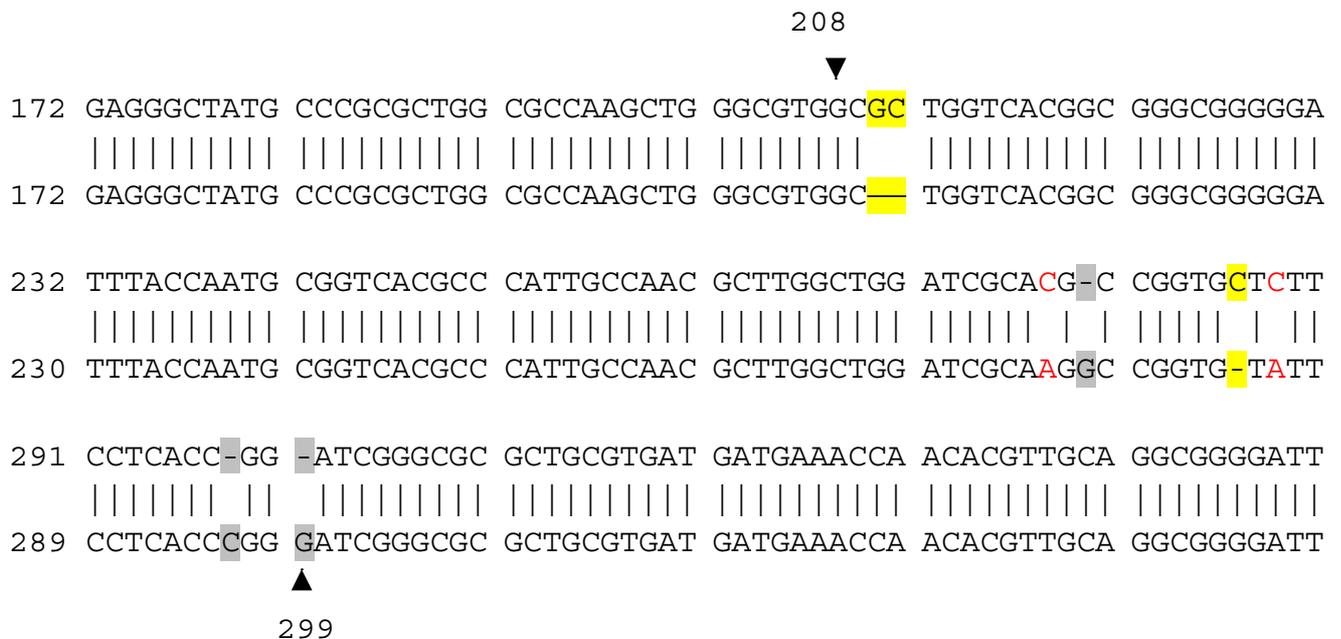
**Abb. III-8:** Restriktionsanalyse des Expressionsplasmids pBALhis.

I. Restriktionsverdau des Plasmids pBALhis mit den Endonukleasen *PstI*, *NcoI*, *BamHI*, *BglII* ; II. *NcoI/HindIII*-Verdau; M - 1 kb-Marker [Gibco].

Nach der Transformation des Plasmids pBAL<sub>his</sub> in verschiedene *E.coli* Stämme wurde ein aktives Hexahistidininfusionsprotein exprimiert.

## 2.2 Korrektur der veröffentlichten Gensequenz

Die Sequenzanalyse des klonierten PCR-Fragments zeigte bedeutende Unterschiede zu der veröffentlichten Gensequenz des *bzl* (Abb. III-9). Es wurden drei Insertionen, drei Deletionen und zwei Basenaustausche gefunden. Die infolge der ersten Insertion entstehende Leserasterverschiebung, die mit der dritten Deletion endet, führt zu einem Unterschied zu der veröffentlichten DNA-Sequenz zwischen den Positionen 210 und 299.



**Abb. III-9:** Vergleich des neu sequenzierten BAL-Gens (oben) GI:9965497 [Janzen & Pohl, 2000] mit dem Eintrag in der GenBank GI:451540 [Hinrichsen et al., 1993].

Die mit den Pfeilen markierten Nukleotide begrenzen den DNA-Bereich, der für die geänderte Aminosäuresequenz kodiert. Markierung: Insertionen – gelb, Deletionen – grau, Basenaustausche – rot.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Änderung der DNA-Sequenz nicht auf einem PCR Fehler beruht, wurde auch die Sequenz der DNA, die als Template benutzt wurde, analysiert, was eine 100%-ige Übereinstimmung mit der geänderten DNA-Sequenz des *bzl* ergab.

Die anschließende Wiederholung der Sequenzierung des Expressionplasmids pBAL<sub>his</sub> hat die beschriebenen Ergebnisse bestätigt.

## 2.3 Expression und Aufreinigung der BALHis

### 2.3.1 Optimierung des Expressionssystems

Die Effizienz des Expressionsplasmids pBALhis bezüglich der Synthese von rekombinanter BALHis in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen wurde anhand der spezifischen Enzymaktivität nach gleicher Induktionszeit unter identischen Wachstumsbedingungen bestimmt. Die höchste Expression der BALHis konnte unter Verwendung des Expressionssystems *E. coli* SG13009 [pBALhis] erreicht werden (Abb. III-10).

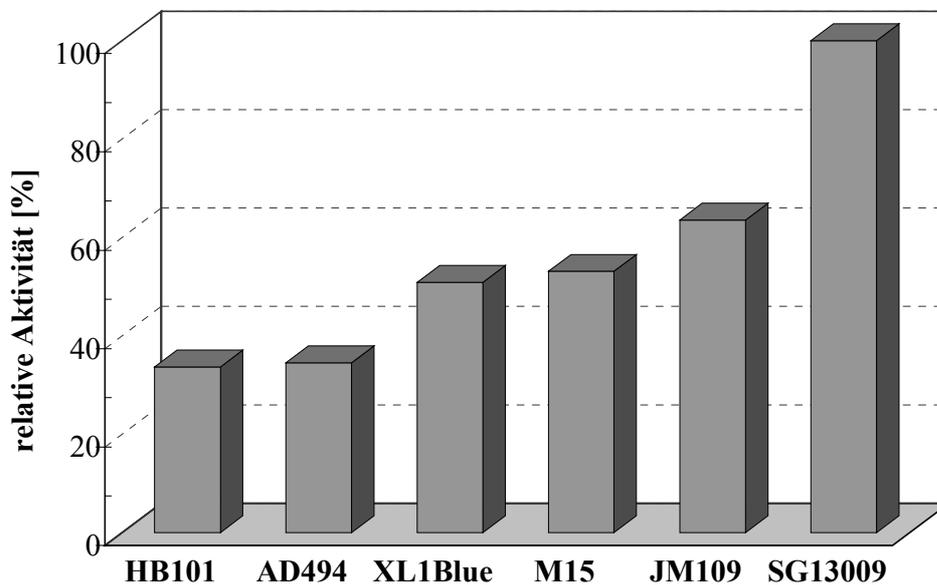


Abb. III-10: Vergleich der Expressionsrate der wt-BALHis in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen.

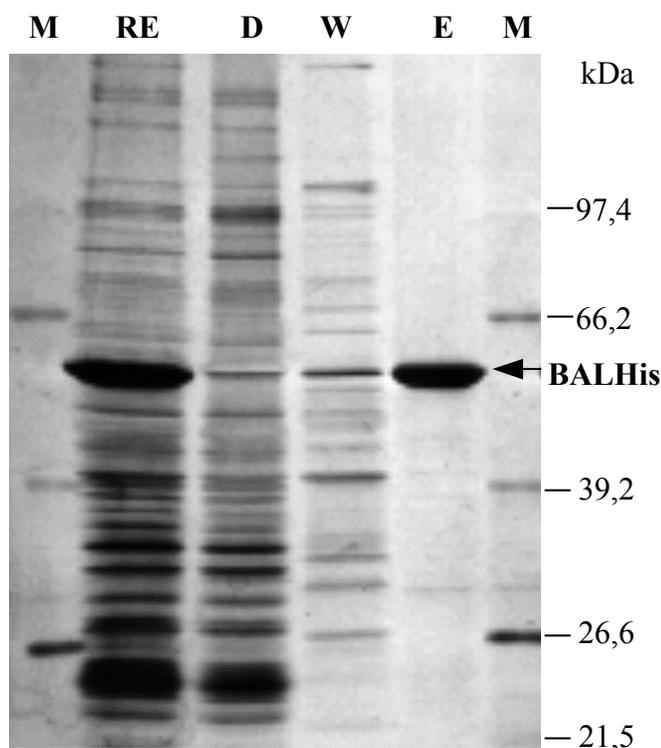
Neben der hohen Expressionsrate begründete auch die niedrige Grundaktivität im nicht induzierten Zustand die Wahl von *E. coli* SG13009 [pBALhis] als Produktionsstamm. Der Stamm SG13009 besitzt mehrere Kopien des Plasmids pREP4 mit dem *lacI*-Gen, das für eine konstitutive Expression des Lac-Repressors sorgt. Durch eine hohe Konzentration des Lac-Repressors wird die Transkription des BALHis-Gens vor der Induktion der Expression durch 1-Isopropyl- $\beta$ -Thiogalaktosid (IPTG) fast völlig reprimiert und eine Belastung des Zellstoffwechsels durch die Überproduktion des Fremdproteins wird verhindert. Das Plasmid pREP4 trägt ein Gen für eine Kanamycinresistenz, das als zweiter Selektionsmarker verwendet wurde.

Die typische Zellausbeute bei der Zellkultivierung in Schüttelkolben lag nach Induktionsdauer von 5 Stunden bei ca. 3,5 g/L mit einer zellspezifischen Aktivität von ca. 2,4 kU/g Zellen. Die

spezifische Aktivität des Rohextrakts betrug 19 U/mg. Bei einer spezifischen Aktivität des reinen Enzyms von 70 U/mg entspricht das rein rechnerisch 27 % des löslichen Proteins.

### 2.3.2 Reinigung der BALHis über IMAC

Das rekombinante carboxyterminale Hexahistidinfrusionsproteins BALHis konnte an eine Ni-NTA-Matrix aufgrund der Komplexbildung zwischen den Histidinresten und  $\text{Ni}^{2+}$ -Metallionen selektiv gebunden und in einem Schritt zu einer homogenen Proteinprobe aufgereinigt werden. Nach dem Auftrag des zellfreien Rohextrakts auf die Ni-NTA-Säule wurden die nicht gebundenen Proteine im Durchbruch eluiert. Die unspezifische Bindung einiger Proteine des Rohextrakts konnte durch den Zusatz von 50 mM Imidazol zum Waschpuffer aufgehoben werden. Das spezifisch gebundene Protein wurde mit einem Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol eluiert. Mit Hilfe der denaturierenden SDS-PAGE wurde eine effektive Aufreinigung des Zielproteins nachgewiesen: die isolierte BALHis zeigte eine Reinheit > 95% (Abb. III-11).



**Abb. III-11:** SDS-PAGE (12,5 %) der IMAC-Reinigung der BALHis.

**M** - Molekulargewichtstandard [Roche Molecular Diagnostics]; **RE** - Rohextrakt; **D** - Durchlauf, **W** - Waschkfraktion; **E** - Eluat.

Das nach der IMAC eluierte ThDP-freie Enzym wurde mittels Gelfiltration in cofaktorhaltigen KPi umgepuffert. Dabei wurde auch das Imidazol abgetrennt. Die Fraktion der Gelfiltration wurde mit einer Amikon-Zelle aufkonzentriert und entweder lyophilisiert oder mit 50 % Glycerol versetzt.

**Tab. III-2:** Ergebnisse der Aufreinigung der BALHis über IMAC.

BALHis	Gesamtaktivität [U]	Aktivitätsausbeute [%]	spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	11910	100	18,7	1
IMAC	7913	67	58,5	3
Gelfiltration	8673	73	69,5	4

### 2.3.3 Hochzelldichte-Kultivierung von *E. coli* SG13009 [pBALhis] im 15 L-Maßstab

Eine anschließende Zellkultivierung des Produktionsstamms *E. coli* SG13009 [pBALhis] im 15 L Maßstab erfolgte mittels Fed-Batch-Technologie in einem semidefinierten Hochzelldichtemedium (HZD). Eine Hochzelldichtekultivierung sollte eine wesentliche Steigerung der Ausbeute und Produktivität des Expressionssystems an intrazellulär vorliegendem rekombinanten BALHis ermöglichen. Außerdem werden Kulturvolumen, Abwassermengen und Produktionskosten bei diesem Verfahren reduziert [Knorre et al., 1990].

Die Zellen wurden in einem Batch-Medium kultiviert bis die vorgelegte C-Quelle erschöpft war. Danach wurde Feed-Lösung computergesteuert zugesetzt. Durch exponentielle Zuführung der C-Quelle wurde ein exponentielles Zellenwachstum mit einer konstanten Wachstumsrate gewährleistet. Die Wachstumsrate wurde durch die vordefinierte Zufütterungsrate bestimmt. Eine Sauerstoffsättigung höher als 20 % wurde in einem Fermenter durch eine kontrollierte Luftzufuhr und hohe Rührgeschwindigkeit erzielt, so dass der Sauerstoff keine Limitierung für das Wachstum des Produktionsstamms darstellte.

Die Wachstumsrate der Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase, die als spezifische Wachstumsrate bezeichnet wird, wird mit der folgenden Gleichung beschrieben:

$$\mu = \frac{\ln(\text{OD}_2/\text{OD}_1)}{t_2 - t_1} [h^{-1}] \quad [\text{Gl. 1}]$$

Die spezifische Wachstumsrate stellt einen sehr wichtigen Parameter für die Kultivierung der rekombinanten Mikroorganismen dar. Übersteigen die spezifischen Wachstumsraten eine kritische Grenze, wurde eine verstärkte Bildung wachstumshemmender metabolischer Nebenprodukte wie Acetat beobachtet [Riesenberg, 1991]. Außerdem führt die Zunahme der spezifischen Wachstumsrate zu einer Senkung der Expressionsrate des rekombinanten Proteins [Fieschko, 1989]. Die programmierte spezifische Wachstumsrate, die durch die Nährstoffdosierung limitiert wurde, richtete sich nach den in den angegebenen Arbeiten beschriebenen Ergebnissen und betrug  $0,12 \text{ h}^{-1}$ .

Die Induktion erfolgte in der Zufütterungsphase bei einer  $OD_{600}$  von 80 durch Zugabe von 1 mM IPTG.

Die Ergebnisse der 15 L HZD-Fermentation sind in der Tabelle III-3 zusammengefasst:

**Tab. III-3:** Ergebnisse der 15 L HZD-Fermentation von *E. coli* SG13009 [pBALhis].

Biofeuchtmasse [g/L]	360
Zellspezifische Aktivität [U/g Zellen]	147
Gesamtaktivität [kU]	792
Gesamtausbeute an rekombinantem Protein [g]	11,5

Die BALHis stand durch die vorliegende Hochzelldichtekultivierung in einer ausreichenden Menge für die weiteren Versuche zur Verfügung.

Allerdings kann die Hochzelldichtekultivierung des Produktionsstamms *E. coli* SG13009 [pBALhis]- sicherlich noch optimiert werden. Eine Senkung der zellspezifischen Aktivität nach der Hochzelldichtekultivierung im Vergleich zu der zellspezifischen Aktivität nach der Zellkultivierung in Schüttelkolben wurde auf die späte Induktion zurückgeführt. Die erzielte spezifische Aktivität entspricht dem Anteil der BALHis am gesamten löslichen Protein von 6 %. Durch frühere Induktion der Expression könnte eine höhere Expressionsrate des rekombinanten Proteins erreicht werden. Da aber eine frühe Induktion zu einer Verringerung der Biomasse führen kann, muss ein optimaler Induktionszeitpunkt gefunden werden, der die maximale Ausbeute an rekombinantem Protein gewährleistet.

Eine frühere Induktion bei  $OD_{600}$  von 60 (bei der HZD-Fermentation des Produktionsstamms des BAL-Muteins BALA28SHis - *E. coli* SG13009 [pBALA28Shis]) führte zu einer fast 3 mal – größeren Ausbeute an rekombinantem Protein (siehe Kapitel III-6.4.1).

### III.3 Proteinchemische Charakterisierung der BALHis

#### 3.1 Bestimmung des Molekulargewichts der BALHis

Das Molekulargewicht der rekombinanten BALHis wurde durch verschiedene Methoden ermittelt (Tab. III-4).

Eine vergleichende Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts der Monomereinheit des Proteins ist die denaturierende SDS-PAGE. Die BALHis wandert im SDS-Gel als eine einzige Polypeptidkette. Anhand der Eichung mit dem Molekulargewichtsmarker lässt sich für das Monomer ein Molekulargewicht von 60 kDa berechnen (Abb. III-11).

Mit Hilfe der denaturierenden Absolutmethode MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry) wurde für die monomere Einheit der BALHis ein Molekulargewicht von 59,99 kDa ermittelt.

Die Gensequenz von Hinrichsen et al. [Hinrichsen et al., 1994] wurde während dieser Arbeit durch eine erneute DNA-Sequenzierung korrigiert (siehe Kapitel III-2.2). Das Monomer der BAL besteht aus 563 Aminosäuren, das Molekulargewicht aus der korrigierten DNA-Sequenz ergibt 58,9 kDa. Der Molekulargewichtsunterschied zwischen dem Hexahistidininfusionsprotein BALHis und der BAL ergibt sich aus den 6 zusätzlichen Histidinresten wie auch aus den bei der Klonierung entstandenen Aminosäureaustausch (A563S) und Einfügung eines Serinrests vor dem His-Tag (Kapitel III-2.1). Dieser Unterschied beträgt theoretisch 0,9 kDa.

Der Vergleich des rechnerisch ermittelten Molekulargewichts von 59,8 kDa zeigt eine gute Übereinstimmung mit den mit SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS bestimmten Molekulargewichten des BALHis Monomers.

Für die Bestimmung des Molekulargewichts des Hexahistidininfusionsproteins BALHis im nativen Zustand wurde die Größenausschluss-Gelpermeationschromatographie angewandt. Die Methode ermöglicht, das Molekulargewicht über das hydrodynamische Volumen des Proteins durch einen Vergleich mit verschiedenen Eichproteinen zu berechnen. Demnach lässt sich ein natives Molekulargewicht von 216,2 kDa berechnen.

Das Ergebnis unterscheidet sich sehr stark von dem in der Literatur beschriebenen Molekulargewicht von 80 kDa für die native BAL [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Dieser Unterschied kann an den in der Arbeit von Gonzalez und Vicuna angewandten Bedingungen

der Aufreinigung liegen, da diese zu der Dissoziation des Tetramers führen könnten<sup>1</sup>. Auch das unterschiedliche Gelmateriale für die Bestimmung des nativen MW durch Gelfiltration benutzt wurde (Ultrogel Aca-34 [Gonzalez & Vicuna, 1989] und Superdex G-200 (diese Arbeit)), konnte zu den gemessenen Unterschieden beitragen.

**Tab. III-4:** Molekulargewichtsbestimmungen der BAL und BALHis mit verschiedenen Methoden. Vergleich mit Literaturdaten und mit dem Molekulargewicht, das aus der Gensequenz abgeleitet wurde.

Methode	Enzym	MW [kDa] diese Arbeit	Abweichung vom MW nach DNA-Sequenz [%]	MW [kDa] Literatur
DNA- Sequenz	BAL	58,9	-	59,4 [Hinrichsen et al., 1993]
	BALHis	59,8	-	-
SDS-PAGE	BAL	-	-	53 [Gonzalez & Vicuna, 1989]
	BALHis	60	0,3	-
MALDI- TOF-MS	BAL	-	-	-
	BALHis	59,9	0	-
Gelfiltration	BAL	-	-	80 [Gonzalez & Vicuna, 1989]
	BALHis	216,2	10	-

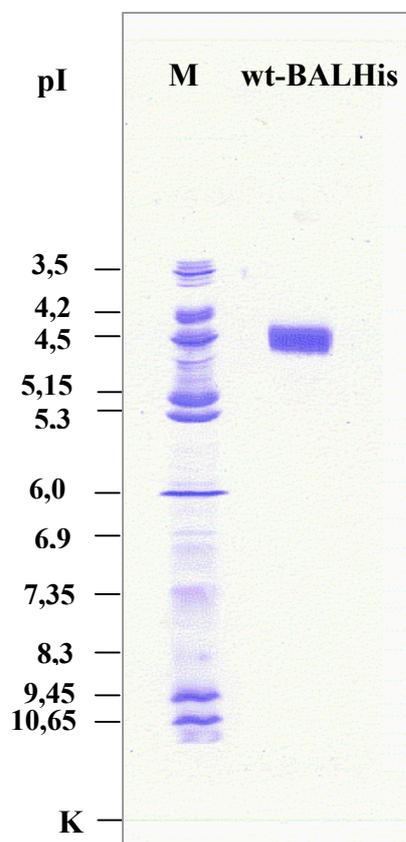
Das Molekulargewicht der nativen BALHis deutet auf eine tetramere Form des Enzyms. Die Abweichung von dem theoretisch errechneten Wert für ein Homotetramer beträgt ca. 10 % und liegt damit im Rahmen der Fehlergrenzen der Methode.

<sup>1</sup> Die Aufreinigung wurde bei pH 8.0 durchgeführt, bei dem die Abschwächung der Cofaktorenbindung beobachtet wird (Kapitel III-4.3). Da das ThDP bei der ThDP-abhängigen Enzymen wesentlich zu der Assoziation der Monomere beiträgt (Kapitel I-3.2), kann der Verlust des ThDP zu einer Dissoziation des Tetramers in die Dimere, bzw. Monomere führen

### 3.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts der BALHis

Mit dem isoelektrischen Punkt (pI) wird der pH-Wert bestimmt, bei dem die Nettoladung des Proteins, die aus den unterschiedlichen Protonierungs- bzw. Deprotonierungszuständen der Seitenketten von Aminosäuren resultiert, gleich null ist. Bei  $\text{pH} = \text{pI}$  weist die Löslichkeit des Proteins den minimalen Wert auf. Dadurch kommt es oft zu der Präzipitation des Proteins bei diesem pH-Wert.

Der pI der wt-BALHis wurde durch die Isoelektrische Fokussierung in einem Ampholyte enthaltenen Agarosegel bestimmt (Abb. III-12). Anhand der Eichgerade, die mit Hilfe der Markerproteine hergestellt wurde, liegt er bei pH 4,6.



**Abb. III-12:** Bestimmung des isoelektrischen Punkts der wt-BALHis.  
M - Marker: Protein Test mixture 3-10 „Serva“, Heidelberg.

### III.4 Stabilitätsuntersuchungen der wt-BALHis

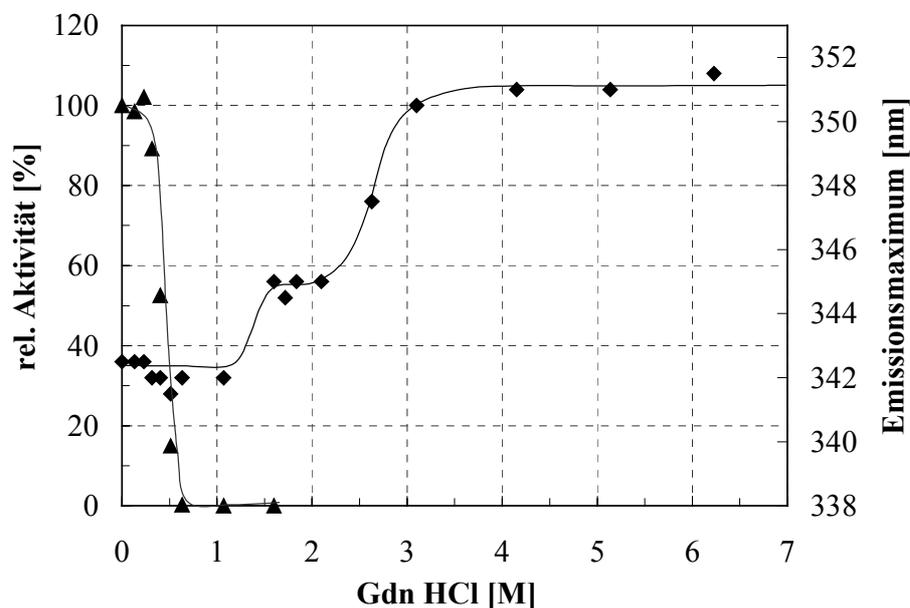
#### 4.1 Stabilität der wt-BALHis gegenüber Denaturierungsmitteln, Vergleich des Fusionsproteins wt-BALHis mit der wt-BAL ohne His-Tag

Die Inkubation eines Proteins in Anwesenheit steigender Konzentrationen eines Denaturierungsmittels, wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) ermöglicht eine Untersuchung der strukturellen Stabilität des Proteins [Pace et al., 1989]. Die beiden Substanzen können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der Peptidbindung mit dem Rückgrat des Proteins interagieren. Außerdem werden durch ihre Wechselwirkung mit den hydrophoben Seitenketten die intramolekularen Wechselwirkungen des Proteins gestört. Diese Interaktionen verursachen eine Denaturierung der Proteine in konzentrierten Lösungen von Harnstoff (8-10 M) oder Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) (6-8 M). Je nach Stabilität des jeweiligen Proteins erfolgen Konformationsänderungen, wie die Dissoziation der Untereinheiten bis zur vollständigen Auffaltung des Proteins bei ansteigenden Konzentrationen des Denaturierungsmittels.

Die Konformationsänderungen des Proteins können spektroskopisch verfolgt werden. Besonders geeignet dafür ist die Tryptophan-Fluoreszenz, vorausgesetzt, die Tryptophanreste haben eine günstige Lage im Protein. Die Fluoreszenzemission reagiert sehr viel sensitiver auf eine Umgebungsänderung, bzw. Änderung der Beweglichkeit der Chromophore des Proteins, als die Lichtabsorption und ist daher ein gutes Mittel, die Änderungen in der Proteinstruktur zu erfassen. Die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin kann selektiv bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt werden. Allerdings ist die Fluoreszenz-quantenausbeute des Tyrosins gegenüber dem Tryptophanrest um den Faktor 5,5 niedriger und bei Proteinen mit mehreren Tryptophanresten dominiert die Tryptophanfluoreszenz. Im Proteininneren liegt das Fluoreszenzmaximum der Tryptophanreste aufgrund hydrophober Wechselwirkungen und eingeschränkter Beweglichkeit in einem kurzwelligen Bereich. Mit zunehmender Denaturierung des Proteins werden die Tryptophanreste in der wässrigen Lösung exponiert und das Fluoreszenzmaximum verschiebt sich aufgrund von Energieverlusten durch Stöße, Rotationen und Schwingungen in den langwelligeren Bereich (sog. Rotverschiebung). Das Fluoreszenzmaximum des freien Tryptophans in wässriger Lösung liegt bei ~350 nm.

Die BAL besitzt 7 Tryptophanreste pro Monomer, was eine fluoreszenzspektroskopische Stabilitätsuntersuchung des Enzyms mittels einer konzentrationsabhängigen Denaturierung mit GdnHCl (Abb. III-13) oder Harnstoff (Abb. III-14) ermöglicht, obwohl der Messbereich wegen der Lage des Fluoreszenzemissionsmaximums des intakten Proteins eng ist. Das Fluoreszenzemissionsmaximum der Proteinprobe der wt-BALHis ohne Denaturierungsmittel liegt bei 342-343 nm, was vermuten lässt, dass sich die Tryptophanreste der BAL, bzw. ein Teil von ihnen in Bereichen höherer Beweglichkeit des Proteins (z.B. an der Proteinoberfläche) befinden.

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der strukturellen Stabilität des Enzyms wurde mit einer reinen Proteinprobe der BALHis durchgeführt. Parallel hierzu wurde die Restaktivität der BALHis nach 2 Stunden Inkubation mit den jeweiligen Harnstoff- bzw. GdnHCl-Konzentrationen bestimmt. Um einen Vergleich der BAL mit der BALHis zu ermöglichen, wurden nach 2 h Inkubation mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen auch die Restaktivitäten der BAL detektiert, die auf die strukturelle Stabilität der BAL schließen lassen.



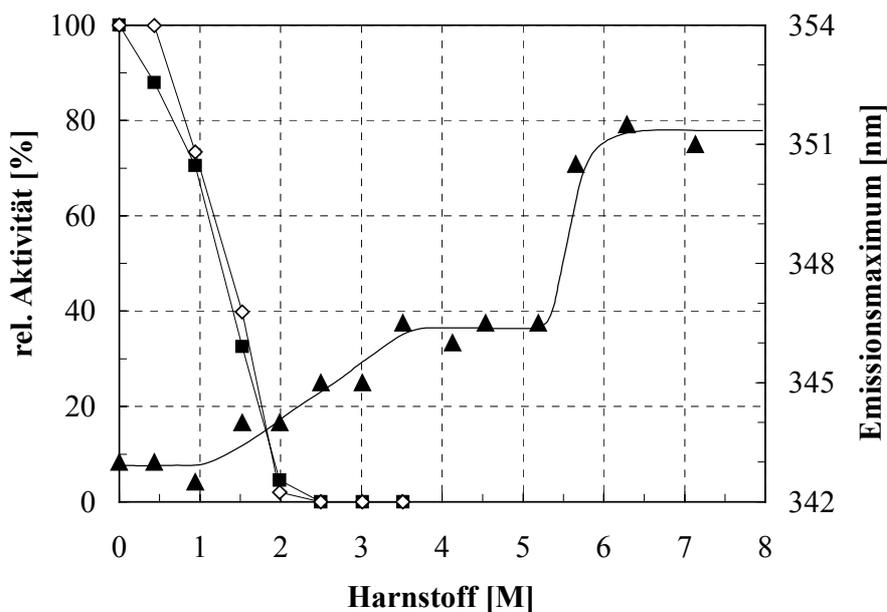
**Abb. III-13:** Änderung der Aktivität und des Fluoreszenzmaximums der BALHis in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration.

Inkubationszeit 20 h; RT; Assaypuffer: KPi pH 6,5, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 mM ThDP.

Die Denaturierung der BALHis mittels GdnHCl verläuft schrittweise (Abb. III-13). Eine Steigerung der GdnHCl - Konzentration auf 1,6-2,1 M führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums von 342 nm auf 345 nm. Dieser Wert liegt deutlich

unterhalb von dem des freien Tryptophans, so dass die Proteinstruktur partiell erhalten sein muss. Bei dem der BAL verwandten Enzym PDC aus *Z. mobilis* konnten vergleichbare Änderungen einer Dissoziation des Tetramers in Monomere zugeordnet werden [Pohl et al., 1994]. Bei einer GdnHCl-Konzentration von ca. 3 M wird das Fluoreszenzmaximum des freien Tryptophans erreicht, was auf eine vollständige Entfaltung des Proteins hindeutet. Damit weist die BALHis eine niedrigere Stabilität gegenüber GdnHCl auf, als die BFDHis, die erst bei einer GdnHCl-Konzentration von >4 M vollständig entfaltet wird.

Ein vollständiger Verlust der Enzymaktivität ist bereits bei einer GdnHCl-Konzentration von 0,5 M zu beobachten. Da die strukturelle Integrität des Proteins anhand der Tryptophanfluoreszenz bei dieser Konzentration erhalten bleibt, kann der Aktivitätsverlust durch die Änderung der Konformation des aktiven Zentrums und anschließende Abdissoziation der Cofaktoren ThDP erklärt werden.



**Abb. III-14:** Änderung des Fluoreszenzmaximums der BALHis und der Aktivität von BAL und BALHis in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Inkubationszeit 20 h; RT; Assaypuffer: KPi pH 6,5, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 mM ThDP.

Die Denaturierung mit Harnstoff verläuft bei der BALHis ebenfalls in zwei Schritten (Abb. III-14). Die erste Stufe mit einem Fluoreszenzmaximum von 346-346,5 nm, die vermutlich dem Übergang von Tetramer zum Monomer entspricht, wird bei einer Konzentration von ca. 3,5 M Harnstoff erreicht. Bei Harnstoffkonzentrationen oberhalb von 5 M erfolgt eine deutliche Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums von 346,5 auf 350 nm, d.h. die BAL wird vollständig denaturiert.

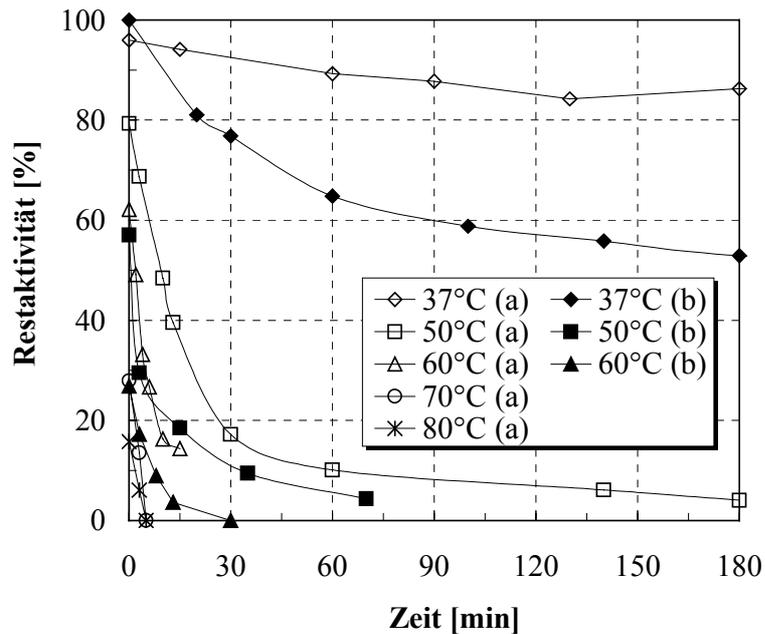
Der vollständige Verlust der Aktivität wurde sowohl bei der BAL als auch bei der BALHis bei einer Harnstoffkonzentration von 1,5-2 M nachgewiesen, die auch zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 342,5 nm auf 345 nm führt. Eine Senkung der Enzymaktivität der BAL bzw. BALHis bereits bei 0,9 M deutet darauf hin, dass die ThDP-Bindung im aktiven Zentrum schon bei der geringen Harnstoff-Konzentrationen gestört wird. Die Vergleichbarkeit der Aktivitätsprofile der BAL und der BALHis bei steigender Konzentration des Denaturierungsmittels sprechen dafür, dass der His-Tag zu keiner Änderung der Struktur des aktiven Zentrums führt.

Aufschlussreich ist der Vergleich der Stabilität der BALHis gegenüber Harnstoff mit der früher untersuchten Stabilität der *Ps.p.* BFDHis und *Z.m.* PDC. Die BALHis weist eine ähnliche strukturelle Stabilität gegenüber Harnstoff wie die BFDHis, die auch bei einer Harnstoff-Konzentration von >5 M denaturiert wird [Iding, 1998], bzw. eine höhere Stabilität als PDC, die bereits bei Harnstoff-Konzentrationen von >3 M vollständig entfaltet wird [Pohl et al., 1994]. Der Aktivitätsverlust geht bei der *Ps.p.* BFDHis direkt mit der vollkommenen Proteinentfaltung einher. Hingegen zeigt die BALHis analog der *Z.m.* PDC [Pohl, 1997] bereits bei 1,5–2 M einen Aktivitätsverlust. Damit liegt der Verlust der Aktivität bei der geringen Konzentrationen des Denaturierungsmittels wahrscheinlich an dem Verlust der Cofaktoren, insbes. ThDP aus dem aktiven Zentrum, der der Proteinentfaltung vorangeht. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf eine schwächere Bindung der Cofaktoren im aktiven Zentrum der BALHis im Vergleich zur *Ps.p.* BFD neben einer genauso starken strukturellen Stabilität.

## 4.2 Temperaturstabilität der wt-BALHis

Die zeitabhängige Inaktivierung des Enzyms bei unterschiedlichen Temperaturen wird als ein Maß der Stabilität benutzt, die für die Anwendung des Enzyms als Biokatalysator in der organischen Synthese bedeutend ist.

In der Abb. III-15 ist die zeitabhängige Inaktivierung der wt-BALHis bei verschiedenen Temperaturen und zwei verschiedenen Cofaktorkonzentrationen gezeigt.



**Abb. III-15:** Temperaturstabilität der wt-BALHis in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen. **a.** 5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP (offene Symbole); **b.** 1 mM  $Mg^{2+}$ , 0,01 mM ThDP (gefüllte Symbole). Aliquots aus der Glycerolstocks der wt-BALHis wurden im Verhältnis 1:100 in den unterschiedlich vortemperierten Probenpuffer (50 mM KPi, pH 6,5) bis Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und anschließend bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Das erste Aliquot für die Aktivitätsmessung wurde sofort nach der Verdünnung entnommen. Als 100 % wurde die Aktivität angenommen, die sofort nach der Verdünnung der Stammlösung in dem auf 37 °C vortemperierten Puffer gemessen wurde.

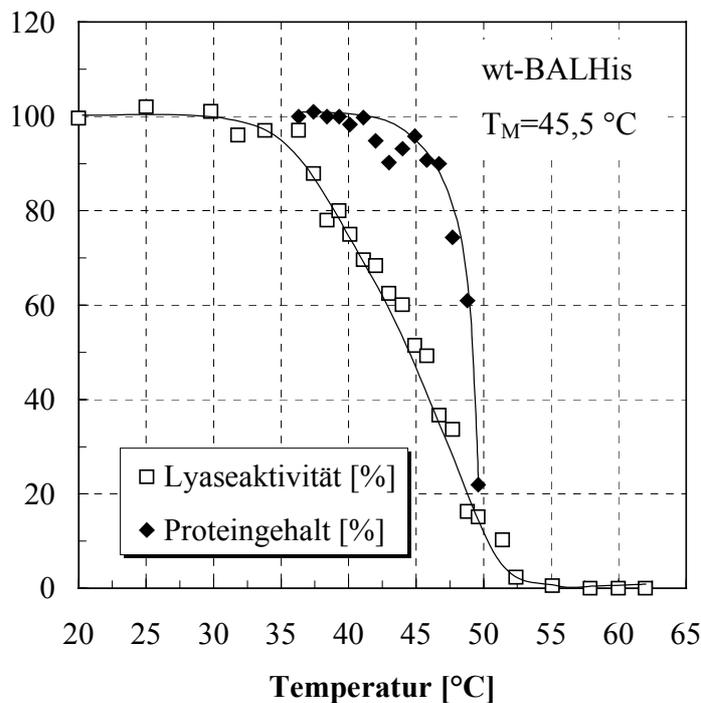
Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inaktivierung der wt-BALHis zu Beginn des thermischen Denaturierungsprozesses durch die Abdissoziation der Cofaktoren aus dem aktiven Zentrum verursacht wird, und mit der Erhöhung der Cofaktorkonzentration verzögert werden kann (Abb. III-15). Während die Inkubation bei 37 °C in Gegenwart von 5 mM  $Mg^{2+}$  und 0,1 mM ThDP innerhalb von 3 Stunden nur zu einer geringfügigen Aktivitätssenkung auf 85 % führt, zeigt die wt-BALHis nach 3 h Inkubation in Gegenwart von 1 mM  $Mg^{2+}$  und 0,01 mM ThDP nur 52 % der Anfangsaktivität. Auch bei 50 °C und 60 °C führt eine Erhöhung der Cofaktorkonzentration zu einer, wenn auch geringen Verzögerung der Deaktivierung. Bei Temperaturen von 70 °C und darüber konnte keine Enzymaktivität in Gegenwart geringer Cofaktorkonzentrationen (1 mM  $Mg^{2+}$ ; 0,01 mM ThDP) nachgewiesen werden.

In Anwesenheit der Cofaktoren (5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP) weist die wt-BALHis bis 30 °C eine hohe Stabilität auf. Nach 52 Stunden Inkubation bei 30 °C wurde in 50 mM KPi, pH 6,5 65 % der Anfangsaktivität wiedergefunden (Daten nicht gezeigt).

Ein geeignete Maß für die Charakterisierung der Temperaturstabilität des Enzyms ist der  $T_M$ -Wert. Der  $T_M$ -Wert gibt die Temperatur an, bei der nur noch die Hälfte der Enzymaktivität, die das Enzym bei 25°C besitzt, vorhanden ist.

Die Enzymlösung der wt-BALHis in cofaktorhaltigem Puffer wurde bei schrittweise erhöhter Temperatur inkubiert. Nachdem die eingestellte Temperatur in der Proteinlösung erreicht war, wurde diese 5 min konstant gehalten und anschließend ein Aliquot entnommen und im gekoppelten photometrischen Test bei 30 °C hinsichtlich der verbliebenen Lyaseaktivität untersucht. Ein weiteres Aliquot diente zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Das Verfahren wurde so lange fortgesetzt, bis die wt-BALHis vollständig thermisch inaktiviert war, bzw. kein lösliches Protein mehr nachweisbar war.

Um eine Näherung des  $T_M$ -Wertes zu erhalten, wurde zunächst ein Schnelltest durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur in 5 °C-Schritten erhöht, um den Temperaturbereich des  $T_M$ -Wertes zu bestimmen. Der genaue  $T_M$ -Wert wurde anschließend durch eine Aktivitätsmessung mit 1 °C - Temperaturintervallen im Bereich des  $T_M$ -Wertes bestimmt (Abb. III-16).



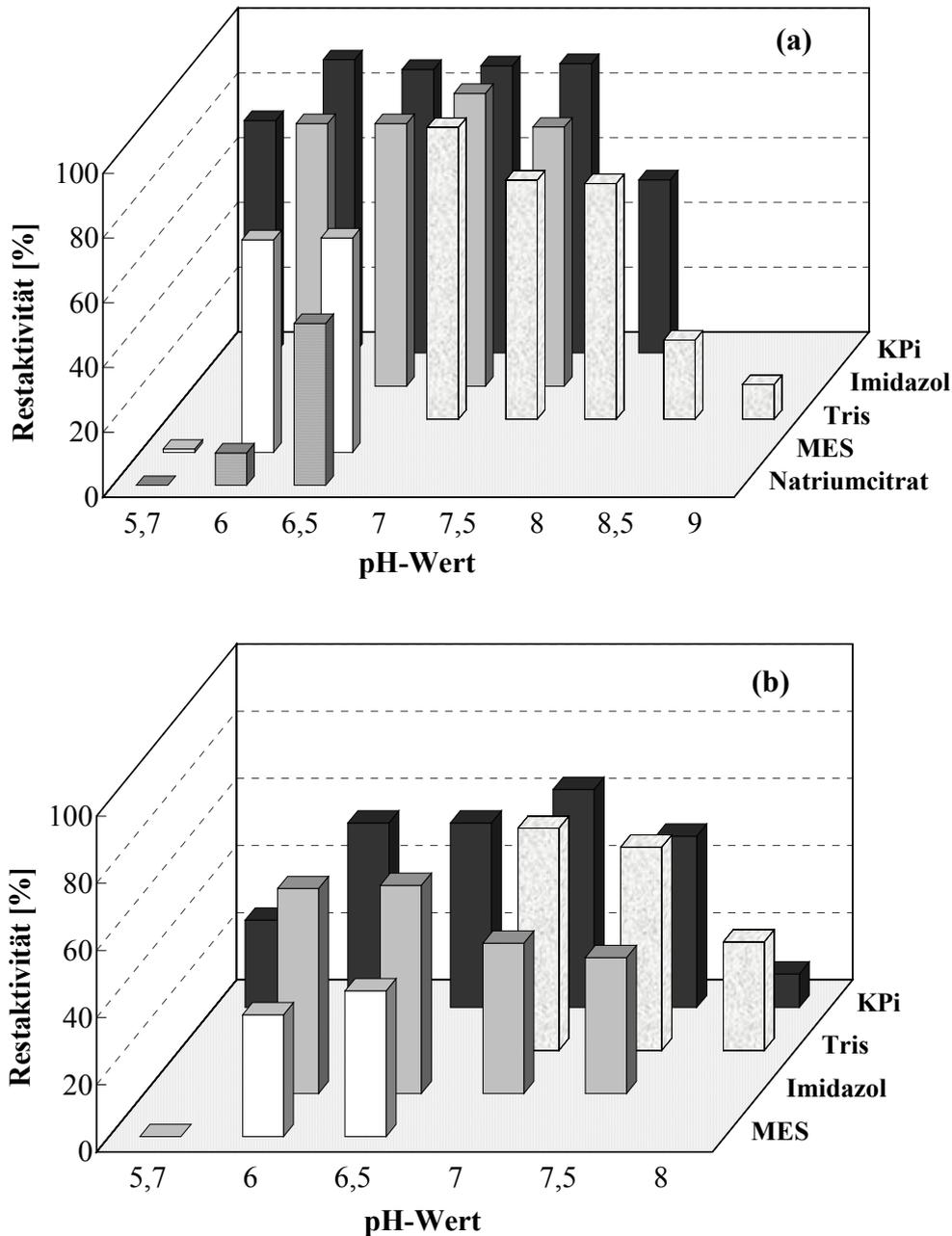
**Abb. III-16:** Bestimmung des  $T_M$ -Wertes- für wt-BALHis.  
50 mM KPi-Puffer, pH 6,5; 5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP. Enzymkonz.=6  $\mu\text{g/ml}$ .  
100% Aktivität in dieser Messreihe entsprechen dem Mittelwert der Messungen bei 30°C: 70 U/mg.

Es ergab sich ein  $T_M$ -Wert von 45,5 °C. Bemerkenswert ist, dass der im Schnelltest bestimmte  $T_M$ -Wert mit dem in dem genaueren Test gemessenen Wert gut übereinstimmt, obwohl das Protein unterschiedlich lange den höheren Temperaturen ausgesetzt wurde.

Wie Abbildung. III-16 zeigt, verliert die wt-BALHis ihre Aktivität bereits vor der temperaturbedingten Proteinaggregation, was an der Abdissoziation der Cofaktoren aus dem aktiven Zentrum liegen kann, die der Proteindenaturierung vorausgeht.

### 4.3. Stabilität der wt-BALHis im Bezug auf pH-Wert und Puffersalz

Die Stabilität der wt-BALHis in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde in Natriumcitrat, MES-KOH, KPi, Imidazol und Tris/HCl Puffer, die einen breiten pH-Bereich abdecken, untersucht (Abb. III-17).



**Abb. III-17:** Stabilität der wt-BALHis im Bezug auf pH-Wert und Puffersalz.

**(a):** Restaktivitäten nach 27 h ; **(b):** Restaktivitäten nach 4 Tagen.

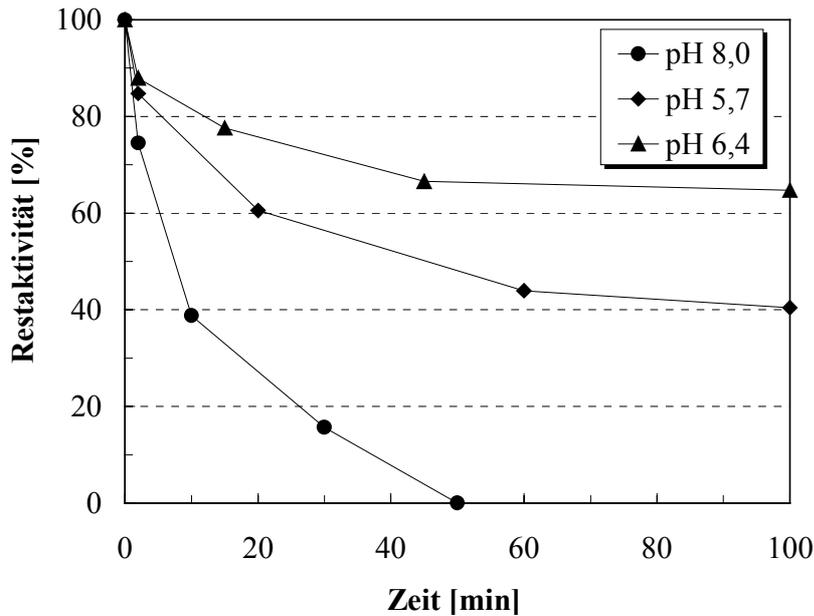
Inkubation bei 25 °C. Die Glycerolstocks der wt-BALHis wurden vor der Inkubation in den entsprechenden Puffer 1:80 bis Endkonzentration von 6 µg/ml verdünnt.

Die wt-BALHis wurde bei unterschiedlichen pH bei Raumtemperatur während 4 Tagen inkubiert. Die Restaktivitäten in den untersuchten Ansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten der Inkubation mit dem gekoppelten photometrischen Test ermittelt. Die wt-BALHis weist eine hohe Stabilität im pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 auf. Es wurde auch gezeigt, dass die Stabilität der wt-BALHis nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom Puffersalz beeinflusst wird. Im Natriumcitratpuffer und MES-Puffer ist das Enzym generell weniger stabil. So wurden in Natriumcitratpuffer bei pH 6 nach 27 h nur 9 % der Anfangsaktivität, bei pH 6,5 50 % und in MES-Puffer bei pH 6-6,5 ca. 65 % der Anfangsaktivität wiedergefunden, während in KPi und Imidazol je 90 und 80 % der Anfangsaktivität bei diesen pH-Werten erhalten blieben. Die höchste Stabilität wurde in Imidazolpuffer und KPi-Puffer zwischen pH 6 und 7,5 und in Tris pH 7,0 nachgewiesen. Der KPi Puffer, pH 7,0, der anhand der Restaktivitäten die maximale Stabilität der wt-BALHis gewährleistet, wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Untersuchungen an der PDC, die analog zur BAL instabil im alkalischen Bereich ist, haben gezeigt, dass die Inkubation bei pH 8,0 zu einer vollkommene Entfernung des ThDP aus dem Holoenzym führt [Pohl, 1997]. Um die pH-Abhängigkeit der niedrigen Enzymstabilität der wt-BALHis näher zu charakterisieren, wurde die Abhängigkeit der Cofaktorbindung im aktiven Zentrum der BAL vom pH-Wert untersucht. Als ein Maß der Cofaktorbindungstabilität diente der zeitabhängige Aktivitätsverlust bei der Inkubation des Enzyms in Puffer ohne Cofaktorzusatz bei Raumtemperatur mit verschiedenen pH-Werten. Die Restaktivitäten, die nach verschiedenen Inkubationszeiten in den jeweiligen Puffer bestimmt wurden, zeigen, dass die wt-BALHis eine starke Abhängigkeit der Cofaktorbindungstabilität vom pH-Wert aufweist (Abb. III-18).

Während bei Inkubation in KPi-Puffer ohne Cofaktoren bei pH 6,4 innerhalb von 90 min. die halbmaximale Aktivität noch nicht unterschritten wurde, liegt die Halbwertszeit im cofaktorfreien KPi-Puffer bei pH 5,7 bei ca. 40 Minuten. Im cofaktorfreien KPi-Puffer bei pH 8,0 ist die Halbwertszeit weniger als 10 Minuten, was auf eine sehr schwache Cofaktorbindung hinweist. Nach 50 Minuten konnte in diesem Puffer keine Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Eine Senkung der Stabilität der BAL im alkalischen Bereich liegt damit mindestens teilweise an der Abschwächung der Bindung der Cofaktoren bei der Steigung des pH-Werts und kann möglicherweise durch den Zusatz der Cofaktoren kompensiert werden.



**Abb. III-18:** Abhängigkeit der Cofaktorbindung vom pH-Wert.

Das Lyophilisat der wt-BALHis wurde in cofaktorhaltigem 10 mM KPi-Puffer pH 6,5 aufgenommen und anschließend durch Gelfiltration über PD-10 Säulen in 50 mM KPi Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten ohne Cofaktoren versetzt. Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug 5 µg/ml. Als 100 % wurde die Aktivität in cofaktorhaltigem Puffer eingesetzt.

Bei der Auflösung des Lyophilisats in cofaktorfreiem Citrat-Puffer pH 6,5 konnte keine Enzymaktivität detektiert werden. Das weist darauf hin, dass die niedrigere Stabilität in Citratpuffer auch an der Abschwächung der Cofaktorbindung in diesem Puffer liegt, was mit dem chelatierenden Effekt des Citrats erklärt werden kann. Die Bildung eines Komplexes von Citrat mit den  $Mg^{2+}$ -Ionen führt zu einer Verringerung der Konzentration der freien  $Mg^{2+}$ -Ionen in der Enzymlösung, dadurch wird eine schnelle Dissoziation der  $Mg^{2+}$ -Ionen aus dem Holoenzym verursacht. Dabei geht auch ThDP, das mit dem Enzym im wesentlichen über  $Mg^{2+}$ -Ionen gebunden ist, verloren.

#### 4.4 Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die Aktivität und Stabilität der wt-BALHis

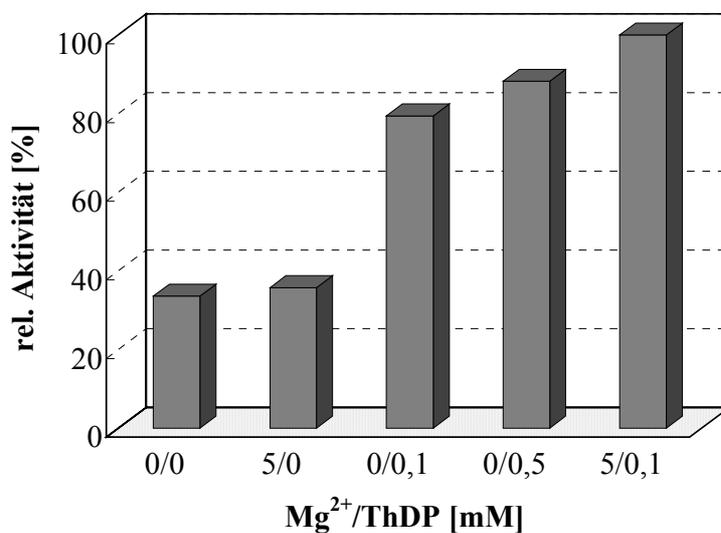
Bei allen ThDP-abhängigen Enzymen werden die Cofaktoren nicht kovalent gebunden und können also aus dem aktiven Zentrum dissoziiert werden. Im Fall der BAL wurde gezeigt, dass sie z. B. durch Dialyse oder DEAE-Cellulose Chromatographie entfernt werden können [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Die Cofaktorbindung wird auch, wie früher schon diskutiert

wurde, unter bestimmten Bedingungen (hoher pH-Wert, Temperaturerhöhung, Zusatz von Denaturierungsmitteln wie Harnstoff und Guanidinchlorid) destabilisiert.

Nach der IMAC-Aufreinigung in cofaktorfreiem Puffer zeigte die wt-BALHis 35-45 % bzgl. der Aktivität, die nach der Zugabe der beiden Cofaktoren zum Eluat gemessen wurde. Dies weist darauf hin, dass die wt-BALHis teilweise als Apoenzym eluiert.

Um ein Maß für die Bindungsstärke der beiden Cofaktoren zu erhalten, wurde die Regeneration der Aktivität der wt-BALHis durch Zusatz von jeweils nur einem der beiden Cofaktoren untersucht. Die wiedergewonnene Aktivität wurde im Assay mit denselben Cofaktorkonzentrationen gemessen, um die Rekombination des Holoenzym während der Messung auszuschließen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass etwa 60 % ThDP bei der Aufreinigung im cofaktorfreien Puffer aus dem aktiven Zentrum des Enzyms dissoziierten, während 90 %  $Mg^{2+}$  an das Apoenzym gebunden bleiben (Abb. III-19).

Die zeitabhängigen Messungen haben gezeigt, dass die vollständige Rekombination des Holoenzym bereits nach 10 Minuten Inkubation bei RT erfolgt. Eine weitere Inkubation während 2,5 Stunden hat zu keiner weiteren Steigerung der Aktivität geführt.



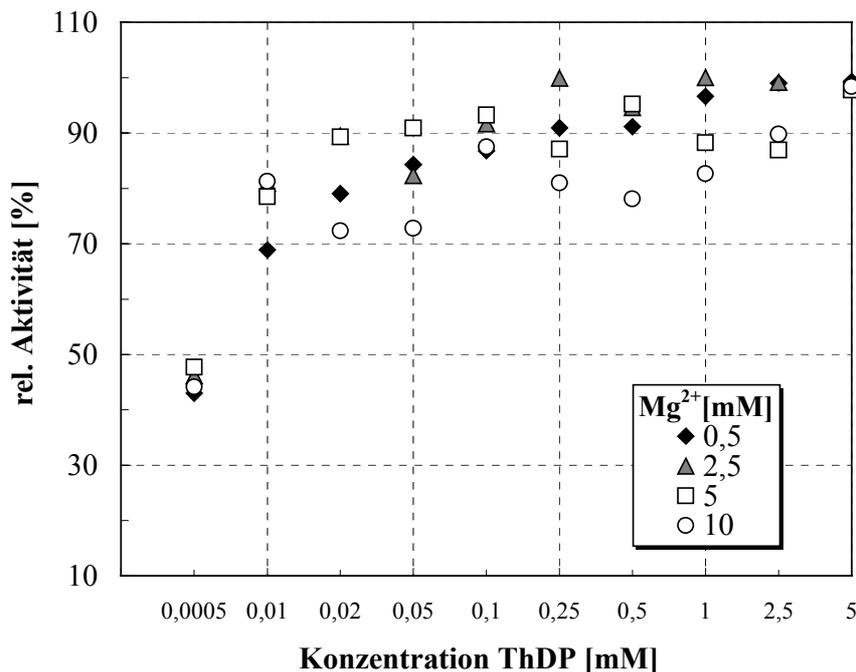
**Abb. III-19:** Rekonstitution des Holoenzym der wt-BALHis nach der cofaktorfreien Aufreinigung. Inkubation erfolgte in Gegenwart von unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen innerhalb von 2,5 h bei RT. Als 100 % wurde die Aktivität in der Enzymlösung mit 5 mM  $Mg^{2+}$  und 0,1 mM ThDP eingesetzt.

Eine zu geringe Cofaktorkonzentration in der Enzymlösung kann durch die zeitabhängige Diffusion der Cofaktoren, insbes. ThDP, aus dem Holoenzym zur Senkung der Enzymstabilität führen. Andererseits wurde in der Literatur die Inhibition der Enzymaktivität durch einen Überschuss von Cofaktoren beschrieben [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Zur Bestimmung

der optimalen Cofaktorkonzentrationen wurde daher der Einfluss von unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen auf die Aktivität der wt-BALHis untersucht.

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration der beiden Cofaktoren zu bestimmen, wurde die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit variierten  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen bei einer konstanten ThDP-Konzentration und mit variierten ThDP-Konzentrationen bei einer konstanten  $Mg^{2+}$ -Konzentration durchgeführt.

Durch die Verdünnung der cofaktorhaltigen Stammlösung der wt-BALHis im cofaktorfreien Puffer wurden die Konzentrationen von den Cofaktoren auf  $0,5 \mu M$  ThDP und  $0,025 mM$   $Mg^{2+}$  eingestellt. Diese Enzymlösung zeigte nur 40-45 % relativ zu der Aktivität in der Enzymlösung mit  $5 mM$   $Mg^{2+}$  und  $0,1 mM$  ThDP. Den Aliquots dieser Enzymlösung wurden unterschiedliche Konzentrationen von einem Cofaktor zugegeben, während die Konzentration des anderen in jeder Versuchsreihe konstant war. Die wiedergewonnene Aktivität wurde im gekoppelten Enzymtest, der den gleichen Cofaktorgehalt wie die Proben besaß, vermessen (Abb. III-20; Abb. III-21).



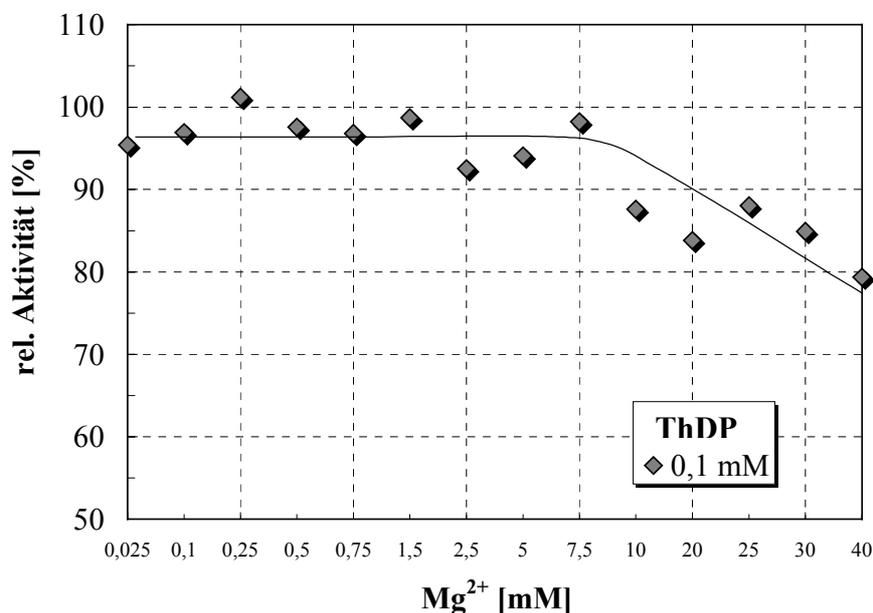
**Abb. III-20:** Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ThDP-Konzentration in Anwesenheit von unterschiedlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen.

Rekonstitution des Holoenzym wt-BALHis erfolgte in  $50 mM$  KPi, pH 7,0 in Gegenwart von beiden Cofaktoren innerhalb von 10 min bei RT. Proteinkonz.  $10 \mu g/ml$ . Als 100 % wurde die Aktivität in der cofaktorhaltigen Stammlösung des Enzyms ( $5 mM$   $Mg^{2+}$ ;  $0,1 mM$  ThDP) angenommen.

Da die Bindung des Diphosphatrests des ThDP über das  $Mg^{2+}$ -Ion an Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms eine maßgebliche Wechselwirkung des ThDP mit dem

Apoenzym darstellt, könnte die optimale ThDP-Konzentration von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration abhängig sein. Daher wurde die Abhängigkeit der Aktivität von der ThDP-Konzentration bei vier unterschiedlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen bestimmt (Abb. III-20). Es ergab sich bei allen untersuchten  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen annähernd die gleiche Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ThDP-Konzentration, die einen Sättigungseffekt widerspiegelt. Im Gegensatz zu den Literaturangaben [Gonzalez & Vicuna, 1989] wurde keine Überschussinhibierung bei ThDP-Konzentrationen größer als 0,01 mM festgestellt.

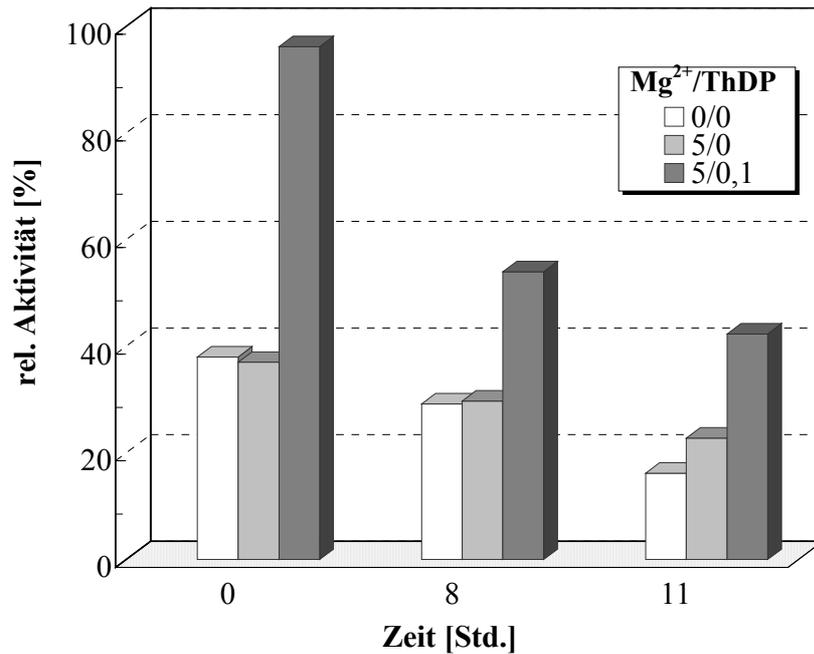
Die Abhängigkeit der Aktivität von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration wurde in Gegenwart von 0,1 mM ThDP untersucht (Abb. III-21).



**Abb. III-21:** Abhängigkeit der Enzymaktivität von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration in Gegenwart von 0,1 mM ThDP. Rekonstitution des Holoenzym wt-BALHis erfolgte in 50 mM KPi, pH 7,0 in Gegenwart von beiden Cofaktoren innerhalb von 10 min bei RT. Proteinkonz. 10  $\mu$ g/ml. Als 100 % wurde die Aktivität in der cofaktorhaltigen Stammlösung des Enzyms (5 mM  $Mg^{2+}$ ; 0,1 mM ThDP) angenommen.

Es wurde kaum eine Aktivitätssenkung bei niedrigen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (bis 0,025 mM) nachgewiesen. Die  $Mg^{2+}$ -Ionen sind scheinbar viel stärker als ThDP an das Enzym gebunden, wie es schon bei der Untersuchung der Regenerierung der Aktivität der cofaktorfreen Enzymprobe nach der IMAC gezeigt wurde, und können durch Verdünnung in cofaktorfreen Lösung nicht entfernt werden. Bei  $Mg^{2+}$ -Konzentration oberhalb 7,5 mM wurde eine Inhibition der Enzymaktivität beobachtet.

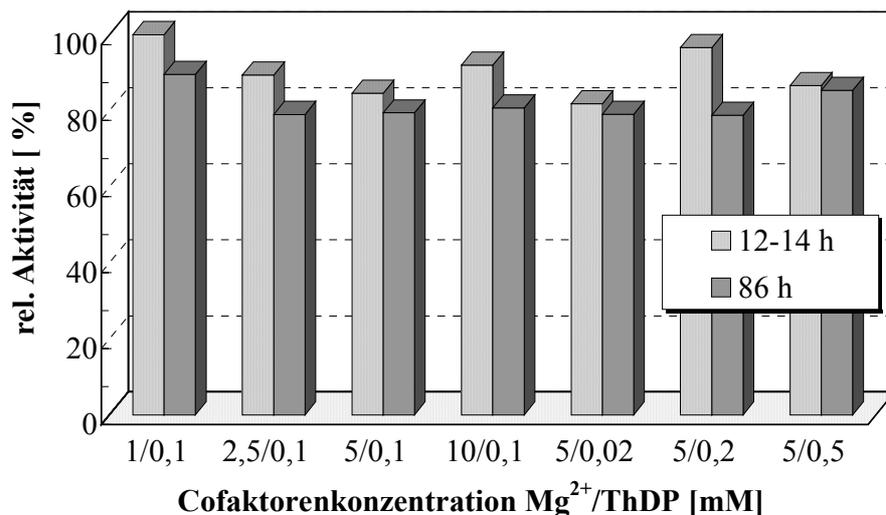
Eine längere Inkubation in Puffer mit geringen Cofaktorkonzentrationen (0,5  $\mu$ M ThDP und 0,025 mM  $Mg^{2+}$ ) führte zu einer irreversiblen Inaktivierung, die stark von der Inkubationszeit abhängig war (Abb. III-22).



**Abb. III-22:** Rekonstitution des Holoenzym der wt-BALHis nach verschiedener Inkubationszeiten in Gegenwart von 0,5  $\mu$ M ThDP und 0,025 mM Mg<sup>2+</sup>. Inkubation in 50 mM KPi, pH 7,0 bei 0 °C ohne Cofaktoren. Rekonstitution in Gegenwart von beiden Cofaktoren innerhalb von 10 min bei RT. Die Proteinkonzentration betrug 0,01 mg/ml.

Nach 8 Stunden Inkubation bei 0°C konnte durch die Zugabe der beiden Cofaktoren (5 mM Mg<sup>2+</sup>; 0,1 mM ThDP) nur 54 % und nach 11 Stunden nur 42 % Aktivität relativ der Aktivität im cofaktorhaltigen Puffer wiedergewonnen werden, während durch sofortiges Mischen einer obenbeschriebenen Enzympräparation mit beiden Cofaktoren 96 % der Aktivität zurückerhalten wurde. Der Zusatz von Mg<sup>2+</sup>-Ionen ohne ThDP führte erst nach 11 Stunden zu einer merklichen Reaktivierung. Dies weist darauf hin, dass eine Dissoziation der Mg<sup>2+</sup>-Ionen wahrscheinlich erst nach längerer Inkubation ohne Cofaktoren erfolgt.

Um die Abhängigkeit der Enzymstabilität von der Cofaktorenkonzentrationen zu untersuchen, wurde die cofaktorfreie Enzymfraktion nach der IMAC mit unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen versetzt und 86 h bei 25 °C inkubiert. Es werden keine wesentlichen Unterschiede der Aktivitätsverluste in Gegenwart der verschiedenen Cofaktorkonzentrationen beobachtet (Abb. III-23).



**Abb. III-23:** Stabilität der wt-BALHis in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen. Inkubation bei 25 °C. Die Proteinkonzentration betrug 1,8 mg/ml. Als 100 %-Wert wurde die Aktivität der wt-BALHis in 50 mM KPi, pH 7,0 mit 5 mM  $Mg^{2+}$  und 0,1 mM ThDP vor der Inkubation angenommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Aktivitäts- und Stabilitätsabhängigkeit der wt-BALHis von der Cofaktorkonzentration zeigen, dass eine ThDP-Konzentration von 0,1 mM und eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 1 mM ausreichend sind, um die Stabilität des Holoenzym zu gewährleisten. Die  $Mg^{2+}$ -Konzentration sollte wegen der Überschussinhibierung nicht größer als 7,5 mM sein.

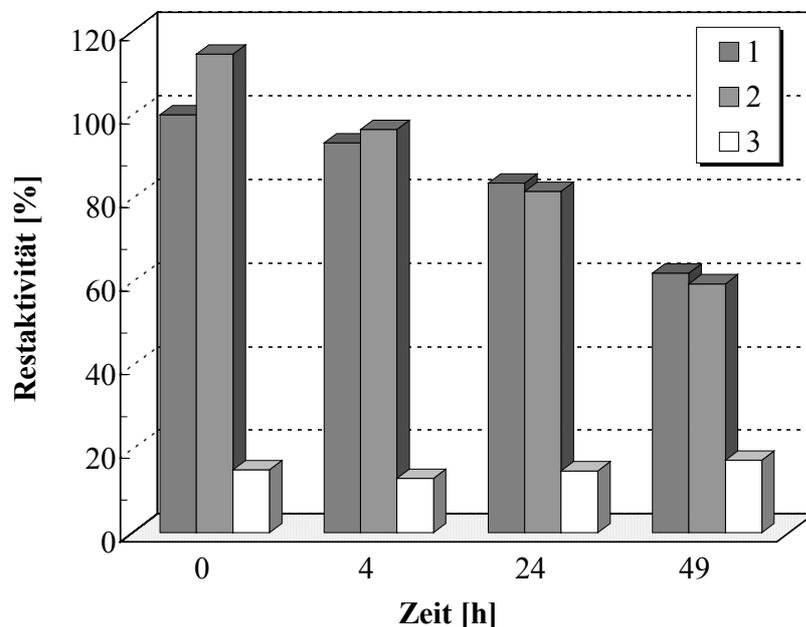
#### 4.5 Stabilität der wt-BALHis in Anwesenheit organischer Lösungsmittel

Die aromatischen Substrate, die von der BAL umgesetzt werden, weisen eine sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen auf. Neben der Einschränkung der Effizienz der BAL-Katalyse, wird dadurch die Untersuchung der Enzymaktivität wesentlich erschwert (Kapitel III-1.3). Die mit Wasser gut mischbaren organischen Lösungsmittel, wie z. B. PEG oder DMSO, vermitteln die Löslichkeit einer höheren Substratkonzentration, wodurch die analytischen Probleme aufgehoben werden können und die Produktivität des Biokatalysators verbessert wird.

In diesem Zusammenhang war es interessant herauszufinden, wie die katalytische Aktivität und Stabilität der BAL von diesen Lösungsmitteln beeinflusst wird.

Die wt-BALHis wurde in Kaliumphosphatpuffer mit Cofaktoren ohne Zusätze und in Anwesenheit von 15 % PEG-400 (v/v) bzw. 20 % DMSO (v/v) während 2 Tagen bei 25 °C

inkubiert. Die Restaktivitäten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem gekoppelten enzymatischen Test ermittelt (Abb. III-24).



**Abb. III-24:** Stabilität der wt-BALHis in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln. **1:** 50 mM KPi-Puffer, pH 7,0, 5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP; **2:** zusätzlich 15 % PEG-400 (v/v); **3:** zusätzlich 20 % DMSO (v/v). Inkubation bei RT. Als 100 % wurde die Aktivität im 1. Ansatz zu Beginn der Inkubation gesetzt.

Sowohl PEG als auch DMSO beeinflussen die Lyaseaktivität der wt-BALHis. Die Zugabe von PEG führte zu einer Erhöhung der Lyaseaktivität der wt-BALHis um 15-20 %. Hingegen inhibierte DMSO die Lyaseaktivität auf 12-15 % der Ausgangsaktivität in KPi. Der Vergleich der Restaktivitäten nach 49 h Inkubation bei 25 °C zeigte eine deutliche Erhöhung der Stabilität der BAL in Gegenwart von DMSO. Während die wt-BALHis sowohl im Puffer ohne Zusätze als auch in Anwesenheit von PEG innerhalb von 49 h ca. 40 % ihrer Aktivität verliert, bleibt die Enzymaktivität im Puffer mit DMSO in dieser Zeit vollkommen erhalten. Die Effizienz der BAL-Katalyse kann durch die Zugabe von PEG-400 wegen der größeren Substratkonzentration verbessert werden. Die Senkung der Aktivität in Anwesenheit von DMSO, die ebenso die grössere Substratkonzentrationen ermöglicht, kann bei Synthesen, die über einen längeren Zeitraum geführt werden, durch die höhere Enzymstabilität kompensiert werden.

## III.5 Charakterisierung der katalytischen Aktivitäten der wt-BALHis

### 5.1 Lyaseaktivität

#### 5.1.1 Lyaseaktivität gegenüber Benzoin

Wie im Kapitel III-1.3 beschrieben wurde, katalysiert die BAL die Spaltung der Acyloin-Bindung von Benzoin, wodurch die doppelte molare Menge des Benzaldehyds gebildet wird (Abb. III-2).

Die kinetischen Daten der von der BAL katalysierten Lyasereaktion lassen sich mit dem Michaelis-Menten-Modell beschreiben.

Nach diesem Modell wird die enzymatische Katalyse folgendermaßen dargestellt. Durch die Bindung des Substrats am Enzym bildet sich mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  ein sog. Enzym-Substrat-Komplex (ES), der entweder in Substrat und Enzym mit einer Reaktionskonstante  $k_2$  dissoziiert oder in das Produkt unter der Freisetzung des Katalysators mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_3$  umgesetzt wird. Da die Produktkonzentration am Anfang der Reaktion gering ist, kann die Rückreaktion, die zur Bindung des Produkts an das Enzym führt, vernachlässigt werden. Unter der Voraussetzung, dass die Substratkonzentration erheblich größer ist als die Enzymkonzentration, wird der Enzymsubstratkomplex stets neu aufgebaut, so dass seine Konzentration sich nicht mehr ändert. Dadurch stellt sich das Fließgleichgewicht zwischen dem freien Enzym und dem Enzymsubstratkomplex ein. Der Bereich, in dem Enzymsubstratkomplex vollständig aufgebaut ist und der Umsatz in der Zeit konstant bleibt wird als „steady-state“ bezeichnet. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration lässt sich im „steady-state“-Bereich mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad [\text{Gl. 2}]$$

$v$  Anfangsreaktionsgeschwindigkeit [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]

$[S]$  Substratkonzentration [M]

$V_{\max}$  Maximalgeschwindigkeit [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]

$K_M$  Michaelis-Menten-Konstante [M]

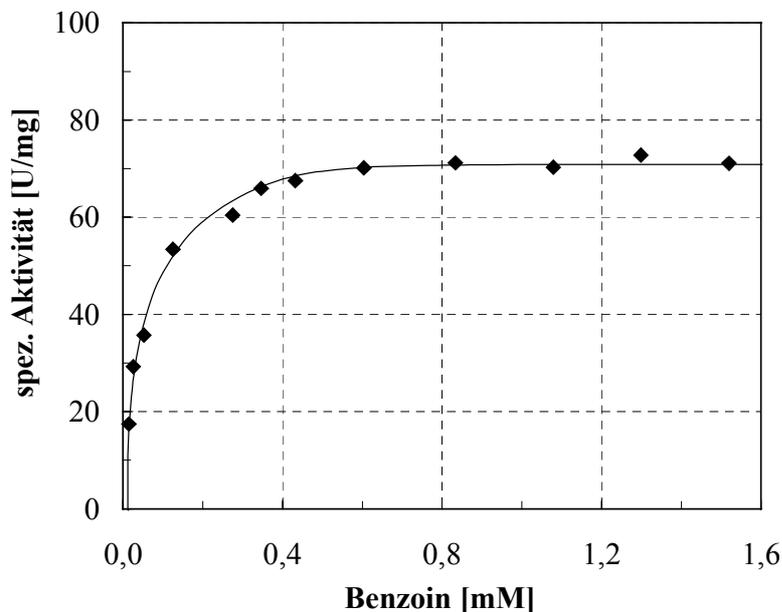
$K_M$  wird als Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte definiert:

$$K_M = \frac{k_1}{k_2 + k_3} \quad [\text{Gl. 3}]$$

Unter der Bedingung dass  $k_2 \gg k_3$  ist, ist der  $K_M$ -Wert der Dissoziationskonstante des ES identisch, und ist damit ein Maß der Affinität des Enzyms zum gegebenen Substrat. Andererseits gibt der  $K_M$ -Wert die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der Substratbindungsstellen besetzt wird, d.h. die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei der die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit erreicht wird.

Die enzymatische Katalyse zeichnet sich durch einen Sättigungseffekt aus. Bei einer Substratkonzentration, die zur vollständigen Auslastung des Enzyms führt, wenn alle Substratbindungsstellen besetzt werden ( $S \gg K_M$ ), wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, die durch weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr gesteigert wird.

Die Messung der Lyaseaktivität der wt-BALHis in Abhängigkeit von der Benzoinkonzentration ergab einen hyperbolischen Verlauf der  $v/S$ -Kurven (Abb. III-25), der den Sättigungseffekt wiedergibt.



**Abb. III-25:** Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis von der Benzoinkonzentration. Substratpuffer: 15 % PEG-400 in 50 mM Tris, pH 8.0, 0,1 mM ThDP, 5 mM  $MgCl_2$ ;  $T=30^\circ C$ .

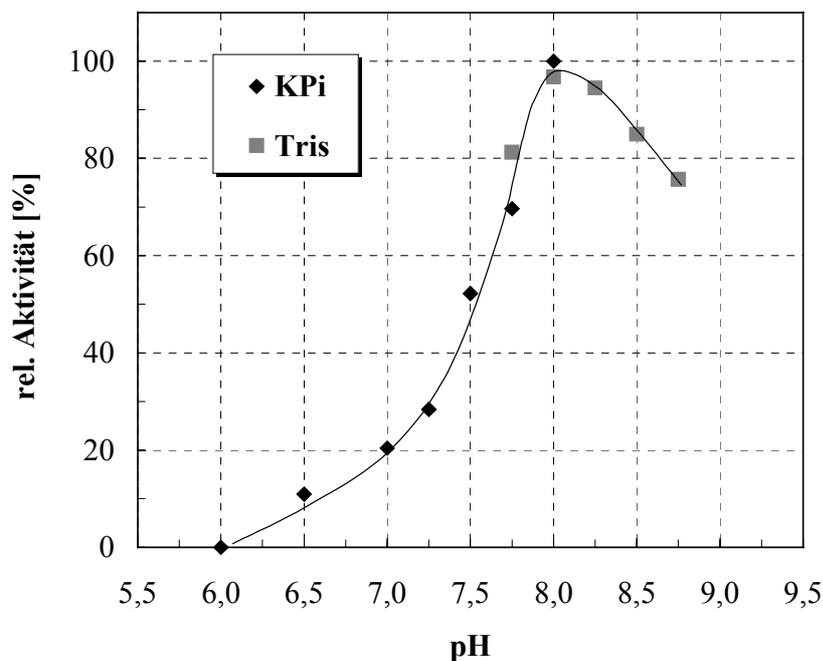
Die  $V_{max}$  von 74 U/mg wurde von der wt-BALHis bei Substratkonzentrationen oberhalb 0,6 mM erreicht. Der  $K_M$ -Wert wurde anhand der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten

mit dem Programm SCIENTIST<sup>®</sup> mit 48  $\mu\text{M}$  errechnet. Dieser Wert zeigt einen wesentlichen Unterschied zu dem in der Literatur angegebenen Wert von 9  $\mu\text{M}$  [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Dies kann durch den unterschiedlichen Substratpuffer (15 % PEG-400 in 50 mM KPi) bedingt sein. Da die Benzoinlöslichkeit in dem wässrigen Puffer ohne PEG (50 mM Tris), der in der Arbeit von Gonzalez und Vicuna benutzt wurde, viel geringer ist, konnte die Sättigungssubstratkonzentration in diesem Puffer nicht erreicht werden und die maximal gemessene Aktivität lag niedriger als  $V_{\text{max}}$ .

Die Untersuchung der Lyaseaktivität gegenüber Benzoin wurde unter Verwendung des racemischen Benzoin als Substrat durchgeführt. Es wurde allerdings später gezeigt, dass nur (*R*)-Benzoin von der BALHis umgesetzt wird. Mit dem (*S*)-Benzoin konnte keine Reaktion als Substrat nachgewiesen werden [Demir et al., 2001].

#### 5.1.1.1 pH-Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis

Die Bestimmung des pH-Optimums wurde unter Verwendung von zwei Puffern (KPi und Tris) durchgeführt, wodurch die Aktivitätsmessungen in einem weiteren pH-Bereich ermöglicht wurden. Es ergab sich für die Lyasereaktion der wt-BALHis ein scharfes Optimum bei pH 8,0 (Abb. III-26).

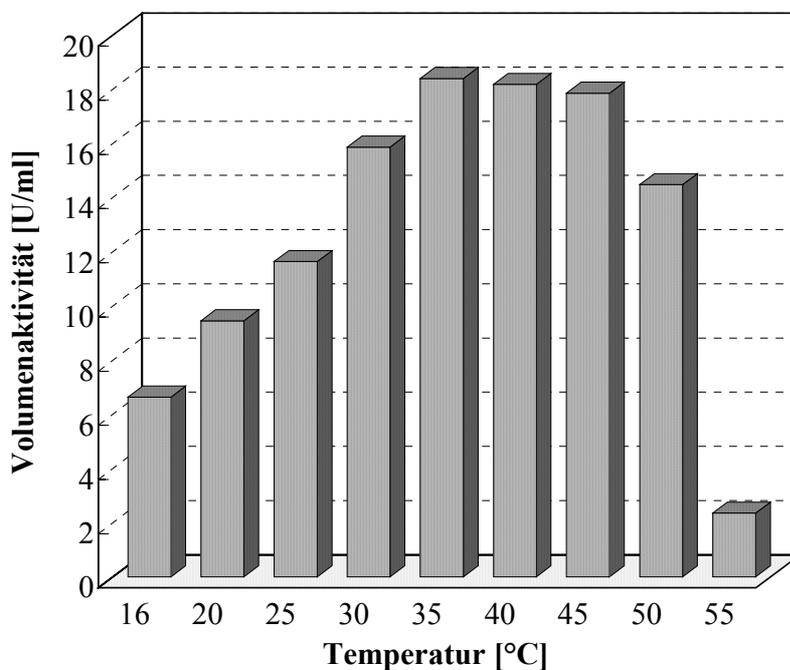


**Abb. III-26:** Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis vom pH-Wert. Die Lyaseaktivität wurde mit dem direkten Test bestimmt. Benzoinkonzentration betrug 0,15 mM; T=30 °C.

Protonierung- und Deprotonierungsschritte spielen eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus ThDP-abhängigen Enzymen [Lobell & Crout, 1996; Schneider & Lindqvist, 1998; Sergienko & Jordan, 2001; Polovnikova et al., 2002]. Dies erklärt die deutliche pH-Abhängigkeit der BAL-Reaktion, da ihr katalytischer Mechanismus wahrscheinlich auch die Beteiligung ionisierbarer Aminosäureresten im aktiven Zentrum einschließt (siehe auch Kapitel III-5.4).

### 5.1.1.2 Temperaturabhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis

Das Temperaturoptimum der Lyaseaktivität wurde mit dem direkten photometrischen Test bestimmt, um den Einfluss der Temperaturabhängigkeit der als Hilfsenzym verwendeten HL-ADH auszuschließen (Abb. III-27). Die wt-BALHis weist eine maximale Aktivität zwischen 35 und 45 °C auf. Eine weitere Steigerung der Temperatur führt zur starken Abnahme der Aktivität, die durch die niedrige Enzymstabilität und Verlust der nativen Proteinstruktur verursacht wird, was bei der Bestimmung des  $T_M$ -Werts gezeigt wurde (Kapitel III.4-2; Abb. III-16).



**Abb. III-27:** Temperaturabhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis. Die Lyaseaktivität wurde im direkten Assay (50mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM ThDP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1mM Benzoin) bestimmt.

Die Lyaseaktivität der BAL zeigt zwischen 16 und 35 °C eine exponentielle Abhängigkeit von der Temperatur. In diesem Temperaturbereich kann die temperaturabhängige Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Ein-Substrat-Reaktion mit der Arrhenius Gleichung beschrieben werden:

$$k_{cat} = A(T) \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad [\text{Gl. 4}]$$

$E_A$	Aktivierungsenergie [ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$R$	allg. Gaskonstante [ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ]
$T$	absolute Temperatur [K]
$k_{cat}$	Katalysekonstante [ $\text{s}^{-1}$ ]

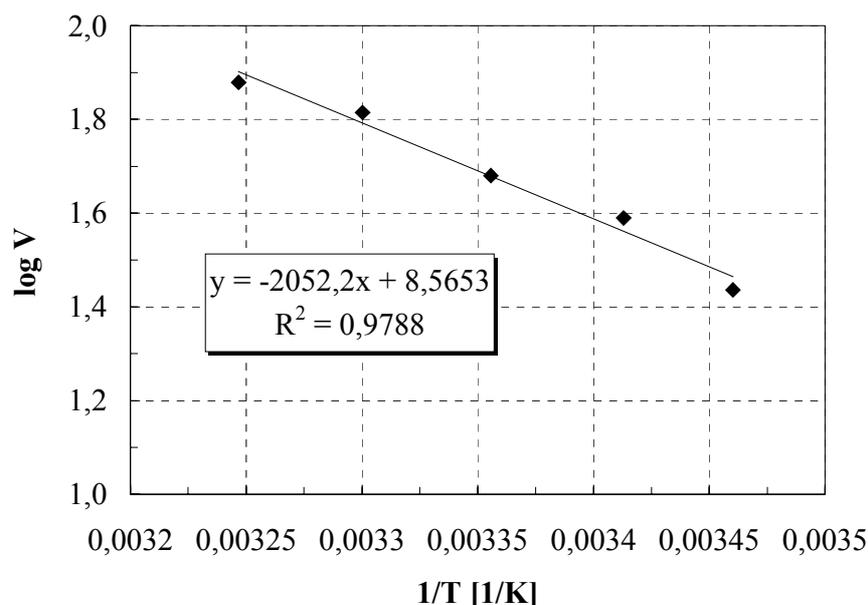
Die Katalysekonstante kann aus der Maximalgeschwindigkeit berechnet werden, wenn die Konzentration der aktiven Zentren bekannt ist:

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E_0]} \quad [\text{Gl. 5}]$$

$V_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]
$[E_0]$	Konzentration der aktiven Zentren des Enzyms [M]

Unter der Annahme, dass die Aktivierungsenergie ( $E_A$ ) in einem engen Temperaturbereich konstant bleibt, lässt sich die Aktivierungsenergie der Lyasereaktion anhand der gemessenen Volumenaktivität bestimmen.

Im direkten photometrischen Test, der in dem vorliegenden Versuch angewandt wurde, konnte keine  $V_{\max}$  gemessen werden, da die höchstmögliche Substratkonzentration, die in diesem Test benutzt werden konnte, aus messtechnischen Gründen auf 0,1 mM begrenzt war (siehe Kapitel III-1.3). Unter Berücksichtigung, dass  $V_{\max}$  in der Michaelis-Menten-Gleichung [Gl. 2] den temperaturabhängigen Anteil ausmacht, kann  $E_A$  allerdings auch anhand der temperaturabhängigen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in einem Reaktionsansatz mit einer bestimmten Substratkonzentration bestimmt werden. Durch Auftragen von  $\log_{10}$  der in dem Temperaturbereich zwischen 16 und 35 °C gemessenen Volumenaktivität gegen  $1/T$  wird eine Gerade erhalten (Abb. III-28), aus deren Steigung die Aktivierungsenergie der enzymatischen Spaltung des Benzoin zu Benzaldehyd auf 17 kJ/mol berechnet wurde.



**Abb. III-28:** Arrhenius-Plot. Temperaturabhängigkeit der Lyaseaktivität.

### 5.1.2 Das Substratspektrum der Lyaseaktivität der wt-BALHis

Aus den Literaturangaben war bekannt, dass von der BAL ausschließlich die 2-Hydroxyketone Benzoin und p-Methoxybenzoin (Anisoin) als Substrate akzeptiert werden [Gonzalez & Vicuna, 1989]. Die Lyaseaktivität der wt-BALHis wurde in dieser Arbeit auch in Bezug auf andere zugängliche 2-Hydroxyketone, wie die kommerziell erhältlichen racemischen Verbindungen Acetoin und 2-Hydroxy-2-methylpropiophenon (2-HMPP) und (*R*)-2-Hydroxypropiophenon (2-HPP), das mit Hilfe der wt-BALHis synthetisiert werden konnte (Kapitel III-5.2.2 und III-5.2.3) untersucht (Abb. III-29).

Dabei zeigte sich, dass die wt-BALHis aliphatisches Acetoin nicht spalten kann (Abb. III-29 (4)), während das 2-HPP, das einen aromatischen Ring besitzt, von der wt-BALHis, wenn auch mit einer niedrigeren Aktivität als Benzoin umgesetzt wurde (Abb. III-29 (2)). Dies deutet auf eine Spezifität der wt-BALHis für aromatische Verbindungen. Das Benzoinderivat, 2-HMPP (Abb. III-29 (3)), konnte von der wt-BALHis allerdings nicht umgesetzt werden. Wahrscheinlich wird die Größe der Substratbindungstasche durch die Einführung der zusätzlichen Methylengruppe, die zu einer dreidimensionalen Ausdehnung des aliphatischen Rests führt, überschritten. Auch die niedrigere Polarität des Ketons, das bei der Spaltung des 2-HMPP gebildet wäre, kann dessen Abspaltung erschweren und die fehlende Lyaseaktivität der BALHis gegenüber diesem Substrat erklären.

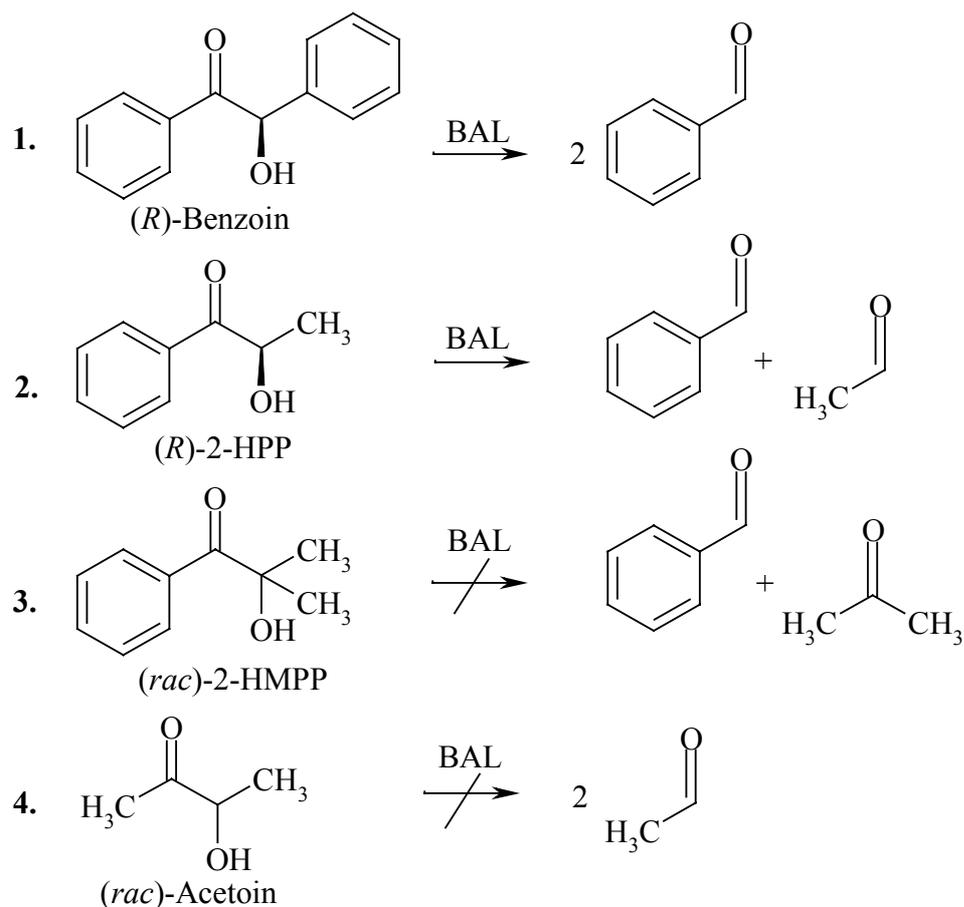


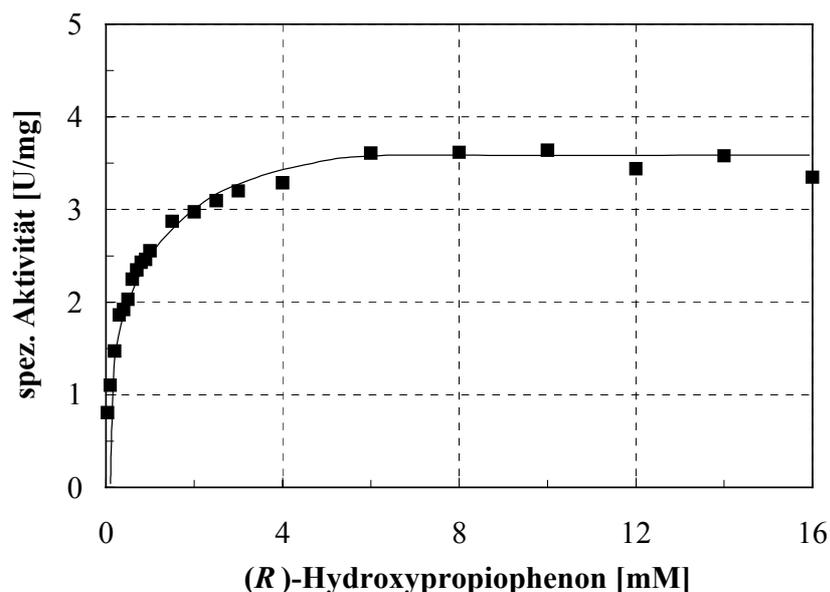
Abb. III-29: Substratspektrum der Lyaseaktivität der wt-BALHis.

Die weiteren kinetischen Daten für die Lyaseaktivität der wt-BALHis wurden mit (*R*)-2-HPP als Substrat bestimmt.

### 5.1.3 Lyaseaktivität der wt-BALHis ausgehend von (*R*)-Hydroxypropiophenon

Die wt-BALHis katalysiert die Spaltung des (*R*)-2-HPP unter Bildung von Benzaldehyd und Acetaldehyd (Abb. III-29 (2.)).

Die Aufnahme der Lyaseaktivität in Abhängigkeit von (*R*)-2-HPP-Konzentration ergab, wie auch bei der Untersuchung der Benzoinspaltung, einen hyperbolen v/S-Plot (Abb. III-30).



**Abb. III-30:** Abhängigkeit der Lyaseaktivität der wt-BALHis von der (*R*)-2-HPP-Konzentration. Substratpuffer 50 mM Tris, pH 8.0, 0,1 mM ThDP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>. T=30°C.

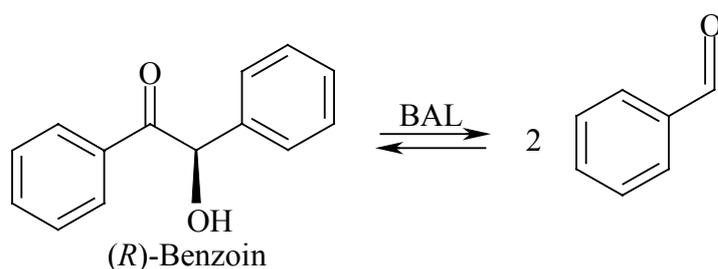
Die maximale spezifische Aktivität wurde bei einer (*R*)-HPP-Konzentration von 6 mM erreicht und betrug 3,6 U/mg. Der  $K_M$ -Wert der wt-BALHis für (*R*)-HPP wurde mit 0,33 mM bestimmt. D.h. die wt-BALHis weist neben einem ca. 7-fach höheren  $K_M$ -Wert eine 20-fach geringere Aktivität bezüglich HPP im Vergleich zu Benzoin auf (siehe Kapitel III-5.1.1). Diese Verhältnisse zeigen, dass der zweite aromatische Ring des Substrats sowohl für die Substratbindung als auch für die weitere Katalyse wichtig ist.

Es muss auch berücksichtigt werden, dass sich der vorliegende  $K_M$ -Wert auf ein Enantiomer des HPP bezieht. Da racemisches Hydroxypropiophenon nicht kommerziell erhältlich ist, wurde das HPP für diese Versuchsreihe mittels wt-BALHis hergestellt, die wie später beschrieben wird (Kapitel III-5.2.2, III-5.2.3), auch die Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-HPP ( $ee > 99\%$ ) katalysiert. Der für (*R*)-HPP bestimmte  $K_M$ -Wert kann, wenn die Enantioselektivität der wt-BALHis bezüglich HPP hoch ist, wie es im Fall des Benzoin nachgewiesen wurde (Kapitel III-5.1.1), bis zu zweimal geringer sein, als der für das Racemat.

## 5.2 Ligaseaktivität

### 5.2.1 Synthese von Benzoin ausgehend von Benzaldehyd

In der Literatur wurde ausschließlich die Lyaseaktivität der BAL beschrieben [Gonzalez & Vicuna, 1989]. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die BAL auch die Rückreaktion der Benzoinspaltung, d.h. die Acyloinkondensation von Benzaldehydmolekülen katalysiert und damit ein synthetisches Potenzial besitzt (Abb. III-31).



**Abb. III-31:** Von der BAL katalysierte Reaktionen der Benzoinspaltung und Benzoin synthese.

Die enzymatische Synthese von Benzoin ausgehend von Benzaldehyd konnte sowohl mit wt-BAL als auch mit wt-BALHis nachgewiesen werden.

Mit der wt-BALHis wurde in Anwesenheit von 20 % DMSO ein fast vollständiger Umsatz (97 %) von Benzaldehyd zum enantiomerenreinen (R)-Benzoin erreicht.<sup>1</sup> Der Enantiomerenüberschuss wurde durch chirale HPLC als >99 % ermittelt [Demir et al., 2001].

Die Optimierung der Bedingungen der Carboligasereaktion ausgehend von Benzaldehyd wie auch die Untersuchung des Substratspektrums der Ligasereaktion wurde mit der wt-BALHis durchgeführt.

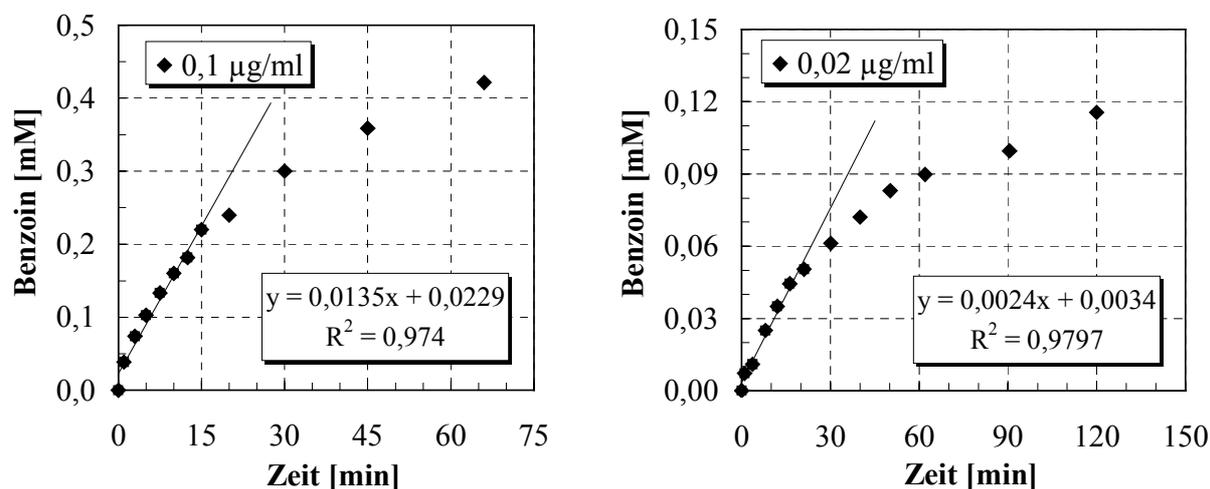
#### 5.2.1.1 Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Ligasereaktion

Um die Ligaseaktivität der wt-BALHis zu charakterisieren, sollte zuerst der Zeitraum bestimmt werden, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit der von der wt-BALHis katalysierten Benzaldehydkondensation konstant bleibt. Dafür wurde die Benzoinbildung durch eine

---

<sup>1</sup> Eine präparative Synthese des Benzoins mit der wt-BALHis wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Müller (Institut für Biochemie 2, FZ Jülich) ausgeführt.

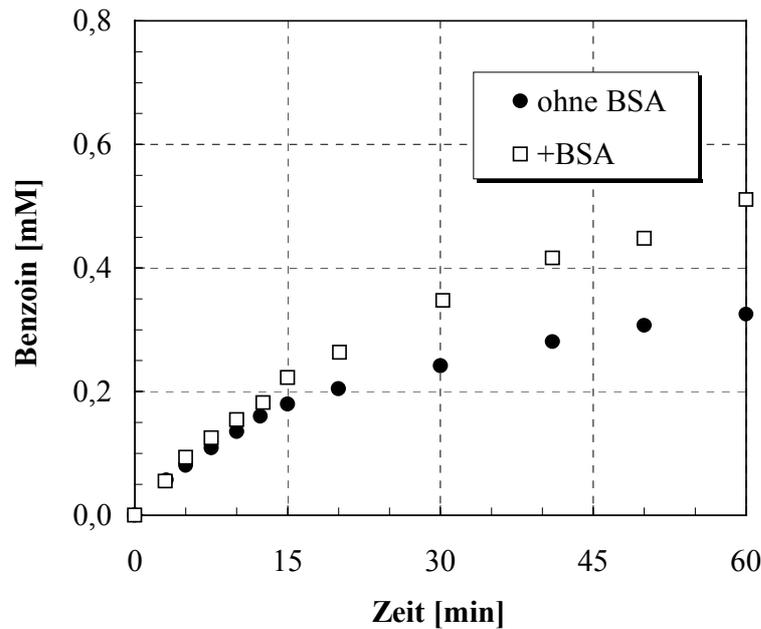
direkte HPLC-Analyse von Aliquots aus dem Reaktionsansatz verfolgt (Abb. V-7). Wegen der schlechten Löslichkeit des Benzoin wurde die Zeit der online-Analyse oder die maximal einzusetzende Enzymmenge durch die Menge des synthetisierten Benzoin eingeschränkt, das in der wässrigen Lösung gelöst werden kann. Die Enzymkonzentration im Reaktionsansatz wurde in Abhängigkeit von der katalytischen Aktivität unter den jeweiligen Bedingungen auf 0,05-0,1  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt. Dadurch konnte die Ligasereaktion während ca. 1 Stunde verfolgt werden. Der Zeitraum, in dem die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen werden konnte, war allerdings wesentlich kleiner (ca. 15 min). Es wurde eine Abnahme der Geschwindigkeit der Benzoin synthese mit der Zeit nachgewiesen, die unabhängig von der gebildeten Menge des Benzoin gemessen wurde. Eine Verringerung der Enzymkonzentration konnte diese Zeit nicht verlängern (Abb. III-32).



**Abb. III-32:** Zeitlicher Verlauf der Benzoin synthese bei zwei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen. Reaktionsansatz: 30 mM Benzaldehyd, 50 mM KPi, pH 7,0; 2,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,1 mM ThDP;  $T=30\text{ }^\circ\text{C}$ .

Da die Abnahme der Syntheseleistung vom Umsatz nicht beeinflusst wurde, lässt sie sich nicht durch die Rückreaktion, die ab einer bestimmten Benzoinkonzentration nicht mehr zu vernachlässigen ist, oder durch eine zu niedrige Substratkonzentration erklären. Durch erneute Enzymzugabe stieg die Syntheseleistung wieder. Damit lag die Vermutung nahe, dass das Enzym im Laufe der Reaktion inaktiviert wird.

Die Senkung der Enzymaktivität konnte durch die Zugabe von BSA zum Reaktionsansatz verlangsamt werden (Abb. III-33). Daher lag die gemessene niedrige Stabilität der wt-BALHis zumindest teilweise an der geringen Proteinkonzentration, die in den Reaktionsansätzen aus messtechnischen Gründen eingestellt werden musste.



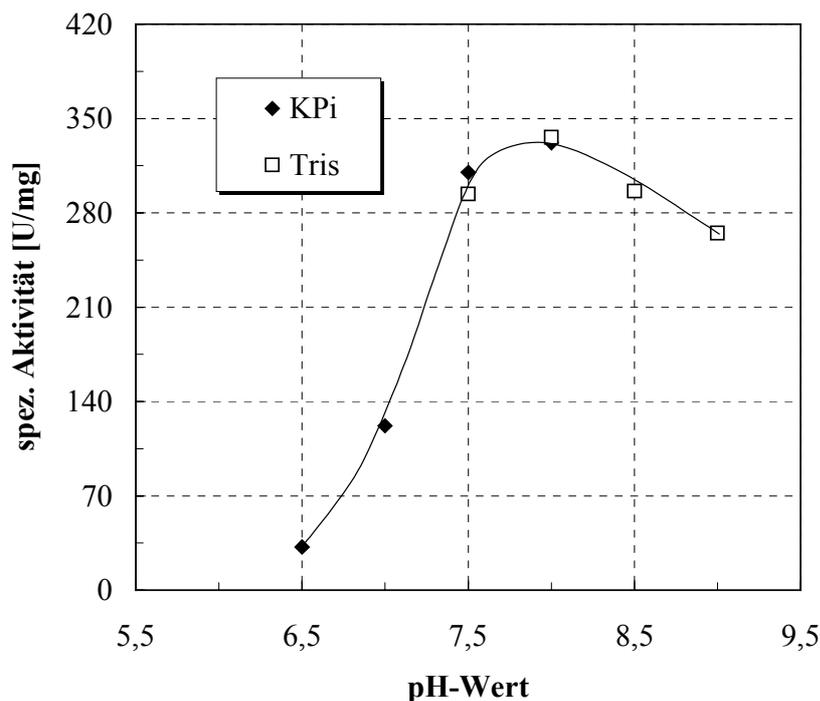
**Abb. III-33:** Einfluss der Proteinkonzentration auf den zeitlichen Verlauf der Benzoin synthese. Reaktionsansatz: 30 mM Benzaldehyd, 50 mM KPi, pH 7,5; 2,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP;  $T=30\text{ }^{\circ}C$ . Enzymkonzentration in beiden Ansätzen betrug 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , BSA-Konzentration betrug 1 mg/ml.

Als mögliche Ursachen der Enzyminaktivierung kamen auch die Substratinhibierung bei der hohen Benzaldehydkonzentrationen und die beim Rühren entstehenden Scherkräfte in Frage. Da die Senkung der Enzymaktivität unabhängig von der Produktkonzentration beobachtet wurde, konnte eine kinetische Produktinhibierung ausgeschlossen werden. Die Abhängigkeit der Ligaseaktivität von der Benzaldehydkonzentration wird im Kapitel III-5.2.1.3 diskutiert. Der Zeitraum, in dem die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei der eingestellten Enzymkonzentration (0,05-0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) gemessen werden konnte, betrug 12-15 min.

### 5.2.1.2 Abhängigkeit der Ligaseaktivität vom pH-Wert

Um die Abhängigkeit der Ligaseaktivität der wt-BALHis vom pH-Wert zu bestimmen, wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Benzoin synthese bei unterschiedlichen pH-Werten in KPi und in Tris-Puffer in Anwesenheit von 30 mM Benzaldehyd aufgenommen (Abb. III-34).

Das pH-Profil der Ligaseaktivität zeigt wie auch im Fall der Lyaseaktivität ein Maximum bei pH 8,0. Damit war es nicht möglich, die Reaktionsrate der Carboligasereaktion gegenüber der Lyasereaktion durch die Änderung des pH-Werts zu steigern.



**Abb. III-34:** pH-Abhängigkeit der Ligaseaktivität der wt-BALHis.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen pH-Werten wurden mittels zeitabhängiger HPLC-Analyse der Batchansätze bestimmt. Reaktionsansatz: 30 mM Benzaldehyd, 50 mM KPi, bzw. 50 mM Tris; 2,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP;  $T=30\text{ °C}$ . Enzymkonzentration in den Reaktionsansätzen betrug 0,1  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , abhängig von der Enzymaktivität.

1 U der Ligaseaktivität der wt-BALHis wurde als die Enzymmenge definiert, die 1  $\mu\text{mol}$  Benzoin bei  $30\text{ °C}$  in einer Minute bildet.

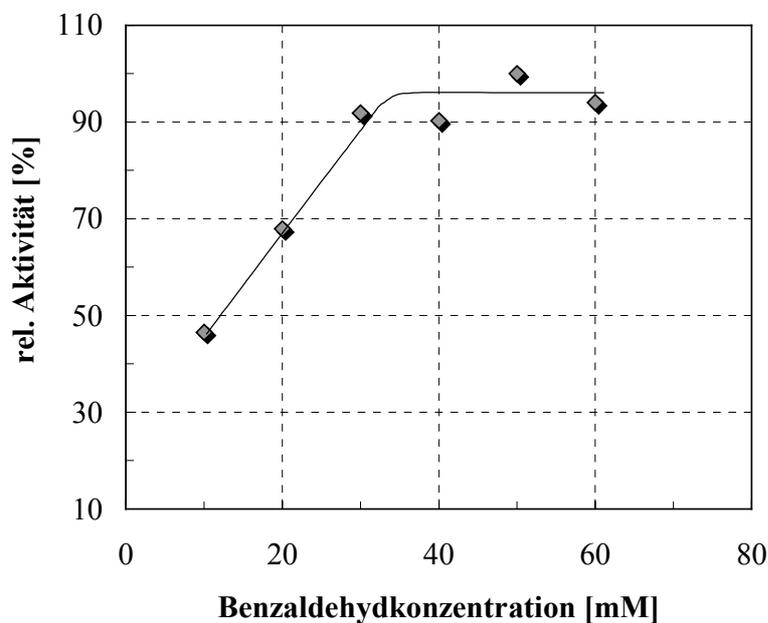
Die unter den angegebenen Bedingungen maximale gemessene spezifische Ligaseaktivität der wt-BALHis ist mit 336 U/mg 4,5 mal größer als die Lyaseaktivität. Das lässt vermuten, dass nicht die Spaltung, sondern die Bildung von 2-Hydroxyketonen die natürliche Aktivität der wt-BALHis darstellt. Die katalytische Aktivität weist damit eine größere Ähnlichkeit mit der katalytischen Aktivität der Transketolase auf, als mit der der  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen, bei denen die Ligaseaktivität eine Nebenaktivität darstellt. Daher könnte die BAL ein Bestandteil des anabolischen Wegs von *Ps. fluoreszens* sein.

### 5.2.1.3 Abhängigkeit der Ligaseaktivität von der Benzaldehydkonzentration

Aus früheren Arbeiten [Iding, 1998] war bekannt, dass die BFD in Gegenwart von Benzaldehydkonzentrationen von 60 mM und darüber schnell inaktiviert wird. Um herauszufinden, wie die Ligaseaktivität und die Stabilität der wt-BALHis von der

Benzaldehydkonzentration beeinflusst wird, wurde die Benzoin synthese bei unterschiedlichen Benzaldehydkonzentrationen mittels HPLC verfolgt.

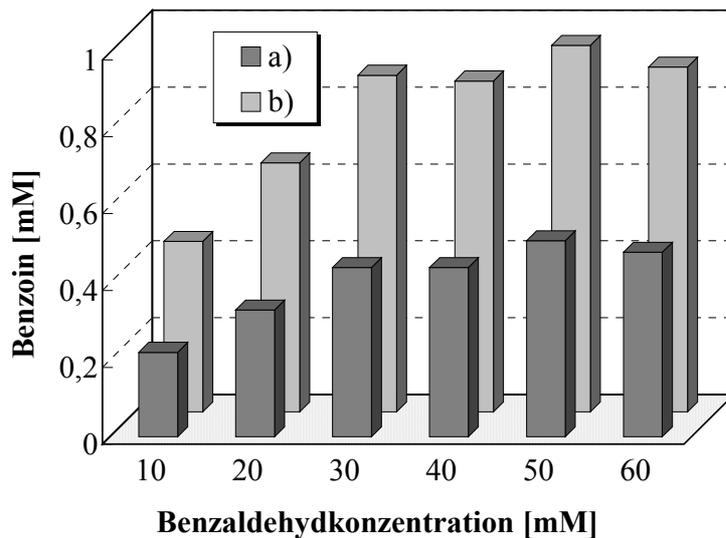
In der Literatur werden unterschiedliche Werte für die Löslichkeit von Benzaldehyd in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur angegeben: 30 mM [Shin & Rogers, 1995], 40-50 mM [Iding, 1998] und bis zu 60 mM [Greiner, 1999]. In eigenen Experimenten konnte nach 1 Stunde Rühren bei 30 °C eine maximale Benzaldehydkonzentration in wässriger Lösung von 60 mM erreicht werden. Die Aufnahme der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Gegenwart von Benzaldehydkonzentrationen bis zu 60 mM ergab eine hyperbolische Abhängigkeit der Ligaseaktivität von der Substratkonzentration (Abb. III-35). Es wurde keine Inhibierung der katalytischen Aktivität beobachtet.



**Abb. III-35:** Abhängigkeit der Ligaseaktivität der wt-BALHis von der Benzaldehydkonzentration. Reaktionsansatz: 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5; 2,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP; T=30 °C. Enzymkonz.=0,05  $\mu$ g/mL. 100 % entspricht 320 U/mg.

Es muss betont werden, dass die Homogenität der Lösung eine unvermeidliche Bedingung für die Stabilität der wt-BALHis darstellt. In den Reaktionsansätzen, in denen Benzaldehyd nicht vollständig gelöst war, konnte kaum Benzoinbildung nachgewiesen werden. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist eine rasche Enzyminaktivierung an der Grenzfläche des gebildeten Zweiphasensystems. Die Inaktivierung bei hohen Benzaldehydkonzentrationen, die im Fall der BFD beobachtet wurde, könnte wahrscheinlich gerade durch die Bildung eines Zweiphasensystems und nicht durch die unmittelbare Wechselwirkung des Benzaldehyds mit dem Enzym bedingt werden.

Beim Vergleich der nach 60 Minuten gemessenen Benzoinkonzentration mit der Produktkonzentration, die ausgehend von der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (Abb. III-35) gebildet werden sollte, konnte eine Enzyminaktivierung in allen Reaktionsansätzen beobachtet werden, während sich die Benzaldehydkonzentration kaum auf die Syntheseleistung auswirkte (Abb. III-36).



**Abb. III-36:** Stabilität der wt-BALHis in Abhängigkeit von der Benzaldehydkonzentration.

**a)** Benzoinkonzentrationen, die nach 60 min in den unterschiedlichen Ansätzen gemessen wurden;

**b)** Soll-Werten: Benzoinkonzentrationen, die ausgehend von der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei der unterschiedlichen Benzaldehydkonzentrationen innerhalb von 60 min gebildet werden sollten.

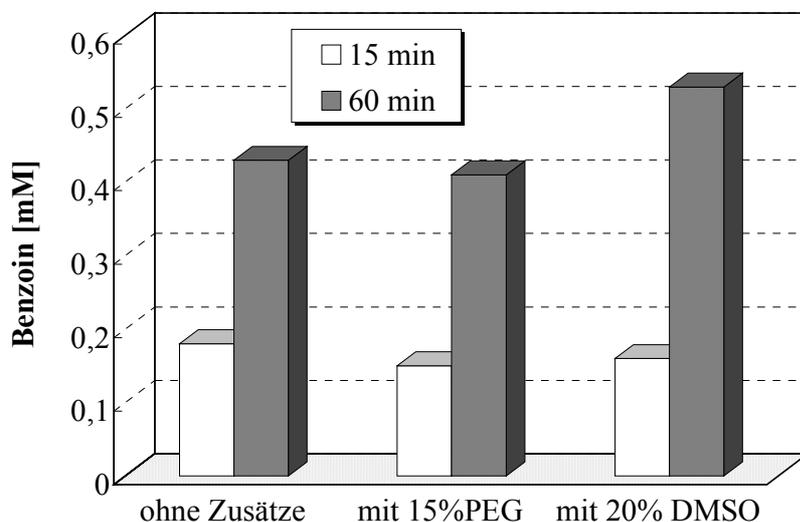
Reaktionsansatz: 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5; 2,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP; T=30 °C. Enzymkonz.=0,05  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 5.2.1.4 Ligaseaktivität in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln

Da die Löslichkeit des als Substrat eingesetzten Benzaldehyds in wässrigen Lösungen gering ist, wurde versucht mit Lösungsvermittlern wie DMSO und PEG eine Erhöhung der Substratkonzentration im Reaktionsansatz zu erreichen. Zunächst wurde jedoch der Einfluss von DMSO und PEG auf die Enzymstabilität und Aktivität untersucht. Um die Abhängigkeit der unterschiedlichen Enzymaktivitäten von organischen Lösungsmitteln vergleichen zu können, wurden im vorliegenden Versuch die gleichen Konzentrationen der Lösungsmittel, wie bei der Untersuchung der Lyaseaktivität eingestellt.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der wt-BALHis in Gegenwart von DMSO und PEG, wie auch die Stabilität des Enzyms gegenüber diesen Lösungsmitteln wurden entsprechend anhand der Syntheseleistung innerhalb von 15 min, bzw. einer Stunde mit HPLC-Analyse von Batchreaktionsansätzen bestimmt (Abb. III-37).

Da die Löslichkeit des Magnesiumphosphats in Anwesenheit von DMSO bei pH 7,5 gering ist, wurde der vorliegende Versuch bei pH 7,0 durchgeführt.



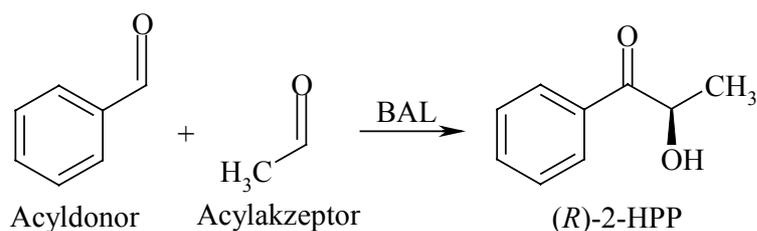
**Abb. III-37:** Ligaseaktivität der wt-BALHis in Anwesenheit von PEG und DMSO. Reaktionsansatz: 30 mM Benzaldehyd, 50 mM KPi-Puffer, pH 7,0; 2,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP; T=30 °C. Enzymkonz.=0,1  $\mu$ g/ml.

Während die Lyaseaktivität in Anwesenheit von DMSO sehr stark abnimmt (Kapitel III-4.5), wird die Ligaseaktivität weder von PEG noch von DMSO stark beeinflusst. Die Ligaseaktivität der wt-BALHis in Gegenwart von 15 % PEG (v/v) bzw. 20 % DMSO (v/v) betrug jeweils 82 % bzw. 87 % der Ligaseaktivität in KPi-Puffer. Eine höhere Stabilität der wt-BALHis in Anwesenheit von 20 % DMSO, die bei der Bestimmung der Lyaseaktivität ermittelt wurde (Kapitel III-4.5), wurde auch im vorliegenden Versuch bestätigt.

Wie schon erwähnt wurde, gelingt in Anwesenheit von 20 % DMSO eine fast vollständige Umsetzung (97 %) von Benzaldehyd zu (*R*)-Benzoin (ee >99 %) [Demir et al., 2001]. Die von der wt-BALHis katalysierte effektive Benzoin synthese in Gegenwart von DMSO basiert wahrscheinlich auf der Gesamtheit der drei beschriebenen Faktoren - der hohen Ligaseaktivität, der niedrigen Lyaseaktivität und hohen Enzymstabilität im Reaktionsansatz mit DMSO.

### 5.2.2 Synthese von Hydroxypropiofenon ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd

In Anwesenheit eines aliphatischen Aldehyds wurde Benzaldehyd von der wt-BALHis zu 95 % in ein (*R*)-Hydroxypropiofenon mit einem ee-Wert von >99 % umgesetzt (Abb. III-38) [Demir et al., 2001]. Die enzymatische Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-HPP konnte mit der wt-BALHis zum ersten Mal durchgeführt werden. Die Carboligation zum (*R*)-HPP entspricht einer unsymmetrischen C-C-Verknüpfung zwischen einem „aktiven Benzaldehyd“ als Acyldonor und Acetaldehyd als Acylakzeptor.

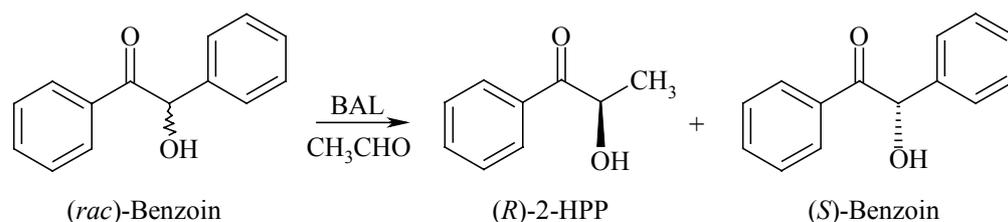


**Abb. III-38:** Darstellung von (*R*)-2-HPP ausgehend von Aldehyden mittels BAL-Katalyse.

Durch Monitoring der Reaktion mittels HPLC-Analyse von Aliquots, die nach verschiedenen langer Inkubationszeit aus einem Batchansatz entnommen wurden, wurde die Bildung von (*R*)-Benzoin beobachtet, das anschließend wieder abgebaut wurde, während die Synthese von (*R*)-HPP detektiert werden konnte. Acetoin wurde in dem Reaktionsansatz nicht detektiert. Das weist darauf hin, dass Benzaldehyd sowohl als Acyldonor als auch als Acylakzeptor von der BAL toleriert wird, während Acetaldehyd nicht als Acyldonor sondern nur als Acylakzeptor in der BAL-katalysierten Reaktion fungieren kann. Es konnten auch keine Syntheseprodukte ausgehend von Acetaldehyd als alleinigem Substrat detektiert werden.

### 5.2.3 Synthese ausgehend von Benzoin und Acetaldehyd als Substrate

Im Unterschied zu  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylasen, die zwar die Acyloinbindung katalysieren, nicht jedoch Acyloine als Substrate akzeptieren können, weist die BAL auch ausgehend von Benzoin Ligaseaktivität auf. In Gegenwart von Acetaldehyd wird (*R*)-Benzoin von der wt-BALHis zu 99 % zu (*R*)-Hydroxypropiofenon (ee > 99 %) umgesetzt. Ausgehend von (*S*)-Benzoin konnte keine Reaktion nachgewiesen werden. Beim Einsatz von (*rac*)-Benzoin als Substrat wird infolge der Racematspaltung enantiomerenreines (*S*)-Benzoin (ee > 99 %) hergestellt, das bisher nicht durch eine enzymatische Synthese zugänglich war (Abb. III-39) [Demir et al., 2001].



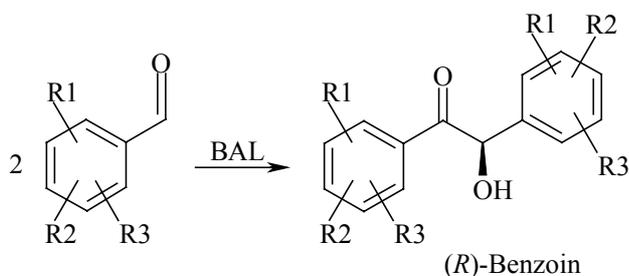
**Abb. III-39:** Darstellung von (*R*)-2-HPP und (*S*)-Benzoin mittels BAL-Katalyse ausgehend von racemischem Benzoin.

### 5.2.4 Das Substratspektrum der Ligasereaktion der wt-BALHis

Im Vergleich zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen besitzt die BAL eine sehr hohe Ligaseaktivität von ca. 336 U/mg (Kap.III-5.2.1.2) (vgl. z.B. zu BFD, die über eine Ligaseaktivität von ca. 6 U/mg ausgehend von Aldehyden verfügt [Iding et al., 2000]). Dies macht die Anwendung der BAL in der organischen Synthese für die Katalyse von C-C-Verknüpfungen besonders interessant.

Das synthetische Potenzial der wt-BALHis wurde in anschließenden Arbeiten von Dr. A. Demir und Dr. D. Kolter<sup>1</sup> ausführlich untersucht. Das Enzym erwies sich als ein interessanter Biokatalysator, der ein breites Substratspektrum akzeptiert und die Synthese von unterschiedlichen chiralen 2-Hydroxyketonen ermöglicht.

Neben Benzaldehyd wurde von der wt-BALHis eine ganze Reihe aromatischer Aldehyde, die in ortho-, para- oder meta-Stellung einfach oder mehrfach substituiert sind, als Substrat akzeptiert (Abb. III-40). Die substituierten Benzaldehyde konnten sowohl als Donoren als auch als Akzeptoren fungieren. Dabei gelingt es, in Anwesenheit von zwei unterschiedlich substituierten Benzaldehyden sowohl symmetrische als auch unsymmetrische (*R*)-Benzoinderivate, u. a. auch mit voluminösen und elektronenziehenden Substituenten zu synthetisieren.



**Abb. III-40:** Darstellung von (*R*)-Benzoinderivaten mittels BAL-Katalyse.

<sup>1</sup> Institut für Biotechnologie 2. FZ Jülich.

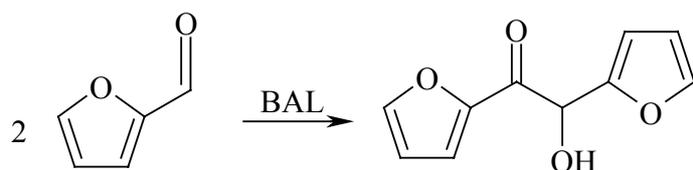
Die Tabelle III-5 zeigt eine Auswahl präparativer Synthesen symmetrischer (*R*)-Benzoinen, die mit der wt-BALHis mit hohen ee-Werten und mit guter Ausbeute durchgeführt wurden.

**Tab. III-5:** Darstellung von symmetrischen (*R*)-Benzoinen ausgehend von Benzaldehydderivaten mittels BAL-Katalyse.

Als Substrat diente jeweils ein Benzaldehyd-Derivat (20-60 mM). R1 - Substituent des Benzaldehyds bzw. Benzoin. Reaktionszeit 20 Std.

R1	Ausbeute [%]	ee [%]
o-methoxy	94	98
m-methoxy	96	96
p-methoxy	96	>99
o-chloro	92	>99
o-hydroxy	91	91
o-methyl	92	>99
p-methyl	98	>99

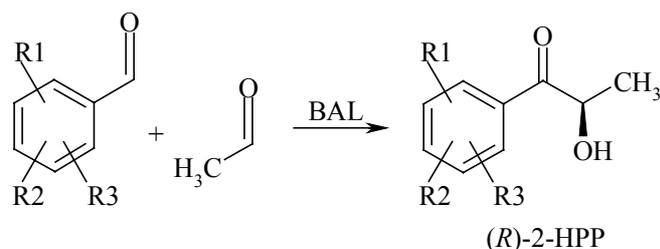
Auch heterocyclische aromatische Aldehyde wurden von der wt-BALHis zu 2-Hydroxyketonen umgesetzt. So konnte ausgehend von Furfural-2-carbaldehyd symmetrisches 2,2'-Furoin synthetisiert werden (Abb. III-41).



**Abb. III-41:** Darstellung von 2,2'-Furoin mittels BAL-Katalyse.

Wurde in der Reaktion Acetaldehyd neben einem aromatischen Aldehyd zugesetzt, katalysiert die wt-BALHis die Synthese unterschiedlicher (*R*)-HPP-Derivate mit mehreren Substituenten (Abb. III-42).

Einige Beispiele von (*R*)-2-HPP-Derivaten, die mit Hilfe der wt-BALHis-katalysierten Carboligations zugänglich waren, werden in der Tabelle III-6 dargestellt.



**Abb. III-42:** Darstellung von (R)-2-HPP-Derivaten mittels BAL-Katalyse ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehydderivaten.

Im Unterschied zu der BFD-katalysierten Synthese wurden von der wt-BALHis anstelle des Acetaldehyds auch andere aliphatische Aldehyde mit verlängerten Kohlenstoffketten (z.B. Propionaldehyd oder Butylaldehyd), wie auch ungesättigte Aldehyde als Acylakzeptoren toleriert. Als Acyldonoren wurden die aliphatischen Aldehyde von der wt-BALHis allerdings nicht akzeptiert, in Abwesenheit aromatischer Aldehyde wurden keine Syntheseprodukte detektiert.

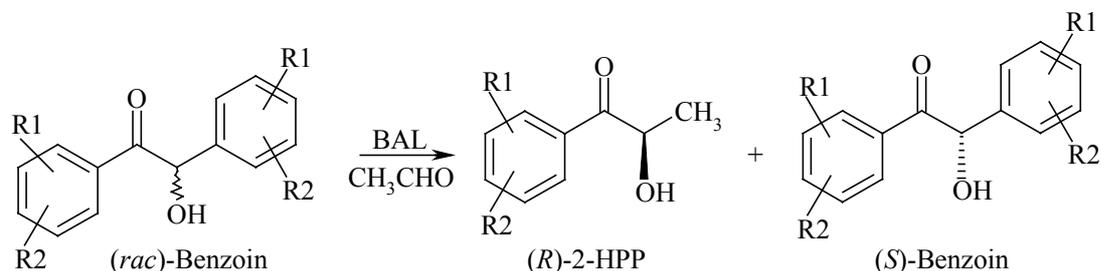
**Tab. III-6:** Darstellung von (R)-2-HPP-Derivaten ausgehend von Benzaldehyd-Derivaten und Acetaldehyd mittels BAL-Katalyse.

Benzaldehydkonzentration (20-60 mM). R1, R2, R3 - Substituenten des Benzaldehyds bzw. des (R)-2-HPP Derivats. Reaktionszeit 20 Std.

R1	R2	R3	Umsatz [%] (ee [%])
H	H	H	100 (>99)
1-chloro	H	H	94 (>99)
1-methoxy	4-fluoro	H	92 (>98)
1-methoxy	H	H	91 (>99)
3-hydroxy	4-methoxy	H	80 (>99)
3-methoxy	4-hydroxy	H	100 (>99)
3-methoxy	4-methoxy	5-methoxy	92 (>93)

Das Spektrum der Acyldonoren konnte durch die Möglichkeit, auch Hydroxyketone als Substrate zu verwenden, stark erweitert werden (Abb. III-43). Als Acyldonoren konnten neben dem Benzoin auch dessen Derivate mit einem oder mehreren Substituenten (z.B. die, die in der Tab. III-7 angeführt werden), wie auch heteroaromatische Acyloine (z. B. Furfural) erfolgreich eingesetzt werden. Unter Verwendung racemischer 2-Hydroxyketone ergibt die von der wt-BALHis katalysierte Carboligasereaktion sowohl (R)-Hydroxyketone, die mit

hoher Enantioselektivität gebildet werden, als auch (*S*)-Hydroxyketone, die durch Racematspaltung zugänglich werden.



**Abb. III-43:** Darstellung von (*R*)-2-HPP-Derivaten und (*S*)-Benzoinderivaten mittels BAL-Katalyse ausgehend von substituiertem racemischem Benzoin und Acetaldehyd als Substraten.

**Tab. III-7:** Darstellung von (*R*)-2-HPP-Derivaten und (*S*)-Benzoinderivaten mittels BAL-Katalyse ausgehend von substituiertem racemischem Benzoin und Acetaldehyd als Substraten.

R1, R2 - Substituenten des Benzoins bzw. des (*R*)-2-HPP Derivats. Reaktionszeit 20 Std.

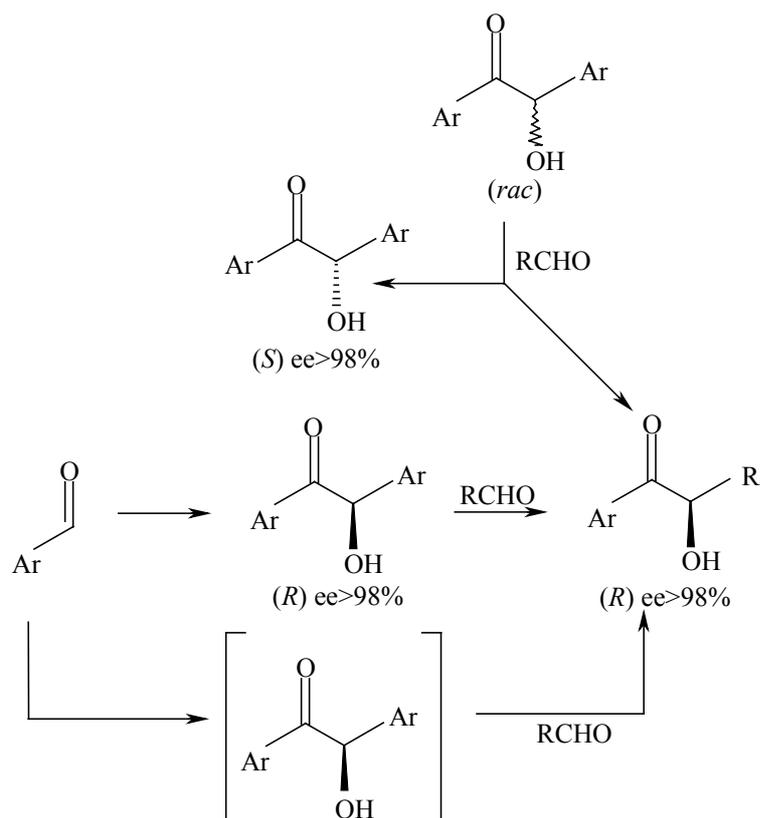
R1	R2	( <i>R</i> )-2-HPP Ausbeute [%] (ee [%])	( <i>S</i> )-Benzoin Ausbeute [%] (ee [%])
H	H	96 (95-98)	96 (99)
1-chloro	H	90 (95-99)	94 (90)
2-fluoro	4-fluoro	88 (92)	89 (85)

Insgesamt ermöglicht die BAL durch die Spaltung und Verknüpfung von C-C-Bindungen den Zugang zu einer Vielzahl von verschiedenen chiralen 2-Hydroxyketonen.

Das synthetische Potenzial der wt-BALHis ausgehend von Aldehyden bzw. 2-Hydroxyketonen als Substrate ist in der Abb. III-44 zusammengefasst.

Es werden sowohl aromatische Aldehyde als auch aromatische 2-Hydroxyketone von der wt-BALHis als Acyldonor akzeptiert. Der im aktiven Zentrum gebildete "aktive Benzaldehyd" wird anschließend auf den Acylakzeptor übertragen, der entweder ein aliphatischer (RCHO) oder aromatischer (ArCHO) Aldehyd sein kann. Nach den zur Zeit zur Verfügung stehenden Ergebnissen geht der Bildung von Hydroxypropiophenon aus Benzaldehyd und Acetaldehyd möglicherweise die Kondensation von zwei Benzaldehydmolekülen zu Benzoin voran.

Die BAL katalysiert die Bildung von (*R*)-2-Hydroxyketonen mit hohen ee-Werten (>98 %). Die Reaktion ausgehend von 2-Hydroxyketon-Racematen liefert dabei durch racemische Spaltung auch (*S*)-2-Hydroxyketone mit hohen ee-Werten (>98 %).



**Abb. III-44:** Durch wt-BALHis zugängliche 2-Hydroxyketone.  
Ar = der Phenylrest.

Obwohl die von der BAL katalysierte Reaktion eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, werden die gebildeten Benzoin- und 2-HPP-Derivate wegen ihrer schlechten Löslichkeit in wässrigen Lösungen durch Ausfallen andauernd dem Gleichgewicht entzogen. Das Gleichgewicht wird damit stets in die Richtung der Synthese verlagert, was eine Produktausbeute von mehr als 98 % ermöglicht.

### 5.3 Untersuchung der Decarboxylaseaktivität der wt-BALHis ausgehend von Benzoylformiat

Um zu untersuchen, ob die BAL analog zur BFD eine Decarboxylaseaktivität besitzt, wurde der gekoppelte photometrische Test mit der wt-BALHis in Gegenwart von unterschiedlicher Benzoylformiatkonzentrationen (15-60 mM) ausgeführt. Auch mit hohen Enzymkonzentrationen im Assay (ca. 0,5 mg/ml) konnte kein Umsatz des Benzoylformiat nachgewiesen werden. Nach zweistündiger Inkubation des Reaktionansatzes konnte durch HPLC-Analyse die Anwesenheit von Benzaldehyd, wie auch von Benzoin im

Reaktionsansatz (25 mM Benzoylformiatlösung in 50 mM KPi-Puffer pH 6,5, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM ThDP) gezeigt werden, was auf eine, wenn auch sehr niedrige, Decarboxylasenebenaktivität (<0,02 U/mg) der wt-BALHis hinweist.

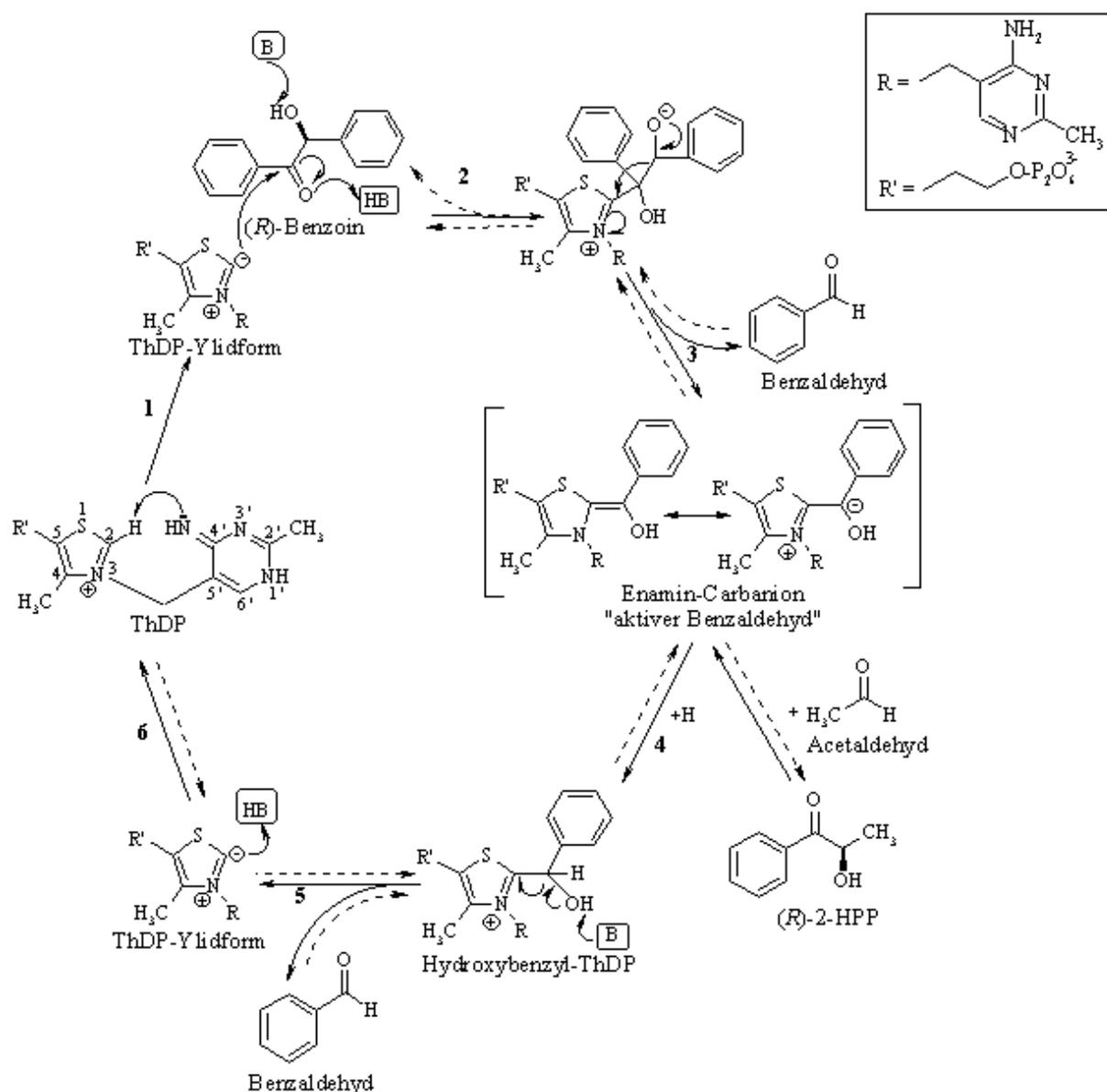
## 5.4 Der Katalysemechanismus der BAL

Wie im Kapitel I-1.3 besprochen wurde, liegt allen Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme ein gemeinsamer Reaktionsmechanismus zugrunde, in dem das ThDP eine Hauptrolle spielt. Viele Protonierungs-Deprotonierungsschritte, die der Reaktionsmechanismus der ThDP-abhängigen Enzyme einschließt, benötigen außerdem die Beteiligung von konjugierten Base-Säure-Paaren, wie z. B. ionisierbaren Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Enzyms. Der Reaktionsmechanismus wurde auf der Basis der bekannten Röntgenkristallstrukturen, durch computergestütztes Modelling und Mutagenesestudien für viele ThDP-abhängigen Enzyme mehr oder weniger detailliert aufgeklärt [Lobell & Crout, 1996; Schneider & Lindqvist, 1998; Sergienko & Jordan, 2001; Polovnikova et al., 2002].

Ein vermutlicher Mechanismus der von der BAL katalysierten Reaktionen, der auf diesen Erkenntnissen beruht, ist in der Abb. III-45 dargestellt. Der erste Schritt des vorliegenden Reaktionsmechanismus ist allen ThDP-abhängigen Enzymen gemeinsam. Es wurde eindeutig bewiesen, dass dieser Schritt von ThDP selbst und zwar von der 4'-Iminogruppe des Aminopyrimidinrings katalysiert wird [Lindqvist et al., 1992; Wikner et al., 1994; Arjunan et al., 1996; Kern et al., 1997], die als Base das Proton vom C2 des Thiazoliumrings abspalten kann (Abb. III-45, 1). Der nukleophile Angriff des resultierenden Ylids am Carbonylkohlenstoff des Benzoin führt zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Cofaktor und Substrat (Abb. III-45, 2). Die dadurch am Carbonylsauerstoff verlagerte negative Ladung wird von einer Säure im aktiven Zentrum stabilisiert. Diese Funktion kann z.B. die aus dem ersten Reaktionsschritt resultierende protonierte 4'-Iminogruppe ausführen, wie es für die PDC gezeigt wurde [Sergienko & Jordan, 2001]. Durch die Deprotonierung der Hydroxylgruppe des gebildeten Intermediats wird die Abspaltung des ersten Benzaldehydmoleküls ermöglicht, was zur Entstehung des resonanzstabilisierten Carbanion-Addukts, des sogenannten „aktiven Benzaldehyds“, führt (3). Der „aktive Benzaldehyd“ wird im nächsten Schritt durch ein Proton, das als Acylakzeptor fungiert, unter Bildung des Hydroxybenzyl-ThDP abgefangen (4). Die Hydroxylgruppe wird anschließend deprotoniert und das zweite

Benzaldehydmolekül wird gebildet (5), während die Regenerierung des protonierten ThDP den Katalysezyklus schließt (6).

Wie die Untersuchung der katalytischen Aktivitäten gezeigt haben, katalysiert die BAL auch die Rückreaktion, die Carboligation. D.h. Benzaldehyd kann an ThDP gebunden und mit einem zweiten Benzaldehydmolekül, das als Acylakzeptor fungiert, ligiert werden. In Gegenwart von Acetaldehyd gelingt sowohl ausgehend von Benzoin als auch von Benzaldehyd als Donorsubstrat die C-C-Verknüpfung zu (*R*)-2-HPP.



**Abb. III-45:** Potentieller Katalysemechanismus der BAL.

Die Lyasereaktion ausgehend von (*R*)-Benzoin, bzw. von (*R*)-2-HPP ist mit durchgezogenen Linien gezeichnet. Die Ligasereaktion ausgehend von Benzaldehyd, bzw. ausgehend von Benzoin und Acetaldehyd ist mit gestrichelten Linien gezeichnet.

## III.6 Darstellung der BALHis-Mutene

### 6.1 Planung der gezielten Mutagenese

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz der BAL zeigt eine signifikante Übereinstimmung mit den Aminosäuresequenzen der anderen ThDP-abhängigen Enzyme. Die Konsensus-Sequenz, die aus dem Vergleich der 24 ThDP-abhängigen Enzyme mit den konservierten Domänenstrukturen bestimmt wurde, zeigt eine Homologie von 30 % identischen, bzw, 45 % ähnlichen Aminosäuren zur *Ps.fl.* BAL –Sequenz (Abb. III-46).

BAL	1	MAMITGGELV	VRTLIKAGVE	HLFGLHGAHI	DTIFQA	CLDH	-DVPIIDTRH
ThDP-Enz	1	-MKATGADYL	AERLEQQGVD	TVFGVPGAI	LPLLDALYAS	PGIRHILCRH	
BAL	50	EAAAGHAAEG	YARAGAKLGV	ALVTAGGGFT	NAVTPIANAW	LARTPVLFLT	
ThDP-Enz	50	EQNAAF AADG	YARLTGKPGV	CLVTS	SGPGAL	NLVTGIADAY	AEHV PVLAI A
BAL	100	GSGALRDEET	NTLQAGIDQV	AMAAPITKWA	HRVMATEHIP	RLVMQAIRAA	
ThDP-Enz	100	GQVGRSDIGH	DAFQEV-DAV	GISR	PITKYS	YLVTSPEDIP	RIIDRAFRTA
BAL	150	LSAPRGPVLL	DLPWDILMNQ	IDEDSV--II	PDLVLSAHGA	RPDPADLDQA	
ThDP-Enz	149	TSGRPGPVYV	DIPKDVAGKA	APAEGVPPVS	AKLPGPAPDE	APLEAAIDQA	
BAL	198	LALLRKAERP	VIVLGSEASR	TARKTALS	SAF	VAATGV	PVFA
ThDP-Enz	199	AQLIKSAKKP	VILVGGGAGR	AGAEEL	REL	AEALGI	PVAT
							TLMAKGIVPD
BAL	248	LPDAMRGGLV	ONLYSFA-KA	DAAPDLVLM	L	GARFGLNTGH	GSGQLI PHSA
ThDP-Enz	249	EHPFYL	GMLG	MHGTA	ANEA	LEEADL	VLA I
							GARF-DDRVT
							GGPTAFAKNA
BAL	297	QVIQVDPDAC	ELGRLQGI	AL			
ThDP-Enz	298	KI IHI	DIDPA	EIGKAV	FPDV	AIVGDI	KALL
							T---ALLQLV
							KEREAISEWD
BAL	347	AKVTDLAQER	YASIAAKSSS	EHALHPFHAS	QVIAKHVDAG	VTVVADGALT	
ThDP-Enz	345	QALRELRDP-	-APLLYKEDP	SEPLHPQ	EVI	RTL	SNFLPPD
							AIVTTDVGQH
BAL	397	YLWLSEVMSR	VKPGGF	LCHG	YLGSMGV	GF	TALGAQVADL
ThDP-Enz	393	QMWAAQY	LKL	PKPRR	WITS	G	GLGTMGFGLP
							AAIGAKLAHP
							E--RRVIAVS
BAL	447	GDGSVGY	SIG	EFDTL	VVRKQL	PLIVI	IIMNNQ
ThDP-Enz	441	GDGSFQ	MTAQ	ELATA	VRYKL	PVKIV	LLNNG
							GLGMV-RQWQ
							IHFYEGRYSE
BAL	497	TRLENGS-YH	GVAAAF	GADG	YHVDS	VE	SFS
ThDP-Enz	490	TKLWDN	PDFV	KLAEAF	GAKG	LRVNT	EEELK
							AALQEALSAD
							GPVLI
							EV
BAL	546	LDPI	PEELI	LIGM	DPFA	563	

**Abb. III-46:** Sequenzvergleich der BAL aus *Ps. fluoreszens* mit der Konsensus-Sequenz aus dem Vergleich der 24 ThDP-abhängigen Enzyme.

Blau - identische AS; grün - ähnliche AS, rot ist essentielle für die ThDP-Katalyse AS, das Bindungsmotiv des Mg<sup>2+</sup> ist unterstrichen, Grau sind die für die ThDP-abhängigen Enzyme charakteristische Domäne hinterlegt (siehe Kapitel I-3.2). Der Sequenzvergleich wurde mit BLAST (NCBI-Server) durchgeführt.

Die höchste Sequenzähnlichkeit wurde zwischen der Primärsequenz der *Ps.fl.* BAL und den Primärsequenzen der Acetolactatsynthetasen (ALS) aus verschiedenen Organismen gefunden. So zeigt z. B. der in der Abbildung III-47 angegebene Sequenzvergleich der *Ps.fl.* BAL mit der ALS aus *E.coli* 29 % Identität, bzw. 42 % Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Sequenzen. ALS katalysiert die Kondensationsreaktion von zwei Pyruvatmolekülen zu Acetolactat und stellt ein Schlüsselenzym in der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin dar. Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der *Ps.fl.* BAL und ALS ist besonders interessant in Zusammenhang mit der beobachteten hohen Ligaseaktivität der BAL. Auch sie deutet auf die wahrscheinliche Beteiligung der BAL in einem Biosyntheseweg hin.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der *Ps.fl.* BAL mit den Primärsequenzen der Proteine, deren 3D-Struktur bis 2000 aufgeklärt war<sup>1</sup> ergab die höchste Übereinstimmung von 24 % Identität mit der Aminosäuresequenz der BFD aus *Pseudomonas putida* (*Ps. p.* BFD) (Abb. III-48). Diese Übereinstimmung betrifft sowohl das ThDP-bindende Motiv [Hawkins et al., 1989] (in Abb. III-48 unterstrichen) als auch Bereiche mit bisher unbekannter Funktion. *Ps. p.* BFD und BAL aus *Ps.fl.* BAL haben auch die bevorzugte Bindung von aromatischen Substraten gemeinsam. Die Aminosäuren, die vermutlich im aktiven Zentrum die Substratspezifität bestimmen, sind daher auch in beiden Enzymen konserviert. Die für die BAL vorhergesagte Sekundärstruktur weist eine noch deutlichere Übereinstimmung mit der bei der BFD bestimmten Sekundärstruktur auf (Abb. III-48). BAL und BFD haben außerdem eine nahezu identische Molekülgröße der Monomere (entsprechend 53 kDa (Kapitel III-3.1) und 56-57 kDa [Iding, 1998]). All diese Faktoren machen die dreidimensionale Struktur der BFD [Hasson et al., 1998] als Modell für die Planung von Mutanten der BAL, deren Röntgenstruktur noch nicht aufgeklärt ist, geeignet.

Die Übereinstimmung, die die Aminosäuresequenz der BAL mit der von der BFD aufweist, ist typisch für die ThDP-Familie. So zeigt die Proteinsequenz der BFD 25 % Identität mit der Proteinsequenz der POX aus *Lactobacillus plantarum* und 21 % mit der von PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* [Hasson et al., 1998]. Diese Übereinstimmung war für das Modelling der 3D-Struktur unter Verwendung der Swiss-Modell-Software nicht ausreichend, da dafür eine Übereinstimmung von mehr als 25 % benötigt wird. Deswegen wurden die Mutationen zur Untersuchung der katalytischen Rolle der BAL-Aminosäuren auf der Basis des Proteinsequenzvergleichs der BAL und der BFD geplant.

---

<sup>1</sup> Die 3D-Struktur der Acetolactatsynthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde vor kurzem aufgeklärt [Pang, Duggleby & Guddat, 2002].

BAL	1	MAMITGGELV	VRTLIKAGVE	HLFGLHGAHI	DTIFQACL	DH	DVPIIDTRHE
AHAS	1	---MNGAQWV	VHALRAQGVN	TVFGYPGGA	MPVYDALYD	G	VEHLLCRHE
BAL	51	AAAGHAAEGY	ARAGAKLGVA	LVTAGGGFTN	AVTPIANAWL	DRT	PVLFLLTG
AHAS	48	QGAAMAAIGY	ARATGKTGVC	IATSGPGATN	LITGLADALL	DSI	PVVAITG
BAL	101	SGALRDDETN	TLQAGIDQVA	MAAPITKWAH	RVMATEHIPR	LVM	QAIRAAAL
AHAS	98	QVSAPFIGTD	AFQE-VDVLG	LSLACTKHSF	LVQSLEELPR	IMAE	AFDVAC
BAL	151	SAPRGPVLLD	LPWDILMNQI	DEDSVII PDL	VLSAHGARPD	PADLD	QALAL
AHAS	147	SGRGPVLLVD	IPKDIQLASG	D---LEPWF	TTVENEVTFP	HAEVE	QARQM
BAL	201	LRKAERPVI	LGSEASRTAR	KTALSAFVAA	TGVPVFADYE	GLSML	SGLPD
AHAS	193	LAKAQKPM	LY VGGVGMAQA	VPALREFLAA	TKMPATCTLK	GLGAVE	ADYP
BAL	251	AMRGLVQNL	YSFAK-ADAA	PDLVLM LGAR	FGLNTGHGSG	QLIPH	SAQVI
AHAS	243	YYLGLGMHG	TKAANFAVQE	CDLLIAVGAR	FDDRVTGKLN	TFAPH-	ASVI
BAL	300	QVDPDACE	LG RLQGI	ALGIV ADVGGTIEAL	AQATAQDAAW	PDRGD	WCAKV
AHAS	292	HMDIDPAEMN	KLRQAHVALQ	GDLNALLPAL	QQPLNQ----	YDWQQH	CAQL
BAL	350	TDLAQERYAS	IAAKSSSEHA	LHPFHASQVI	AKHV DAGVTV	VADGAL	TYLW
AHAS	338	RDEHSWRY--	---DHPGDAI	YAPLLLKQLS	DRK-PADCVV	TTDVGQ	HQMW
BAL	400	LSEVMSRVKP	GGFLCHGYLG	SMGVGFGTAL	GAQVADLEAG	RRTIL	VTDGD
AHAS	382	AAQHIAHTRP	ENFITSSGLG	TMGFGLPAAV	GAQVA--RPN	DTVVC	ISGDG
BAL	450	SVGYSIG EFD	TLVRKQLPLI	VIIMNNQSWG	ATLHFQQLAV	GPNRVT	GTRL
AHAS	430	SFMMNVQELG	TVKRKQLPLK	IVLLDNQRLG	MVRQWQQLFF	QERYSE	TTLT
BAL	500	ENGSYHG VAA	AFGADGYHVD	SVESFSAALA	QALAHNRPAC	INVAV-	-----
AHAS	480	DNPDFLMLAS	AFGIHQHIT	RKDQVEAALD	TMLNSDGPYL	LHVS	IDELN
BAL	545	ALDPI PPEEL	ILIGMDPFA	563			
AHAS	530	VWPLVPPGAS	NSEMLEKLS	548			

**Abb. III-47:** Sequenzvergleich der BAL aus *Ps. fluoreszens* und ALS aus *E.coli*.  
**Blau** - identische AS; **grün** - ähnliche AS, das Bindungsmotiv des Mg<sup>2+</sup> ist unterstrichen.

BAL	1	MAMITGGELV	VRTLIKAGVE	HLFGLHG <b>A</b> HI	DTIFQACLDH	DVPIIDTRH <b>E</b>
BFD	1	MASVHG--TT	YELLRQIGID	TVFGNPGSN-	ELPFLKDFPE	DFRYILALQ <b>E</b>
		HHHHHH	HHHHHH	EEEE	HHHHHHHH	EEEE H
BAL	51	AAAGHAAEGY	ARAGAKLGVA	LVTAGGGFTN	AVTPIANAWL	DRTPVLFITG
BFD	48	ACVVGIADGY	AQASRKPAFI	NLHSAAGTGN	AMGALSNAWN	SHSPLIVTAG
		HHHHHHHHHH	HHH EEEE	EE HHHHH	HHHHHHHHHH	EEEE
BAL	101	SGALRDEETN	TLQAGIDQVA	MAAPITKWAH	RVMATEHIPR	LVMQAIRAAL
BFD	98	QOTRAMIGVE	ALLTNVDAAN	LPRPLVKWSY	EPASAAEVPH	AMSRAIHMAS
		HH	HHHHHHHHHH	EEE E	HHHHHH	HHHHHHHH
BAL	151	SAPRGPVLLD	LPWDILMNQI	DEDSVIIPDL	VLSAHGARPD	PADLDQALAL
BFD	148	MAPQGPVYLS	VPYDDWDKDA	DPQSHHLFDR	HVSSS-VRLN	DQDLDILVKA
		EEEE	HHH			HHHHHHHHHH
BAL	201	LRKAERPVI	LGSEASRTAR	KTALSAFVAA	TGVPVFADYE	G-LSMLSGLP
BFD	197	LNSASNPAIV	LGPDVDAANA	NADCVMLAER	LKAPVWVAPS	APRCPPFTRH
		HHH EEE E	HHH	HHHHHHHHHH	EEEE	
BAL	250	DAMRGLVQN	LYSFAKADAA	PDLVLMGAR	FGLNTGHGSG	QLIPHSAQVI
BFD	247	PCFRGLMPAG	IAAISQLLEG	HDVVLVIGAP	VFRYHQYDPG	QYLKPGTRLI
			HHHHHHHH	EEEE		EEE
BAL	300	QVDPDACELG	RLQGIALGIV	ADVGGTIEAL	AQATAQDAAW	PDRGDWCAKV
BFD	297	SVTCDPLEAA	RAP-MGDAIV	ADIGAMASAL	ANLVEE----	-----SSRQ
		EEE HHH	EEE	HHHHHHHH	HHHHH	
BAL	350	TDLAQERYAS	IAAKSSSEHA	LHPFHASQVI	AKHVDAGVTV	VADGALTYLW
BFD	336	LPTAAPEPAK	VDQDAG---R	LHPETVFDTL	NMAPENAIY	LNSTSTTAQ
				HHHHHHHH	HHH EE EE	HHHH
BAL	400	LSEVMSRVKP	GGFLCHGYLG	SMGVGFGTAL	GAQVADLEAG	RRTILVTGDG
BFD	383	MWQRLNMRNP	GSYYFCAAGG	-LGFALPAAI	GVQLAEPER-	-QVIAVIGDG
		HH	EEE	HHHHHHHH	HHHHH	EEEE H
BAL	450	SVGYSIGefd	TLVRKQLPLI	VIIMNNQSWG	ATLHFQQLAV	GPNRVTGTRL
BFD	430	SANYSISALW	TAAQYNIPTI	FVIMNNGTYG	ALRWFAGVLE	AEN-VPGLDV
		HH HHHH	HHH E	EEEE H	HHHHHHH	
BAL	500	ENGSYHGVA	AFGADGYHVD	SVESFSAALA	QALAHNRPAC	INVAVALDPI
BFD	479	PGIDFRALAK	GYGVQALKAD	NLEQLKGSQ	EALSAKGPVL	IEVSTVSPVK
		HHHHH	EEEE	HHHHHHHH	EE EEEE	
BAL	550	PPEELILIGM	DPFA			

**Abb. III-48:** Sequenzvergleich der BAL aus *Ps. fluoreszens* und BFD aus *Ps. putida*.

**Blau** – identische AS; **grün** - ähnliche AS, das Bindungsmotiv des Mg<sup>2+</sup> ist unterstrichen. Die Sekundärstruktur für die BAL wurde mit dem PSIPRED-Programm (ExPasy-Server) vorhergesagt, der Vergleich wurde mit dem Programm CLUSTALW (EBI-Server) durchgeführt. Die Sekundärstruktur wurde nur für übereinstimmende Bereiche der beiden Enzyme gezeigt: E -  $\beta$ -Faltblatt, H -  $\alpha$ -Helix. Die Aminosäuren, die durch gezielte Mutagenese geändert wurden, sind **rot** markiert.

Bei der gezielten Mutagenese wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Der erste Ansatzpunkt bestand in der Untersuchung der Unterschiede der Aktivitäten der BAL und BFD. Sowohl BAL als auch BFD setzen aromatische Substrate um. Während allerdings die BAL eine Lyaseaktivität ausgehend von Benzoin aufweist, zeigt die BFD eine Decarboxylaseaktivität ausgehend von Benzoylformiat und weist keine Lyaseaktivität bezüglich 2-Hydroxyketonen auf (M. Baumann, persönliche Mitteilung). Durch die Änderung von Aminosäureresten der BAL gegen die analogen der BFD sollte untersucht werden, welche Aminosäuren im aktiven Zentrum für diese Unterschiede der Aktivitäten relevant sind.

Andererseits sollte überprüft werden, ob bei der BFD und BAL konservierte Aminosäuren, die bei der BFD im aktiven Zentrum vorliegen und wichtig für die Decarboxylierung sind, auch für die BAL-Katalyse von Bedeutung sind.

## **6.2 BFD als Modell für die gezielte Mutagenese der BAL**

### **Die funktionswichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum der BFD**

Die bekannte Struktur des aktiven Zentrums der BFD erlaubt es, die Aminosäurereste mit Base/Säure Funktion bestimmen, die aufgrund ihrer räumlichen Position mit den reaktiven Übergangszuständen am ThDP interagieren können [Hasson et al., 1998]. Die Rolle mehrerer Aminosäurereste im Reaktionsmechanismus der BFD wurde auch durch gezielte Mutagenese bestätigt [Polovnikova et al., 2002].

#### **BFDS26**

Durch Röntgenstrukturanalyse wurde gezeigt, dass Ser26 der BFD ein Wassermolekül bindet, das vermutlich für die Protonierung des Enamins (vergl. Schritt 4 in Abb. III-45) notwendig ist und möglicherweise auch mit His281 verbunden ist. Ein zweites Wassermolekül, das eine Wasserstoffbindung zu S26 bildet, kann die Protonenübertragung von der Hydroxylgruppe des Hydroxybenzyl-Intermediats vor der Benzaldehydeliminierung vermitteln (Abb. III-45, 5) [Hasson et al., 1998]. Das Einführen eines neutralen Alaninrests in die angegebene Position bewirkte die Senkung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der Decarboxylasereaktion um einige Größenordnungen und führte zu einer geringeren Substrataffinität bezüglich Benzoylformiat. Durch Untersuchung des BFDS26A-Muteins mittels stopped-flow Spektroskopie, womit der Einfluss des Aminosäureaustausches auf die einzelnen

Reaktionsschritte untersucht werden kann, wurde die Beteiligung des Ser26 an der Eliminierung des Benzaldehyds und an der Enaminprotonierung, wie auch an der Stabilisierung der Enamin-Carbanionstruktur nachgewiesen [Polovnikova et al., 2002].

Bei Mutagenesestudien an der *Z. m.* PDC konnte gezeigt werden, dass die in der Analogposition zu BFDS26 liegende Asparaginsäure D27 auch die Stabilisierung der Resonanzstruktur des "aktiven Acetaldehyds" und die Protonierung des Enamins beeinflusst. Durch Mutation von D27 zu Asparagin wird die Protonierung des Enamins beeinträchtigt, was zu einer Steigerung der Ligaseaktivität relativ zur Decarboxylaseaktivität in der *PDCD27A* und zur Generierung einer Acetolactatsynthaseaktivität führte [Wu et al., 2000]. Außerdem wurde der Einfluss der Mutation auf die Cofaktorbindungstabilität nachgewiesen, der auf ein Zusammenwirken von *Z. m.* PDCD27 mit ThDP deutet [Chang et al., 1999; Wu et al., 2000].

Anhand des Vergleichs der Proteinsequenzen der BFD und BAL (Abb. III-48) wurde für die gezielte Mutagenese das in der Analogposition stehende Alanin 28 der BAL ausgesucht. Die Mutation A28S führt zur Steigerung der Polarität ohne die sterischen Gegebenheiten an dieser Stelle des aktiven Zentrums zu verändern. Hierdurch könnte die Bindung des polaren Substrats Benzoylformiats und die Stabilisierung des carbanionoiden Übergangszustandes gefördert werden.

### **BFDH70 und BFDH281**

Für die Katalyse ThDP-abhängiger Enzyme sind Histidinreste im aktiven Zentrum von besonderer Bedeutung. Die Anwesenheit von analogen Histidinresten wurde in den aktiven Zentren der *Ps. p.* BFD [Hasson et al., 1998], *Z. m.* PDC [Dobritzsch et al., 1998], YPDC [Dyda et al., 1993; Arjunan et al., 1996] und TK aus *S. cerevisiae* [Lindqvist et al., 1992; Nikkola et al., 1994] gefunden. Die Mutagenesestudien zeigten, dass die Histidinreste bei diesen Enzymen eine wichtige [Wikner et al., 1997; Sergienko & Jordan, 2001], bzw. essentielle Funktion (His113 der *Z. m.* PDC) [Schenk et al., 1997] in der enzymatischen Katalyse ausführen, obwohl diese in den verschiedenen Enzymen unterschiedlich sein kann.

Von den beiden Histidinresten, die im aktiven Zentrum der BFD gefunden wurden, erwies sich His70 als besonders relevant für die Decarboxylaseaktivität. Dieser Rest, der wahrscheinlich vor der Substratbindung in seiner protonierten Form vorliegt, kann anhand der Röntgenstrukturanalyse des BFD-R-Mandelat-Komplexes [Weiss et al., 1988] aufgrund seiner räumlichen Position die richtige Orientierung des negativ geladenen Substrates für den nukleophilen Angriff des ThDP-Ylids gewährleisten. Die andere Funktion von His70 besteht

vermutlich in der anschließenden Protonierung des Sauerstoffs der Carboxylgruppe des Substrats bei der Bildung des ersten ThDP-Substrat Komplexes (Abb. III-45, 3). Eine Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Hydroxybenzyl-Intermediats vor der Eliminierung des Benzaldehyds (Abb. III-45, 5) erfolgt wahrscheinlich durch dasselbe Histidin [Polovnikova et al., 2002].

In der Proteinsequenz der BAL befindet sich in der entsprechenden Position ein Threonin. Die Mutation T73H sollte mit dem selben Ziel eingefügt werden, wie A28S, um zu überprüfen, ob dadurch die Decarboxylaseaktivität des Enzyms verbessert wird.

Das His281 kann anhand der Röntgenstrukturanalyse der BFD mit dem gebundenen Substrat auch wie His70 an der richtigen Orientierung des Benzoylformiats bezüglich ThDP teilnehmen [Polovnikova et al., 2002]. Die wesentliche Rolle dieser Aminosäure in der BFD-Katalyse wurde auch durch Mutagenesestudien nachgewiesen [Siegert, 2000; Polovnikova et al., 2002]. Seine Funktion besteht vermutlich in der Protonierung des Enamins. Obwohl der Rest zu weit von dem Enamin entfernt liegt, um dieses Zusammenwirken direkt einzugehen, befindet er sich auf einer beweglichen Schleife, die eine Annäherung zu dem Reaktionsintermediat ermöglichen kann. Eine ähnliche Konformationsänderung wurde schon für die *Z. m.* PDC vermutet, deren katalytisch wichtige Histidinreste ebenfalls relativ weit von ThDP entfernt liegen [Schenk et al., 1997].

Das BALHis286, das anhand des Sequenzvergleichs (Abb. III-48) eine ähnliche Position in der Proteinstruktur der BAL besitzt wie BFDH281, sollte gegen Alanin ausgetauscht werden, um zu überprüfen, ob dieses Histidin für die BAL-Katalyse relevant ist.

#### **BFDA460 und BFDF464**

In der BFD sind die Aminosäuren Alanin 460 und Phenylalanin 464 Bestandteil einer Helix, die die Substratbindungstasche begrenzen. Diese Reste sind vom C2 des ThDP entsprechend 5 bzw. 8 Å entfernt, und die Seitenketten beider Aminosäuren sind auf den "aktiven Benzaldehyd" gerichtet, da eine Umdrehung der Helix 3,6 Aminosäuren entspricht. Die Helix, die Phenylalanin 464 und Alanin 460 beinhaltet, stellt einen sehr beweglichen Bereich der Proteinstruktur dar, der durch die Substratbindung geordnet werden kann [Hasson et al., 1998]. Es wurde aufgrund der Position dieser Aminosäuren im aktiven Zentrum vermutet, dass sie die Substratspezifität wie auch die Stereoselektivität der C-C-Verknüpfung bestimmen können [Hasson et al., 1998; Iding, 1998]. Nach Einführen des PDC-spezifischen Isoleucins an der Position 460 der BFD zeigte das Mutein eine erhöhte Decarboxylaseaktivität und einen kleineren  $K_M$ -Wert gegenüber dem natürlichen Substrat der PDC, dem Pyruvat, wie

auch gegenüber den anderen aliphatischen Aminosäuren [Siegert, 2000]. Die Enantioselektivität der C-C-Verknüpfung von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu (*S*)-2-HPP wurde sowohl bei dem Mutein *BFDF464A*, als auch bei dem Mutein *BFDA460I* stark reduziert [Iding, 1998; Siegert, 2000]. Damit wurde bestätigt, dass diese Aminosäuren für die Substratspezifität und die Enantioselektivität der BFD relevant sind.

Der Sequenzvergleich zwischen BFD und BAL zeigt, dass sich die Aminosäurereste A480 und F484 der BAL und A460 und F464 der BFD an äquivalenten Positionen befinden (Abb. III-48). Außerdem zeigt die Sekundärstrukturvorhersage für die BAL, dass diese Aminosäuren bei der BAL, wie auch bei der BFD Bestandteil des helikalen Bereichs sind und somit wahrscheinlich die gleiche Orientierung der Seitenketten aufweisen. A480 und F486 der BAL wurden analog zur BFD gegen Isoleucin ausgetauscht.

### **BFDE47**

Ein katalytisch wichtiger Glutaminsäurerest der in allen aktiven Zentren bisher bekannter ThDP-abhängiger Enzyme konserviert ist, wurde auch im aktiven Zentrum der BFD gefunden (BFDE47). Alle Muteine, bei denen Glutaminsäure im aktiven Zentrum gegen eine andere Aminosäure (unter anderem gegen Asparaginsäure) ausgetauscht wurde, haben sehr stark verminderte bis keine katalytische Aktivität [Wikner et al., 1994; Kern et al., 1997; Killenberg-Jabs et al., 1997].

Der Rest BALE50, der im Sequenzvergleich in analoger Position zu BFDE47 liegt (Abb. III-48), kann mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine Schlüsselrolle im katalytischen Mechanismus spielen. Dies sollte durch den Austausch des BALE50 gegen Alanin überprüft werden.

## **6.3 Gezielte Mutagenese mittels PCR**

Für einen gezielten Austausch einzelner Nukleotide, der zum gewünschten Austausch einer Aminosäure führt, wurde das von Ho [Ho et al., 1989; Horton et al., 1989] beschriebene PCR-Verfahren der „overlapping extension“ benutzt (Kapitel V-3.1.2). Das Verfahren ermöglicht die Amplifikation des mutierten DNA-Fragments, mit dem anschließend das entsprechende Segment des BAL -Gens ersetzt werden sollte (Abb. III-49).

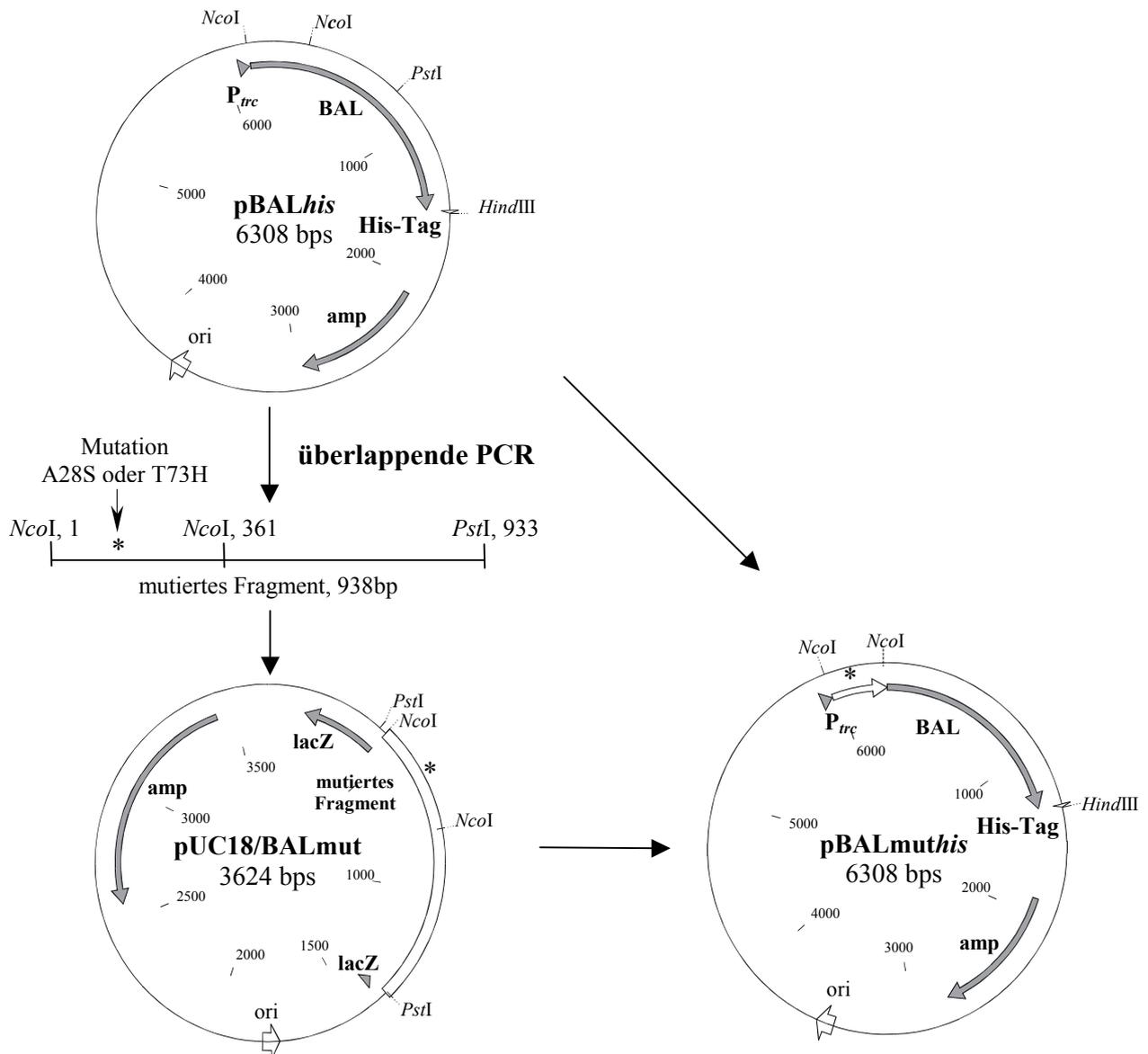
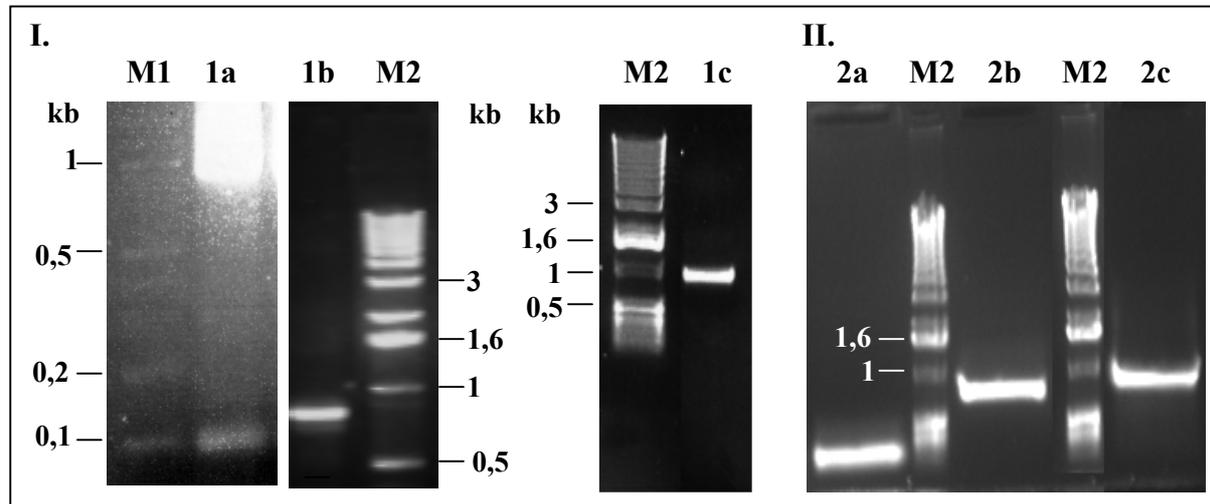


Abb. III-49: Einführung der Mutationen A28S und T73H in den pBALhis.

Aufgrund der bekannten Nukleotidsequenz des BAL-Gens [Hinrichsen et al., 1994; Janzen & Pohl, 2000] (Kapitel III-2.2) wurden die PCR-Primer konstruiert, die die Einführung der Mutationen A28S und T73H ermöglichten. Die zum Austausch einer Aminosäure zu ersetzenden Nukleotide wurden so ausgewählt, dass gleichzeitig eine zusätzliche Restriktionschnittstelle eingefügt wurde, um das weitere Screening der Mutanten zu erleichtern. Bei der Nukleotidwahl wurde außerdem die Codonnutzung im Wirtsorganismus *E.coli* berücksichtigt (Anhang VII.1). Für die Einführung der beiden Mutationen wurden die gleichen „äußeren Primer“ verwendet, die 5'-terminale Erkennungssequenzen geeigneter Restriktionsendonukleasen enthielten (Primersequenzen s. Kapitel V-1.7).

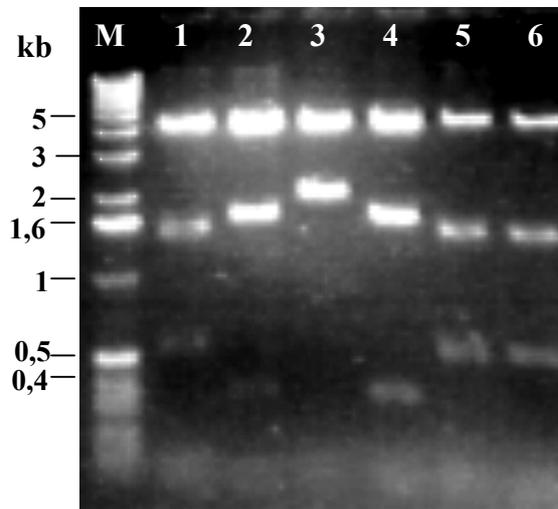
Die die Mutation enthaltenden DNA-Fragmente (Abb. III-50) wurden zuerst in den ‚blunt end‘ mit *SmaI*-geschnittenen pUC18 ligiert. Aus diesem Hilfskonstrukt wurden sie anschließend mit *NcoI* ausgeschnitten und in den *NcoI*-linearisierten und dephosphorylierten pBAL*His* ligiert (Abb. III-49).



**Abb. III-50:** PCR-Fragmente zur Klonierung der Muteine mit Mutationen A28S und T73H. **I.** PCR-Fragmente zur Einführung der A28S-Mutation: Einzelfragmente 82 bps (**1a**) und 850 bps (**1b**), Fusionsfragment 930 bps (**1c**); **II.** PCR-Fragmente zur Einführung der T73H-Mutation: Einzelfragmente 220 bps (**2a**) und 710 bps (**2b**), Fusionsfragment 930 bps (**2c**); **M1** - 100 bp Marker [NEB], **M2**-1 kb-Marker [Gibco].

Zur Einführung des mutierten Fragments in das BAL-Gen stand am 5'-Ende des Gens nur eine *NcoI*-Schnittstelle zur Verfügung. Das Gen besitzt noch eine *NcoI*-Schnittstelle (Kapitel III-2.1), die allerdings "downstream" hinsichtlich der beiden einzuführenden Mutationen liegt, so dass das mit *NcoI* ausgeschnittene Fragment in beiden Fällen die mutierte DNA-Sequenz einschließt und zum Austausch gegen das entsprechende Segment des wt-Gens benutzt werden konnte. Dabei sind zwei Orientierungen des *NcoI*-Fragments im Plasmid pBAL*His* möglich. Über Restriktionsanalyse mittels *BamHI* (Abb. III-51) bzw. *SphI*, deren Restriktionschnittstellen in die mutierten Fragmente eingefügt wurden, wurde die Anwesenheit und Ausrichtung des die Mutation enthaltenden *NcoI*-Fragments in den rekombinanten Klonen überprüft und die Klone mit der richtigen Orientierung des Inserts ausgesucht. Voraussagen über die zu erwarteten Längen der Restriktionsfragmente bei verschiedener Orientierung des Inserts waren mit Hilfe des Computer-Programms *Clone Manager* möglich. Die Restriktionsanalyse verschiedener Klone mit *BamHI* zeigt Abb. III-51. Bei der richtigen Orientierung des mutierten PCR-Fragments resultieren aus der Inkubation des Plasmids pBALA28*Shis* mit *BamHI* Fragmente mit der Größe von 0,36, 1,64 und 4,3 kb

(Abb. III-51: 2, 4). Wenn das mutierte Fragment dagegen invers ligiert wurde, entstehen Fragmente mit der Größe von 0,56 kb, 1,44 kb und 4,3 kb (Abb. III-51: 1, 5, 6).



**Abb. III-51:** Orientierung des mutierten PCR-Fragments im Expressionsplasmid pBALA28Shis. 1-6: Restriktionsanalyse verschiedener Klone mit *Bam*HI; M-1kb-Marker [Gibco].

Die Sequenzanalyse der ausgewählten Klone bestätigte die richtige Orientierung und die Anwesenheit der einzuführenden Mutationen A28S und T73H. In dem rekombinanten Klon mit dem mutierten Fragment T73H wurde noch ein weiterer Basenaustausch (G228A) identifiziert, der zu dem Austausch des Gly76 gegen Glu führte. Dieses Plasmid wurde pBALT73H/G76Ehis genannt.

## 6.4 Expression und Reinigung der Muteine über IMAC

Die weiteren BAL-Muteine BALE50AHis, BALF484IHis, BALA480IHis, BALH286AHis wurden auf der Basis von pBALhis in der Arbeitsgruppe von M. McLeish (University of Michigan) hergestellt. Die Muteine wurden analog zu der wt-BALHis in *E.coli* SG13009 unter Verwendung der entsprechenden Expressionsplasmide exprimiert. Der Anteil der Zielproteine lag bei 21-29 % des löslichen Proteins. Die als Histidininfusionsproteine exprimierten Muteine wurden analog zu der wt-BALHis in einem Schritt mittels IMAC aufgereinigt (Tab. III-8).

Alle Muteine weisen eine geringere Lyaseaktivität relativ zur wt-BALHis auf. Das Mutein BALH286AHis weist ca. 85 % der Aktivität des Wildtyps auf, während die Muteine BALF484IHis ca. 33 % und BALA480IHis und BALA28SHis nur ca. 14 % und 10 % der

Aktivität zeigen. Für die Muteine BALE50AHis und BAL73H/G76EHis konnte keine Lyaseaktivität nachgewiesen werden, obwohl die Analyse der aufgereinigten IMAC-Fraktionen im SDS-Gel auch bei diesen Muteinen die Banden der Monomere gezeigt hat. Aufgrund der fehlenden oder sehr schwachen Lyaseaktivität wurde auf die weitere Charakterisierung dieser Muteine verzichtet.

**Tab. III-8:** Spezifische Lyaseaktivitäten der Muteine im Rohextrakt und nach der Reinigung über IMAC und Gelfiltration im Vergleich zu denen des Wildtyps.

	Rohextrakt [U/mg]	nach IMAC [U/mg]	Reinigungsfaktor
<b>Wt</b>	19	70	3,7
<b>H286A</b>	14	65	4,6
<b>F484I</b>	5,4	23	4,2
<b>A28S</b>	2,9	10	3,5
<b>A480I</b>	1,5	6,7	4,5

#### 6.4.1 Hochzelldichte-Fermentation (HZD) des *E. coli* SG13009 [pBALA28Shis] im 15 L - Maßstab

Die HZD-Fermentation des *E. coli*-Stamms SG13009 [pBALA28Shis] wurde analog der von *E. coli* SG13009 [pBALhis] durchgeführt (siehe Kapitel III-2.3.3). Im Unterschied zu der ersten Fermentation erfolgte allerdings eine Induktion der Expression schon bei der OD<sub>600</sub> von 60. Dies führte nach 10 Stunden Induktion zu einem Anteil von 22 % des rekombinanten Proteins am gesamten löslichen Protein. Die Gesamtausbeute des rekombinanten Proteins wurde durch die frühere Induktion auf 30 g gesteigert. Die Ergebnisse der HZD-Fermentation des *E. coli* SG13009 [pBALA28Shis] sind in der Tabelle III-9 zusammengefasst.

**Tab. III-9:** Ergebnisse der 15 L HZD-Fermentation des *E. coli* SG13009 [pBALA28Shis].

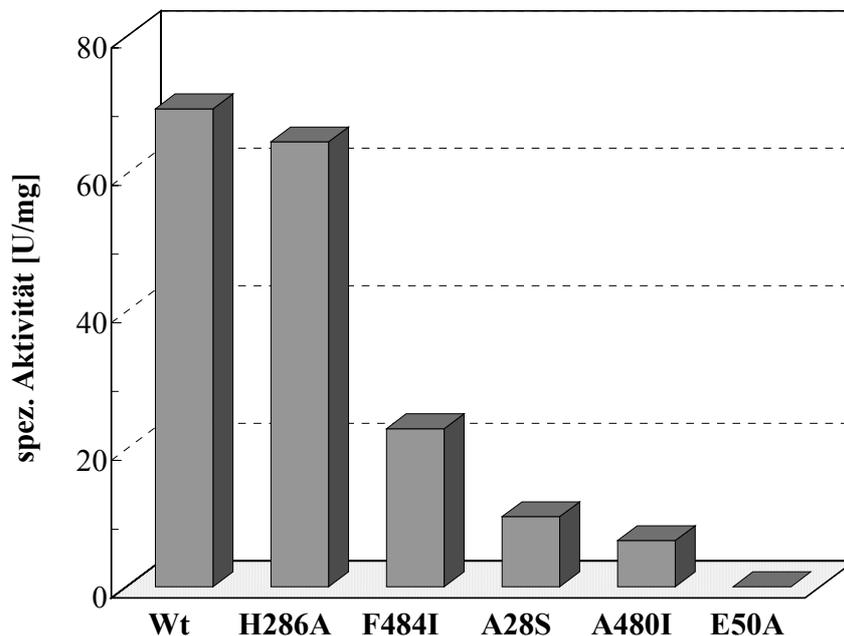
Biofeuchtmasse [g/L]	188
Zellspezifische Aktivität [U/gZellen]	87
Gesamtaktivität [kU]	276
Gesamtausbeute an rekombinantem Protein [g]	30

### III.7 Untersuchungen zur katalytischen Aktivitäten und Stabilität der Muteine *BALA28SHis*, *BALH286AHis*, *BALA480IHis*, *BALF484IHis* im Vergleich zur wt-BALHis

#### 7.1 Lyaseaktivität

##### 7.1.1 Vergleichende Charakterisierung der Lyaseaktivität ausgehend von Benzoin

Die untersuchten Mutationen beeinflussen die Lyaseaktivität der wt-BALHis sehr unterschiedlich: während das Mutein *BALH286AHis* eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität besitzt, zeigten die Muteine *BALF484IHis*, *BALA28SHis* und *BALA480IHis* eine signifikante Reduktion der Aktivität auf entsprechend 23 U/mg, 10 U/mg und 7 U/mg. Bei dem Mutein *BALE50AHis* wurde keine Lyaseaktivität nachgewiesen.

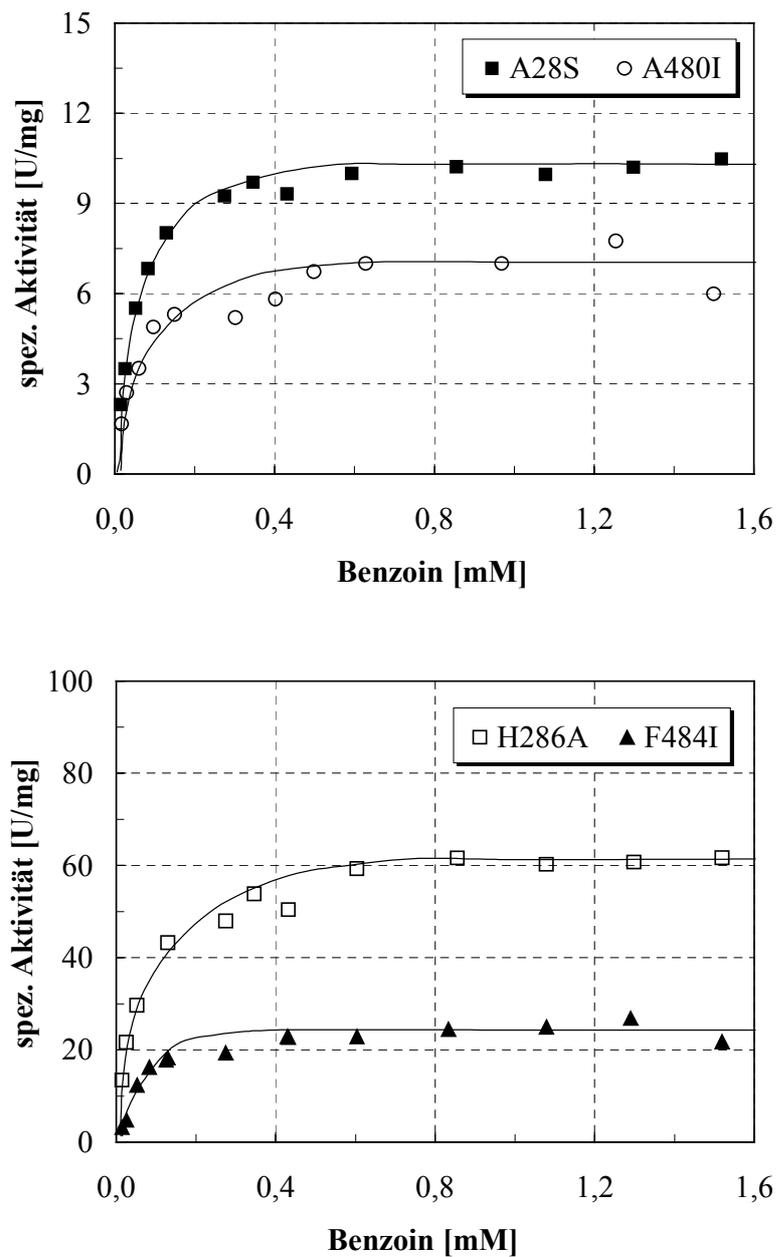


**Abb. III-52:** Vergleich der Lyaseaktivitäten der verschiedenen Muteine und der wt-BALHis. Die Aktivitäten wurden mit dem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Assaypuffer: 15 % PEG-400 in 50 mM Tris, pH 8.0, 0,1 mM ThDP, 5 mM Mg<sup>2+</sup>. Die Benzoinkonzentration betrug 1,5 mM. T=30 °C.

Die Bestimmung der Lyaseaktivität der Muteine wurde bei einer Substratkonzentration von 1,5 mM Benzoin durchgeführt. Bei der wt-BALHis wurde bei dieser Konzentration die

Substratsättigung erreicht (Kapitel III-5.1.1). Ob das auch bei den Muteinen der Fall ist und damit  $V_{\max}$  gemessen wurde, sollte durch kinetische Untersuchungen festgestellt werden.

Die Lyaseaktivität der Muteine ließ sich analog der Lyaseaktivität der wt-BALHis mit dem Michaelis-Menten-Modell beschreiben. Die Aufnahme der Lyaseaktivität der Muteine in Abhängigkeit von der Benzoinkonzentration ergab einen hyperbolischen Verlauf der  $v/S$ -Kurven (Abb. III-53). Die Substratsättigung war bei allen Muteinen deutlich zu erkennen. Damit entsprechen die in der Abb. III-52 dargestellten Ergebnisse der  $V_{\max}$ .



**Abb. III-53:** Abhängigkeit der Lyaseaktivität der Muteine von der Benzoinkonzentration.

Die Aktivitäten wurden mit dem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Assaypuffer: 15 % PEG-400 in 50 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM ThDP, 5 mM  $Mg^{2+}$ ;  $T=30^{\circ}C$ .

Die anhand der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten mit dem Programm SCIENTIST<sup>®</sup> (Mikromath, USA) errechneten kinetischen Daten sind in der Tabelle III-10 zusammengefasst.

Die sehr ähnlichen  $K_M$ -Werte lassen vermuten, dass die eingeführten Mutationen die Affinität des Enzyms zum Substrat kaum beeinflussen. Nur im Fall der *BALF484I*His ist eine leichte Erhöhung des  $K_M$ -Werts zu sehen, die auf eine Beteiligung dieser Position an der Substratbindung hindeutet. Eine Steigerung des  $K_M$ -Wertes bzgl. des natürlichen Substrats wurde auch bei dem Austausch des in der Analogposition stehenden F464 der BFD gegen Isoleucin nachgewiesen [Siegert, 2000]. Unter Vorbehalt wurde damit die Bedeutung des in den BFD und der BAL konservierten Phenylalanins für die Substratbindung des aromatischen Substrats bestätigt.

**Tab. III-10:** Vergleich der kinetischen Konstanten der wt-BALHis und der Muteine bezüglich der Spaltung von Benzoin.

	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{s}^{-1}\text{mM}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [%]
<b>Wt</b>	48	66,9	1458	100
<b>H286A</b>	55	56,4	1036	71
<b>F484I</b>	67	22	334	23
<b>A28S</b>	47	9,5	202	14
<b>A480I</b>	45	6,6	147	10

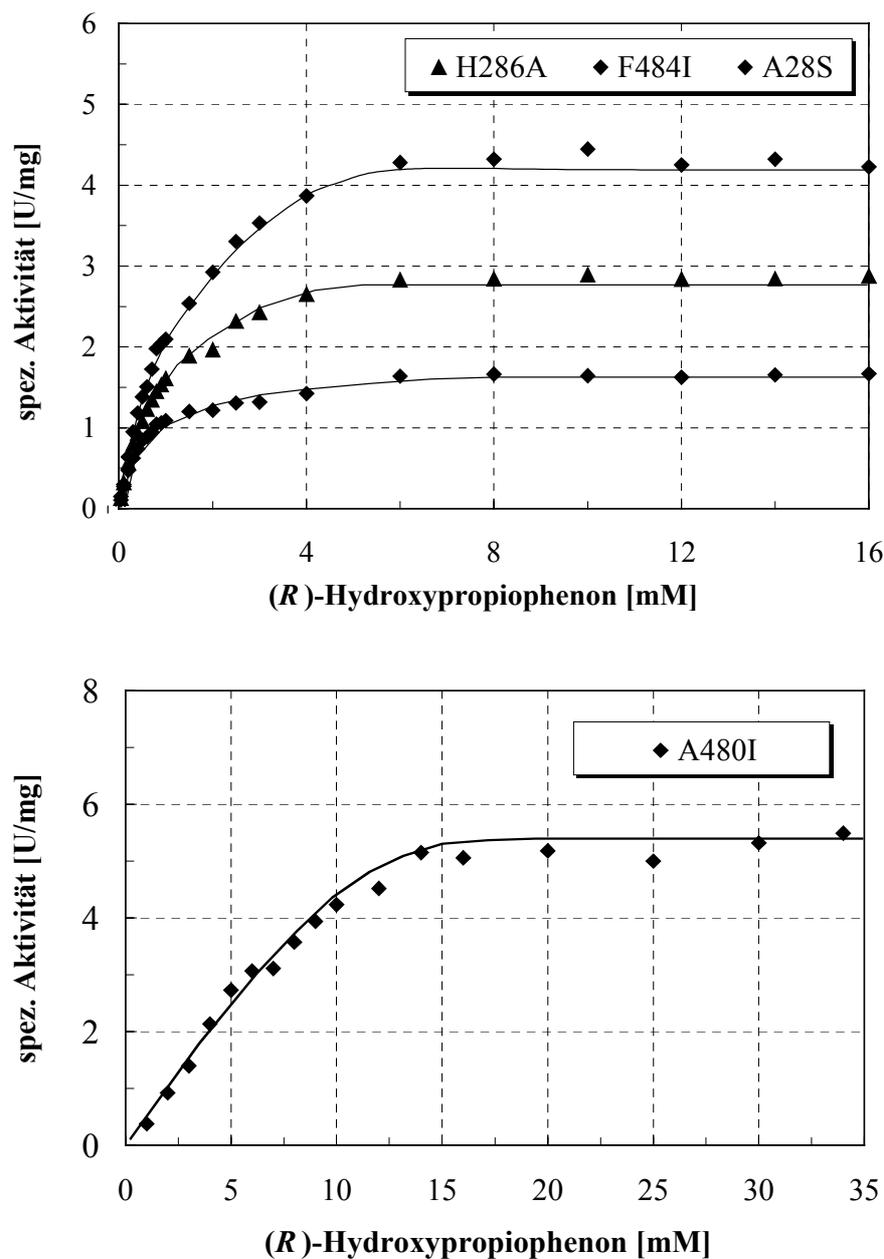
Die Katalysekonstante oder die Wechselzahl, die zur Charakterisierung der Lyaseaktivität der Muteine im Vergleich zur wt-BALHis herangezogen wird, beschreibt die Anzahl der Substratmoleküle, die in einem aktiven Zentrum bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit dem Substrat pro Sekunde in das Produkt umgewandelt werden (siehe Gl. 4, Kapitel III-5.1.1.2). Die in der Tabelle III-10 angegebenen Werte beziehen sich auf eines der 4 katalytischen Zentren des Enzyms.

Die Lyaseaktivität wurde durch alle eingeführten Mutationen, ausgenommen H286A, stark beeinträchtigt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren A28, A480, F484 für die BAL-Katalyse wesentlich sind, analog denen an den entsprechenden Positionen stehenden Aminosäuren der BFD. Da die  $K_M$ -Werte der Muteine gleich oder größer sind als der  $K_M$ -Wert des Wildtyps, ist auch der Koeffizient aus  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$ , der ein Maß für die Effizienz eines Enzyms darstellt, bei allen Muteinen niedriger als beim Wildtyp.

### 7.1.2 Vergleichende Charakterisierung der Lyaseaktivität ausgehend von (*R*)-Hydroxypropiofenon

(*R*)-HPP wurde von allen Muteinen analog dem Wildtyp als Substrat akzeptiert und in der Lyasereaktion umgesetzt.

Die kinetischen Untersuchungen ergaben für alle Muteine eine hyperbole Abhängigkeit der Aktivität von den Substratkonzentration (Abb. III-54).



**Abb. III-54:** Abhängigkeit der Lyaseaktivität der Muteine von der (*R*)-2-HPP-Konzentration. Die Aktivitäten wurden mit dem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Assaypuffer: 50 mM Tris, pH 8.0, 0,1 mM ThDP, 5 mM Mg<sup>2+</sup>; T=30 °C.

Aus den gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten ergaben sich die in der Tab. III-11 dargestellten  $K_M$ -Werte. Die Affinität zum Substrat (*R*)-HPP ist bei allen untersuchten Muteinen geringer als zum Substrat Benzoin. Die Unterschiede der  $K_M$ -Werte für HPP sind bei den Muteinen untereinander und relativ zur wt-BALHis deutlicher ausgeprägt als für Benzoin. Besonders auffallend ist die Veränderung der Substrataffinität durch den Austausch des Alanins 480 gegen Isoleucin, der eine Erhöhung des  $K_M$ -Werts um mehr als 20-fache verursacht. Die Substratsättigung wurde mit diesem Mutein erst mit 14 mM erreicht. Auch durch den Austausch des Phenylalanins 484 gegen Isoleucin, der zu einem 5-fach höheren  $K_M$ -Wert führt, wurde die Substrataffinität zum 2-HPP wesentlich erniedrigt.

**Tab. III-11:** Vergleich der kinetischen Konstanten von wt-BALHis und der Muteine bezüglich der Spaltung von (*R*)-HPP.

	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $s^{-1}mM^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [%]
<b>Wt</b>	0,3	3,4	10	100
<b>H286A</b>	0,9	2,8	3	30
<b>A28S</b>	0,6	1,6	3	28
<b>A480I</b>	5	4,9	1	10
<b>F484I</b>	1,2	4,0	3	32

Die spezifischen Aktivitäten für die Spaltung von (*R*)-HPP liegen deutlich niedriger, als die für die Spaltung von Benzoin, wobei die untersuchten Mutationen die Aktivität bzgl. (*R*)-HPP viel weniger beeinflussen, als die Aktivität bezüglich Benzoins, d.h. die Muteine haben eine vergleichbar hohe Aktivität wie der Wildtyp.

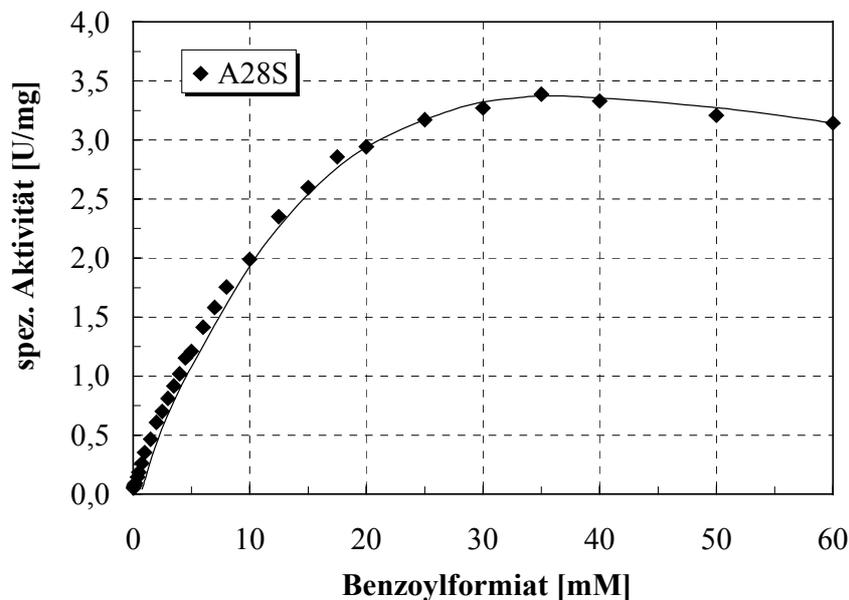
Interessanterweise zeigen die Muteine *BALF484I*His und *BALA480I*His sogar eine Aktivitätssteigerung relativ zur wt-BAL. Der Grund für die Verbesserung der Aktivität kann die zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung des Substrats mit dem aktiven Zentrum durch die größere Seitenkette des Isoleucins sein. Durch die höhere Aktivität ist die Effizienz der *BALF484I*His, die durch den Quotient  $k_{cat}/K_M$  ausgedrückt wird, höher als bei der *BALH286A*His und der *BALA28S*His trotz der niedrigen Affinität zum Substrat (Tab. III-11).

## 7.2 Decarboxylaseaktivität

### 7.2.1 Untersuchung der Decarboxylaseaktivität der Muteine ausgehend von Benzoylformiat

Wie bereits beschrieben, setzt die wt-BALHis Benzoylformiat, wenn auch mit äußerst niedriger Aktivität von  $< 0,02$  U/mg, zum Benzaldehyd um (Kapitel III-5-3). Durch die Einführung der Mutation A28S wurde versucht die Decarboxylaseaktivität der BAL zu verbessern.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Decarboxylierung des Benzoylformiats mit der BALA28SHis sind in der Abb. III-55 gezeigt.



**Abb. III-55:** Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität der BALA28SHis von der Benzoylformiatkonzentration. Die Bestimmung der Aktivität wurde im Mikrotiterplattenlesegerät mit dem gekoppelten enzymatischen Test durchgeführt.  $T=30$  °C.

Die maximale spezifische Aktivität des BALA28SHis bezüglich Benzoylformiat wurde bei einer Substratkonzentration von 35 mM mit 3,4 U/mg bestimmt. Die maximale gemessene Geschwindigkeit ist aber in diesem Fall nur eine scheinbare. Die Aufnahme der konzentrationsabhängigen Decarboxylaseaktivität ergab nach der Steigerung der Aktivität bis zu einer Substratkonzentration von 35 mM eine Aktivitätssenkung bei höheren Substratkonzentrationen, die auf eine Substratüberschussinhibition deutet.

Die Substratüberschussinhibierung stellt eine unkompetitive Inhibierung dar, die durch die Bindung weiterer Moleküle des Substrats an den Enzym-Substrat-Komplex zustande kommt. Die Bildung des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes (ESI) bzw. Enzym-Substrat-Substrat-Komplex (ES<sub>n</sub>) verursacht eine Konformationsänderung im Bereich des aktiven Zentrums, wodurch die Substratumsetzung am aktiven Zentrum gehemmt wird. Wird zur Vereinfachung angenommen, dass nur ES<sub>2</sub> gebildet wird, lässt sich die enzymatische Reaktion unter Bezeichnung der Bildungskonstante des ES<sub>2</sub>-Komplexes als Inhibitionskonstante (K<sub>i</sub>) mit folgender Gleichung beschreiben:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right) \cdot [S] + K_M}, \quad [\text{Gl. 6}]$$

$$\text{wo } K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad [\text{Gl. 7}]$$

Da im Fall der Substratüberschussinhibierung die gleiche Verbindung sowohl als Substrat als auch Hemmstoff auftritt, ist eine direkte Bestimmung der enzymkinetisch relevanten Größen V<sub>max</sub> und K<sub>M</sub> problematisch. Es wird davon ausgegangen, dass bei sehr kleinen Substratkonzentrationen ein Hemmungseffekt zu vernachlässigen ist. Bei Darstellung der Gleichung 6 in der Reziprokform ist zu sehen, dass im Bereich niedriger Substratkonzentrationen die Michaelis-Menten-Gleichung durchaus anzuwenden ist (Gl. 8)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{K_i \cdot V_{\max}} \cdot [S] \quad [\text{Gl. 8}]$$

Bei hohen Substratkonzentrationen liegen neben dem ES-Komplex auch ES<sub>2</sub>, ES<sub>3</sub> usw. vor, wodurch der V<sub>max</sub> auch nicht näherungsweise errechnet werden kann. Hingegen lässt sich K<sub>i</sub> im Bereich hoher Substratkonzentrationen, bei denen die Hemmungswirkung dominiert, bestimmen. In diesem Fall ergibt sich (-K<sub>i</sub>) als Abszissenabschnitt des Dixon-Diagramms (1/v gegen [S]) (aus[Ahlers & Arnold, 1982]).

Die kinetischen Daten für die Decarboxylaseaktivität der BAL428SHis, die die Modellierung mit dem Programm SCIENTIST<sup>®</sup> nach dem oben beschriebenen Modell erbracht hat, sind in der Tabelle III-12 zusammengefasst. Die V<sub>max</sub> wurde auf 8,2 U/mg, K<sub>M</sub> auf 27,9 mM und K<sub>i</sub> auf 52,8 mM errechnet.

**Tab. III-12:** Kinetische Daten für die Decarboxylierung von Benzoylformiat mittels BALA28SHis.

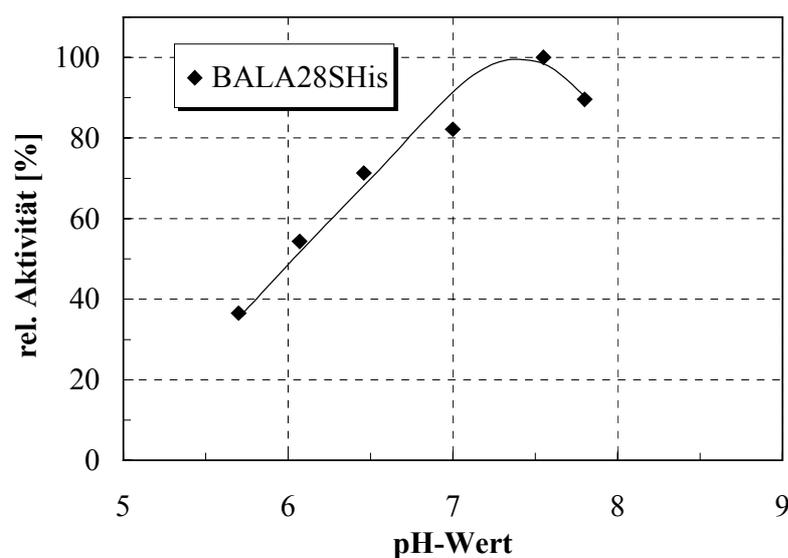
	$K_M$ [mM]	$V_{max}$ [U/mg]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $s^{-1} mM^{-1}$ ]	$K_i$ [mM]
<b>BALA28SHis</b>	27,9	8,2	7,4	0,9	52,6

Eine Änderung der nativen Konformation des aktiven Zentrums der BAL durch die Einführung einer BFD-typischen Seitenkette in dem Mutein BALA28SHis, bewirkt also eine deutliche Steigerung der Decarboxylaseaktivität. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die eingeführte polare Seitenkette eine sonst fehlende Wechselwirkung mit Benzoylformiat eingehen kann, einer im Unterschied zu dem natürlichen Substrat der BAL, Benzoin, polaren Substanz.

Die Untersuchung der Muteine BALH286AHis, BALA480IHis und BALF484IHis in Gegenwart von 15-60 mM Benzoylformiat zeigte keine Decarboxylierungsaktivität dieser Muteine.

### 7.2.2 pH-Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität der BALA28SHis

Die Abhängigkeit der Decarboxylasereaktion vom pH-Wert wurde mit dem direkten photometrischen Test in Mikrotiterplatten untersucht (Abb. III-56).



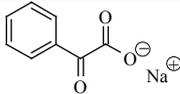
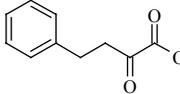
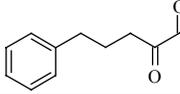
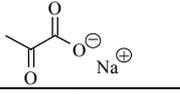
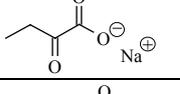
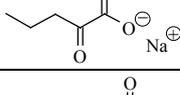
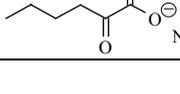
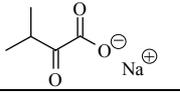
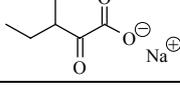
**Abb. III-56:** Abhängigkeit der Decarboxylasereaktion der BALA28SHis vom pH-Wert. Reaktionsansatz: 80 mM Benzoylformiat in 100 mM KPi; 5 mM  $Mg^{2+}$ ; 0,1 mM ThDP. T=30 °C. Die Volumenaktivität bei pH 7,5 wurde als 100 % gesetzt.

Die Decarboxylasereaktion der BALA28SHis weist ein pH-Optimum von 7,5, das zwischen dem pH-Optimum der Decarboxylaseaktivität der BFD (pH 6,0) und dem pH-Optimum der Lyasereaktion (pH 8,0) liegt.

### 7.2.3 Substratspektrum der Decarboxylaseaktivität der BALA28SHis

Die verschiedenen 2-Ketocarbonsäuren wurden als Substrate der BALA28SHis getestet, um die nähere Information über die sterischen Verhältnisse im aktiven Zentrum zu erhalten.

**Tab. III-13:** Substratspektrum der Decarboxylierungsreaktion der BALA28SHis. Die Konzentration der Substrate betrug jeweils 20 mM in 50 mM KPi, pH 6,0, 0,1 mM ThDP, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>.

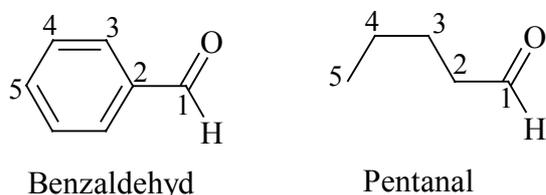
Substrat	spezifische Aktivität [U/mg]	relative Aktivität [%]	
aromatische 2-Ketocarbonsäuren			
	Phenylglyoxylsäure	2,8	100
	4-Phenyl-2-oxobutansäure	0,06 <sup>1</sup>	2,1
	5-Phenyl-2-oxopentansäure	0,16 <sup>2</sup>	5,7
lineare 2-Ketocarbonsäuren			
	2-Oxopropansäure	0	0
	2-Oxobutansäure	0,07	2,5
	2-Oxopentansäure	0,07	2,5
	2-Oxohexansäure	0,25	8,9
C3-substituierte 2-Ketocarbonsäuren			
	2-Oxo-3-methylbutansäure	0	0
	2-Oxo-3-methylpentansäure	0	0

<sup>1</sup> Die Löslichkeit des Substrats ist sehr gering (Endkonzentration ca. 5 mM)

<sup>2</sup> Die Löslichkeit des Substrats ist sehr gering (Endkonzentration ca. 10 mM)

Es wurden die 2-Ketocarbonsäuren ohne Funktionelle Gruppen in der Seitenkette ausgewählt, um den Einfluss der elektronischen Faktoren auf die Aktivität auszuschliessen.

Die in der Tabelle III-13 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Substratspektrum der durch das Mutein BALA28SHis katalysierten Decarboxylasereaktion neben Benzoylformiat weitere  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren umfasst, allerdings mit deutlich geringeren spezifischen Aktivitäten. Nicht nur aromatische, sondern auch aliphatische Substrate werden von der BALA28SHis umgesetzt. Der Vergleich der Aktivitäten bezüglich verschiedener aliphatischer  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren zeigt eine deutliche Tendenz: eine lineare Verlängerung der Kohlenstoffkette führt zu einer Steigerung der Decarboxylaseaktivität. Während Pyruvat von der BALA28SHis nicht decarboxyliert wird, zeigt das Mutein eine Enzymaktivität gegenüber 2-Oxohexansäure mit ca. 9 % bezogen auf Benzoylformiat. Beim Vergleich der entstehenden Aldehyde Pentanal und Benzaldehyd fällt ihre ähnliche Raumerfüllung auf (Abb. III-57). Daraus folgt, dass die Größe der Substratbindungstasche wahrscheinlich der Kohlenstoffkettenlänge von 5 C-Atomen entspricht. Auch für die BFD stellt das Pentanal ein optimales, aliphatisches Substrat dar [Iding, 1998], was auf eine ähnliche Größe der Substratbindungstasche bei diesen zwei Enzymen hinweist.



**Abb. III-57:** Vergleich der Raumerfüllung von Benzaldehyd und Pentanal.

Verzweigungen am C3-Atom der aliphatischen  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren wurden von der BALA28SHis vermutlich wegen ihres größeren Raumbedarfs nicht toleriert.

Beim Umsatz von Derivaten des Benzoylformiats zeigt die BALA28SHis eine viel geringere Aktivität. Interessanterweise wird bei der Verlängerung der aliphatischen Kohlenstoffkette des Substituenten von der 4-Phenyl-2-ketobuttersäure zur 4-Phenyl-2-ketovaleriansäure eine Steigerung der Aktivität beobachtet. Die gleiche Tendenz wurde bereits auch für die BFD gezeigt [Siegert, 2000]. Durch die Verlängerung wird dem Kohlenstoffrückgrat eine größere Flexibilität verliehen, wodurch das Substrat möglicherweise dem Raum der Substratbindungstasche besser angepasst werden kann.

In parallel durchgeführten Tests mit der wt-BALHis konnte keine Aktivität bezüglich der untersuchten Substrate nachgewiesen werden.

### 7.3. Ligaseaktivität

Die Benzoinbildung ausgehend von Benzaldehyd wurde bei allen untersuchten Muteinen *BALH286AHis*, *BALA28SHis*, *BALA480IHis* und *BALF484IHis* nachgewiesen.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden, wie im Kapitel III-5.2.1.1 beschrieben, durch die on-line HPLC-Analytik der Reaktionsansätze bestimmt. Die erzielten Ligaseaktivitäten sind in der Tabelle III-14 zusammengefasst.

**Tab. III-14:** Spezifische Carboligaseaktivität der BAL-Muteine im Vergleich zum Wildtyp. Batchreaktionsansatz: 30 mM Benzaldehyd in 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5; 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,1 mM ThDP; T=30 °C, unter Rühren. Enzymkonz.= 0,1 µg/ml.

	<b>wt</b>	<b>H286A</b>	<b>A28S</b>	<b>F484I</b>	<b>A480I</b>
<b>spez. Aktivität [U/mg]</b>	336	152	58	50	n.b.

Alle untersuchten Mutationen reduzieren die Ligaseaktivität gegenüber dem wt-Enzym. Im Unterschied zur Lyaseaktivität gilt das auch für die Mutation H286A, die zu einer 2-fach niedrigeren Ligaseaktivität im Vergleich zu der wt-BALHis führt. Den stärksten Einfluss auf die Ligaseaktivität der BAL hat die Mutation A480I. Mit diesem Mutein konnten bei der eingesetzten Proteinmenge nur Spuren gebildeten Benzoins detektiert werden. Die Ligaseaktivität der *BALA480IHis* wurde daher nicht bestimmt.

Auch die Lyaseaktivität der BAL wurde durch diese Mutation am meisten beeinflusst (Kapitel III-7.1). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Verringerung der katalytischen Aktivität der BAL an der Verengung der Substratbindungstasche durch die Einführung der sterisch anspruchsvollen Seitenkette liegt, die die Bewegung des voluminösen Benzoins verhindert.

In Gegenwart von Acetaldehyd und Benzaldehyd wurde in den Reaktionsansätzen mit den Muteinen *BALH286AHis*, *BALA28SHis*, *BALA480IHis* und *BALF484IHis* mittels chiraler HPLC die Synthese von (*R*)-2-HPP nachgewiesen. Durch die zeitabhängige Analyse der Batchreaktionsansätze wurde gezeigt, dass alle der oben genannten BAL-Muteine bis auf *BALF484IHis* analog der wt-BALHis die Bildung des (*R*)-Benzoins katalysieren, das später zum (*R*)-2-HPP umgesetzt wird. Nach 12 Stunden wurde von den Muteinen *BALA28SHis* und *BALF484IHis* der vollständige Umsatz der Aldehyde zum (*R*)-2-HPP katalysiert, während bei den Muteinen *BALH286AHis* und *BALA480IHis* nach derselben Inkubationszeit neben (*R*)-2-HPP auch das (*R*)-Benzoin nachgewiesen werden konnte.

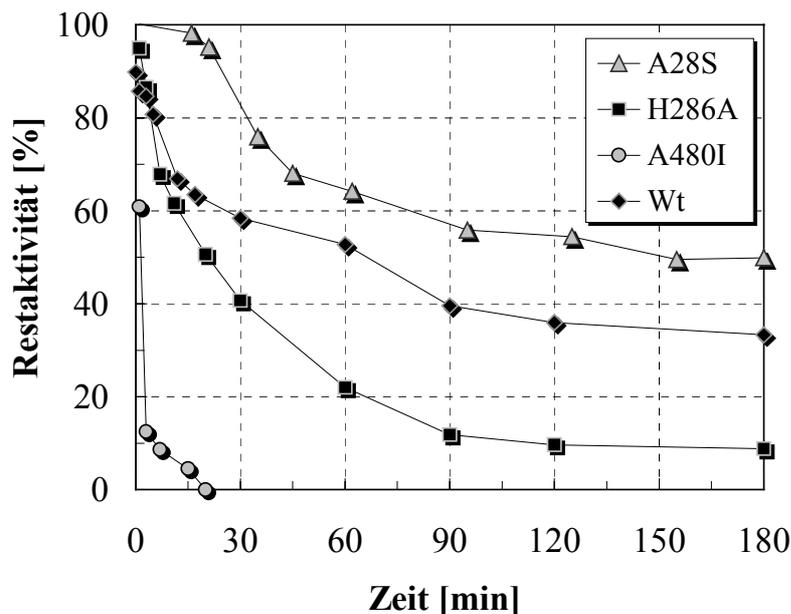
Von allen Muteinen wurde ausschließlich die Synthese von (*R*)-Produkten katalysiert. Im

Unterschied zur BFD, bei der das Einfügen der Mutationen A460I und F464I zur Änderung der Enantioselektivität führte [Iding, 1998], beeinflussen die Mutationen in der Analogpositionen der BAL die Enantioselektivität nicht.

## 7.4 Stabilitätsuntersuchungen der Muteine

### 7.4.1 Bindungsstabilität der Cofaktoren bei Muteinen im Vergleich zur wt-BALHis

Um die Cofaktorbinding der Muteine mit der wt-BALHis vergleichen zu können, wurden die Enzyme in KPi-Puffer ohne Cofaktoren bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde der zeitabhängige Aktivitätsverlust zur qualitativen Charakterisierung der Bindungsstabilität der Cofaktoren bei Wildtyp und Muteinen gemessen (Abb. III-58).



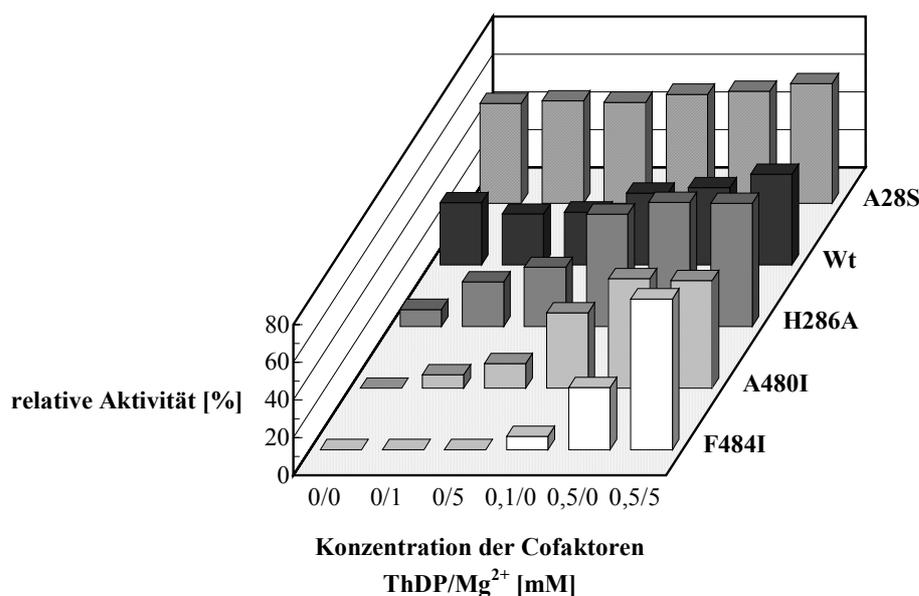
**Abb. III-58:** Bindungsstabilität der Cofaktoren bei Muteinen im Vergleich zur wt-BALHis. Inkubation in cofaktorfreiem 50 mM KPi, pH 7,0 bei 30 °C. Als 100 % wurde jeweils die Aktivität in cofaktorhaltigem Puffer angenommen. Die Proteinkonzentration betrug 0,05-0,06 mg/ml.

Die Enzymlösungen wurden in cofaktorhaltigem Puffer (50 mM KPi, pH 7,0, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,1 mM ThDP) auf die gleiche Proteinkonzentration verdünnt, um einen möglichen Einfluss der Proteinkonzentration auf die Enzymstabilität auszuschließen. Dann wurden sie mittels Gelfiltration über PD-10 Säulen in den cofaktorfreien KPi (50 mM, pH 7,0) umgepuffert und anschließend bei 30 °C inkubiert. Die Enzymaktivitäten wurden zu verschiedenen

Zeitpunkten mit dem gekoppelten Test ebenfalls ohne Zusatz der Cofaktoren ermittelt, um die Regeneration des Holoenzym während der Messung zu vermeiden. Die Enzymproben von wt-BALHis und BALH286AHis mussten aufgrund ihrer höheren spezifischen Aktivitäten unmittelbar vor der Aktivitätsmessung nochmals verdünnt werden.

Wt-BALHis und die Muteine zeigen sehr unterschiedliche Cofaktorbindungsstärken. So weist der zeitabhängige Aktivitätsverlust bei der BALA28SHis auf eine stärkere Cofaktorbindung hin, als beim wt-Enzym. Während wt-BALHis im cofaktorfreien Puffer innerhalb von 3 Stunden bei 30 °C ca. 70 % der Aktivität verliert, gehen bei BALA28SHis innerhalb dieser Zeit ca. 50 % der Aktivität verloren. Bei der BALH286AHis erfolgt der Aktivitätsverlust im Vergleich zum wt-Enzym schneller und nach 3 Stunden wird nur noch 10 % Restaktivität gemessen. Die Muteine mit den Austausch A480I und F484I zeigen unter den vorliegenden Bedingungen rasche Aktivitätsverluste. BALA480IHis verliert die Aktivität in weniger als 20 Minuten und BALF484IHis wird schon während der Umpufferung (5 Minuten) vollständig inaktiviert.

Nach 3 h Inkubation im cofaktorfreien Puffer (im Fall der BALF484IHis nach 30 min) wurden die Enzyme mit den in Abb. III-59 angegebenen Konzentrationen der Cofaktoren für 30 min bei RT inkubiert. Die wiedergewonnene Lyaseaktivität wurde mit dem gekoppelten Enzymtest in Anwesenheit der gleichen Cofaktorkonzentrationen wie in den Enzymproben gemessen.



**Abb. III-59:** Rekonstitution der Holoenzyme von wt-BAL und Muteinen. Enzyme wurden nach der Inkubation bei 30 °C in cofaktorfreien KPi-Puffer, pH 7,0 in Gegenwart der beiden Cofaktoren innerhalb von 20-30 min bei RT inkubiert. Proteinkonz.= 0,05-0,06 mg/ml.

Die in der Abb. III-59 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass keine vollständige Reaktivierung erreicht werden konnte. Betrachtet man den Rückgewinn der Aktivität beim Zusatz von  $Mg^{2+}$  und ThDP, scheinen die Aktivitätsverluste im Fall von *BAL4480His* und *BALH286AHis* ausschließlich am Verlust des ThDP zu liegen, während die  $Mg^{2+}$ -Ionen am Enzym gebunden bleiben. Durch Zugabe von 0,5 mM ThDP wurden entsprechend 58 und 66 % der Aktivität zurückgewonnen, im Vergleich zu entsprechend 57 und 65 % der Aktivität bei dem Zusatz der beiden Cofaktoren gemessen wurden. Auch bei der wt-BALHis wird die Aktivität bei der Zugabe von 0,5 mM ThDP rekonstituiert. Hingegen scheint der Aktivitätsverlust bei der *BALF484His* durch den Verlust beider Cofaktoren bedingt zu sein, da erst in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ , eine Regeneration des Holoenzym beobachtet wurde. Die *BALA28SHis* zeigte die höchste Restaktivität unter den untersuchten BALHis-Varianten im cofaktorfreen Puffer und damit die stärkste Cofaktorbindung. Der Zusatz der Cofaktoren führte in diesem Fall nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Aktivität um ca. 10 %.

Dass keine vollständige Reaktivierung der Enzyme bei der Zugabe der Cofaktoren erreicht werden kann, weist darauf hin, dass es über den Verlust der Cofaktoren auch zu irreversiblen Inaktivierungseffekten kommt. Die geringe Stabilität des Apoenzym im Vergleich zum Holoenzym ist charakteristisch für viele cofaktorabhängige Enzyme. Wie in der Einleitung diskutiert wurde, trägt das ThDP in den verwandten Enzymen PDC und BFD wesentlich zu der Assoziation der Monomere bei. Die Entfernung des ThDP führt damit zu einer schnelleren Dissoziation des Tetramers in die Dimere, bzw. Monomere, die aufgrund der Exposition der hydrophoben Oberflächen des Enzyms eine höhere Aggregationsneigung besitzen.

Wie im Kapitel III-4.4 schon erwähnt wurde, führte auch die Verdünnung der cofaktorhaltigen Lösung der wt-BALHis (ohne Inkubation bei einer höheren Temperatur) zu einer teilweise irreversiblen Inaktivierung.

#### **7.4.2 Temperaturstabilität der *BALA28SHis* im Vergleich zur wt-BALHis**

Bei den vergleichenden Untersuchungen der Cofaktorbindungstabilität der wt-BALHis und der Muteine wurde eine stärkere Bindung der Cofaktoren bei der *BALA28SHis* nachgewiesen. Es wurde für die wt-BALHis gezeigt, dass bei diesem Enzym Denaturierungsprozesse mit dem Verlust der Cofaktoren aus dem aktiven Zentrum beginnen (Kapitel III-4). Daher wurde vermutet, dass die *BALA28SHis* eine höhere Stabilität aufweist.

Um die Temperaturstabilität der BALA28SHis mit der von der wt-BALHis zu vergleichen, wurde der  $T_M$ -Wert auch für BALA28SHis bestimmt.

Die Enzymlösung der BALA28SHis in cofaktorhaltigem Puffer wurde unter denselben Bedingungen wie bei der wt-BALHis, bei schrittweise erhöhter Temperatur inkubiert (Kapitel III-4.2). Durch die Untersuchung der Restaktivitäten (Abb. III-60) wurde der  $T_M$ -Wert der BALA28SHis bestimmt, der mit 50,5 °C deutlich höher als der des wt-Enzyms liegt ( $T_M$ -Wert der wt-BALHis liegt bei 45,5 °C).

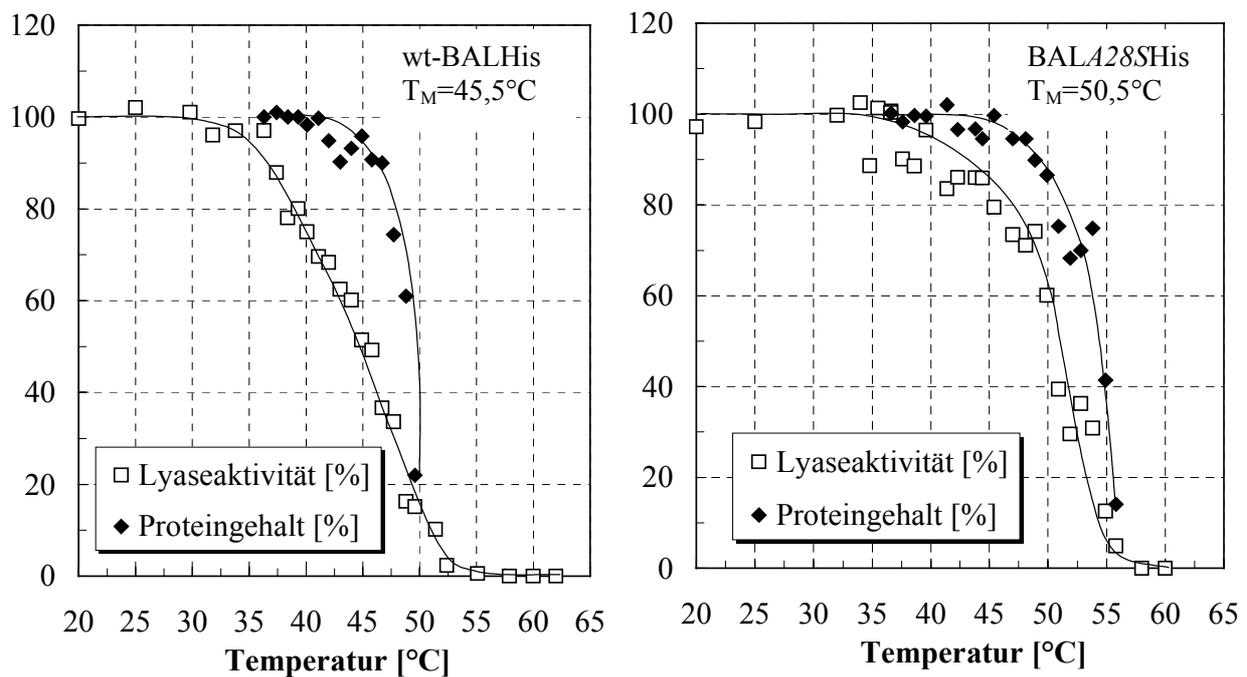
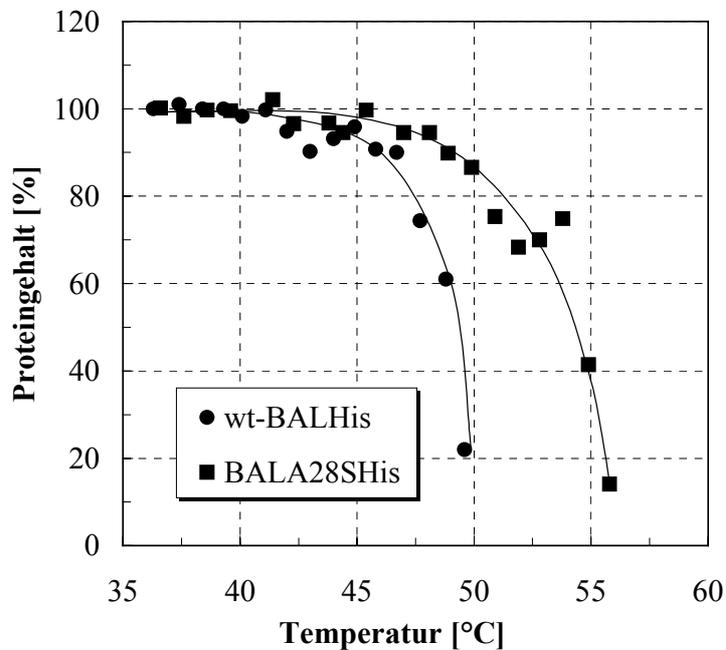


Abb. III-60: Bestimmung des  $T_M$ -Werts der BALA28SHis im Vergleich zu der wt-BALHis.

Analog der wt-BALHis zeigt die BALA28SHis die Aktivitätsverluste bereits vor der Proteinaggregation. D.h. die temperaturbedingte Inaktivierung des Enzyms beginnt auch in diesem Fall mit der Abdissoziation der Cofaktoren aus dem aktiven Zentrum. Allerdings zeigt der Vergleich des Ablaufs der termischen Inaktivierung beim wt-Enzym und bei der BALA28SHis, dass die Kurve der termischen Inaktivierung der BALA28SHis weniger steil als die der wt-BALHis verläuft. Dies deutet darauf hin, dass die Dissoziation der Cofaktoren bei der BALA28SHis erst bei der höheren Temperaturen beginnt. Damit weisen auch die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die eingefügte Mutation zu einer stärkeren Bindung der Cofaktoren führt.

Aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Lyaseaktivität der Enzyme wurden die Aktivitätsmessungen mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen durchgeführt, wobei die

Proteinkonzentration der BALA28SHis ca. 7 Mal höher war, als die der wt-BALHis. Das könnte ein Grund für die höhere Stabilität des Muteins im Vergleich zur wt-BALHis sein. Allerdings zeigt der direkte Vergleich des Proteingehalts in Enzymlösungen mit der gleichen Proteinkonzentration, dass die wt-BALHis früher aggregiert, als das Mutein (Abb. III-61).



**Abb. III-61:** Proteinaggregation der wt-BALHis und BALA28SHis in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Proteinkonzentration der wt-BALHis und BALA28SHis betrug 40 µg/ml.

Unter Berücksichtigung der beiden Messungen kann behauptet werden, dass die Mutation A28S zu einer Erhöhung der Thermostabilität der BALHis führt.

## IV. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung der Thiamindiphosphatabhängigen Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluoreszens* (*Ps.fl.* BAL). Zum Beginn der Promotionsarbeit war bekannt, dass die *Ps.fl.* BAL eine Spaltungsreaktion des Benzoin zum Benzaldehyd katalysiert. In dieser Arbeit wurde zum ersten mal die Katalyse der Rückreaktion mit der *Ps.fl.* BAL gezeigt, die die Anwendung der BAL als Biokatalysator für die Synthese chiraler 2-Hydroxyketone ermöglicht. Es wurden die proteinchemischen und enzymologischen Eigenschaften der BAL untersucht und die optimalen Bedingungen für die katalysierten Reaktionen bestimmt.

Durch die Untersuchung von Punktmutanten der BAL wurden Aminosäurereste bestimmt, die für die katalytische Aktivität der BAL und die Cofaktorbindung relevant sind.

### Etablierung des Aktivitätstests

Mit einem gekoppelten photometrischen Aktivitätstest wurde ein einfacher enzymatischer Test für die Charakterisierung der Lyaseaktivität der BAL etabliert. Dafür wurde eine Folgereaktion verwendet, in der der von der BAL gebildete Benzaldehyd mittels HL-ADH unter äquimolarem Verbrauch von NADH zu Benzylalkohol reduziert wird. Die Aktivität der BAL wird anhand der Absorptionsabnahme durch den Verbrauch des NADH bestimmt.

Die Anwendbarkeit des Tests in Gegenwart von PEG wurde gezeigt. Durch den Zusatz von 15 Vol.% PEG-400 zum Assaypuffer konnten höhere Substratkonzentration gelöst werden, die die Aktivitätsmessungen im Bereich der Substratsättigung ermöglichen.

### Produktion und Aufarbeitung

Die Klonierung der BAL als C-terminales Hexahistidininfusionsprotein ermöglichte eine effektive Aufreinigung des Enzyms zu einer homogenen Proteinfraction in einem chromatographischen Schritt.

Durch die Umklonierung der BAL in den Expressionsvektor pKK233-2 mit dem starken T<sub>7</sub>-Promotor wurde außerdem eine Steigerung der Expression der rekombinanten BALHis in *E.coli* von ca. 5 % auf ca. 27 % des löslichen Gesamtproteins erzielt.

Es wurde eine Hochzelldichtekultivierung des Produktionstamms *E. coli* SG13009 [pBALhis] im 15 L Maßstab mittels Fed-Batch-Technologie durchgeführt, aus der nach Aufreinigung 11,5 g der rekombinanten BALHis gewonnen wurden.

### **Proteinchemische Charakterisierung der BALHis**

Eine Sequenzierung des BAL-Gens ergab Unterschiede zu der veröffentlichten DNA-Sequenz, die zu einer Korrektur der BAL-Proteinsequenz zwischen den Aminosäuren 70 und 99 führten. Die korrigierte Aminosäuresequenz zeigte eine größere Homologie zu der verwandten BFD, als die, die aus der veröffentlichten DNA-Sequenz abgeleitet wurde.

Das Molekulargewicht der nativen BALHis wurde mittels Größenausschluss-Gelpermeationschromatographie zu 216,2 kDa bestimmt. Der Vergleich mit dem Molekulargewicht der Monomereinheit, das mit einer denaturierenden SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS untersucht wurde, ließ auf eine homotetramere Quartiärstruktur der BALHis schließen. Der isoelektrische Punkt (pI) der BALHis wurde durch die isoelektrische Fokussierung mit 4,6 bestimmt.

Während die BALHis in Anwesenheit der Cofaktoren ThDP und  $Mg^{2+}$ -Ionen eine hohe Enzymstabilität aufweist, weisen unterschiedliche Stabilitätsuntersuchungen in Abwesenheit der Cofaktoren auf eine schwache Bindung der Cofaktoren (insbes. ThDP) im aktiven Zentrum der BALHis hin.

Untersuchungen zur Temperaturstabilität der BALHis zeigten, dass das Enzym in Gegenwart der zugesetzten Cofaktoren über mehrere Stunden bis 37 °C stabil ist. Es wurde gezeigt, dass die Inaktivierung des Enzyms zu Beginn des thermischen Denaturierungsprozesses durch die Abdissoziation der Cofaktoren insbesondere ThDP aus dem aktiven Zentrum verursacht wird. Die Untersuchung der Enzymstabilität der wt-BALHis in Abhängigkeit vom Puffersalz zeigte eine hohe Stabilität in Imidazol-, KPi- und Tris-Puffer. Das Stabilitätsoptimum der BALHis liegt im pH-Bereich 6,0 - 7,5. Bei höherem pH-Wert wurde eine Verringerung der Stabilität gemessen, die mit der Abschwächung der Cofaktorbindung im aktiven Zentrum korreliert. Die Inkubation der BALHis in Gegenwart von Denaturierungsmitteln, wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) führte zu einem schnellen Aktivitätsverlust, während die fluoreszenzspektroskopische Messungen eine hohe strukturelle Stabilität der BALHis ermittelt haben. So wurde der vollständige Verlust der Aktivität bereits bei einer GdnHCl-Konzentration von 0,5 M, bzw. bei einer Harnstoffkonzentration von 1,5-2 M nachgewiesen, während eine vollständige Entfaltung des Proteins bei einer GdnHCl-Konzentrationen oberhalb 3 M bzw. bei Harnstoff-Konzentrationen oberhalb 5 M erfolgt.

Die Aktivität der wt-BALHis zeigte eine hyperbole Abhängigkeit von der ThDP-Konzentration, die bei unterschiedlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen annähernd gleich ist. Hingegen wurde bei geringen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (bis zu 0,025 mM) in Anwesenheit von 0,1 mM ThDP kein Aktivitätsverlust gemessen. Während bei ThDP-Konzentration bis zu

5 mM keine Inaktivierung beobachtet wurde, wurde eine Überschussinhibierung bei  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen oberhalb von 7,5 mM nachgewiesen. Die Untersuchungen ergaben, dass eine ThDP-Konzentration von 0,1 mM und eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 1 mM ausreichend sind, um die Stabilität des Holoenzym zu gewährleisten.

Die Stabilität der BALHis in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, wie PEG oder DMSO, wurde vor allem wegen der sehr geringen Löslichkeit der von der BAL umgesetzten aromatischen Substrate in wässrigen Lösungen untersucht. Während die Zugabe von PEG-400 zu dem Reaktionsansatz die Stabilität der BALHis nicht beeinflusste, führte der Zusatz von DMSO zu einer wesentlichen Erhöhung der Enzymstabilität.

### **Charakterisierung der katalytischen Aktivitäten der wt-BALHis**

*Ps.fl.* BAL weist eine hohe (*R*)-Enantioselektivität auf und zwar sowohl hinsichtlich der Ligase- wie auch hinsichtlich der Lyasereaktion.

Die kinetischen Daten der Lyaseaktivität der wt-BALHis wurden für die Spaltung von (*rac*)-Benzoin und (*R*)-2-Hydroxypropiophenon bestimmt. Die maximale spezifische Aktivität von 74 U/mg wurde von der wt-BALHis bei Benzoinkonzentrationen oberhalb 0,6 mM erreicht, der  $K_M$ -Wert für Benzoin betrug 0,05 mM. Für (*R*)-2-HPP wurde die  $V_{max}$  bei einer Konzentration von 6 mM erreicht und betrug 3,6 U/mg. Der  $K_M$ -Wert der wt-BALHis für HPP wurde zu 0,3 mM bestimmt. Das pH-Optimum der Lyaseaktivität liegt bei pH 8,0, das Temperaturoptimum liegt zwischen 35 und 45 °C.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal das synthetische Potenzial der BAL gezeigt, das anschließend in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Müller (IBT 2, Forschungszentrum Jülich) näher charakterisiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die BAL neben der Spaltung von 2-Hydroxyketonen auch die Ligasereaktion unter Bildung von (*R*)-2-Hydroxyketonen mit hohen ee-Werten (>98 %) katalysiert. (*R*)-2-Hydroxyketone werden von der BALHis sowohl ausgehend von Aldehyden, wie auch ausgehend von racemischen 2-Hydroxyketonen synthetisiert. Dabei erhält man auch die (*S*)-2-Hydroxyketone durch die Racematspaltung, wie z.B. (*S*)-Benzoin, das bisher nicht durch enzymatische Katalyse zugänglich war. Die BALHis weist eine Spezifität für aromatische Donorsubstrate auf, während sowohl aliphatische als auch aromatische Aldehyde als Acylakzeptoren fungieren können, entsprechend werden (*R*)-Benzoine, bzw. (*R*)-2-HPP gebildet. Die Ligaseaktivität der BALHis wurde bezüglich der Acyloinkondensation von Benzaldehyd charakterisiert. Die bei einer Benzaldehydkonzentration von 30 mM und pH 8,0 maximale gemessene Ligaseaktivität der BALHis ist mit 336 U/mg 4,5 mal größer als die

Lyaseaktivität. Damit könnte die Bildung von 2-Hydroxyketonen die natürliche Aktivität der wt-BALHis darstellen.

Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln wie PEG und DMSO sowohl auf die Lyaseaktivität als auch auf die Ligaseaktivität der BALHis wurde untersucht. Während die Ligaseaktivität weder von PEG noch von DMSO wesentlich beeinflusst wird, sinkt die Lyaseaktivität in Gegenwart von DMSO auf 15 % der Aktivität in KPi-Puffer. Durch die hohe Ligaseaktivität, die niedrige Lyaseaktivität und hohe Enzymstabilität im Reaktionsansatz mit DMSO wird eine effektive Acyloinsynthese in Gegenwart von DMSO gewährleistet. In Anwesenheit von 20 % DMSO findet eine fast vollständige Umwandlung (97 %) von Benzaldehyd zu (*R*)-Benzoin (ee >99 %) statt.

Die wt-BALHis weist auch eine sehr niedrige Decarboxylaseaktivität (<0,02 U/mg) ausgehend von Benzoylformiat auf, was ihre Verwandtschaft zu den  $\alpha$ -Ketosäure-decarboxylasen bestätigt.

#### **Identifizierung der für die katalytische Aktivität und Stabilität der BAL relevanten Aminosäuren.**

Die gezielte Mutagenese wurde anhand des Sequenzvergleichs der BAL und der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*Ps. p.* BFD), deren 3D-Struktur bekannt ist, geplant.

Die Mutationen A28S, E50A, F484I, A480I, H286A wurden unter Benutzung des Plasmids pBALhis mittels PCR-Verfahren mit mutierten Oligonukleotiden eingeführt. Das Mutein BALA28SHis wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugt. Durch die HZD-Kultivierung des *E. coli* SG13009 [pBALA28Shis]-Produktionsstamms im 15 L - Maßstab wurden 30 g des rekombinanten Proteins gewonnen. Die weiteren Muteine wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. McLeish (University of Michigan) hergestellt und die Klone wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Lyaseaktivität der BAL bezüglich Benzoins wurde durch alle eingeführten Mutationen ausgenommen H286A deutlich beeinträchtigt, die Mutation E50A führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren A28, A480, F484 und E50 für die BAL-Katalyse wesentlich bzw. essentiell sind, anlog zu denen an den entsprechenden Positionen stehenden Aminosäuren der BFD. Die Mutationen H286A und besonders F484I führten zu einer Erhöhung des  $K_M$ -Wertes für Benzoin. Die beiden Punktmutationen bewirkten eine noch deutlichere Erhöhung des  $K_M$ -Wertes für (*R*)-HPP. Am meisten wurde allerdings der  $K_M$ -Wert für (*R*)-HPP durch den Austausch des Alanins 480 gegen Isoleucin beeinflusst. Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung der

Aminosäuren H286 F484 und A480 an der Substratbindung des aromatischen Substrats im aktiven Zentrum der BAL hin. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Mutationen H286A, A480I und besonders F484I zu einer Abschwächung der Cofaktorbinding im aktiven Zentrum führten, während die Mutation A28S eine höhere Bindungsstabilität der Cofaktoren und eine höhere Thermostabilität der BAL bewirkte.

Durch die Einführung der BFD-spezifischen Serin-Seitenkette anstelle des Alanins 28 der BAL gelang die Umwandlung der BAL in eine schwache  $\alpha$ -Ketosäuredecarboxylase (8,2 U/mg im Bezug auf Benzoylformiat). Das pH-Optimum der Decarboxylasereaktion der BALA28SHis wurde mit pH 7.5 bestimmt.

## V. Material und Methoden

### V.1 Material

#### 1.1 Geräte

Hersteller

##### Fermentation

40 L-Fermenter [Infors]

##### Zentrifugation

Tischzentrifuge 5415C [Eppendorf]

Tischzentrifuge Biofuge A [Shimadzu]

Tischzentrifuge Rotina 35R [Hettich]

Sorvall RC5B [Du Pont]

Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150H  
mit Kühlfälle Unicryo MC1L [Uniekuip]

##### Zellaufschluss

Schwingkugelmühle [Retsch]

Desintegrator S [IMA]

Ultraschallgerät UW60 [Branson]

##### Gefriertrocknung

Lyophile LyoVac GT3 [Leybold Heraeus]

##### pH-Stat

VIT90 Video Titration [Radiometer]

ABU91 Autoburette [Radiometer]

##### PCR

Thermocycler [Biometra]

##### Bildverarbeitung

EagleEye II Videosystem [Stratagene]

Luminograph [Berthold]

UV-Transilluminator [Stratagene]

Spiegelreflexkamera OM-2 [Olympus]

**Spektroskopie**

ALADIM (MALDI-TOF-MS)	[Institut für Lasermedizin H.-H.-Universität Düsseldorf]
Polarimeter 241*241MC	[Perkin Elmer]
Fluoreszenzphotometer 241LS 50 B	[Perkin Elmer]
UV/VIS-Spektralphotometer 16A	[Shimadzu]
UV/VIS-Spektralphotometer DU 650	[Beckmann]
Thermomax microplate reader	[Molecular Devices]
GC-MS HP6890 Series GC-System mit HP 5973 "Mass Delivery Detektor"	[Hewlett Packard]

**Chromatographie**

FPLC-System	[Amersham Biosciences]
Fraktionssammler	[Amersham Biosciences]
HiLoad	[Amersham Biosciences]
HPLC-System	[GynkoteK] [Hewlett Packard]
Säule Chiralcel OB	[Diacel]
Säule Chiralpack AD	[Diacel]

**Elektrophorese**

DNA- Elektrophoresekammer GNA 100	[Life Technologie]
DNA- Elektrophoresekammer Horizon 11.14	[BioRad]
Power-Supplies	[Amersham Biosciences] [Biorad]
Protein-Elektrophoresekammer	[Desaga]
Elektrophoresekammer für IEF	[Serva]

**Ultrafiltration**

Centricon 15	[Amicon]
Rührzelle 8050, 8010	[Amicon]

**1.2 Chemikalien**

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien für Lösungen und Puffer waren mindestens von p.a.-Qualität und wurden in der Regel von Fluka, Sigma, Roth oder Merck bezogen. Nährmedienbestandteile stammten von Merck und Difco, die Coenzyme von Biomol. Enzyme

und Chemikalien für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden von NEB, Amersham Biosciences, Biozym, Stratagene, MBI, Gibco oder Roche Molecular Diagnostics bezogen und waren von höchster Qualität. Elektrophoresechemikalien stammten von Roth oder Serva. Die verwendeten nicht käuflichen 2-Ketocarbonsäuren stammten von Georg Krix [Krix et al., 1997].

### 1.3 Mikroorganismen

<i>E.coli</i> Xl1Blue	[Stratagene]
<i>E.coli</i> SG13009prep4	[Qiagen]
<i>E.coli</i> M15prep4	[Qiagen]
<i>E.coli</i> HB101	[Roche Molekular Diagnostics]
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	[Stratagene]
<i>E.coli</i> JM109	[Stratagene]
<i>E.coli</i> AD494	[Novagen]

### 1.4 Vektoren

pQE60	[Qiagen]
pkk233-2	[Amersham Biosciences]
pUC18	[Amersham Biosciences]
pREP4	[Qiagen]

### 1.5 Medien

#### LB-Medium [Sambrook et al., 1989]

Bacto-Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Aq demin.	ad 1000 ml; pH 7,5-8,0

**SOB-Medium**

Bacto-Trypton	20 g
NaCl	0,58 g
Hefeextrakt	5 g
1M KCl-Lösung	2,5 ml
1M MgCl <sub>2</sub> -Lösung	10 ml
1M MgSO <sub>4</sub> -Lösung	10 ml
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 6,8-7,0

Die Agarkonzentration in festen Medien betrug jeweils 2 %.

**Stammlösungen der Antibiotika**

Ampicillin	100 mg/ml
Kanamycin	25 mg/ml
Chloramphenikol	30 mg/ml

Sterilisation durch Filtration über 0,2 µM Membranen [Sartorius]

**FSB-Medium**

Kaliumacetat	1 g
KCl	7,5 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	9 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,5 g
Hexamincobalttrichlorid	0,8 g
Glycerin	20 ml
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 6,4

Sterilisation durch Filtration über 0,2 µM Membranen [Sartorius]

**HZD-Medium**

HZD-Grundlösung:

NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	6 g
Glucose	6 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g

Hefeextrakt 441	3 g
Na <sub>2</sub> EDTA x 1 H <sub>2</sub> O	9,3 mg
Vitaminlösung 428 [DSM]	5 ml
Spurenelementlösung	4 ml
Thiamin-Lösung	1 ml (0,1 g/ml)
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 7,0

Glucose, MgSO<sub>4</sub> und Hefeextrakt wurden getrennt von den anderen Medienbestandteilen autoklaviert. Sowohl die Thiamin-Lösung als auch die Vitamin-Lösung und Antibiotika (je 10 ml von Ampicillin-Lösung (0,1 g/ml) und Kanamycin-Lösung (25 mg/ml)) wurden durch Filtration über 0,2 µm Membranen [Sartorius] sterilisiert und nachträglich zugegeben.

#### **Vitaminlösung 428 [DSM]**

Riboflavin (Vit. B <sub>2</sub> )	10 mg
Thiamin x HCL (Vit. B <sub>1</sub> )	1 g
Nicotinsäure	50 mg
Pyridoxin x HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	50 mg
Calciumpanthotenat	50 mg
Biotin	0,1 mg
Folsäure	0,2 mg
Cyanocobalamin (Vit. B <sub>12</sub> )	1 mg
Aq. bidest.	ad 100 ml; pH 7,0

Alle Komponenten wurden zuerst bei pH 12 (NaOH) gelöst, danach auf pH 7 mit HCl eingestellt.

#### **Spurenelementlösung**

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	40 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 mg
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	7 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5 mg
AlCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2 mg
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	40 mg
Aq. bidest.	ad 1000 ml; pH 7,0

Die Lösung wurde in 250-facher Konzentration in 5 N HCl angesetzt, eine Sterilisation war nicht notwendig.



A28S-s 5'-GCC TGC ACG GAT CCC ATA TC-3'  
*Bam*HI

A28S-as 5'-GAT ATG GGA TCC GTG CAG GC-3'  
*Bam*HI

T73H-s 5'-GCT GGT GCA TGC GGG CGG-3'  
*Sph*I

T73H-as 5'-CCG CCC GCA TGC ACC AGC-3'  
*Sph*I

## 1.8 Software

SCIENTIST

Clone

ClustalW

PSIPRED

MikroMath, USA  
Science & Education Software, USA  
WWW Service at the EBI  
<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>  
Protein Structure Prediction Server  
University College London  
<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>

## V.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.1 Konservierung mikrobiologischer Stämme

*E.coli* Stämme wurden in Vollmedium im Schüttelkolben angezogen und anschließend auf Vollmediumagarplatten ausplattiert.

Für die langfristige Lagerung der *E.coli*-Kulturen wurden 50 %-ige Glycerinkulturen hergestellt. Eine einzelne Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher von einer Vollmediumplatte abgenommen und über Nacht in 5 ml Vollmedium vermehrt. Die Aliquots der so gewonnenen Bakterienkultur wurden mit 87 %-igem Glycerin gemischt. Die Glycerinkulturen wurden bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 2.2 Kulturführung

#### 2.2.1 Plattenkulturen

Die Inkubation der auf den Festmedien ausplattierten *E.coli*-Kulturen erfolgte aerob bei  $37\text{ °C}$  bis Einzelkolonien erkennbar waren. Bewachsene Agarplatten wurden bis zu zwei Monate bei  $4\text{ °C}$  gelagert.

#### 2.2.2 Zellkultivierungen in Schüttelkolben

Die Zellkultivierung bis zu 2 L erfolgte in Schüttelkolben. Flüssigmedien wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten, Glycerinstocks oder 1-10 Vol % Vorkulturen beimpft und auf einem Rundschtüttelgerät mit einer Frequenz von 110-160 rpm bei geeigneter Temperatur inkubiert. Wenn im Text nicht anders erwähnt ist, wurde die Anzucht der Zellen und Expression bei  $37\text{ °C}$  durchgeführt.

##### 2.2.2.1 Expression der wt-BAL in *E.coli*

Die Expression des rekombinanten Proteins wurde in dem *E.coli*-Stamm DH5- $\alpha$  im 1 L -1.5 L Maßstab durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase bei der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,6-0,8 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach der Induktion wurden die Zellen 3-4 Stunden kultiviert.

##### 2.2.2.2 Expression der wt-BALHis und der BALHis-Muteinen in *E.coli*

Bei der Optimierung des Expressionssystems bezüglich des Expressionstamms erfolgte die Induktion der Expression in *E.coli* - Stämmen AD494, HB101, JM109, XLBlue, M15, SG13009 nach einheitlicher Inkubationszeit von 3,5 h bei  $37\text{ °C}$  und 120 rpm nach dem

Animpfen der Kulturen mit 1 Volumenprozent Übernachtkultur. Die optischen Dichten ( $OD_{600}$ ) lagen zwischen 0,7 und 1,0.

Die Zellkultivierung des Produktionsstamms *E. coli* SG13009 [pBAL<sub>his</sub>] wurde bis zum 1,5 L Maßstab in Schüttelkolben durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte mit 1 mM IPTG in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer  $OD_{600}$  von 0,7-0,9. Die Induktionsdauer betrug ca. 5 h. Die typische Zellausbeute lag bei ca. 3,5 g/L.

### 2.2.3 15 L-Fed-batch-Zellkultivierungen

Die 15 L-Fed-batch-Zellkultivierungen in HZD-Medium wurden in 40 L-Fermenter durchgeführt. Die HZD-Grundlösung wurde mit  $Na_2EDTA \times 1 H_2O$  im Fermenter autoklaviert. Danach wurden die getrennt autoklavierten Glucose-,  $MgSO_4$ - und Hefeextrakt-Lösungen zugegeben und die übrigen Komponenten des Mediums mittels Sterilfiltration zugegeben. Sowohl die Thiamin-Lösung als auch die Vitamin-Lösung und Antibiotika (je 10 ml Ampicillin-Lösung (0,1 g/ml) und Kanamycin-Lösung (25 mg/ml)) wurden durch Filtration über 0,2  $\mu$ M Membranen [Fa. Sartorius] sterilisiert und nachträglich zugesetzt.

Die Animpfkultur wurde über Nacht in 5 L-Schüttelkolben kultiviert und anschließend in eine Animpfflasche steril überführt, um dann mit einer Pumpe in den Fermenter eingetragen zu werden. 10 L HZD-Medium wurden mit 2 % Vorkultur beimpft.

Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Die Zellkultivierung wurde durch das Redoxpotenzial, den Sauerstoffpartialdruck und den pH-Wert kontinuierlich kontrolliert. Rührerdrehzahl und Sauerstoffeintrag wurden durch die programmierte  $pO_2$ -Regelungssequenz gesteuert, damit ein Sauerstoffpartialdruck von 20 % nicht unterschritten wurde.

**Tab. V-1:**  $pO_2$ -Regelungssequenz für die Sauerstoffsättigung im Fermenter.  
Stirrer = Rührerdrehzahl [ $min^{-1}$ ]; Flow=Begasungsrate [ $L \cdot min^{-1}$ ]; \*.v=ist-Wert; \*.sp=Soll-Wert; \*.la=Schrittweite.

Beschreibung	Programmierung
Regelalgorithmus	$IF(pO_2 < pO_2.sp) \{ Stirrer.sp = Stirrer.sp * (100 + pO_2.la * (pO_2.sp - pO_2.v) / 10) / 100 \}$
Regelbereich des Rührers	$IF(pO_2 > pO_2.bv) \{ Stirrer.sp = Stirrer.sp * (100 - pO_2.la * (pO_2.v - pO_2.sp) / 10) / 100 \}$ $IF(Stirrer.sp < 300) \{ Stirrer.sp = 300 \}$ $IF(Stirrer.sp > 1200) \{ Stirrer.sp = 1200 \}$
Regelung der Begasungsrate	$Flow.sp = 40 * Stirrer.sp / 1000$

Der pH-Wert wurde während der Zellkultivierung mit 25 %-iger Ammoniaklösung und 1 N Phosphorsäure konstant bei pH 7,0 gehalten. Sobald die vorgelegte C-Quelle erschöpft war, wurde Feedlösung computergesteuert zugesetzt. Eine fortwährende Entnahme von Proben diente der Bestimmung der optischen Dichte und der Ermittlung der spezifischen Lyaseaktivität mittels photometrischem Tests. Die Induktion der Expression erfolgte mit

1 mM IPTG in der Feedingphase. Die Zellkultivierung wurde abgebrochen, wenn der Sauerstoffpartialdruck irreversibel unter 20 % gesunken war oder eine Abnahme der spezifischen Aktivität gemessen wurde.

### 2.3 Zellernte

Die Zellen wurden durch die Zentrifugation während 10 min bei 4000 rpm in der (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, GSA, GS3-Rotor) geerntet. Die erhaltene Biomasse wurde entweder sofort aufgeschlossen oder bei -20 C gelagert.

### 2.4 Bestimmung des Zellwachstums durch Messung der optischen Dichte

Mikrobielle Zellen, die in einen Lichtstrahl gebracht werden, bewirken eine Intensitätsschwächung des Lichtes durch eine Lichtstreuung [Bertger, 1983]. Das Verhältnis von eintretender und austretender Intensität  $I_0$  bzw.  $I$  des Lichtstrahls wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben.

$$E = \frac{I_0}{I} \log_{10} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad [\text{Gl. 9}]$$

Bei konstantem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  und konstanter Küvettenschichtdicke  $d$  ergibt sich für einen bestimmten Messbereich eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Extinktion  $E$  und der Zellkonzentration  $c$ .

Durch spektrophotometrische Messungen der Extinktion im Wellenlängenbereich von 550 nm bis 660 nm, kann die zeitabhängige Zunahme der Zellkonzentration in einer Population wachsender Zellen bestimmt werden. Dies vereinfacht die Reproduktion von wachstumsabhängigen Versuchsergebnissen, erfordert allerdings die Einhaltung von konstanten Versuchsbedingungen, denn der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts sowie Größe, Form, Brechungsindex und Wachstumsbedingungen der untersuchten Spezies [Bertger, 1983]. Eine Aussage über absolute Zellkonzentrationen ist nur über die Erstellung populationsspezifischer Eichkurven durch mikroskopische Bestimmung der Zellzahl möglich. Für die durchgeführten Versuche war jedoch die Bestimmung definierter Zellkonzentrationen nicht notwendig.

Um die Linearität zwischen Extinktion und Zellkonzentration zu gewährleisten, werden die Proben für jede OD-Messung soweit verdünnt, dass die gemessenen Extinktionen den Wert von 0,5 nicht übersteigen.

## 2.5 Herstellung kompetenter *E.coli* – Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach den Methoden von Hanahan [Hanahan, 1983] und von Cohen et. al. [Sambrook et al., 1989] oder mittels DMSO und PEG. Hierbei wurden 50 ml LB-Medium 1:100 mit einer *E.coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C auf einem Rundschüttelgerät inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3-0,4 wurden die Zellen abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 2 ml TSS-Medium (4 °C) aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

TSS-Medium: 10 %PEG 600; 5 % DMSO; 50 mM Mg<sup>2+</sup> (Cl<sup>-</sup> oder SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)

Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Da die kompetenten Zellen *E.coli* JM110 sehr empfindlich auf Gefriervorgänge reagieren und daher nicht nach Hanahan [Hanahan, 1983] präpariert und gelagert werden konnten, wurden die kompetenten, Zellen dieses Stammes mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode nach Cohen et al. hergestellt und nach 5 h sofort zur Transformation verwendet.

## 2.6 Zellaufschluss und Herstellung eines zellfreien Rohextraktes

### 2.6.1. Mechanischer Zellaufschluss

Der mechanische Zellaufschluss erfolgte mittels Glasperlen (Ø=0,3 mm). Es wurden 40%-ige Zellsuspensionen mit Aufschlusspuffer hergestellt und mit der doppelten Menge an Glasperlen versetzt. Der Aufschluss erfolgte je nach Volumen entweder in einer Retsch-Schwingmühle (1-2 ml) [Hummel & Kula, 1989] oder in einem Desintegrator S (10-50 ml) über einem Zeitraum von 25 min bei 4000 rpm. Das Homogenat wurde 15-20 min bei 8.000-12.000 rpm (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, GSA, GS3 oder SS34-Rotoren) und 4°C zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren des zellfreien Überstandes wurde das Zellpellet mit den Glasperlen einmal mit Aufschlusspuffer (½ Volumen der Zellsuspension) gewaschen, erneut zentrifugiert und die Überstände vereinigt.

### 2.6.2 Zellaufschluss per Ultraschall

Der Zellaufschluss durch gepulsten Ultraschall erfolgte in einer 30 %-igen Zellsuspension im Aufschlusspuffer, die 10-15 min mit 0,5 % Lysozym auf Eis vorinkubiert wurde. Die Zellen wurden am pulsed Sonifer [Branson] 3-4 Zyklen (60 %) bei 80 % Leistungshöhe mit dazwischenliegenden Kühlungsintervallen ausgesetzt. Die Zeit der Behandlung war von der Zellmenge abhängig. Zellsuspensionen von 20-40 ml wurden 4 mal während 5 min behandelt, bei Volumina von 1-2 ml betrug die Zyklusdauer 25 s. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 20 min bei 18.000 rpm (SS34-Rotor) und 4°C abzentrifugiert.

Aufschlusspuffer: 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0  
 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>  
 0,1 mM ThDP

## V.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die selektive Amplifikation des wt-BAL-Gens aus dem Klonierungsvektor pUC18/*bzl*, wie auch für die Einführung der gezielten Mutationen in das BALHis-Gen verwendet.

Die Oligonukleotide, die als PCR-Primer benutzt wurden, wurden von der Fa. MWG in Form eines Lyophilisats bezogen. Die Länge der Oligonukleotide betrug zwischen 28 und 34 Basen (Kapitel V-1.7).

#### 3.1.1 Amplifikation des wt-BAL-Gens

Als Template diente bei der Amplifikation des wt-BAL-Gens das Plasmid pUC18/*bzl*. Die Primer, die für die Amplifikation des *bzl* verwendet wurden, wurden aufgrund der bekannten DNA-Sequenz [Hinrichsen et al., 1994] konstruiert und enthielten 5'-terminal geeignete Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA als PCR-Template	20 ng
Polymerase Puffer (10x) <sup>1</sup>	1/10 Vol
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM
Sense- und Antisense -Primer	je 60 pmol
proof-reading-DNA-Polymerase <i>pfu</i>	2,5 U
Aq. bidest.	ad 100 µl

Die PCR wurde mit Hilfe eines automatischen DNA-Thermal Cyclers [Biometra] durchgeführt, der eine Erhitzung des Deckels ermöglicht, daher war es nicht nötig, die PCR-Ansätze mit Mineralöl zu überschichten.

Die PCR wurde nach dem folgenden Programm durchgeführt:

5 min (1x zum Anfang des Programms)	Denaturierung bei 94°C
1 min	Denaturierung bei 94 °C
2 min	Annealing der Primer bei 50-54 °C, je nach Schmelztemperatur der Primer

---

<sup>1</sup> Es wurden die vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2 min                    Extension bei 74 °C (Verlängerung der Primer durch die *Pfu*-Polymerase )  
(Zyklische Wiederholung (30x) der letzten drei Schritte)

10 min                  Extension bei 74 °C,  
um zu gewährleisten, dass alle amplifizierten Fragmente vollständig verlängert werden

In 30 Zyklen einer automatischen PCR-Reaktion wurde eine ausreichend hohe Konzentration der DNA erzeugt, um die Ligation zu ermöglichen.

### 3.1.2 Einführung der Mutationen mittels PCR

Die Mutagenese erfolgte mittels PCR-Verfahren der „overlapping extension“ (überlappenden PCR) [Ho et al., 1989], dessen Prinzip in der Abb. V-1 verdeutlicht wird.

Das Verfahren wird in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt werden zwei komplementäre Oligonukleotide, die in der Mitte die Mutation tragen, und zwei weitere Oligonukleotide, die rechts, bzw. links von der Mutation liegen (upstream, bzw. downstream), als Primer verwendet. Mit je einem mutierten und einem der äußeren Primer werden zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Enden produziert. Nach der Hybridisierung dieser Fragmente in einer nachfolgenden PCR dient das überlappende 3'-Ende jedes Stranges als Primer für die Synthese des Gegenstranges zu dem überstehenden 5'-Ende. Die Mutationen, die Oligonukleotidprimer tragen, finden sich auch zu 100% im letzten PCR-Produkt wieder.

Die Wahl der zu ersetzenden Nukleotide richtete sich nach der Codonnutzung des Wirtsorganismus, also *E.coli* [Sharp et al., 1988]. Die „äußeren Primer“ bei der Herstellung der überlappenden Fragmente enthielten 5'-terminal geeignete Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und PCR-Programm entsprachen den, die oben beschriebenen wurden (Kapitel V-3.1.1).

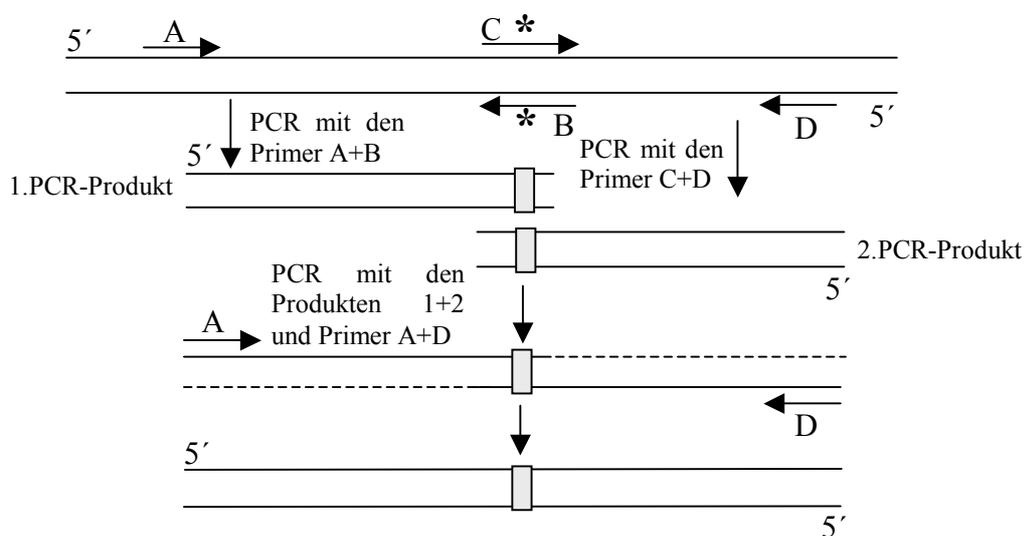


Abb. V-1: Schema zur Mutagenese mittels PCR nach der Methode der „overlapping extension“.

Als Template im ersten Schritt diente das Plasmid pBAL<sub>his</sub>.

Die überlappenden Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Trennung und Isolierung in äquimolaren Mengen zur PCR eingesetzt (250 ng des kleinen Fragments). Die Annealingtemperatur dieser PCR richtete sich nach der Schmelztemperatur der überlappenden Sequenz.

### 3.2 Berechnung der Schmelztemperatur von Primern

Die Schmelztemperatur  $T_m$  eines Primers wurde folgendermaßen abgeschätzt [Thein & Wallace, 1988].

Schmelztemperatur  $T_m$  [°C] = 2 x (Basenanzahl A+T) + 3 x (Basenanzahl C+G)

Die empfohlene Annealingtemperatur  $T_A$  für PCR-Vorgänge ergibt sich aus der Schmelztemperatur durch Addition von 3°C:  $T_A$  [°C] =  $T_m$  [°C] + 3 °C.

### 3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Linearisierte DNA wurde zur Identifizierung, Quantifizierung und Isolierung in Agarosegelen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und durch einen Vergleich mit einer Größenmarker DNA zugeordnet.

Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook [Sambrook et al., 1989]. Verwendet wurden abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 0,6 – 1,5 %-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer, denen 0,005 % Ethidiumbromidlösung (v/v) zugesetzt wurde. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 5 – 7 V/cm Gellänge über einen Zeitraum von 1-3 Stunden.

TAE-Puffer, pH 8,0:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
Probenauftragspuffer:	6 x TAE-Puffer, pH 8,0 50 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Molekulargewichtsstandard:	1 kb-Leiter [Gibco] 100 bp DNA-Leiter [Biolab]

Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem Eagle Eye II<sup>®</sup> [Stratagene] analysiert und dokumentiert, indem die Ethidiumbromidfluoreszenz im UV-Durchlicht bei 312 nm angeregt und photographisch festgehalten wurde.

### 3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte meistens mit dem Qiaex II Gelextraction Kit [Qiagen] nach Herstellerangaben. Zur Elution der DNA-Fragmente wurden 30 µl 0,1 mM Tris-HCl, pH 8,0, verwendet. Die Isolierung wurde auch mit dem Kit der Firma Machery & Nagel nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA-haltige Lösung wurde anschließend einer Ethanol-Fällung unterzogen und die DNA in 10 µl TE-Puffer, pH 8,0 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA) oder Aq. bidest. resuspendiert.

### 3.5 DNA-Restriktion

Die Inkubation mit unterschiedlichen Endonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Zu analytischen Zwecken wurden 0,5-1 µg DNA mit 1-5 U Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei geeigneter Temperatur für 0,5-2 h inkubiert. Präparative Restriktionen wurden mit einer DNA-Menge bis zu 4 µg in einem Gesamtvolumen von 40 µl durchgeführt. Qualität und Vollständigkeit der enzymatischen Spaltung wurden mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen überprüft.

#### 3.5.1 Partialverdau durch sukzessive Verdünnung der Restriktionsendonuklease

Der Partialverdau ist eine effektive Methode für die Klonierung von Fragmenten, die die Restriktionsschnittstelle, die für die Klonierung benutzt werden soll, auch im Gen enthalten. Ein 100 µl Restriktionsansatz, der die zu verdauende DNA und 1x Restriktionspuffer enthielt, wurde in 5 Eppendorfgefäße so verteilt, dass das erste Gefäß 30 µl, das zweite bis vierte Gefäß je 20 µl und das letzte 10 µl der Reaktionsmischung enthielt. Die Restriktionsendonuklease (3-10 U/µg DNA) wurde mit 30 µl Reaktionsmischung im ersten Gefäß auf Eis versetzt und gut gemischt. Dann wurde der Reihe nach 20 µl aus dem vorgehenden Gefäß in das nachfolgende auf dem Eis pipetiert, wodurch eine sukzessive Verdünnung der Restriktionsendonuklease in den Reaktionsansätzen erreicht wurde. Alle 5 Reaktionsansätze wurden 15 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion wurde in allen Ansätzen gleichzeitig durch Inkubation in einem Eisbad abgestoppt. Die Ansätze wurden nach dem Abstoppen vereinigt und die Restriktionsfragmente wurden in einer Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Das Fragment mit der richtigen Größe wurde anschließend aus dem Gel isoliert.

### 3.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um ein Religieren der Vektoren während der Ligation zu vermeiden, wurden diese unter Verwendung von alkalischer Phosphatase aus Shrimp (Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)) [Roche Molekular Diagnostics] an ihren 5'-Termini dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von 50 ng des Vektors erfolgte mit 1 U SAP nach den Angaben des Herstellers in einem Reaktionsansatz mit  $Zn^{2+}$ -haltigem Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 9  $\mu$ l, für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C 15 min inaktiviert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde direkt für die Ligation benutzt.

### 3.7 Ligation

#### 3.7.1 Ligation von überstehenden Enden („sticky ends“)

Die Ligationsansätze enthielten 1 x Ligationspuffer [Roche Molecular Diagnostics] und 5 U T4-DNA-Ligase [Roche Molekular Diagnostics] in einem Gesamtvolumen von max. 20  $\mu$ l. Das Insert wurde in fünffach-molarem Überschuß zum Vektor eingesetzt [Mülhardt, 1999]. Die Ligation erfolgte durch die Inkubation der Ansätze bei 16 °C über Nacht.

#### 3.7.2 Ligation von glatten Enden („blunt-ends“)

Zur Ligation von PCR-Fragmenten wurde das SureClone<sup>®</sup> Kit [Roche Molecular Diagnostics] eingesetzt. Das Kit enthält den mit *Sma*I linearisierten Klonierungsvektor pUC18, dessen blunt-ends 5'-dephosphoryliert vorlagen (pUC18-*Sma*I/BAP (Bovine Alkaline Phosphatase)). Die PCR-Fragmente wurden gemäß der Herstellerangaben mit Klenow-Fragment und Phosphonukleotidkinase behandelt und anschließend von den Proteinen mittels Phenol/Chloroform- Extraktion befreit. Danach wurden die DNA-Proben durch Gelfiltration unter Anwendung der im Kit enthaltenen Mikro-Spin-Säulchen entsalzt und mit dem Vektor in einem molaren Verhältnis von 5:1 versetzt. Die Ligationsansätze wurden mit der T4-Ligase aus dem Kit bei 16 °C für 4 h inkubiert, bevor 3-7  $\mu$ l der Ligation zur Transformation kompetenter *E.coli* Zellen verwendet wurden.

### 3.8 Präparation von Plasmid DNA

#### 3.8.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA

Zur Schnellpräparation von Plasmid DNA wurden 1,5 ml einer 5 ml-Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen wurden 3 min bei RT mit 7000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100  $\mu$ l Lösung A resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung B und 5-minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Durch Zugabe von 150  $\mu$ l

Lösung C wurde die Lösung neutralisiert und die denaturierten Proteine nach 15 min Inkubation auf Eis gefällt. Durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurden Zelltrümmer, präzipitierte Proteine und genomische DNA sedimentiert und anschließend mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 0,7 Vol. 2-Propanol gefällt und 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, in einer Vacuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl TE –Puffer, pH 8,0 (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA) resuspendiert.

Lösung A: 50 mM Glucose  
10 mM EDTA  
25 mM Tris-HCl pH 8,0  
100 µg RNaseA /ml, jeweils frisch zugefügt

Lösung B: 0,2 M NaOH  
1,0 % (w/v) SDS

Lösung C: 3,0 M Natriumacetat pH 4,8

Die im Schnellverfahren präparierte Plasmid-DNA eignete sich für die Überprüfung des Inserts, bzw. der Insertorientierung und für die Transformationen.

### 3.8.2 Plasmid DNA Präparationen mittels kommerzieller Kits

Die Plasmidpräparationen erfolgten mit den Kits der Fa. Qiagen Plasmid tip-20 oder Midi-Kit nach dem Prinzip der alkalischen Lysis anhand des Herstellerprotokolls. Nach dem letzten Schritt des Protokolls wurde eine Ethanol-fällung angeschlossen, danach wurde die DNA in Wasser aufgenommen. Die hochreine DNA wurde für Ligationen und Sequenzierungen verwendet.

## 3.9 Transformation von Bakterien

Die Transformation der *E.coli* Zellen wurde nach dem Protokoll von Hanahan [Hanahan, 1983] durchgeführt. 100-200 µl tiefgefrorene kompetente Zellen wurden 20 min auf Eis aufgetaut, mit 20-30 ng Plasmid-DNA oder 2 µl Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock wurde 90 sek bei 42°C durchgeführt, danach wurde der Ansatz sofort für 5 min auf Eis gestellt. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz mit 4 Volumen LB-Medium versetzt und 60 min bei 30°C bzw. 37°C unter guter Belüftung geschüttelt. 200 µl Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei der Transformation von Plasmiden wurde der Transformationsansatz ohne die Zellenregeneration direkt auf vorgewärmte Selektionsagarplatten ausgestrichen.

### 3.10 Ethanolfällung

Zur Konzentrierung von DNA-Lösungen wurden diese mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2, und 2 Vol. eiskaltem Ethanol (abs.) versetzt, mindestens 30 min (bzw. über Nacht) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 20 min in einer Tischzentrifuge bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 12000 rpm sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol zweimal von Salz frei gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in Aq. bidest. oder TE-Puffer, pH 8,0 (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA) resuspendiert.

## V.4 Proteinchemische Methoden

### 4.1 Proteinreinigung

#### 4.1.1 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte an Q-Sepharose Fast Flow. Das Material ist eine Agarosematrix mit quartären Aminen als funktionelle Gruppen. Das Material bindet Proteine mit negativer Oberflächenladung, die dann mit einer Salzlösung, z. B. NaCl oder einem pH-Schift wieder abgelöst werden können.

Die Säule wurde mit Puffer A vor der Verwendung äquilibriert. Der Rohextrakt wurde durch Zentrifugation geklärt und direkt im Aufschlusspuffer aufgetragen. Der Proteindurchbruch wurde mit Puffer A eluiert. Anschließend wurde ein linearer Natriumchloridgradient von 300 bis 500 mM gestartet. Der Startpunkt des Gradienten ist abhängig vom aufgetragenen Probenvolumen. Die BAL eluierte bei 350-430 mM NaCl. Alle noch gebundenen Proteine wurden mit Puffer C entfernt.

Die kontinuierliche Proteindetektion fand durch Absorptionsmessung bei 280 nm in einer Durchflußküvette statt. Die Absorptionsempfindlichkeit muss während der Elution des Zielproteins wesentlich höher sein (0,1 mAU) als während der Elution des Durchbruchs (2 mAU), weil die Proteinkonzentration nach Abtrennung der nicht gebundenen Proteine mehr als eine Zehnerpotenz geringer war.

Matrix	Q-Sepharose FF [Amersham Biosciences]
Gelbettvolumen	170 ml ( $\varnothing$ 4 cm)
Flussrate	2,5 ml/min.
Probe	Rohextrakt (Gesamtprotein bis 1000 mg)
Fraktionsgröße	10 ml
Puffer A	50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 0,01 mM ThDP, 1 mM $\text{MgCl}_2$ , 300 mM NaCl
Puffer B	wie A aber 500 mM NaCl
Puffer C	wie A aber 1 M NaCl

Die Regeneration der Matrix erfolgte nach jeder Chromatographie durch folgende Lösungen:

1 M Kalilauge/ Kaliumchloridlösung  
 Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 zur Neutralisation  
 75 % Essigsäure  
 Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 zur Neutralisation

Zur Bestimmung der Aufreinigungsausbeute wurde der Proteingehalt nach Bradford [Bradford, 1976] und die spezifische Aktivität bestimmt.

#### 4.1.2 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)

Die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) stellt einen besonderen Fall der Affinitätschromatographie dar, einer effektiven Feinreinigungsmethode, der das Prinzip der spezifischen Wechselwirkung zwischen der Zielsubstanz und dem auf der Matrix kovalent gebundenen Liganden zugrunde liegt. IMAC beruht auf der Fähigkeit bestimmter Aminosäuren (insbes. Histidin) bei neutralem pH einen Chelatkomplex mit den bivalenten Metallionen  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  zu bilden. Diese Methode ermöglicht eine effektive Aufreinigung natürlicher Proteine mit hohem Histidingehalt, wie auch von Fusionsproteinen, denen ein His-Tag angefügt wurde.

Für die präparative Reinigung wurde eine Agarosematrix mit Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA)-Liganden und zweiwertiges Nickel als Metallion verwendet (Abb. V-2). Durch 4 chelatisierende Gruppen gewährleistet der NTA-Ligand sehr feste Bindung mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen. Die 2 freibleibenden Koordinationsstellen der  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion werden für die Wechselwirkung mit den Histidin-Resten benutzt.

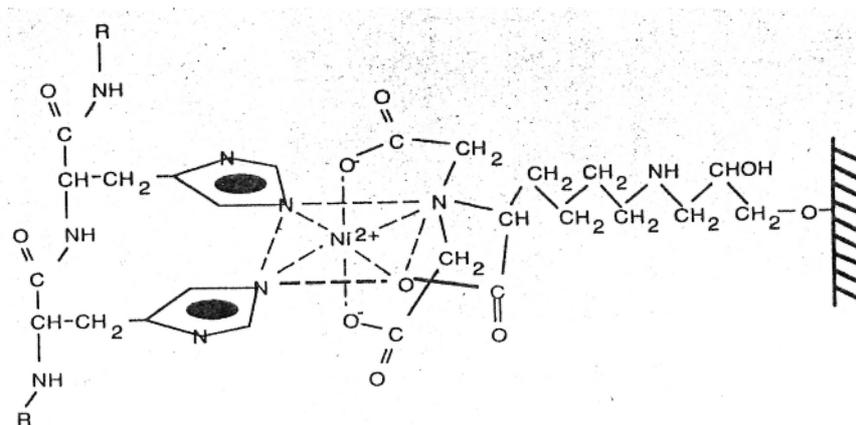


Abb. V-2: Spezifische Bindung des Histidinfusionsproteins an der Ni-NTA-Matrix.

Der Rohextrakt wurde im Aufschlusspuffer auf die Säule aufgetragen, die nicht-bindenden Proteine wurden im Durchbruch eluiert, die unspezifisch gebundenen Proteine wurden mit 50 mM Imidazol von der Säule entfernt. Die BALHis wurde mit 250 mM Imidazol eluiert.

Gelmatrix	Ni-NTA-Agarose [Qiagen]
Flussrate	2 ml/min
Probe	Rohextrakt (bis 5 mg BALHis/ml Säulenmaterial)
Äquilibrierungspuffer	50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
Waschpuffer	50 mM Kaliumphosphat, 50 mM Imidazol, pH 7,0
Elutionspuffer	50 mM Kaliumphosphat, 250 mM Imidazol, pH 7,8

Die Elution der BALHis erfolgte in einem cofaktorfreen Puffer. Um das Holoenzym zu regenerieren, wurde das Protein anschließend mittels Gelfiltration an G-25 Sephadex in den cofaktorhaltigen 10 mM KPi, pH 7,0 umgepuffert. Gleichzeitig wurde das Imidazol aus der Proteinprobe entfernt, da dieses bei der Lyophilisation oder beim Einfrieren des Proteins zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Die Proteinproben wurden nach der Gelfiltration mit 50 % Glycerol versetzt oder lyophilisiert. Sowohl das Lyophilisat, als auch 50 %-Glycerol-Proteinlösungen wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.1.3 Gelpermeationschromatographie

Die Gelfiltration trennt die Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen. Das Elutionsvolumen korreliert bei kugelsymmetrischen Proteinen mit dem Molekulargewicht. Für die verschiedenen Molekulargewichtsbereiche werden unterschiedlich stark vernetzte Dextrangele verwendet.

##### 4.1.3.1 Sephadex G-25

Die für die Gelpermeationschromatographie verwendete Matrix Sephadex G-25 ist stark vernetzt und besitzt für den Molekulargewichtsbereich von 1 – 5000 Dalton ein lineares Trennvermögen. Aufgrund ihrer niedrigen oberen Ausschlussgrenze, die die Abtrennung niedermolekularer Substanzen von Proteinen erlaubt, diente die Gelfiltration an G-25 Sephadex der Entsalzung und Umstellung des Puffers nach der Anionenaustauschchromatographie und IMAC.

Das Volumen der Proteinprobe ist bei der Gelfiltration durch den Säulendurchmesser und das Volumen der Matrix limitiert.

Gelbettvolumen	950 ml ( $\varnothing$ 5 cm)
Probenvolumen	max. 100 ml
Flussrate	max. 20 ml/min.

##### 4.1.3.2 Superdex G-200

Die analytische Gelfiltration an Superdex G-200 PG wurde für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts der BALHis angewandt. Der lineare Trennbereich liegt zwischen 10 und 600 kDa.

Gelbettvolumen	123,6 ml ( $\varnothing$ 1,6 cm)
Probenvolumen	< 1 ml
Flussrate	1 ml/min
Fraktionsvolumen	1 ml
Puffer	50 mM KPi, pH 6,5 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM ThDP

Zur Beschreibung der Elution einer Substanz bei der Gelfiltration hat sich der  $K_{av}$  (coefficient of available volume) als geeignet erwiesen, da er nur von der Art des betrachteten Moleküls und dem Gelmaterial, nicht aber vom Gesamtvolumen  $V_t$  und der Packungsdichte der Säule abhängig ist.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad [\text{Gl. 10}]$$

$V_e$	Elutionsvolumen
$V_0$	Ausschlussvolumen
$V_t$	Gesamtvolumen des Säulenbetts

Der Term  $V_t - V_0$  entspricht dem Volumen der stationären Phase  $V_{\text{Gelmatrix}}$  einschließlich den Volumen der mobilen Phase  $V_i$  in den Poren des Gels. Das Volumen  $V_i$  kann nicht direkt bestimmt werden. Mit der Näherung  $V_t - V_0 = V_i$  gibt der  $K_{av}$ -Wert den Volumenanteil von  $V_i$  an, welcher für das betrachtete Molekül effektiv zugänglich ist.

Mit Proteinen verschiedener Größe (Low and High Molecular Weight Kit [Amersham Biosciences]) wurde eine Eichung für das oben genannte Puffersystem durchgeführt (Tab. V-2; Abb. V-3). Das Ausschlussvolumen von 49 ml wurde mit Blue-Dextran bestimmt.

Die Elution der BAL erfolgte bei einem Elutionsvolumen von 68,5 ml. Das entspricht einem  $K_{av}$ -Wert von 0,26.

**Tab. V-2:** Eichproteine für die G-200 und die Elutionsvolumina.

Eichprotein	MW [Da]	$V_e$ [ml]
Ribonuclease A	13700	102,9
Chymotrypsinogen A	25000	97,7
Ovalbumin	43000	87,8
Bovine Serum Albumin	67000	80,9
Aldolase	158000	71,9
Catalase	232000	70,1
Ferritin	440000	60,7
Thyroglobulin	669000	53,2

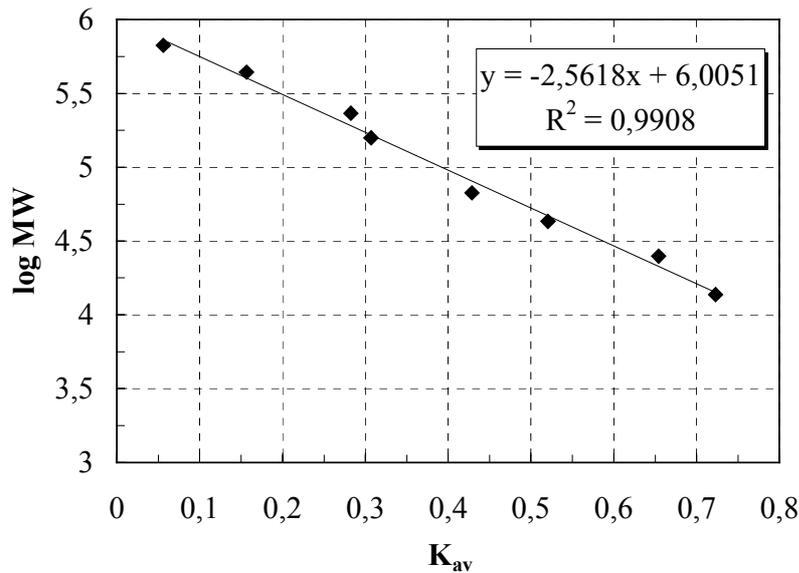


Abb. V-3: Eichgerade der G-200 zur Molekulargewichtsbestimmung.

## 4.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Enzymlösungen wurden bei Bedarf mittels Ultrafiltration in Rührzellen [Amicon] unter einem Druck von 3,5-4 Pa bis zur Endkonzentration von 0,5 – 2,5 mg/ml aufkonzentriert. Hierzu wurden Omega-Membranen [Filtron] mit der Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet. Vor der Anwendung wurden die Membranen ca. 10 min in dem entsprechenden Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 6,5, 0,1 mM ThDP, 1 mM  $MgCl_2$ ) gequollen.

## 4.3 Lagerung der Proteine

Die gereinigten Proteinfractionen wurden nach der Umpufferung entweder mit 50 % Glycerol versetzt oder lyophilisiert. Das Lyophilisat und Enzymchargen in 50 %-Glycerol wurden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Mit 0,02 % Natriumazid konnte die Enzymlösung während einer Woche mit geringen Aktivitätsverlusten von  $<10\%$  bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden. Diese wurden für parallele Versuche als homogene Präparation verwendet.

## 4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Proben wurde photometrisch nach der Methode von Bradford *et al.* [Bradford, 1976] bestimmt. Die Methode beruht auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische, insbesondere Arginin-, und aromatische Aminosäurereste beliebiger Proteine. Durch Ausbildung des Protein-Farbstoffkomplexes verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm, so

dass es zu einer Farbverschiebung von rot nach blau kommt. Die Absorptionsänderung bei 595 nm kann spektrophotometrisch gemessen werden und ermöglicht unter Erstellung einer Eichgeraden mittels definierter Mengen Rinderserumalbumin eine direkte Bestimmung des Proteingehaltes.

Da nur im Bereich bis 0,1 mg Protein/ml eine Proportionalität zwischen Extinktion und Proteingehalt besteht, mussten Probelösungen mit Extinktionswerten oberhalb von 0,5 geeignet verdünnt werden.

Bradford-Reagenzlösung:

Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
Ethanol (100 %)	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %)	100 ml
Aq. deion.	ad 1000 ml

Lagerung im Dunkeln bei RT

Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden jeweils 0,1 ml Proteinprobe mit 0,9 ml Reagenzlösung in einer 1,5 ml Plastikkuvette vermischt und nach 8 min die Extinktion bei 595 nm in einem Spektrophotometer gemessen. In gleicher Weise wurde eine Konzentrationsreihe mit 0,01-0,1 mg/ml Rinderserumalbumin für eine Eichgerade erstellt. Einstellung von Enzymkonzentrationen < 10 µg/ml erfolgte durch Verdünnung.

#### 4.5 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen (12,5 %) diente der Kontrolle von Aufreinigungsschritten und der Ermittlung des Molekulargewichtes der Monomereinheit. Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Lämmli [Lämmli, 1970] durchgeführt. Die Proteinproben wurden 1:1 mit einem reduzierenden Probenpuffer versetzt, 2 min bei 95 °C denaturiert und reduziert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Proben wurden auf das 6 %-ige Sammelgel aufgetragen, mit dem das Trenngel überschichtet wurde.

Probenpuffer	5 % Mercaptoethanol 1 % SDS
--------------	--------------------------------

Trenngel pro 30 ml:	12,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) 7,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,3 ml 10 % SDS 9,4 ml 30 % Glycerin 0,3 ml 10 % Ammoniumperoxidisulfat (APS)
------------------------	--

Sammelgel pro 15 ml:	2,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid 3,75 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,15 ml 10 % SDS 8,45 ml H <sub>2</sub> O
-------------------------	--

0,15 ml 10 % APS  
10 µl TEMED

Als Protein-Standard wurde der „Premixed Standard“ [Roche] in einer 1:100 Verdünnung verwendet.

Die folgenden Trennbedingungen wurden gewählt:

Maxigel (12 x16 cm)	üN 7-9 mA, danach 20 mA; Gesamtdauer 18-20 h	16 °C
Midigel (8x10 cm)	20 mA; Gesamtdauer 2-2,5 h	16 °C

Die Detektion erfolgte mittels Silberfärbung [Blum et al., 1987] oder Coomassiefärbung. Zur Coomassiefärbung wurden die Gele nach der Elektrophorese 30-40 min in der Färbelösung inkubiert und zwischen 4–16 Std. entfärbt. Dabei werden die meisten Proteine gleichzeitig im Gel durch Fällung fixiert.

Färbelösung :

Coomassie Blau R-250	0,1 %
Methanol	40 %
Eisessig	10 %

Entfärber :

Ethanol	40 %
Eisessig	10 %
Aq. dest.	50 %

## 4.6 Isoelektrische Fokussierung

Der isoelektrische Punkt der wt-BALHis wurde mittels isoelektrischer Fokussierung in einem Ampholyte enthaltenen Agarosegel bestimmt [Westermeier, 1990]. Durch die Verteilung der Ampholyte unter Anlegung einer elektromagnetischen Spannung wird in diesem Gel ein pH-Gradient aufgebaut. In verschiedenen pH-Bereichen des Gels unterscheidet sich die Nettoladung des Proteins wegen der unterschiedlichen Protonierung-Deprotonierung der Seitenketten von Aminosäuren. Das beladene Protein wandert in dem elektromagnetischen Feld bis der Punkt erreicht wird, an dem seine Nettoladung null ist. Der lokale pH-Wert des Gels, wo das Protein fixiert wird, entspricht dem isoelektrischen Punkt des Proteins.

IEF-Agarosegel:

Agarose	1,25 g
Sorbit	8 g
Glycerin	3 g
EDTA	0,05 g
Aq. deion.	bis 100 g

Das IEF-Agarosegel wurde nach der Auflösung in 10 ml-Aliquots verteilt und bei 4 °C gelagert. Vor der Benutzung wurde das 10 ml-Aliquot durch Aufwärmung in der Mikrowelle vorsichtig gelöst, auf 70 °C im Wasserbad abgekühlt und mit 625 µl des entsprechend vortemperierten Ampholyts versetzt.

Die reine Proteinprobe nach der IMAC und Gelfiltration wurde durch wiederholende Verdünnung mit Wasser und anschließende Aufkonzentrierung mit der Amikon-Zelle teilweise entsalzt und zum Schluss bis 1,1 mg/ml aufkonzentriert.

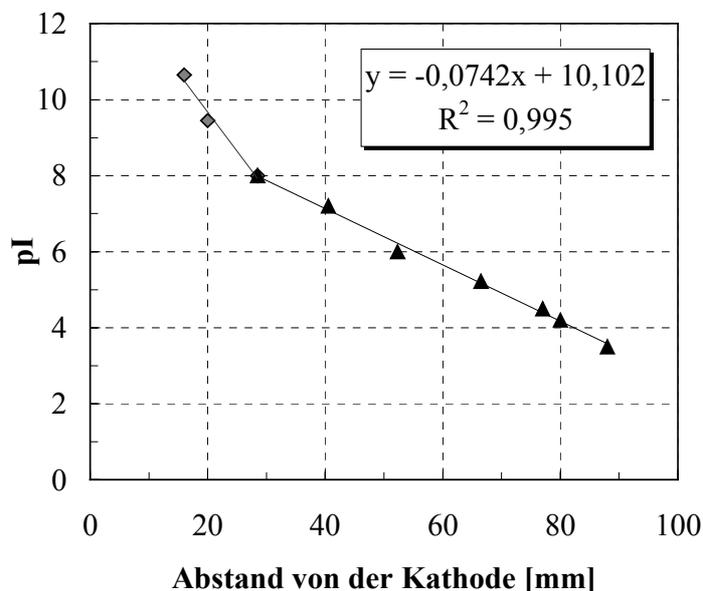
Trennbedingungen :

Stromstärke	max
Spannung	500 V
Leistung	10 W

Die IEF wurde nach 60 min beendet, als die Stromstärke nicht mehr abnahm.

Die Proteine wurden nach der Trennung im Gel 20 min mit 20 % Trichloressigsäure fixiert. Die Säure wurde anschließend mit Millipore-Wasser abgespült (2 x 5 min) und das Gel wurde innerhalb von 1,5 Stunden bei 70 °C getrocknet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch die Coomassie-Färbung analog der von Polyacrylamidgelen (Kapitel V-4.5).

Danach wurde das Gel bei Raumtemperatur getrocknet und konnte dauerhaft gelagert werden. Zur Erstellung der Eichgerade (Abb. V-4) wurde die pI-Standardmischung eingesetzt, die verschiedene Makroproteine im pI-Bereich zwischen 3 bis 10 enthält (Protein Test Mixture [Serva]) (Tab. V-3).



**Abb. V-4:** Eichgerade zur Bestimmung des pI-Werts mittels isoelektrischer Fokussierung.

Durch den breiten benutzten pH-Bereich ergab sich eine Gerade, die am Anfang abknickt. Deswegen wurden bei der Aufstellung der Geradengleichung die ersten zwei Messpunkte

nicht berücksichtigt (Abb. V-4). Mit der ermittelten Geradengleichung wurde der pI der wt-BALHis rechnerisch anhand des Abstandes der Proteinbande von der Kathode, der 74 mm betrug, mit 4,6 bestimmt.

**Tab. V-3:** Eichproteine für die isoelektrische Fokussierung.

<b>Eichprotein</b>	<b>pI</b>	<b>Abstand von der Kathode [mm]</b>
Cytochrom C (Pferd)	10,65	16
Ribonuklease A (Pankreas Rind)	9,45	20
Lectin ( <i>Lens culinaris</i> )	8,3/8,0/7,75	26-31
Myoglobin (Pferd)	7,35/6,9	37-44
Carboanhydrase (Erythrocyten, Rind)	6,0	52
$\beta$ -Lactoglobulin (Milch, Rind)	5,3/5,15	65-68
Trypsininhibitor(Sojabohne)	4,5	77
Glycoseoxidase ( <i>Aspergillus niger</i> )	4,2	80
Amyloglucosidase ( <i>Aspergillus niger</i> )	3,5	88

#### **4.7 MALDI-TOF-MS (Matrix-Assited Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry)**

Die Massenspektrometrie wurde verwendet, um das Molekulargewicht des Monomers der wt-BALHis zu bestimmen.

MALDI ermöglicht die Analyse der organischen Substanzen mit der molekularen Masse bis 200 kDa aufgrund der Trennung der beladenen Atome und Moleküle nach ihrer molekularen Masse. Die Methode verwendet die pulsierende Laserbestrahlung um die analysierte Verbindung, wie z.B. Proteinprobe zu verdunsten und zu ionisieren. Vor der Bestrahlung wird die analysierte Probe in einer niedrigen Konzentration gleichmäßig mit der bei der Laserwellenlänge absorbierenden Matrix, (wie z.B. sinapinic oder dihydroxybenzoic acid) gemischt. Die verwendete Matrix gewährleistet die Absorption der Energie des Laserpuls und die weitere Energieübertragung auf die analysierte Probe. Durch die Benutzung der Matrix, wie auch durch die sehr kurze Behandlungszeit wird sowohl die Dissoziation der zu analysierenden Moleküle in kleine Fragmente, als auch ihre Assoziation zu Oligomeren verringert. Die gebildeten Ionen werden danach in dem TOF-Massenanalysator nach der Flugzeit analysiert, die von dem Verhältnis ihrer Masse zur Ladung ( $m/z$ ) abhängig ist. Da es einzeln beladene Partikel produziert werden ( $z=1$ ), hängt der Weg eines Ions von seiner Masse ab.

Die Enzymproben wurden 1:3 bis 1:5 mit der Matrix auf dem Probesteller gemischt, mit einem Fön getrocknet und vermessen. Das Molekulargewicht der Monomere wurden anhand der Flugzeit über eine externe Kalibrierung mit BSA errechnet.

Gerät:	ALADIM [Insitut für Lasermedizin, HHU-Düsseldorf]
Lasers:	Stickstofflaser $\lambda = 337 \text{ nm}$ gepulst 3 ns; 1 Hz Auflösung $\sim 40$ (Masse M / Peakbreite bei halber Peakhöhe dM)
Matrix:	9 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure 1 mg/ml 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure in 20 % (v/v) Acetonitril / 79,9 % (v/v) A. dest. / 0,1 % Trifluoressigsäure
Kalibrant:	1,6 mg BSA/ml $MW_{(BSA)} = 66430 \text{ Da}$ in Acetonitril / A. dest. / Trifluoressigsäure
Proben:	$\sim 1 \text{ mg/ml}$ Enzym in Aq. dest. umgepuffert

#### 4.8 Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln

Die Denaturierung der wt-BALHis durch steigende Denaturierungsmittelkonzentrationen (Harnstoff und GdnHCl) wurde durch die Verschiebung des Emissionsmaximums der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz verfolgt.

Die Messung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Gerät:	Fluoreszenzphotometer 241LS 50 B [Perkin Elmer]
Anregungswellenlänge:	$\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$
Fluoreszenzemission:	$\lambda_{\text{em}} = 320 - 370 \text{ nm}$
Proteinkonzentration:	10 – 15 $\mu\text{g/ml}$
Probevolumen:	1 ml
Schlitzweiten:	Extinktion: 5 nm Emission: 7,5 nm

Die resultierenden Spektren wurden jeweils um die Hintergrundemission in den Pufferlösungen mit entsprechenden Denaturierungsmittelkonzentrationen korrigiert.

Die Denaturierungsmittelkonzentrationen variierten zwischen 0 M und 8 M in Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,01 mM ThDP). Die genaue Denaturierungsmittelkonzentration wurde durch Messung des Brechungsindex(N) in den proteinfreien Referenzproben nach folgender Gleichung bestimmt [Pace et al., 1989].

$$c(\text{Harnstoff}) = 117,66 \Delta N + 29,753 (\Delta N)^2 + 185,56 (\Delta N)^3 \text{ [M]}$$

$$c(\text{GdnHCl}) = 57,147 \Delta N + 38,68 (\Delta N)^2 - 91,6 (\Delta N)^3 \text{ [M]}$$

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach zwanzigstündiger Inkubation und der Restaktivität nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur.

## 4.9 Bestimmung des $T_M$ -Werts

Die Enzymlösungen der wt-BALHis und BALA28SHis in cofaktorhaltigem Puffer (50 mM KPi-Puffer, pH 6,5; 5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,1 mM ThDP), wurden bei schrittweise erhöhter Temperatur im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Die aktuelle Temperatur in der Proteinlösung wurde mit einem externen Thermoelement (Alma-digit, München, Germany) kontrolliert. Nachdem die eingestellte Temperatur in der Proteinlösung erreicht war, wurde diese 5 min konstant gehalten und anschließend ein 50  $\mu$ l Aliquot entnommen und im gekoppelten photometrischen Test bei 30 °C hinsichtlich der verbliebenen Lyaseaktivität untersucht. Ein weiteres Aliquot von 100  $\mu$ l diente zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Gleichzeitig wurde die Temperatur in der Probe erhöht. Das Verfahren wurde so lange fortgesetzt, bis Enzymproben vollständig thermisch inaktiviert waren.

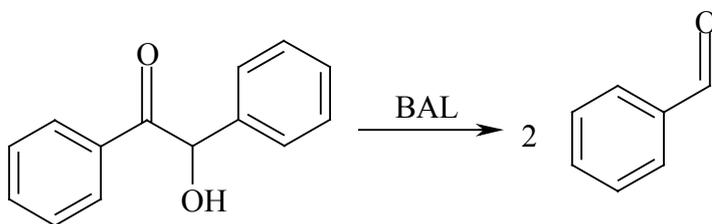
## 4.10 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivität eines Enzyms wird bestimmt durch die Messung des Substratumsatzes in einer bestimmten Zeiteinheit. Die Messeinheit der Enzymaktivität, ein Unit (U), entspricht der Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol eines bestimmten Substrates unter den definierten Bedingungen in einer Minute umsetzt.

Lyaseaktivität und Decarboxylaseaktivität der wt-BAL und der Muteine wurden mit Hilfe des photometrischen Enzymtests bestimmt.

### 4.10.1 Direkter Enzymtest zur Bestimmung der Lyaseaktivität

1 U der Lyaseaktivität der BAL entspricht der Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol Benzoin bei 30 °C in einer Minute umsetzt.



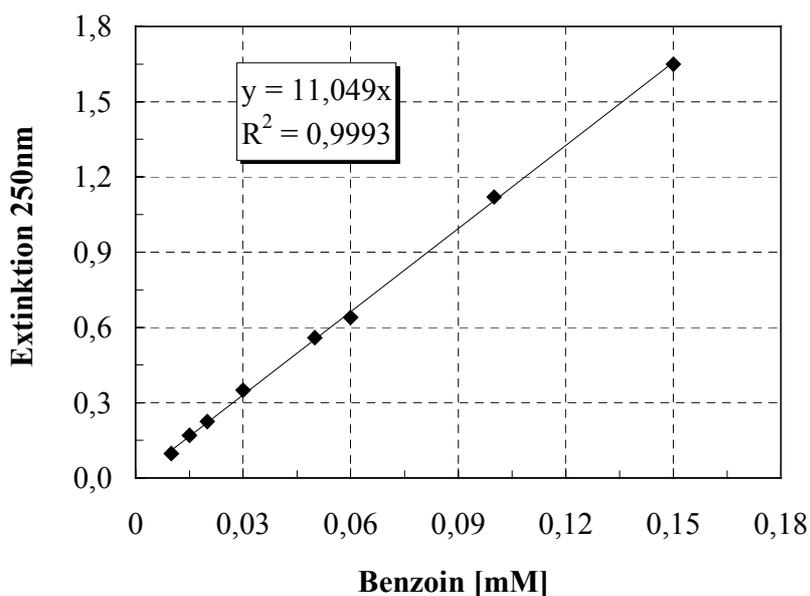
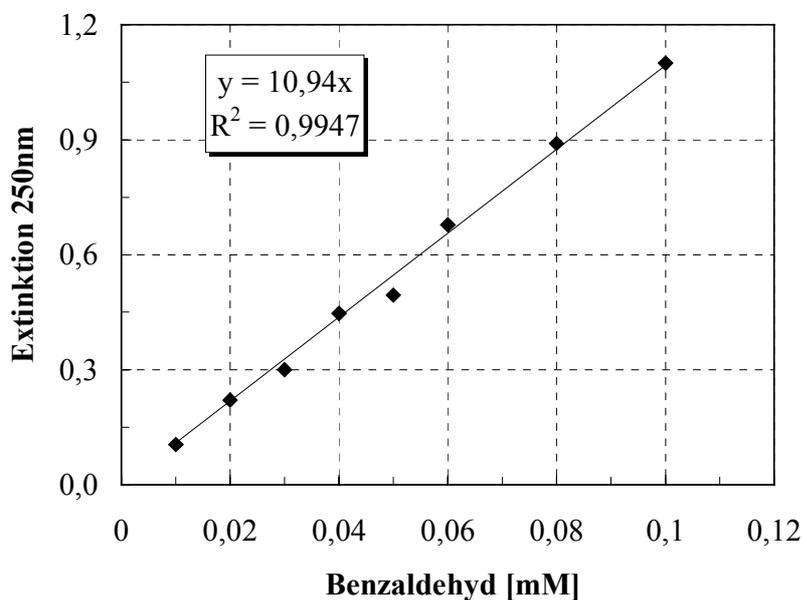
**Abb. V-5:** Lyaseaktivität der BAL.

Sowohl Edukt als auch Produkt der Lyasereaktion ausgehend von Benzoin haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 250 nm. Bei der Umsetzung des Benzoins mittels BAL kommt es aber zur Bildung von zwei Molekülen des Produkts aus jedem Molekül des Substrats (Abb. V-5). Das ermöglicht, die Absortionszunahme im Laufe der

Reaktion im UV-Photometer bei 250 nm direkt zu verfolgen. Die Konzentrationsänderung des Benzoin lässt sich dann mit der folgenden Gleichung berechnen [Gonzalez & Vicuna, 1989]: [Gl. 11]:

$$\Delta A = A - A_0 = (\varepsilon_S \cdot (C - C_0) + 2(C_0 - C) \cdot \varepsilon_P) \cdot d = (C - C_0) \cdot (\varepsilon_S - 2\varepsilon_P) \cdot d = -\Delta C(2\varepsilon_P - \varepsilon_S) \cdot d$$

$A_0$	Anfangsabsorption
$A$	Endabsorption
$\varepsilon_S$	Extinktionskoeffizient des Substrats [ $L \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]
$\varepsilon_P$	Extinktionskoeffizient des Produkts [ $L \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]
$C_0$	Anfangskonzentration des Substrats [M]
$C$	Endkonzentration des Substrats [M]
$d$	Schichtdicke



**Abb. V-6:** Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd und Benzoin im Assaypuffer. Assaypuffer: 15 % PEG-400 in 50 mM Tris, pH 8,0 mit 2,5 mM  $MgCl_2$  und 0,1 mM ThDP.

Die Extinktionskoeffizienten für Benzaldehyd und Benzoin im Assaypuffer (15 % PEG-400 im 50 mM Tris pH 8,0) wurden entsprechend mit 10,9 L·mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> bzw. 11,1 L·mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> bestimmt (Abb. V-6).

Die Volumenaktivität berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{min} \cdot \frac{V}{v \cdot d \cdot \epsilon} \quad [Gl. 12]$$

Kombiniert man diese Gleichung mit der Gleichung 11, so folgt unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Extinktionskoeffizienten des Benzaldehyds und Benzoins:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{min} \cdot \frac{V}{v \cdot d \cdot (2\epsilon_p - \epsilon_s)} = \frac{\Delta E}{min} \cdot \frac{2}{21,8 - 11,1} = \frac{\Delta E}{min} \cdot 1,84$$

U	Unit (μmol/min)
ΔE/min	Extinktionsänderung
V	Gesamtvolumen
v	Probevolumen
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm im Photometer)
ε <sub>s</sub>	molarer Extinktionkoeffizient des Substrats [L·mmol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]
ε <sub>p</sub>	molarer Extinktionkoeffizient des Produkts [L·mmol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]

Testzusammensetzung:

950 μl Substratlösung  
50 μl Enzymlösung

Zusammensetzung der Substratlösung:

15 % PEG-400 in 50 mM Tris pH 8,0  
2,5 mM Magnesiumchlorid  
0,1 mM ThDP

Die Substratlösung wurde auf 30 °C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe der Enzymlösung gestartet. Eine Messung dauert 60 Sekunden, von denen nur die letzten 50 Sekunden zur Aktivitätsbestimmung herangezogen wurden.

Allerdings hat der direkte Enzymtest einige wichtige Nachteile, die seine Anwendung beschränken. Da der photometrische Aktivitätstest bei hohen Absorptionswerten nicht anwendbar ist, muss die Substratkonzentration im Assay niedriger als 0,15 mM sein. Da die Absorption mit der Zunahme der Produktkonzentration zunimmt, müssen die zu messenden Enzymaktivitäten unter 0,5 U/ml liegen, um eine Messzeit von 1 min zu gewährleisten. Ein weiterer Nachteil des direkten Enzymtests folgt aus der Natur der katalysierten Reaktion, die eine Gleichgewichtsreaktion darstellt. Wenn Benzaldehyd in der Reaktionsmischung entsteht, läuft die Reaktion auch in der Gegenrichtung ab, was die Änderung der Absorption beeinflusst. Man kann also die Lyaseaktivität der BAL nur in einem kurzen Zeitraum messen, solange die Benzaldehydkonzentration vernachlässigbar niedrig ist.

#### 4.10.2 Direkter Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität

Benzoylformiat besitzt ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und hat in Kaliumphosphat-Puffer einen stoffspezifischen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon=0,032 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [Iding, 1998]. Die Aktivität kann durch die kontinuierliche Messung der Abnahme der Substratkonzentration im UV-Photometer bei 340 nm ermittelt werden. Die Substratlösung wird auf 30 °C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe der Enzymlösung gestartet. Eine Messung dauert 90 Sekunden, von denen nur die letzten 80 Sekunden zur Aktivitätsbestimmung herangezogen werden.

Testzusammensetzung:

950 µl Substratlösung  
50 µl Enzymlösung

Zusammensetzung der Substratlösung:

25 mM Benzoylformiat, pH 6.0, KOH  
50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.0  
2,5 mM Magnesiumchlorid  
0,1 mM ThDP

Als 1 U ist die Enzymmenge definiert, die 1 µmol Benzoylformiat pro Minute bei 30 °C umsetzt.

Die Volumenaktivität berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot 625$$

Um eine ausreichende Absorptionsänderung messen zu können, ist bei dem niedrigen Extinktionskoeffizienten für Benzoylformiat eine sehr konzentrierte Enzymlösung notwendig.

#### 4.10.3 Gekoppelter Enzymtest zur Bestimmung der Lyase- und Decarboxylaseaktivitäten

Wenn nicht anderes angegeben, erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität durch den gekoppelten Enzymtest, um die Limitierungen des direkten Tests zu umgehen. Hierbei wurde als Hilfsenzym eine Alkoholdehydrogenase eingesetzt, die den gebildeten Aldehyd unter äquimolarem Verbrauch von NADH zu Benzylalkohol reduziert. Die Konzentrationsänderung von NADH lässt sich bei einer Wellenlänge von 340 nm spektrophotometrisch verfolgen.

Durch einen Überschuss der Alkoholdehydrogenase wird die Reaktion, in der der Aldehyd gebildet wird, limitierend und die Abnahme des NADH ist direkt proportional der Lyaseaktivität der BAL, bzw. der Decarboxylaseaktivität der BAL<sub>A28SHis</sub>. Die in den meisten Versuchsreihen eingesetzte Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HL-ADH) hat ein weites Substratspektrum und reduziert sowohl aliphatische als auch aromatische Aldehyde. Bei der Untersuchung der Lyaseaktivität ausgehend von Hydroxypropiophenon wurde die preisgünstigere Hefe-ADH eingesetzt, die nur einen von der beiden gebildeten Aldehyden und zwar Acetaldehyd reduziert. Da die Hefe-ADH nur aliphatische Aldehyde umsetzen kann, ist sie für die anderen Messungen ungeeignet.

Die Anwendung des gekoppelten Enzymtests für die Bestimmung der Lyaseaktivität hat folgende Vorteile: 1. Durch eine enzymatische Folgereaktion werden die gebildeten Aldehyde aus der Reaktionsmischung entfernt und die von der BAL katalysierte Lyasereaktion kann nur in einer Richtung ablaufen. 2. Die Messung der Absorptionsabnahme erfolgt bei der Wellenlänge von 340 nm, bei der weder Edukt noch Produkt ihre Absorptionsmaxima haben. Auch für die Bestimmung der Decarboxylaseaktivität ist der gekoppelte Enzymtest bevorzugt. Der Extinktionskoeffizient von NADH ist um einen Faktor ~200 größer als der des Benzoylformiat, somit ist die Aktivitätsbestimmung um diesen Faktor empfindlicher.

Die Messung erfolgte im Photometer bei 340 nm und 30 °C (die Temperatur in der Lösung wurde mit einem Temperaturfühler kontrolliert). Nach 5 min Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung (ca. 1 U/ml) gestartet und die Änderung der Extinktion über 90 Sekunden erfolgt, von denen die ersten 10 Sekunden zur Aktivitätsbestimmung nicht herangezogen wurden.

Substituiert man den Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,3 \text{ Lmmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) in die Gleichung (2) so folgt für die Decarboxylaseaktivität:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot 3,17$$

Testzusammensetzung für die Decarboxylaseaktivität:

750  $\mu\text{l}$  Assaypuffer  
 100  $\mu\text{l}$  Substratlösung (50 mM Benzoylformiat, pH 6.0 (KOH))  
 50  $\mu\text{l}$  HL-ADH (5 U/mL)  
 50  $\mu\text{l}$  NADH-Lösung (3,5 mM)  
 50  $\mu\text{l}$  Enzymlösung

Assaypuffer:

50 mM Kaliumphosphat, pH 6,0  
 2,5 mM Magnesiumchlorid  
 0,1 mM ThDP

Bei der Bestimmung der Lyaseaktivität ausgehend von Benzoin wird der photometrische Koeffizient durch 2 geteilt, da aus jedem Benzoinmolekül 2 Benzaldehydmoleküle gebildet werden, die in der Folgereaktion reduziert werden.

Damit gilt für die Lyaseaktivität

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot 1,59$$

Testzusammensetzung für die Lyaseaktivität

850  $\mu\text{l}$  Substratlösung (1,5 mM Benzoin im Assaypuffer)  
 50  $\mu\text{l}$  HL-ADH (5 U/mL)  
 50  $\mu\text{l}$  NADH-Lösung (7 mM)  
 50  $\mu\text{l}$  Enzymlösung

Assaypuffer:

15 % PEG in 50 mM Tris pH 8,0  
 2,5 mM Magnesiumchlorid  
 0,1 mM ThDP

#### 4.10.3.1 Untersuchung des Substratspektrums der Lyaseaktivität

Andere 2-Hydroxyketone als Benzoin wurden als mögliche Substrate für die Lyasereaktion der BAL ebenfalls mit dem gekoppelten Assay untersucht. Bei besonders geringen Aktivitäten wurde die Messzeit verlängert (bis 300 s) und eine parallele Blindmessung ohne Enzym durchgeführt, um etwaige nicht-enzymatische Effekte auszuschließen.

Als Hilfsenzym wurde in diesen Tests HL-ADH verwendet. Es wurde zuvor überprüft, ob die im Test entstehenden Aldehyde Substrate der HL-ADH sind, um eine Limitierung des gekoppelten Tests durch die HL-ADH auszuschließen.

#### 4.10.3.2 Bestimmung der kinetischen Konstanten im Mikrotiterplattenlesegerät

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten der wt-BALHis und der Muteine (ausgenommen BALA480/His) bezüglich Hydroxypropiophenon (Kapitel III-5.1.3; III-7.1.2) und der BALA28SHis bezüglich Benzoylformiat (Kapitel III-7.2.1) wurden im Mikrotiterlesegerät („96-well-Format“) durchgeführt. Dies ermöglichte die Messung schwacher Aktivitäten mit vertretbarem Enzymverbrauch. Außerdem ist so der Einsatz hoher Benzoylformiatkonzentrationen im Assay trotz der Absorption des Benzoylformiats bei 340 nm möglich.

Bei der Testzusammensetzung wurde berücksichtigt, dass der Anteil der Enzymlösung, durch deren Zugabe der Test gestartet wird, nicht weniger als die Hälfte des gesamten Assayvolumens betragen soll, um eine gute Vermischung der Enzymlösung mit dem Assaymix zu erreichen.

#### Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Decarboxylierung des Benzoylformiats

Testzusammensetzung (Gesamtvolumen des Tests 200 µl):

20 µl Substratlösung pH 6,0, (KOH)  
 50 mM Puffer  
 20 µl NADH-Lösung ( 3,5 mM)  
 10 µl HL-ADH(5 U/ml)  
 100 µl Enzymlösung

Assaypuffer:

50 mM Kaliumphosphat, pH 6,0  
 2,5 mM Magnesiumchlorid  
 0,1 mM ThDP

Die Volumenaktivität berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot \frac{V}{v \cdot d \cdot \epsilon} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot \frac{2}{6,3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 0,514 \text{ cm}} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot 0,62$$

#### Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Spaltung des (R)-Hydroxypropiophenons

Bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten für das Substrat (R)-Hydroxypropiophenon in den Mikrotiterplatten wurde der Anteil der Substratstammlösung möglichst hoch gewählt,

um eine ausreichend hohe Substratkonzentration im Assay zu erreichen. Daher wurde in diesem Fall folgende Testzusammensetzung verwendet:

Testzusammensetzung (Gesamtvolumen des Tests 200  $\mu$ l):

80  $\mu$ l Substratlösung  
 10  $\mu$ l NADH-Lösung (7 mM)  
 10  $\mu$ l Hefe-ADH (5 U/ml)  
 100  $\mu$ l Enzymlösung

Substratlösung: 40 mM (*R*)-2-HPP  
 50 mM Tris, pH 8,0  
 2,5 mM Magnesiumchlorid  
 0,1 mM ThDP

Die Volumenaktivität berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot \frac{2}{6,3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 0,514 \text{ cm}} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot 0,62$$

Die Löslichkeit des 2-HPP in wässrigen Lösungen wurde in eigenen Versuchen mit 40 mM bestimmt. Daher wurde die höchste Substratkonzentration in den Mikrotiterplatten durch die Zusammensetzung des Assays auf 16 mM limitiert. Im Fall des Muteins BAL4480/His konnte bei dieser Substratkonzentration keine Substratsättigung erreicht werden. Daher wurden die kinetische Untersuchungen für diesen Mutein im Photometer unter Benutzung von 1 ml-Küvette durchgeführt. Der Assay wurde analog dem Assay für Benzoin zusammengesetzt (siehe oben). Die maximale eingesetzte Substratkonzentration betrug in diesem Fall 34 mM

## V.5 Biotransformationen

### 5.1 Benzoin synthese

#### 5.1.1 Analytische Synthese des Benzoins ausgehend von Benzaldehyd

##### 5.1.1.1 Synthese des Benzoins ausgehend von Benzaldehyd mit der wt-BAL

Die Synthese von Benzoin mit der wt-BAL wurde ausgehend von Benzaldehyd als alleinigem Substrat in Batch-Ansätzen mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 6; 6,5; 7; 7,5; und 8) während 16 h durchgeführt. Die Anwesenheit von Benzoin wurde in allen 5 Reaktionsmischungen mit DC- und HPLC-Analyse anhand des Vergleichs mit der Referenzsubstanz Benzoin nachgewiesen.

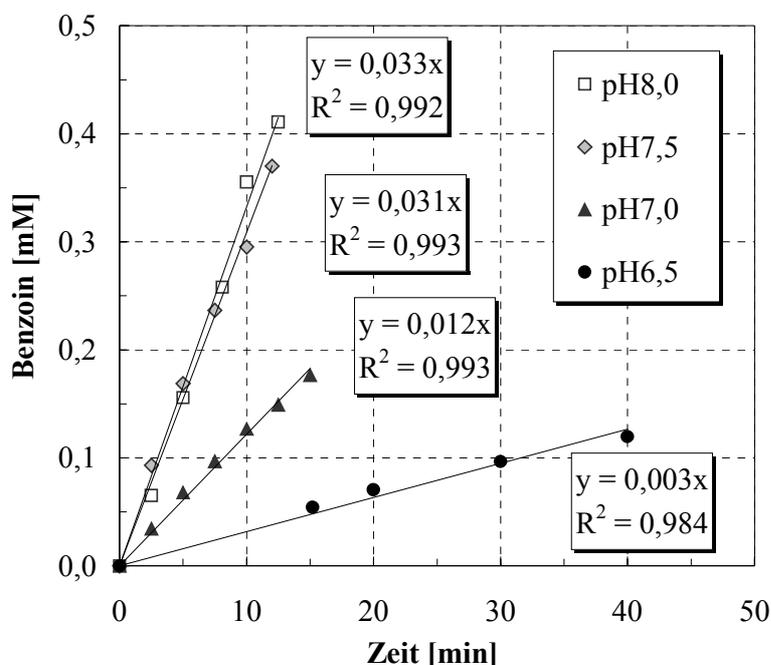
### 5.1.1.2 Synthese des Benzoin aus Benzaldehyd mit der wt-BALHis

Die Synthese von Benzoin aus Benzaldehyd mit der wt-BALHis wurde in einer Glasflasche unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

Reaktionstemperatur	30 °C
Substrate	10 - 60 mM Benzaldehyd (optimal 50 mM)
Reaktionspufferlösung	50 mM Kaliumphosphat (pH 6,5-8,0) (optimal pH 8,0) 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1 mM ThDP
Katalysatorkonzentration	~0,05-0,1 µg/ml BALHis

Reaktionsvolumina und Reaktionsdauer wurden der Fragestellung angepasst.

Um die Zeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen wurden die Proben aus dem Batchansatz jede 2,5 min entnommen und nach der gebildeten Benzoinmenge analysiert (Abb. V-7).



**Abb. V-7:** Bestimmung der Anfangsaktivitäten der wt-BALHis bei unterschiedlichen pH-Werten. Reaktionsansatz: 30 mM BA, 50 mM KPi-Puffer; 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,1 mM ThDP. Enzymkonz. = 0,1-0,05 µg/ml.

### 5.1.2 Präparative Synthese des Benzoin aus Benzaldehyd mit der wt-BALHis

Die präparative Synthese des Benzoin aus Benzaldehyd wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionstemperatur	25 °C
Substrate	3 mmol Benzaldehyd

Reaktionspufferlösung	20 % DMSO 80 % 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,0) 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> 0,15 mM ThDP
Reaktionsvolumen	100 ml
Reaktionsdauer	62 Std.

20 U der BALHis wurde eingesetzt. Nach 42 Stunden wurde die Reaktionsmischung mit zusätzlichen 20 U der BALHis versetzt. Der Umsatz wurde mit GC-MS auf 97 % ermittelt.

### 5.1.3 Synthese der Benzoinderivate mit der wt-BALHis

Die Synthese der Benzoinderivate sind analog der Synthese von Benzoin mit Benzaldehydderivaten als Substraten (20-60 mM) innerhalb von 20 Stunden durchgeführt worden.

### 5.1.4 Isolierung des (*R*)-Benzoins

Die Reaktionsansätze wurden mit 1/4 Volumen Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit H<sub>2</sub>O und Kochsalzlösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wurde die Produktlösung am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt und das Benzoin aus Ether/Hexan (1/1) bei -20°C durch steigende Mengen Hexan auskristallisiert. Die Kristalle wurden durch Waschen mit eiskaltem Hexan von Benzaldehyd befreit und die Lösungsmittelreste im Hochvakuum entfernt. Es wurde 305 mg (96 %) des (*R*)-Benzoins erhalten.

### 5.1.5 Analytische Daten des Benzoin und Benzaldehyds

#### 5.1.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

DC ermöglicht die Trennung von chemischen Substanzen aufgrund ihrer verschiedenen Polarität durch Verteilung zwischen dem hydrophilen Kieselgel, das eine Platte aus Aluminium oder Glas beschichtet, und der mobilen hydrophoben Phase (Laufmittel). Das Laufverhalten einer Substanz in einem gegebenen DC-System wird mit dem Retentionsfaktor beschrieben, der einen Quotient zwischen der Laufstrecke der Substanz und der des Laufmittels darstellt.

stationäre Phase	Kieselgel 60 F254 [Merck]
mobile Phase	Diethylether-Benzin40/60 (4:1)
Retentionsfaktoren	Benzoin 0,59; Benzaldehyd 0,86.

Detektion erfolgte im UV-Licht.

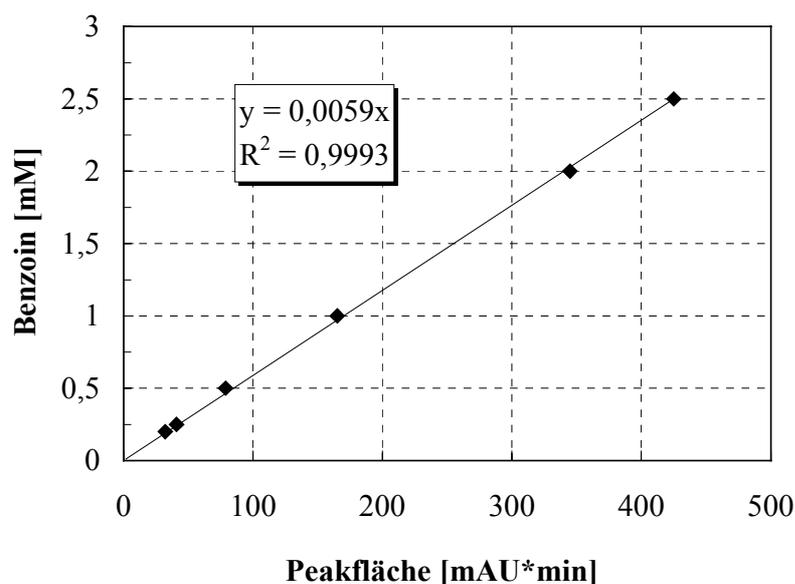
### 5.1.5.2 Quantifizierung von Benzaldehyd und Benzoin mittels RP-HPLC

Die Trennung der Substanzen mit der Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) basiert auf ihrer unterschiedlichen Polarität. Hydrophile Substanzen, die nur schwache Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Säulenmatrix eingehen, eluieren früher, hydrophobere Stoffe später.

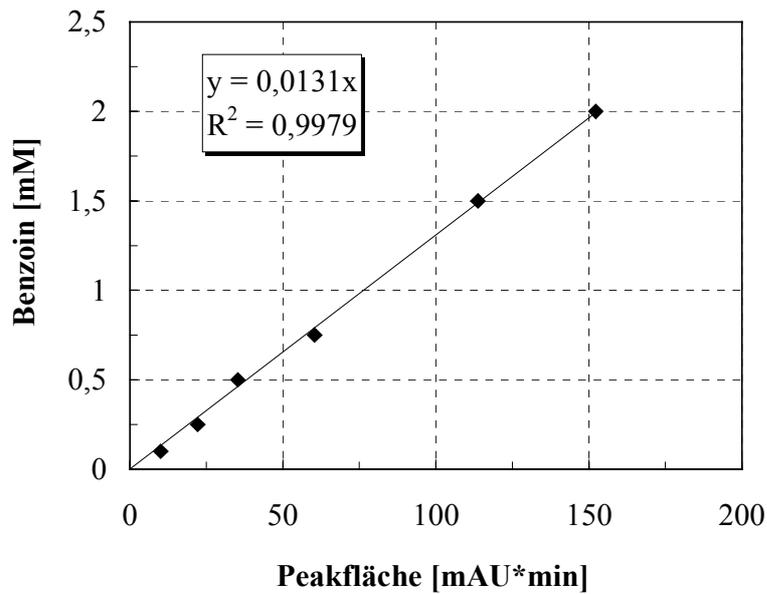
Die Quantifizierung des Benzaldehyds, bzw. Benzoin erfolgte mittels reversed-phase HPLC unter folgenden Bedingungen:

stationäre Phase	C18 Hypersil ODS 5 $\mu$ Säule, 250 mm x 4,6 mm [
Elution	isokratisch mit 40 %CH <sub>3</sub> CN, 0,5 %CH <sub>3</sub> COOH, 59,5 % H <sub>2</sub> O
Flussrate	1,1 ml/min
Detektion	250 nm und 263 nm
Retentionszeiten:	Benzaldehyd - 7,2 min, Benzoin - 9,8 min

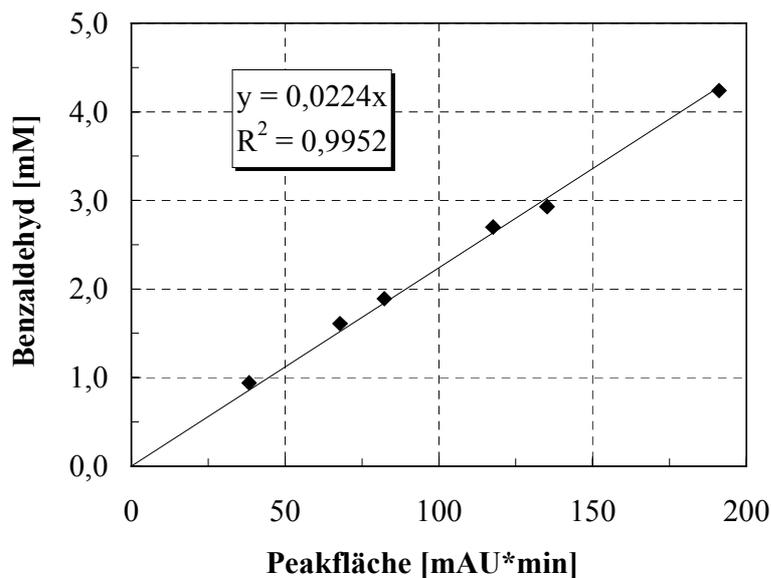
Da die Löslichkeit des Benzoin im wässrigen System äußerst gering ist, wurde das Benzoin zur Eichung in HPLC-Puffer (40 % CH<sub>3</sub>CN) gelöst (Abb. V-8 - Abb. V-10)



**Abb. V-8:** Eichgerade zur Quantifizierung von Benzoin mittels HPLC bei 250 nm. Injektion je 20  $\mu$ l.



**Abb. V-9:** Eichgerade zur Quantifizierung von Benzoin mittels HPLC bei 263 nm. Injektion je 20  $\mu$ l.



**Abb. V-10:** Eichgerade zur Quantifizierung von Benzaldehyd mittels HPLC bei 250 nm. Injektion je 5  $\mu$ l.

### 5.1.5.3 Chirale HPLC

Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des Benzoin erfolgte durch die HPLC an einer chiralen Säulenmatrix.

stationäre Phase	Chiralpack AD Säule
Elution	90 % n-Hexan; 10 % 2-Propanol
Flussrate	0,75 ml/min
Druck	21 bar
Temperatur	20 °C
Detektion	254 nm
Retentionszeit	(R)-Benzoin - 26,95 min

## 5.2 Synthese von (*R*)-2-Hydroxypropiophenon mit der wt-BALHis

### 5.2.1 Analytische Synthese des (*R*)-2-HPP ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd

Die Synthese von (*R*)-2-HPP ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd erfolgte mit wt-BALHis und den Muteinen in einer Glasflasche unter Rühren bei folgenden Bedingungen:

Reaktionstemperatur	30°C
Substrate	50 mM Benzaldehyd 500 mM Acetaldehyd
Reaktionspufferlösung	50 mM Kaliumphosphat (pH 7,0) 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1 mM ThDP
Katalysatorkonzentration	~0,05-0,1 µg/ml BALHis
Reaktionszeit	12 – 24 h
Reaktionsvolumen	1 – 2 ml

Die Produkte der Reaktion wurden mit GC-MS und chiraler HPLC analysiert.

### 5.2.2 Präparative Synthese ausgehend von Aldehyden

Die präparative Synthese des (*R*)-2-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionstemperatur	25 °C
Substrate	2 mmol Benzaldehyd 2 mmol Acetaldehyd,
Reaktionspufferlösung	20 % DMSO 80 % 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,0) 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> 0,15 mM ThDP
Reaktionsdauer	96 h

20 U der BALHis wurde eingesetzt. Nach jede 24 Stunden wurde die Reaktionsmischung mit zusätzlichen 20 U der BALHis und 4 mmol Acetaldehyd versetzt. Der Umsatz wurde mittels GC-MS zu 95 % ermittelt.

Die Synthese der 2-HPP-Derivaten sind analog der Synthese von 2-HPP mit Benzaldehydderivaten als Substraten (20-60 mM) innerhalb von 20 Stunden durchgeführt worden.

### 5.2.3 Aufreinigung von (*R*)-2-HPP

Die Reaktionsansätze wurden analog den Reaktionsansätzen für Benzoin behandelt (Kapitel V-5.1.4). Es wurde 285 mg (95 %) des (*R*)-2-HPP erhalten.

## 5.2.4 Analytische Daten des (*R*)-2-HPP

### 5.2.4.1 Chirale HPLC

stationäre Phase	Chiralpack AD Säule
Elution	90 % Isohexan; 10 % 2-Propanol
Flussrate	0,75 ml/min
Druck	21 bar
Temperatur	20 °C
Detektion	254 nm
Retentionszeit	15,78 min ( <i>R</i> )-2-HPP

In allen Reaktionsansätzen wurde nur (*R*)-HPP detektiert.

## VI. Literaturverzeichnis

- Adam, W., Diaz, M.T., Fell, R.T. and Saha-Moller, C.R. (1996) Kinetic Resolution of Racemic  $\alpha$ -Hydroxy Ketones by Lipase-catalyzed Irreversible Transesterification. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7, (8), 2207-2210.
- Adam, W., Fell, R.T., Hoch, U., Saha-Moller, C.R. and Schreier, P. (1995) Kinetic Resolution of Chiral  $\alpha$ -Hydroperoxy Esters by Horseradish Peroxidase-Catalyzed Enantioselective Reduction to  $\alpha$ -Hydroxy Esters. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6, (5), 1047-1050.
- Adam, W., Müller, M. and Prechtel, F. (1994) Dimethyldioxirane Oxidation of Titanium Enolates: Diastereoselektive  $\alpha$ -Hydroxylationen. *J. Org. Chem.*, 59, 2358-2364.
- Ahlers, J. and Arnold, A. (1982) *Enzymkinetik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York.
- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. and Jordan, F. (1996) Crystal Structure of the Thiamin Diphosphate-dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 256, (3), 590-600.
- Asakawa, T., Wada, H. and Yamano, T. (1968) Enzymatic Conversion of Phenylpyruvate to Phenylacetate. *Biochim. Biophys. Acta*, 170, 375-391.
- Barrowman, M.M. and Fewson, C.A. (1985) Phenylglyoxylate Decarboxylase and Phenylpyruvate Decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr. Microbiol.*, 12, 235-240.
- Barrowman, M.M., Harnett, W., Scott, A.J., Fewson, C.A. and Kusel, J.R. (1986) Immunological Comparison of Microbial TPP-dependent Non-oxidative  $\alpha$ -Keto Acid Decarboxylases. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34, 57-60.
- Bertger, F. (1983) *Wachstum von Mikroorganismen*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Beyer, H. and Walter, W. (1991) *Lehrbuch der Organischen Chemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved Silverstaining of Plant proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.

- Bommarius, A.S., Schwarm, M. and Drauz, K. (1998) Biocatalysis to Amino Acid-based Chiral Pharmaceuticals - Examples and Perspectives. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 5, (1-4), 1-11.
- Bornscheuer, U.T. and Pohl, M. (2001) Improved Biocatalysts by Directed Evolution and Rational Protein Design. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5, (2), 137-143.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Breslow, R. (1956) The Mechanism of Thiamine Action. *Chem. Ind.*, R28-R29.
- Breslow, R. (1958) On the Mechanism of Thiamine Action IV. Evidence from Studies on Model Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3719-3726.
- Breslow, R. and McNelis, E. (1959) Studies on Model Systems for Thiamine Action. Synthesis of Reactive Intermediates and Evidence on the Function of the Pyrimidine Ring. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 3080-3082.
- Bruhn, H., Pohl, M., Grotzinger, J. and Kula, M.-R. (1995) The Replacement of Trp392 by Alanine Influences the Decarboxylase/Carboligase Activity and Stability of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.*, 234, (2), 650-5.
- Chang, A.K., Nixon, P.F. and Duggleby, R.G. (1999) Aspartate-27 and Glutamate-473 are Involved in Catalysis by *Zymomonas mobilis* Pyruvate Decarboxylase. *Biochem. J.*, 339, (Pt 2), 255-260.
- Chenault, H.K., Simon, E.S. and Whitesides, G.M. (1988) *Biotechnol. Gen. Engin.*, 6, 221.
- Chenault, H.K. and Whitesides, G.M. (1987) Regeneration of Nicotinamide Cofactors for use in Organic Synthesis. *Appl. Biochem. Technol.*, 14, 147-197.
- Costacurta, A., Keijers, V. and Vanderleyden, J. (1994) Molecular Cloning and Sequence Analysis of an *Azospirillum brasiliense* Indole-3-pyruvate Decarboxylase. *Mol. Gen. Genet.*, 243, 463-472.
- Crout, D.H.G., Littlechild, J. and Morrey, S.M. (1986) Acetoin Metabolism: Stereochemistry of the Acetoin Produced by the Pyruvate Decarboxylase of Wheat Germ and by the  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase of *Klebsiella aergenes*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 105-108.

- Csuk, R. and Glänzer, B.I. (1991) Baker's Yeast Mediated Transformations in Organic Chemistry. *Chem. Rev.*, 91, 49-91.
- Demir, A.S., Dunnwald, T., Iding, H., Pohl, M. and Müller, M. (1999) Asymmetric Benzoin Reaction Catalyzed by Benzoylformate Decarboxylase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, (24), 4769-4774.
- Demir, A.S., Hamamci, H., Tanyeli, C., Akhmedov, I.M. and Doganel, F. (1998) Synthesis and *Rhizopus oryzae* Mediated Enantioselective Hydrolysis of  $\alpha$ -Acetoxy Aryl Alkyl Ketones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 9, (10), 1673-1677.
- Demir, A.S., Pohl, M., Janzen, E. and Müller, M. (2001) Enantioselective Synthesis of Hydroxy Ketones Through Cleavage and Formation of Acyloin Linkage. Enzymatic Kinetic Resolution via C-C bond cleavage. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 633-635.
- Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. and Lu, G. (1998) High Resolution Crystal Structure of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for Substrate Activation in Pyruvate Decarboxylases. *J. Biol. Chem.*, 273, (32), 20196-20204.
- Drauz, K. and Waldmann, H. (1995) Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook. VCH, Weinheim.
- Dünwald, T. and Müller, M. (2000) Stereoselective Formation of Bis( $\alpha$ -Hydroxy Ketones) via Enzymatic Carbonylation. *J. Org. Chem.*, 65, (25), 8608-12.
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. and Jordan, F. (1993) Catalytic Centers in the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase at 2.4-Å Resolution. *Biochemistry*, 32, (24), 6165-6170.
- Effenberger, F. (1994) Synthese und Reaktionen optisch aktiver Cyanhydrine. *Angew. Chem.*, 106, 1609-1619.
- Effenberger, F., Null, V. and Ziegler, T. (1992) Preparation of Optically Pure L-2-hydroxyaldehydes with Yeast Transketolase. *Tetrahedron Letters*, 33, (36), 5157-5160.
- Faber, K. (1997) Biotransformations in Organic Chemistry. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Faber, K. and Patel, R. (2000) Chemical biotechnology. A Happy Marriage between Chemistry and Biotechnology: Asymmetric Synthesis via Green Chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, (6), 517-519.

- Fagain, C.O. (1995) Understanding and Increasing Protein Stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1252, (1), 1-14.
- Fieschko, J.C. (1989) Fermentation Technology Using Recombinant Microorganisms. In: *Biotechnology*. Rehm, H.J. and Reed, G. (eds.), VCH, Weinheim, Vol. 7b, 117-140.
- Förster, S., Ross, J., Effenberger, F., Wajant, H. and Sprauer, A. (1996) Über die erste rekombinante Hydroxynitril-Lyase und ihre Anwendung in der Synthese von (*S*)-Cyanhydrinen. *Angew. Chem.*, 108, 493-494.
- Fox, M.A. and Whitesell, J.K. (1995) *Organische Chemie: Grundlagen, Mechanismen, Bioorganische Anwendungen*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg Berlin Oxford.
- Friedemann, R. and Neef, H. (1998) Theoretical Studies on the Electronic and Energetic Properties of the Aminopyridine Part of Thiamin Diphosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385, 245-250.
- Fuganti, C. and Grasselli, P. (1982) Synthesis of the C<sub>14</sub> Chromanyl Moiety of Natural  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (4), 205-206.
- Funganti, C., Grasselli, P., Poli, G., Servi, S. and Zorzella, A. (1988) Decarboxylative Incorporation of  $\alpha$ -Oxobutyrate and  $\alpha$ -Oxovalerate into (*R*)- $\alpha$ -Hydroxyethyl- and *n*-Propyl Ketones on Reaction with Aromatic and  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated Aldehydes in Baker's Yeast. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1619-1621.
- Gais, H.J. and Hemmerle, H. (1990) Asymmetrische Synthese mit Enzymen. *Chemie in unserer Zeit*, 239-248.
- Gala, D., Di Benedetto, D.J., Clark, J.E., Murphy, B.L., Schumacher, D.P. and Steinman, M. (1996) Preparations of Antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative Chromatographic Resolution and Total Asymmetric Synthesis via Enzymatic Preparation of Chiral  $\alpha$ -Hydroxy Arylketones. *Tetrahedron Letters*, 37, (5), 611-614.
- Gonzalez, B. and Vicuna, R. (1989) Benzaldehyde Lyase, a Novel Thiamine PPi-requiring Enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *J. Bacteriol.*, 171, (5), 2401-2405.
- Greiner, L. (1999) Reaktionstechnik der Benzoylformiatdecarboxylase. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

- Guo, F., Zhang, D., Kahyaoglu, A., Farid, R.S. and Jordan, F. (1998) Is a Hydrophobic Amino Acid Required to Maintain the Reactive V conformation of Thiamin at the active Center of Thiamin Diphosphate-requiring Enzymes? Experimental and Computational Studies of Isoleucine 415 of Yeast Pyruvate Decarboxylase. *Biochemistry*, 37, (38), 13379-91.
- Guo, Z., Goswami, A., Mirfakhrae, K.D. and Patel, R.N. (1999) Asymmetric Acyloin Condensation Catalyzed by Phenylpyruvate Decarboxylase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, (24), 4667-4675.
- Guo, Z., Goswami, A., Nanduri, V.B. and Patel, R.N. (2001) Asymmetric Acyloin Condensation Catalysed by Phenylpyruvate Decarboxylase. Part 2: Substrate Specificity and Purification of the Enzyme. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, (4), 571-577.
- Hanahan, D. (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, (4), 557-580.
- Hashimoto, S. and Ozaki, A. (1999) Whole Microbial Cell Processes for Manufacturing Amino Acids, Vitamins or Ribonucleotides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, (6), 604-608.
- Hashiyama, T., Morikawa, K. and Sharpless, K.B. (1992)  $\alpha$ -Hydroxy Ketones in High Enantiomeric Purity from Asymmetric Dihydroxylation of Enol Ethers. *J. Org. Chem.*, 57, 5067-5068.
- Hasson, M.S., Muscate, A., McLeish, M.J., Polovnikova, L.S., Gerlt, J.A., Kenyon, G.L., Petsko, G.A. and Ringe, D. (1998) The Crystal Structure of Benzoylformate Decarboxylase at 1.6 Å Resolution: Diversity of Catalytic Residues in Thiamin Diphosphate-dependent Enzymes. *Biochemistry*, 37, (28), 9918-9930.
- Hawkins, C.F., Borges, A. and Perham, R.N. (1989) A Common Structural Motif in Thiamin Pyrophosphate-binding Enzymes. *FEBS Lett.*, 255, (1), 77-82.
- Hecquet, L., Bolte, J. and Demuynck, C. (1996) Enzymatic Synthesis of "Natural-labeled" 6-deoxy-L-sorbose Precursor of an Important Food Flavor. *Tetrahedron*, 52, (24), 8223-8232.
- Hegeman, G.D. (1966a) Synthesis of the Enzymes of the Mandelate Pathway by *Pseudomonas putida* I. Synthesis of the Enzymes by the Wild Type. *J. Bacteriol.*, 91, 1140-1154.

- Hegeman, G.D. (1966b) Synthesis of the Enzymes of the Mandelate Pathway by *Pseudomonas putida* III. Isolation and Properties of Constitutive mutants. J. Bacteriol., 91, 1161-1167.
- Hegeman, G.D. (1970) Benzoylformiate decarboxylase (*Pseudomonas putida*). In: Methods in Enzymology Academic Pr., New York, NY, Vol. 17, 674-678.
- Hildebrandt, G. and Klavehn, W. (1932) Verfahren zu Herstellung von 1-phenyl-2-methylaminopropan-1-ol. Deutsches Reichspatent Nr. 548 459
- Hinrichsen, P., Gomez, I. and Vicuna, R. (1993) *Pseudomonas fluorescens* biovar I benzaldehyde lyase (bznB) gene, complete cds. Direct Submission. U04048
- Hinrichsen, P., Gomez, I. and Vicuna, R. (1994) Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Benzaldehyde Lyase from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. Gene, 144, (1), 137-138.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction. Gene, 77, (1), 51-59.
- Hochuli, E. and Döbli, H. (1992) Europäische Patentschrift EP 0253 303 B1
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Engineering Hybrid Genes without the use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension. Gene, 77, (1), 61-68.
- Hummel, W. and Kula, M.-R. (1989) Simple Method for Small Scale Disruption of Bacteria and Yeast. J. Microbiol. Meth., 9, 209-210.
- Iding, H. (1998) Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas fluorescens*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Iding, H., Dünwald, T., Greiner, L., Liese, A., Müller, M., Siegert, P., Grotzinger, J., Demir, A.S. and Pohl, M. (2000) Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida* as Stable Catalyst for the Synthesis of Chiral 2-hydroxy Ketones. Chemistry, 6, (8), 1483-95.
- Iding, H., Siegert, P., Mesch, K. and Pohl, M. (1998) Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations. Biochim Biophys Acta, 1385, (2), 307-22.
- IUBMB. (1992) Enzyme Nomenclature. Academic Press, New York.

- Janzen, E. and Pohl, M. (2000) *Pseudomonas fluorescens* biovar I benzaldehyde lyase (bznB) gene, complete cds. Direct Submission. AY007242
- Johnson, C.R. and Wells, G.W. (1998) Organic Synthesis Using Biocatalytically Generated Intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2, (1), 70-6.
- Jones, J.B. (1986) Enzymes in Organic Synthesis. *Tetrahedron*, 42, (13), 3351-3403.
- Takeya, H., Morishita, M., Koshino, H., Morita, T.-i., Kobayashi, K. and Osada, H. (1999) Cytoxazone: A Novel Cytokine Modulator Containing a 2-Oxazolidinone Ring Produced by *Streptomyces sp.* *J. Org. Chem.*, 64, (3), 1052 -1053.
- Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. and Hübner, G. (1997) How Thiamin Diphosphate Is Activated in Enzymes. *Science*, 275, (5296), 67-70.
- Killenberg-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S. and Hubner, G. (1997) Role of Glu51 for Cofactor Binding and Catalytic Activity in Pyruvate Decarboxylase from Yeast Studied by Site-directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 36, (7), 1900-1905.
- Kluger, R. (1987) Thiamin Diphosphate: A Mechanistic Update on Enzymic and Nonenzymic Catalysis of Decarboxylation. *Chem. Rev.*, 87, 863-876.
- Knight, R.L. and Leeper, F.J. (1998) Comparison of Chiral Thiazolium and Thiazolium Salts as Asymmetric Catalysts for the Benzoin Kondensation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1891-1893.
- Knorre, W.A., Deckwer, W.-D., Korz, D., Pohl, H.-D., Riesenber, D., Roß, A., Sanders, E. and Schultz, V. (1990) Hochzelldichte-Fermentation von *E.coli* für rDNA-Produkte. *BioEng*, 5, 28-33.
- Kobori, Y., Myles, D.C. and Whiteside, G.M. (1992) Substrate Specificity and Carbohydrate Synthesis Using Transketolase. *J. Org. Chem.*, 57, 5899-5907.
- Koike, T., Murata, K. and Ikariya, T. (2000) Stereoselective Synthesis of Optically active  $\alpha$ -hydroxy Ketones and Anti-1,2-diols via Asymmetric Transfer Hydrogenation of Unsymmetrically Substituted 1,2-diketones. *Org. Lett.*, 2, (24), 3833-3836.
- Krix, G., Bommarius, A.S., Drauz, K., Kottenhahn, M., Schwarm, M. and Kula, M.-R. (1997) Enzymatic Reduction of  $\alpha$ -Keto Acids Leading to L-amino Acids, D- or L-hydroxy Acids. *J. Biotechnol.*, 53, (1), 29-39.

- Kuebrich, J.P., Schowen, R.L., Wang, M. and Lupes, M.E. (1971) The Mechanism of the Benzoin Condensation. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 1214-1223.
- Kula, M.-R. (1994) Enzyme Catalysed Reactions of Carbonyl Groups. In: *Proc. Chiral Europe 1994 Symp. Spring innovations*, Stockport, UK, 27-33.
- Kula, M.-R. and Wandrey, C. (1987) Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane-Reactor with Simultaneous NADH Regeneration. *Meth. Enzymol.*, 136, 9-21.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Lehninger, A.L. (1987) *Biochemie*. VCH, Weinheim.
- Liese, A. and Filho, M.V. (1999) Production of Fine chemicals Using Biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, (6), 595-603.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. and Sundstrom, M. (1992) Three-dimensional Structure of Transketolase, a Thiamine Diphosphate Dependent Enzyme, at 2.5 Å Resolution. *Embo J.*, 11, (7), 2373-9.
- Littelchild, J. and Turner, N. (1995) Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Data with *Escherichia coli* Transketolase. *Acta Crystallogr.*, D51, 1074-1076.
- Lobell, M. and Crout, D.H.G. (1996) Pyruvate Decarboxylase: A Molecular Modeling Study of Pyruvate Decarboxylation and Acyloin Formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, (8), 1867-1873.
- Morazzoni, P. and Bombardelli, E. (1995) *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*, 66, (1), 3-42.
- Mülhardt, C. (1999) *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena Lübeck Ulm.
- Müller, Y.A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G.E., Jordan, F. and Schneider, G. (1993) A Thiamin Diphosphate Binding Fold Revealed by Comparison of the Crystal Structure of Transketolase, Pyruvat oxidase and Pyruvate decarboxylase. *Structure*, 1, 95-103.
- Müller, Y.A., Schumacher, G., Rudolph, R. and Schulz, G.E. (1994) The Refined Structures of a Stabilized Mutant and of Wild-type Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Mol. Biol.*, 237, (3), 315-35.

- Myles, D.C., Andrulis III, P.J. and Whitesides, G.M. (1991) A transketolase-based Synthesis of (+)-Exo-brevicomin. *Tetrahedron Letters*, 32, (37), 4835-4838.
- Nakamura, K., Kondo, S.-i., Kawai, Y., Hida, K., Kitano, K. and Ohno, A. (1996) Enantio- and Regioselective Reduction of  $\alpha$ -Diketones by Baker's Yeast. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7, (2), 409-412.
- Neuberg, C. and Hirsch, J. (1921) Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase). *Biochem. Zeitschr.*, 115, 282-310.
- Nikkola, M., Lindqvist, Y. and Schneider, G. (1994) Refined Structure of Transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 238, (3), 387-404.
- Ogawa, J. and Shimizu, S. (1999) Microbial Enzymes: New Industrial Applications from Traditional Screening Methods. *Trends Biotechnol.*, 17, (1), 13-20.
- Oh, K.J., Park, E.J., Yoon, M.Y., Han, T.R. and Choi, J.D. (2001) Roles of Histidine Residues in Tobacco Acetolactate Synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, (5), 1237-43.
- Pace, C.N., Shirley, B.A. and Thomson, J.A. (1989). In: *Protein Structure: A Practical Approach I*. Creighton, T.E. (ed.) RL Press, Oxford New York Tokio, 311-330.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G. and Guddat, G.L.W. (2002) Crystal Structure of Yeast Acetohydroxyacid Synthase: A Target for Herbicidal Inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 317, (2), 249-262.
- Petersen, M. (1999) Chemical Biotechnology: Industrial Applications and Recent Advances. Invited overview. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, (6), 593-594.
- Pohl, M. (1997) Protein Design on Pyruvate Decarboxylase (PDC) by Site-directed Mutagenesis. Application to Mechanistical Investigations, and Tailoring PDC for the Use in Organic Synthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 58, 15-43.
- Pohl, M., Grotzinger, J., Wollmer, A. and Kula, M.-R. (1994) Reversible Dissociation and Unfolding of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.*, 224, (2), 651-661.
- Polovnikova, L.S., McLeisch, M.J., Sergienko, E.A., Burgner, J.T., Anderson, N.L., Jordan, F., Kenyon, G.L. and Hasson, M.S. (2002) Roles of Active Site Residues in the Catalytic Mechanism of a Thiamin Diphosphate-dependent Enzyme, Benzoylformate Decarboxylase. in *Biochemistry eingereicht*.

- Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayré, S.B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F. and Huisman, G.W. (2001) Gerichtete Evolution und Biokatalyse. *Angew. Chem.*, 113, (21), 4068-4080.
- Prosen, E. and Ward, O.P. (1994) Optimisation of Reaction Conditions for Production of *S*-(-)-2-hydroxypropiofenone by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Ind. Microbiol.*, 13, 287-291.
- Riesenberg, D. (1991) High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2, (3), 380-384.
- Robinson, B.H. and Chun, K. (1993) The Relationships Between Transketolase, Yeast Pyruvate Decarboxylase and Pyruvate Dehydrogenase of the Pyruvate Dehydrogenase Complex. *FEBS Lett.*, 328, (1-2), 99-102.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour New York.
- Schellenberger, A. (1998) Sixty Years of Thiamin Diphosphate Biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385, (2), 177-186.
- Schenk, G., Duggleby, R.G. and Nixon, P.F. (1998) Properties and Functions of the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Transketolase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30, (12), 1297-318.
- Schenk, G., Leeper, F.J., England, R., Nixon, P.F. and Duggleby, R.G. (1997) The role of His113 and His114 in Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.*, 248, (1), 63-71.
- Schloss, J.V. (1984) *Chemistry and Plant Production: Herbicides Inhibiting Branched Chain Amino Acids Biosynthesis - Recent Developments*. Springer-Verlag, Berlin.
- Schneider, G. and Lindqvist, Y. (1998) Crystallography and Mutagenesis of Transketolase: Mechanistic Implications for Enzymatic Thiamin Catalysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385, (2), 387-98.
- Schomburg, D. and Stephan, D. (eds.) (1997) *Enzyme Handbook 13*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Schorcken, U. and Sprenger, G.A. (1998) Thiamin-dependent Enzymes as Catalysts in Chemoenzymatic Synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385, (2), 229-43.

- Schulze, B. and Wubbolts, M.G. (1999) Biocatalysis for Industrial Production of Fine Chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, (6), 609-15.
- Seki, M. and Mori, K. (1999) Synthesis of (-)-Cytoxazone, a Novel Cytokine Modulator Isolated from *Streptomyces sp.* *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, (11), 2965-2967.
- Sergienko, E.A. and Jordan, F. (2001) Catalytic Acid-base Groups in Yeast Pyruvate Decarboxylase. 3. A steady-state Kinetic Model Consistent with the Behavior of Both Wild-type and Variant Enzymes at all Relevant pH Values. *Biochemistry*, 40, (25), 7382-7403.
- Sharp, P.M., Cowe, E., Higgins, D.G., Shields, D.C., Wolfe, K.H. and Wright, F. (1988) Codon Usage Patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a Review of the Considerable within- Species Diversity. *Nucleic Acids Res.*, 16, (17), 8207-8211.
- Shin, H.S. and Rogers, P.L. (1995) Biotransformation of Benzaldehyde to L L-Phenylacetylcarbinol, an Intermediate in L L-ephedrine Production by Immobilized *Candida utilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 7-14.
- Shin, W., Pletcher, J., Blank, G. and Sax, M. (1977) Ring Stacking Interactions Between Thiamin and Planar Molecules as Seen in the Crystal Structure of a Picrolonate Dihydrate Complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 674-683.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) Terminal-sequence Analysis of Bacterial Ribosomal RNA. Correlation Between the 3'-terminal-Polypyrimidine Sequence of 16-S RNA and Translational Specificity of the Ribosome. *Eur. J. Biochem.*, 57, (1), 221-230.
- Siegert, P. (2000) Vergleichende Charakterisierung der Decarboxylase- und Carboligasereaktion der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* und der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* mittels gerichteter Mutagenese. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Sprenger, G., Schorken, U., Sprenger, G. and Sahn, H. (1995) Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: Cloning of its Gene, talB, and Characterization of the Enzyme from Recombinant Strains. *J. Bacteriol.*, 177, (20), 5930-5936.
- Sprenger, G.A. and Pohl, M. (1999) Synthetic Potential of Thiamin Diphosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 6, (3), 145-159.
- Sprenger, G.A., Schorken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A.A., Taylor, S.V., Begley, T.P., Bringer-Meyer, S. and Sahn, H. (1997) Identification of a Thiamin-

- dependent Synthase in *Escherichia coli* Required for the Formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate Precursor to Isoprenoids, Thiamin, and Pyridoxol. Proc. Natl. Acad. Sci., 94, (24), 12857-62.
- Stader, J. (1995) Gene Expression in Recombinant *E.coli*. In: Gene Expression in Recombinant Mikroorganismen. Smith, A. (ed.) Marcel Dekker Inc, New York, 1-51.
- Stanier, R.Y. and Ornston, L.N. (1973) The  $\beta$ -ketoacid pathway. Adv. Microb. Physiol., 9, 89-151.
- Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A. and Lewis, K. (2000) Synergy in a Medicinal Plant: Antimicrobial Action of Berberine Potentiated by 5'-methoxyhydroripin, a Multidrug Pump Inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci., 97, (4), 1433-1437.
- Stetter, H., Rämisch, Y. and Kuhlmann, H. (1976) Über die präparative Nutzung der Thiazoliumsalzkatalysierten Acyloin und Benzoin-Bildung. I. Herstellung von einfachen Acyloinen und Benzoinen. Synthesis, 733-735.
- Strauss, U.T., Felber, U. and Faber, K. (1999) Biocatalytic Transformation of Racemates into Chiral Building Blocks in 100% Chemical yield and 100% Enantiomeric excess. Tetrahedron: Asymmetry, 10, (1), 107-117.
- Theil, F. (1997) Enzyme in der organischen Synthese. Akademischer Verlag Spektrum, Heidelberg Berlin Oxford.
- Thein, S.L. and Wallace, R.B. (1988) The Use of Synthetic Oligonucleotides as Specific Hybridization Probes in the Diagnosis of Genetic Disorders. In: Human Genetic Diseases: A Practical Approach. Davis, K.E. (ed.) IRL Press, Hemdon, Virginia.
- Tripathi, C.K., Agarwal, S.C., Bihari, V., Joshi, A.K. and Basu, S.K. (1997) Production of L-phenylacetylcarbinol by Free and Immobilized Yeast Cells. Indian J. Exp. Biol., 35, (8), 886-9.
- Tsou, A.Y., Ransom, S.C., Gerlt, J.A., Buechter, D.D., Babbitt, P.C. and Kenyon, G.L. (1990) Mandelate Pathway of *Pseudomonas putida*: Sequence Relationships Involving mandelate Racemase, (S)-mandelate Dehydrogenase, and Benzoylformate Decarboxylase and Expression of Benzoylformate Decarboxylase in *Escherichia coli*. Biochemistry, 29, (42), 9856-62.
- Ward, O.P. and Singh, A. (2000) Enzymatic Asymmetric Synthesis by Decarboxylases. Curr. Opin. Biotechnol., 11, (6), 520-526.

- Weiss, P.M., Garcia, G.A., Kenyon, G.L., Cleland, W.W. and Cook, P.F. (1988) Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using  $^{13}\text{C}$  and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry*, 27, (6), 2197-205.
- Westermeier, R. (1990) *Elektrophoresepraktikum*. VCH, Weinheim.
- Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Nikkola, M., Lindqvist, Y., Sundstrom, M. and Schneider, G. (1994) Analysis of an Invariant Cofactor - Protein Interaction in Thiamin Diphosphate-dependent Enzymes by Site-directed Mutagenesis. Glutamic Acid 418 in Transketolase is Essential for Catalysis. *J. Biol. Chem.*, 269, (51), 32144-32150.
- Wikner, C., Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y. and Schneider, G. (1997) Identification of Catalytically Important Residues in Yeast Transketolase. *Biochemistry*, 36, (50), 15643-15649.
- Wilcocks, R. and Ward, O.P. (1992) Factors Affecting 2-hydroxypropiophenone Formation by Benzoylformate Decarboxylases from *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 1058-1063.
- Wilcocks, R., Ward, O.P., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y. and Prosen, E. (1992) Acyloin Formation by Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, (5), 1699-1704.
- Wong, C.H. and Whitesides, G.M. (1995) *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*.
- Wu, Y.G., Chang, A.K., Nixon, P.F., Li, W. and Duggleby, R.G. (2000) Mutagenesis at Asp27 of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Effect on its Ability to Form Acetoin and Acetolactate. *Eur. J. Biochem.*, 267, (21), 6493-6500.
- Yanase, H., Okuda, M., Kita, K., Sato, Y., Shibata, K., Sakai, Y. and Kato, N. (1995) Enzymatic preparation of [1, 3- $^{13}\text{C}$ ]Dihydroxyacetone Phosphate from [ $^{13}\text{C}$ ]Methanol and Hydroxypyruvate Using the Methanol-assimilating System of Methylophilic Yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, (2), 228-234.

## VII. Anhang

### 7.1 Codon Usage in *Escherichia coli* K12

*Escherichia coli* K12 [gbbet]: 4290 CDS's (1363404 codons)

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

---

UUU 22.3 ( 30407)	UCU 8.5 ( 11523)	UAU 16.2 ( 22050)	UGU 5.2 ( 7063)
UUC 16.6 ( 22582)	UCC 8.6 ( 11771)	UAC 12.2 ( 16671)	UGC 6.5 ( 8849)
UUA 13.9 ( 18943)	UCA 7.2 ( 9793)	UAA 2.0 ( 2707)	UGA 0.9 ( 1260)
UUG 13.7 ( 18629)	UCG 8.9 ( 12195)	UAG 0.2 ( 326)	UGG 15.2 ( 20756)
CUU 11.0 ( 15019)	CCU 7.0 ( 9572)	CAU 12.9 ( 17631)	CGU 20.9 ( 28471)
CUC 11.1 ( 15105)	CCC 5.5 ( 7491)	CAC 9.7 ( 13275)	CGC 22.0 ( 29970)
CUA 3.9 ( 5316)	CCA 8.4 ( 11497)	CAA 15.3 ( 20913)	CGA 3.6 ( 4860)
CUG 52.6 ( 71716)	CCG 23.2 ( 31617)	CAG 28.8 ( 39288)	CGG 5.4 ( 7404)
AUU 30.3 ( 41375)	ACU 9.0 ( 12228)	AAU 17.7 ( 24189)	AGU 8.8 ( 11982)
AUC 25.1 ( 34264)	ACC 23.4 ( 31891)	AAC 21.7 ( 29534)	AGC 16.1 ( 21908)
AUA 4.4 ( 5967)	ACA 7.1 ( 9684)	AAA 33.6 ( 45821)	AGA 2.1 ( 2899)
AUG 27.9 ( 37995)	ACG 14.4 ( 19682)	AAG 10.3 ( 14080)	AGG 1.2 ( 1694)
GUU 18.3 ( 24916)	GCU 15.3 ( 20811)	GAU 32.1 ( 43817)	GGU 24.7 ( 33738)
GUC 15.3 ( 20800)	GCC 25.5 ( 34770)	GAC 19.1 ( 25999)	GGC 29.6 ( 40400)
GUA 10.9 ( 14855)	GCA 20.1 ( 27470)	GAA 39.4 ( 53783)	GGA 8.0 ( 10902)
GUG 26.4 ( 35983)	GCG 33.6 ( 45866)	GAG 17.8 ( 24313)	GGG 11.1 ( 15118)

---

Coding GC 51.83% 1st letter GC 58.87% 2nd letter GC 40.72% 3rd letter GC 55.89%

Stand: Mai 2002 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>)

## 7.2 DNA- und Proteinsequenz der BALHis

1        **atggcgatgattacagggcggaactggttgttcgcaccctaataaaggctggggtcgaa**  
M A M I T G G E L V V R T L I K A G V E

61        catctgttcggcctgcacggcgcatatcgatacgatttttcaagcctgtctcgatcat  
H L F G L H G A H I D T I F Q A C L D H

121       gatgtgccgatcatcgacacccgccatgaggccgccgagggcatgcgccgagggctat  
D V P I I D T R H E A A A G H A A E G Y

181       gcccgcgctggcgccaagctgggcgtggcgctgggtcacggcggggcggggattaccaat  
A R A G A K L G V A **L V T A G G G F T N**

241       gcggtcacgcccattgccaacgcttggctggatcgacgcccgggtgctcttcctcaccgga  
**A V T P I A N A W L D R T P V L F L T G**

301       tcgggcgctgctgctgatgatgaaaccaacacgcttgacggcggggattgatcaggtcgcc  
S G A L R D D E T N T L Q A G I D Q V A

361       atggcggcgcccattaccaaagggcgcatcgggtgatggcaaccgagcatatcccacgg  
M A A P I T K W A H R V M A T E H I P R

421       ctggtgatgcaggcgatccgcgccgcttgagcgcgccacgcgggcccgggtgttgctggat  
L V M Q A I R A A L S A P R G P V L L D

481       ctgccgtgggatattctgatgaaccagattgatgaggatagcgtcattatccccgatctg  
L P W D I L M N Q I D E D S V I I P D L

541       gtcttgtccgcgcatggggccagaccgaccctgccgatctggatcaggctctcgcgctt  
V L S A H G A R P D P A D L D Q A L A L

601       ttgcgcaaggcggagcggccgggtcatcgtgctcggctcagaagcctcgcggaacagcgcg  
L R K A E R P V I V L G S E A S R T A R

661       aagacggcgcttagcgccttctggtggcgactggcgtgccgggtgtttgccgattatgaa  
K T A L S A F V A A T G V P V F A D Y E

721       gggctaagcatgctctcggggctgcccgatgctatgcggggcgggctggtgcaaacctc  
G L S M L S G L P D A M R G G L V Q N L

781       tattcttttgccaaagccgatgccgcgccagatctcgtgctgatgctgggggcgcttt  
Y S F A K A D A A P D L V L M L G A R F

841       ggcttaacaccgggcatggatctgggcagttgatccccatagcgcgcaggtcattcag  
G L N T G H G S G Q L I P H S A Q V I Q

901       gtcgaccctgatgctgagctgggacgcctgcagggcatcgtctgggcattgtggcc  
V D P D A C E L G R L Q G I A L G I V A

961       gatgtgggtgggaccatcgaggcttggcgcagggcaccgcgcaagatgcggttggccg  
D V G G T I E A L A Q A T A Q D A A W P

1021      gatcgcggcgactggtgcgccaaagtgacggatctggcgcaagagcgtatgccagcatc  
D R G D W C A K V T D L A Q E R Y A S I

```

1081   gctgcgaaatcgagcagcgcgagcatgcgctccaccctttcacgcctcgcagggtcattgcc
      A A K S S S E H A L H P F H A S Q V I A
1141   aaacacgtcgatgcaggggtgacgggtgtagcggatggtgcgctgacctatctctggctg
      K H V D A G V T V V A D G A L T Y L W L
1201   tccgaagtgatgagccgcgtgaaacccggcggttttctctgccacggctatctaggctcg
      S E V M S R V K P G G F L C H G Y L G S
1261   atgggcgtgggcttcggcacggcgctgggcgcgcaagtggccgatcttgaagcaggccgc
      M G V G F G T A L G A Q V A D L E A G R
1321   cgcacgatccttgtgaccggcgatggctcgggtgggctatagcatcgggtgaatttgatcgc
      R T I L V T G D G S V G Y S I G E F D T
1381   ctggtgcgcaaacaattgccgctgatcgatcatcatcatgaacaaccaagctggggggcg
      L V R K Q L P L I V I I M N N Q S W G A
1441   acattgcatttccagcaattggccgctcgcccccaatcgcgtagcgggcacccgtttgaa
      T L H F Q Q L A V G P N R V T G T R L E
1501   aatggctcctatcacggggtggccgcgcctttggcgcgatggctatcatgtcgacagt
      N G S Y H G V A A A F G A D G Y H V D S
1561   gtggagagcttttctgcggctctggcccaagcgctcgcccataatcgccccgcctgcatc
      V E S F S A A L A Q A L A H N R P A C I
1621   aatgtcgcggtcgcgctcgatccgatccgcccgaagaactcattctgatcggcatggac
      N V A V A L D P I P P E E L I L I G M D
1681   cccttcggatctcatcaccatcaccatcactaa
      P F G S H H H H H H stop

```

### Farbcode:

**Rot** ist As-Sequenz markiert, die sich von der in der EMBL veröffentlichten As-Sequenz unterscheidet (siehe Kapitel 3-2-2).

**Grün** sind Aminosäuren markiert, die infolge des für die Klonierung des BAL-Gens benötigten Nukleotidenaustausches entstanden sind.

### 7.3 MALDI-TOF-MS

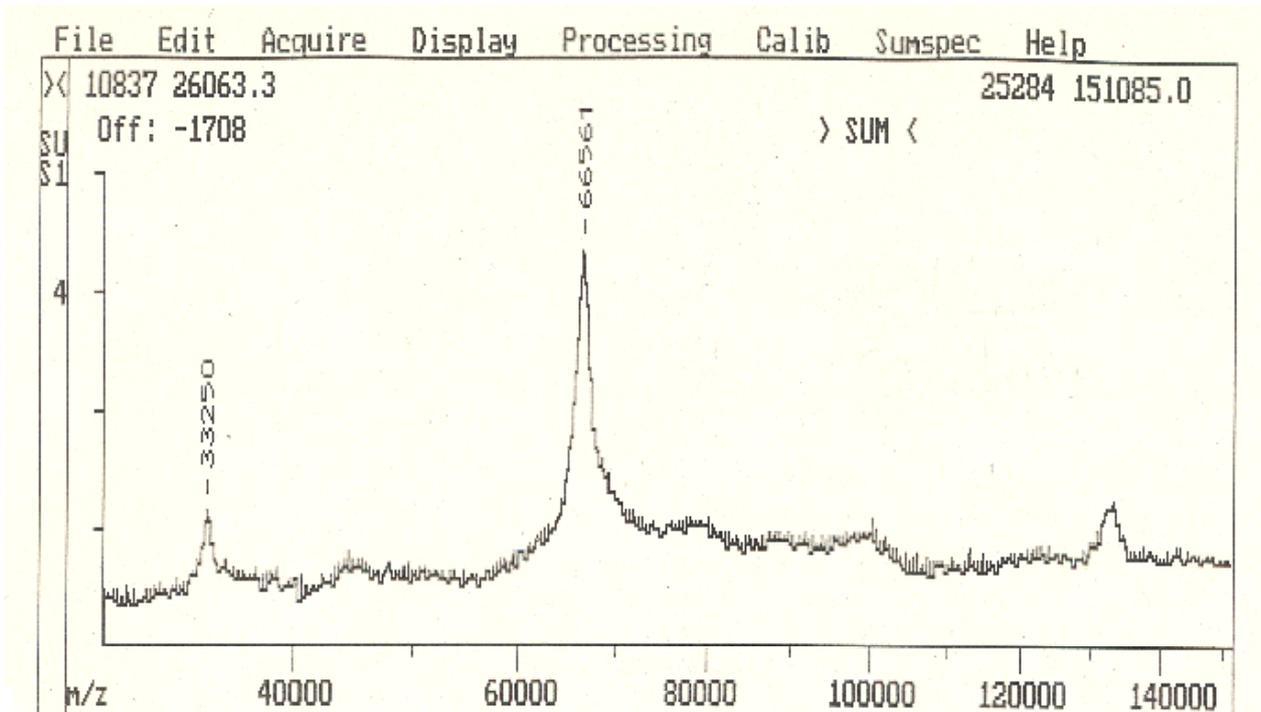


Abb. VII-1: MS-Kalibrierung: Massenspektrum des BSA.

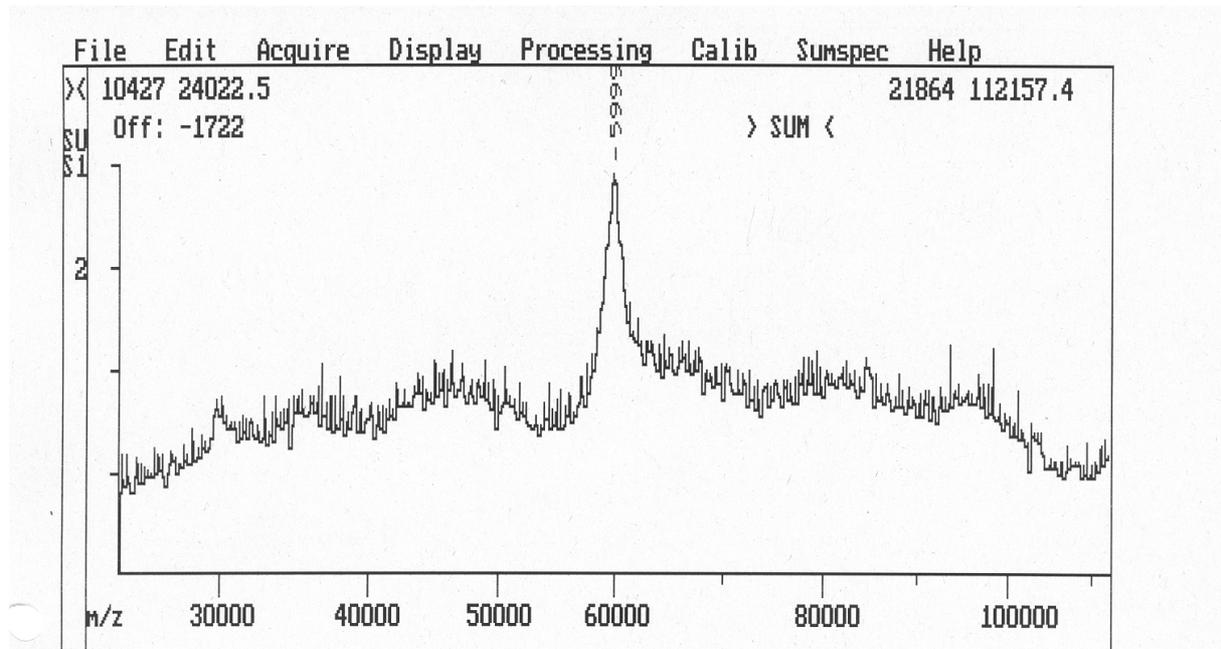


Abb. VII-2: Massenspektrum der BALHis mittels MALDI-TOF-Analysator.

## Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Enzymtechnologie durchführen zu können, für die sehr guten Arbeitsbedingungen an ihrem Institut und für die Übernahme des Hauptreferates bedanken.

Frau Priv.-Doz. Dr. Martina Pohl danke ich für die interessante Themenstellung, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihre konstruktiven Anregungen und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Hanns Weiss, Institut für Biochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Herrn Dr. Michael Müller, Herrn Dr. Ayhan Demir, Frau Dr. Doris Kolter, IBT-2 Forschungszentrum Jülich, bin ich zu Dank verpflichtet für eine sehr freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit.

Frau Dr. Bettina Lingen danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und konstruktive Anregungen.

Für die wertvollen Ratschläge bei der molekularbiologischen Arbeiten möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Verseck und Frau Dr. Heike Slusarczyk bedanken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Enzymtechnologie möchte ich für die Hilfsbereitschaft und freundschaftliches Arbeitsklima danken, vor allem Dr. Petra Heim, Dr. Peter Iwan, Dr. Hans Iding, Dr. Petra Siegert, Dipl.-Biol. Sebastian Neumann, Dipl.-Biol. Kofi Abokitse, Dipl.-Biol. Birgit Geueke, Dipl.-Chem. Andrea Weckbecker.

Insbesondere danke ich meinen Bürokollegen Dipl.-Chem. Lutz Krieg, Dr. Steffen Oßwald, Dr. Arne Matzen und Dr. Ansgar Sandgathe, für eine ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre in Büro 404, für ihre fachliche und menschliche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch der Konrad-Adenauer-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertationsarbeit im Rahmen eines Stipendiums.

...und nicht zuletzt danke ich natürlich meinen Eltern und meiner Familie, die mich die ganze Zeit über in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.