fin HEINRICH HEINE JNIVERSITÄT DÜSSELDORF

# Screening, biochemische Charakterisierung und Strukturaufklärung mikrobieller Threonin-Aldolasen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nina Dückers aus Nettetal

Düsseldorf, August 2011

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel Korreferent: Prof. Dr. Manfred Braun

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter Leitung von Prof. Dr. Werner Hummel in der Zeit von September 2008 bis August 2011 erstellt.

für Sergio und Amelie

Teile der Arbeit sind bereits veröffentlicht:

N. Dückers, K. Baer, S. Simon, H. Gröger, W. Hummel, "Threonine aldolases - screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 409-424.

K. Baer, N. Dückers, W. Hummel, H. Gröger, "Expanding the Application Range of Aldolases: Novel Asymmetric Syntheses of  $\alpha$ -Methylated  $\beta$ -Hydroxy  $\alpha$ -Amino Acids and  $\beta$  Amino Alcohols" *ChemCatChem* **2010**, *2*, 939-942.

K. Baer, N. Dückers, T. Rosenbaum, C. Leggewie, S. Simon, M. Krauser, S. Oswald, W. Hummel, H. Gröger, "Towards Efficient L-Threonine Aldolase-Catalyzed Enantio- and Diastereoselective Aldol Reactions of Glycine with Substituted Benzaldehydes: Biocatalyst Production and Process Development" *Tetrahedron: Asymmetry* **2011** 

### Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Hummel für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich, sowie der evocatal GmbH für die Finanzierung im Rahmen dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Manfred Braun danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Harald Gröger vom Lehrstuhl für Chemie an der Universität Erlangen-Nürnberg danke ich für die sehr gute Kooperation im Rahmen dieses DBU-Projektes und die stets freundliche Hilfe und kompetenten Ratschläge. Mein besonderer Dank gilt Katrin Baer, Sabine Simon und Giuseppe Rulli für die Unterstützung durch Durchführung der NMR- und chiralen HPLC-Messungen, sowie die netten Diskussionen und den steten Austausch untereinander.

Stephan Wagner von der Arbeitsgruppe für Strukturbiochemie und biophysikalische Chemie der Universität Köln möchte ich für das Durchführen der Kristallisationsarbeiten und die Strukturaufklärung der LTAE aus *E. coli* danken.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft im Laufe meiner Promotion bedanken. Besonders bei Franco Circolone möchte ich mich für die intensive Hilfe und Unterstützung- besonders in der Endphase dieser Arbeit- ganz herzlich bedanken.

Ein großer Dank geht außerdem an Dalia Al-Sultani, die mir innerhalb der Anfertigung dieser Arbeit sowohl als Praktikantin als auch als Bachelor-Studentin mit großem Fleiß und Motivation zur Seite stand.

Meiner Familie, besondersTim und meiner Mutter, möchte ich für die Unterstützung in den letzten Jahren von Herzen danken.

Mein herzlichster Dank gilt Sergio, der mich in dieser Zeit getragen und ertragen hat, der immer für mich da war und mir Kraft, Halt, viel Liebe und Motivation in dieser ganz speziellen Zeit gegeben hat.

#### Vielen Dank!

## I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	I
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III. TABELLENVERZEICHNIS	VII
IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Biokatalyse	1
1.2 C-C-kuppelnde Reaktionen         1.2.1 Die Aldolreaktion         1.2.2 C-C-knüpfende Enzyme	<b>5</b> 5 6
<b>1.3 Aldolasen</b> 1.3.1 Threonin-Aldolasen         1.3.2 Serinhydroxymethyltransferasen (SHMT)	<b></b>
<b>1.4 β-Hydroxy-α-aminosäuren</b> 1.4.1 Enzym katalysierte Synthese von enantiomeren- und diastereomerenreinen β-Hydroxy-α-amino	<b>19</b> osäuren21
<ul> <li>1.5 Screening nach neuen Enzymen</li></ul>	<b>24</b> 26 28
1.6 Identifizierung von unbekannten Mikroorganismen	30
1.7 Hochdurchsatz Screeningmethoden	
ZIELSETZUNG	
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Geräte	36
2.2 Software, Programme und Webseiten	
2.3 Chemikalien	
2.4 Reaktions- und Nachweis-Kits	39
2.5 Bakterienstämme und Plasmide	
2.6 Stämme der DSMZ aus dem <i>In Silico</i> Screening	41
2.7 Oligonukleotide	41
2.8 Puffer und Lösungen	46

2.9 Wachstumsbedingungen	50
2.9.1 Sterilisation	50
2.9.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	50
2.9.3 Bestimmung der Zelldichte	
2.10 Probenentnahme Umweltproben und Kultivierung	53
2.11 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	53
2.11.1 Präparation von Plasmid-DNA	53
2.11.2 Präparation genomischer DNA.	
2.11.3 Phenol-Chloroform Extraktion	
2.11.4 Fällung von Nukleinsäuren	
2.11.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
2.12 In vitra Modifilation von DNA	55
2.12 IR visit in von DNA	55 55
2.12.1 Resultation von DNA	
2.12.2 Turturverdud genomisener Drvr	
2.12.5 Dephosphoryherung von Phasmacen	56
2.12.5 Standard-Klonierung von PCR Produkten	57
2.12.6 Konstruktion von Genombibliotheken in <i>P. nutida</i>	57
2.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	
2.14 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	
2.15 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	
2.15.1 Standard-PCR	
2.15.2 EUBAC-PCR zur Amplifizierung von 16S-rRNA	59
2.15.3 Quick-Change-PCR	
2.15.4 Overlap-Extension-PCR	61
2.16 Stammidentifizierung über ribosomale DNA (16S-rDNA Analyse)	
2.17 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	
2.17.1 Herstellung chemisch kompetenter E. coli	
2.17.2 Chemische Transformation von E. coli	
2.17.3 Elektroporation von P. putida	
2.17.4 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	
	()
2.18 Blau-Weiß-Selektion über α-Komplementation in <i>E. coli</i>	63
2.19 Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stamms P. putida durch Deletion	
2.20 Proteinexpression und Probenaufbereitung	
2 20 1 Expression	65
2.20.2 Zellaufschluss	
2.20.3 Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen	
2.20.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	
2.20.5 Aufarbeitung des Zellpellets für SDS-PAGE Analysen	
2.20.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
2.21 Biochemische Methoden/ Analytische Methoden	
2.21.1 Bestimmung der Threonin-Aldolase-Aktivität durch einen gekoppelten Photometertest	
2.21.2 Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Threonin-Aldolase-Reaktion	
2.21.5 Umsetzung und Derivatisierung zur Analyse mittels NMR und HPLC	
2.21.0 Kernresonanzspektroskopie (NMK)	
2.21.7 Hochielstungsflussigkeitschromatographie (HPLC)	
2.21.0 Unisetzungen zur gaschromatographischen Anaryse	/l 71
2.21.7 Gasenromatographic	

2.22 Chromatographische Reinigung der Threonin-Aldolasen	72
2.23 Kristallisierung der Threonin-Aldolase aus <i>E. coli</i> (LTAE)	
3. ERGEBNISSE	76
3.1 Vorversuche	
3.1.1 Screening-Methode und Analytik	76
3.1.2 Indirekter, gekoppelter Photometertest zur Bestimmung der TA-Aktivität	79
3.1.2 Die Vergleichsenzyme	81
3.1.3 Prozessoptimierung der enzymatischen Aldolreaktion	
3.2 Screening-Wege	
3.2.1 Screening von Stammsammlungen	
3.2.2 Anreicherung Phenylserin-abbauender Mikroorganismen aus Bodenproben	
3.2.3 In Silico-Screening ausgehend von bekannten TA-Sequenzen	
3.3 Identifizierung neuer Aldolase-Gene	
3.3.1 Identifizierung der Aldolase-Gene über konservierte Regionen	
3.3.2 Identifizierung der Aldolase-Gene mithilfe eines Selektions-Stammes	
3.4 Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes P. putida	101
3.5 Erstellung einer DNA-Bank in <i>E. coli</i>	106
3.6 Die I TAF aus F. coli XI 1	100
2.6.1 Mutagenese der E. coli I TAE	109
3.6.2 Biochemische Charakterisierung der Trn 87 Mutente	
2.6.2 Aufrainigung der <i>E</i> coli TA (LTAE)	115
3.6.4 Kristallisierung & Strukturaufklärung der LTAE	
4. DISKUSSION	124
4.3 Screening-Wege	
4.3.1 Screening von Stammsammlungen	
4.3.2 Anreicherung Phenylserin-abbauender Mikroorganismen aus Bodenproben	125
4.3.3 In Silico-Screening ausgehend von bekannten TA-Sequenzen	
4.4 Hochdurchsatz-Screening mithilfe eines Selektions-Stammes	130
4.5 Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes P. putida	132
4.6 Erstellung einer DNA-Bank in <i>E. coli</i>	132
48 Dio I TA aus F. goli VI 1 (I TAF)	13/
4.6 Die LTA aus E. con ALT (LTAE)	134
4.8.2 Biochemische Charakterisierung der Truntonhan Mutante	136
4.8.2 Dioenemisene Charakteristerung der Tryptophan-Wutante	130
	137
5. ZUSAMMENFASSUNG	141
6. SUMMARY	143
7. LITERATUR	145

8. ANHANG	
6.1 Plasmidkarten	
6.2 Sequenzen	
6.3 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

# II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Allgemeines Schema der Aldolreaktion	5
Abb. 2: Synthese von 1a (R)- und 1b (S)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Blausäure (Cvanid) durch H	INL7
<b>Abb. 3:</b> Anwendung von Aldolasen in Abhängigkeit von ihrem Donormolekül <sup>[6]</sup>	
Abh. 4: Katalysemechanimsus der Klasse I und Klasse II Aldolasen	10
<b>Abb. 5:</b> Synthese von Atorvastatin durch partielle DERA-Katalyse in einem Schritt <sup>[6]</sup>	
Abb. 6: TA-katalysierte Bildung der vier verschiedenen Threonin-Isomere durch Aldolkondensation von	Glvcin
und Acetaldehvd	
Abb. 7: Struktur der TA aus <i>T. maritima</i> nach Kielkopf <i>et al.</i> <sup>[54]</sup>	
Abb. 8: Katalysemechanismus der TA-katalysierten Retro-Aldolreaktion mit D-β-Phenylserin als Substra	at. <b> 17</b>
Abb. 9: Vergleich von Threonin-Aldolase und Serin-Hydroxymethyl-Transferase Reaktion in der Biosyn	these
von Glycin.	19
<b>Abb. 10:</b> Chirale Bausteine basierend auf $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren	20
Abb. 11: Zambon Prozess für die chemische Synthese von Thiamphenicol <sup>[70]</sup>	21
Abb. 12: Enzymatische Spaltung von D,L-threo-MTPS unter Verwendung einer D-spezifischen TA	23
Abb. 13: Schematische Darstellung der Anreicherung von Mikroorgansimen aus Bodenproben	29
Abb. 14: Phylogenetischer Stammbaum der Bakterien von kultivierten und unkultivierbaren Gruppen <sup>[91]</sup>	
Abb. 15: Schema zur Identifizierung via Selektion in P. putida KT2440	33
Abb. 16: Darstellung der einstufigen asymmetrischen Direkt-Synthese von chiralen Schlüsselintermediate	en
durch Verwendung einer industriell nutzbaren Aldolase	34
Abb. 17: DNA-Molekulargewichtsstandard "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas)	46
Abb. 18: Protein-Größenstandard "PageRuler Prestained ProteinLadder" (Fermentas)	48
Abb. 19: Gekoppelter Photometertest mit Threonin als Substrat zur Bestimmung der Threonin-Aldolase-	
Aktivität nach Kimura <i>et al.</i> <sup>[38]</sup>	68
Abb. 20: Derivatisierung von Phenylserin mit Benzoylchlorid	
Abb. 21: 1. Screening-Runde ausgehend von der Retro-Aldolreaktion mit Phenylserin als Substrat.	
Abb. 22: GC-Referenz-Diagramm für Benzaldehyd.	
Abb. 23: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum eines <i>threo-/ erythro</i> -Gemischs von derivatisiertem Phenylserin	
Abb. 24: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum eines <i>threo-/ erythro</i> -Gemischs von Phenylserin als Hydrochlorid	
Abb. 25: SDS-Gel der beiden rekombinanten Threonin-Aldolasen aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	
Abb. 26: Ubersicht verschiedener resuspendierter Bodenproben verschiedener Standorte.	
Abb. 27: Ubersicht über die gewonnenen Rein-Isolate aus den Bodenproben.	
Abb. 28: Agarose-Gel isolierter 16S-rRNA aus Bodenproben DNA.	
Abb. 29: Datenbankanalyse der 16S-rRNA von Bodenproben-Isolat B13b).	
Abb. 30: Sequenzvergleich der beiden Threonin-Aldolasen aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	
Abb. 31: Alignment für die putative Enreonin-Aldolase PpTA aus P. putaa KT2440 mit der Datenbank.	
Abb. 32: a) Agarose Gel und b) SDS-Gel der amplifizierten TA aus P. puttaa KT2440 (PpTA).	
Abb. 33: GC-Chromalogramm für die Omsetzung mit der Pp1A aus P. punda K12440 in der Aldoispalit	ing. 100
ADD. 54: Agarose-Gei der PCK aus P. puttaa Plasmid-DNA nach Transformation der DNA-Bank aus E. ( VI.1. im Voltor nDDB 1MCS2	101
Abb 35: Sahama für die Konstruktion des TA defizienten Stammes P. nutida KT2440APnTA	101
Abb. 35: Schema für die Konstruktion des IA-denziehnen Stammes F. pulluu K12440AFpTA	102
Abb. 30: FCK zur Ampfinizierung des upsiteam-, downsiteam-Fragments und der Gentamychi-Kassette.	····· 103
<b>Abb. 37.</b> Kiomerungs-senema zur Konstruktion des Erneomin-Audorase denzienten Stammes in <i>I. putud</i>	106
<b>Abb. 30:</b> Restriktionsanalyse je eines Klons der Genom-Bank aus Bodennroben-Isolat B10b) und B11c2	108
<b>Abb</b> 40: Ouick-Change PCR des Plasmids nET28a-ltaE mit Aminosäureaustausch in Position 87	110
<b>Abb</b> 41: Aminosäureaustausch durch Quick-Change-PCR in Position 96 der LTAE Gly $\rightarrow$ Asn	112
<b>Abb. 42:</b> Bestimmung des Temperaturontimums für die LTAE-Trn87 Mutante im Vergleich zum Wildtvi	n-
Enzym	r 114
Abb. 43: Bestimmung des pH-Optimums der Trp87-Mutante	115
<b>Abb. 44:</b> Bestimmung der kinetischen Konstanten V <sub>max</sub> und K <sub>m</sub> für die Tryptophan-Mutante	116
<b>Abb. 45:</b> Aufreinigung der LTA aus <i>E. coli</i> über Ni-NTA Affinitätschromatographie	117
<b>Abb. 46:</b> LTAE-Kristalle des Apoenzyms in zwei unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen	120
Abb. 47: Optimierte Kristalle der LTAE mit Glycin.	121
Abb. 48: Struktur der LTAE im aktiven Zentrum	122
Abb. 49: a) Dimer und b) Monomer der E. coli LTAE mit gebundenem Cofaktor PLP im aktiven Zentrur	m. <b> 123</b>
Abb. 50: Alignment verschiedener Threonin-Aldolasen und der <i>E. coli</i> SHMT.	135
- /	

## III. Tabellenverzeichnis

Tab.	1:	Übersicht über die literaturbekannten Angaben zu Diastereoselektivitäten von Enzymen mit TA-	
		Aktivität	13
Tab.	<b>2:</b> <i>I</i>	Anteil der kultivierbaren Bakterien in der Gesamtbakterienzahl <sup>[41]</sup> .	27
Tab.	<b>3:</b> (	Übersicht über die verwendeten Geräte	36
Tab.	<b>4:</b> (	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software, Programme und Websiten	37
Tab.	<b>5:</b> (	Übersicht über die verwendeten Chemikalien	37
Tab.	<b>6:</b> ไ	Übersicht über die verwendeten Reaktions- und Nachweis-Kits	39
Tab.	7: ľ	Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	39
Tab.	8: l	Übersicht der verwendeten Vektoren	40
Tab.	9: l	Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide	40
Tab.	10:	Übersicht über die ausgewählten Stämme mit Sequenzähnlichkeit zu E. coli und S. cerevisiae TA	41
Tab.	11:	Übersicht über die verwendeten Primer. TM: Schmelztemperatur	42
Tab.	12:	Verwendete Primer zur Erstellung der Deletionsmutante in <i>P. putida</i> KT2440 mittels " <i>Overlap-extention</i> PCR"	. 44
Tab.	13:	Verwendete Primer zur Erstellung der Mutanten der E. coli TA durch Aminosäureaustausch in	
		Position 87 (Phenylalanin) und Position 96 mittels Quick-Change-PCR.	45
Tab.	14:	Übersicht über die verwendeten Primer zur 16S-rDNA Amplifizierung	45
Tab.	15:	Übersicht über die verwendeten Antibiotika und ihre Endkonzentrationen in E. coli und P. putida	51
Tab.	16:	Zusammensetzung der PCR-Ansätze unter Verwendung der Pfu- und Phusion-DNA-Polymerase	59
Tab.	17:	Zusammensetzung des EUBAC-PCR-Ansatzes.	60
Tab.	18:	Zusammensetzung des Quick-Change PCR-Ansatzes.	60
Tab.	19:	Zusammensetzung des Overlap-Extention PCR-Ansatzes unter Verwendung der <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase.	61
Tab.	20:	Stämme aus der IMET-Stammsammlung, die in der Retro-Aldolreaktion mit Phenylserin- Aktivität zeigten.	83
Tab. Tab.	21: 22:	Übersicht über die mit NMR gemessenen Umsetzungen der <i>Arthrobacter</i> -Enzym-Rohextrakte Übersicht über die verwendeten Bodenproben, ihre Fundorte und die daraus erhaltenen Isolate.	85 86
Tab.	23:	Kinetische Untersuchung des Umsatzes und des d.rWertes am NMR am Beispiel dreier Bodenproben-Isolate.	88
Tab.	24:	NMR-Analyse ausgewählter Bodenproben Isolate.	89
Tab.	25:	Enantiomerenüberschuss einiger Bodenproben-Isolate bestimmt mit chiraler HPLC.	90
Tab.	26:	Stamm-Identifizierung einiger relevanter Bodenproben-Isolate über ihre 16S-rRNA-Analyse	93
Tab.	27:	Übersicht der bisherigen Experimente mit den ausgewählten Stämmen aus dem in Silico-Screening.	95
Tab.	28:	Übersicht über Umsätze, Aktivitäten und d.rWerte der rekombinant erhaltenen Enzyme aus dem in	
		Silico-Screening	96
Tab.	29:	Wachstumstest von P. putida auf Benzaldehyd in Minimalmedium	98
Tab.	30:	Mit NMR analysierte Klone der Bodenproben-Isolate aus der Gen-Bank 1	107
Tab.	31:	Aktivitäten und Proteingehalt der LTAE-Mutanten durch Aminosäureaustausch an Position 87 1	111
Tab.	32:	Analyse der LTA-Mutanten mittels NMR. Umsatzbestimmung und d.rWert-Bestimmung 1	111
Tab.	33:	Aktivitäten der beiden Einzel-Mutanten durch Austausch in Position 87 und 96 im Vergleich zur	
		Wildtyp LTAE 1	112
Tab.	34:	Beispiel für einen Optimierungsansatz in 24-well Platten 1	119
Tab.	35:	Details zu den jeweils besten Datensätzen der Röntgenstrukturanalyse von LTAE mit und ohne	
		Glycin	121

## IV. Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet.

$\Delta$	Deletion einer DNA Sequenz
Ø	Durchmesser
Ω	Antibiotikaresistenz-Kassette
3'	drittes Kohlenstoffatom z.B. einer Desoxyribose
5'	fünftes Kohlenstoffatom z.B. einer Desoxyribose
Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin Resistenz
Aq. dest.	destilliertes Wasser
Äq	Äquivalente
BÁC	bacterial artificial chromosome (künstliches Bakterienchromosom)
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
С	Celsius
cDNA	complementary DNA
Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol Resistenz
Da	Dalton
de	diastereomeric excess (Diastereomerenüberschuss)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dsDNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ее	enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
EE	Essigsäureethylester
et al.	et aliii (und andere)
EtOH	Ethanol
f	femto, dezimale Verkleinerung einer Einheit um 10-15
fw	forward (vorwärts gerichtet)
g	Gramm
ĞC	Gaschromatographie
Gm <sup>r</sup>	Gentamycin Resistenz
GZE	Ganzzellextrakt
h	Stunde
His <sub>6</sub> -tag	Sequenz aus 6 hintereinander folgenden Histidinmolekülen
HK	Hauptkultur
HPLC	High Perfomance Liquid Chromatographie
	(Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HTS	high troughput screening (Hochdurchsatz-Screening)
Hz	Hertz
in silico	Vorgänge, die im Computer ablaufen (angelehnt an lateinisch in silicio)

in vitro	im Glas (lateinisch)
in vivo	im lebendigen Organismus (lateinisch)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante ( <sup>1</sup> H-NMR)
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin Resistenz
kb	Kilobasen
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
L	Liter
<i>lac</i> -Promotor	Promotor des Lactose Operons
lacZ	B-Galaktosidasegen
LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
Lsø	Lösung
m	Multiplett (NMR)
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
M	molar (Mol pro Liter)
MCS	multiple cloning site
Milli-O Wasser	Wasser aus Millinore Anlage
min	Minute
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
n h	nicht hestimmt
n d	nicht detektierbar
NMR	nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriacetat (Nitrilotriessigsäure)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>Zobl</sub>	optische Dichte bei einer definierten Wellenlänge (= Zahl)
orf	open reading frame(s) (offene(r) Leserahmen)
ori	origin of renlication (Renlikationsursnrung)
P	PCR Primer
P nutida· Pn	Pseudomonas nutida
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	nolymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pfu	Pyrococcus furiosus
PLP	Pyridoxalphosphat
PS	Phenylserin
nnm	narts per million
n n	Ouartätt ( <sup>1</sup> H-NMR)
ч rDNA	ribosomale DNA
RE	Restriktionsenzym(e) Restriktionsendonuklease(n)
rev	revers (rückwärts gerichtet)
Rkt	Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Drehzahl pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Singulett ( <sup>1</sup> H-NMR)
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	sodium dodecvl sulfate (Natriumdodecvlsulfat)
sec	Sekunde
S.O.	siehe oben

t	Triplett ( <sup>1</sup> H-NMR)
Та	annealing temperature (Hybridisierungs-Temperatur)
ТА	Threonin-Aldolase
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat
Tc <sup>r</sup>	Tetracyclin
tE	Elongationszeit
template	Matrize, Muster
TM	melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit(s) (Einheit(en) der Enzymaktivität)
ÜK	über-Nacht-Kultur
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	vollentsalztes (demineralisiertes) Wasser
versus	gegen, gegenüber gestellt (lateinisch)
V	Volt
VK	Vorkultur
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	mal Erdbeschleunigung (g = 9,80665 Meter/sec2)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosi
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

#### **1.1 Biokatalyse**

In den letzten Jahren ist die Biokatalyse zu einer wichtigen Anwendung für die industrielle Produktion von Chemikalien geworden, insbesondere für die Synthese von chiralen Schlüsselintermediaten, die in der Lebensmittel- und Pharmazeutika-Produktion, sowie in der Herstellung von Feinchemikalien für die Organische Synthese benötigt werden.

Schon seit der Antike macht man sich die Eigenschaften von Biokatalysatoren für die Herstellung von Lebensmitteln zu Nutzen, so z.B. für das Bierbrauen, für die Fermentation von Wein oder Milchprodukten <sup>[1, 2]</sup>. Während bei diesen Prozessen der gesamte lebende Organismus biotechnologisch verwendet wird, nutzt man bei der Enzymtechnologie direkt isolierte Enzyme. Auch für die Heilkunde wurde die Wirkung von Enzymen aus verschiedenen Pflanzen genutzt, so konnten mitunter Geschwüre durch Auflegen von frisch gekauten Feigen geheilt werden. Der Strunk der Ananas, der das Enzym Bromelain enthält, wurde bei Verrenkungen und Verstauchungen verwendet und auch bei Halsentzündungen und Ödemen wurde die heilende Kraft der Ananas genutzt <sup>[3]</sup>.

Innerhalb des 19. Jahrhunderts versuchten Forscher, die für diese Prozesse verantwortlichen Moleküle zu identifizieren und ihre Funktion aufzuklären, was innerhalb dieses Jahrhunderts zu einer Vielzahl bahnbrechender Entdeckungen führte. So entdeckte 1836 Schwann das Pepsin und Louis Pasteur erforschte ab 1850 die Fermentation, wobei er zu der Erkenntnis kam, dass an der Gärung kleinste einzellige Lebewesen beteiligt sind, die sich unter Sauerstoffausschluss vermehren <sup>[4]</sup>. Der Begriff 'Enzym' (griechisch "zyme" für Sauerteig/Hefe) wurde von dem deutschen Mediziner Wilhelm Friedrich Kühne im Jahr 1879 geprägt und wurde seitdem in der Wissenschaft für alle Biokatalysatoren anerkannt<sup>[5]</sup>. Enzyme sind Proteine und fungieren als effektive Biokatalysatoren, wobei sie - wie von Katalysatoren zu erwarten ist - bei der zu katalysierenden Reaktion nicht verbraucht werden und somit nach Ende der Reaktion wieder in ihrer ursprünglichen aktiven Form vorliegen. Sie sind in der Lage die zu katalysierende Reaktion um den Faktor 10<sup>5</sup> bis 10<sup>7</sup> zu beschleunigen <sup>[6]</sup>. Des Weiteren können sie in sehr geringen Konzentrationen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  mol % eingesetzt werden und auch in diesem kleinen Konzentrationsbereich noch hohe Ausbeuten erzielen<sup>[7]</sup>. Die Einsatzgebiete von Enzymen sind mittlerweile sehr umfassend und vielfältig. So setzt man für die Produktion von Waschmitteln eiweißspaltende Proteasen, sowie Amylasen und fettspaltende Lipasen ein; Weichmachern werden Cellulasen zugesetzt und zum Bleichen können Oxidoreduktasen und Peroxidasen eingesetzt werden. In der Textilindustrie werden Cellulasen verwendet, in der Lederindustrie erfolgt die Entfernung nicht-lederbildender Bestandteile durch Proteasen, in der Zellstoff- und Papierherstellung werden u. a. Xylanasen eingesetzt und auch im Umweltschutz (Bioremediation, Abwasseraufbereitung) und in der modernen Analytik (Lebensmittelproduktion und - überwachung, medizinische Therapie und Diagnostik) finden Enyzme Anwendung<sup>[1, 8]</sup>.

Die konventionellen chemischen Syntheseprozesse laufen oftmals nur unter drastischen Reaktionsbedingungen (hohe Temperatur, hoher Druck, extreme pH-Werte, Verwendung von organischen Lösungsmitteln) und unter Bildung unerwünschter Nebenprodukte ab. Dies verursacht aufgrund des gesteigerten Energiebedarfs, des erhöhten Verbrauchs an Substrat, der notwendigen Aufreinigung bzw. Abtrennung der Produkte sowie der Entsorgung von unerwünschten Nebenprodukten erhebliche Kosten. Im Gegensatz dazu bietet die Biokatalyse eine hoch attraktive Möglichkeit, Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, Atmosphärendruck, neutraler pH-Wert) durchzuführen <sup>[9]</sup>. Zudem sind Enzyme in hohem Maße chemo-, regio- und enantioselektiv, so dass weitgehend auf die Verwendung von Schutzgruppen verzichtet werden kann und das Produkt in der Synthese mit sehr hoher Reinheit anfällt <sup>[6, 10]</sup>. Durch die milden Reaktionsbedingungen der meisten enzymatischen Prozesse wird der Energieaufwand weitestgehend minimiert, was zu niedrigeren Prozesskosten führt und in geringerer Umweltbelastung resultiert <sup>[11]</sup>. Durch der Stereo- und Regiospezifität einer Enzymkatalyse kann auf teure Nutzen Ausgangssubstanzen verzichtet und somit die Kosten des Prozesses gesenkt werden. Aufgrund der Spezifität der Reaktion wird die Bildung unerwünschter, oft toxischer Nebenprodukte und die damit verbundenen Aufreinigungs- und Entsorgungsprobleme vermieden, was ebenfalls die Kosten minimiert und Umweltprobleme vermeidet [11-12]. Chemische Prozesse können außerdem meist erst durch gekoppelte biotechnologische Verfahren effizient und gewinnbringend genutzt werden<sup>[13]</sup>.

In den letzten Jahren ist die Biokatalyse durch die steigenden Bedürfnisse, insbesondere der Pharmaindustrie nach hoher Selektivität, zu einer wichtigen Anwendung für die industrielle Produktion von enantiomerenreinen, chiralen Schlüsselintermediaten, die in der Produktion von wirksamen Pharmazeutika <sup>[14, 15]</sup>, sowie in der Herstellung von Feinchemikalien für die asymmetrische Organische Synthese benötigt werden, geworden. Enzyme werden nicht nur in der Pharmaindustrie für die Synthese von Wirkstoffen, sondern auch in der Medizin sowohl in der Krankheitsdiagnostik als auch für therapeutische Zwecke erfolgreich eingesetzt. Zur Förderung der Blutgerinnung wird Thrombin therapeutisch eingesetzt und zur Auflösung von Blutgerinnseln die Urokinase; in der Krebstherapie werden z.B. antineoplastische Enzyme verwendet und auch bei Infektionskrankheiten werden therapeutische Enzyme genutzt <sup>[16]</sup>. In der Diagnostik finden Peroxidasen und Phosphatasen im Nachweis von Tumoren mittels ELISA Verwendung und die Glucoseoxidase kann zur Blutzuckerbestimmung bei Diabetis genutzt werden.

Bei einer konventionellen chemischen Synthese entstehen beide Enantiomere einer chiralen Verbindung als racemisches Gemisch und die Auftrennung und Reinigung solch eines racemischen Gemisches ist aufwendig und kostspielig. Enantiomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild, sind sich also in vielen, gerade physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer chiralen Umgebung und weisen – sofern die Verbindungen biologisch aktiv sind – sehr häufig unterschiedliche Wirkungen auf. Da bei einem Gemisch zweier Enantiomere einer optisch aktiven Verbindung meistens nur das eine Isomer die gewünschte Wirkung zeigt, während das andere Isomer keine oder sogar eine gegenteilige Wirkung aufweisen kann, ist es von größter Notwendigkeit, die wirksame Verbindung in absoluter optischer Reinheit herzustellen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist sicherlich der "Contergan"-Skandal. Das Medikament (Thalodomid) sollte als Schlafmittel dienen, kam allerdings nicht enantiomerenrein auf den Markt und dies hatte verheerende Folgen. Denn nur das (*R*)-Enantiomer der chiralen Verbindung hatte die gewünschte Wirkung als Schlafmittel, während das (*S*)-Enantiomer eine teratogene Wirkung aufwies. Dieses Beispiel zeigt einmal mehr die Notwendigkeit der enantiomerenreinen Synthese von Wirkstoffen.

Während lange Zeit nur die Racematspaltung als eine Möglichkeit für die Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen angewandt wurde, ermöglicht die asymmetrische Direktsynthese die Einführung der gewünschten Chiralität in einem Schritt. Für die Synthese chiraler Alkohole, Diole, Aminoalkohole, Aminosäuren und Aminen können Oxidoreduktasen und Lyasen (Decarboxylasen) genutzt werden <sup>[17]</sup>; für die Spaltung verschiedener Racemate werden hydrolytische Enzyme genutzt und für die asymmetrische Synthese durch Aldolkondensation oder Acyloinkondensation werden Aldolasen und Decarboxylasen verwendet.

Ein industrielles Verfahren zur Herstellung chiraler Diole von großer Bedeutung ist die Synthese von 1,3-Propandiol<sup>[18]</sup>. 1,3-Propandiol wird heutzutage ausgehend von Glycerol mittels der beiden Enzyme Glycerol-Dehydratase und 1,3-Propandiol-Dehydrogenase biosynthetisch in gentechnisch-veränderten *E. coli*-Bakterien hergestellt<sup>[19]</sup>. Dabei wird Glycerol, welches zuvor aus Glukose synthetisiert werden kann, zunächst durch die Glycerol-

Dehydratase zu 3-Hydroxypropionaldehyd umgesetzt und dieser anschließend durch die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase zu 1,3-Propandiol. Um diesen Prozess effektiv und gewinnbringend zu nutzen musste zunächst ein gentechnisch veränderter E. coli-Stamm hergestellt werden. Dadurch wurde ein kostengünstiger, effizienter Prozess im Vergleich zu den beiden konventionellen chemischen Verfahren, dem Degussa/Du Pont- und Shell-Verfahren, mit nur geringen Ausbeuten, etabliert. 1,3 Propandiol ist eine bedeutende Ausgangssubstanz für die Herstellung Hochleistungskunststoffen von wie Polytrimethylenterephthalat (PTT)<sup>[20] [21]</sup>.

Die Wissenschaft konnte bis dato ungefähr 3.000 verschiedene Enzyme in lebenden Organismen identifizieren und katalogisieren, von denen mehrere hundert kommerziell zur Verfügung stehen. Die Eigenschaften von Enzymen lassen sie optimal als Biokatalysatoren in der chemischen Industrie nutzen, um Reaktionen zu katalysieren, für die keine geeigneten chemischen Katalysatoren zur Verfügung stehen, sowie um "grüne Chemie" zu betreiben, d.h. chemische Prozesse, die unter hohem Energieaufwand und unter Entstehung großer Mengen giftiger Abfallstoffe ablaufen, durch umweltschonende Bioprozesse zu ersetzen. Das Interesse am Nutzen von Biokatalysatoren für industrielle Prozesse wuchs besonders durch die erheblichen Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie mit der Produktion von rekombinanten Enzymen in mikrobiellen Expressionssystemen, die eine fortlaufende Gewinnung des Biokatalysators ermöglichen. Es hat sich gezeigt, dass Einschränkungen des natürlichen Substrat-Bereichs durch moderne Techniken des "Enzym-Engineering" überwunden werden können. Sowohl rationales Protein-Design als auch die Technik der gerichteten Evolution können helfen, den Nutzen von Biokatalysatoren deutlich zu verbessern [<sup>22</sup>].

Das Potential der Vielfalt an Biokatalysatoren ist noch längst nicht ausgeschöpft; es werden weiterhin regelmäßig neue Enzyme isoliert und die Optimierung bereits vorhandener Enzyme durch Protein-Engineering steht auch erst am Anfang<sup>[23]</sup>.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Verwirklichung weiterer biokatalytischer Prozesse ganz wesentlich von der Verfügbarkeit geeigneter Biokatalysatoren abhängt <sup>[24]</sup>.

#### 1.2 C-C-kuppelnde Reaktionen

Die stereoselektive Knüpfung von Kohlenstoff-Bindungen zum Aufbau des Kohlenstoffgrundgerüstes organischer Verbindungen spielt eine bedeutende Rolle für die industrielle Organische Synthese <sup>[25]</sup>. Reaktionen, bei denen eine neue C-C-Bindung katalytisch geknüpft wird, sind z.B. Kreuzkupplungen wie die Heck-, Suzuki-, Sonogashira-, Stille- und Negishi-Kupplung oder Additionsreaktionen an Carbonylverbindungen wie die (cyclische) Diels Alder-, Aldol- oder Mannich-Reaktion.

#### **1.2.1 Die Aldolreaktion**

Bei der Aldolreaktion wird ein enolisierbarer Aldehyd oder ein Keton an die Carbonylgruppe eines zweiten Aldehyds/Ketons unter Bildung von Aldolen ( $\beta$ -Hydroxyaldehyde) und Ketolen ( $\beta$ -Hydroxyketone) addiert <sup>[6, 25]</sup>. Über diese Reaktion wurde erstmals von dem Chemiker Alexander Borodin im Jahre 1869 berichtet, im Folgenden wurde sie dann von Charles Wurtz (1872) weiter untersucht. Sie stellt eine der wichtigsten Reaktionen zur Knüpfung neuer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen dar. Sie ist häufig mit einer nachfolgenden Dehydratisierung verbunden, wobei der gesamte Prozess dann Aldolkondensation genannt wird <sup>[26]</sup>.



Abb. 1: Allgemeines Schema der Aldolreaktion

Nachteile der chemischen Aldolreaktion sind zum einen die häufige Bildung von Produktgemischen, zum anderen die Tatsache, dass bei der Reaktion zweier gleicher Ketone das chemische Gleichgewicht auf der Seite der Edukte liegt. Da bei der Aldolreaktion bis zu zwei neue Chiralitätszentren gebildet werden können, spielt die Stereokontrolle dieser Reaktion eine wichtige Rolle. Durch gezielte Kontrolle der Reaktionsparameter und Auswahl des Enolates (E/Z), das in der Regel unter kinetisch kontrollierten Bedingungen vorgefertigt wird, kann die Diastereoselektivität beeinflusst werden <sup>[27]</sup>. In der Mukaiyama-Reaktion z.B. werden an Stelle von Enolaten Silylenolether eingesetzt und die Chiralität im Produkt durch Einsatz von Lewis-Säure-Katalysatoren mit chiralen Liganden eingeführt <sup>[28]</sup>.

Es leiten sich viele andere Organische Synthesen von der Aldolreaktion ab, so z.B. die Knoevenagel-Reaktion oder die Claisen-Schmidt Reaktion von aromatischen Aldehyden und

Ketonen mit Aldehyden bzw. Ketonen zu aromatischen, ungesättigen Aldehyden und Ketonen. Eine Kombination aus Aldol- und Michael-Reaktion ist die Robinson-Annelierung.

#### 1.2.2 C-C-knüpfende Enzyme

Eine Gruppe von Biokatalysatoren mit großer und stetig wachsender Bedeutung für die asymmetrische industrielle Synthese sind Enzyme, die die selektive Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen katalysieren und dadurch chirale Verbindungen als Bausteine für bioaktive Substanzen wie z.B. Pharmazeutika zugänglich machen. Die Stereoselektivität der Enzyme ist ein wesentlicher Aspekt, den sich die Organische Chemie zunutze machen will und der die intensive Forschung nach neuen Enzymen zur C-C-Kupplung antreibt<sup>[22]</sup>. Die Natur stellt eine große Zahl von vielseitigen Enzymen für die stereoselektive Kupplung von C-C-Bindungen zur Verfügung, davon sind vor allem die Lyasen und Hydrolasen zu nennen <sup>[6]</sup>. Besonders die Biosynthese von Kohlenhydraten zeichnet sich durch eine Reihe von hoch spezifischen C-C-Kupplungsschritten aus. In der Natur werden C-C-Kupplungen durch eine begrenzte Anzahl von Enzymen verschiedener Gruppen katalysiert, die hauptsächlich zur Klasse der Aldolasen oder Ketolasen gehören<sup>[22]</sup>. Bekannt sind außerdem Oxynitrilasen, die in der Natur die Spaltung von Cyanhydrinen katalysieren und einige Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme wie Transketolasen und  $\alpha$ -Ketosäure-Decarboxylasen. Es ist nicht überraschend, dass viele Enzyme, die für die in vitro-Synthese von C-C-Bindungen verwendet werden, aus dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel stammen, wo diese Enzyme natürlicherweise für den Abbau von Molekülen in vielen Stoffwechselprozessen zur Verfügung stehen<sup>[22]</sup>.

Diese Möglichkeit der Reversibilität einer Enzymreaktion kann man sich für die Synthese vieler chiraler Kohlenstoffverbindungen zu Nutze machen, so konnten z.B. Sprenger *et al.* im Jahre 1995 neue C-C-kuppelnde Enzyme aus *E. coli* entdecken, mit denen die Synthese von 1-Deoxyzuckern gelang <sup>[29,30]</sup>. Die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) ermöglicht den Zugang zu zahlreichen Hydroxyketonen durch Umsetzung von Hydroxyaldehyden mit Pyruvat, Acetaldehyd oder 3-Hydroxy-2-butanon. 2-Hydroxyketone sind wichtige chirale Bausteine in der Organischen Chemie und dienen als Vorstufe bei der Synthese vieler natürlicher Stoffe, z.B. für Pharmazeutika <sup>[31]</sup>. Durch Folgereaktionen an der Carbonyl- oder der Hydroxyl-Funktion, sowie an den Seitenketten, können sie vielseitig modifiziert werden. So sind sie z.B. in der Taxolseitenkette, im Ephedrin und Bupropion, dem Wirkstoff der "Raucherentwöhnungspille" enthalten.

Ein weiteres interessantes Enzym zur stereoselektiven C-C-Knüpfung in industriellem Maßstab ist die Hydroxynitrillyase (HNL), welche die enantioselektive C-C-Knüpfung durch Addition von Blausäure an ein Aldehyd/Keton unter Bildung des entsprechenden optisch aktiven Cyanhydrins katalysiert<sup>[22]</sup>. Für die Katalyse benötigen HNLs keinen zusätzlichen Cofaktor. Cyanhydrine sind synthetisch vielseitige Bausteine in der Organischen Synthese, so z.B. für die Synthese von Feinchemikalien, Pharmazeutika und Agrochemikalien. Von industrieller Bedeutung ist das (S)-3-Phenoxybenzaldehyd-Cyanhydrin, das kommerziell in großem Maßstab (1000 g/L/d im 10-Jahres-Tonnen Maßstab) enantiomerenrein (98,5% ee) mit der (S)-selektiven HNL aus Hevea brasiliensis produziert wird <sup>[32]</sup>. Wichtige industrielle Produkte der HNL-Synthese sind die Mandelonitrile, die in die jeweiligen Mandelsäure-Derivate umgewandelt werden können. Enantiomerenreine Mandelsäure wird klassischerweise als Reagenz für die Racematspaltung durch enantioselektive Kristallisation genutzt. Darüber hinaus dienen Mandelsäure und ihre Derivate auch als chirale Synthons<sup>[6]</sup>.



**Abb. 2:** Synthese von 1a (*R*)- und 1b (*S*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Blausäure (Cyanid) durch HNL-Katalyse und anschließende Umwandlung in 2a (*R*)- und 2b (*S*)-Mandelsäure

Bislang haben sich technische Anwendungen von Enzymen für C-C-Kupplungen stark auf stereoselektive Carboligationen konzentriert, aber die stete Weiterentwicklung von Biokatalysatoren dürfte den Einsatz von Enzymen in naher Zukunft auch auf Reaktionen wie z.B. die Friedel-Crafts-Acylierung oder Vinylierung erweitern<sup>[22]</sup>.

### 1.3 Aldolasen

Aldolasen sind eine bedeutende Gruppe von industriell nutzbaren Enyzmen, die in den letzten Jahren viel an Aufmerksamkeit gewonnen haben aufgrund ihrer Fähigkeit, die Bildung und auch Spaltung von C-C Bindungen zu katalysieren, die zu stereochemisch reinen chiralen Produkten führt <sup>[33, 34]</sup>.

In der Organischen Synthese und auch in natürlichen Prozessen spielt die Aldolreaktion zur Bildung neuer C-C-Bindungen eine bedeutende Rolle.

Aldolasen gehören zur Gruppe der Lyasen <sup>[34]</sup>, die typischerweise die stereoselektive Addition eines Ketondonors an einen Aldehydakzeptor unter Bildung von  $\beta$  -Hydroxycarbonylverbindungen katalysieren. Sie zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Kontrolle über die Regiochemie aus und tolerieren eine große Vielzahl von Akzeptor-Molekülen, während sie nur wenige Donormoleküle akzeptieren <sup>[6, 35]</sup>.

Sie können hinsichtlich ihres Donor-Moleküls in vier Hauptfamilien unterteilt werden <sup>[7, 34]</sup>:

- Dihydroxyacetonphosphat-abhängige Aldolasen (DHAP-Aldolasen) zur Synthese von 2-Keto-3,4-dihydroxyaddukte
- Pyruvat- und Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängige Aldolasen zur Synthese von 3-Desoxy-2-ketosäuren
- Acetaldehyd- abhängige Aldolasen zur Synthese von 3-Hydroxyaldehyden
- Glycin-abhängige Aldolasen für die Synthese von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren



**Abb. 3:** Anwendung von Aldolasen in Abhängigkeit von ihrem Donormolekül <sup>[6]</sup>: (a) Acetaldehyd-abhängige Aldolasen, (b) Phosphoenolpyruvat- (PEP) and Pyruvat-abhängige Aldolasen, (c) Dihydroxyacetonphosphat abhängige Aldolasen (d) Glycin-abhängige Aldolasen und

Desweiteren können sie aufgrund ihres Katalysemechanismus in zwei Unterklassen unterteilt werden (s. Abb. 4):

Klasse I Enzyme kommen in Tieren und höhere Pflanzen vor. Ihr Katalysemechanismus verläuft über eine Schiff-Base als Intermediat unter Bildung eines Enamins.

Klasse II Enzyme findet man in Bakterien und Pilzen; sie benötigen zusätzliche Metal-Cofakor wie  $Zn^{2+}$  und die Katalyse verläuft über ein Enolat-Intermediat.



Abb. 4: Katalysemechanimsus der Klasse I und Klasse II Aldolasen

Eine Aldolase, die in hohem Maße für die Organische Synthese an Bedeutung gewonnen hat, ist die 2-Deoxyribose-5-phosphataldolase (DERA), eine TypI-Aldolase, die den Donor Acetaldehyd als ein Enamin aktiviert. Sie ist ebenfalls in der Lage, eine Vielzahl an Akzeptor-Molekülen zu akzeptieren und außerdem auch flexibler als die meisten anderen Aldolasen bei der Wahl des Donor-Moleküls<sup>[36]</sup>.

Die DERA wird erfolgreich für die Synthese von Epothilon A verwendet, wobei zwei der sieben stereogenen Zentren durch die DERA geschaffen werden. Epothilon A ist ein 16-gliedriges Makrolactam, das erfolgreich in der Krebstherapie zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden kann<sup>[36]</sup>.

Außerdem wird das Enzym für die Synthese von Atorvastatin, einem Cholesterol-senkendem Medikament verwendet (s. Abb. 5)<sup>[6]</sup>.



Abb. 5: Synthese von Atorvastatin durch partielle DERA-Katalyse in einem Schritt<sup>[6]</sup>

#### 1.3.1 Threonin-Aldolasen

Ein bedeutender Typ von Aldolasen sind die Pyridoxal-5-phosphat-abhängigen (PLP) Threonin-Aldolasen (TAs). Diese Enzyme katalysieren die Spaltung von Threonin in Glycin und Acetaldehyd, sowie die stereospezifische Rückreaktion, die Aldolreaktion. Eine Besonderheit der TAs ist, dass sie in der Lage sind, eine große Vielzahl von aromatischen und aliphatischen Aldehyden als Substrat zu akzeptieren. Am besten geeignet sind hier aromatische Aldehyde mit elektronenziehenden Gruppen (*electron withdrawing groups*) <sup>[37]</sup>. Threonin-Aldolasen können für die Synthese von multifunktionellen chiralen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ aminosäuren und für die enzymatische Racematspaltung genutzt werden <sup>[38] [39]</sup>. Desweiteren können sie auch in der bienzymatischen "Zwei-Schritt, ein-Topf Synthese" von  $\beta$ -Aminoalkoholen, basierend auf einer enantio- und diastereoselektiven Aldolreaktion gefolgt von einem Decarboxylierungs-Schritt durch eine L-Aminosäure-Decarboxylase, genutzt werden <sup>[40, 41]</sup>.

Ein Schlüsselmerkmal und Vorteil der Threonin-Aldolase (TA)-katalysierten asymmetrischen Synthese von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren ist die Bildung von zwei neuen Chiralitätszentren in einem Schritt, ausgehend von leicht zugänglichen prochiralen Molekülen<sup>[42]</sup>.

Die Aldolreaktion verläuft unter kompletter Kontrolle der Stereochemie am  $\alpha$ -C-Atom (unabhängig ob D- oder L-Enzym), aber mit unzureichender Stereoselektivität am  $\beta$ -C-Atom; die chiralen Produkte werden somit mit hoher Enantio-, aber sehr geringer Diastereoselektivität erhalten <sup>[37, 42, 43]</sup>.

Trotz der beeindruckenden Erfolge der TA-katalysierten Prozesse und obwohl die direkte deutlichen Nutzung von (nicht geschütztem) Glycin einen Vorteil gegenüber chemokatalytischen bietet Glycin), stellen unzureichende Ansätze (geschütztes Diastereoselektivitäten, Umsätze, Ausbeuten und volumetrische Produktivitäten immer noch Herausforderungen dieses enzymatischen Syntheseweges dar<sup>[42]</sup>.



Abb. 6: TA-katalysierte Bildung der vier verschiedenen Threonin-Isomere durch Aldolkondensation von Glycin und Acetaldehyd

#### 1.3.1.1 Biologische Funktion und Vorkommen der Threonin-Aldolasen

Threonin-Aldolasen kommen ubiquitär in der Natur vor, sie sind in einigen Pflanzen, Wirbeltieren, Bakterien, Hefen und Pilzen zu finden <sup>[44]</sup>. Sie gehören zur Gruppe der Pyridoxal-5-phosphat- (PLP) abhängigen Enzyme, welche die Spaltung von L- und L-*allo*-Threonin zu Glycin und Acetaldehyd im sekundären Glycin-Biosyntheseweg katalysieren. Sowohl L-Threonin als auch L-*allo*-Threonin können in der Natur gefunden werden <sup>[45]</sup>.

L-Threonin hat drei Abbauwege in lebenden Organismen:

Threonin kann durch die L-TA abgebaut werden, wobei Glycin und Acetaldehyd gebildet werden. Die L-Threonin-Deaminase <sup>[46]</sup> ist für die Bildung von 2-Ketobutyrat und Ammoniak verantwortlich ist und die L-Threonin-Dehydrogenase <sup>[47, 48]</sup> oxidiert L-Threonin unter Verwendung von NAD<sup>+</sup> zu 2-Amino-3-Ketobutyrat.

TAs konnten bisher aus einer Vielzahl von Bakterien und Hefen/Pilzen isoliert und charakterisiert werden und alle erwiesen sich als intrazelluläre Enzyme <sup>[43]</sup>. Sie werden unterteilt in D- und L- Enzyme hinsichtlich ihrer Stereochemie am  $\alpha$ -C Atom. Hinsichtlich ihrer Stereospezifität am  $\beta$ -C Atom von Threonin können sie weiterhin in drei Sub-Typen unterteilt werden: 1. spezifische TA, die nur Threonin umsetzt 2. *allo*-TA, die *allo*-Threonin umsetzt und 3. *low specificity*-TA (*low*-TA), die sowohl Threonin als auch *allo*-Threonin als Substrat akzeptiert. Bis heute konnten alle drei L-spezifischen Enzyme in verschiedenen

Mikroorganismen nachgewiesen werden, hinsichtlich der D-spezifischen Enzyme ist allerdings bis heute nur die D-*low specificity*-TA bekannt <sup>[43, 49]</sup>. Während L-*low*-TA-Aktivität in vielen verschiedenen Mikoorganismen gefunden werden kann, gibt es D-TA Aktivität nur in den Mikroorganismen *Arthrobacter* sp. und *Alcaligens xylosoxidans*. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über einige Mikroorganismen, die über ein aktives Enzym mit TA-Aktivität verfügen und ihre Stereoselektivitäten.

Enzym	Mikroorganisms	Stereoselektivität, Substrat de (%)	Literatur
L-TA	Pseudomonas putida	kinetisch $de > 30 \%$ three	
	NCIMB 10558	thermodynamisch de 21 % threo	[44]
L-TA	Pseudomonas	kinetisch (1 min) $de > 30\%$ three	[44]
	aeruginosa	thermodyn. (30 min) de 21% threo	
L-low-TA	E. coli	Thr: <b>de</b> 21% <i>threo</i> (10% Ausbeute)	[38, 50]
		PS (3 h - 3% Ausbeute): <b>de</b> 42% <i>threo</i>	
		PS (24h - 9% Ausbeute): de 20% threo	
SHMT	E. coli	L-allo-Threonin > 99 %	[50-51]
		L-Threonin < 1 %	
L-low-TA	Bordetella	Phenylserin: kinetisch <b>de</b> 70 % <i>ervthro</i>	[44]
	bronchiseptica 13414	thermodynamisch de -	
Phenylserine-	Pseudomonas putida	Phenylserin (threo/erythro) 2:1	[52]
Aldolase			
L-allo-TA	Aeromonas jandaei	Phenylserin: kinetisch <b>de</b> <i>ervthro</i>	[44]
	DK-39	thermodynamisch de 27 % threo	[53]
L-low-TA	Thermotoga maritima	Phenylserin: kinetisch <b>de</b> <i>erythro</i>	[44, 54]
	C	thermodynamisch de 20 % threo	
L-low-TA	Saccharomyces	Phenylserin: kinetisch <b>de</b> 40% <i>erythro</i>	[44]
	cerevisiae (gly1)	thermodynamisch de 22 % threo	
D-low-TA	Alcaligenes xylosoxidans	Phenylserin: kinetisch (1 h) $de > 85\%$ three	[44]
	IFO 12669	thermodynamisch (5 d) <b>de</b> 17% <i>threo</i>	
		• • • • •	
D-low-TA	Silicibacter pomeroyi	Phenylserin: kinetisch (5 min) $de > 20\%$ three	[44]
	(15171)	thermodynamisch (5 d) de 21% threo	
Alanin-	Geobacillus	D-Phenylserin spezifisch	[44]
Racemase	stearothermophilus		

 

 Tab.
 1: Übersicht über die literaturbekannten Angaben zu Diastereoselektivitäten von Enzymen mit TA-Aktivität.

#### 1.3.1.2 Selektivität und Substrat-Spektrum der TA-Reaktion

Die Selektivität der Bildung der beiden neuen Stereozentren der TA-Reaktion hängt von der kinetischen Selektivität des Enzyms (in kinetischer Kontrolle) und von dem thermodynamischen Gleichgewicht (in thermodynamischer Kontrolle) der Reaktion ab, aber auch stark von der Art des verwendeten Substrates sowie von Lösungsmittel- und Temperatureffekten. Erste Untersuchungen zum Substrat-Spektrum der Reaktion wurden durch die Gruppe um C.-H. Wong durchgeführt. Sie zeigten, dass Sauerstoff-Substituenten in  $\beta$ -Position des Aldehyds einen starken Einfluss auf die Diastereoselektivität haben, so konnten sie hohe Diastereoselektivitäten für die *erythro*-Verbindung mit einem d.r.-Wert von 98:2 (*erythro:threo*) erzielen <sup>[55]</sup>. Die Verwendung der LTA aus *E. coli* lieferte mit aliphatischen Aldehyden als Substrat hauptsächlich das *erythro*-Produkt, während die DTA mit aromatischen Aldehyden hauptsächlich die *threo*-Verbindung ergab.

Der entscheidende und somit limitierende Faktor der TA-Reaktion ist, dass die Stereoselektivitäten und Umsätze der Reaktion von thermodynamischen und kinetischen Faktoren abhängen. Hohe Diastereoselektivitäten können nur unter kinetischer Kontrolle erhalten werden, jedoch verbunden mit deutlich verminderten Umsätzen<sup>[38]</sup>. So zeigten Kimura et al., dass die Diastereoselektivität nach einer 3h Umsetzung für die erythro-Verbindung einen de-Wert von > 99% ergab, während er bei einer 24h-Umsetzung auf 86% für die *erythro*-Verbindung und 6% für die *threo*-Verbindung sank <sup>[38]</sup>. Die Veränderung der Umsatzzeit hat jedoch größeren Einfluss bei Verwendung der LTA als bei Verwendung der DTA bei Verwendung von Phenylserin als Substrat. Große Erfolge hinsichtlich der Diastereoselektivitäten ergaben sich durch Verwendung von substituierten Aldehyd-Derivaten. So konnte fluoriertes L-Threonin mit einer Ausbeute von 50% und einem de von 93% für die threo-Verbindung unter Verwendung einer L-spezifischen TA erhalten werden. Die Verwendung von DTAs lieferte sogar noch höhere Diastereomerenüberschüsse aufgrund des sich langsamer einstellendem thermodynamischen Gleichgewichtes. Die höchsten Diastereoselektivitäten einer TA-Reaktion wurden durch Nutzung von D-spezifischen Enzymen unter kinetischer Kontrolle mit einem de von bis zu 99% erzielt <sup>[37, 44]</sup>.

#### 1.3.1.3 Struktur der TA

Bisher konnte die Struktur der TA lediglich aus dem thermophilen Organismus *Thermotoga maritima* <sup>[54]</sup> aufgeklärt werden.

Kielkopf *et al.* kristallisierten sowohl das Apo-Enzym mit PLP als Cofaktor, als auch das Enzym mit gebundenem Substrat L-*allo*-Threonin und gebundenem Produkt Glycin. Das *T. maritima* Enzym ist eine *low specificity*-TA, die sowohl L-*allo*- als auch L-Threonin umsetzt, aber trotzdem eine 25-fach höhere Präferenz für die *allo*-Verbindung zeigt.

Das Enzym bildet ein Homotetramer mit dem via Schiff'sche Base über Lysin gebundenen Cofaktor PLP in der interdomänen Spalte, wobei jedes Monomer aus zwei  $\alpha/\beta$ -Domänen besteht. Die molekulare Masse einer Untereinheit ist bei fast allen TAs mit 35-40 kDa sehr ähnlich. Viele weitere bereits charakterisierte TAs und andere Enzyme derselben Familie bilden zumeist Tetramere. Die Oberfläche des Tetramers ist negativ geladen und die Oberflächen zwischen den Untereinheiten sind weitgehend hydrophob oder es werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hauptkettenatomen und Wassermolekülen gebildet.

Die Struktur enthält verschiedene gebundene Calcium- und Chlorid-Ionen, die scheinbar zur Katalyse und Oligomerisierung beitragen. Die Chlorid-Ionen stabilisieren die Interaktionen zwischen den Untereinheiten und sind somit für die Ausbildung einer tetrameren Struktur verantwortlich. Jedes Chlorid-Ion ist durch die Stickstoff-Atome von Arginin (Arg72) aus der Hauptkette jeder Untereinheit, sowie durch zwei Wassermoleküle koordiniert. Die direkte Koordination eines Restes in der Nähe des Lysins (Lys199) im aktiven Zentrum mit der Hauptkette deutet darauf hin, dass gebundene zweiwertige Metallionen die genaue Lokalisierung der PLP-Einheit über die Polypeptidkette beeinflussen können. Das Substrat Threonin kann durch die Anwesenheit von zwei katalytischen Histidin-Resten (His83 und His125) und gebundenen Wassermolekülen in der Nähe des aktiven Zentrums stabilisiert werden. Die Interaktion mit dem L-*allo*-Threonin scheint jedoch stärker zu sein, da die Affinität des Enzyms zu diesem Isomer deutlich höher ist. Die beiden Histidinreste stammen aus verschiedenen Untereinheiten. Zwischen der Hydroxylgruppe des L-*allo*-Threonins und dem Histidin der zum aktiven Zentrum gehörenden Untereinheit (His83), sowie Wassermolekülen, werden Wasserstoffbrücken ausgebildet.

Währenddessen lassen Modellierungsversuche vermuten, dass L-Threonin von einem Histidin einer zweiten Untereinheit (His125) stabilisiert wird, nur dass diese Stabilisierung mit geringerer Präferenz stattfindet <sup>[54]</sup>. Dieses Histidin kann jedoch nicht mit dem *allo*-Isomer binden. Für die Unterscheidung von L- und L-*allo*-Isomer könnte auch noch ein Tyrosin im aktiven Zentrum verantwortlich sein (Tyr87). Die gebundenen Wassermoleküle können mit

der negativ geladenen Phosphatgruppe des PLP interagieren und die Methylgruppe des Lallo-Threonins durch hydrophobe Kontakte mit einem im aktiven Zentrum befindlichen Tyrosin (Tyr87) erkannt werden. Dieses Tyrosin ist somit vermutlich für Unterscheidung von L- und L-allo-Isomer verantwortlich <sup>[54]</sup>. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die sterische Größe des Restes in Position 87 verantwortlich für die Stereospezifität des Enzyms ist; so bewirken große sterische Reste eine höhere *allo*-Spezifität. Die TA aus *P. aeruginosa*, die keinen aromatischen Aminosäurerest an dieser Position besitzt hat hingegen eine deutliche Präferenz für L-Threonin. Ein Histidin ist ebenfalls für die Stabilisierung des PLP Cofaktors über eine  $\pi$ - $\pi$  Verbindung mit dem Ringsystem beteiligt <sup>[54]</sup>.



Abb. 7: Struktur der TA aus T. maritima nach Kielkopf et al. [54]

#### 1.3.1.4 Katalysemechanismus TA

Ausgangspunkt der Katalyse der Threonin-Aldolase ist die Bindung des Cofaktors PLP via Schiff'scher Base an den Lysinrest im aktiven Zentrum des Enzyms, wodurch sich ein internes Aldimin ausbildet. Die Enyzm-Katalyse beginnt mit der Bildung eines externen Aldimins zwischen dem Substrat - in der folgenden Abbildung D- $\beta$ -Phenylserin - und dem gebundenen Cofaktor PLP, wobei das Substrat den Lysinrest am C4-Kohlenstoffatom des PLP-Rings ersetzt. Im Folgenden wird in einer Retro-Aldolspaltung das Aldimin unter Freisetzung des Aldehyds (hier Benzaldehyd) und dem PLP-Glycin-Komplex (Quinonoid-Komplex) unter Basenkatalyse gespaltet. Hier wird vermutet, dass der Imidazolring eines Histidins im aktiven Zentrum die Funktion der Base übernimmt und das Proton der Hydroxylgruppe abspaltet. Die Protonierung des  $\alpha$ -Kohlenstoffs von Glycin setzt anschließend Glycin frei und regeneriert die interne Schiff-Base <sup>[54]</sup>.



Abb. 8: Katalysemechanismus der TA-katalysierten Retro-Aldolreaktion mit D-β-Phenylserin als Substrat.

#### 1.3.2 Serinhydroxymethyltransferasen (SHMT)

Es sind weitere Enzym-Klassen bekannt, die TA-Aktivität zeigen, so z.B. die Serin-Hydroxymethyltransferasen (SHMT)<sup>[57]</sup> oder auch die spezifische Phenylserin-Aldolase und Alanine-Racemase<sup>[37, 58]</sup>.

Die SHMT ist ein Pyridoxal-5-phosphat-abhängiges Enyzm, das die reversible Umwandlung von L-Serin und Tetrahydrofolat (THF) in Glycin und 5,10-Methylen-THF katalysiert. 5,10-Methylen-THF ist die zentrale Ausgangsverbindung für den Transfer eines C-Atoms für die Pyrimidinsynthese und für den Methylierungszyklus. Somit spielt die SHMT eine wichtige Rolle im Kohlenstoffmetabolismus, da die Reaktion als Haupt-Lieferant für C1-Körper dient, die für die Synthese von Purinen, Thymidylaten, Methionin und vielen Neurotransmittern benötigt werden <sup>[59]</sup>. SHMT katalysiert außerdem die THF-unabhängige Retroaldolspaltung von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren wie *allo*-Threonin und  $\beta$ -Phenylserin in Glycin und den irreversible entsprechenden Aldehvd, sowie die Umwandlung von 5.10-Methenyltetrahydrofolat zu 5-Formyltetrahydrofolat<sup>[59]</sup>, Transaminierungen, Racemisierungen und Decarboxylierungen<sup>[50, 60]</sup>.

Die SHMT ist in der Natur weit verbreitet, man findet sie in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren. Das Enzym existiert in Wirbeltieren sowohl in cytoplasmatischer als auch in mitochondrialer Form, die von verschiedenen Genen kodiert werden, wogegen in Prokaryoten nur eine Form gefunden werden konnte [61, 62]. Lange Zeit wurde spekuliert, ob TA- und SHMT-Aktivitäten von ein und demselben Protein katalysiert werden. In einigen Organismen sind SHMTs diskrete Enzyme, die SHMT aus Rattenleber z.B. zeigt keinerlei TA-Aktivität <sup>[63]</sup>. Bis heute ist nur ein Enzym mit sowohl LTA-Aktivität als auch SHMT-Aktivität bekannt, nämlich aus dem Organismus Streptococcus thermophilus [64]. LTAs können abhängig von Umgebung in der Nähe des aktiven Lysin-Restes im aktiven Zentrum in zwei Typen klassifiziert werden, zum einen in Enzyme mit LTA- und SHMT- Aktivität und zum anderen in Enzyme mit LTA- aber ohne SHMT-Aktivität. Es treten zwei verschiedene konservierte Aminosäure-Motive; das Motiv "TTTTHKTL" in der Nähe der PLP-Cofakor Bindestelle ist für SHMT Aktivität und L-allo-Spezifität typisch, während das Motiv "ICLSKGLG", welches weiter entfernt von der PLP-Bindestelle vorzufinden ist, im Vergleich zu Proteinen mit TA Aktivität einheitlich auftritt und auf L-low specificity-TA Spezifität, d.h. den Verlust der Stereoselektivität, hinweist<sup>[49]</sup>.



Abb. 9: Vergleich von Threonin-Aldolase und Serin-Hydroxymethyl-Transferase Reaktion in der Biosynthese von Glycin.

### 1.4 β-Hydroxy-α-aminosäuren

Chirale  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren sind bedeutende strukturelle Motive für die Produktion von vielen bioaktiven Komponenten. Die chemische Synthese ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der lang und ineffizient ist, die Einführung von Schutzgruppen beinhaltet, meist chirale Hilfsstoffe und starke Säure oder Base-Katalysatoren benötigt und nur unzufriedenstellende Stereoselektivitäten liefert <sup>[65]</sup>. Die direkte enzymkatalysierte, enantioselektive Aldolreaktion von Glycin und einer Aldehydkomponente führt zur Bildung einer neuen C-C-Bindung und erzeugt zwei neue stereogene Zentren in einem Schritt. Dies ist eine der attraktivsten und effizientesten Methoden zur Synthese von solchen chiralen Bausteinen, die als Schlüsselintermediate für eine Vielzahl von folgenden Reaktionen verwendet werden können <sup>[66]</sup>.

β-Hydroxy-α-aminosäuren können für die Produktion von verschiedenen Wirkstoffen wie Antibiotika oder Immunsupressiva sowie von Agrochemikalien eingesetzt werden und sind wichtige Bestandteile von Peptiden und verwandten Komponenten sowie anderen komplexen Naturstoffen <sup>[67]</sup>. Sie dienen als nützliche Vorstufen und chirale Hilfsstoffe in der Organischen Synthese. So kann die β-Hydroxy-α-aminosäure Methylthiophenylserin (MTPS), ein L-*threo*-Phenylserin-Derivat, für die Synthese der Antibiotika Thiamphenicol und Florfenicol eingesetzt werden; L-*threo*-3,4-Dihydroxyphenylserin (L-threo-DOPS) spielt eine große Rolle in der Behandlung von Parkinson <sup>[38, 39, 68, 43, 69]</sup>. Das Threonin-Derivat 4-Hydroxythreonin ist ein wichtiger Baustein für Rizobitoxine, einem Inhibitor von PLP-abhängigen Enzymen. Aber auch in dem Prozess der chemischen Racemat-Spaltung werden TAs industriell angewendet <sup>[38]</sup>. Es gibt jedoch einige Limitierungen in der Synthese von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren. Wie bereits beschrieben, können  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren zwar mit exzellentem *ee* aber nur sehr geringem d.r.-Wert gebildet werden. Hohe d.r.-Werte können nur unter kinetischer Kontrolle und Konditionen weit entfernt vom Equilibrium, jedoch mit limitierender Ausbeute erhalten werden <sup>[44]</sup>. Daher wären Methoden, die die Stereochemie nicht nur an C- $\alpha$ , sondern auch an C- $\beta$  der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren kontrollieren, von großem Nutzen für die chemische Industrie.



Abb. 10: Chirale Bausteine basierend auf  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren
### 1.4.1 Enzym katalysierte Synthese von enantio- und diastereomerenreinen β-Hydroxy-αaminosäuren

Über die vergangenen Jahre hat die Anwendung von TAs als Katalysatoren für die Synthese von β-Hydroxy-α-aminosäuren zunehmend an Interesse gewonnen. Einen chemischen Prozess, der industriell in großem Maßstab für die Synthese eines diastereomeren-angereicherten Racemats einer β-Hydroxy-α-aminosäure eingesetzt wird, findet man in der Multi-Stufen-Produktion des Antibiotikums Thiamphenicol (Zambon Prozess<sup>[70]</sup> Abb. 11). Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten einer enzymatischen Synthese von β-Hydroxy-α-aminosäuren: Die Synthese über enzymatische Racematspaltung (enzymatic resolution) und die asymmetrische Direkt-Synthese<sup>[71]</sup>.



Abb. 11: Zambon Prozess für die chemische Synthese von Thiamphenicol<sup>[70]</sup>

#### 1.4.1.1 Die enzymatische Racemat-Spaltung

Für eine hohe Attraktivität einer enzymatischen Synthese enantiomerenreiner  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ aminosäuren ist eine ökonomische, chemische Synthese des erforderlichen Racemats Vorraussetzung, welches dann enzymatisch getrennt wird.

Für die Synthese racemischer β-Hydroxy-α-aminosäure wurde eine Reihe von chemischen Prozessen etabliert, die auf der Nutzung starker Säure oder Base-Katalysatoren basieren. Das Konzept für die enzymatische Spaltung durch Nutzung von TAs, besteht aus einer enantioselektiven Spaltung der diastereomerenreinen racemischen β-Hydroxy-α-aminosäure. Das gewünschte Produkt, das das übrigbleibende Enantiomer darstellt, wird sofort isoliert und die Nebenprodukte Glycin und Aldehyd können recycled werden und für die folgende chemische Synthese des gewünschten racemischen Substrates für den nächsten Schritt wieder in den Prozess einfließen <sup>[43]</sup>. So kann durch den Einsatz einer D-spezifischen TA (D-*low specificity* TA) aus einem Gemisch von D,L-*threo*-Methylthiophenylserin (MTPS) das L-Enantiomer erhalten werden, da die D-TA das D-Enantiomer kontinuierlich durch Spaltung aus dem Prozess entfernt und so das Reaktions-Gleichgewicht auf die Produktseite zugunsten des L-Enantiomers verschiebt, dies wird durch das Entfernen der Spaltprodukte noch verstärkt (Abb. 12). Ein wesentlicher Nachteil dieser Synthesemethode ist die maximale Ausbeute von nur 50% durch Separation. Liu *et al.* konnten aus 200 mM D,L-*threo*-MTPS 100mM enantiomerenreines L-Produkt mit 50% Ausbeute und einem *ee* von 99,6% erhalten <sup>[72]</sup>.

Doch auf der anderen Seite macht der einfache Zugang zu den diastereomerenreinen racemischen Substraten diese enzymatische Spaltung attraktiv, insbesondere da dies den Einsatz von TAs mit geringer Diastereoselektivität ermöglicht (das ist bei den meisten TAs der Fall). Darüber hinaus stellt diese Art der Threonin-Aldolase-katalysierten Spaltung eine interessante Alternative zu den entwickelten industriellen chemischen Verfahren dar, die den Schutz der Aminogruppe der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäure, die chemische Auflösung, sowie die Abspaltung der Aminogruppe und schließlich das Recycling von nicht-reaktiven Rückständen umfasst. Nachteile, wie ineffiziente chemische Spaltung, den Schutzund Entschützungsschritt und die Nutzung großer Mengen organischer Lösungsmittel werden mit dem Prozess der enzymatischen Spaltung vermieden<sup>[43]</sup>.



Abb. 12: Enzymatische Spaltung von D,L-threo-MTPS unter Verwendung einer D-spezifischen TA.

#### 1.4.1.2 Die asymmetrische Direktsynthese

Die Verwendung von Threonin-Aldolasen in der asymmetrischen Synthesereaktion ausgehend von prochiralen Verbindungen bietet einen attraktiven Syntheseweg zu ß-Hydroxy-α-aminosäuren mit (theoretisch) vollständigem Umsatz. Ein solch höherer (potenzieller) Umsatz ist der wichtigste Vorteil gegenüber dem Konzept der enzymatischen Spaltung. Dass in der enantio- und diastereoselektiven biokatalytischen Aldolreaktion von Glycin und einem Aldehyd zwei stereogenen Zentren in einem Schritt gebildet werden, macht diesen Weg zusätzlich attraktiv. Während das stereogene Zentrum am α-Kohlenstoffatom mit ausgezeichneter Selektivität gebildet wird, ist die Selektivität am β-Kohlenstoffatom jedoch gering. Dies stellt sicherlich einen großen Nachteil im Vergleich zum Prozess der enzymatischen Spaltung dar (basierend auf der Verwendung diastereomerenreiner Racemate), der zuvor diskutiert wurde. Die Notwendigkeit eines großen Überschusses von Glycin ist ein weiterer Nachteil eines solchen asymmetrischen Verfahrens. Für eine lange Zeit gab es eine weitere Einschränkung der asymmetrischen Prozesse mit Threonin-Aldolasen, nämlich die Annahme, dass nur Glycin als Aminosäure-Donor für diese Aldolreaktion akzeptiert würde; jedoch wurde diese Einschränkung durch Arbeiten der Griengl-Gruppe überwunden. Es sind mittlerweile TA-Reaktionen bekannt, bei denen auch Serin, Alanin und auch Cystein als Donor-Molekül eingesetzt werden können <sup>[37, 73]</sup>. Ungeachtet der wichtigen Beiträge auf diesem Gebiet müssen die niedrigen bis mittleren Diastereoselektivitäten (im Vergleich zu der hervorragenden Enantioselektivität am a-Kohlenstoff) dieser Biotransformation noch erheblich verbessert werden. Die Selektivität der Bildung der beiden neuen Stereozentren hängt von der kinetischen Selektivität des Enzyms und vom thermodynamischen Equilibrium der reversiblen Aldolreaktion ab (in thermodynamisch kontrollierten Reaktionen). Darüber

hinaus benötigt man, um einen ausreichend hohen Umsatz für die Aldolreaktion von Glycin mit einem Aldehyd zu erzielen, einen hohen Überschuss an Glycin (10 Äquivalente), um das Gleichgewicht in Richtung der Produktseite zu verschieben <sup>[44, 46, 74]</sup>.

#### 1.5 Screening nach neuen Enzymen

Die Erschließung neuer Enzyme, die eine Alternative zu den chemischen Produktions-Verfahren mit all ihren Nachteilen darstellen, ist nach wie vor eine große Herausforderung. Durch Nutzung von Biokatalysatoren sollen die chemischen Verfahren nicht nur nach und nach ersetzt, sondern diese auch in ihrer Effizienz übertrumpft werden. Die Effizienz einer Vielzahl von industriell genutzten chemischen Prozessen/Produktionsverfahren ist zum großen Teil noch unzufriedenstellend und stark limitiert durch eine Vielzahl von Synthese-Stufen, durch den Einsatz organischer Lösungsmitteln oder starker Säure/Base Katalysatoren, sowie durch die Verwendung von Schutzgruppen-Chemie und die Entsorgungskosten von anfallenden Nebenprodukten. Somit ist der Bedarf an neuen Katalysatoren, die all diesen Limitierungen nachkommen, für die Industrie von großem Interesse. Bei der Suche nach neuen Biokatalysatoren können verschiedenste Ressourcen genutzt werden. Es wurde hierbei die Aussage "You only get what you screen for" geprägt. Ein Zugang zu neuen Enzymen liefert die Vielzahl von kultivierbaren Mikroorganismen, die in Stammsammlungen angelegt wurden, z.B. DSMZ Stammsammlung. Diese Mikroorganismen sind leicht verfügbar und können oft mit Standard-Techniken in jeweiligem Vollmedium im Labor kultiviert werden und so die Enzyme für die zu untersuchende Reaktion isoliert werden. Jedoch ist solch ein Screening meist sehr umfangreich, beginnend mit den verschiedenen, meist für jeden Organismus recht spezifischen, komplexen Medien. Außerdem kann die Zusammensetzung der Medien die Gen-Expression nachteilig beeinflussen.

Durch Datenbankanalyse, ein sogenanntes *in Silico*-Screnning, kann mit bereits bekannten Daten nach ähnlichen Sequenzen in einer Datenbank gesucht werden, um potenzielle Enzyme zu identifizieren. Ausgehend von bereits bekannten Sequenzen oder Teilsequenzen mit den gewünschten Anforderungen kann so nach putativen Enzymen gesucht werden, die aufgrund einer Sequenzähnlichkeit die gleichen oder verbesserte Merkmale aufweisen. Hierdurch können jedoch keine komplett neuen Enzyme gefunden werden, sondern nur auf bereits vorhandene, veröffentlichte Sequenzen zurückgegriffen werden. Da die Anzahl bereits verfügbarer Enzyme nur gering ist, liefert die Diversität und Variabilität der Mikroorganismen in der Natur ein großes Potential für die Identifizierung vollkommen neuartiger Enzyme<sup>[75]</sup>. Der Großteil von Mikroorganismen ist bis heute nicht identifiziert und das enorme Potential somit noch unerschlossen. Laut Schätzung soll die Diversität an verschiedenen Arten im Bereich von bis zu 10<sup>7</sup> liegen<sup>[76]</sup>, jedoch sollen bis jetzt nur rund 5000 Arten charakterisiert sein<sup>[77]</sup>. Es wäre somit von enormer Bedeutung, diese Mikroorganismen im Labor zu kultivieren und die Enzyme zu isolieren, zu identifizieren und zu nutzen. Jedoch ist nur ungefähr 1 % der vorkommenden Mikroorganismen aus Umweltproben im Standard-Labormaßstab kultivierbar<sup>[77]</sup> und bietet so nur einen winzigen Einblick in das vorhandene Potential. Eine Alternative, die sich mit der gesamten unkultivierbaren Vielfalt einer Umweltprobe beschäftigt, ist der Metagenomansatz (s. Absatz 1.5.1).

Zusätzlich zum Screening nach neuen Enzymen bietet die Anpassung von bereits bekannten Enzymen an geforderte Prozessbedingungen durch "protein-engineering" eine weitere Möglichkeit in ihren Eigenschaften verbesserte Enzyme zu erhalten. Hier kann zwischen dem rationalem Protein-Design und der gerichteten Evolution unterschieden werden <sup>[78, 79]</sup>.

Die gerichtete Evolution ahmt das Darwin'sche Prinzip von Mutation und Selektion nach und ist eine schnelle und kostengünstige Methode, um neue Varianten bestehender Enzyme zu finden, die besser funktionieren als die natürlich vorkommenden Wildtyp-Enzyme<sup>[12, 79, 80,</sup> <sup>81]</sup>. Ein für ein Enzym kodierendes Gen, das in seinen Eigenschaften verbessert werden muss, wird durch in vitro-Mutagenese verändert, so dass eine Vielzahl an Enzym-Varianten entsteht. Diese Varianten können anschließend durch Screening untersucht werden, um die Variante des Mutationsdurchgangs (Mutagenese) zu finden, die vorteilhaftere Eigenschaften aufweist. Dazu wird die Population von Mutanten geklont und in einem geeigneten Wirt überexprimiert, um anschließend viele Klone auf Aktivität des zu untersuchenden Enzyms zu testen. Der gesamte Vorgang von Mutagenese, Screening und Selektion kann hierbei so oft wie notwendig wiederholt werden, um immer besser geeignete Varianten bezüglich einer Reaktion hervorzubringen. Die Mutationsvorgänge müssen verschiedene Eigenschaften aufweisen, um als geeignet eingestuft zu werden. Einerseits muss ein ungezielter, statistischer Austausch von Aminosäuren stattfinden, andererseits müssen die Mutationsrate und verteilung kontrollierbar sein. Heutzutage scheinen evolutionäre Methoden der fruchtbarsten Ansatz für die Entwicklung neuer kommerzieller Biokatalysatoren zu sein. Aber auch die Fähigkeiten des rationalen Designs, insbesondere computergestützter Techniken und das 'de novo-Design' sind ausbaufähig und gewinnen immer mehr an Bedeutung <sup>[82]</sup>. Das rationale Protein-Design basiert auf bereits vorhandenen Kenntnissen über die Struktur und den

Reaktionsmechanismus eines Enzyms, um durch computergestützte Modelle Vorhersagen über die Art der einzuführenden Veränderungen treffen zu können. Anschließend können diese Vorhersagen durch ortsspezifische Mutagenese und eine biochemische Charakterisierung experimentell überprüft und die vorhandenen Enzyme auf diesem Wege optimiert werden<sup>[82]</sup>.

#### 1.5.1 Der Metagenom Ansatz

Der Begriff Metagenom umfasst die Gesamtheit der genetischen Information aller Mikroorganismen eines Habitats zu einem definierten Zeitpunkt und wurde erstmals von [83] Der Handelsman im Jahr 1998 geprägt Metagenomansatz stellt eine kultivierungsunabhängige Methode zur Isolierung und Identifizierung von unbekannten Mikroorganismen und ihrer Vielzahl von Genen dar. In einer Bodenprobe befinden sich bis zu 10.000 verschiedene Mikroorganismen, deren Vielfalt und genetisches Potential somit zugänglich gemacht werden kann<sup>[84]</sup>. Zur Identifizierung der Enzyme können sequenzbasierte und funktionsbasierte Screeningmethoden genutzt werden. Beim sequenzbasierten Ansatz wird entweder von konservierten Regionen im Vergleich zu bereits bekannten Enzymen ausgegangen und unter Verwendung degenerierter Primer die Gene amplifiziert, die für die entsprechenden Enzyme kodieren, oder die metagenomische DNA wird in kleinen Fragmenten in "Shotgun"-Vektoren kloniert und anschließend sequenziert ("gene-mining"). Desweiteren nutzt man Hybridisierungstechniken oder die Microarraymethode für sequenzbasiertes Screening. Da das sequenzbasierte Screening auf Homologie beruht, können so keine vollkommen neuen Enyzme identifiziert werden und trotz Sequenzähnlichkeit ist eine Funktionalität nicht garantiert<sup>[85]</sup>.

Beim funktionsbasierten Screening werden ganze Metagenombanken auf Enzymaktivität durch Expression der Enzyme im heterologen Wirt getestet. Dazu werden DNA-Fragmente durch partiellen Verdau der metagenomischen DNA erzeugt, welche theoretisch der Gesamtheit aller im Habitat vorhanden Genome entsprechen, und in geeignete Vektoren mit hoher Kopienzahl kloniert. Man unterscheidet zwischen sogenannten "small-insert" oder "medium-insert" Bibliotheken (2-15 kb) und den "large-insert" Bibliotheken in Cosmid- oder Fosmid-Vektoren bzw. in BACs (bis 150 kb), die in der Lage sind sehr große DNA-Fragmente aufzunehmen. Durch Verwendung der "large-insert" Bibliotheken ist es möglich, auch gesamte Operons oder Strukturgene zu identifizieren, jedoch ist die Expression im Gegensatz zu den "small-insert" Bibliotheken, die einen starken Promotor aufweisen, eher

gering. Die so entstandene DNA-Bank kann anschließend in einen im Labor zu kultivierenden Mikroorganismus wie *E. coli* transformiert, die Proteine exprimiert und so die enthaltenen Enzyme identifiziert werden <sup>[83, 86]</sup>. Hierbei benötigt man jedoch geeignete Hochdurchsatz-Screenings, um die gewünschte Aktivität zu messen und außerdem ist die Screening-Effizienz limitiert. Aus tausenden charakterisierten Klonen können meist nur wenige positive identifiziert werden.

Das Metagenom bietet aufgrund seiner Diversität und Vielzahl von Mikroorganismen ein enormes Potential an neuartigen Enzymen mit vielversprechenden Eigenschaften. Je mehr Gene durch die metagenomsiche DNA kodiert werden, desto größer ist die Möglichkeit, diese zu erschließen. Auf der Suche nach neuen Enzymen für eine bestimmte Reaktion kann es sinnvoll sein, sich ein Habitat auszusuchen, das bereits mit Mikroorganismen einer bestimmten Art und gewissen Eigenschaften angereichert ist, da diese aufgrund der natürlichen Bedingungen dort besonders gut angepasst sind. Die Diversität eines Habitats kann durch viele Faktoren beeinflusst werden, so z.B. durch äußere Quellen, wie ein hohes Vorkommen von Chemikalien (Industriegelände), oder Pestizide und Gasansammlungen. Aber auch im Labormaßstab kann man sich dieses Prinzip zu nutzen machen, indem man Mikroorganismen eines bestimmten Habitats mit speziellen Eigenschaften gezielt mit gewünschtem Substrat anreichert.

Habitat	Kultivierbarkeit [%]
Boden	0,3
Sediment	0,25
Süßwasser	0, 1 - 0, 5
Meerwasser	< 0,1
Belebtschlamm	3 - 15

Tab. 2: Anteil der kultivierbaren Bakterien in der Gesamtbakterienzahl<sup>[41]</sup>.

#### 1.5.2 Anreicherung von Mikroorganismen aus Umweltproben

Die Wahl der Bestandteile eines Komplexmediums kann die Art und Häufigkeit der durch Kultivierung erfassbaren Mikroorganismen deutlich verändern. Dieser Effekt kann auch zur Anreicherung spezifischer Organismen angewandt werden, um aus der Vielzahl von Mikroorganismen diejenigen zu identifizieren, die Biokatalysatoren mit den gesuchten Eigenschaften besitzen. Den Mikroorganismen wird als einzige Nährstoffquelle ein Substrat zur Verfügung gestellt, das sie nur dann verwerten können, wenn sie einen geeigneten Biokatalysator besitzen<sup>[87]</sup>.

Medienkomponenten, deren Konzentration, der pH-Wert oder die Zugabe von Hemmstoffen in Kombination mit den Inkubationsbedingungen (Sauerstoffpartialdruck, Temperatur, Lichtverhältnisse) sind nur einige Parameter, die zur Anreicherung spezifischer Gruppen von Mikroorganismen eingesetzt werden können. Soll eine Anreicherung unter definierten Bedingungen erfolgen, so werden häufig Minimalmedien verwenden. Die Zusammensetzung dieser Medien ist bekannt, bis ins Detail definiert und enthält die Bestandteile, die die Mindestansprüche für das Wachstum der betreffenden Mikroorganismen erfüllen. Minimalmedien bestehen aus anorganischen Salzen als Stickstoff- und Schwefelquelle, Magnesium- und Eisensalzen, einer C-Quelle und im Bedarfsfalle weiteren Zusätzen, wie Vitaminen oder z.B. organischen N-Verbindungen. Häufig werden auch die Spurenelemente, wie Kupfer, Kobalt, Zink und Mangan in definierter Konzentration zugesetzt. Durch Zugabe einer gezielten Nährstoffquelle (C- oder N-Quelle) in einem Minimalmedium können selektiv Mikroorganismen angereichert werden, die in der Lage sind, diese Nährstoffquelle zu nutzen. Nur die Mikroorganismen, die in der Lage sind, diese Nährstoffquelle zu metabolisieren, sind auch in der Lage sich zu vermehren. Idealerweise wählt man hier das Substrat der zu untersuchenden Enzymreaktion als Nährstoffquelle aus, das im Idealfall durch Vorhandensein eines Gens für ein solches Enzym in der gewünschten Reaktion umgesetzt werden kann. Die folgende Abbildung 13 zeigt ein Übersichts-Schema für die Anreicherung von Mikroorganismen aus Bodenproben.



Abb. 13: Schematische Darstellung der Anreicherung von Mikroorgansimen aus Bodenproben.

#### 1.6 Identifizierung von unbekannten Mikroorganismen

Die Sequenzierungstechnik von Nukleinsäuren stellt eine dringend benötigte phylogenetische Perspektive in der Mikrobiologie dar, um Mikroorganismen zu vergleichen und zu klassifizieren. Da die Analyse phylogenetisch ist, werden die Mitglieder einer Population mit bereits bekannten Mikroorganismen im Hinblick auf ihre grundlegenden biochemischen Eigenschaften und ihr Potenzial verglichen<sup>[88]</sup>. In den 80er Jahren entwickelten Lane *et al.* einen neuen Zweig der mikrobiellen Ökologie, indem sie die direkte Analyse von 5S (~ 120 Nukleotide) und 16S-rRNA (~ 1600 Nukleotide) Gen-Sequenzen aus der Umwelt nutzten, um die Diversität der Mikroorganismen einer Umweltprobe ohne Kultivierung zu beschreiben<sup>[89]</sup>. Der Durchbruch kam durch Weiterentwicklung der PCR-Technik und das Design von universellen Primern, die einen Zugang zu den gesamten Genen ermöglichten. Bei der Beurteilung der Verwandtschaft der Mikroorganismen untereinander durch Vergleich ihrer 16S-rRNA-Sequenzen ist es jedoch nicht wichtig die vollständigen Sequenzen der Moleküle zu ermitteln. Zur Identifizierung von Mikroorganismen aus Bodenproben kann so mittels PCR, ausgehend von der genomischen DNA der gesamten Probe, die für jeden Mikroorganismus spezifische 16S-rDNA amplifiziert werden und über diese spezifische Sequenz mithilfe von Datenbank-Analyse eine Stammidentifizierung vorgenommen werden. So gelang Pace et al. erstmals durch Amplifizierung der 16S-rRNA und Klonierung des gesamten Metagenoms, einen charakteristischen Stammbaum für dieses Habitat (marines Picoplankton) zu erhalten <sup>[90]</sup>. Heutzutage ist die Sequenz der 16S- bzw. 18S-rRNA, bzw. deren Gene (rDNA), von mehr als 18.000 prokaryotischen und eukaryotischen Organismen bekannt, die als Grundlage zur Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen dienen können. Es gibt einige Gründe, die dafür sprechen, sich bei der Analyse einer mikrobiellen Population auf die rRNA zu fokussieren. Die rRNA ist als Schlüsselelement der Proteinsynthese funktional und evolutionär in allen Organismen gleich. Der Vorteil der 16SrRNA für phylogenetische Analysen ist, dass diese ubiquitär mit hoher Kopienzahl vorkommt, über konservierte und variable Bereiche verfügt und eine sehr große Datenbank zum Vergleich verfügbar ist <sup>[88]</sup>. Die folgende Abbildung zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, basierenden auf 16S-rRNA-Analyse nach Handelsmann et al., der sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare Bakterien Stämme beinhaltet. Mindestens die Hälfte der dargestellten Gruppen wird durch Sequenzen von nicht-kultivierbaren Bakterien ausgemacht <sup>[91]</sup>.



Abb. 14: Phylogenetischer Stammbaum der Bakterien von kultivierten und unkultivierbaren Gruppen<sup>[91]</sup>.

#### 1.7 Hochdurchsatz Screeningmethoden

Zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Biokatalysatoren ist eine geeignete Hochdurchsatz-Screening-Methode (HTS) notwendig. Konventionelle Methoden basieren auf einem Screening auf Agar-Platten oder Mikrotiter-Platten durch physikalische Separation und individuelle Assays. Beim Screening auf Agar-Platten kann die Identifizierung meist leicht durch Betrachtung der Morphologie der gewachsenen Kolonien erfolgen. So gibt z.B. die Hofbildung oder ein Farbumschlag Auskunft über eine bestimmte enzymatische Reaktion. Der Nachweis von Protease-Aktivität kann auf *skim milk*-Agar erfolgen, Amylase-Aktivität kann auf Stärke-Agar nachgewiesen werden und Lipase-Aktivität auf Tributyrin-Agar. Auf diese Art können tausende Klone parallel auf Platten analysiert werden und ein Screening ganzer Gen-Banken ist möglich. Während einige Enzymklassen durch relativ einfache Platten-Tests gezielt auf Aktivität in hohem Durchsatz getestet werden können, gibt es für viele Enzyme keine geeignete HTS-Methode, die direkt auf die Aktivität schließen lässt.

Eine vielversprechende Alternative zu den herkömmlichen Methoden liefert die Verwendung von Selektions-Systemen in bestimmten Selektions-Stämmen. So kann z.B. der Stamm Pseudomonas putida KT2440 wachstums-induziertes Selektions-System als zur Identifizierung neuer Threonin-Aldolase-Gene genutzt werden. Dieser Stamm ist in der Lage, auf Benzaldehyd, dem Spaltprodukt der TA-Reaktion von Phenylserin, zu wachsen. im Mandelat-Abbauweg von P. putida KT2440 vollständig Benzaldehyd kann verstoffwechselt und zu Acetyl-CoA abgebaut werden. Wenn dieser Selektions-Stamm als Transformationswirt zum Durchmustern von Genom-Banken verwendet wird, zeigt das Wachstum des Stammes bei Kultivierung auf Minimalmedium mit dem Substrat Phenylserin als alleiniger Kohlestoff-Quelle das Vorhandensein eines intakten TA Gens innerhalb der Genom Bank an, da nur dieser Transformand anwächst (Abb. 15).



Abb. 15: Schema zur Identifizierung via Selektion in *P. putida* KT2440.

# Zielsetzung

β-Hydroxy-α-aminosäuren sind bedeutende chirale Bausteine für die Synthese biologisch aktiver Moleküle, die in den letzten Jahren für die chemisch industrielle Prozesse, besonders für die aufstrebende "weiße Biotechnologie", an steigendem Interesse gewonnen haben. Ein Zugang zu dieser wichtigen Substanz-Klasse bieten die Threonin-Aldolasen und Enzyme mit TA-Aktivität, da sie in der Lage sind, die stereoselektive C-C Knüpfung unter Entstehung zweier neuer Chiralitätszentren in einem einzelnen Schritt zu katalysieren. Bis dato sind eine Vielzahl von Enzymen mit Threonin-Aldolase-Aktivität aus verschiedesten Organismen bekannt, wobei besonders die L-spezifischen Enzyme für die Synthese der β-Hydroxy-L-αaminosäuren von Bedeutung sind. Jedoch gibt es einige Limitierungen der Threonin-Aldolase-Reaktion, so z.B. die meist unzureichenden Umsätze und Ausbeuten und die geringen Diastereoselektivitäten im Vergleich zu exzellenten Enantioselektivitäten. Ziel dieser Arbeit ist es neue, verbesserte Enzyme mit optimierter Diastereoselektivität für die Synthese von chiralen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren zu finden und somit den Limitierungen der konventionellen chemischen Synthese-Prozesse nachzukommen, um diese nach und nach zu ersetzen. Ein alternativer Weg ist die einstufige Direkt-Synthese der enantiomeren- und diastereomerenreinen Schlüsselintermediate durch eine industriell nutzbare Threonin-Aldolase in wässrigem Medium ohne zusätzlichen Cofaktor (Abb. 16).



Abb. 16: Darstellung der einstufigen asymmetrischen Direkt-Synthese von chiralen Schlüsselintermediaten durch Verwendung einer industriell nutzbaren Aldolase

Durch Nutzung verschiedener Screening-Methoden soll ein Zugang zu neuen Enzymen mit optimierten Eigenschaften, vor allem mit optimierten Diastereoselektivitäten, geschaffen werden. Folgende Screening-Ansätze wurden in dieser Arbeit verfolgt:

- 1.) Screening verschiedener Stammsammlungen (hauseigene, DSMZ) auf TA-Aktivität.
- 2.) Screening von Mikroorganismen aus Bodenproben durch Anreicherung von Phenylserin-abbauenden Organismen.
- 3.) *In Silico*-Screening ausgehend von bekannten TA-Sequenzen bereits vorhandener, rekombinanter Enzyme aus *E. coli* und *Sacharomyces cerevisiae*.
- 4.) Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes in P. putida KT2440.
- 5.) Verwendung eines Selektions-Stammes in *P. putida* KT2440 als wachstumsinduziertes Selektionssystem für die Identifizierung neuer Aldolase-Gene.
- 6.) Mutagenese einer bereits vorhandenen LTA aus *E. coli* durch gezielten Aminosäure-Austausch in Position 87 des Enzyms, basierend auf literaturbekannten Daten.

# 2. Material und Methoden

# 2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
Analysenwaage	AE 100 und 163 (Mettler)
Brutroller	SB2 mit Aufsatz für 63 Kulturröhrchen (Carl Roth GmbH)
Brutschüttler	Infors HT Multitron Standard (Infors GmbH)
Gaschromatograph	GC-17A (Shimadzu)
Elektrophorese	Mini-Sub Cell GT System oder Wide Mini-Sub Cell GT System (Bio-
(DNA)	Rad Laboratories GmbH)
Elektrophorese	Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH)
(Protein)	
Elektroporator	MicroPulser electroporator (Bio-Rad Laboratories GmbH)
French Press	French Press Cell Disruptor & French Pressure Cell 40K (1"
	Stempelquerschnitt) (Thermo)
NMR-Spektrometer	JEOL JNM GX 400, JEOL JNM EX 400 oder Bruker Avance 300 bzw.
	400 NMR-Spektrometer
PCR-Cycler	Mastercycler Gradient oder Ep-gradient S (mit Realpleax 4) (Eppendorf
	AG)
pH-Elektrode	GAT Ionode IJ44 (Gamma Analysen Technik GmbH)
pH-Meter	Multi-Calimatik Typ 763 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH &
	Co. KG)
Photometer	Luminescence Spektralphotometer LS50B (PerkinElmer Cellular
	Technologies Germany GmbH) oder BioPhotometer (Eppendorf AG)
Power Supply	Consort EV265 / EV243 / E862 oder Power Pac 300 (Bio-Rad
	Laboratories GmbH)
Scanner	CanoScan LiDE 1.000 (Canon AG)
Sterilisator	KSG 25-2-3 (KSG Sterilisatoren GmbH) oder VARIOKLAV
	Dampfsterilisator (H+P Labortechnik AG)
Schwingmühle	MM 200 (Retsch)
Thermoblock	Wechselblock für Reaktionsgefäße (Eppendorf AG)
Thermomixer	Thermomixer Comfort (Eppendorf AG)
UV Tisch	(Bio-Budget Technologies GmbH)
Vortexgenie	VF2 (Janke & Kunkel Labortechnik)
Waage	HF-3000G (A&D Engineering, Inc.) oder CP 2245 (Satorius AG)
Milli-Q Anlage	Milli-Q Integral Water Purification System; MilliPAK Express 20
	(Millipore GmbH)
Zentrifugen	Heraeus Biofuge pico (Heraeus Holding GmbH), Hettich Rotina 35R
	(Rotor 1717) (Andreas Hettich GmbH & Co. KG), Sorvall RC5B und
	RC5B Plus Superspeed (Du Pont)

# 2.2 Software, Programme und Webseiten

Name	Bezeichnung und Firma oder URL	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide blast (Datenbank: Nucleotide collection (nr/nt), Algorithmus: Megablast), protein blast (Datenbank: non-redundent protein sequences (nr), Algorithmus: blastp), NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	
ChemDraw	CambridgeSoft (Cambridge, USA)	
Ultra 10.0		
Clone Manager	Software for the Molecular Biologist, Scientific & Educational (Sci-Ed)	
	Software	
DoubleDigest <sup>1M</sup>	Fermentas (St. Leon-Roth), http://www.fermentas.com	
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH http://www.dsmz.de/	
ExPASy	ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics, compute	
	pI/Mw tool, http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html	
ISI (Institute for scientific information) web of knowledge, http://portal.isiknowledge.com/		
Microsoft Office (Microsoft Deutschland GmbH)		
NCBI	National Center for Biotechnology Information,	
	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
Origin 7G	OriginLab's Consulting Services	
ICT	http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx	

Tab. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software, Programme und Websiten.

# 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung (Hersteller)
Aceton	Aceton Rotisoly HPLC (Carl Roth GmbH)
Acrylamid	Rotinhorese Gel 30 (37 5:1) (Carl Roth GmbH)
	Agar Agar Kobe I (Carl Both GmbH)
Agaroso	Agar-Agar, Kober (Carr Kotti Oliloff) Poti Agarosa Agarosa NEEO Ultra Qualität für dia DNA/DNA
Agaiose	Flektrophorese (Carl Roth GmbH)
Ammoniumsulfat	Ammoniumsulfat $> 99.5\%$ p.a. ACS ISO (Carl Roth GmbH)
Ampicillin	Ampicillin Sodium Salt (GERBU Biochemicals GmbH)
APS	Ammoniumperoxodisulfat, $\geq$ 98%, p.a., ACS (Carl Roth GmbH)
Benzoylchlorid	Benzoylchlorid zur Synthese (Merck KgaA)
Bromphenolblau	Bromphenolblau Na-Salz, für die Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
Chloramphenicol	Chloramphenicol, 99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Chloroform-	Roti-C/I (24:1) (Carl Roth GmbH)
Isoamylalkohol	
Coomassie	Brillant Blau G 250 (C.I. 42655) (Carl Roth GmbH)
DMF	N,N-Dimethylformamid, Rotipuran, $\geq$ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Rotipuran, $\geq$ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
dNTPs	PCR Nucleotide Mix, 10 mM each (Roche Diagnostics GmbH)
DTT	1,4-Dithiothreitol, minimum 99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99%, p.a. (Carl

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

	Roth GmbH)
Essigsäure	Essigsäure, Rotipuran, 100%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Essigsäureethylester	Essigsäureethylester, Ethylacetat
EtBr	Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/mL) (Carl Roth GmbH)
EtOH	Ethanol, Rotipuran, $\geq$ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Fleischextrakt	Fleischextrakt, pulv., für die Bakteriologie (Carl Roth GmbH)
Gentamycin	Gentamycin sulfate, research grade (Serva Electrophoresis GmbH)
Glukose	α-D(+)-Glucose Monohydrat für die Mikrobiologie (Carl Roth GmbH)
Glycerin	Glycerin, Rotipuran, > 99,5%, p.a., wasserfrei (Carl Roth GmbH)
Glycin	Glycin, Pufferan > 99%, p.a. (Carl Roth GmbH)
HCI	Salzsäure 37%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Hefeextrakt	Hefeextrakt, puly., für die Bakteriologie (Carl Roth GmbH)
HEPES	HEPES-Natriumsalz. Pufferan > 96% (Carl Roth GmbH)
Herring Sperm DNA	Herring Sperm DNA, 10 ug/uL (Promega GmbH)
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid für die Molekularbiologie, > 99%.
	dioxanfrei, animal free (Carl Roth GmbH)
Isopropanol	2-Propanol. Rotisoly. > 99.9% UV/IR-Grade (Carl Roth GmbH)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat $> 99\%$ p a wasserfrei (Carl Roth GmbH)
Kaliumacetat	Kaliumacetat. > 99%. Ph.Eur., BP (Carl Roth GmbH)
Kalium-Iodid	Kaliumiodid, reinst Ph.Eur., USP (AppliChem GmbH)
Kanamycin	Kanamycinsulfat (Carl Roth GmbH)
KCl	Kaliumchlorid. $> 99\%$ . Ph.Eur., USP, BP (Carl Roth GmbH)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat. $> 98\%$ Ph.Eur., USP, BP (Carl Roth
	GmbH)
Malzextrakt	Malzextrakt puly für die Bakteriologie (Carl Roth GmbH)
MeOH	Methanol Rotinuran $> 99.9\%$ n a ACS ISO (Carl Roth GmbH)
MgCl	Magnesiumchlorid-Hexahydrat $> 99\%$ n a ACS (Carl Roth GmbH)
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat-Hentahydrat $> 99\%$ Ph Eur USP BP (Carl Roth
118504	GmbH)
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	Natriumcarbonat $> 99.8\%$ p.a. ACS ISO wasserfrei (Carl Roth
1(42003	GmbH)
NaHCO <sub>2</sub>	Natriumhydrogencarbonat $> 995\%$ n a ACS ISO (Carl Roth GmbH)
NaOH	Natriumhydroxid $> 99\%$ n a ISO in Plätzchen (Carl Roth GmbH)
Natriumacetat	Natriumacetat-Tribydrat > 99 5% n a ACS ISO (Carl Roth GmbH)
Natriumcitrat	tri-Natriumcitrat-Dihydrat > 99% n a ACS (Carl Roth GmbH)
PEG4000	Polvethylenglycol 4000 (Fermentas)
Penton	Penton tryptisch verdaut puly für die Bakteriologie (Carl Roth GmbH)
Phenol-Chloroform	Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Carl Roth GmbH)
Phenylserin	D L <i>-threo</i> -Phenylserin Dihydrat (Acros/Sigma-Aldrich)
Phosphorsäure	ortho-Phosphorsäure 85% Rotinuran > 85% n.a. ACS ISO (Carl Roth
1 nosphorsaule	GmbH)
Saccharose	Saccharose für die Mikrobiologie (Merck KgaA)
SAP	Shrimn-Alkaline-Phosphatase (Fermentas)
SDS	SDS ultra pure $> 99\%$ für die Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
Soia Penton	Penton aus Soia papainisch verdaut für die Mikrobiologie (Carl Roth
boju i opton	GmbH)
TCA	Trichloressigsäure, BioChemica (AppliChem GmbH)
TEMED	TEMED, 99%, p.a., für die Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
Threonin	L- bzw. D-Threonin,
Tributyrin	(MP Biomedicals, LLC)

Tris	Tris, Pufferan, ≥ 99,9%, Ultra Qualität (Carl Roth GmbH)
Triton X 100	Triton X 100, reinst (Carl Roth GmbH)
Trypton	Trypton/Pepton aus Casein pankreatisch verdaut (Carl Roth GmbH)
Tryptophan	L-Typthophan, reinst (Merck KgaA)
Tween 20	Tween 20, Ph.Eur. (Carl Roth GmbH)
X-Gal	X- $\beta$ -Gal, $\geq$ 99%, für die Biochemie (Carl Roth GmbH)

# 2.4 Reaktions- und Nachweis-Kits

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Reaktions- und Nachweis-Kits

Kit (Hersteller)	Anwendungsbereich
DNease Blood & Tissue Kit (QIAGEN AG)	Isolierung genomischer DNA
innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena AG)	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen,
	PCR Purification
innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena AG)	Plasmid Isolierung (max. 10 µg)
NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel	Plasmid Isolierung (max. 250 µg)
GmbH & Co. KG)	

#### 2.5 Bakterienstämme und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und rekombinante Plasmide sind in Tabelle 7, 8, und 9 aufgeführt.

Stamm	Bezeichnung	<b>Referenz/Literatur</b>
<i>E. coli</i> DH5α	$F^{-}supE44 \ lacZ\Delta M15 \ \Delta lacU169 \ hsdR17$	[92]
	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 $\lambda$	
E. coli BL21 (DE3)	$B F^{-} ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ TetR$	[93] [94]
	<i>gal</i> 1 (DE3)	
<i>E. coli</i> XL1	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1	Stratagene, Heidelberg
	lac glnV44 F'[ ::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup>	
	$\Delta(\text{lacZ})M15$ ] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	
<i>E. coli</i> S17-1	Ec94::[RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)],Tp <sup>r</sup> ,	[95]
	$Sm^{r}$ , tra <sup>+</sup> , recA, pro, res	
P. putida KT2440	Wildtyp	[96]

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Vektor	Resistenz genetische Marken	Bezugsquelle/Referenz	Wirt
pET21a	$P_{T7}P_{lac}Ap^{r}ColE1$	Novagen (Madison, USA)	E. coli
pET28a	$P_{T7}P_{lac}Km^{r}ColE, His_{6}-Tag$	Novagen (Madison, USA)	E. coli
pBBR1MCS2	$rep mob^+ lacZ' Km^r$	[97]	breites Wirtsspektrum
pBC SK(+)	$P_{T7}P_{T3}P_{lac} lac Z' Ap^{r} Cm^{r}$	Stratagene (Heidelberg)	E. coli
pBSL142	Bluescript-Derivat, MCS Ap <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	[98]	
pSUP202	pBR325-Derivat, Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> mob <sup>+</sup>	[95]	E. coli
pBluescript	$P_{T7}P_{T3}P_{lac}lacZ' Cm^{r}ColE1$	Stratagene (Heidelberg)	E. coli
pWKR202I	pACY177-Derivat, Gm <sup>r</sup>	Figurski & Helinski, 1979	-

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Vektoren

Tab. 9: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Vektor	Resistenz	Referenz
	genetische Marken	
pET21a- <i>ltaE</i>	Ap <sup>r</sup> , 1001 bp Fragment ItaE ( <i>E. coli</i> XL1), <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	T. Rosenbaum
pET21a-gly1	Ap <sup>r</sup> ,1001 bp Fragment gly1 (S. cerevisiae), NdeI/XhoI kloniert	T. Rosenbaum
pET28a- <i>ltaE</i>	Km <sup>r</sup> 1001 bp Fragment gly1 (S. cerevisiae), NdeI/XhoI kloniert	diese Arbeit
pET28a-gly1	Km <sup>r</sup> 1001 bp Fragment gly1 (S. cerevisiae), NdeI/XhoI kloniert	diese Arbeit
pET28a-Dp	Km <sup>r</sup> 1065 bp Fragment TA aus <i>Desulfotalea psychrophila</i> , <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET28a-Ag	Km <sup>r</sup> 1149 bp Fragment TA aus <i>Ashbya gossypii</i> , <i>NdeI/Xho</i> I kloniert	diese Arbeit
pET28a-Kp	Km <sup>r</sup> 1167 bp Fragment TA aus <i>Kluyveromyces polysporus</i> , <i>NcoI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET28a-Le	Km <sup>r</sup> 1110 bp Fragment TA aus <i>Lodderomyces polyspora, NcoI /XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET28a-Pst	Km <sup>r</sup> 1205 bp Fragment TA aus <i>Pichia stipitis</i> , <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET28a-ppTA	Km <sup>r</sup> 1041 bp Fragment TA aus <i>P. putida</i> KT2440,	diese Arbeit

	NdeI/XhoI kloniert	
рЕТ28а- <i>ДррТА</i>	Km <sup>r</sup> 1041 bp Fragment TA aus <i>P. putida</i> KT2440,	diese Arbeit
	<i>NdeI/XhoI</i> kloniert, $\Omega$ Gm <sup>1</sup> aus pBSL142 <i>EagI</i> kloniert	
pSUP202∆ <i>ppTA</i>	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , 500 bp Fragment upstream des $ppTA$ -Gens aus <i>P. putida</i> KT2440 ( <i>Cla</i> I, <i>Mlu</i> I), $\Omega$ Gm <sup>r</sup> aus pBSL142 <i>Mlu</i> I kloniert, 500 bp Fragment downstream des <i>ppTA</i> aus <i>P. putida</i> KT2440 ( <i>Mlu</i> I, <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pBCSK-up500	pBCSK + 500 bp upstream Fragment PpTA <i>P. putida</i> KT2440	diese Arbeit
pBCSK- up/dw500	pBCSK + 500 bp upstream Fragment PpTA, + 500 bp downstream Fragment PpTA aus <i>P. putida</i> KT2440	diese Arbeit
pBCSKΔ <i>PpTA</i>	$Gm^{r}$ , pACY177-Derivat, $Gm^{r}$ , $\Delta PpTA$	diese Arbeit

#### 2.6 Stämme der DSMZ aus dem In Silico Screening

Tab. 10: Übersicht über die ausgewählten Stämme mit Sequenzähnlichkeit zu E. coli und S. cerevisiae TA

Stamm	Bezeichnung	Referenz
ausgehend vom Alignm	ent mit Threoninaldolase (ltaE)	aus <i>E. coli</i> XL1
Shewanella baltica	Wildtyp	DSMZ
Desulfotalea psychrophila	Wildtyp	DSMZ
Pseudomonas syringae	Wildtyp	DSMZ
Photobacterium profundum	Wildtyp	DSMZ
ausgehend vom Alignment mit Threoninaldolase (gly1) aus S. cerevisiae		
Ashbya gossypii	Wildtyp	DSMZ
Pichia stipitis	Wildtyp	DSMZ
Lodderomyces elongisporus	Wildtyp	DSMZ
Kluyveromyces polyspora	Wildtyp	DSMZ
Candida glabrata	Wildtyp	DSMZ

### 2.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Name	Sequenz $(5^2 \rightarrow 3^2)$	Tm (°C)	Verwendung
C. f.		$\frac{(0)}{570}$	
Cg-IW	CGAATAT <u>CATATG</u> ACTACTGAACTACCAC CAC <sup>Nde1</sup>	57,9	Amplifizierung der TA
Cg-rev	CGAATAT <u>GCGGCC</u> GCTTAGTACTTGTAA	63,3	aus Candida glabrata
	G TCTTGATC		
Kp-fw	CGAATAT <u>CCATGG</u> ATGTCTGAATTCGAT	60,8	Amplifizierung der TA
	TTACCTTTACC		aus Kluyveromyces
Kp-rev	CGAATAT <u>CTCGAG</u> CTAATATTTGTAAGT <sup>Xhol</sup>	55,6	polyspora
Ag-fw	CTTAAC CGAATATCATATGAATCAGGATATGGAA	55,1	
C	NdeI		
Ag-rev	CTAC CGAATAT <u>CTCGAG</u> TTAATACTTGTAGGT <i>Xho</i> l	57,7	Amplifizierung der TA aus <i>Ashbya gossypii</i>
	CTTGATC		
Le-fw	CGAATAT <u>CCATGG</u> ATCTCTCTGTATTTG	58,9	Amplifizierung der TA
-	CAAAC		aus Lodderomyces
Le-rev	CGAATAT <u>CTCGAG</u> TTAGTTATTCTCAGC	58,0	polyspora
Pst-fw	TGTATAAAAC CGAATATCATATGGACTTCTCAACTTAT	59 5	
1 50 100	Ndel	09,0	
	ACCGCC	50.0	Amplifizierung der TA
Pst-rev	CGAATAT <u>CTCGAG</u> TCACTCTTCGATATT <i>Xho</i> I	58,9	aus Pichia stipitis
Dr. f.	ACTGTAAAATC	(2.4	
Pp-Iw	Ncol	02,4	Amplifizierung der TA
D	TCAGACACAG	(1)(	aus Photobacterium
Pp-rev	CGAATAT <u>CTCGAG</u> TTATAAAGCGCATTT <i>Xho</i> I	61,6	profundum
D C	TAACGCCG	(1.0	
Ps-fw	CGAATAT <u>CATATG</u> ACGGTCATCGATCIG	64,0	Amplifizierung der TA
Da mari	CGCAGC	70.4	aus Pseudomonas
Ps-rev	VGAATAT <u>GCGGCC</u> GCTCATGGGTGTTCA Noti	/0,4	syringae
Sh fr	AAGGCTGCG	60 5	
50-1W	COAATAT <u>CCATGO</u> ATGATAGATTTACGC <i>Nco</i> I	00,5	
Sh mar	AGTGATACTG	65 0	Amplifizierung der TA
SU-rev	Xhol	03,0	aus snewunella dallica
	CTGCTTCATAAC		

Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Primer. TM: Schmelztemperatur

Dp-fw	CGAATAT <u>CATATG</u> CAGGTGAAGAGCAT <sub>Ndel</sub>	59,0	Amplifizierung der TA
	АСААААТС		aus Desulfotalea
Dp-rev	CGAATAT <u>CTCGAG</u> CTATAGGGCCCCTGC	65,6	psychrophila
	AAAAAGTCC		
PpTA- fw	CGATAT <u>CATATG</u> ACAGACAAGAGCCAA	58,8	Amplifizierung der
1.00	CAATTC		putativen TA aus <i>P</i> .
PpTA- rev	CGATAT <u>CTCGAG</u> TCAGCCACCAATGATC	65,4	putida KT2440
	GTGCG	(1.2	
PpA-tw	CGAATAT <u>CATATG</u> AAGCATCTGGACTGC	61,3	Amplifizierung der
	ACACTTC		putativen Aldolase aus P.
PpA-fw	CGAATAT <u>CTCGAG</u> TCATTTCAGTGGCCC	62,5	putida KT2440
	ATAAACG		
up- 500fw	GTCGACAGCCTTCGGCGTACTTGTTGG	64,7	Amplifizierung der 500 bp flankierenden Region
up- 500rev	GGATCCGGCACGGTCCTGTGAACGACGC BamHI	69,3	vor dem PpTA-Gen in <i>P. putida</i> KT2440
dw- 500fw	CGATAT <u>GGATCCAAGCTT</u> GCGAGAGCCG BamHI HindIII	75,9	Amplifizierung der 500 bp flankierenden Region
	GGGCCGCCGTGCGGC		nach dem PpTA Gen in
dw- 500rev	CGAATAT <u>GTCGAC</u> GCTCGCGTTGAACGC	68,1	Pseudomonas putida KT2440
	TGCCATC		
SHMT- fw	CGAATAT <u>CATATG</u> TTTGCCAAYATYTCH <sub>Ndel</sub>	53,9- 60,8	Amplifizierung der
	MTTKC	,	SHMT aus Bodenproben-
SHMT- rev	CGAATAT <u>CTCGAG</u> TTAKTKTKCRTATAC	56,5- 61,4	Isolat B11c2)
	AGGGAA		

Name	Sequenz (5'→3')	TM (°C)	Verwendung
up500-fw	GTCGACAGCCTTCGGCGTACTTGTTGGTC Sall	66,3	Amplifizierung des Gen-flankierenden upstream-Fragments
up500-dw	<b>TGCCTGATGGAT</b> GGCACGGTCCTGTGA ACGACGCAGA	71,4	Amplifizierung des Gen-flankierenden upstream-Fragments mit Homologie zu ΩGm <sup>r</sup>
dw500-fw	GCCGTAAAGCTTGCGAGAGCCGGGGGCC GCCGTGCGGC	77,4	Amplifizierung des Gen-flankierenden downstream - Fragments mit Homologie zu ΩGm <sup>r</sup>
dw500-rev	GTCGACGCTCGCGTTGAACGCTGCCATC HindIII GAG	69,5	Amplifizierung des Gen-flankierenden downstream-Fragments
ΩGm <sup>r</sup> -fw	CAGGACCGTGCCATCCATCAGGCAACG ACGGGCTGC	72,8	Amplifizierung der Gentamycin Kassette ΩGm <sup>r</sup> aus pWKR202I (2300bp)
ΩGm <sup>r</sup> -rev	CCCGGCTCTCGCAAGCTTTACGGCCAC AGTAACCAA	69,9	Amplifizierung der Gentamycin Kassette ΩGm <sup>r</sup> aus pWKR202I (2300bp) mit Homologie zum downstream Fragment

 

 Tab. 12: Verwendete Primer zur Erstellung der Deletionsmutante in P. putida KT2440 mittels "Overlapextention PCR"

Name	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$	TM	Aminosäure-
		(°C)	Austausch
LTAE-Leu-fw	GCGCATAACTATCTGTTAGAAGCCGGTG	67,3	
	GCGCG		Phe $\rightarrow$ Leu
LTAE-Leu-rev	CGCGCCACCGGCTTCTAACAGATAGTTA	67,3	
	TGCGC		
LTAE-Trp-fw	GCGCATAACTATCTG <b>TGG</b> GAAGCCGGTG	70,3	
	GCGCG		Phe $\rightarrow$ Trp
LTAE-Trp-rev	CGCGCCACCGGCTTCCCACAGATAGTTA	70,3	
	TGCGC		
LTAE-Asn-fw	GCGCATAACTATCTGAATGAAGCCGGTG	67,7	
	GCGCG		Phe $\rightarrow$ Asn
LTAE-Asn-rev	CGCGCCACCGGCTTCATTCAGATAGTTA	67,7	
	TGCGC		
LTAE-Asp-fw	GCGCATAACTATCTGGATGAAGCCGGTG	68,9	
	GCGCG		Phe $\rightarrow$ Asp
LTAE-Asp-rev	CGCGCCACCGGCTTCATCCAGATAGTTA	68,9	
	TGCGC		
LTAE-Ser-fw	GCGCATAACTATCTGTCTGAAGCCGGTG	68,7	
	GCGCG		Phe $\rightarrow$ Ser
LTAE-Ser-rev	CGCGCCACCGGCTTCAGACAGATAGTTA	68,7	
	TGCGC		
LTAE-His-fw	GCGCATAACTATCTGCATGAAGCCGGTG	69,2	
	GCGCG		Phe $\rightarrow$ His
LTAE-His-rev	CGCGCCACCGGCTTCATGCAGATAGTTA	69,2	
	TGCGC		
LTAE-Asp96-fw	GGCGCGGCGGTGCTGGGGCAGTATTCAAC	73,4	
	CGCAA		$Gly \rightarrow Asp$
LTAE-Asp96-rev	TTGCGGTTGAATACTGCCCAGCACCGCC	73,4	-
	GCGCC		

**Tab. 13:** Verwendete Primer zur Erstellung der Mutanten der *E. coli* TA durch Aminosäureaustausch in Position 87 (Phenylalanin) und Position 96 mittels Quick-Change-PCR.

Tab. 14: Übersicht über die verwendeten Primer zur 16S-rDNA Amplifizierung.

Name	Sequenz (5'→3')	TM (°C)	Referenz
142R	CGGYTACCTTGTTACGAC	53,7-56	[99]
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	53,2-57,3	[100]

#### 2.8 Puffer und Lösungen

#### Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

<u>TBE-Puffer :</u>	Tris	89 mM
	Borat	89 mM
	Na <sub>2</sub> -EDTA	2,5 mM

DNA-Probenpuffer: Na <sub>2</sub> -EDTA	100 mM
Glycerol	43 % (v/v)
BPB	0,05 % (w/v)



Abb. 17: DNA-Molekulargewichtsstandard "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas)

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 6000, 3000 und 1000 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

#### Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

<u>Magnesium-Mix:</u>	
MgCl <sub>2</sub>	500 mM
MgSO <sub>4</sub>	500 mM

# Transformationspuffer (TMF):

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
RbCl <sub>2</sub>	50 mM
MnCl <sub>2</sub>	40 mM

# Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 10-fach Elektrophorese-Puffer :

Tris-Hcl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
A. dest	ad 1000 ml

#### 4-fach Sammelgelpuffer (pH6,8):

Tris-HCl	0,5 M
A. dest.	ad 200 ml

# 4-fach Trenngelpuffer (pH8,8) :

Tris-HCl	1,5 M
Aq. dest.	ad 200 ml

#### SDS-Probenpuffer (pH6,8):

Tris-HCl	50 mM
Glycerol	10 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
ß-Mercaptoethanol	2 % (v/v)
BPb	0,03 % (w/v)

15% (w/v) SDS-Trenngel:

4-fach Trenngelpuffer	2,500 ml
87% (v/v) Glycerol	0,100 ml
A.dest	3,050 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	3,750 ml
10% (w/v) SDS	0,100 ml
10% (w/v) APS	0,075 ml
TEMED	0,015 ml

#### SDS-Sammelgel:

4-fach Sammelgelpuffer	1,250 ml
A.dest.	3,150 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	0,715 ml
10 % (w/v) SDS	0,050 ml
10 % (w/v) APS	0,050 ml
TEMED	3,5 µl





Abb. 18: Protein-Größenstandard "PageRuler Prestained ProteinLadder" (Fermentas)

Zur besseren Orientierung sind die 72 kDa Bande rot und die 10 kDa Bande grün gefärbt.

Comassie-Blau-Färbelösung:

Ethanol	25% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Comassie Brilliant Blue	0,2% (w/v)
Entfärbe-Lösung:	

Ethanol	5% (v/v)
Essigsäure	7% (v/v)

# Puffer für die Proteinaufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

<u>Lysispuffer (pH 8,0):</u>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Harnstoff	8 M
Waschpuffer (pH 8,0):	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
Harnstoff	8 M
Elutionspuffer (pH 8,0):	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
Harnstoff	8 M

#### 2.9 Wachstumsbedingungen

#### 2.9.1 Sterilisation

Bei allen mikrobiologischen Arbeiten wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien für 20 min bei 121°C und 1 kg/cm<sup>2</sup> Überdruck dampfsterilisiert. Thermolabile Substanzen wurden sterifiltriert, Kolben wurden über Nacht im Sterilisationsschrank bei 180°C hitzesterilisiert.

#### 2.9.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

*E. coli* wurde in LB-Medium bei 37 °C kultiviert; *P. putida* wurde in Medium EM1 bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in einem Reagenzglas-Rotator, größere Volumina im Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler bei 120 rpm kultiviert. Dabei entsprach das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 14) kultiviert. Vorkulturen wurden über Nacht inkubiert, Hauptkulturen (HK) wurden aus einer Übernachtkultur (ÜK) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Zur Expression der heterologen Gene wurde die Überexpression der T7-RNA-Polymerase bei dem Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von ~ 0.5 durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden 1 ml ÜK mit 500 ml (80% igem) Glycerin versetzt und in Cryo-Gefäßen bei -80 °C eingefroren und konserviert.

LB-Medium: 10 g/l Trypton 5 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt pH 7,0

EM1-Medium: 20 g/l Trypton 5 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt 1 % (w/v) Glucose pH 7,5

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

Tab. 15: Übersicht über die verwendeten Antibiotika und ihre Endkonzentrationen in E. coli und P. putida.			
Antibiotikum	Endkonzentration in <i>E. coli</i>	Endkonzentration in <i>P. putida</i>	
	(µg/ml)	(µg/ml)	
Kanamycin (Km <sup>r</sup> )	50	50	
Ampicillin (Ap <sup>r</sup> )	100	-	
Chloramphenicol (Cm <sup>r</sup> )	50	450	
Gentamycin (Gm <sup>r</sup> )	10	30	
Tetracyclin (Tc <sup>r</sup> )	25	50	
Irgasan (Irg <sup>r</sup> )	-	25	

#### Antibiotika

#### Selektionsmedium für Threonin-Aldolase-Aktivität

Das Selektionsmedium für Threonin-Aldolase-Aktivität basiert auf dem Minimalmedium M9 nach Sambrook *et al.*, 1989 <sup>[101]</sup> mit 10 mM D,L*-threo*-Phenylserin (Sigma-Aldrich) als alleiniger Kohlenstoffquelle anstatt Glukose. Bakterien wurden mehrere Tage bei 30 °C inkubiert.

Lösung 1: 1 M Phenylserin Lösung 2: 2,5 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O ad 100 ml A. dest. Lösung 3: 0,2 g CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O ad 100 ml A. dest. Lösung 4: 35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g NaCl 5 g NH<sub>4</sub>Cl ad 500 ml A. dest.

Lösungen 2 - 4 wurden für 20 min bei 120 °C autoklaviert und Lösung 1 sterilfiltriert. Für 1 L Medium wurden 10 ml Lösung 1, 10 ml Lösung 2, 10 ml Lösung 3 und 100 ml Lösung 4 auf 1L mit sterilem Aq. dest. aufgefüllt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

#### Minimalmedium zur Anreicherung von Mikroorganismen aus Bodenproben

C-Quelle (Phenylserin)	10,00 g
Ammoniumsulfat	2,00 g
Hefeextrakt	0,20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,34 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,54 g
Agar	17,00 g
HVK-Spurenelementlösung	20,00 ml

Auf ein Liter Aq. dest auffüllen

Zusammensetzung der HVK-Spure	nelementlösung:
Titriplex I	10,00 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	14,45 g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	3,33 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	9,25 mg
Metall-Lösung	50,00 ml
Mit 10 M NaOH pH 6,6 einstellen	

Zusammensetzung der Metall-Lösung:

Titriplex II	250,00 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,22 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,48 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	4,01 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	39,20 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	244,45 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	171,03 mg

Mit 6 M  $H_2SO_4$  einen pH-Wert von 1,5 – 2,0 einstellen

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt, um das vermehrte Wachstum von Pilzen im sauren Millieu zu vermeiden.

Das D,L-*threo*-Phenylserin wurde als Kohlenstoff-Quelle erst nach Autoklavieren in das abgekühlte Medium gegeben, um eine vorzeitige Zersetzung zu vermeiden.

#### 2.9.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass einer  $OD_{600}$ von 1 eine Zellzahl von ungefähr 1 x 10<sup>9</sup> Zellen entspricht.

#### 2.10 Probenentnahme Umweltproben und Kultivierung

Bei allen Proben wurden handelt es sich um Bodenproben, die an verschiedenen Standorten entnommen und in sterilen *Falcon tubes* gesammelt und bei 4 °C gelagert wurden.

Zur Kultivierung wurde den Bodenproben jeweils 1g entnommen und in 10 ml dest. Wasser durch kräftiges Vortexen gut suspendiert. Es wurde gewartet, bis sich die Sedimente abgesetzt haben und aus dem Überstand 100 µl abgenommen und auf Minimalagar mit D,L-*threo*-Phenylserin als alleiniger C-Quelle ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für einige Tage bei Raumtemperatur. Jeden Tag wurde die Morphologie der Organismen überprüft. Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie (z.B. Kolonieform, Pigmentierung, Sekretbildung) wurden vereinzelt. Nach drei fraktionierten Ausstrichen wurden die Organismen in Flüssigkulturen angezogen und ein Aliquot der Kulturen mit Glycerin kryokonserviert. Es wurden insgesamt 16 Bodenproben unterschiedlicher Art von diversen Standorten verwendet.

#### 2.11 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.11.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. putida* erfolgte durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Analytik Jena und Qiagen nach Angaben der Hersteller.

#### 2.11.2 Präparation genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus einer 5 ml Übernachtkultur mit Hilfe des DNeasy Blood&Tissue Kits der Firma Qiagen isoliert oder mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

#### 2.11.3 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Phenol-Chloroform Extraktion trennt Proteine und Nukleinsäuren voneinander. Nach Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v/v)] zur DNA-Lösung wurde die Probe so lange gemischt, bis sich eine Emulsion bildete. Die organische, untere Phase und die wässrige, obere Phase wurden durch Zentrifugation separiert (13.000 rpm, 2-5 min, RT). Die wässrige Phase wurde, ohne die Interphase oder die organische Phase zu verschleppen, in ein zweites Eppendorfgefäß überführt und weitere zwei Mal wie oben beschrieben extrahiert. Die Phenolreste wurden aus der wässrigen Phase durch eine weitere Extraktion mit einem Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch [24:1 (v/v)] entfernt. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation (s.o.) wurde die DNA der wässrigen Phase durch Isopropanol-Fällung isoliert.

#### 2.11.4 Fällung von Nukleinsäuren

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 0,.3 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5) und 0,8 Volumen eiskaltem Isopropanol (-20°C) versetzt und gemischt. Anschließend wurde für 15 Minuten zentrifugiert (14.000 rpM, 4 °C). Das gewonnene Pellet wurde mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 14.000 rpM, RT) wurde die DNA entweder bei RT oder im Eppendorf-Inkubator bei 65 °C für einige Minuten getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde anschließend in 50  $\mu$ l Aq. dest. aufgenommen, bzw. für eine anschließende Dephosphoryliereung der DNA in 44  $\mu$ l Aq. dest. aufgenommen.

#### 2.11.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde entweder photometrisch am Eppendorf Biophotometer durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt oder alternativ über den DNA-Tüpfeltest.

#### Tüpfeltest

1  $\mu$ L der DNA-Probe bzw. einer Verdünnungsreihe wurde neben einer Konzentrationsreihe des DNA Standards (Herring Sperm DNA, 10-50 ng/ $\mu$ L) auf eine Agarose-Tüpfelplatte getropft. Waren die Proben und der Standard vollständig getrocknet, konnte die Helligkeit der Tropfen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 260 nm verglichen und somit die Konzentration abgeschätzt werden. Tüpfelplatte: Petrischale mit Nocken (35 x 10 mm), 0,8% (w/v) Agarose, 0,5 µg/mL EtBr

#### **Photometrische Bestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm über das Programm *dsDNA* des *BioPhotometers* nach Herstellerprotokoll bestimmt.

Als Küvette wurde die *TrayCell* Messzelle in Kombination mit zwei verschiedenen Deckeln, abhängig vom Mess-bereich, verwendet (Tab. 14).

Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub>.

Tab. 14: Deckelgrößen der TrayCell Messzelle und die dazugehörigen Parameter.

Deckelgröße	virtueller	Probenvolumen	Messbereich
	Verdünnungsfaktor		
1 mm	10	3-5 μL	15-800 ng/μL
0,2 mm	50	0,7-4 μL	100-4.000 ng/µL

#### 2.12 In vitro Modifikation von DNA

#### 2.12.1 Restriktion von DNA

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte durch Restriktionsenzyme nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der empfohlenen Puffer bei empfohlener Temperatur, wobei der Anteil an Enzymlösung in einer Reaktion nie mehr als 10% (v/v) vom Gesamtvolumen betrug. Bei Verwendung von zwei kompatiblen Enzymen wurden jeweils gleiche Enzymaktivitäten (*Units*) in die Reaktion eingesetzt.

Hierzu wurden für einen präparativen Verdau insgesamt 60  $\mu$ l Gesamtvolumen angesetzt und zur Überprüfung einer Klonierung in einem analytischen Verdau 20  $\mu$ l, die anschließend über ein 0,8 – 1 %iges Agarose Gel analysiert wurden. Präparativ verdaute Plasmide und PCR-Produkte wurden anschließend aus dem Agarose-Gel extrahiert und die DNA mittels "Gel-Extraction" Kit von der Firma Qiagen isoliert.

Analytischer Restriktionsverdau:

100-300 ng DNA, 1,5  $\mu$ L Puffer (10 *x*), 2 U Restriktionsenzym, ad 20  $\mu$ L Milli-Q Wasser, Inkubation: je nach Enzymen 2h - ÜN

Präparativer Restriktionsverdau:

>10 µg DNA, 6 µL Puffer (10 x), 1-2 U Restriktionsenzym pro µg DNA, ad 60 µL Milli-Q Wasser, Inkubation: je nach Enzymen  $2h - \ddot{U}N$ .

Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze bei jeweils vom Hersteller empfohlener Temperatur für 20 min erhitzt.

#### 2.12.2 Partialverdau genomischer DNA

Isolierte genomische DNA wurde partiell mit der Restriktionsendonuklease *Bsp*143I (*Sau*3AI) verdaut. Hierzu wurden 10  $\mu$ g der isolierten genomischen DNA mit 1 U Restriktionsenzym für 30 sec – 1 min bei 37°C inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Proben durch die Auftrennung in einem 0,6 %igem Agarosegel analysiert und in 6 – 10 kb großen Fragmenten aus dem Agarosegel eluiert.

#### 2.12.3 Dephosphorylierung von Plasmiden

Bei ungerichteten Klonierungen wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert, um Religationen zu vermeiden. Dazu wurde die Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau über Isopropanolfällung gefällt und in 44  $\mu$ l Aq. dest. aufgenommen. Es wurde mit 1 U alkalischer Phosphatase aus *Pandalus borealis* [Shrimp Alkaline Phosphotase (*SAP*)] pro 10 pmol Vektorenden im *SAP*-Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert.

#### 2.12.4 Klonierung von DNA Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen kompatiblen, überhängenden Enden (*sticky ends*) oder glatten Enden (*blunt ends*) doppel-strängiger DNA-Moleküle unter Verbrauch von ATP. Zur effektiven *in vitro*-Ligation von DNA mit *sticky ends* wurden 100 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit Insert-DNA, Puffer (1 x) und 2,5-5 U Ligase für 1 h bei RT inkubiert. *Blunt end*-Ligationen wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 mit Insert-DNA nach Vorgabe von Fermentas in Puffer (1 x) mit 5 U Ligase und Zugabe von PEG4000 entweder für 2h bei 16°C oder ÜN bei 4°C inkubiert.

Die einzusetzende Menge an Vektor zu Insert für das angegebene molare Verhältnis für *sticky end* und *blunt end* Klonierungen wurde über folgende Formel berechnet:
Länge [bp] x  $10^{-6}/([c] \times 660) = \text{fmol/}\mu\text{l DNA}$ 

Die Inaktivierung der T4-Ligase erfolgte für 10 min bei 65°C.

#### 2.12.5 Standard-Klonierung von PCR Produkten

Die DNA wurde über PCR unter Verwendung der *Pfu*- oder Phusion-DNA-Polymerase amplifiziert. 4 µL PCR Produkt wurden über AGE analytisch kontrolliert.

Bei Beobachtung mehrerer Banden wurden diese über eine präparative AGE aufgetrennt, die gewünschte Bande über Gelelution isoliert und die Konzentration bestimmt. Bei *sticky end*-Ligationen über eingefügte Schnittstellen, wurde das isolierte PCR Produkt mit diesen Enzymen verdaut und die Proben über eine PCR-Purification aufgereinigt. Die Ligation erfolgte in den Vektor pET28a über die eingefügten Schnittstellen. Bei *blunt end*-Klonierungen wurde das PCR Produkt direkt in den *Sm*aI linearisierten Vektor pBluescript SK oder pBCSK (+) *blunt end* kloniert. Chemisch kompetente *E. coli* DH5α wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und diverse Klone ausgewählt, deren Plasmide isoliert und über Restriktionsanalyse kontrolliert wurden. Anschließend wurden die Plasmide sequenziert.

#### 2.12.6 Konstruktion von Genombibliotheken in P. putida

Partiell mit *Bsp143*I verdaute genomische DNA aus Bodenproben wurde in den Vektor pBBR1MCS mit breitem Wirtsbereich kloniert. Der Vektor pBBR1MCS wurde zuvor mit *Bam*HI restringiert und mit der alkalischen Phosphatase aus *Pandalus borealis* [Shrimp Alkaline Phosphotase (*SAP*)] dephosphoryliert. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug bei *sticky-end*-Ligationen typischerweise 1:3 bis 1:5 mit mind. 100 ng Plasmid. Die Ligationsansätze wurden für 2 h bei 16°C inkubiert und anschließend direkt in *P. putida* mittels Elektroporation transformiert. Alternativ wurden die Ligationen 30 min bei Raumtemperatur in "rapid ligation buffer" (Fermentas) inkubiert und anschließend transformiert.

## 2.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Plasmid-DNA (50-100 ng/ $\mu$ L in Milli-Q Wasser), sowie gereinigte PCR-Produkte (~ 300 ng/ $\mu$ L in Milli-Q Wasser) wurden standardmäßig bei der Firma Sequiserve in Vaterstetten sequenziert. Ggf. wurden die Primer für die Sequenzierung in einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ L in Milli-Q Wasser mitgeschickt.

## 2.14 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,5 % - 1 % (w/v) nach Sambrook *et al.* (1989) <sup>[101]</sup> elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde  $0,5 \times$  TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurden die "1kb-ladder" und "50bp-ladder" von Fermentas eingesetzt. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem "EagleEye II" der Firma Stratagene (Heidelberg) zusammen mit der Software "Gel Jet Imager Plus" der Firma Intas (Göttingen) genutzt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des "Gel Extraction"-Kits der Firma Qiagen bzw. des DoublePure Kits der Firma Analytik Jena nach Angaben des Herstellers.

## 2.15 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 2.15.1 Standard-PCR

PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von DNA und wurde nach der methode von Saiki *et al.* (1988) durchgeführt <sup>[102]</sup>. Die *annealing* Temperatur (Ta) lag bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase 5-10 °C unter der Schmelztemperatur (TM), bei Verwendung der Phusion Polymerase 3°C über der TM der verwendeten Primer. Die Elongationszeit (tE) war abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA und betrug 1.000 Bp/min. Die Extensionszeit richtete sich nach der Größe der zu amplifizierenden Produkte, die *Pfu*-DNA-Polymerase benötigt für 1kb etwa 2 min und die Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase ca. 30 s.

Komponente	PCR-Ansatz <i>Pfu</i> -Polymerase	PCR-Ansatz Phusion-Polymerase
Template-DNA	100-250 ng	100-250 ng
Primer	je 5 µl (10 pM) <i>fw &amp; rev</i>	Je 2,5 µl (10 pM) <i>fw</i> & <i>rev</i>
DMSO	1,5 µl	1,5 µl
Puffer (1x)	5 µl	10 µl
Polymerase	1 µl	0,5 µl
dNTP's	1 μl (10 mM)	1 μl (10 mM)
Endvolumen	50 µl	50 µl

Tab. 16: Zusammensetzung der PCR-Ansätze unter Verwendung der Pfu- und Phusion-DNA-Polymerase.

Je nach PCR variierten die Einstellungen des Mastercycler Gradienten:

<u>Programm nd1 (*Pfu*):</u> 1 x (98°C, 5 min), 30-35 x ((98°C, 45 sec), (Ta, 1 min), (tE, 72°C, 1 min 10 sec)), 1 x (72°C, 10 min)

<u>Programm nd2 (*Phusion*) 2-step:</u> 1 x (98°C, 30 sec), 30-35 x ((98°C, 10 sec), (tE, 72°C, 1 40 sec)), 1 x (72°C, 10 min)

*PfuTurbo* DNA Polymerase: 2,5 U, Fehlerrate =  $1,3 \times 10^{-6}$ 

*Phusion* Polymerase: 2 U, Fehlerrate =  $4,4 \times 10^{-7}$ 

# 2.15.2 EUBAC-PCR zur Amplifizierung von 16S-rRNA

Mittels EUBAC-PCR wurde die für jeden Mikroorganismus spezifische 16S-rDNA unter Verwendung universeller Primer amplifiziert. Der Reaktionsansatz war analog zum Ansatz unter Verwendung der *Pfu*-DNA-Ploymerase.

Tab. 17: Zusammensetzung des EUBAC-PCR-Ansatzes.

Komponente	PCR-Ansatz <i>Taq</i> -Polymerase	
Template-DNA	100-250 ng	
Primer	je 5 µl (10 pM) <i>fw &amp; rev</i>	
DMSO	1,5 µl	
Puffer (1x)	5 µl	
Polymerase	1 µl	
dNTP's	1 µl (10 mM)	
Endvolumen	50 µl	

Programm EUBAC (Taq): 1 x (95°C, 2 min), 30-35 x ((95°C, 45 sec), (52°C, 45 sec), (tE, 72°C, 1 min 30 sec)), 1 x (72°C, 10 min)

*Taq* DNA-Polymerase: 1,25 U, Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Fehlerrate = 2,2 x $10^{-5}$ 

## 2.15.3 Quick-Change-PCR

Die Quick-Change PCR wurde zur Erstellung von Mutanten der E. coli TA, die sich in einer Aminosäure in Postition 87 des Gens unterscheiden, verwendet. Hierfür wurde die an Position 87 befindliche Aminosäure Phenylalanin gegen sechs verschiedene Aminosäuren mit diversen Eigenschaften unter Verwendung der in Tabelle 12 angegebenen Primer ausgetauscht.

Komponente	PCR-Ansatz Phusion-Polymerase	
Template-DNA	2 µl	
pET28a-ltaE	1 μl	
Primer	je 1 μl (10 pM) <i>fw</i> & <i>rev</i>	
Betain	3 µl	
Puffer (1x)	10 µl	
Polymerase	0,5 µl	
dNTP's	1 µl (10 mM)	
Endvolumen	50 µl mit Aq. Dest.	

<u>Programm Quick-Change (*Phusion*):</u> 1 x (98°C, 5 min), 30 x ((98°C, 45 sec), (Ta, 1 min), (tE, 72°C, 3 min 30 sec)), 1 x (72°C, 10 min)

#### 2.15.4 Overlap-Extension-PCR

Mit der Overlap-Extention-PCR werden drei DNA-Fragmente mit jeweils überlappenden homologen Regionen in einer einzigen PCR nach Vorschrift von Choi *et al.* zu einem Konstrukt amplifiziert <sup>[103]</sup>. Dabei werden zunächst drei Zyklen mit allen drei Templates ohne Primer durchlaufen und anschließend weitere 25 Zyklen nach Zugabe der Primer.

Komponente	PCR-Ansatz Phusion-Polymerase
Template-DNA	2 µl
Primer	je 2,5 µl (10 pM) <i>fw &amp; rev</i>
DMSO	5 μl
Puffer (1x)	5 μl
Polymerase	1 μl
dNTP's	1 µl (10 mM)
Endvolumen	50 µl mit Aq. Dest.

 Tab. 19: Zusammensetzung des Overlap-Extention PCR-Ansatzes unter Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase.

<u>Programm Overlap1 (*Pfu*):</u> 1 x (98°C, 5 min), 3 x ((98°C, 45 sec), (Ta, 1 min), (tE, 72°C, 8 min)), 1 x (72°C, 10 min)

Nach 3 Zyklen mit Programm Overlap1 erfolgte die Primer-Zugabe und weitere 25 Zyklen mit Programm Overlap2

<u>Programm Overlap2 (*Pfu*):</u> 1 x (98°C, 5 min), 25 x ((98°C, 45 sec), (tA, 1 min), (tE, 72°C, 8 min)), 1 x (72°C, 10 min)

## 2.16 Stammidentifizierung über ribosomale DNA (16S-rDNA Analyse)

Einen ersten Überblick über die Diversität der Organismen einer Probe wurde über BLAST-Datenbank Analysen der klonierten und sequenzierten ribosomalen DNA (16S rDNA) gewonnen. Die Risikostufe von bekannten Organismen wurde über deren Typstämme und die DSMZ-Datenbank bestimmt.

## 2.17 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

#### 2.17.1 Herstellung chemisch kompetenter E. coli

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  oder BL21 (DE3) wurden durch eine Behandlung mit Calciumchlorid erzeugt, wobei die Präparation mit Zellen erfolgte, die zuvor 3 *x* fraktioniert ausgestrichen worden waren. Aus einer Übernachtkultur wurde eine Hauptkultur mit einer  $OD_{600} = 0,05$  angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 0,5$  inkubiert. Das Zellwachstum wurde auf Eis für 10 min gestoppt. Die Zellen wurden anschließend in 7 mL FB-Puffer (4°C) pro 100 mL Hauptkultur aufgenommen (Zentrifugation: 10 min, 4°C, 1750 *x g*) und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (s.o) wurden die Zellen in 1,7 mL FB-Puffer (4°C) pro 100 mL Hauptkultur resuspendiert, à 100 µL aliquotiert für 1 h bei -20°C eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

FB-Puffer: 100 mM KCl, 50 mM CaCl2, 10% (w/v) Glycerin, 10 mM Kaliumacetat, pH 6,4

#### 2.17.2 Chemische Transformation von E. coli

Die Transformation kompetenter E. coli Zellen erfolgte nach Hanahan (1983)<sup>[92]</sup>.

#### 2.17.3 Elektroporation von P. putida

Die Elektroporation wurde mit Hilfe des MicroPulsers (BioRad, München) nach Herstellerangaben in 2mm Elektroporationsküvetten (Biobudget) durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen direkt in EM1-Medium (Abs. 2.9.2) aufgenommen, bei 30 °C für 3 h im Brut-Roller inkubiert und anschließend auf Selektivagar ausplattiert (30°C, über Nacht).

## 2.17.4 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Pseudomonas kann unter milden Bedingungen durch die Methode des "biparentalen matings" mittels Konjugation transformiert werden. Hierfür wird ein Donorstamm, der einen Pilus ausbilden kann, ein Rezipientenstamm und ein mobilisierbares Plasmid (mob+) benötigt. E. coli S17-1 wurde als Donorstamm verwendet und trägt die tra-Gene des RP4-Plasmids stabil ins Genom integriert <sup>[104]</sup>. Als Empfängerstamm (Rezipient) wurde P. putida KT2440 verwendet. Die Anzucht der Stämme erfolgte über Nacht in einer 5 ml LB-Medium (Abs. 2.9.2) unter Selektionsdruck bei 30°C (P. putida) und 37°C (E. coli). Am folgenden Tag wurde die E. coli-Kultur in eine 10 ml-Hauptkultur mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05 überimpft und das Zellwachstum in der logarithmischen Phase bei einer  $OD_{600}$  von ~ 0,5 gestoppt. Es wurden 2 ml der beiden Kulturen pelletiert (5 min, 8000 rpm, RT) und das Pellet mit zweimal mit je 1 ml 150 mM NaCl-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 8000 rpm, RT). Mit 1 ml LB-Medium wurde zunächst das eine, dann mit der erhaltenen Suspension das andere Pellet resuspendiert und auf einen sterilen auf einer LB-Agarplatte liegenden Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 4-24h Inkubation bei der Wachstumstemperatur des Rezipienten wurden die Zellen mit 1ml LB-Medium vom Filter gespült und in unterschiedlichen Verdünnungen  $(10^{0} - 10^{4})$  auf Selektivagar ausplattiert. Dem Selektivagar wurde zur Kontraselektion des E. coli Stammes das Antibiotikum Irgasan in einer Konzentration von 25 µg/ml zugesetzt.

## 2.18 Blau-Weiß-Selektion über α-Komplementation in E. coli

Die Blau-Weiß-Selektion basiert auf der Unterscheidung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in Gegenwart des Substrats X-Gal und des Induktors IPTG. Dabei muss ein Wirtsbakterium (z.B. *E. coli* DH5 $\alpha$ ) verwendet werden, das die  $\omega$  -Peptidregion der  $\beta$  -Galaktosidase chromosomal-kodiert, sowie Vektoren (z.B. pUC18, pBluescript) mit einer MCS in der komplementierenden  $\alpha$ -Peptidregion. Nach der Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz wurden die Zellen auf selektivem Indikatormedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden für mehrere Stunden bei 4°C gelagert und positive Klone durch eine weiße Färbung identifiziert.

Indikator<br/>medium: LB-Agar, (150 µg/mL Ampicillin), 165 µM IPTG, 6 mL X-Gal (2% (w/v) in DMF)

# 2.19 Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stamms *P. putida* durch Deletion

Für die Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stamms *P. putida* durch Deletion des aktiven Threonin-Aldolase-Gens PpTA in *P. putida* KT2440 standen einige Methoden zur Verfügung:

Zunächst wurde zur Erstellung der Insertions-/Deletionsmutante des Gens *ppTA* ein Mutagenesevektor konstruiert, der auf dem mobilisierbaren Suizidvektor pSUP202 beruht.

Es wurden 500 bp Fragmente der flankierenden Regionen vor Anfang und Ende der 1045 bp langen Gensequenz mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der Oligonukleotide ,up' und ,dw' wurden an den Enden der amplifizierten Fragmente Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Sal*I (up-fw, dw-rev), *Bam*HI (up-rev, dw-fw) und *Hind*III inseriert.

Alternativ wurde direkt in das PpTA-Gen über eine Gen-interne Schnittstelle die Antibiotika-Kassette  $\Omega Gm^{r}$ , die aus dem Vektor pBSL142 isoliert wurde, eingefügt und das gesamte Konstrukt in den Suizidvektor pSUP202 kloniert.

Eine dritte Methode basiert auf einem PCR-Schema via Overlap-Extension-PCR. Hier wurden die sowohl die 500 bp Fragmente der flankierenden Regionen vor Anfang und Ende der 1045

bp langen Gensequenz (up500, dw500), als auch die Antibiotika-Kassette  $\Omega Gm^{r}$ , mittels PCR amplifiziert und über die Primer homologe Bereiche zwischen den drei Fragmenten eingefügt. Üner diese Homologien sollte in einer weiteren PCR alle drei Fragmente zu einem PCR-Produkt up500-  $\Omega Gm^{r}$ -dw500 zusammengefügt werden, das im anschließenden in den pSUP202 kloniert werden sollte.

Der resultierende Mutagenesevektor sollte im Weiteren als pSUP $\Delta taPp$  ( $\Omega$ Gm in pSUP202) bezeichnet werden. Nach der Transformation des *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit dem Mutagenesevektor sollte dieser durch den tri-parentalen konjugativen Transfer in *P. putida* KT2440 überführt werden. Die Transkonjuganden, die auf Selektivagarplatten mit den Antibiotika Gm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup> wachsen können, enthalten den durch homologe Rekombination ins Genom integrierten Mutagenesevektor, da dieser als pSUP202-Derivat in *P. putida* nicht replizieren konnte.

Durch ein weiteres Rekombinationsereignis soll der Vektoranteil aus dem Genom wieder verloren gehen und über die homologen flankierenden Bereiche die Gentamycinkassette inseriert und das intakte *ppTA*-Gen deletiert werden.

# 2.20 Proteinexpression und Probenaufbereitung

#### 2.20.1 Expression

*E. coli* BL21 (DE3) und *P. putida* KT2440 wurden jedes Mal neu mit Plasmid-DNA transformiert, auf selektivem Agar vereinzelt und direkt zur Expression verwendet.
Eine 25 mL Vorkultur wurde in selektivem Medium in einem 250 mL Erlenmeyer-kolben mit Schikanen mit einer Einzelkolonie beimpft und unter Schütteln über Nacht (ÜN) kultiviert.
Am Folgetag wurde eine 1 L Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,05 in einem 5 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit der VK vom Vortag angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis max. 0,8 angezogen. Anschließend wurde die Kultur mit 1 mM IPTG bzw. induziert und weitere 4 h kultiviert.

#### 2.20.11 Co-Expression mit Chaperonen zur Verbesserung der Löslichkeit

Die RR-ADH aus *Rhodococcus ruber*, die für den Nachweis von Benzaldehyd im gekoppelten Photometertest zur Bestimmung der Threonin-Aldolase-Aktivität eingesetzt werden kann, wurde zur Verbesserung der Löslichkeit und damit der Aktivität durch den Einsatz von Chaperonen versucht zu optimieren. Hierzu wurde zunächst das Gen für die RR-ADH in den Vektor pET21 ligiert, der Ligationsansatz in *E.coli* DH5α transformiert und im Folgenden das Plasmid RR-ADH-pET21a isoliert.

Für die Co-Expression mit dem Chaperon pGro7 (Takara-Chaperon Tool-Box) wurden je 3 μl des Vektors RR-ADH-pET21a und des Chaperons pGro7 in *E.coli* BL21 (DE3) transformiert und überexprimiert. Die Expressionsdauer betrug 18-22 h bei 25°C. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (8000 rpm, 4°C für 20 min) geerntet und über die French Press aufgeschlossen.

## 2.20.2 Zellaufschluss

Zellen wurden in größerem Maßstab (> 10 ml) über die French Press und in kleineren Volumina über Glasperlen an der Schwingmühle (Retsch) aufgeschlossen.

#### 2.20.2.1 French Press

Für einen Zellaufschluss über die French-Press wurden die Zellen als 15-25% ige Lösung in Kaliumphosphat-Puffer (KPi, 50 mM, pH 8.0) resuspendiert. Nach drei Durchläufen an der French Press bei einem Druck von 1500 bar wurde für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der zellfreie Rohextrakt als klarer Überstand erhalten.

#### 2.20.2.2 Schwingmühle

1,2 g Glasperlen  $(0,3 - 0,5 \mu m)$  wurden in Eppendorfgefäßen (EPGs) eingewogen und 800  $\mu$ l Zellsuspension (25% ig in KPi-Puffer, 50 mM, pH 8.0) auf die Glasperlen gegeben. Anschließend wurden die EPGs in Einsätzen in der Schwingmühle eingespannt und bei maximaler Einstellung in drei Durchläufen zu je 5 min aufgeschlossen. Zwischen den Durchläufen wurden die Proben je 5 min auf Eis gekühlt. Durch anschließende Zentrifugation erhält man den zellfreien Rohextrakt als klaren Überstand

#### 2.20.3 Fraktionierung von E. coli-Zellen

Die Zelltrümmer, die die erste Fraktion darstellen, wurden durch eine Zentrifugation für 2 min bei 3.000 rpm (4°C) aus dem GZE entfernt. Zur weiteren Aufteilung des GZE in lösliche (Fraktion 3) und membrangebundene Proteine (Fraktion 2) wurde für weitere 30 min bei 14.000 rpm (4°C) zentrifugiert. Die hierbei sedimentierten Proteine ("inclusion bodies") wurden direkt in 1 Vol. SDS-Probenpuffer oder Zellaufschlusspuffer aufgenommen, während die im Überstand lokalisierten löslichen Proteine direkt in Enzymtests eingesetzt oder mit ½ Vol. SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei -20°C.

## 2.20.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von BRADFORD spektralphotometrisch bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA), mit dem eine Eichgerade angelegt wurde. Hierzu wurde die Absorption bei einer BSA Verdünnung von 0,02 bis 0,1 mg/ml gemessen und grafisch gegen einander aufgetragen. Es wurden 100 µl Verdünnung mit 900 µl Bradford Reagenz versetzt, 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration eines Enzyms

wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, um die optimale Verdünnung zu bestimmen, die innerhalb des linearen Wertebereichs der Eichgeraden liegt.

Proteine in Lösung sind in der Lage aufgrund der aromatischen Aminosäuren ultraviolettes Licht einer Wellenlänge von 280 nm zu absorbieren. Alternativ wurde daher über die Messung der Absorption bei 280 nm und die Extinktionskoeffizienten aromatischer Aminosäuren (Tyrosin und Tryptophan) die Proteinkonzentration über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet. Diese Methode wurde bei frisch aufgereinigten Enzym-Präparaten angewandt.

#### 2.20.5 Aufarbeitung des Zellpellets für SDS-PAGE Analysen

Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) 10 min bei 95°C aufgekocht (100  $\mu$ l Probe mit 25  $\mu$ l Probenpuffer). Typischerweise wurden 10  $\mu$ L Probe über SDS-PAGE analysiert. Zuvor wurde entweder die Proteinkonzentration bestimmt und zu vergleichende Proben nach gleichem Proteingehalt (15  $\mu$ g) aufgetragen oder auf die gleiche OD<sub>600</sub> verdünnt und nach gleichem Volumen aufgetragen.

#### 2.20.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem, welches sich aus einem 5 %igen Sammelgel und aus einem 14 %igen Trenngel zusammensetzte. Die Proben wurden bei einer Spannung von 100 V ins Sammelgel einlaufen gelassen, anschließend wurde das Gel bei erhöhter Spannung (180 V - 200 V) weiter laufen gelassen. Die Entwicklung des Gels erfolgte in Coomassie-Färbelösung auf Ethanolbasis für 1-2h und anschließende Entfärbung in Essigsäure/Ethanol-Entfärber über Nacht.

## 2.21 Biochemische Methoden/ Analytische Methoden

# 2.21.1 Bestimmung der Threonin-Aldolase-Aktivität durch einen gekoppelten Photometertest

Es wurde ein gekoppelter photometrischer Enzymtest mit L-Threonin als Substrat durchgeführt unter Verwendung eines Hilfsenzyms, der ADH aus Bäcker-Hefe, die den freigesetzten Aldehyd quantitativ nachweist (Abb. 19). Die Aktivität der Threonin-Aldolase kann durch Messung der Abnahme des Cofaktors NADH in der ADH-Reaktion bei 340 nm indirekt bestimmt werden <sup>[38]</sup>. Durch einen Überschuss an ADH wurde gewährleistet, dass die Aktivität der Aldolase limitierend und somit die Abnahme der NADH-Konzentration direkt proportional zu dieser war. Die Messung erfolgte bei 30 °C, wobei der Ansatz (720 µl Millipore, 100 µl HEPES 1 M, pH 8, L-Threonin-Lsg. 100 mM, NADH 12,5 mM, PLP 2,5 mM, Manganchlorid, Hefe-ADH 3 U) 5 min vorinkubiert wurde. Der Test wurde durch Zugabe der ADH (10 µl) gestartet und die Änderung der Extinktion über 90 s verfolgt.



**Abb. 19:** Gekoppelter Photometertest mit Threonin als Substrat zur Bestimmung der Threonin-Aldolase-Aktivität nach Kimura *et al.*<sup>[38]</sup>.

#### 2.21.2 Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Threonin-Aldolase-Reaktion

Mit dem indirekten Photometertest zur Bestimmung der TA-Aktivität (Abs. 2.21.1) wurde das pH-Optimum der Tryptophan87-Mutante bestimmt. Die Aktivität wurde zwischen pH 4 und pH 11 bestimmt. Hierfür wurden verschiedene Puffer, die entweder für den sauren (Citrat-Puffer), neutralen (Phosphat-Puffer) oder basischen pH-Bereich (TRIS-Puffer) am besten geeignet waren, verwendet. Die Abnahme der Substratkonzentration wurde innerhalb einer Messzeit von 90 s verfolgt und die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert graphisch dargestellt.

#### 2.21.3 Bestimmung des Temperaturoptimums der Threonin-Aldolase-Reaktion

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Threonin-Aldolase-Reaktion wurde der indirekte Photometertest verwendet (Abs. 2.21.1). Der Reaktionsansatz wurde hierfür ohne Enzym-Rohextrakt, Cofaktor NADH und Hilfsenzym ADH 5 Minuten bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe des zuvor gereinigten Enzyms, des Cofaktors NADH und zuletztder ADH die Messung gestartet.

Die Abnahme der Substratkonzentration wurde innerhalb einer Messzeit von 90 s verfolgt und die Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur graphisch dargestellt.

#### 2.21.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung von L-Threonin zu Acetaldehyd durch die Threonin-Aldolase gegen die L-Threonin-Konzentration aufgetragen. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit dem gekoppelten Photometertest (Abs. 2.21.1) bestimmt.

Die Auswertung nach Michaelis-Menten erfolgte mit Hilfe des Programms Origin 7G; so ließen sich sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$ , als auch die Michaelis-Menten-Konstante K<sub>m</sub> bestimmen.

#### 2.21.5 Umsetzung und Derivatisierung zur Analyse mittels NMR und HPLC

Zu 1 mmol Glycin, 0,1 mmol Benzaldehyd und PLP (50 µM) wurde 250 µl Rohextrakt gegeben und die Mischung 5h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert basisch gestellt (180 µl 5 M NaOH) und 1,5 Äquivalente (0,15 mmol) Benzoylchlorid zugegeben. Während der Reaktionszeit wurde der pH mehrmals überprüft und gegebenenfalls mit NaOH nachkorrigiert. Nach 2 h wurde pH 1 mittels verdünnter HCl eingestellt und fünfmal mit je 1 ml Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Umsatz und das Diastereomerenverhältnis wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt, der *ee*-Wert mittels chiraler HPLC. Der Umsatz kann durch das Verhältnis an derivatisiertem Phenylserin zu Glycin bestimmt werden.



Abb. 20: Derivatisierung von Phenylserin mit Benzoylchlorid.

#### 2.21.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektren wurden an den Geräten JEOL JNM GX 400, JEOL JNM EX 400 oder Bruker Avance 300 oder 400 NMR-Spektrometer gemessen. Falls nicht angegeben wurden alle Messungen bei RT durchgeführt. Die chemische Verschiebung ist in  $\sigma$ -Werten (ppm) angegeben. Für die Signalmultiplizitäten werden im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartätt, m = Multiplett, b = verbreitert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Delta bearbeitet.

#### 2.21.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

100 μl Enzym (Rohextrakt) wurden in 1ml Batch-Ansätzen (Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 7, 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 % DMSO) zusammen mit den entsprechenden Aldehyden (5 – 500 mM) bis zu 96 h bei 30 °C und 300 rpm auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion der Ansätze mit der doppelten Menge an Essigsäureethylester (EE) gestoppt. Die Konzentration der Produkte und deren *ee*-Wert wurden mittels chiraler HPLC bestimmt (Chiracel OD-H, Daicel, Arbeitskreis Prof. Gröger in Erlangen). Die Spektren wurden mit einem LC-Net II/ADC Gerät und Pumpen (PU-1587 Intelligent Prep. Pump und PU 987 Intelligent Prep. Pump) der Firma JASCO oder mit einem Gerat CBM-10A und Pumpe (LC-10AT Liquid Chromatograph) der Firma Shimadzu aufgenommen. Als Säulen wurden die Daicel ChiralpakR AD-H bzw. Daicel ChiralcelR OJ-H Säule verwendet. Als Laufmittel diente Hexan/ Isopropanol (90:10), die Flussrate betrug 0,5 ml/min, die Temperatur lag bei 40 °C.

#### 2.21.8 Umsetzungen zur gaschromatographischen Analyse

Bei den GC-Analysen wurde sowohl das Substrat Benzaldehyd, als auch der korrespondierende Benzylalkohol, nachgewiesen und quantifiziert. Vor den eigentlichen Messungen wurden die reinen Substrate als Referenzen gemessen, um die genaue Retentionszeit zu ermitteln. Die Umsetzungen erfolgten in der Threonin-Aldolase-Spaltreaktion, ausgehend von Phenylserin, welches 10 mM in KPi-Puffer (50 mM, pH 7,5) gelöst wurde und mit 100 µl Rohextrakt 5h bei RT inkubiert wurde. Zur Extraktion des gebildeten Produktes wurden 200 µl der Ansätze in ein neues Gefäß (ER) überführt, 400 µl Essigsäureethylester zugegeben und 1 min sorgfältig durchmischt (Vortex). Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (5 min, 14000 rpm, RT). 150 µl der oberen, Phase wurden abgenommen, in ein GC-Gefäß organischen überführt und gaschromatographisch analysiert.

#### 2.21.9 Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Untersuchungen an stationärer chiraler Phase wurden mit einem Gaschromatographen (GC-17A) der Firma Shimadzu unter Verwendung der chiralen Säule CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm ID) durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium (1,3 ml/min) verwendet. Zur Analyse wurde, wenn nicht anders angegeben, 150  $\mu$ l der Proben-Lösung eingespritzt. Die Messungen liefen über 36 min bei folgendem Temperaturprogramm ab:

Starttemperatur 60°C, 5 min halten Anschließend 5°C pro Minute heizen bis 195°C Bei 195°C 5 min halten

Nachdem bekannt war, dass das gewünschte Produkt Benzaldehyd relativ am Anfang des bisherigen Temperaturprogramms im Spektrum bei ca. 5,9 min zu sehen war, wurde das Programm angepasst indem es dementsprechend gekürzt wurde, um in der gleichen Zeit mehr Messungen laufen zu lassen.

#### 2.2.1.10 Fehlerbetrachtung zur Analytik

Einige NMR Spektren ließen sich entweder durch hohes Hintergrundrauschen oder durch unzureichend hohe Maxima schlecht, bzw. gar nicht integrieren. Aus diesem Grund konnte für einige enzymatsiche Umsetzungen die Diastereoselektivität nicht konkret in Werten angegeben werden und meist nur eine Schätzung bzw. Tendenz für die Diastereomerenverhältnisse (d.r.-Werte) gemacht werden. Desweiteren zeigten viele Spektren direkt, dass sowohl threo als auch erythro Produkt nahezu gleichermaßen entstanden sind und dien d.r.-Werte in der Nähe eines racemischen Gemisches lagen. In diesem Fall wären die Werte keine signifikante Verbesserung zur Referenz gewesen und wurden als nicht relevant betrachtet. Als signifikant sollten d.r.-Werte von mindestens 20% Verbesserung zum Referenzenzym betrachtet und mit konkreten Werten angegeben werden. Deshalb ist im Ergebnisteil und in der Diskussion zum Teil nur eine Aussage darüber gemacht worden, ob ein Enzym eher als threo- oder erythro- spezifisch klassifiziert werden kann, bzw. es sich um ein nicht selektives Enzym handelt, dass zur Bildung eines Racemats führt.

## 2.22 Chromatographische Reinigung der Threonin-Aldolasen

Die Reinigung der Proteine erfolgte nach der Expression des korrespondierenden Gens in dem Vektors pET28a im heterologen Wirt E. coli BL21(DE3) als N-terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) nach Porath et al. (1975) <sup>[105]</sup>. Nach der Expression im 1 1 -Maßstab wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm, 20 min, 4 °C) und das Pellet in KPi-Puffer (50 mM, pH 8) resuspendiert, so dass eine 25% ige (w/v) Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden an der French Press aufgeschlossen und die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (16.000 rpm, 30 min, 4°C) abgetrennt. Der als Überstand erhaltene zellfreie Rohextrakt wurde anschließend über eine mit mindestens 5 Säulenvolumen equilibrierte "Ni<sup>2+</sup>-NTA superflow"-Säule (40 ml Säulenvolumen, Qiagen, Hilden) mit einer Flußrate von 2-4 ml/min aufgereinigt. Die Säule wurde mit Wasch-Puffer (50 mM KPi pH 6, 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM ThDP, 20 mM Imidazol) gewaschen bis die Extinktion bei 280 nm konstant blieb und anschließend mit Elutions-Puffer (50 mM KPi pH 6, 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM ThDP, 250 mM Imidazol) bei einer Flussrate von 4 ml/min von 0 - 100% Imidazolkonzentrazion eluiert. Die einzelnen Fraktionen des Elutions-Maxima wurden anschließend über ein SDS-Gel (14 %iges Trenngel) analysiert und photometrisch auf TA-Aktivität untersucht (s. Abs. 1.19.1).

Das Aufkonzentrieren, Entsalzen und Umpuffern der Proteinlösungen erfolgte in Centricons mit einer Membran -Ausschlussgrenze von 10 kDa. Durch Umpuffern wurde der Imidazol-Puffer (250 mM Imidazol) durch Kaliumphosphat-Puffer (Kpi, 50 mM, pH 8.0) ersetzt, indem zweimal mit KPi aufgefüllt und zentrifugiert wurde. Die gereinigten Proteine wurden sofort frisch verwendet oder für einige Tage bei 4°C gelagert.

## 2.23 Kristallisierung der Threonin-Aldolase aus E. coli (LTAE)

Die Kristallisierungs-Ansätze erfolgten durch die Arbeitsgruppe für Strukturbiochemie und biophysikalische Chemie von PD Dr. Karsten Niefind an der Universität zu Köln; es wurde frisch aufgereinigtes und aufkonzentriertes Enzympräparat von mindestens 10 mg/ml eingesetzt.

Direkt vor der Kristallisation wurde die LTAE in 10 mM TEA, pH 7.0 über eine Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) gelfiltriert und dazu eine Flussrate von 0.5 ml/min angelegt. Das Enzym sollte in einem Ansatz als Apoenzym (mit Cofaktor PLP) und in einem weiteren Ansatz unter Zugabe des Substrats Glycin cokristallisiert werden.

Dem Protein (0.27 mM) wurde für diese Ansätze 0.28 mM PLP (also etwa equimolar) und für den Ansatz mit Substrat 10 mM Glycin (im Überschuss) zugesetzt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Direkt vor dem Pipettieren der Ansätze wurden die Proben 20 Minuten bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert, um unerwünschte Proteinaggregate abzutrennen.

Die Kristallisierung erfolgte in "Intalli-Plates (96 well)" der Firma Art Robbins (Sunnyvale, USA) unter Nutzung des Pipettierautomaten "Hydra II" der Firma Matrix (Wehrheim) mit je 500 nl unterschiedlicher Fällungsmittellösungen aus kommerziell erwerblichen Kristallisationsscreens pro Well. Anschließend wurde mit dem "eDrop"-System (Matrix, Wehrheim) 500 nl Proteinlösung zu der Fällungsmittellösung hinzupipettiert, der Tropfen hatte also ein Gesamtvolumen von 1 µl. Die Intelli-Plates besitzen zwei Tropfen pro Well, so dass in einem immer Fällungsmittel mit Protein und Glycin, in dem anderen Fällungsmittel mit Protein ohne Glycin gemischt wurde. Die Tropfen sind über einem Reservoir von 70 µl Volumen der reinen Fällungsmittellösung angebracht, die Kristallisation erfolgte nach dem Dampfdiffusionprinzip im so genannten "hängenden Tropfen". Die Platten wurden dann mit Folie abgedeckt, so dass die Tropfen immer nur mit dem dazugehörigen Reservoir über die Gasphase in Kontakt stehen. Danach wurde für eine Minute bei 3000 rpm zentrifugiert, um eine möglichst homogene Durchmischung der Tropfen zu erreichen. Die Ansätze wurden bei 20°C gelagert und regelmäßig über ein Leica (Wetzlar) S8AP0-Mikroskop kontrolliert.

Kristallines Material wurde dann zunächst an einem "PX Scanner" der Firma Oxford Diffraction (Oxford, UK) mit Röntgenstrahlen beschossen, um Salzkristalle von Proteinkristallen zu unterscheiden und um einen Eindruck von den Beugungseigenschaften der Kristalle zu bekommen. Der PX Scanner erlaubt, einzelne Diffraktionsbilder eines Kristalles aufzunehmen, ohne dass man den Kristall zuvor aus der Kristallisationsplatte entnehmen muss. Die Nachteile sind, dass massiv viel Röntgenlicht von der Platte und dem Tropfen gestreut wird und, dass man den Kristall im Röntgenstrahl nicht voll um eine Achse drehen kann (ein zwingendes Kriterium, um die Struktur des Proteins zu lösen).

#### Optimierung

Ausgehend von den Ergebnissen der ersten breitgefächerten Kristallisationsansätze können die Kristallisationsbedingungen anschließend durch Variationen einzelner Parameter noch optimiert werden. Initiale Treffer wurden hierzu auf 24-well "Cryschem Plates" der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, USA) optimiert. Dazu wurden je nach Kristallisationsbedingung die unterschiedlichen Parameter (pH, Fällungsmittelkonzentration, Additiv-Konzentration) systematisch verändert (s. Ergebnis-Teil).

Die konkreten Bedingungen zur Kristallisation eines bestimmten Proteins lassen sich nicht vorhersagen und müssen daher empirisch ermittelt werden. Eine Abschätzung der wahrscheinlichsten Faktoren und eine Untersuchung der Kristallisationsbedingungen, die bereits bei verwandten Proteinen gefunden wurden (Datenbankrecherche), können hierbei behilflich sein. In diesem Fall wurden die Kristallisationsbedingungen der bisher einzigen Veröffentlichung einer kristallinen Threonin-Aldolase aus dem Organismus *Thermotoga marimita* als Vergleich verwendet. Außerdem wurde über die Seite www.phyre.com ein Homologie-Model (pdb file) für die TA aus *E. coli* modelliert und als Strukturvorschlag genutzt.

## Cryoprotokoll

Um die Kristalle später bei einer Temperatur von 100 K vermessen zu können, mussten sie zuvor in eine Cryolösung überführt werden. Kühlt man diese Cryolösung und den darin enthaltenen Proteinkristall, dann entstehen keine Eiskristalle (die das Diffraktionsbild durch ungeordnete Röntgenreflexe und das Protein-Kristallgitter stören), sondern vitrifiziertes Eis, eine amorphe, glasartige Form von Wasser, deren Dichte in etwa der von flüssigem Wasser entspricht. So bleibt der Kristall unbeschadet und es kommt zu keinen unnötigen Röntgenreflexen durch kristallines Wasser.

Die optimierten Kristalle wurden mit Nylon-Schlaufen der Firma Hampton Research "gefischt" und in einen extra Tropfen mit Cryolösung überführt. In dieser Lösung wurden die Kristalle mehrere Minuten inkubiert, dann wieder mit einer Nylon-Schlaufe gefischt und in flüssigen Stickstoff überführt.

#### Messung

Die eigentliche Messung der Kristalle erfolgte an der Beamline MX14.1 am BESSY in Berlin. Die Wellenlänge des Röntgenlichts war dabei 0.91841 Å. Der Detektor war ein Rayonics MX-225 3x3 CCD-Detektor.

#### Kristallisationsscreens:

1. Crystal Screen 1 + Crystal Screen 2 der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, USA), 96 Bedingungen

- 2. Classic Screen 1-10 der Firma Jena Bioscience (Jena), 240 Bedingungen
- 3. JCSG Core Suite 1-4 der Firma Qiagen (Hilden), 384 Bedingungen
- 4. JCSG + Suite der Firma Qiagen (Hilden), 96 Bedingungen
- 5. Grid Screen MPD der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, USA), 24 Bedingungen
- 6. Grid Screen PEG/LiCl der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, USA), 24 Bedingungen

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Vorversuche

## 3.1.1 Screening-Methode und Analytik

Zur Identifizierung neuer, aktiver Enzyme mit Threonin-Aldolase-Aktivität wurde zunächst eine geeignete Screening-Methode benötigt, die direkten Aufschluss über das Vorhandensein eines intakten TA-Gens gibt.

Zunächst wurde das Screening von der Aldolase-Spaltreaktion, der Retro-Aldolreaktion, aus betrachtet und ausgehend von D,L-*threo*-Phenylserin als Substrat der Threonin-Aldolase die Spaltung in die Komponenten Glycin und Benzaldehyd analysiert. Phenylserin bietet sich als zu untersuchendes Substrat an, da es bereits gut getestet ist für die Reaktion (Fesko *et al.*)<sup>[44]</sup>, (Misono *et al.*)<sup>[52]</sup> und außerdem auch kommerziell verfügbar ist (Acros und Sigma-Aldrich). Das Spaltprodukt der Aldolase-Reaktion Benzaldehyd ist wiederum einfach mittels Gaschromatographie nachzuweisen (Abb. 21 und 22). Somit folgte zunächst die Überprüfung aktiver Enzyme mittels Gaschromatographie, wobei hier nur eine Aussage über das Vorhandensein eines TA-Gens, jedoch nicht über die Selektivität gemacht werden konnte.



Abb. 21: 1. Screening-Runde ausgehend von der Retro-Aldolreaktion mit Phenylserin als Substrat. Der Nachweis des freigesetzten Benzaldehyds erfolgt mittels gaschromatographischer Untersuchung.



Abb. 22: GC-Referenz-Diagramm für Benzaldehyd.

Im Weiteren sollten die mittels GC analysierten aktiven Enzyme auch in Syntheserichtung, der Bildung von Phenylserin in der Aldolreaktion, verifiziert werden. Der Nachweis von Phenylserin ist gaschromatographisch nicht möglich, weshalb hier eine alternative Analytik gewählt werden musste, die die Überprüfung chiraler Moleküle erlaubt. Zur Bestimmung der Diastereoselektivitäten und zur Unterscheidung der verschiedenen Diastereomere kann die <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie genutzt werden, zur Bestimmung der Enantioselektivität und Unterscheidung der Enantiomere eines Gemischs von Isomeren kann die chirale HPLC-Analytik genutzt werden.

Zur Messung der Proben mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurden zwei Messvarianten verwendet; Phenylserin konnte entweder als Hydrochlorid in D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel oder als an der Aminofunktion mit Benzoylchlorid derivatisierte Verbindung in Aceton als Lösungsmittel gemessen werden. Die Methode der Derivatisierung des gesamten NMR-Ansatzes ist jedoch zur Umsatzbestimmung sicherer. Da die zur Umsetzung verwendeten Enzym-Rohextrakte zur Lagerung meist in Glycerin aufbewahrt wurden und bei den Messungen das Glycerin-Signal das Signal des Glycins überlagert, ist die Auswertung nicht mehr möglich ist. Durch Derivatisierung werden störende Glycerinreste vor der Messung abgetrennt und nur derivatisiertes Produkt Phenylserin und Edukt Glycin sind im Spektrum zu sehen.

In der Abbildung 23 ist das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines *threo-/erythro-*Gemischs von derivatisiertem Phenylserin als Referenz-Spektrum dargestellt. Die beiden Diastereomere

lassen sich durch unterschiedliche Signale der beiden Wasserstoffe in β-Position voneinander unterscheiden. Das Signal für das *threo-* β-H-Atom ist bei einer Verschiebung von ~ 5,5d ppm, das erythro- β-H-Atom bei einer Verschiebung ~ 5,26d ppm zu erwarten. Das Signal der Wasserstoffe in α -Position ist für die *threo-* und *erythro-*Verbindung im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von derivatisiertem Phenylserin nicht voneinander zu unterscheiden und tritt als Multiplett bei ~ 5,0m ppm auf.

In Abb. 24 ist das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines *threo-/erythro*-Gemischs von Phenylserin als Hydrochlorid dargestellt. Hier sieht das Spektrum bezüglich der *threo/erythro*-H-Signale anders aus. Sowohl die Signale der Wasserstoffe in  $\beta$ -Position, als auch die Signale der Wasserstoffe in  $\alpha$  -Position sind aufgespalten. Für das *threo*-Isomer liegt das Signal des  $\beta$ -H-Atoms bei 4,24d ppm und das des  $\alpha$  –H-Atoms bei 5,42d ppm, für das *erythro*-Isomer liegt das Signal des  $\beta$ -H-Atoms bei 4,33d ppm und das des  $\alpha$  –H-Atoms bei 5,39d ppm.



Abb. 23: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines *threo-/ erythro*-Gemischs von derivatisiertem Phenylserin.



Abb. 24: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines *threo-/ erythro-*Gemischs von Phenylserin als Hydrochlorid.

Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte durch Vergleich der Signale für Produkt und Edukt im Spektrum, im Fall einer Derivatisierung wurde der Umsatz aus dem Verhältnis von derivatisiertem Phenylserin zu derivatisiertem Glycin bestimmt. Für die Umsatzbestimmung war die voherige Derivatisierung nötig.

#### 3.1.2 Indirekter, gekoppelter Photometertest zur Bestimmung der TA-Aktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der Threoninaldolasen wurde ein indirekter, gekoppelter Photometertest nach Kimura *et al.* verwendet <sup>[38]</sup>. Der durch die TA-Reaktion entstandene Aldehyd wird dabei durch Zugabe einer ADH unter Verbrauch des Cofaktors NADH zum korrespondierenden Alkohol reduziert. Durch Messung der Extinktions-Abnahme bei 340 nm, die spezifisch für NADH ist, kann die Enzymaktivität der TA in U/ml bestimmt werden. Die Messung der ADH-Reaktion sollte sehr schnell stattfinden, damit die Reaktion der TA und damit die Spaltung der  $\beta$  -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäure der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in diesem gekoppelten Test ist.

Die Wahl des Hilfsenzyms, der ADH, ist abhängig von dem durch die TA-Reaktion entstandenen Aldehyd. So kann bei Verwendung von Threonin als Substrat nicht dieselbe ADH verwendet werden, wie bei Verwendung von Phenylserin als Substrat. Bei der Spaltung von Threonin entsteht Acetaldehyd, der durch eine ADH aus der Bäckerhefe zum Alkohol reduziert werden kann. Bei der Spaltung von Phenylserin hingegen ensteht Benzaldehyd, den die Bäckerhefe-ADH nicht als Substrat akzeptiert und somit für diesen Test als Hilfsenzym ungeeignet ist. Hier könnten alternativ zwei weitere ADHs verwendet werden, die ADH aus der Pferdeleber (HL-ADH) und die ADH aus *Rhodococcus ruber* (RR-ADH).

Die HL-ADH war zu Beginn dieser Arbeit, im Gegensatz zur Bäckerhefe-ADH (Sigma-Aldrich) und RR-ADH, nicht verfügbar. Somit wurde zunächst getestet, ob die RR-ADH für Benzaldehyd als Substrat eine ausreichend hohe Spezifität aufweist und somit gute Aktivitäten messbar sind.

Der Aktivitätstest mit Benzaldehyd als Substrat lieferte für die RR-ADH jedoch nur eine geringe Aktivität von 1,8 U/ml. Außerdem wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und die spezifische Aktivität der ADH ermittelt. Es ergab sich eine Proteinkonzentration von 16,2 mg/ml und eine spezifische Aktivität von lediglich 0.14 U/mg. In weiteren Testreihen fiel die Aktivität in dem gekoppelten Test noch deutlich geringer aus.

Trotz der geringen Aktivitätswerte für die Messung mit Benzaldehyd wurde das Enzym auch im gekoppelten Photometertest zur Bestimmung der Threoninaldolase Aktivität getestet. Hierbei wurde der indirekte Photometertest für eine L-spezifische Threoninaldolase aus *E. coli* (LTAE. s. Abschnitt 3.1.2) durchgeführt. Die Aktivität war allerdings, wie erwartet, sehr niedrig mit 0,3 U/ml.

Es wurde anschließend untersucht, ob die RR-ADH vermehrt in löslicher oder in unlöslicher Form als "inclusion bodies" in der Zelle exprimiert wird. Da mehr als 50% der RR-ADH unlöslich vorliegen, wurde durch die Hilfe eines Chaperons, einem Faltungshelfer, versucht die Löslichkeit und somit auch die Aktivität der RR-ADH zu optimieren.

Doch auch die Co-Expression mit dem Chaperon pGro7 (Takara-Chaperon) lieferte keine signifikant verbesserte Aktivität für Benzaldehyd als Substrat mit 2 U/ml.

Aus diesem Grunde wurde zur Bestimmung der TA-Aktivitäten in allen folgenden Arbeiten der gekoppelte Photometertest mit Threonin als Substrat unter Verwendung der Bäckerhefe-ADH angewandt.

#### 3.1.2 Die Vergleichsenzyme

Seit Beginn der Arbeit standen zwei rekombinante Threonin-Aldolasen aus E. coli XL1 und der Hefe Sacharomyces cerevisiae für alle anstehenden Arbeiten als Vergleichsenzyme zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um L-spezifische Threonin-Aldolasen, die der Katergorie der low specificity-TAs zugeordnet werden können, da es sich hierbei um keine hoch diastereoselektiven Enzyme handelt. Die beiden Enzyme wurden auf ihre Aktivität und den d.r.-Wert analysiert und die TA aus E. coli wurde außerdem aufgereinigt und anschließend kristallisiert (s. Abs. 3.6.2 und 3.6.3). Abb. 25 zeigt das SDS-Gel der beiden Threonin-Aldolasen jeweils mit IPTG induziert und uninduziert. Beide Enzyme liegen in sehr gut überexprimierter Form vor. Die E. coli TA hat ein Molekulargewicht von 35 kDa, die TA aus S. cerevisiae liegt bei 40 kDa. Ausgehend von den bekannten Sequenzen der beiden Enzyme konnte eine Datenbankrecherche nach neuen aktiven Enzymen im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen werden (s. Abs. 3.3.3). In den folgenden Abschnitten soll besonders auf die Lspezifische low specificity-TA aus E. coli (LTAE) näher eingegangen werden. Die LTAE besitzt für die Spaltreaktion von L-Threonin eine volumetrische Aktivität von 35 U/ml (spezifische Aktivität 1,5 U/mg); sie katalysiert die Bildung von Phenylserin ausgehend von Benzaldehyd und Glycin mit einem Diasteremerenverhältnis von 54:46 (threo:erythro) unter fast vollständigem Umsatz von (91%) mit einem Enantiomerenverhältnis von >99% ee für das L-Isomer. Die TA aus der Hefe S. cerevisiae besitzt eine volumetrische Aktivität von 25 U/ml (spezifische Aktivität 1,5 U/mg).



**Abb. 25:** SDS-Gel der beiden rekombinanten Threonin-Aldolasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae*. Probe 1 = E. *coli* TA uninduziert, Probe 2 = E. *coli* TA induziert, M = 1 kb Ladder (Fermentas), Probe 3 = S. *cerevisiae* TA uninduziert, Probe 4 = S. *cerevisiae* TA induziert.

# 3.1.3 Prozessoptimierung der enzymatischen Aldolreaktion unter Verwendung der L-TA aus *E. coli* (LTAE)

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Harald Gröger der Universität zu Nürnberg-Erlangen wurde im Rahmen der Dissertation von Katrin Baer eine Prozessoptimierung der enzymatischen Aldolreaktion unter Verwendung der L-Threonin-Aldolase aus *E. coli* und *S. cerevisiae* durchgeführt. Hierbei sollte ein verbesserter Syntheseweg für die Herstellung von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren unter Auswirkung auf die Diastereoselektivität und den Umsatz der Reaktion erarbeitet werden (K. Baer *et al., Tetrahedron: Asymmetry* 2011).

Aus der Literatur gehen hohe Enantioselektivitäten mit >99% *ee*, aber meist nur unzureichende Diastereoselektivitäten mit d.r.-Werten in der Größenordnung von 65:35 (*threo:erythro*) und für aromatische Aldehyde von 72:28 (*threo:erythro*) hervor <sup>[41, 42]</sup>.

Im Rahmen der Prozessoptimierung wurden verschiedene Reaktionsparameter verändert, wie die Enzym- und Subtsratmenge, die Reaktionstemperatur und die Reaktionszeit. Außerdem wurden die Notwendigkeit des Glycinüberschusses, die Zugabe von Additiven und die Verwendung verschiedener substituierter Aldehyde analysiert.

Die Standard-Aldolreaktion unter Verwendung der Threonin-Aldolase für die Bildung von Phenylserin aus Benzaldehyd und Glycin verläuft mit 100 mM Substrat unter 10-fachem Überschuss von Glycin. Nach dem aktuellen Stand der Literatur ist die Substratkonzentration auf maximal 100 mM limitiert für eine erfolgreiche enzymatsiche Umstzung und Werte > 100 mM wären eine Herausforderung für die technische Anwendung. in großem Maßstab.

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration von 0,1 M auf 0,25 M ohne Umsatzverluste und Einbußen der d.r.-Werte durchaus möglich ist.

Die Notwendigkeit des Glycinüberschusses wurde jedoch bestätigt.

Sehr gute Diastereomerenverhältnisse wurden unter Verwendung von substituierten Benzaldehyden erhalten. So führte der Einsatz von *ortho*-Chlorbenzaldehyd bei der Synthese der entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäure unter Verwendung der L-TA aus *E. coli* zu einem signifikant verbessertem d.r.-Wert von 80:20 (*threo:erythro*) unter fast vollständigem Umsatz von > 95%. Auch mit dem Enzym aus der Hefe *S. cerevisiae* konnte ein hoher d.r.-Wert von 82:18 (*threo:erythro*) bei einem Umsatz von 92% erhalten werden.

Unter Verwendung dieses Substrates konnte eine erneute Prozessoptimierung auch mit einem geringeren Überschuss an Glycin (8 Äquivalente) die gleichen guten Ergebnisse erzielen.

Die Verringerung der Enzymmenge auf 30 U/mmol ging mit einer Erniedrigung des Umsatzes einher, jedoch ohne Verluste der Diastereoselektivitäten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Prozessoptimierung eine enzymatische Aldolreaktion unter Verwendung von 250 mM Substrat *o*-Chlorbenzaldehyd mit exzellentem Umsatz von > 95% und einem deutlich verbessertem d.r.-Wert von bis zu 80:20 (*threo:erythro*) unter Verwendung der Threonin-Aldolase aus *E. coli* (TA aus *S. cerevisia* 92% Umsatz, d.r.-Wert 82:18 *threo:erythro*) zulässt.

## **3.2 Screening-Wege**

#### 3.2.1 Screening von Stammsammlungen

Durch Screening verschiedener Stammsammlungen sollte ein Zugang zu neuen Enzymen für die Synthese chiraler  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren erhalten werden. Hierfür wurden zunächst ca. 200 verschiedene Stämme der hauseigenen IMET-Stammsammlung in jeweiligem Vollmedium kultiviert und anschließend der zellfreie Rohextrakt isoliert, der zunächst mittels GC und anschließend für einige ausgewählte Proben mittels NMR analysiert wurde.

Nach GC-Analyse zeigten 42 Stämme Threonin-Aldolase-Aktivität für die Spaltung von Phenylserin zu Benzaldehyd und Glycin, dies waren durchgehend verschiedene Stämme. Die folgende Tabelle (Tab. 20) gibt eine Übersicht über einige der Stämme aus der hauseigenen IMET-Stammsammlung, die über ein Enzym mit Threonin-Aldolase-Aktivität verfügen.

Stammname	DSM Nummer	IET-Nummer	Klassifizierung
Ralstonia eutropha	428	187	Bakterium
Arthrobacter sp.	20413	155	Bakterium
Pichia haplophila	70365	367	Hefe
Pichia guilliermondii	6381	366	Hefe
Ralstonia eutropha	531	19	Bakterium
Microbacterium lacticum	20427	23	Bakterium
Rhodococcus rhodnii	43336	61	Bakterium
Rhodococcus rubber	43338	74	Bakterium
Rhodotorula glutinis	70398	75	Hefe

 Tab. 20: Stämme aus der IMET-Stammsammlung, die in der Retro-Aldolreaktion mit Phenylserin-Aktivität zeigten.

Debaryomyces hansenii	70590	81	Hefe
Rhodococcus sp.	NCIMB 10554	212	Bakterium
Rhodococcus erythropolis	43188	132	Bakterium
Escherichia coli	2607	192	Bakterium
Curtobacterium albidum	20512	353	Bakterium
Dactylosporangium fulvum	43917	389	Bakterium
Pichia anomala	70260	413	Hefe

Die Analyse mittels NMR und die d.r.-Wert-Bestimmung lieferten 11 Stämme aus der IMET-Stammsammlung, die positiv bezüglich der Bildung von Phenylserin waren.

Es konnte dabei für acht Stämme gezeigt werden, dass hier Enzyme vorliegen, die eine Präferenz für die *threo*-Verbindung aufweisen, und drei Stämme, bei denen das *erythro*-Produkt bevorzugt gebildet wurde.

Es wurden außerdem gezielt Mikroorganismen, die literaturbekannt über eine Threonin-Aldolase verfügen, oder die eine Stammidentifizierung aus Bodenproben-Mikroorganismen nach 16S-rRNA Analyse lieferte, getestet. Hier wurden Pseudomonaden, Sphingobakterien und auch Arthrobacter untersucht, wobei nur die Arthrobacter hohe Aktivitäten in der Aldolaspaltung ausgehend von Phenylserin zeigten. Diese wurden anschließend auch mittels NMR in der Synthese-Reaktion analysiert, um die d.r.-Werte zu bestimmen. Die folgende Tabelle (Tab. 19) gibt die Ergebnisse der NMR-Auswertung wieder. Man sieht, dass die Umsätze sehr unterschiedlich sind von < 5% bis über 70%, aber die d.r.-Werte alle in derselben Größenordnung liegen. Alle getesteten Arthrobacter zeigten für die Aldolreaktion von Phenylserin Präferenz für die Umsetzung der *threo*-Verbindung, jedoch nur in vergleichbarer Höhe mit bereits literaturbekannten Enzymen. Der höchste d.r.-Wert wurde bei Verwendung des Stammes *Arthrobacter ardleyensis* mit einem Verhältnis *threo:erythro* von 70:30 erhalten (Tab. 21).

Arthrobacter Stamm	IET-number	conversion	dr
		[%]	(threo:erythro)
Arthrobacter nicotianeae	577	54	62:38
Arthrobacter chlorophenolicus	578	46	61:39
Arthrobacter ardleyensis	579	30	70:30
Arthrobacter methylotrophus	580	55	61:39
Arthrobacter agilis	581	< 5	64:36
Arthrobacter atrocyneus	582	71	59:41
Arthrobacter ureafaciens	583	55	62:38
Arthrobacter sp.	584	45	60:40
Arthrobacter gangotriensis	585	60	60:40
Arthrobacter sulfonivorans	587	58	62:38
Arthrobacter protophormiae	589	61	62:38
Arthrobacter globiformis	590	61	60:40
Arthrobacter kerguelensis	591	73	62:38
Arthrobacter citreus	593	< 5	n.b.
Arthrobacter nicotinovorans	594	71	60:40
Arthrobacter pascens	595	76	60:40

Tab. 21: Übersicht über die mit NMR gemessenen Umsetzungen der Arthrobacter-Enzym-Rohextrakte.

#### 3.2.2 Anreicherung Phenylserin-abbauender Mikroorganismen aus Bodenproben

Verschiedene Bodenproben mit ihrer Vielfalt an Mikroorganismen wurden auf Minimalmedium mit D,L-threo-Phenylserin als alleiniger C-Quelle kultiviert und so mit diesem Substrat angereichert. So wurden gezielt nur Mikroorganismen kultiviert, die in der Lage sind, Phenylserin in irgendeiner Weise zu verwerten, im Idealfall sollte dies durch eine C-C-Spaltung in einer Retro-Aldolreaktion mit einer geeigneten Aldolase erfolgen. Zunächst konnte jedoch nur eine Aussage über den Phenylserin-Abbau gemacht werden. Es wurden insgesamt 16 Bodenproben verschiedenster Art von unterschiedlichen Standorten für die Anreicherung verwendet, in Wasser resuspendiert und der wässrige Überstand direkt ausplattiert. Nach einigen Tagen bis hin zu Wochen (für einige Bodenproben) waren die meisten Platten mit einer Vielzahl von Kolonien verschiedener Farbe und Morphologie bewachsen. Die Platten von Bodenprobe 3, 8 und 14 waren auch nach einigen Wochen nicht

bewachsen. Es wurden von jeder bewachsenen Platte mehrere unterschiedliche Kolonien durch dreimaligen Ausstrich vereinzelt und anschließend in Cryo-Kulturen bei -80°C für die folgenden Experimente konserviert. Von den Isolaten 1, 2, 9, 15 und 16 konnten auch nach mehrfacher Fraktionierung keine Reinkulturen erhalten werden, es wurden immer wieder Verunreinigungen von Platte zu Platte verschleppt. Auf diese Weise konnten 26 verschiedene Isolate in Reinkulturen ausgehend von ursprünglich 16 Bodenproben erhalten werden. Anschließend wurden diese Isolate in Flüssigmedium mit Phenylserin als Kohlenstoff-Quelle kultiviert, die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und der zellfreie Rohextrakt für weitere Analysen erhalten. Die folgende Tabelle (Tab. 22) gibt eine Übersicht über die verwendeten Bodenproben, ihre Herkunft und die daraus gewonnenen reinen Isolate, die in der Lage waren Phenylserin zu verwerten.

Bodenprobe	Herkunft	gewonnene Isolate
B1		-
B2	Bodenproben	-
B3	Industriegelände	-
B4		B4a), b), c)
В5		B5a), b)
B6		B6a)
B7	Kompostproben	B7a)
B8		-
B9		-
B10	Baustelle, erdiger Boden	B10a1), a2)
		B10b1), b2)
		B10c)
B11	Sandboden	B11a1), a2), a3), a4)
		B11b1),
		B11c1), c2)
		B11d)
B12	Bodenprobe erdig	B12a),b)
B13	Bodeprobe sandig	B13a1), a2)
		B13b)

Tab. 22: Übersicht über die verwendeten Bodenproben, ihre Fundorte und die daraus erhaltenen Isolate.

		B13c)
B14	Bodenprobe sandig	-
B15	Bodenproben lehmig	-
B16		-



Abb. 26: Übersicht verschiedener resuspendierter Bodenproben verschiedener Standorte.



**Abb. 27:** Übersicht über die gewonnenen Rein-Isolate aus den Bodenproben. Isolat B11a) als intensiv gelb gefärbte Kolonien, B13b) als blass-gelb gefärbte Kolonien und B11c1) als unpigmentierte Kolonien auf Minimalagar mit Phenylserin als C-Quelle.

Die gewonnenen Bodenproben-Isolate wurden zunächst in der Retro-Aldolreaktion mit D,L*threo*-Phenylserin als Substrat analysiert und die Umsetzung nach 5h und nach 24h mittels Gaschromatographie untersucht, um entstandenen Benzaldehyd nachzuweisen. Dieser ist bereits in geringen Konzentrationen in der GC nach einer Retentionszeit von ~ 5.9 min analysierbar (Referenzspektrum Abb. 22). In fast allen Fällen konnte Benzaldehyd in verschiedenen Konzentrationen gaschromatographisch nachgewiesen werden. Die Isolate, bei denen die Umsetzung des Rohextraktes mit D,L-*threo*-Phenylserin zur Bildung von Benzaldehyd führte, verfügen somit über ein Enzym mit Threonin-Aldolase-Aktivität. Entscheidend ist jedoch, welche Stereoselektivität diese Enzyme aus den Bodenproben-Isolaten in der Aldolreaktion für die Bildung von Phenylserin zeigen. Aus diesem Grunde wurden die TA-aktiven Isolate mit Glycin und Benzaldehyd umgesetzt und die Bildung von Phenylserin nach 71h und 5h mittels NMR analysiert. Hierzu mussten die Proben nach der Umsetzung jedoch zunächst mit Benzoylchlorid an der Aminogruppe derivatisiert werden, um sie in Aceton als Lösungsmittel zu messen. Diese Methode erwies sich als vorteilhafter zur Signal-Identifizierung und Integration für die d.r.-Wert-Bestimmung. In ersten Versuchen wurden die Proben als Hydrochlorid in D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel vermessen, doch der Peak des D<sub>2</sub>O war von der Fläche so groß, dass er die relevanten Peak der *threo-* und *erythro-*Wasserstoffe weitesgehend verdeckte bzw. verschob. Durch vorherige Derivatisierung und Verwendung von Aceton als Lösungsmittel gibt es keine störenden Peaks mehr und eine leichtere Auswertung der Spektren ist möglich.

Erste NMR-Versuche nach 5h und 71h Umsatzzeit zeigten, dass kürzere Umsatzzeiten zu höheren d.r.-Werten zugunsten der *threo*-Verbindung führten. Dies gibt Tabelle 23 am Beispiel der ersten Messungen für drei verschiedene Isolate wieder. Die Abhängigkeit des d.r.-Wertes von der Umsatzzeit wird durch die Literatur belegt, da hohe d.r.-Werte nur unter kinetischer Kontrolle der Reaktion erhalten werden können<sup>[38]</sup>.

<b>Bodenproben Isolat</b>	Umsatz	d.r
		Wert
Umsatz	zzeit 5h	
B10b)	5	37:63
B11a)	38	72:28
B13a)	10	65:35
Umsatz	zeit 71h	
B10b)	10	27:73
B11a)	51	62:38
B13a)	29	64:36

 

 Tab. 23: Kinetische Untersuchung des Umsatzes und des d.r.-Wertes am NMR am Beispiel dreier Bodenproben-Isolate.

Die Isolate mit denen die ersten Messungen durchgeführt wurden, enthielten zum Teil noch Verunreinigungen, so dass für weitere aussagekräftigere Messungen zur Bestimmung der Diastereomerenverhältnisse und Umsätze die Isolate erneut aus der Kryo-Kultur angezogen wurden, um sie von Verunreinigungen zu befreien. Tabelle 23 gibt somit lediglich eine Aussage über die Veränderung des d.r.-Wert unter kinetischer Kontrolle der Reaktion.

Weitere NMR-Messungen der sauberen Isolate lieferten zum Teil sehr hohe Diastereoselektivitäten, wobei die besten Ergebnisse in der nächsten Tabelle (Tab. 24) zusammengefasst sind.

Bodenproben-Isolate	Umsatz	d.rWert, <i>de</i> -Wert
		(threo:erythro)
B10a 1), B10c)	55	63:37
B10a 2)	22	60:40
B10b1)	n.b.	> 90:10
B10b2)	10	28:72
B11a2)	10	68:32
B11a3)	51	> 90 % threo
B11a4)	38	76:24
B11b1)	59	66:34
B11c1)	49	69:31
B11c2)	n.b.	95:5
B13a 1)	29	> 85% threo
B13a 2)	81	> 90% threo
B13b)	6	> 90% threo
B13c)	14	> 95% threo

 Tab. 24: NMR-Analyse ausgewählter Bodenproben Isolate.

Die Umsätze konnten nicht für alle Proben bestimmt werden und variierten für die gemessenen Proben zwischen 10% und 81%, wobei 81% Umsatz für die enzymatische Aldolreaktion ein sehr hoher Wert ist, der selten erreicht werden kann. Die d.r.-Werte liegen bei fünf Isolaten über 90% für die *threo*-Verbindung; diese sind somit hoch *threo*-spezifisch.

Das Isolat B10b2) zeigt jedoch im Gegensatz zu allen anderen Isolaten *erythro*-Spezifität und nimmt damit eine Ausnahmerolle ein. Dies ist insofern verwunderlich, da alle Bodenproben mit reiner *threo*-Verbindung im Minimalmedium angereichert wurden.

Für einige Proben wurde außerdem an der chiralen HPLC der Enantiomerenüberschuss (*ee-*Wert) bestimmt. Alle gemessenen Proben waren hoch spezifisch für das L-Isomer, die folgende Tabelle (Tab. 25) gibt dies exemplarisch für vier Isolate wieder.

Bodenproben-	ee-Wert
Isolat	(HPLC)
B10b2)	L 96%
B11a3)	L>99%
B13a 1)	L 91%
B13a 2)	L >99%

Tab. 25: Enantiomerenüberschuss einiger Bodenproben-Isolate bestimmt mit chiraler HPLC.

Hier nimmt wieder Bodenproben-Isolat B10b2) eine spezielle Rolle ein, da es zusätzlich zur *erythro*-Spezifität auch noch L-Spezifität aufweist, denn es ist bislang kein Enzym aus der Literatur bekannt, das sowohl *erythro*- als auch L-spezifisch ist. Isolat B13a1) ist ebenfalls zu erwähnen, da es mit einem *ee*-Wert von 91% hinsichtlich der  $\alpha$ -Position nicht hoch selektiv ist und somit zu einem doch beträchtlichem Anteil auch das D-Isomer erhalten wird. Aus der Literatur geht jedoch hervor, dass Threonin-Aldolasen hinsichtlich ihrer Stereoselektivität in  $\alpha$ -Position hoch selektiv sind <sup>[37, 42, 43]</sup>.

Nach GC- und NMR-Analytik wurden drei Bodenproben mit den jeweils daraus erhaltenen Isolaten, die die besten Aktivitäten und Diastereoselektivitäten zeigten, für alle folgenden Arbeiten ausgewählt. Hierbei handelt es sich um die verschiedenen Isolate aus den Bodenproben **B10**, **B11** und **B13**.

#### 3.2.2.1 Kultivierung der Isolate auf Threonin als Kohlenstoff-Quelle

Durch Kultivierung aller aus der Anreicherung mit Phenylserin gewonnenen Bodenproben-Isolate auf Threonin als Kohlenstoffquelle in Minimalmedium, sollte getestet werden, ob unter Verwendung des natürlichen Substrats der TA-Reaktion in lebenden Organismen, dieselben Ergebnisse wie mit Phenylserin erhalten werden können. Alle Isolate ließen sich innerhalb weniger Tage auf Minimalagar mit Threonin als Kohlenstoff-Quelle kultivieren. Die Zellen wurden geerntet, der zellfreie Rohextrakt isoliert und eine Umsetzung mit Phenylserin als Substrat durchgeführt (5 h Umsetzung), die mittels GC analysiert wurde. In allen Fällen konnte kein Benzaldehyd als Spaltprodukt der Aldolase-Reaktion ausgehend von Phenylserin gaschromatographisch nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den gefundenen Enzymen aus den Bodenproben-Isolaten wahrscheinlich um induzierbare Enzyme handelt, die erst durch Vorhandensein von Phenylserin als Kohlenstoffquelle exprimiert werden.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde außerdem der gekoppelte Photometertest (Abs. 2.21.1) für die Rohextrakte aus der Threonin-Kultivierung mit Threonin als Substrat durchgeführt. Da die Isolate aus der Phenylserin-Anreicherung in der Lage waren auch auf Threonin als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen, muss das Threonin verwertet, bzw. abgebaut worden sein. Dies kann durch die Threonin-Aldolase in die Produkte Acetaldehyd und Glycin erfolgen, jedoch gibt es noch weitere Möglichkeiten des Threonin-Abbaus in lebenden Organismen. Die Aminosäure kann außerdem zu Propionyl-CoA umgesetzt werden, das wiederum zu Succinyl-CoA umgewandelt wird und in den Citrat-Zyklus einfließt. Außerdem kann Threonin durch die beiden Enzyme Threonin-Deaminase und Threonin-Dehydrogenase umgesetzt werden (Abs. 1.3.1.1).

Durch den Photometertest sollte somit getestet werden, ob das zur Kultivierung als C-Quelle verwendete Threonin durch eine Threonin-Aldolase gespalten wurde oder nicht. Wenn dies der Fall wäre, sollte man eine Aktivität durch den gekoppelten Photometertest unter Verwendung von Threonin als Substrat messen können. Doch wäre dieses Enzym nicht identisch mit der aus der Phenylserin-Anreicherung erhaltenen Aldolase (Phenylserin-Aldolase), da Phenylserin von ihr nicht als Substrat umgesetzt werden kann und sie somit spezifisch für Threonin als Substrat wäre. Der Photometertest lieferte allerdings keine Aktivität für die Umsetzung der Isolate aus der Threonin-Kultivierung. Dies lässt darauf schließen, dass Threonin auf anderem Wege metabolisiert wurde.

#### 3.2.2.2 Identifizierung der Phenylserin-abbauenden Organismen

Zur Identifizierung der verschiedenen Mikroorganismen aus den Bodenproben wurde eine Analyse der Stämme über ihre 16S-rRNA vorgenommen. Hierzu wurden die konservierten Bodenproben-Isolate in Vollmedium angezogen, um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten (da die Isolate in Minimalmedium nur sehr schwach anwachsen) und anschließend aus den Zellen die genomische DNA isoliert. Dies erfolgte entweder unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Qiagen Blood & Tissue Kit) oder standardmäßig über Chloroform-Phenol-Extraktion. Anschließend wurde mit universellen Primern die für jeden Mikroorgansimus spezifische 16S-rRNA mittels PCR amplifiziert. Das spezifische PCR-Produkt mit einer Größe von ~1500 bp wurde aus dem Agarosegel eluiert und im Folgenden sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen konnten dann zur Identifizierung der Stämme mit dem Programm BLAST mit der Datenbank in einem *in Silico*-Screnning verglichen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass für die 16S-rRNA eine sehr umfangreiche Datenbank im Internet zur Verfügung steht, konnten alle Sequenzen einer bestimmten Art mit 99% Übereinstimmung zugeordnet werden.



**Abb. 28:** Agarose-Gel isolierter 16S-rRNA aus Bodenproben DNA. M = 1kb ladder (Fermentas), 1-5 = 16S-rRNA verschiedener Bodenproben-Isolate.

Die Stamm-Identifizierung lieferte verschiedene Mikroorganismen, wobei hauptsächlich Pseudomonaden identifiziert wurden, aber auch Arthrobacter, Paenibacillen, ein Sphingobacterium und ein Acinetobacter (Tab. 26). Pseudomonas ist ein typisches Bodenbakterium und in der Literatur bekannt für Threonin-Aldolase- und SHMT-Aktivität. Ebenso sind Threonin-Aldolasen aus Arthrobacter bekannt und Sequenzen verfügbar. Die Genome von einigen Acinetobacter-Stämmen, Paenibacillen und Sphingobacterien sind
sequenziert und mittels Genom-Analyse konnten auch in diesen Stämmen putative Enzyme mit TA-Aktivität identifiziert werden. So besitzen die meisten Acinetobacter eine putative SHMT, die in der Sequenz nahezu identisch sind.

Douenproben-isolat	Identifizierung
B10a 1), B10c)	Pseudomonas sp.
B10a 2)	Pseudomonas sp.
B10b1)	Pseudomonas sp.
B10b2)	Paenibacillus sp.
B11a2)	Paenibacillus sp.
B11a3)	Arthrobacter sp.
B11a4)	Sphingobacterium sp./
	Alcaligens sp.
B11b1)	Pseudomonas sp.
B11c1)	Arthrobacter sp.
B11c2)	Acinetobacter sp.
B13a 1)	Arthrobacter sp.
B13a 2)	Pseudomonas sp.
B13b)	Pseudomonas sp.

 Tab. 26: Stamm-Identifizierung einiger relevanter Bodenproben-Isolate über ihre 16S-rRNA-Analyse.

 Bodenproben-Isolat
 Identifizierung

In der folgenden Abbildung (Abb. 29) ist exemplarisch für das Bodenproben-Isolat B13a1) eine Datenbankanalyse dargestellt, die das Isolat als *Arthrobacter* sp. Identifiziert.

ACCESSION	Description	score	score	coverage	- <u>value</u>	ident
DQ157987.1	Arthrobacter sp. 16.22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	2566	100%	0.0	100%
DQ157990.1	Arthrobacter sp. 31.31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	100%	0.0	99%
EF612307.1	Arthrobacter sp. OS-09B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2549	2549	99%	0.0	100%
GU244360.1	Arthrobacter sp. Lc30-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%
FN377736.1	Arthrobacter sp. Marine-33 partial 16S rRNA gene, isolate Marine-33	2538	2538	100%	0.0	99%
FM955888.1	Arthrobacter sulfonivorans 16S rRNA gene, strain Asd MW-A1	2538	2538	100%	0.0	99%
FM955886.1	Arthrobacter oxydans 16S rRNA gene, strain Asd M5-7	2538	2538	100%	0.0	99%
FM955861.1	Arthrobacter oxydans 16S rRNA gene, strain Asd M3-4	2538	2538	100%	0.0	99%
AM491456.2	Arthrobacter sp. Nj-37 16S rRNA gene, strain Nj-37	2538	2538	100%	0.0	99%
D84595.2	Arthrobacter sp. S22237 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	2536	2536	99%	0.0	99%
GU244356.1	Arthrobacter sp. Lc10-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2534	2534	100%	0.0	99%
GU082324.1	Arthrobacter sp. enrichment culture clone ts0221R 16S ribosomal RNA	2534	2534	99%	0.0	99%
FM955860.1	Arthrobacter sulfonivorans 16S rRNA gene, strain Asd M3-2	2532	2532	100%	0.0	99%
AM421977.1	Arthrobacter sp. NJ-29 16S rRNA gene, strain NJ-29	2532	2532	100%	0.0	99%
AB039736.1	Arthrobacter sp. CAB1 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2532	2532	100%	0.0	99%
D84591.2	Arthrobacter sp. S22232 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	2531	2531	99%	0.0	99%
<u>AM491454.1</u>	Arthrobacter sp. Nj-30 16S rRNA gene, strain Nj-30	2531	2531	99%	0.0	99%
GU733458.1	Arthrobacter sp. Lc5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	100%	0.0	99%
GQ477171.1	Arthrobacter sp. RKS6-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	100%	0.0	99%
FJ517625.1	Arthrobacter sp. EM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	100%	0.0	99%
DQ157984.1	Arthrobacter sp. 13.34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	100%	0.0	99%
AM933503.1	Arthrobacter sp. FB11 partial 16S rRNA gene, isolate FB11	2525	2525	99%	0.0	99%
FN397658.1	Arthrobacter sp. PON4 partial 16S rRNA gene, strain PON4	2523	2523	100%	0.0	99%
EF491954.1	Arthrobacter sp. OS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2523	2523	100%	0.0	99%
AJ864856.1	Arthrobacter sp. J64 partial 16S rRNA gene, isolate J64	2523	2523	100%	0.0	99%
GU733470.1	Arthrobacter sp. Lc31-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	100%	0.0	99%
GU733460.1	Arthrobacter sp. Lc10-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	100%	0.0	99%
<u>GQ477173.1</u>	Arthrobacter sp. RKS6-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	100%	0.0	99%
FJ517623.1	Arthrobacter sp. EM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	100%	0.0	99%
EU029648.1	Arthrobacter sp. MY14015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	100%	0.0	99%
NR 025084.1	Arthrobacter sulfonivorans strain ALL 16S ribosomal RNA, partial sequ	2521	2521	100%	0.0	99%
AB240230.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: BS0	2519	2519	99%	0.0	99%
AJ551154.1	Arthrobacter sp. An16 partial 16S rRNA gene, isolate An16	2519	2519	99%	0.0	99%
AY539812.1	Uncultured actinobacterium clone 45B46 small subunit ribosomal RNA	2519	2519	99%	0.0	99%
GU321363.1	Arthrobacter sp. NMC12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2518	2518	99%	0.0	99%
FJ517630.1	Arthrobacter sp. ER2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2518	2518	100%	0.0	99%
FR682670.1	Arthrobacter sp. R-36535 partial 16S rRNA gene, strain R-36535	2516	2516	100%	0.0	99%
<u>GQ477172.1</u>	Arthrobacter sp. RUGL6-5 16S ribosomal RNA gene. partial sequence	2516	2516	100%	0.0	99%

Abb. 29: Datenbankanalyse der 16S-rRNA von Bodenproben-Isolat B13b). Höchste Übereinstimmungen wurden für Arthrobacter-Spezies gefunden.

## 3.2.3 In Silico-Screening ausgehend von bekannten TA-Sequenzen

Das *in Silico*-Screening nach neuen Threonin-Aldolasen wurde ausgehend von den Sequenzen zweier Enzyme aus *E. coli* (XL1) und *S. cerevisiae*, die bereits von Beginn der Arbeit rekombinant verfügbar waren, mit dem Programm BLAST durchgeführt. Ausgehend von beiden Enzymen, die untereinander nur eine Identität von 39% (Abb. 29) haben, wurden jeweils fünf Stämme ausgewählt, die eine putative Threonin-Aldolase besitzen. Hierbei wurden Stämme mit einer Identität von ~ 70% ausgewählt, um keine zu große Ähnlichkeit zum Ausgangsenzym der Suche zu haben, da sowohl die TA aus *E. coli* als auch aus *S. cerevisiae* low specificity-TAs sind und somit keine hohen Diastereoselektivitäten aufweisen. Für das BLAST Resultat ausgehend von der TA aus *E. coli* kommt außerdem hinzu, dass die Stämme mit größter Übereinstimmung hauptsächlich pathogene Mikroorganismen waren.

Das Ergebnis für *S. cerevisiae* war deutlich günstiger, da die meisten Enzyme mit höherer Übereinstimmung unter nicht-pathogenen Stämmen gefunden wurden.

Tabelle 27 gibt eine Übersicht über die ausgewählten Stämme mit Übereinstimmung zu den bereits bekannten Aldolasen (unter Berücksichtigung der Risikogruppe). Die Stämme wurden bei der DSMZ als Lebendkultur bzw. als Lyophilisat bestellt, im jeweiligen Vollmedium angezogen und anschließend der zellfreie Enzym-Rohextrakt des Wildtyps für erste Aktivitätstests isoliert.

Anschließend wurde die genomische DNA der Stämme isoliert und die TA-Gene mit genspezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Die genomische DNA ließ sich mit Chloroform-Phenol-Extraktion von allen Organismen isolieren und das Gen für die TA konnte in allen Fällen amplifiziert werden. Über die Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme eingefügt, um die PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pET28a mit C- und N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag zu klonieren. Die Klonierung und anschließende Transformation und Überexpression in *E. coli* BL21 lieferte fünf neue rekombinante Threonin-Aldolasen aus den Organismen *Lodderomyces elongisporus*, *Ashbya gossypii*, *Pichia stipitis*, *Desulfotalea psychrophila* und *Kluyveromyces polysporus* (Tab. 27).

Stamm	gen.	PCR-Produkt	Klonierung
	DNA	(neue Primer)	
ausgewählte Stämr	ne ausgehen	d von der <i>E. coli</i> TA	A Sequenz
Photobacterium profundum	$\checkmark$	×	
Desulfotalea psychrophila	$\checkmark$	$\checkmark$	pET28a-Dp
Pseudomonas syringae	$\checkmark$	×	
(pv. tomato)			
Shewanella baltica	$\checkmark$	×	
ausgewählte Stämme	ausgehend v	on der S. cerevisiae	TA Sequenz
Lodderomyces elongisporus	$\checkmark$	$\checkmark$	pET28a-Le
Ashbya gossypii	$\checkmark$	$\checkmark$	pET28a-Ag
Candida albicans	$\checkmark$	$\checkmark$	×
Pichia stipitis	$\checkmark$	$\checkmark$	pET28a-Pst
Kluyveromyces polysporus	$\checkmark$	$\checkmark$	pET28a-Kp

**Tab. 27:** Übersicht der bisherigen Experimente mit den ausgewählten Stämmen aus dem *in Silico*-Screening. Gelungene Experimente sind mit einem Haken, nicht gelungene Experimente mit einem Kreuz gekennzeichnet.

Die so erhaltenen Enzyme wurden im Folgenden auf Aktivität untersucht. Durch einen gekoppelten Photometertest mit einer ADH aus Bäckerhefe wurden die Aktivitäten für L-Threonin als Standard-Substrat gemessen. Anschließend wurde mit D,L-*threo*-Phenylserin eine Umsetzung für 5h durchgeführt und die Reaktion mit GC auf Benzaldehyd-Bildung überprüft. Umsatz und d.r.-Wert wurden dann durch Analyse in Synthese-Richtung für die Bildung von Phenylserin am NMR bestimmt.

Die folgende Tabelle (Tab. 28) gibt einen Überblick über die Ergebnisse mit den neuen, rekombinanten Enzymen. Die Enzyme zeigen alle Aktivität in der Aldolspaltung. Die NMR-Analyse zeigt, dass alle fünf Enzyme *threo*-spezifisch sind, wenn auch nur gering, aber die Umsätze durchweg sehr hoch sind.

**Tab. 28:** Übersicht über Umsätze, Aktivitäten und d.r.-Werte der rekombinant erhaltenen Enzyme aus dem i*n Silico*-Screening.

Stamm	Aktivität	Proteingehalt	spez.	Umsatz	dr-Wert
	U/ml	mg/ml	Aktivität		(threo:erythro)
			U/mg		
D. psychrophila	80	41	2	90%	60:40
L. elongisporus	35	n.b.	-	>95%	63:37
A. gossypii	97	20	5	>95%	60:40
K. polysporus	10	n.b.	-	93%	62:38
P. stipitis	20	38	0,5	61%	60:40

# 3.3 Identifizierung neuer Aldolase-Gene

## 3.3.1 Identifizierung der Aldolase-Gene über konservierte Regionen

Ein Weg zur Isolierung des Aldolase-Gens führt direkt über die Stammidentifizierung der Bodenproben-Isolate und anschließende PCR mit genspezifischen (degenerierten) Primern, die nach literaturbekannten Sequenzen designt wurden.

Im Falle des Bodenproben-Isolates B13 z.B. ergab die Stammbaumanalyse mittels 16S-rRNA größte Homologie zu *Arthrobacter* Spezies (BLAST). Literatur bekannt ist eine L-TA Sequenz aus *Arthrobacter sp.* (FB24); nach dieser Sequenz und der Sequenz der putativen TA aus *Arthrobacter chlorophenolicus* und *Arthrobacter aurescens* wurden genspezifische Primer angefertigt und versucht, über die genomische DNA des Bodenproben-Isolates das Aldolase-Gen mittels PCR zu amplifizieren.

Außerdem wurde nach konservierten Bereichen innerhalb der Aldolase-Sequenzen gesucht, indem ein "*in Silico*-Screening" mit den Sequenzen bereits bekannter TAs durchgeführt wurde.

Die folgende Abbildung (Abb. 30) zeigt das Alignment der beiden Threonin-Aldolasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae*, die für diese Arbeit als Referenzenzyme verwendet wurden. Man kann vier konservierte Regionen erkennen, die zwischen vier bis fünf Aminosäuren lang sind. Das

Motiv ICLSK(GLG) tritt bei *low specificity*-TAs einheitlich auf und ist ein Merkmal von Enzymen mit geringer Stereospezifität, so wie die bei beiden TAs aus *E. coli* und *S. cerevisiae*, die in der Aldolreaktion keine große Selektivität zeigen.

Score = 190 bits (482), Expect = 6e-53, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 112/285 (39%), Positives = 161/285 (56%), Gaps = 5/285 (1% Query 3 DLRSDTVTRPSRAMLEAMMAAPVGDDVYGDDPTVNALQDYAAELSGKEAAIFLPTGTQA 62 DLRSDT T P+ M+EA + A +GD VYG+D L+ A ++GKEA +F +GT + Sbjct 16 DLRSDTFTTPTAEMMEAALEASIGDAVYGEDVDTVRLEQTVARMAGKEAGLFCVSGTLS 75 Query 63 LVALLSHCERGEEYIVGQA-AHNYLFEAGGAAVLGSIQPQPIDAAADGTLPLDKVAMKI 121 +A+ +H + I+ AH Y EA G A+L P+ + L L+ + Sbjct 76 QIAIRTHLMQPPYSILCDYRAHVYTHEAAGLAILSQAMVVPVVPSNGDYLTLEDIKSHY 135 Query 122 PDD--IHFARTKLLSLENTHNGKVLPREYLKEAWEFTRERNLALHVDGARIFNAVVAYG 179 PDD IH A T+L+SLENT +G V P E L + E L LH <mark>DGARI</mark>+NA  $\mathbf{G}$ sbjct 136 P#DGDIHGAPTRLI<mark>SLENT</mark>LHGIVYPLEELVRIKAWCMENGLKLHCDGARI</mark>WNAAAQSG 195 Query 180 ELKEITQYCDSFT<mark>ICLSK</mark>GLGTPVGSLLVGNRDYIKRAIRWRKMTGGGMRQSGILAAAG 239 LK+ + DS + ICLSK +G P+GS+LVGN ++K+A +RK GGG+RQSG++A sbjct 196 PLKQYGEIFDSIS<mark>ICLSK</mark>SMGAPIGSVLVGNLKFVKKATHFRKQQGGGIRQSGMMARMA 255 Query 240 YALKNN-VARLQEDHDNAAWMAEQLREAGADVMRQ-DTNMLFVRV 282 + N+ ++L H A +AE G + DTN +F+ + Sbjct 256 VNINNDWKSQLLYSHSLAHELAEYCEAKGIPLESPADTNFVFINL 300

**Abb. 30:** Sequenzvergleich der beiden Threonin-Aldolasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae*. Die konservierten Bereiche sind gelb hinterlegt. Lys199, das als Cofaktor-Bindestelle dient und diesen via Schiff'sche Base bindet ist mit einem Pfeil markiert.

Ausgehend von diesem Alignment wurden nach den konservierten Bereichen degenerierte Primer designt, um Teilstücke der TA-Sequenz ausgehend von der genomischen DNA der Bodenproben-Isolate zu amplifizieren.

Sowohl der Ansatz über Primer nach literaturbekannten Sequenzen, als auch der Ansatz über konservierte Bereiche lieferten jedoch keine PCR-Produkte, die als TA-Gen oder Teilbereich identifiziert werden konnten. Es konnten lediglich unspezifische kleinere Amplifikate erhalten werden, die nach einem Alignment mit bekannten TA-Sequenzen keine Übereinstimmung lieferten.

## 3.3.2 Identifizierung der Aldolase-Gene mithilfe eines Selektions-Stammes

Zur Identifizierung neuer Aldolase-Gene war es wichtig, ein geeignetes Hochdurchsatz-Screening-Verfahren zu finden. Von dem Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 ist bekannt, dass er Benzaldehyd im Mandelat-Abbauweg verstoffwechseln kann und somit in der Lage ist, Benzaldehyd als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Bei Vorhandensein von Benzaldehyd in Minimalmedium kann der Stamm anwachsen. Da Benzaldehyd das Produkt der Retro-Aldolreaktion ausgehend von Phenylserin als Substrat ist, können auf diesem Wege durch Wachstums-induzierte Selektion in *P. putida* neue Aldolase-Gene identifiziert werden.

Ein Wachstumstest in Minimalmedium mit verschiedenen Konzentrationen an Benzaldehyd als Kohlenstoffquelle zeigte, dass der Stamm schon bei sehr geringen Konzentrationen von 0,5 mM Benzaldehyd anwuchs. Bei Konzentrationen ab 5 mM Benzaldehyd konnte jedoch kein Wachstum mehr nachgewiesen werden, da Benzaldehyd in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf die Zellen wirkt und diese absterben (Tab. 29).

[c] Benzaldehyd (mM)	Wachstum
0,1	-
0,5	+
1	+
5	-
10	-

Tab. 29: Wachstumstest von P. putida auf Benzaldehyd in Minimalmedium.

Eine weitere wesentliche Bedingung an den Selektions-Stamm war, dass dieser nicht auf dem Substrat Phenylserin als C-Quelle in Minimalmedium wachsen darf, da so die Selektion nicht stattfinden kann. Aus diesem Grund wurde *P. putida* auch in Medium mit Phenylserin als Haupt-Kohlenstoffquelle kultiviert und dieser Test zeigte, dass auch hier nach  $\sim 2$  Tagen ein Wachstum nachgewiesen werden konnte. Dies weist darauf hin, dass *P. putida* über ein aktives Enyzm mit TA-Aktivität verfügt, das Phenylserin zu Benzaldehyd abbauen kann und dadurch das Wachstum des Stammes induziert hat.

Eine Genom-Analyse des sequenzierten *P. putida* KT2440 bestätigte anschließend diese Vermutung und zeigte, dass der Stamm über eine putative Threonin-Aldolase verfügt.

Ein Vergleich der Sequenz mit der Datenbank (BLAST) zeigt für diese putative Threonin-Aldolase hohe Übereinstimmung zu weiteren bekannten Threonin-Aldolasen (Abb. 31).

Accession	Description	<u>riax</u> score	score	coverage	- value	ident
NP 742488.1	threonine aldolase [Pseudomonas putida KT2440] >gb AAN65952.1 AEI	714	714	99%	0.0	100%
ADR58051.1	Low specificity L-threonine aldolase [Pseudomonas putida BIRD-1]	712	712	99%	0.0	99%
<u>YP 001265700.1</u>	threonine aldolase [Pseudomonas putida F1] >gb ABQ76516.1  L-threo	7.06	706	99%	0.0	98%
<u>YP_001666593.1</u>	threonine aldolase [Pseudomonas putida GB-1] >gb ABY96257.1  Three	702	702	99%	0.0	98%
<u>YP 001751731.1</u>	threonine aldolase [Pseudomonas putida W619] >gb ACA75362.1  Thre	689	689	99%	0.0	96%
<u>YP 610574.1</u>	low-specificity L-threonine aldolase [Pseudomonas entomophila L48] $> \epsilon$	682	682	99%	0.0	94%
050584.1	RecName: Full=Low specificity L-threonine aldolase; Short=Low specific	655	655	99%	0.0	90%
<u>YP 262789.1</u>	L-threonine aldolase, low-specificity [Pseudomonas fluorescens Pf-5] >;	635	635	99%	4e-180	87%
ZP 07777972.1	threonine aldolase [Pseudomonas fluorescens WH6] >gb EFQ60895.1  1	634	634	99%	5e-180	86%
<u>YP 002875148.1</u>	low-specificity L-threonine aldolase [Pseudomonas fluorescens SBW25]	631	631	99%	5e-179	86%
ZP 01368433.1	hypothetical protein PaerPA_01005593 [Pseudomonas aeruginosa PACS	624	624	99%	9e-177	85%
NP 254100.1	low specificity I-threonine aldolase [Pseudomonas aeruginosa PAO1] >r	623	623	99%	1e-176	85%
ZP 06479853.1	threonine aldolase [Pseudomonas syringae pv. aesculi str. 2250] >ref[2	622	622	99%	2e-176	85%
YP 002443386.1	low specificity I-threonine aldolase [Pseudomonas aeruginosa LESB58]	622	622	99%	3e-176	85%
YP 350938.1	L-threonine aldolase [Pseudomonas fluorescens Pf0-1] >gb ABA76947.	620	620	99%	1e-175	85%
ZP 06457624.1	threonine aldolase [Pseudomonas syringae pv. aesculi str. NCPPB3681]	620	620	99%	1e-175	85%
<u>YP_001351512.1</u>	low specificity I-threonine aldolase [Pseudomonas aeruginosa PA7] >gb	620	620	99%	1e-175	85%
YP 237831.1	threonine aldolase [Pseudomonas syringae pv. syringae B728a] >gb[A	619	619	99%	2e-175	85%
ZP 07263088.1	threonine aldolase [Pseudomonas syringae pv. syringae 642]	619	619	99%	3e-175	85%
EFW82409.1	threonine aldolase [Pseudomonas syringae pv. glycinea str. B076] >gb	617	617	99%	1e-174	85%
ZP 04590797.1	threonine aldolase [Pseudomonas syringae pv. oryzae str. 1_6]	615	615	99%	3e-174	85%
YP 001189613.1	L-threonine aldolase [Pseudomonas mendocina ymp] >gb ABP86881.1	614	614	99%	7e-174	83%
NP 790259.1	threonine aldolase, low-specificity [Pseudomonas syringae pv. tomato s	613	613	99%	1e-173	85%
ZP 04936287.1	low specificity I-threonine aldolase [Pseudomonas aeruginosa 2192] >g	599	599	93%	2e-169	87%
YP 001172315.1	low specificity I-threonine aldolase [Pseudomonas stutzeri A1501] >gb].	585	585	99%	3e-165	78%
<u>YP 001524934.1</u>	low-specificity L-threonine aldolase [Azorhizobium caulinodans ORS 571	521	521	97%	5e-146	74%

Abb. 31: Alignment für die putative Threonin-Aldolase PpTA aus *P. putida* KT2440 mit der Datenbank (BLAST)

Dieses putative Enzym mit einer Größe von 1041 bp, im Folgenden mit "PpTA" benannt, wurde ausgehend von der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert (Abb. 32a), kloniert, in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert und anschließend auf Aktivität mit Phenylserin und Threonin als Substrat analysiert. Außerdem wurde das Enzym mittels SDS-PAGE analysiert und besitzt ein Molekulargewicht von 40 kDa (Abb. 32b).



Abb. 32: a) Agarose Gel und b) SDS-Gel der amplifizier (Fermentas).

x aus P. putida KT2440 (PpTA), M = 1 kb ladder



Abb. 33: GC-Chromatogramm für die Umsetzung mit der PpTA aus *P. putida* KT2440 in der Aldolspaltung, eindeutiger Nachweis von entstandenem Benzyladehyd.

Mittels Gaschromatographie konnte die PpTA als aktives Enzym in der Aldolspaltung von Phenylserin zu Benzaldehyd identifiziert werden (Abb. 33). Der gekoppelte Enzymtest mit Threonin als Substrat lieferte eine Aktivität von 35 U/ml. Anschließend wurde in der Synthese-Reaktion von Phenylserin mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie kontrolliert, ob das Enzym diastereoselektiv ist. Der mittels NMR ermittelte d.r.-Wert lag bei 62% Umsatz, jedoch nur bei einem Verhältnis von 57:43 (*threo:erythro*) und liegt somit in der Größenordnung des d.r.-Werts für die *E.coli*-TA.

Das Selektionssystem in Form des Bakteriums *P. putida* KT2440 sollte außerdem für die bereits rekombinant vorliegende Threonin-Aldolase aus *E.coli* (LTAE) überprüft werden. Dazu wurde von dem Stamm *E. coli* XL1, der über die L-Threonin-Aldolase LTAE verfügt, von der die Sequenz bekannt ist, eine Gen-Bank angelegt und diese in *P. putida* eingebracht. Da der Stamm zu dieser Zeit noch nicht als Selektions-Stamm eingesetzt werden konnte, da die Deletion des *ppTA*-Gens noch in Arbeit war, konnte dieser noch nicht als Hochdurchsatz-Methode zur Identifizierung der TA-Gene aus den Bodenproben-Isolaten verwendet werden. Jedoch konnte zur Überprüfung des gesamten Systems und der Methodik die Gen-Bank aus *E. coli* eingebracht und durch Bekanntheit der LTAE-Sequenz mittels PCR über genspezifische Primer überprüft werden, ob das Gen nach dem Partialverdau als Ganzes intakt geblieben war und in den Stamm eingebracht werden konnte.



**Abb. 34:** Agarose-Gel der PCR aus *P. putida* Plasmid-DNA nach Transformation der DNA-Bank aus *E. coli* XL1 im Vektor pBBR1MCS2. Die Überprüfung des Selektions-Systems am Beispiel der LTAE war erfolgreich, das TA-Gen konnte mit gen-spezifischen Primern amplifiziert werden und ist nach dem Partialverdau intakt geblieben.

Diese Überprüfung war erfolgreich (Abb. 34), es konnte ein für die Größe der LTAE (1002 bp) spezifisches PCR-Produkt ausgehend von der *P. putida* Plasmid-DNA über eine PCR mit gen-spezifischen Primern amplifiziert werden. Dieses PCR Produkt von  $\sim 1$  kb wurde aus dem Gel isoliert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung lieferte eine 100% ige Sequenz-Übereinstimmung zur LTAE.

Das Ergebnis dieser Überprüfung zeigt, dass prinzipiell alle Einzel-Schritte im Selektions-Stamm *P. putida* KT2440 funktionieren und nach einem partiellen Verdau der genomischen DNA in 6-10 kb Fragmente mit *Bsp143*I das LTAE-Gen intakt geblieben ist.

## 3.4 Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes P. putida

Da *P. putida* KT2440 aufgrund eines vorhandenen Threonin-Aldolase-Gens nicht als Selektions-Stamm verwendet werden kann, sollte eine Deletionsmutante konstruiert werden. Die Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes in *P. putida* KT2440 sollte nach folgendem Schema (Abb. 35) mittels "Overlap-Extension"-PCR erfolgen. Zunächst sollten die 500 bp großen flankierenden Regionen vor und nach dem *ppTA*-Gen in einer PCR amplifiziert werden. Ebenso sollte eine Gentamycin-Kassette  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> (2300 bp) aus dem Vektor pBSL142 amplifiziert werden. Alle drei Fragmente müssen dann zusammen in einer PCR ("Overlap-Extension") über homologe Bereiche zu einem Fragment vereinigt und das 3,3 kb Fragment über eingefügte Schnittstellen in den Suizidvektor pSUP202 kloniert werden. Der Vektor pSUP202 kann in Pseudomonas nicht replizieren und so werden elektrokompetente *P. putida* KT2440-Zellen mit dem Konstrukt up500- $\Omega$ Gm<sup>r</sup>dw500pSUP202 transformiert, um in Folge zweier homologer Rekombinationsereignisse den Vektoranteil zu verlieren und die Antibiotika-Kassette ins Genom zu integrieren.



Abb. 35: Schema für die Konstruktion des TA-defizienten Stammes *P. putida* KT2440 $\Delta$ PpTA.

Alle drei Fragmente up500, dw-500 und  $\Omega \text{Gm}^{r}$  konnten mittels PCR in guter Konzentration amplifiziert werden (Abb. 36). Jedoch war es nicht möglich die "Overlap-Extension-PCR" mit allen drei Fragmenten in einem einzelnen Schritt durchzuführen, weshalb das Konstrukt up500- $\Omega \text{Gm}^{r}$ -dw500 in zwei getrennten PCRs amplifiziert werden musste.



**Abb. 36:** PCR zur Amplifizierung des upstream-, downstream-Fragments und der Gentamycin-Kassette. M = 1 kb ladder (Fermentas).

Die PCR-Produkte wurden entweder aus dem Gel eluiert oder mittels PCR-Purification-Kit für die folgende PCR aufgereinigt. Die Konzentration der Fragmente wurde photometrisch bestimmt, um diese in der folgenden PCR in äquimolarem Verhältnis einzusetzen. Anschließend sollte das Gesamt-Fragment entweder durch Homologie zwischen up500-Fragment und dw500-  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> oder dw500-Fragment und up500-  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> in einer weiteren "overlap extension"-PCR amplifiziert werden. Bei jeglichen Ansätzen mit verschiedenen Polymerasen, verschiedenen Schmelztemperaturen und unterschiedlichen PCR-Vorschriften konnte kein PCR-Produkt eines Gesamtfragmentes von up500-, dw500 und Gentamycin-Kassette  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> (up500-  $\Omega$ Gm<sup>r</sup>- dw500) in der Größe von 3,3 kb erhalten werden konnte. Es wurden immer nur die beiden Teilfragmente up500-  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> und dw500-  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> amplifiziert. Somit konnte auf diesem Wege keine Konstruktion der Deletionsmutante erfolgen.

## 2. Alternative zur Erstellung eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes P. putida

Als Alternative wurde versucht über ein Klonierungs-Schema die Fragmente up500, dw500 und die Antibiotika-Kassette  $\Omega$ Gm<sup>r</sup> zunächst in den linearisierten Vektor pBCSK (+) zu klonieren, um dann das Gesamt-Konstrukt zur Deletion des *ppTA*-Gens in den Suizidvektor pSUP202 einzubringen. Hier sollte das folgende Klonierungs-Schema (Abb. 37) verwendet werden.



Abb. 37: Klonierungs-Schema zur Konstruktion des Threonin-Aldolase defizienten Stammes in P. putida

Doch schon die ersten Klonierungen der beiden Teil-Fragmente up500 und dw500 in den Vektor pBCSK(+) und anschließende Isolierung der Klone über Blau-Weiß-Selektion lieferte nach Sequenzierung nicht das Produkt, sondern nur Übereinstimmungen von bis zu 80 bp zur Sequenz des up- bzw. dw-500 Fragments.

## 3. Alternative zur Erstellung eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes P. putida

Alternativ sollte die Gentamycin-Kassette zur Deletion des Threonin-Aldolase-Gens in P. *putida* direkt über eine im *ppTA*-Gen befindliche Schnittstelle eingefügt werden. Dazu sollte die Kassette aus dem Vektor pWKR202I durch über Primer eingefügte Schnittstellen amplifiziert werden und das *ppTA*-Gen im Klonierungsvektor pET28a dementsprechend geschnitten werden. Hier wurde als mögliche geninterne Schnittstelle die des Restriktionsenzyms *EagI* (= *Eco52I*) gewählt. Anschließend sollte nach erfolgreicher Klonierung der Kassette innerhalb des *ppTA*-Gens, das gesamte Konstrukt in einer PCR mittels über die Primer eingefügte *NdeI*-Schnittstellen amplifiziert werden, um es im Folgenden in den Suizidvektor pSUP202 zu klonieren und dann das deletierte Gen in *P. putida* über homologe Rekombination einzubringen.

Das *ppTA*-Gen ließ sich auch nach mehreren Versuchen intern über die *Eag*I-Schnittstelle nicht schneiden und wurde deshalb sequenziert, um zu überprüfen, ob die *Eag*I-Schnittstelle noch intakt ist, oder Sequenz durch Mutation (z.B. über UV-Licht bei der Gel-Elution) verändert wurde. Hier zeigte die Sequenzierung, dass das *ppTA*-Gen mit der angegeben Sequenz (NCBI, komplettes Genom *P. putida* KT2440) nicht übereinstimmt und auch keine *Eag*I-Schnittstelle aufweist. Hier müsste die Sequenz überprüft werden und nach einer alternativen Gen-internen Schnittstelle gesucht werden, die zur Insertion der Antibiotika-Kassette geeignet wären. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

# 3.5 Erstellung einer DNA-Bank in E. coli

Zur Erstellung einer Genom-Bank wurden die Bodenproben-Isolate aus der Anreicherung mit den besten Ergebnissen (d.r.-Werten) ausgewählt und aus diesen die genomische DNA isoliert. Hierfür konnten zwei verschiedene Methoden angewandt werden, die Verwendung des Blood & Tissue Kits (Qiagen), welches eine schnelle Isolierung großer Mengen an DNA erlaubte und die Phenol-Chloroform-Extraktion, die zwar meist keine hohen Ausbeuten, aber dafür sehr reine, hochkonzentrierte DNA erzielte. Die genomische DNA wurde mittels Restriktionsanalyse mit dem "4-base cutter" *Bsp143*I (*Sau*3a) partiell verdaut und über ein 0,6 % iges Agarosegel analysiert. Anschließend sollten Fragmente in einer Größe von 6-10 kb aus dem Gel eluiert werden, um zu gewährleisten, dass das TA-Gen mit einer durchschnittlichen Größe von 1000 – 1200 bp intakt bleibt.

Hierzu war zunächst eine Testreihe nötig, um die optimalen Reaktionsbedingungen für den Partialverdau zu bestimmen. So wurden verschiedene Verdünnungen des Restriktionsenzyms mit verschiedenen DNA-Konzentrationen zu verschiedenen Zeiten untersucht und die Verdaue sofort durch Pipettieren in SDS-Stopp-Puffer abgestoppt. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch für drei Bodenproben-Isolate die Reaktionskinetik für den Verdau mit *Bsp143*I (Abb. 38).



**Abb. 38:** Test der optimalen Reaktionsbedingungen für den Partialverdau. 10  $\mu$ g DNA wurden mit 1 U Enzym über 5 min verdaut. M =1 kb Ladder (Fermentas), Probe 1-4 = DNA von Isolat B13b) zum Zeitpunkt t = 0, 30 sec, 1 min, 5 min, Probe 5-8 = DNA von Isolat B10b) zum Zeitpunkt t = 0, 30 sec, 1 min, 5 min, Probe 9-12 = DNA von Isolat B11c2) zum Zeitpunkt t = 0, 30 sec, 1 min, 5 min.

Der optimale Partialverdau zu Fragmenten der gewünschten Größe konnte mit 10  $\mu$ g reiner DNA aus einer Chloroform-Phenol-Extraktion mit 1 U *Bsp143*I nach 30 sec – 1 min für die Bodenproben-Isolate erhalten werden, wobei die Intensität des Verdaus für die drei Isolate recht unterschiedlich war. Die aus dem Gel eluierten Fragmente wurden anschließend in den Vektor pBBR1MCS2, der zuvor mit *BamH*I restringiert wurde, kloniert und zunächst in *P. putida* KT2440 transformiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde in einer Flüssigkultur von Minimalmedium mit Phenylserin als Kohlenstoffquelle kultiviert und die Plasmid-DNA aus der gesamten Kultur isoliert. Die Plasmid-DNA wurde dann, da *P. putida* als Wildtyp nicht als Selektionssystem geeignet ist, in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf Minimalagar mit Phenylserin als C-Quelle kultiviert. Es wurden je Isolat 20 Klone gepickt, in *E. coli* BL21 transformiert und der zellfreie Rohextrakt isoliert, um diesen auf TA-Aktivität zu untersuchen. Zunächst wurde der Rohextrakt mit Phenylserin inkubiert und die Aldolspaltung zu Benzaldehyd mittels GC kontrolliert. Hier war die Hälfte aller Klone in der Aldolspaltung aktiv. Anschließend wurde die Aktivität der Klone mit L-Threonin als Substrat durch den gekoppelten Photometertest (Abs. 2.21.1) bestimmt.

Die aktiven Klone wurden in *E. coli* BL21 überexprimiert und in der Aldolreaktion zu Phenylserin mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie das Diastereomerenverhältnis bestimmt. Die folgende Tabelle (Tab. 30) gibt einen Überblick über die gemessenen Klone der Isolate B10b) und B11c2), den bestimmten Umsatz der Reaktion und den d.r.-Wert.

Bodenproben-Isolat	Umsatz [%]	d.rWert
		(threo:erythro)
B11c 2) Klon 1	10	94:6
B11c 2) Klon 2	16	> 95:5
B11c 2) Klon 3	16	95:5
B11c 2) Klon 4	36	~ 60:40
B11c 2) Klon 5	11	50:50
B10b) Klon 1	8	65:35
B10b) Klon 2	> 5	95:5
B10b) Klon 3	11	90:10
B10b) Klon 4	9	95:5
B10b) Klon 5	> 5	> 95:5

Tab. 30: Mit NMR analysierte Klone der Bodenproben-Isolate aus der Gen-Bank.

Die d.r.-Werte sind für vier Klone des Isolats B11c2) und für fünf Klone des Isolats B10b) sehr hoch mit Werten >95:5 für die *threo*-Komponente und decken sich mit den Ergebnissen der Wildtyp-Rohextrakte.

Im Anschließenden sollten die Proben sequenziert werden, um das Aldolase-Gen zu identifizieren und isolieren und so die rekombinanten Enzyme erhalten werden. Für die Sequenzierungen wurden die Plasmide erneut in *E. coli* transformiert, um ausreichend Plasmid-DNA zu präparieren. Anschließend wurden mit diesen neuen Plasmiden Restriktionsanalysen zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße aus der DNA-Bank durchgeführt. Durch diese Restriktionsanalysen mit diversen Restriktionsenzymen, die innerhalb des Vektors schneiden, konnte jedoch nur Leervektor pBBR1MCS2 nachgewiesen werden, was den Ergebnissen aus der Analyse wiedersprach. Somit wurde der Rest der Original-Plasmid-DNA der beiden besten Klone aus erster Präparation, der für die Analyse in der Aldolreaktion mittels NMR zu den hohen d.r.-Werten, und damit eindeutig zum Nachweis eines intakten TA-Gens geführt hatte, mittels Restriktionsanalyse überprüft. Hier konnte zusätzlich zum Vektoranteil auch Insert-DNA nachgewiesen werden (s. Abb. 39).



**Abb. 39:** Restriktionsanalyse je eines Klons der Genom-Bank aus Bodenproben-Isolat B10b) und B11c2) im Vektor pBBR1MCS2. M = 1kb ladder (Fermentas), 1 = Klon 4 von Isolat B10b), 2 = Klon 2 von Isolat B11c2).

Der Vektor pBBR1MCS2 hat eine Größe von 5144 bp. Unter dem Vektoranteil sind aber noch eine Bande von ~ 4000 bp, eine Bande von ~ 3000 bp und Banden zwischen 1000 und 1500 bp zu erkennen. Zählt man alle zusätzlichen Banden zusammen, ergibt sich eine ungefähre Insert-Größe von ~ 10kb. Durch interne Schnittstellen im Insert, könnte dieses in die erkennbaren Fragmente zerlegt worden sein. Auffällig ist hier jedoch, dass bei beiden Isolaten ein relativ identisches Restriktionsmuster auftaucht, das voraussetzen würde, dass dieselben Schnittstellen in den beiden Inserts auftauchen müssten.

Für eine aufklärende Sequenzierung der Proben war jedoch aus der Original-DNA-Präparation nicht mehr genügend DNA vorhanden und die nachfolgenden Transformationen ließen die Ergebnisse bisher nicht reproduzieren, so dass bislang die Gene der Bodenproben-Isolate mit TA-Aktivität als solche nicht identifiziert und isoliert werden konnten.

Eine Alternative bietet hier sicherlich eine geeignete Hochdurchsatz-Methode, die durch die Möglichkeit eines Selektionssytems mit Erstellung der Deletionsmutante in *P. putida* KT2440 und den somit etablierten Stamm *P. putida* KT2440∆PpTA gegeben wäre.

Die aus den Bodenproben-Isolaten angelegte Genom-Bank in *E. coli* lieferte hohe Diastereoselektivitäten für die Synthese von Phenylserin in der enzymatischen Aldolreaktion und weist somit auf eine erfolgreiche Isolierung der intakten TA-Gene hin. Jedoch waren nach erneuter Transformation der positiven Klone keine Inserts aus der Genom-Bank im Vektor identifizierbar, so dass bislang auf diesem Wege die Gene der hoch diastereoselektiven Aldolasen aus Bodenproben-Isolaten nicht identifiziert und isoliert werden konnten.

## 3.6 Die LTAE aus E. coli XL1

#### 3.6.1 Mutagenese der E. coli LTAE

Durch die Arbeiten von Kielkopf *et al.* ist bekannt, dass die Aminosäure an Position 87 eine wesentliche Rolle in der Diastereoselektivität des Enzyms zu haben scheint <sup>[54]</sup>. Die *E. coli* LTA, die zu den *low specificity*-TAs gehört und somit kein hoch diastereoselektives Enzym ist, hat in dieser Position die Aminosäure Phenylserin. Kielkopf *et al.* postulieren, dass große, sperrige Aminosäuren mit aromatischen Resten an Position 87 einen nachteiligen Effekt auf die Diastereoselektivität haben. So hat die LTA aus *Thermotoga maritima*, die ein Tyrosin an der Stelle besitzt, einen wesentlich schlechteren d.r.-Wert als die TA aus *Pseudomonas aeruginosa*, die an Position 87 eine Asparaginsäure aufweist, also keine Aminoäure mit aromatischem Rest. Aus diesem Grunde sollte die Position 87 in der *E. coli* TA gegen Aminosäuren verschiedener Gruppen ausgetauscht werden. Geplant war ein Austausch gegen Leucin, Serin, Histidin, Asparagin, Asparaginsäure und Tryptophan.

Durch Austausch des an Position 87 befindlichen Phenylserins gegen kleine, kurzkettige hydrophobe Aminosäuren ohne aromatischen Rest sollte der d.r.-Wert sich laut Kielkopf *et al.* verbessern, durch Austausch gegen eine noch sperrigere Aminosäure wie Tryptophan sollte der d.r.-Wert schlechter werden und nahezu dem eines racemischen Gemischs entsprechen.

Es wurde für jeden Austausch eine "*Quick-Change"* PCR unter Verwendung der in Tabelle 12 (s. Material & Methoden) aufgeführten Primer ausgehend von dem Plasmid pET28a-ltaE mit der *E. coli* Wildtyp LTA durchgeführt (s. Abb. 40).



**Abb. 40:** Quick-Change PCR des Plasmids pET28a-ltaE mit Aminosäureaustausch in Position 87. M = 1 kb ladder (Fermentas), Probe 1 = Kontrolle mit Plasmid im Gesamtvolumen der PCR-Ansätze (auf 50  $\mu$ l Aq. dest.), Probe 2 = Phe87  $\rightarrow$  Trp, Probe 3 = Phe87  $\rightarrow$  Asp, Probe 4 = Phe87  $\rightarrow$  Asn, Probe 5 = Phe87  $\rightarrow$  His, Probe 6 = Phe87  $\rightarrow$  Ser.

Anschließend wurde mit dem PCR-Produkt ein *Dpn*I-Verdau durchgeführt, um amplifiziertes PCR-Produkt mit eingeführter Mutation von dem unmodifizierten, eingesetzten Ursprungs-Plasmid zu trennen. *Dpn*I schneidet nur methylierte oder hemimethylierte DNA-Stränge und keine unmethylierte DNA. Plasmide, die aus *E. coli* DH5α präpariert wurden sind im Gegensatz zur neusynthetisierten, mutierten DNA praktisch immer methyliert. *DpnI* ist deshalb bei der Mutagenese für die rückstandslose Beseitigung der Template-DNA aus der PCR-Probe zuständig. Nach dem *DpnI*-Verdau wurden die PCR Produkte in *E. coli* DH5α transformiert und von den Transformationsplatten jeweils einige Klone isoliert, die im nächsten Schritt sequenziert wurden. Die sequenzierten Klone, bei denen der Austausch erfolgreich war, wurden anschließend in *E. coli* BL21 transformiert, überexprimiert und das Enzym über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Die Aktivitäten wurden über den gekoppelten Photometertest (Abs. 2.21.1) mit Threonin als Substrat und der Proteingehalt über die Absorption aromatischer Aminosäuren unter UV-Licht bei 280 nm bestimmt (Tab. 31).

Mutanten	vol. Aktivität U/ml	Proteingehalt mg/ml	spez. Aktivität U/mg
ltaE-Wt	22,4	14,7	1,5
ltaE-His87	25,2	24,7	1,02
ltaE-Asn87	17,5	22,8	0,77
ltaE-Asp87	4,2	37,7	0,11
ltaE-Trp87/Asp96	0,35	17,2	0,02
ltaE-Ser	5,5	8,1	0,68

Tab. 31: Aktivitäten und Proteingehalt der LTAE-Mutanten durch Aminosäureaustausch an Position 87.

Im Folgenden wurden die aufgereinigten Mutanten durch <sup>1</sup>H- NMR-Spektroskopie analysiert und der d.r.-Wert sowie der Umsatz bestimmt. Die folgende Tabelle (Tab. 32) gibt einen Überblick über die d.r.-Werte nach der Mutation an Position 87 des Enzyms. Im Vergleich dazu hat das *E. coli* Wildtyp-Enzym als *low specificity*-LTA einen d.r.-Wert von 54:46 (*threo:erythro*), wobei hier der ermittelte Wert für den Umsatz aus der Reihe fällt.

Mutante	Diastereomerenverhältnis d.r. ( <i>threo:erythro</i> )	<i>de</i> -Wert [%]	Umsatz [%]
ltaE-Wt	54:46	8	> 95
ltaE-His87	55:45	10	43
ltaE-Asn87	63:37	26	41
ltaE-Asp87	59:41	18	40
ltaE-Trp87/Asp96	67:33	34	47
ltaE-Ser87	58:42	16	68

Tab. 32: Analyse der LTA-Mutanten mittels NMR. Umsatzbestimmung und d.r.-Wert-Bestimmung.

Die d.r.-Werte haben sich durch die Aminosäureaustausche nicht wie erwartet stark verändert. Die Histidin-Mutante ist nahezu identisch zum Wildtyp (*de* 8%), die Serin- (*de* 16%) und Asparaginsäure-Mutante (*de* 18%) haben nur eine leichte Verbesserung und die Asparagin-Mutante eine etwas eindeutigere Verbesserung (*de* 26%). Der beste d.r.-Wert wird jedoch durch die Tryptophan-Mutante erreicht, die zusätzlich zum Austausch in Position 87 auch noch einen weiteren, nicht gezielten Austausch in Position 96 hat, wodurch ein Überschuss der *threo*-Komponente von immerhin 34% (*de*) erhalten wird.

Dieser hohe Wert für die Tryptophan-Mutante widerspricht der Annahme, dass sperrige, aromatische Aminosäuren den d.r.-Wert herabsetzen und lässt vermuten, dass der erhöhte d.r.-Wert auf die zusätzliche Mutation in Position 96 zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde mussten die beiden Mutationen aufgetrennt und somit zwei voneinander unabhängige Mutanten erzeugt werden, die dann erneut bezüglich der d.r.-Werte analysiert werden sollten. Die Erstellung zweier unabhängiger Mutanten durch die Aminosäureaustausche Phe87 $\rightarrow$ Trp und Gly96 $\rightarrow$ Asp erfolgte ebenso wie die anderen Mutationen über Quick-Change-PCR. Der Austausch konnte in beiden Fällen mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 41) und die Proben wurden anschließend über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt.



Abb. 41: Aminosäureaustausch durch Quick-Change-PCR in Position 96 der LTAE, Gly → Asp

Von den beiden Einzel-Mutanten durch Austausch von Phe87→Trp und Gly96→Asp wurde anschließend die Aktivität mit Threonin als Substrat photometrisch bestimmt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Aktivität und den Proteingehalt der beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Während für die Trp87-Mutante eine sehr hohe Aktivität messbar war, konnte für die Asp96-Mutante keine Aktivität festgestellt werden.

whatyp LIAE.			
Mutante	Aktivität (U/ml)	Proteingehalt (mg/ml)	spezifische Aktivität (U/mg)
ltaE-Wt	43,3	34,9	1,24
ltaE-Asp96	-	-	-
ltaE-Trp87	119,0	14,7	8,07

**Tab. 33:** Aktivitäten der beiden Einzel-Mutanten durch Austausch in Position 87 und 96 im Vergleich zur Wildtyp LTAE.

## 3.6.2 Biochemische Charakterisierung der Trp87-Mutante

Die durch den Austausch von Phenylalanin gegen Tryptophan in Position 87 des Enzyms erhaltene Mutante LTAE-Trp87 sollte im Folgenden im Vergleich zum Wildtyp-Enzym näher charakterisiert werden. Hierzu wurden das Temperaturoptimum und pH-Optimum des gereinigten Enzyms, sowie die Stabilität und die kinetischen Konstanten nach Michaelis-Menten bestimmt.

Sowohl die Temperatur, als auch der pH-Wert, sind wichtige Faktoren, die die Stabilität und Aktivität eines Enzyms beeinflussen. Um das optimale Potential eines Enzyms zu nutzen, ist die Analyse der Stabilität und Aktivität durch äußere Einflüsse nötig, denn jedes Enzym hat bestimmte Bedingungen unter denen es am besten funktioniert. Für die durchgeführten Charakterisierungen wurden überexprimierte, aufgreinigte Enzympräparate verwendet.

## 3.6.2.1 Bestimmung des Temperatur-Optimums der Trp87-Mutante

Jedes Enzym besitzt ein Temperaturoptimum, bei dem seine Aktivität und damit die Reaktionsrate am höchsten ist. Um dieses Temperaturoptimum für die Trp87-Mutante und das Wildtyp-Enzym in der Retro-Aldolreaktion für die Spaltung von L-Threonin zu bestimmen, wurde der Ansatz für den gekoppelten Photometertest (Abschnitt 2.21.1) mit dem Enzym-Rohextrakt, jedoch ohne Cofaktor NADH und Bäckerhefe-ADH, 5 Minuten bei den jeweiligen Temperaturen vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung bei den entsprechenden Temperaturen durch Zugabe des Cofaktors NADH und der Bäckerhefe-ADH bei 340 nm.



**Abb. 42:** Bestimmung des Temperaturoptimums für die LTAE-Trp87 Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Bis zu einer Temperatur von 30°C wurde die LTAE 1:10 verdünnt eingesetzt, und ab einer Temperatur von 40°C in einer Verdünnung von 1:100. Die Mutante wurde bis 30°C 1:10 verdünnt, ab 30°C – 50°C 1:100 verdünnt und bei 60°C 1:200 verdünnt eingesetzt.

Für das Wildtyp-Enzym nimmt die Aktivität mit steigender Temperatur von 15°C auf 60°C kontinuierlich zu (Abb. 42). Das Temperaturoptimum ist erst bei 60-70°C erreicht, was durchaus mit den Literaturdaten nach Liu *et al.* übereinstimmt <sup>[106]</sup>. Auch für die Tryptophan-Mutante ist das Temperaturoptimum erst bei 60°C erreicht, bei 70°C ist aber bereits eine Abnahme der Aktivität zu beobachten. Die Aktivität ist jedoch mit 386 U/ml dreimal so hoch wie beim Wildtyp-Enzym mit 126 U/ml. Die erhöhte Temperatur von 60°C im Vergleich zur Standard-Messtemperatur von 30°C bewirkt eine Verdopplung der Aktivität der LTAE.

Nach zwei wöchigem wiederholten Einfrieren und Auftauen der Enzym-Rohextrakte war nur noch 50% der Ursprungsaktivität von ~120 U/ml (gekoppelter Photometer-Assay bei 30°C) bei der Mutante messbar.

## 3.6.2.2 Bestimmung des pH-Optimums der Trp87-Mutante

Das pH-Optimum der Tryptophan-Mutante wurde durch Inkubation des Ansatzes für den gekoppelten Photometertest in verschiedenen Puffern mit pH-Werten zwischen pH 4 und pH 11 bestimmt. Im sauren Millieu, bei pH 4-6 war keine Aktivität messbar, das pH-Optimum liegt im basischen Bereich bei einem pH-Wert von 9,3.



Abb. 43: Bestimmung des pH-Optimums der Trp87-Mutante.

## 3.6.2.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten der Trp87-Mutante

Für die Spaltung von L-Threonin in der Retro-Aldolreaktion wurden die kinetischen Konstanten in Form der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird durch eine komplette Sättigung des Enzyms mit Substrat erreicht. Das gesamte Enzym liegt dabei als Enzym-Substrat-Komplex im Gleichgewicht vor und die Reaktionsgeschwindigkeit kann durch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr gesteigert werden. Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) ist ein Maß für die Affinität zum Substrat und gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}/2$ ) erreicht ist. Eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat wird durch einen niedrigen

Km -Wert wiedergegeben, während ein hoher Km -Wert auf eine niedrige Affinität zum Substrat hindeutet. Für die Bestimmung von V<sub>max</sub> und K<sub>m</sub> wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v) der Spaltung von L-Threonin mit Hilfe des gekoppelten Photometertests bestimmt (Abs. 2.21.1). Die erhaltene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v) wurde über der Substratkonzentration [S] nach Michaelis-Menten graphisch aufgetragen (Origin) und v<sub>max</sub> und K<sub>m</sub> bestimmt (Abb. 44).

Der Wert für die Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) beträgt 5,48 U/mg, der K<sub>m</sub>-Wert für die Trp87-Mutante liegt bei 1,48 mM. Beim Wildtyp-Enzym liegen die literaturbekannten Werte nach Liu *et al.* bei 1,70 +/- 0,03 U/mg für V<sub>max</sub> und 2,85 +/- 0,12 mM für K<sub>m</sub>.



Abb. 44: Bestimmung der kinetischen Konstanten Vmax und Km für die Tryptophan-Mutante

## 3.6.3 Aufreinigung der E. coli TA (LTAE)

Die Aufreinigung der *E. coli* TA erfolgte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie durch Nutzung eines Vektors, der für einen N-terminalem Polyhistidinrest (His<sub>6</sub>-tag) codiert. Hierzu musste die *E. coli* TA, die zunächst rekombinant im Vektor pET21a vorlag, in den geeigneten Vektor pET28a, kloniert werden. Anschließend wurde das Enzym in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert, die Zellen geerntet, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Rohextrakt direkt über Ni-NTA aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte im 15 ml Maßstab an der Chromatographieanlage ÄKTA Explorer durch Elution mit einem Imidazol-Gradienten.



**Abb. 45:** Aufreinigung der LTA aus *E. coli* über Ni-NTA Affinitätschromatographie. M = prestained PAGE ruler (Fermentas), Probe 1 - 15 = aktive Peak-Fraktionen nach Aufreinigung.

Die Aufreinigung war erfolgreich, wie man anhand des SDS-Gels der einzelnen Fraktionen des Peak-Maximums erkennen kann (Abb. 45). Es ist nur eine Bande bei der für die LTAE spezifischen molekularen Größe eines Monomers von 35 kDa zu erkennen. Die über das SDS-Gel analysierten reinen Elutionsfraktionen ohne erkennbare Fremdbanden wurden gepoolt und mussten, da sie sich im Elutionspuffer mit hohem Salzanteil befanden, zunächst über mehrere Zentrifugations-Schritte in Centricons mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa umgepuffert und anschließend aufkonzentriert werden.

Anschließend wurde die TA-Aktivität des aufkonzentrierten Proteins photometrisch bestimmt. Die volumetrische Aktivität betrug **66** U/ml.

Durch die Absorption aromatischer Aminosäuren bei 280 nm unter UV-Licht wurde mithilfe der Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin der Proteingehalt photometrisch bestimmt und betrug für die gereinigte LTA **30 mg/ml**. Daraus resultiert eine spezifische Aktivität von **2,2 U/mg**.

Die LTAE aus *E. coli* konnte mittels eines N-terminal fusionierten His<sub>6</sub>-Tags erfolgreich über Metall-Affinitätschromatographie (Ni-NTA) gereinigt und isoliert werden.

## 3.6.4 Kristallisierung & Strukturaufklärung der LTAE

Für die Kristallisierung der LTAE wurde frisch aufgereinigtes und gelfiltriertes Enzym mit einer Proteinkonzentration von mindestens 10 mg/ml eingesetzt.

Kristalle konnten sowohl für das Apoenzym (mit Cofaktor PLP) als auch für den Enzym-Substrat-Komplex mit Glycin erhalten werden.

Die Kristalle des Apo-Proteins sind schneller und ungeordneter gewachsen, als die Cokristalle mit Glycin. Schneller heißt in diesem Fall, dass die Apo-Kristalle nach etwa 30 Stunden ihre endgültige Größe von etwa 200 x 200 x 2 µm bereits erreicht hatten, während die Kristalle in Anwesenheit von Glycin etwa 5-7 Tage gebraucht haben, um auf eine Größe von etwa 300 x 300 x 4 µm zu wachsen. Kristalle wurden unter zwei verschiedenen Screeningbedingungen erhalten. So konnten mit PEG400 und Additiven wie Calciumchlorid und Glycerin und auch in Anwesenheit von Ammoniumsulfat, Natriumacetat und Natriumchlorid Kristalle beider Ansätze erhalten werden. Abbildung 46 und 47 zeigt die Kristalle unter mikroskopischer Auflösung und die dazu gehörigen genauen Screening-Bedingungen. Die Kristalle, die mit PEG400 erhalten wurden, sind recht zweidimensional im Vergleich zu den Ammoniumsulfat-Kristallen, was bei der Datensammlung zu Problemen führen kann, jedoch erwiesen sie sich als wesentlich stabiler, was man auch im Vergleich der Bruchkanten beider Kristalle erkennen kann. Die Bruchkanten der PEG400-Kristalle sind glatt und eben, während die der Ammoniumsulfat-Kristalle uneben und brüchig aussehen. Aufgrund der Instabilität ließen sich die feinen Kristalle für Optimierungsansätze und die Vermessung nur sehr schlecht aus den Platten isolieren, ohne zu Zerbrechen. In einer weiteren Testreihe wurden jedoch ausreichend viele Kristalle gezüchtet, so dass aus beiden Bedingungen Kristalle überführt und optimiert werden konnten.

Die Optimierung sah für das Beispiel der letztlich besten Screening-Bedingung folgendermaßen aus: Der erste Kristall war in einer Bedingung des "Crystal Screen 1" (Hampton Research) in Gegenwart von 100 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM CaCl<sub>2</sub> und 28 %

(v/v) PEG400 als Fällungsmittel gewachsen. Der 24-well Optimierungsansatz für diese Kristallisationsbedingung ist in der folgenden Tabelle (Tab. 34) exemplarisch gezeigt. Dabei wurde je 1  $\mu$ l Protein-PLP-Lösung (entweder mit oder ohne Glycin) mit 1  $\mu$ l Fällungsmittellösung gemischt und den entstehenden 2  $\mu$ l-Tropfen über einem Reservoir von 1 ml Volumen äquilibriert. Sowohl 4°C als auch 20°C wurden als Wachstumstemperaturen ausprobiert.

I ab. 34: Beispiel	<b>1 ab. 34:</b> Beispiel für einen Optimierungsansatz in 24-weil Platten.					
100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	
pH 7.1,200 mM	рН 7.1,	рН 7.1,	рН 7.1,	рН 7.1,	рН 7.1,	
CaCl <sub>2</sub> , 22 % (v/v)	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	
PEG400	24 % (v/v)	26 % (v/v)	28 % (v/v)	30 % (v/v)	32 % (v/v)	
	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	
100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	
рН 7.5,	рН 7.5,	рН 7.5,	рН 7.5,	рН 7.5,	рН 7.5,	
200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	
22 % (v/v)	24 % (v/v)	26 % (v/v)	28 % (v/v)	30 % (v/v)	32 % (v/v)	
PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	
100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	
рН 7.9,	рН 7.9,	рН 7.9,	рН 7.9,	рН 7.9,	рН 7.9,	
200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	
22 % (v/v)	24 % (v/v)	26 % (v/v)	28 % (v/v)	30 % (v/v)	32 % (v/v)	
PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	
100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	100 mM HEPES	
pH 7.1,200 mM	рН 7.1,	рН 7.1,	рН 7.1,	рН 7.1,	рН 7.1,	
CaCl <sub>2</sub> , 22 % (v/v)	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	200 mM CaCl <sub>2</sub> ,	
PEG400	24 % (v/v)	26 % (v/v)	28 % (v/v)	30 % (v/v)	32 % (v/v)	
	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	PEG400	

Tab. 34: Beispiel für einen Optimierungsansatz in 24-well Platten.



Abb. 46: LTAE-Kristalle des Apoenzyms in zwei unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen.



**Abb. 47:** Optimierte Kristalle der LTAE mit Glycin, gewachsen in 100 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM CaCl2, 30 % (v/v) PEG 400 Proteinlösung vorinkubiert mit 25 mM Glycin.

	LTAE ohne Glycin	LTAE mit Glycin
Röntgenquelle	BESSY MX 14.1	BESSY MX 14.1
Detektor	MAR225	MAR225
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2221	C2221
Gitterkonstanten a,b,c (Å)	76.51, 100.79, 175.85	76.30, 100.89, 176.35
Drehwinkel (°)	0.3	0.2
Moleküle in der		
asymmetrischen Einheitszelle	2	2
Auflösung, gesamt (Å)	35 - 1.90	35 - 1.80
Auflösung, höchste Schale(Å)	1.95 - 1.90	1.85 - 1.80
Anzahl der Gesamtreflexe	214763 (12623)	373328 (27464)
Anzahl einzigartiger Reflexe	53345 (3647)	62960 (4593)
Vollständigkeit (%)	99.0 (92.7)	99.5 (99.4)
Redundanz	4.0 (3.5)	13.6 (13.7)
I/σ(I)	17.4 (3.75)	17.1 (3.25)
Rmerge (%)	9.5 (47.1)	9.1 (50.2)

Tab. 35: Details zu den jeweils besten Datensätzen der Röntgenstrukturanalyse von LTAE mit und ohne Glycin.

Die Struktur des Apoenzyms ließ sich nach der Methode des molekularen Ersatz (MR) problemlos lösen. Dazu wurde die bekannte Struktur der L-Threonine-Aldolase aus *Thermotoga maritima* (PDB-Codes 1LW5 und 1LW4) benutzt.

Die Strukturen wurden anschließend mit der Phenix Software Suite verfeinert. Für die Glycin-gebundene Struktur liegen die kristallographischen R-Werte (ein Maß für die globale Richtigkeit der Struktur) bei aktuell 18.25 und 14.87% (Rwork, respektive Rfree) bei einer Standardabweichung der Bindungswinkel um 1.09° und der Bindungslängen um 0.008 Å. Die

Auflösung lag für das Apo-Enzym bei ~ 1,9 Å und für das Enzym mit Glycin sogar bei bis zu 1,8 Å. Das sind, verglichen mit Strukturen ähnlicher Auflösung, gute Werte.

Jedoch ist die Strukturaufklärung für den Enzym-Substrat-Komplex mit Glycin deutlich schwieriger gewesen. Kielkopf *et al.* schreiben, dass im *Thermotoga*-Enzym der Besetzungsgrad mit Substrat bezogen auf die einzelnen Monomere im Kristallgitter stark unterschiedlich sein kann. In den ersten Datensätzen konnte beobachtet werden, dass anscheinend nur ein kleiner Teil der Proteine im Kristallgitter auch tatsächlich Glycin gebunden hatte, wenn in Gegenwart von Glycin co-kristallisiert wurde. Es wurden mehrere Datensätze von Kristallen, die in Gegenwart von Glycin gewachsen sind, erhalten, jedoch lässt sich das Glycin nur innerhalb der Elektronendichte vermuten. Durch sogenanntes "Soaking" (Zugabe von frischem Glycin zum Cryomittel vor dem Gefrieren der Kristalle) konnten jedoch eindeutige Elektronendichten für gebundenes Glycin erhalten werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 48) zeigt die aufgelöste Struktur des LTAE Apoenzyms mit gebundenen Cofaktor und einen anhand der Elektronendichteverteilung gelösten Strukturvorschlag für den Enzym-Substrat-Komplex mit Glycin.

Das PLP ist im Apoenzym via Schiff'sche Base über Lysin 197 im aktiven Zentrum gebunden und bildet ein internes Aldimin (Abb. 48a)) Abbildung 48b zeigt die Elektronendichte-Verteilung zwischen PLP, welches nun vom Lysin wieder gelöst ist, und Glycin, wodurch sich ein externes Aldimin bildet.



Abb. 48: Struktur der LTAE im aktiven Zentrum. a) = internes Aldimin, Cofaktor PLP gebunden via Schiff'sche Base über Lysin 197, b) = externes Aldimin, Cofaktor gebunden über Glycin. Stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren, bzw. zu Wassermolekülen (x) sind durch

gestrichelte Linien dargestellt. Die Gitternetzebene gibt die aus den Datensätzen erhaltene Elektronendichteverteilung an.

Desweiteren sieht man weitere im aktiven Zentrum vorhandene Aminosäuren, wie das Histidin 83, welches ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Substrat-Bindung zu Threonin und der Stereospezifität des Enzyms spielt.

Die *E. coli* LTAE liegt kristallisiert als Dimer vor, wobei eine Untereinheit 35 kDa groß ist und aus zwölf  $\alpha$ -Helices und 13 ß-Faltblättern besteht (Abb. 49).



Abb. 49: a) Dimer und b) Monomer der E. coli LTAE mit gebundenem Cofaktor PLP im aktiven Zentrum.

Die Kristallisierung der LTAE war sowohl für das Apo-Enzym als auch für die Co-Kristallisation mit Substrat Glycin erfolgreich. Kristalle konnten bis zu einer Auflösung von 1.85 Å erhalten und die Struktur problemlos aufgeklärt werden.

# 4. Diskussion

# 4.3 Screening-Wege

#### 4.3.1 Screening von Stammsammlungen

Das Screening von Stammsammlungen ist eine einfache Methode, um nach aktiven Enzymen zu suchen, da hierbei auf eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen zurückgegriffen werden kann. Jedoch lassen sich mit dieser Methode keine vollkommen neuen Enzyme finden. Außerdem benötigt man die sequenzierten Genome der jeweiligen Mikroorganismen, um nach festgestellter Aktivität im Wildtyp einen Zugang zu den Genen und somit zu den rekombinanten Enzymen durch einen Sequenzvergleich (BLAST) zu erhalten. Alternativ ist es nötig ein Hochdurchsatz-Screening-System zu etablieren.

Es wurden verschiedene Sammlungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen auf Vorhandensein von Enzymen mit Threonin-Aldolase-Aktivität getestet.

Hierzu wurde auf der einen Seite die hauseigene Sammlung nach Enyzmen mit TA-Aktivität durchsucht, auf der anderen Seite wurde gezielt durch vorhergehende Datenbank- oder Literaturrecherche, die auf das Vorhandensein einer Threonin-Aldolase oder SHMT hingewiesen hat, eine bestimmte Sammlung (z.B. DSMZ-Stammsammlung) durchsucht.

Auf diesem Wege konnten mehrere neue aktive Enyzme mit TA-Aktivität identifiziert werden. Von größtem Interesse war die Stereoselektivität dieser Enzyme hinsichtlich des  $\beta$ -C-Atoms der durch die Enzymkatalyse entstandenen  $\beta$  -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäure. Da die Threonin-Aldolasen in der Aldolreaktion im Allgemeinen hoch spezifisch bezüglich der Synthese des  $\alpha$ -C-Atoms sind (mit *ee* > 99%), jedoch nur ungenügende Selektivitäten am  $\beta$ -C-Atom aufweisen, war die Bestimmung der Diastereoselektivität über den d.r.-Wert mittels NMR notwendig. Größte Bedeutung, insbesondere für die pharmazeutische Industrie, besitzen die diastereomerenreinen *threo*-Verbindungen der chiralen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren.

Die Analyse der in Sammlungsstämmen gefundenen Stämme, die TA-Aktivität aufweisen, lieferte hauptsächlich die bevorzugten *threo*-spezifischen Enzyme. Meist waren die Spektren jedoch sehr schlecht auswertbar, die Maxima nur schwierig integrierbar und der Umsatz schlecht bestimmbar. Dies lag daran, dass die Ausbeute nach der enzymatischen Umsetzung und anschließender Derivatisierung des Produktes Phenylserin oft zu gering war. In den meisten Fällen konnte nur ein ungefähres Verhältnis *threo:erythro* geschätzt werden oder eine grobe Aussage über den Überschuss eines Isomers gemacht werden.

Für die Arthrobacter-Stämme konnte der Umsatz und das Diastereomerenverhältnis eindeutig bestimmt werden. Alle in Arthrobacter gefundenen Enzyme mit TA-Aktivität zeigen *threo*-Spezifität für die Aldolreaktion, doch sind die d.r.-Werte immer noch in der Größenordnung bereits bekannter Enzyme.

Durch Screening von Stammsammlungen konnten Enzyme mit Threonin-Aldolase-Aktivität gefunden werden, jedoch liegen die Werte für die Diastereomerenverhältnisse unterhalb dessen, was für die enzymatische Aldolreaktion angestrebt wird.

#### 4.3.2 Anreicherung Phenylserin-abbauender Mikroorganismen aus Bodenproben

Die Anreicherung Phenylserin-abbauender Mikroorganismen aus Bodenproben bietet einen Zugang zu vollkommen neuen Enzymen mit den gewünschten Eigenschaften. Während der Metagenom-Ansatz eine kultivierungsunabhängige Methode zur Isolierung des gesamten Genpools eines Habitats ermöglicht, werden durch die Anreicherung mit einem bestimmten Substrat als Nährstoffquelle in Minimalmedium gezielt nur die Mikroorganismen aus diesem Habitat kultiviert, die in der Lage sind, dieses Substrat auch in Stoffwechselprozessen zu verwerten. Durch Kultivierung der gesamten Bodenproben auf Minimalmedium mit Phenylserin als alleiniger Kohlenstoffquelle konnten selektiv Mikroorganismen erhalten werden, die in der Lage sind, Phenylserin umzusetzen, bzw. in einer Art und Weise abzubauen. Ob dies jedoch auch in der gewünschten Weise, also durch eine Threonin-Aldolase oder ein verwandtes Enzym in einer Retro-Aldolspaltung erfolgt, musste im Folgenden durch geeignete Analyse der erhaltenen Bodenproben-Mikroorganismen überprüft werden. Hierfür mussten die Mikroorganismen erst einmal in Reinkultur konserviert und anschließend der zellfreie Rohextrakt für alle weiteren Tests gewonnen werden. Auf den meisten Platten war nach einigen Tagen starkes Wachstum vieler schon mit bloßem Auge erkennbar unterschiedlicher Mikroorganismen zu sehen. Doch war es schwierig die Mikroorgansimen zu vereinzeln, es wurden immer wieder Verunreinigungen verschleppt. Einige Mikroorganismen schienen an einen anderen Mikroorganismus und dessen Wachstum gebunden zu sein. So konnten nicht aus allen ursprünglich 16 Bodenproben Phenylserinabbauende Mikroorganismen gefunden werden, jedoch wurden aus einigen Bodenproben mehrere Organismen mit potenziellen Threonin-Aldolasen erhalten. Bei diesen Böden handelt es sich um sehr lehmige, erdige Böden, die zum Teil auch vermehrt von Regenwürmern und

anderen Insekten bewohnt wurden und wohl sehr nährreich waren; sowie Kompostproben, die ebenfalls eine breite Vielfalt an Mikroorganismen beherbergen. Aus den sehr sandigen Böden konnten keine Mikroorganismen nach Kultivierung auf Phenylserin gewonnen werden; wahrscheinlich waren diese Böden mit keiner sehr großen Vielfalt an Mikroorganismen oder mit extremophilen Mikroorganismen besiedelt, die über keine Enzyme mit TA-Aktivität verfügen. Es sind einige Threonin-Aldolasen aus in erdigen Böden lebenden Organismen, wie aus dem Bodenbakterium *Pseudomonas putida*, bekannt, so dass die Wahrscheinlichkeit groß war, im erdigen Boden einen Stamm zu finden, der TA-Aktivität besitzt.

Um die einzelnen Stämme zu separieren und zu konservieren, mussten die Kulturen, nachdem sie auf Platte bereits dreimal fraktioniert ausgestrichen wurden, in flüssigem Minimalmedium mit Phenylserin kultiviert werden. Dies erwies sich als schwierig, da die Stämme nur sehr langsam mit geringer Zelldichte oder zum Teil gar nicht wuchsen. Alternativ wurden die Stämme deshalb auf Agar-Platten ausgestrichen und so lange kultiviert, bis die Platte dicht bewachsen war und die Zellen anschließend mit Medium und einem Spatel von der Platte "abgeschwemmt".

Die Analyse der gewonnenen zellfreien Rohextrakte der einzelnen Bodenproben-Isolate wurden in einer ersten Screeningrunde mit Phenylserin in der Retro-Aldolspaltung umgesetzt und mittels GC analysiert um die Stämme mit Enzymen mit TA-Aktivität von denen ohne Aktivität zu separieren. Die Enzym-Aktivität wurde auf diese Weise nicht bestimmt, aber durch einen relativ hohen Durchsatz von Proben an der GC konnte direkt eine Aussage auf das Vorhandensein eines Enzyms, das Phenylserin in der Retro-Aldolreaktion in Benzaldehyd spaltet, getroffen werden. Zur Bestimmung von Enzym-Aktivitäten kann ein gekoppelter Photometertest mit einer ADH, die den Benzaldehyd unter NADH-Verbrauch zum Benzylalkohol umsetzt, verwendet werden. Hier kann jedoch nicht jede beliebige ADH verwendet werden, sondern nur ein für Benzaldehyd spezifisches Enzym, wie die ADH aus der Pferdeleber (HL-ADH) oder aus *Rhodococcus ruber (RR*-ADH). Da die HL-ADH nicht verfügbar war und die RR-ADH keine hohe Aktivität für die Reaktion zeigte, wurde derselbe Test unter Verwendung des natürlichen Substrates der TAs, L-Threonin, genutzt, wobei hier der entstehende Acetaldehyd durch eine kommerziell verfügbare ADH aus *S. cerevisiae* nachgewiesen werden kann.

Die Analyse der Umsetzungen mit den Bodenproben-Isolaten zeigte, dass fast alle Isolate Phenylserin durch ein geeignetes Enzym in Benzaldehyd spalten konnten. Die restlichen Isolate, die zwar ebenfalls auf Phenylserin als C-Quelle kultivierbar waren, müssen in der Lage sein das Phenylserin anderweitig zu verwerten. Phenylserin kann zum Beispiel in einer Deaminierung durch das Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym Phenylserin-Deaminase zu Phenylpyruvat umgesetzt werden <sup>[107]</sup>.

Die Analyse der in der Spaltreaktion positiven Isolate mit TA-Aktivität in Syntheserichtung war von entscheidender Bedeutung, da die Umsätze und d.r.-Werte so bestimmt werden konnten. Hier lieferten sieben Isolate aus den Bodenproben deutlich erhöhte d.r.-Werte mit > 80: 20 im Vergleich zu den meisten literaturbekannten Enzymen, jedoch waren die Umsätze in den meisten Fällen sehr gering. Mit hohen d.r.-Werten gingen niedrige Umsätze einher; je besser der Umsatz, desto schlechter war auch d.r.-Wert. Lediglich das Isolat B13b) konnte bei einem guten *de* von >90% auch einen hohen Umsatz von 81% für die Synthese von Phenylserin in der Aldolreaktion erzielen und nimmt damit eine bedeutende Rolle ein. Enzyme mit Threonin-Aldolase-Aktivität, die hoch diastereoselektiv sind und hohe Umsätze in der Aldolreaktion zeigen sind selten und es gibt wenige literaturbekannte Beispiele hierfür. Da hohe Diastereoselektivitäten meist nur unter kinetischer Kontrolle, nach kurzer Umsatzzeit erhalten werden, sind die Umsätze dementsprechend gering.

Solch hohe d.r.-Werte, wie sie durch die Enzyme der Bodenproben-Isolate für das *threo*-Isomer erhalten wurden, konnten bislang entweder nur durch den Nutzen von D-spezifischen Enzymen, oder durch Verwendung substituierter Derivate des Aldehyds erhalten werden. Hier sind besonders die Halogen-substituierten Benzaldehyde zu nennen, mit denen unter Verwendung L-spezifischer Enzyme d.r.-Werte von 80:20 (*threo:erythro*) erhalten werden können.

Von großer Bedeutung für die industrielle Anwendung der TAs in der Synthese von  $\beta$  -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren wäre es somit, dieses Enzym aus dem Bodenproben-Isolat B13b) zu identifizieren und rekombinant zu erhalten.

Die Anreicherung Phenylserin-abbauender Mikroorganismen aus Bodenproben lieferte einige neue Enzyme mit deutlich verbesserten d.r.-Werten im Vergleich zu den bisher veröffentlichten Threonin-Aldolasen. Jedoch waren die Umsätze für die meisten Enzyme sehr niedrig und daher immer noch für die enzymatische Aldolreaktion limitierend.

#### 4.3.2.1 Kultivierung der Isolate auf Threonin als Kohlenstoff-Quelle

Durch Kultivierung der aus der Anreicherung mit Phenylserin gewonnenen konservierten Bodenproben-Isolate auf Minimalmedium mit Threonin als Kohlenstoffquelle sollte getestet werden, ob die Isolate beide Substrate gleichermaßen als Kohlenstoffquelle für ihr Wachstum nutzen und ob die Enzyme zwischen den beiden Substraten unterscheiden und eine Spezifität zeigen. Dies sollte bei erfolgreichem Wachstum auf Threonin im Folgenden in der Retro-Aldolreaktion durch einen Aktivitätstest am Photometer, sowie durch eine GC-Analyse getestet werden. Dem Minimalmedium wurde Threonin in derselben Konzentration zugesetzt wie Phenylserin in der ersten Anreicherung der Isolate. Alle Isolate aus der Phenylserin-Anreicherung waren auch mit Threonin im Medium kultivierbar und sind sogar schneller und dichter angewachsen, als bei vorheriger Kultivierung auf Phenylserin. Threonin konnte somit als Kohlenstoffquelle genutzt und somit von den Mikroorganismen metabolisiert werden.

Die anschließend aus den Zellen isolierten Rohextrakte zeigten jedoch in der Umsetzung mit Phenylserin als Substrat in der gaschromatographischen Analyse keine Aktivität mehr in Form von gebildetem Benzaldehyd. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Bildung der Enzyme mit Threonin-Aldolase-Aktivität erst bei Vorhandensein von Phenylserin im Minimalmedium induziert wird und es sich wahrscheinlich dabei um spezifische, literaturbekannte Phenylserin-Aldolasen handelt. Das Phenylserin ist dafür verantwortlich, dass die Exprimierung der Enzyme erst stattfinden kann.

Threonin wird jedoch ebenfalls als Kohlenstoffquelle akzeptiert und induziert Wachstum, jedoch bleibt hier die Induktion der für die Spaltung von Phenylserin verantwortlichen Aldolase aus und die Retro-Aldolspaltung mit Phenylserin als Substrat kann deshalb nicht mehr stattfinden. Da Threonin jedoch auch als C-Quelle verwertet werden konnte, bleibt die Frage, wie dies durch die Bodenproben-Isolate möglich war. Es gibt einige Abbauwege von Threonin in lebenden Organismen. Threonin kann nicht nur in einer Retro-Aldolreaktion durch eine Threonin-Aldolase gespalten werden, sondern außerdem gibt es noch die Möglichkeit der Umsetzung zu Propionyl-CoA, oder die Umsetzungen durch die Enzyme Threonin-Deaminase und Threonin-Dehydrogenase. Um zu überprüfen, ob Threonin im Minimalmedium von den Mikroorganismen tatsächlich von einer Threonin-Aldolase, die spezifisch für Threonin als Substrat ist, umgesetzt wurde, wurde anschließend der aus der Kultivität untersucht. Im Falle einer Threonin-Aldolase-Reaktion hätte hier Aktivität gemessen werden können, da der freigesetzte Acetaldehyd durch die gekoppelte ADH-Reaktion unter
NADH-Verbrauch zum entsprechenden Alkohol umgesetzt worden wäre. Dies war jedoch nicht der Fall und belegt, dass die Bodenproben-Isolate über kein weiteres Enzym mit Threonin-Aldolase-Aktivität verfügen, dass in der Lage ist Threonin umzusetzen. Dieses scheint vielmehr anderweitig verstoffwechselt zu werden, z.B. zu Propionyl-CoA, einem wertvollen Metaboliten in Stoffwechselprozessen.

Die durch Phenylserin-Anreicherung aus Bodenproben gewonnenen Enzyme mit Threonin-Aldolase-Aktivität sind mit großer Wahrscheinlichkeit allesamt induzierbare Enzyme- sogenannte Phenylserin-Aldolasen! Eine Anzucht der Isolate auf Threonin als Kohlestoffquelle induztiert zwar Wachstum der Stämme, jedoch wird Threonin nicht in einer Aldolreaktion durch eine Threonin-Aldolase gespalten.

### 4.3.2.2 Identifizierung der Phenylserin-abbauenden Organismen aus Bodenproben

Zur Identifizierung der aus Bodenproben gewonnenen Mikroorganismen, die in der Lage sind, Phenylserin in einer Aldolspaltung durch eine Threonin-Aldolase oder ein vergleichbares Enzym mit TA-Aktivität abzubauen, wurde die für jeden Mikroorganismus spezifische 16srRNA mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Anhand dieser spezifischen Sequenz konnte durch Datenbankanalyse eine Stammidentifizierung über die Ähnlichkeit zu bereits gespeicherten 16S-rRNA Daten durchgeführt werden. Diese Identifizierung war in den überwiegenden Fällen sehr eindeutig für einen bestimmten Organismus. Insgesamt konnten aus den Bodenproben-Isolaten fünf verschiedene Bakterienarten identifiziert werden: Pseudomonas, Arthrobacter, Acinetobacter, Paenibaciullus und Sphingobakterium.

Diese Organismen sind alle bekannt als Bodenbewohner, besonders Pseudomonas ist ein vielverbreitetes Bodenbakterium. Aus Pseudomonaden und Arthrobacter-Stämmen sind bereits Enzyme mit TA-Aktivität bekannt und Sequenzen veröffentlicht.

Hierbei handelt es sich um L-spezifische und L-*allo*-spezifische TAs <sup>[42]</sup>; desweiteren berichten Misono *et al.* <sup>[52]</sup> über eine spezifische Phenylserin-Aldolase aus *Pseudomonas putida*. Jedoch ist in allen Fällen auch für diese bekannten Enzyme der Umsatz und Diastereomerenüberschuss in der Aldoleraktion der limitierende Faktor. Die *de*-Werte liegen für die L-TAs typischerweise unter kinetischer Kontrolle bei >30 % für die *threo*-Verbindung (d.r.-Wert 65:35 *threo:erythro*), unter thermodynamischer Kontrolle bei 21 % (d.r.-Wert ~ 60:40 *threo:erythro*).

### 4.3.3 In Silico-Screening ausgehend von bekannten TA-Sequenzen

Durch das *in Silico*-Screening konnten ausgehend von den Sequenzen der beiden TAs aus *E. coli* und *S. cerevisiae* fünf neue rekombinante Enzyme mit TA-Aktivität gefunden werden. Nach Analyse zeigt sich jedoch, dass die d.r.-Werte für die Synthese von Phenylserin in der Aldolreaktion zwar zugunsten der *threo*-Verbindung waren, jedoch keine signifikant verbesserten Werte zu den bisher veröffentlichten Threon-Aldolasen darstellen. Die Umsätze waren allerdings bei allen Umsetzungen mit den neuen Enzymen mit Werten bis zu 90% sehr hoch. Solche hohen Umsätze wurden bei der enzymatischen Aldolreaktion nur selten bei kurzen Umsatzzeiten erreicht. Hohe Umsätze sind meist nur unter thermodynamischer Kontrolle der Reaktion zu erzielen und stellten bislang eine große Limitierung der enzymatischen Synthese von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren mit Threonin-Aldolasen dar.

Ausgehend von solch hohen Umsätzen wäre eine Optimierung der Reaktion und eine Variation der Benzaldehyd-Komponente durch Derivate, die literaturbekannt zur Erhöhung der Diastereoselektivität führen, von großem Interesse.

Das *in silico*-Screening lieferte ausgehend von zwei bereits bekannten Threonin-Aldolase-Sequenzen fünf neue rekombinante *threo*-spezifische Enzyme. Jedoch sind die Diastereomerenverhältnisse allesamt nur in der Größenordnung von bisher bereits bekannten Threonin-Aldolasen. Die Umsätze waren für diese neuen Enzyme sehr hoch für eine enzymatische Aldolreaktion.

### 4.4 Hochdurchsatz-Screening mithilfe eines Selektions-Stammes

*Pseudomonas putida* KT2440 ist in der Lage, viele aliphatische und aromatische Kohlenstoffverbindungen als Nährstoffquelle zu nutzen und zu metabolisieren. So kann auch Benzaldehyd, welches ausgehend von Phenylserin als Substrat das Spaltprodukt der Retro-Aldolreaktion darstellt, im Mandelat-abbauweg verstoffwechselt werden. Aufgrund dieser Tatsache ist *P. putida* KT2440 ein geeignetes Selektionssystem für die Identifizierung neuer Threonin-Aldolasen. Doch das Selektionssystem kann nur genutzt werden, wenn der Stamm das Substrat Phenylserin selbst nicht als Kohlestoffquelle nutzen kann und über kein eigenes Enzym mit TA-Aktivität verfügt. In ersten Wachstumstest auf Minimalagar mit Phenylserin als C-Quelle konnte zunächst kein Wachstum des Stammes nachgewiesen werden. Doch bei Wiederholung dieser Experimente zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit waren die

Pseudomonaden in der Lage auf dem Minimalagar mit Phenylserin zu wachsen und dieses somit als Nährstoffquelle zu verwerten. Um auszuschließen, dass dieses Wachstum durch eine Instabilität des Phenylserins und einen frühzeitigen Zerfall in Benzaldehyd (so wie es nach Autoklavieren z.B. der Fall ist) verursacht wird, wurde eine Testreihe zur Stabilität des Phenylserin wurde bei verschiedenen Phenylserins angelegt. Temperaturen im Minimalmedium über mehrere Tage inkubiert und anschließend mittels GC auf gebildetes Benzaldehyd überprüft. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass das Wachstum auf einer Instabilität des Phenylserins beruht, denn auch nach zweiwöchiger Inkubation des Phenlyserins bei RT in Minimalmedium, war nach gaschromatographischer Analyse kein Zerfall in Benzaldehyd nachweisbar. Da die Anzucht der Mikroorganismen immer innerhalb dieser Zeitspanne erfolgte, war somit eine Stabilität der Kohlenstoffquelle Phenlyserin gewährleistet. Somit war nahe liegend, dass der Stamm bereits über ein Enzym mit Threonin-Aldolase-Aktivität verfügt und eine Genom-Analyse des durchsequenzierten Organismus bestätigte diese Annahme. Die putative Threonin-Aldolase wurde im Folgenden durch analytische Umsetzungen und Aktivitätstest als aktives Enzym identifiziert. Um diesen Stamm für die Identifizierung neuer Threonin-Aldolasen, besonders der neu gefundenen guten Enzyme aus den Bodenproben-Isolaten, als Selektions-System und somit als Horchdurchsatz-Screening-Methode zu nutzen, musste dieses Gen durch Deletion ausgeschaltet werden.

*P. putida* KT2440 kann durch die Möglichkeit Benzaldehyd im Mandelat-Abbauweg zu verstoffwechseln als Wachstums-induziertes Selektionssystem eingesetzt werden. Jedoch ist eine weitere Bedingung, dass das Wachstum auf Phenylserin als Kohlestoffquelle ausbleibt. Da der Wildtyp-Stamm jedoch über eine aktive Threonin-Aldolase verfügt, muss dieses Gen erst deletiert werden, um das Selektionssystem zur Identifizierung der neuen Threonin-Aldolasen zu nutzen.

### 4.5 Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes P. putida

Zur Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes *P. putida* KT2440 standen diverse Methoden zur Verfügung, die parallel angewandt wurden. Die Deletion kann über ein Klonierungs-Schema in einen Sub-Klonierungsvektor eingefügt werden, oder die Konstruktion der Deletionsmutante über ein PCR-Schema durch Overlap-Extension PCR schrittweise erfolgen. Beide Methoden lieferten kein Ergebnis, da sowohl die Klonierungen als auch die PCRs nur bis zu einem bestimmten Punkt funktionierten. Alternativ wurde nach einer Gen-internen Schnittstelle innerhalb des PpTA-Gens gesucht, über die die Kassette zur Deletion des intakten Gens direkt insertiert werden konnte. Hier bot sich nur das Enzym *Eag*I an, das relativ mittig im *ppTA*-Gen schneidet und weder im Vektor, noch innerhalb der Kassette Schnittstellen aufweist. Auch auf diese Weise konnte kein Konstrukt zur Deletion des PpTA-Gens in den suizidvektor pSUP202 eingebracht werden.

Die Konstruktion eines Threonin-Aldolase defizienten Stammes durch Deletion des Threonin-Aldolase Gens PpTA in *P. putida* KT2440 lieferte im Rahmen dieser Arbeit keine Ergebnisse und scheiterte bereits am Klonierungsschema oder an der Overlap-Extension-PCR.

### 4.6 Erstellung einer DNA-Bank in E. coli

Zur Erstellung einer DNA-Bank der Bodenproben-Isolate musste die DNA der Isolate zunächst partiell in 6 – 10 kb große Fragmente restringiert werden. Hierfür war nur sehr reine, hoch konzentrierte DNA geeignet, die nur aus einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit mehrmaliger Reinigung der DNA erhalten werden konnte, während die Verwendung kommerzieller Kits keine geeignete DNA lieferte.

Auch wenn das Selektionssystem für die Bodenproben noch nicht zur Verfügung stand, wurde die aus den Bodenproben B10b) und B11c2) erhaltene Gen-Bank zunächst in *P. putida* transformiert und der gesamte Transformationsansatz in Minimalmedium mit Phenylserin als Kohlenstoffquelle angezogen. Von dem Gen-Pool wurde die Plasmid-DNA isoliert und anschließend in *E. coli* transformiert, wobei hier nicht selektiert werden kann. Da wir jedoch davon ausgehen, dass es sich bei den Bodenproben-Enzymen um induzierbare Aldolasen handelt, die erst bei Vorhandensein des Substrats Phenylserin im Medium produziert werden, konnte eine überschaubare Anzahl an Transformanden auf den Platten erwartet werden. Dies

war auch der Fall; die Platten waren nur mit ca. 25 Kolonien bewachsen, so dass alle Klone auch ohne Hochdurchsatz-Screening Methode per Hand getestet werden konnten. Hierzu wurden die verschiedenen Klone in E. coli überexprimiert und der aus der Expression erhaltene Rohextrakt in der Aldolspaltung mit GC und in der Synthese-Richtung mittels NMR analysiert und anschließend aus den NMR-Spektren die Umsätze und die d.r.-Werte bestimmt. Die Ergebnisse waren mit den Wildtyp-Umsetzungen identisch, zum Teil waren die d.r.-Werte noch verbessert und deutlich höher, als die d.r.-Werte aus Umsetzungen mit den anderen neuen Enzymen aus dem in silico-Screening oder dem Stammsammlungs-Screening. Es handelt sich bei den Enzymen somit um hoch threo-spezifische Threonin-Aldolasen aus den Bodenproben-Isolaten. Die Isolate konnten nach 16S-rDNA-Analyse als Acinetobacter sp. (B11c2) und Pseudomonas sp. (B10b) identifiziert wurden. Die Negativkontrolle von Leervektor in E. coli und nur E. coli Rohextrakt lieferte keinen Umsatz in der Synthese von Phenylserin und es ist somit auszuschließen, dass ein E. coli-eigenes Enzym für solch hohe Diastereomerenverhältnisse verantwortlich ist. Das E. coli eigene Enzym mit TA-Aktivität (TA bzw. SHMT) zeigt keine Aktivität, da dieses Enzym nicht exprimiert wurde und somit wahrscheinlich nicht in ausreichender Menge in den Zellen vorlag, um die Aktivität zu beeinflussen.

Eine anschließende Restriktionsanalyse mit verschiedenen Enzymen sollte den Vektor mit dem Insert aus der DNA-Bank schneiden und somit die durchschnittliche Insertgröße der Gen-Bank bestimmt werden. Für diese Restriktionsanalysen und eine anstehende Sequenzierung der Inserts musste jedoch zunächst einmal eine ausreichende Menge an DNA präpariert werden, weshalb die ursprünglichen Proben erneut transformiert wurden. Die anschließende Restriktionsanalyse zeigte jedoch nur ein Bandenmuster für den Vektoranteil, es waren keine Inserts für beide Proben B10b) und B11c2) vorhanden. Eine anschließende Sequenzierung bestätigte dieses Ergebnis, es konnte nur Vektoranteil editiert werden.

Es konnten jedoch aus der ursprünglichen Plasmid-DNA beider Proben sowohl Umsätze, als auch Aktivitäten in der Aldolspaltung, sowie in der Synthese von Phenylserin eindeutig analytisch nachgewiesen werden. Es wurden sehr hohe d.r.-Werte gemessen, die nicht von einem *E. coli*-eigenen Enzym stammen können, da der *E. coli* selbst keinen Umsatz lieferte. Dies weist darauf hin, dass der Fehler bei der zweiten Transformation der Ursprungs-Plasmide der liegen muss. Eine Möglichkeit wäre, dass nach erneuter Transformation das Insert wieder aus dem Genom verloren gegangen ist und somit nur noch Vektoranteil in den Transformanden nachgewiesen werden konnte. Um zu überprüfen, ob das Insert im Ursprungs-Plasmid eindeutig nachweisbar ist, wurden die Reste dieser (~ 5 µl) mittels Restrinktionsanalyse in kleinem Ansatz überprüft und es konnte ein anderes Bandenmuster als in der zweiten Plasmid-Präp nach erneuter Transformation nachgewiesen werden, das eindeutig nicht nur Vektoranteil zeigt. Jedoch ist hier das Bandenmuster für Probe B10b) und B11c2) nahezu identisch, obwohl es sich bei den beiden Isolaten um Enzyme aus verschiedenen Organismen handelt. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass diese zwei Enzyme eine identische Sequenz besitzen. Somit ist dieses einheitliche Bandenmuster beider Proben nach der Restriktion nicht erklärbar.

Auch nach einer weiteren Transformation aus der ursprünglichen Plasmid-DNA, konnten erneut nur Klone erhalten werden, die lediglich aus Vektoranteil bestanden, so dass der Fehler auch weiterhin bei der Transformation lag.

### 4.8 Die LTA aus E. coli XL1 (LTAE)

### 4.8.1 Mutagenese der *E. coli* TA

Durch Austausch der Aminosäure in Position 87 im aktiven Zentrum des Enzyms sollte nach Annahme von Kielkopf *et al.* die Diastereoselektivität beeinflusst werden. Die LTAE besitzt an Position 87 ein Phenylalanin, d.h. eine Aminosäure mit sterisch anspruchsvollem aromatischem Rest. Kielkopf *et al.* gehen von der Annahme aus, das solch sterisch anspruchsvolle Aminosäuren mit großen Gruppen oder aromatischen Seitenketten sich nachteilig auf die Diastereoselektivität des Enzyms auswirken. Untersuchungen diverser Threonin-Aldolasen hinsichtlich ihrer Aminosäure in Position 87 und den bisher bekannten d.r.-Werten verifizierten ihre Annahmen. So hat die die L-*low*-TA aus *Thermotoga maritima* an Position 87 ein Tyrosin, während die LTA aus *Pseudomonas putida*, die wesentlich spezifischer für L-Threonin als für L-*all*o-Threonin ist an dieser Position über keine sterisch anspruchsvolle Aminosäure mit aromatischem Rest verfügt.

Position 87 scheint die einzig variable Stelle im aktiven Zentrum der TAs zu sein und eine wesentliche Rolle bei der Unterscheidung von *threo-* und *erythro-*Isomeren zu spielen.

Der folgende Ausschnitt aus dem Alignment verschiedener literaturbekannter Threonin-Aldolasen gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Aminosäuren an Position 87, wobei die *P. aeruginosa* TA das einzige Enzym ist, das keine aromatische Aminosäure an dieser Stelle besitzt (Abb. 50).



**Abb. 50:** Alignment verschiedener Threonin-Aldolasen und der *E. coli* SHMT, Vergleich der Aminosäuren in Position 87 des Enzyms (Kielkopf *et al.*)<sup>[54]</sup>.

Die Diastereoselektivitäten dieser Enzyme sind unter kinetischer Kontrolle alle auf Seiten des erythro-Isomers, die Diastereomerenüberschüsse dieser Enzyme liegen kinetisch alle auf Seiten des erythro-Isomers (s. Einleitung Tabelle 1), die P. aeruginosa TA hingegen ist mit einem d.r.-Wert 65:35 (*threo:erythro*) unter kinetischer Kontrolle (t = 1 min) *threo-*spezifisch. Der Austausch der Aminosäure in Position 87 im E. coli Enzym erfolgte mittels Quick-Change-PCR und war für fünf der sieben Mutationen erfolgreich. Im Falle der Serin-Mutante konnte kein Aminosäureaustausch nachgewiesen werden, für die Tryptophan-Mutante war der Austausch von Phenylserin gegen Tryptophan zwar erfolgreich, aber es wurde außerdem noch eine zusätzliche Punktmutation durch die PCR eingefügt. Diese Punktmutation führte zu einem weiteren Aminosäureaustausch an Position 96 von Glycin zu Asparaginsäure. Trotzdem wurde diese Mutante ebenfalls auf Aktivität untersucht und die Umsetzung zu Phenylserin analysiert, um eine mögliche Auswirkung auf den d.r.-Wert zu überprüfen. Für diese Doppelmutante war der d.r.-Wert am stärksten verändert und zwar zugusten des threo-Isomers mit einem Verhältnis von 67:33 (threo:erythro). Für die reine Tryptophan-Mutante wurde allerdings nach Kielkopf et al. das Gegenteil erwartet, nämlich ein schlechterer d.r.da Tryptophan die größte Aminosäure mit aromatischer Seitenkette ist. Wert. Dementsprechend war zu prüfen, ob der erhöhte d.r.-Wert nur durch die zusätzliche Mutation an Position 96 oder durch die Kombination beider Mutationen in dieser Variante erzielt wurde. Dazu musste diese Doppelmutante in zwei Mutanten aufgetrennt werden.

Um einen Vergleich dieser Mutanten zum Wildtyp-Enzym zu haben, ist es entscheidend, die betreffenden Aminosäuren und ihre räumliche Anordnung innerhalb der Struktur näher zu betrachten. Aus diesem Grunde wurde die durch Kristallisierung erhaltene Struktur der LTAE mit Modellen der Mutanten verglichen. Der Austausch in Position 96 betrifft nicht direkt das aktive Zentrum des Enzyms, da die Entfernung zwischen dieser Position und Aminosäure 87, sowie Lysin 197, das die Cofaktorbindestelle ausmacht, zu groß ist, um eine Wechselwirkung dieser Aminosäuren untereinander anzunehmen Jedoch können durchaus Aminosäureaustausche, die nicht direkt innerhalb des aktiven Zentrums stattfinden, die Struktur und somit auch Stereospezifität eines Enzyms zugunsten eines Isomers entscheidend verändern. Position 96 liegt an der Grenzfläche zischen einzelnen Monomeren eines Dimers bzw. Tetramers der LTAE und ein Austausch in dieser Position kann durchaus zu strukturellen Änderungen innerhalb des Enzyms führen. Durch Austausch des kleinen, hydrophoben Glycins durch Asparaginsäure werden neue Verhältnisse innerhalb dieser Grenzregion geschaffen, da nun durch die sauren Reste die Wechselwirkungen nicht nur zwischen den benachbarten Aminosäureresten innerhalb einer Kette, sondern auch zwischen zwei verschiedenen Ketten beeinflusst werden können. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Apsaraginsäure-Mutante im gekoppelten Photometer-Test mit Threonin als Substrat keine Aktivität in der Retro-Aldolreaktion zeigte.

Durch den Aminosäureaustausch in Position 87 der *E. coli* LTAE wurden fünf neue Mutanten des Enzyms erhalten, sowie durch eine zufällige Mutation in Position 96 des Enzyms noch eine weitere Einzelmutante, sowie eine Doppelmutante durch Austausch in den Postitionen 87 und 96. Die d.r.-Werte wurden durch die Mutagenese jedoch nicht wie erwartet signifikant verändert, es zeigen sich nur kleine Abweichungen vom Wildtyp-Enzym und eine Tendenz in Richtung der Annahme von Kielkopf *et al.* 

### 4.8.2 Biochemische Charakterisierung der Tryptophan-Mutante

Die durch den Aminosäure-Austausch in Position 87 (Phe  $\rightarrow$  Trp) des Enzyms erhaltene Tryptophan-Mutante (Trp87-Mutante) zeigte von allen Mutanten bei Weitem die größte Aktivitätsverbesserung. Die Aktivität ist im Rohextrakt bei der Standard-Messung (30°C, gekoppelter Photometertest mit L-Threonin als Substrat) doppelt so hoch wie beim Wildtyp-Enzym LTAE. Zur biochemischen Charakterisierung der Mutante wurden das Temperaturoptimum, die pH-Stabilität und die kinetischen Konstanten (v<sub>max</sub> und K<sub>m</sub>) im Vergleich zum Wildtyp-Enzym bestimmt. Das Temperaturoptimum der Trp87-Mutante liegt bei 60°C mit einer volumetrischen Aktivität von 557 U/ml und einer spezifischen Aktivität von 38 U/ml. Bei 60°C ist die Aktivität der Mutante somit fünfmal so hoch, wie bei der Standard-Messung bei 30°C. Das für das Wildtyp-Enzym bestimmte Temperaturoptimum liegt zwischen 60 und 70°C und stimmt mit den literaturbekannten Werten überein<sup>[106]</sup>.

Das pH-Optimum und die kinetischen Konstanten ( $V_{max}$  und  $K_m$ ) konnten nur für die Trp87-Mutante und nicht für den Wildtyp bestimmt werden, da hier nicht genügend aufgereinigtes Enzym für weitere Messungen präpariert wurde. Hier kann zum Vergleich auf die Werte in der Literatur zurückgegriffen werden. Das pH-Optimum der Mutante liegt im basischen Millieu, bei einem pH von 9,3, der pH-Bereich mit der höchsten Aktivität für das Wildtyp-Enzym liegt nach Liu *et al.* zwischen 8,5 und 9 und stimmt damit mit den Messergebnissen überein.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten zeigte, dass die Trp87-Mutante einen niedrigeren K<sub>m</sub>-Wert und somit eine höhere Affinität zum Substrat L-Threonin zeigt, als das Wildtyp-Enzym. Der K<sub>m</sub>-Wert liegt bei der Mutante bei 1,48 mM, beim Wildtyp-Enzym bei 2,85 mM, somit besitzt die Tryptophan-Mutante eine doppelt so hohe Affinität zum Substrat L-Threonin. Von entscheidender Bedeutung wäre die Bestimmung des d.r.-Wertes dieser Tryptophan-Mutante, um zu überprüfen, ob durch den Austausch nicht nur die Aktivität und die Affinität des Enzyms zum Substrat L-Threonin verbessert wurde, sondern auch die Diastereoselektivität.

#### 4.8.3 Kristallisierung der LTAE

Die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie über den N-terminalen His<sub>6</sub>-tag führte zu einem Enzympräparat mit hoher Reinheit, so dass das aufgereinigte Enzympräparat direkt in zur Kristallisierung eingesetzt werden konnte. Desweiteren erwies sich der His<sub>6</sub>-tag nicht als störend und hatte keinerlei Einfluss auf die Enzymaktivität oder die Umsetzung, so dass dieser im Nachhinein nicht abgespalten werden musste.

Die LTAE ließ sich sowohl als Apoenzym mit Cofaktor Pyridoxalphosphat, als auch mit Glycin als Substrat problemlos kristallisieren. Die Kristalle wuchsen jedoch ziemlich schnell und somit relativ brüchig, so dass die Isolierung recht schwierig war. In weiteren Ansätzen konnten aber ausreichende Mengen an Kristallen erzeugt werden, aus denen sich Einzel-Kristalle für Optimierungsansätze und die anschließende Röntgenstrukturanalyse isolieren ließen.

Die Struktur ließ sich für das Apoenzym mithilfe der *Thermotoga*-Struktur problemlos lösen. Für die Kristalle von LTAE mit Substrat Glycin erwies sich die Strukturaufklärung als schwieriger, da nur ein geringer Teil der Enzyme Glycin tatsächlich im Kristallgitter gebunden hat und der Besetzungsgrad stark variiert. Dieses Problem konnte jedoch durch die "Soaking"-Methode überwunden werden, da durch diese Methode eine höhere Anfangskonzentration an Glycin verwendet wird und dem fertigen Kristall über das Cryomittel noch weiteres Glycin zugefügt werden kann. Auf diese Art und Weise konnte ein Datensatz mit gebundenem Glycin erhalten werden, welches eindeutig über die Elektronendichteverteilung im Kristallgitter nachweisbar war.

Das Glycin scheint jedoch kooperativ gebunden zu sein, im kristallisierten Thermotoga-Enzym ist Glycin nicht in jedem Monomer gebunden vorzufinden, sondern sicher nur in einem Monomer des Tetramers über die Elektronendichteverteilung auszumachen. In zwei weiteren Monomeren scheint es einen Zustand zwischen via Schiff'sche Base an Lysin 197 gebundenem PLP und gebundenem Glycin zu geben und im weiteren Monomer ist kein gebundenes Glycin nachweisbar.

Während die TA aus *Thermotoga maritima* als Tetramer kristallisiert, ist die LTAE jedoch als Dimer kristallisiert. Dies könnte an den unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen vor Kristallisierung der beiden Proteine liegen.

Die Strukturen von LTAE und Thermotoga TA sind sich jedoch im Großen und Ganzen sehr ähnlich, es gibt lediglich zwei kleine Unterschiede (Abb. 51 und Abb. 52). In der Thermotoga-Struktur gibt es eine zusätzliche Insertion von Aminosäuren in Form einer "Schlaufe" (Abb. 51a) und in der LTAE gibt es ein oxidiertes Cystein, das wahrscheinlich durch die Kristallisationsbedingung geschaffen wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei der Kristallisierung der Thermotoga-TA dem Kristallisationsansatz ein Reduktionsmittel hinzugegeben, um dies zu verhindern.



Abb. 51: a) Vergleich der Monomere von LTAE aus *E. coli* (türkis) und der LTA aus *Thermotoga maritima* (grau). Die in der Thermotoga-Struktur zusätzlich auftauchende Aminosäure-Schlaufe ist rot umrandet. b) Vergleich des Dimers der LTAE aus *E. coli* (türkis) mit dem Tetramer der LTA aus *Thermotoga maritima* (grau).



**Abb. 52:** Vergleich des aktiven Zentrums der *Thermotoga*-LTA (grau) und der LTAE aus *E. coli* (türkis). Glycin ist über PLP als externes Aldimin gebunden (schwarz). Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien unter den verschiedenen Aminosäuren und Wassermolekülen (x) dargestellt.

Die im Kristallisationsansatz befindlichen Ca<sup>2+</sup>-Ionen und Cl<sup>-</sup>-Ionen, die innerhalb der Struktur gebunden sind, scheinen jedoch nicht nur Kristallisationsartefakte zu sein, sondern vielmehr notwendig und somit Voraussetzung für die Kristallisierung der Threonin-Aldolasen zu sein. Diese werden fest gebunden und scheinen somit wichtig für die Stabilität der Struktur, besonders für die Stabilisierung zwischen den einzelnen Monomeren innerhalb der Struktur zu sein (da Cl<sup>-</sup>-Ionen an der Grenzfläche zischen den Monomeren anzutreffen sind).

Um dies zu bestätigen, wäre es sinnvoll die Ca<sup>2+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen aus dem Enzym zu entfernen und anschließend die Aktivität zu prüfen. Dies wäre z.B. durch Zugabe eines Komplexbildners wie EDTA möglich, jedoch ist fraglich ob die Bindung der Ionen innerhalb des Kristallgitters gelöst werden kann und das EDTA die beteiligten Aminosäuren, über die die Koordination erfolgt, als Liganden verdrängen kann.

Die LTAE aus *E. coli* ist eine *low specificity*-TA, d.h. sie ist kein hoch stereoselektives Enzym und die d.r.-Werte für die Aldolreaktion mit Phenylserin sind nur in der Größenordnung von 60:40 (*threo:erythro*). Als Vergleich wäre es von Bedeutung, ein hoch stereoselektives Enzym mit einem Diastereomerenüberschuss von mindestens 90% zu kristallisieren und die Struktur aufzuklären, um Unterschiede im aktiven Zentrum und die Spezifität für ein bestimmtes Substrat zu erklären. Hier sind besonders die neuen Enzyme aus den Bodenproben-Isolaten mit hohen d.r.-Werten von bis zu 95:5 für die *threo*-Komponente von großem Interesse, sobald hier die rekombinanten Enzyme zugänglich sind.

Die für die LTAE aus *E. coli* erhaltene Kristallstruktur ist nahezu identisch zur Kristallstruktur der LTA aus *Thermotoga maritima*. Die LTAE kristallisiert jedoch als Dimer im Vergleich dazu wurde die LTA aus *T. maritima* als Tetramer erhalten.

# 5. Zusammenfassung

Aldolasen, die die C-C-Verknüpfung von Benzaldehyd und Glycin unter Bildung von Phenylserin katalysieren, sind im Prinzip literaturbekannt, natürlicherweise handelt es sich dabei um Threonin-Aldolasen. Da bei dieser Synthese zwei neue Asymmetriezentren (in  $\alpha$ und  $\beta$ -Position) gebildet werden, werden allerdings hohe Anforderungen an die Enantio- und Diastereoselektivität dieser Enzyme gestellt. Bei Auswertung der Literaturdaten zeigt sich, dass die bislang beschriebenen Enzyme Produkte bilden, die durchweg in  $\alpha$ -Position eine hohe Enantioselektivität (> 99% *ee*) zeigen, während alle bislang bekannten Enzyme nur eine niedrige Diastereoselektivität in  $\beta$ -Position aufweisen.

Threonin-Aldolasen und verwandte Enzyme mit Threonin-Aldolase-Aktivität (z.B. die Serinhydroxymethyltransferasen SHMTs) können für die Synthese von multifunktionellen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren genutzt werden, da sie in der Lage sind, die stereoselektive C-C Knüpfung unter Entstehung zweier neuer Chiralitätszentren in einem einzelnen Schritt zu katalysieren. Diese  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren sind bedeutende chirale Bausteine für die Synthese biologisch aktiver Moleküle, die in den letzten Jahren für chemisch industrielle Prozesse, insbesondere für die Pharma-Industrie, an steigendem Interesse gewonnen haben. Jedoch gibt es einige Limitierungen der Threonin-Aldolase-Reaktion, wie die meist unzureichenden Umsätze und Ausbeuten und die geringen Diastereoselektivitäten im Vergleich zu exzellenten Enantioselektivitäten (bis zu 99% *ee*). Ziel dieser Arbeit war es, verbesserte Enzyme mit optimierter Diastereoselektivität für die Synthese der chirale  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren zu identifizieren und zu isolieren und somit den Limitierungen der konventionellen chemischen Synthese-Prozesse nachzukommen.

Zwei literaturbekannte Enzyme (aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae*) sind für dieses Projekt rekombinant verfügbar gemacht worden, da sie als Referenzenzyme für methodische Ausarbeitungen gut einsetzbar sind, beispielsweise für die Entwicklung einer Immobilisierungsmethode, für die Etablierung einer Enantio- und Distereomeren-Analytik oder die Ausarbeitung einer Hochzelldichte-Fermentation zur Gewinnung größerer Zellmassen. Ausgehend von der Threonin-Aldolase LTAE aus *E. coli* wurde eine gezielte Mutagenese durchgeführt, um optimierte Enzyme mit verbesserter Diastereoselektivität zu erhalten. Eine Mutante zeigte eine verbesserte Diastereoselektivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym und eine sehr hohe Aktivität für die Spaltung von Threonin in der RetroAldolreaktion. Außerdem wurde die LTAE im Rahmen dieser Arbeit kristallisiert und die Struktur des Enzyms (sowohl Apo-Enzym als auch Enzym mit Substrat Glycin) aufgeklärt.

Mittels verschiedener Screeningansätze sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Threonin-Aldolasen mit optimierter Diastereoselektivität für die Synthese eines relevanten Intermediates der Thiamphenicol-Synthese, einer  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäure, zugänglich gemacht werden. Ziel war es hierbei, hoch *threo*-spezifische Enzyme zu identifizieren, da nur die *threo*-Verbindung als chirales Intermediat für Folgesynthesen von großer Bedeutung ist. Hierbei wurde zum einen definierte Stammsammlungen nach neuen, vielversprechenden Enzymen durchsucht, zum anderen wurden verschiedene Bodenproben mit der zu verwertenden Kohlenstoff-Quelle (Phenylserin, einer  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäure) angereichert und auf Threonin-Aldolase-Aktivität getestet. Außerdem wurde ein "*in Silico*"-Screening auf Basis der beiden bekannten Threonin-Aldolase-Sequenzen (*E. coli* und *S. cerevisiae* TA) durchgeführt.

Der Zugang zu den neuen Enzymen sollte durch eine selektionsbasiertes Screening mithilfe eines speziellen Selektions-Systems in *Pseudomonas putida* KT2440 gewährleistet werden. Dieser Stamm ist in der Lage auf Benzaldehyd, dem Spaltprodukt der Threonin-Aldolase-Reaktion ausgehend von Phenylserin als Substrat, zu wachsen, indem er dieses im Mandelat-Abbauweg verstoffwechselt. Jedoch verfügt der Stamm auch über eine eigene, aktive Threonin-Aldolase (PpTA), die ebenfalls näher untersucht wurde, und kann nur nach Deletion dieses Gens als Selektions-Stamm für die Identifizierung neuer Aldolase-Gene genutzt werden. Die Konstruktion dieser Deletionsmutante des Selektions-Stammes konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

Die verschiedenen Screening-Ansätze erwiesen sich als erfolgreich. Es konnten neue Enzyme mit deutlich verbesserten d.r.-Werten in der Aldolreaktion für die β-Hydroxy-α-aminosäure Phenylserin gefunden werden. Enzyme mit sehr guten Diastereoselektivitäten für die *threo*-Verbindung als Produkt wurden in in Bodenproben-Stämmen, durch Anreicherung dieser Organismen mit Phenylserin, gefunden. Diese lieferten im Vergleich zu den bisher in der Literatur beschriebenen Enzymen signifikant verbesserte Resultate für die enzymatische Aldolreaktion. Das "*in Silico*-Screening" lieferte 5 neue rekombinante Enzyme mit *threo*-Spezifität, wobei hier die Umsätze für die enzymatische Aldreaktion sehr hoch waren.

Die Etablierung des Selektions-Systmes in *P. putida* durch Deletion des Stamm-eigenen TA-Gens würde einen Zugang zu diesen neuen Threonin-Aldolase-Genen liefern.

# 6. Summary

Aldolases, that catalyze the carbon-carbon bond coupling of benzaldehyde and glycine under the formation of phenylserine, are in principle known from literature, naturally, they are threonine aldolases. As two new asymmetric centres (in  $\alpha$ - and  $\beta$ -position) in this synthesis will be formed, heavy demands are made on the enantio- and diastereoselectivity of these enzymes. From literature data is known, that the previously described enzymes form products that consistently show a high enantioselectivities in  $\alpha$  -position, while only poor diastereoselectivities in  $\beta$ -position are described.

Threonine aldolases and related enzymes with threonine aldolase activity (for example the serinehydroxymethyltransferases SHMTs) can be used for the synthesis of multifunctional  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminoacids, because of their ability to catalyze the stereospezific C-C bond coupling under formation of two new chiral centres in one single step. These  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminoacids are important chiral building blocks for the synthesis of biologically active molecules, which have become an emerging tool for the industrial production of chemicals, in particular for fine chemicals and drug production. But there are still some limitations in the threonine aldolase reaction, like the poor conversions, yields and low diastereoselectivities in comparison to excellent enantioselectivities. The aim of this work was to identify and isolate enzymes, with optimized diastereoselectivity for the synthesis of chiral  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminoacids and therefore to overcome the limitations of conventional chemical synthesis.

Two of those enzymes (from *E. coli* and *S. cerevisiae*) were made recombinantly available for this project, because they are well used as reference enzymes for the methodological elaborations, such as the development of an immobilization method, for the establishment of enantio- and diastereomeric analytics or the development of a high-cell-density fermentation for production of larger cell masses.

Based on the threonine aldolase from *E. coli*, LTAE, a targeted mutagenesis in position 87 of the enzyme was performed to obtain optimized enzymes with improved diastereoselectivity. One mutant (by exchange of aminoacid phenylalanine87 against tryptophan) shows an improved diastereoselectivity and a very high activity for the cleavage of threonine as substrate in the aldolreaction. In addition, the LTAE protein was analyzed by X-ray crystallization and the structure of the enzyme could be solved.

By the use of various screening-approaches, new threonine aldolases with improved diastereoselectivity for the synthesis of a  $\beta$  -hydroxy- $\alpha$ -aminoacid, an intermediate in synthesis of the antiobiotic thiamphenicole, should be made available.

The aim was to identify highly *threo*-specific enzymes, because only the threo-compound, as a chiral intermediate for subsequent synthesis, is of great importance.

On the one hand defined strain collections were screened for new promising enzymes, on the other hand several soil smaples with their hugh diversitiy of microorganisms were enriched with the desired carbon source (phenylserin as  $\beta$  -hydroxy- $\alpha$ -aminoacid) and tested for threonine aldolase activity. In addition an *in silico*- screening based on the two known threonine aldolase sequences from *E. coli* and *S. cerevisiae* was performed.

An access to the new aldolase-genes should be given by a selection based screening system using a special selection strain *P. putida* KT2440. This strain is able to grow on benzaldehyde, the cleavage product of the threonine aldolase reaction from phenylserin, by its metabolisation in the mandelic degradation pathway. However, this strain also has its own active threonine aldolase (PpTA), which has been analyzed in detail, and can only be used as selection strain for the identification of new aldolase-genes after deletion of that gene.

So far the construction of this deletion mutant in *P. putida* KT2440 could not be established in this work.

However, the different screening methods were succesful. New enzymes with significantly improved d.r.-values in the aldol reaction of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminoacid could be found. Enzymes with very good diastereoselectivities for the threo-compound as product were found in strains isolated from soil samples by the enrichment of these organisms with phenylserine as carbon source. In comparison to the previously in literature described enzymes they show significantly improved results for the enzymatic aldol reaction.

The *in silico*-screening resulted in five new recombinant enzymes with low *threo*-preference, but excellent conversions up to 90%. These are very high values, since the poor conversions are often a limitation in the enzymatic aldolreaction.

The establishment of the selection systeme in *P. puti*da by deletion of the active aldolase of this strain, would provide an access to the new aldolase-genes.

## 7. Literatur

- [1] H. Ruttloff, *Behr's Verlag Hamburg* **1994**.
- [2] R. Ulber, K. Soyez, *Chemie in unserer Zeit* **2004**, *38*, 172-180.
- [3] H. R. Maurer, Cellular and Molecular Life Sciences 2001, 58, 1234-1245.
- [4] L. Pasteur, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris) 1858, 46, 615-618.
- [5] H. Gutfreund, *FEBS Letters: Enzymes: One Hundred Years (Gutfreund, H., ed)* **1976**, 62, 1-23.
- [6] J. Sukumaran, U. Hanefeld, *Chemical Society Reviews* **2005**, *34*, 530-542.
- [7] K. Faber, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York 2000, 4. Auflage.
- [8] B. Osterath, N. Rao, S. Lütz, A. Liese, *Chemie in unserer Zeit* 2007, 41, 324-333.
- C. n. Jiménez-González, P. Poechlauer, Q. B. Broxterman, B.-S. Yang, D. am Ende, J. Baird, C. Bertsch, R. E. Hannah, P. Dell'Orco, H. Noorman, S. Yee, R. Reintjens, A. Wells, V. Massonneau, J. Manley, *Organic Process Research & Development* 2011, 15, 900-911.
- [10] V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2006, 40, 111-120.
- [11] M. Braun, Teichert, O., Zweck, A. <u>http://www.vdi.de/fileadmin/vdi\_de/redakteur\_dateien/kfbt\_dateien/Biokatalyse-</u> <u>UEbersichtsstudie.pdf</u> (19.04.2011) **2006**.
- [12] B. Marrs, S. Delagrave, D. Murphy, *Current Opinion in Microbiology* **1999**, *2*, 241-245.
- [13] J. D. Rozzell, Bioorganic & Medicinal Chemistry 1999, 7, 2253-2261.
- [14] R. Patel, R. Hanson, A. Goswami, V. Nanduri, A. Banerjee, M.-J. Donovan, S. Goldberg, R. Johnston, D. Brzozowski, T. Tully, J. Howell, D. Cazzulino, R. Ko, *Journal of Industrial Microbiology & Camp; Biotechnology* 2003, 30, 252-259.
- [15] R. Patel, *Current Organic Chemistry* **2006**, *10*, 1289-1321.
- [16] M. Vellard, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 444-450.
- [17] R. Patel, Coordination Chemistry Reviews 2008, 252, 659-701.
- [18] M. Edin, J.-E. Bäckvall, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 2216-2222.
- [19] C. E. Nakamura, G. M. Whited, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 454-459.
- [20] D. Steverding, Chemie in unserer Zeit, 44, 384-389.
- [21] W. L. Tang, H. Zhao, Biotechnology Journal 2009, 4, 1725-1739.
- [22] M. Breuer, B. Hauer, Current Opinion in Biotechnology 2003, 14, 570-576.
- [23] M. T. Reetz, Angewandte Chemie 2011, 123, 144-182.
- [24] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* 2001, 409, 258-268.
- [25] T. D. Machajewski, C.-H. Wong, Angewandte Chemie 2000, 112, 1406-1430.
- [26] C. Wurtz, Bull Soc Chim Fr 1872, Ausgabe 17, 436.
- [27] A. P. T. Laue, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden 2006, 5. Auflage.
- [28] T. Mukaiyama, Banno, K., Narasaka, K. , *J. Am. Chem. Soc.* **1974** *96*, 7503-7509.
- [29] G. A. Sprenger, U. SchĶrken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, 94, 12857-12862.
- [30] M. Schürmann, M. Schürmann, G. A. Sprenger, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *19-20*, 247-252.
- [31] P. D. de María, T. Stillger, M. Pohl, M. Kiesel, A. Liese, H. Gröger, H. Trauthwein, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2008**, *350*, 165-173.

- [32] T. Purkarthofer, W. Skranc, C. Schuster, H. Griengl, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *76*, 309-320.
- [33] H. J. M. Gijsen, L. Qiao, W. Fitz, C.-H. Wong, *Chemical Reviews* 1996, 96, 443-474.
- [34] A. Samland, G. Sprenger, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *71*, 253-264.
- [35] S. M. Dean, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *ChemInform* 2007, 38, no-no.
- [36] H. Kumagai, H. Yoshida, H. Yamada, T. Nagate, *Biochim. Biophys. Acta* 1972, 258, 779-&.
- [37] K. Fesko, L. Giger, D. Hilvert, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 5987-5990.
- [38] T. Kimura, V. P. Vassilev, G. J. Shen, C. H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 11734-11742.
- [39] J. Q. Liu, M. Odani, T. Yasuoka, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 44-51.
- [40] R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, *Microbiol. Rev.* 1995, 59, 143-169.
- [41] J. Steinreiber, M. Schuermann, F. van Assema, M. Wolberg, K. Fesko, C. Reisinger, D. Mink, H. Griengl, *Advanced Synthesis & Catalysis* 2007, 349, 1379-1386.
- [42] N. Dückers, K. Baer, S. Simon, H. Gröger, W. Hummel, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *88*, 409-424.
- [43] J. Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2000**, *10*, 107-115.
- [44] K. Fesko, C. Reisinger, J. Steinreiber, H. Weber, M. Schürmann, H. Griengl, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2008**, *52-53*, 19-26.
- [45] Riariosf.G, R. Pagani, Marinell.E, *Eur. J. Biochem.* 1969, *8*, 88-&.
- [46] A. Samach, D. Hareven, T. Gutfinger, S. Ken-Dror, E. Lifschitz, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 2678-2682.
- [47] R. A. Dale, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 1978, 544, 496-503.
- [48] A. Edgar, *BMC Genetics* **2002**, *3*, 18.
- [49] L. Vidal, J. Calveras, P. Clapes, P. Ferrer, G. Caminal, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 68, 489-497.
- [50] R. Contestabile, A. Paiardini, S. Pascarella, M. L. di Salvo, S. D'Aguanno, F. Bossa, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6508-6525.
- [51] S. Makart, M. Bechtold, S. Panke, *Journal of Biotechnology* 2007, *130*, 402-410.
- [52] H. Misono, H. Maeda, K. Tuda, S. Ueshima, N. Miyazaki, S. Nagata, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4602-4609.
- [53] J. Q. Liu, T. Dairi, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Journal of Bacteriology* 1997, *179*, 3555-3560.
- [54] C. L. Kielkopf, S. K. Burley, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11711-11720.
- [55] V. P. Vassilev, T. Uchiyama, T. Kajimoto, C. H. Wong, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 4081-4084.
- [56] H. Yamada, H. Kumagai, T. Nagate, H. Yoshida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, 39, 53-&.
- [57] L. V. Schirch, T. Gross, Journal of Biological Chemistry 1968, 243, 5651-5655.
- [58] F. P. Seebeck, D. Hilvert, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 10158-10159.
- [59] D. M. E. Szebenyi, F. N. Musayev, M. L. di Salvo, M. K. Safo, V. Schirch, *Biochemistry* **2004**, *43*, 6865-6876.
- [60] V. R. Pai, V. Rajaram, S. Bisht, B. S. Bhavani, N. A. Rao, M. R. N. Murthy, H. S. Savithri, *Biochem J* **2009**, *418*, 635-642.

- [61] L. Schirch, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1983, 53, 83-112.
- [62] H. Ogawa, T. Gomi, M. Fujioka, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2000**, *32*, 289-301.
- [63] H. Ogawa, M. Fujioka, *Journal of Biochemistry* **1981**, *90*, 381-390.
- [64] A. Chaves, M. Fernandez, A. L. S. Lerayer, I. Mierau, M. Kleerebezem, J. Hugenholtz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5656-5662.
- [65] D. Crich, A. Banerjee, *The Journal of Organic Chemistry* 2006, *71*, 7106-7109.
- [66] X. Chen, Y. Zhu, Z. Qiao, M. Xie, L. Lin, X. Liu, X. Feng, *Chemistry A European Journal* **2010**, *16*, 10124-10129.
- [67] Q. Li, S.-B. Yang, Z. Zhang, L. Li, P.-F. Xu, *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, 1627-1631.
- [68] B. Christensen, J. Nielsen, *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *68*, 652-659.
- [69] M. Alonso, A. Riera, *Tetrahedron-Asymmetry* **2005**, *16*, 3908-3912.
- [70] C. G. L. Coppi, A. Longoni, S. Panossian, Wiley, Chichester 1997, 2. Auflage, 353-362.
- [71] S. H. Baik, H. Yoshioka, H. Yukawa, S. Harayama, *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**, *17*, 721-727.
- [72] J. Q. Liu, M. Odani, T. Dairi, N. Itoh, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 586-591.
- [73] K. Fesko, M. Uhl, J. Steinreiber, K. Gruber, H. Griengl, Angewandte Chemie International Edition 2010, 49, 121-124.
- [74] J. Q. Liu, S. Ito, T. Dairi, N. Itoh, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 702-708.
- [75] J. Ogawa, S. Shimizu, *Trends in Biotechnology* **1999**, *17*, 13-20.
- [76] D. A. Cowan, *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 14-16.
- [77] V. Torsvik, L. Ã<sup>\*</sup>vreÃ¥s, T. F. Thingstad, *Science* **2002**, *296*, 1064-1066.
- [78] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Current Opinion in Chemical Biology* 2001, *5*, 137-143.
- [79] M. T. Reetz, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 5716-5722.
- [80] K. E. Jaeger, T. Eggert, A. Eipper, M. T. Reetz, *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, 55, 519-530.
- [81] Y. L. Boersma, M. J. Dröge, W. J. Quax, FEBS Journal 2007, 274, 2181-2195.
- [82] F. H. Arnold, Nature 2001, 409, 253-257.
- [83] J. Handelsman, M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, R. M. Goodman, *Chemistry & Biology* **1998**, *5*, R245-R249.
- [84] G. Antranikian, G. Meurer, P. Lorenz, in *Angewandte Mikrobiologie*, Springer Berlin Heidelberg, **2006**, pp. 189-206.
- [85] W. R. Streit, R. A. Schmitz, Current Opinion in Microbiology 2004, 7, 492-498.
- [86] H. Shizuya, B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, M. Simon, Proceedings of the National Academy of Sciences 1992, 89, 8794-8797.
- [87] M. Breuer, R. Stürmer, *Chemie in unserer Zeit* **2006**, *40*, 104-111.
- [88] G. J. Olsen, D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, D. A. Stahl, Annual Review of Microbiology 1986, 40, 337-365.
- [89] D. J. Lane, B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, N. R. Pace, Proceedings of the National Academy of Sciences 1985, 82, 6955-6959.
- [90] T. M. Schmidt, E. F. DeLong, N. R. Pace, J. Bacteriol. 1991, 173, 4371-4378.
- [91] J. Handelsman, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004, 68, 669-685.
- [92] D. Hanahan, Journal of Molecular Biology 1983, 166, 557-580.
- [93] F. W. Studier, B. A. Moffatt, Journal of Molecular Biology 1986, 189, 113-130.
- [94] F. W. Studier, *Journal of Molecular Biology* **1991**, *219*, 37-44.

- [95] R. Simon, U. Priefer, A. Puhler, Nat Biotech 1983, 1, 784-791.
- [96] K. E. Nelson, C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. C. Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Düsterhöft, B. Tümmler, C. M. Fraser, *Environmental Microbiology* 2002, *4*, 799-808.
- [97] a) P. R. Kovach ME, Elzer PH, Roop RM 2nd, Peterson KM, *Biotechniques* 1994, *Vol. 16*, 800-802; b) M. E. Kovach, P. H. Elzer, D. Steven Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, K. M. Peterson, *Gene* 1995, *166*, 175-176.
- [98] M. F. Alexeyev, I. N. Shokolenko, T. P. Croughan, Gene 1995, 160, 63-67.
- [99] M. D. Kane, Poulsen, L.K. and Stahl, D.A., *Appl Environ Microbiol* **1993**, *59*, 682-686.
- [100] J. Brosius, Dull, T.J., Sleeter, D.D. and Noller, H.F., J Mol Biol 1981, 148, 107-127.
- [101] J. Sambrook, Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989, Vol. 3.
- [102] R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, H. Erlich, Science 1988, 239, 487-491.
- [103] K.-H. Choi, H. Schweizer, *BMC Microbiology* 2005, 5, 30.
- [104] R. Simon, M. O'Connell, M. Labes, A. Pühler, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 118* (Ed.: H. W. Arthur Weissbach), Academic Press, **1986**, pp. 640-659.
- [105] J. Porath, J. A. N. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* 1975, 258, 598-599.
- [106] J. Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 255, 220-226.
- [107] H. Muramatsu, Y. Suzuki, T. Imai, S. Ueshima, J. Ozaki, Y. Matsui, S.-i. Kato, K. Ohnishi, N. Kimoto, H. Yamamoto, S. Nagata, *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, 90, 159-172.

# 8. Anhang

### 6.1 Plasmidkarten







### 6.2 Sequenzen

### LTAE aus E. coli (1002bp)

ATGATTGATTTACGCAGTGATACCGTTACCCGACCAAGCCGCGCCATGCTCGAAGCGATGATGGCCGCCCCGGTT GGGGACGACGTTTACGGAGACGACCCTACCGTTAATGCTCTGCAGGACTACGCAGCAGAGCTTTCCGGTAAAGAA GCCGCCATTTTTCTGCCTACCGGCACTCAGGCCAACCTGGTCGCTCTGCTCAGTCACTGCGAACGCGGCGAAGAG TATATTGTCGGTCAGGCCGCGCATAACTATCTGTTTGAAGCCGGTGGCGGCGGTGCTGGGCAGTATTCAACCG CAACCCATAGACGCGGCTGCCGACGGCACGCTACCGCTGGATAAAGTGGCGATGAAAATCAAACCCGACGATATC CATTTCGCCCGCACCAAATTACTCAGTCTGGAAAACACCCCACAACGGCAAAGTGTTGCCGCGGGGAATACCTGAAA GAAGCATGGGAATTTACCCGCGAGCGCAATCTGGCGCTGCATGTTGACGGTGCGCGCATCTTTAATGCCGTGGG GCTTACGGCTGCGAACTGAAAGAGATCACGCAATATTGTGATTCGTTCACCATTTGCCTGTCGAAAGGTCTTGGG ACGCCAGTCGGTTCATTACTCGTCGGTAATCGTGATTACATTAAACGTGCCATTCGCTGGCGGAAAATGACAGGT GGCGGGATGCGCCAGTCCGGCATTCTGGCTGCCGCGGGATATATGCCCTGAAAAATAACGTTGCGCGCGTTGCAG GAAGACCACGACAACGCTGCCTGGATGGCGGAGCAGCTGCGTGAAGCAGGCGCGGATGTGATGCGTCAGGACACC AATATGCTGTTTGTTCGCGTCGGGGAAGAAAATGCTGCCGCGGTTAGGCGAAAACGAGGGGGAAGAACGTGCTG ATTAACGCCTCGCCGATTGTCCGCCTGGTGAACGCACTCTGGCGGAACAACTGGCGGAAAACGTGCC CACTGGCGT**G**CATTCCTGGCGCGTTAA

midlrsdtvtrpsramleammaapvgddvygddptvnalqdyaaelsgkeaaiflptgtqanlvallshcergee yivgqaahnylfeaggaavlgsiqpqpidaaadgtlpldkvamkikpddihfartkllslenthngkvlpreylk eaweftrernlalhvdgarifnavvaygcelkeitqycdsfticlskglgtpvgsllvgnrdyikrairwrkmtg ggmrqsgilaaagiyalknnvarlqedhdnaawmaeqlreagadvmrqdtnmlfvrvgeenaaalgeymkarnvl inaspivrlvthldvsreqlaevaahwraflar

### LTA aus Saccharomyces cerevisiae (gly1) (1164bp)

ATGACTGAATTCGAATTGCCTCCAAAATATATCACCGCTGCTAACGACTTGCGGTCAGACACATTCACCACTCCA ACTGCAGAGATGATGGAGGCCGCTTTAGAGGCCTCTATCGGTGACGCTGTCTACGGTGAAGATGTTGACACCGTT AGGCTCGAACAGACCGTTGCCCGCATGGCTGGCAAAGAAGCAGGTTTGTTCTGTGTCTCTGGGACTTTGTCCAAC  ${\tt CAGATTGCCATCAGAACTCACTTGATGCAACCTCCATACTCTATTGTGATTACAGGGCTCACGTTTACACT}$ CTGGAAAACACTTTACACGGTATTGTTTATCCATTGGAAGAACTGGTCCGCATCAAAGCTTGGTGTATGGAAAAT GGTCTCAAACTACATTGTGACGGTGCCAGAATCTGGAATGCCGCTGCACAATCTGGCGTGCCATTAAAGCAATAT AACCTTAAGTTTGTCAAGAAGGCCACCCATTTCAGAAAACAACAAGGTGGTGGTATTAGACAATCTGGTATGATG GCTAGAATGGCTCTTGTAAACATCAACAACGATTGGAAGTCCCAATTGCTGTACTCGCACTCTTTGGCTCATGAA TTAGCCGAATATTGTGAGGCAAAGGGCATCCCGCTAGAGTCTCCAGCAGACACCAACTTTGTCTTTATTAACCTG AAGGCCGCTAGAATGGACCCAGATGTCCTTGTTAAGAAGGGTTTGAAGTACAACGTTAAGCTAATGGGTGGTAGA GTCTCGTTCCACTATCAAGTCACCAGAGATACTTTGGAAAAAGTCAAATTGGCCATCTCCGAGGCCTTCGACTAT GCTAAAGAACATCCTTTCGACTGTAACGGACCTACCCAGATTTACCGTAGTGAATCCACCGAGGTCGACGTTGAT GGCAACGCTATCCGCGAAATAAAAACCTACAAATACTGA

mtefelppkyitaandlrsdtfttptaemmeaaleasigdavygedvdtvrleqtvarmagkeaglfcvsgtlsn qiairthlmqppysilcdyrahvytheaaglailsqamvvpvvpsngdyltledikshyvpddgdihgaptrlis lentlhgivypleelvrikawcmenglklhcdgariwnaaaqsgvplkqygeifdsisiclsksmgapigsvlvg nlkfvkkathfrkqqgggirqsgmmarmalvninndwksqllyshslahelaeyceakgiplespadtnfvfink aarmdpdvlvkkglkynvklmggrvsfhyqvtrdtlekvklaiseafdyakehpfdcngptqiyrsestevdvdg naireiktyky

### PpTA aus Pseudomonas putida KT2440 (ppTA) (1041)

mtdksqqfasdnysgicpeawvamekanrghdraygddqwteraseyfrnlfetdcevffafngtaanslalasl cqsyhsvicsetahvetdecgapeffsngsklltaasvngkltpqsirevalkrqdihypkprvvtitqatevgt vyrpdelkaisatckelglnlhmdgarftnacaflgcspaeltwkagvdvlcfggtkngmavgeailffnrqlae dfdyrckqagqlaskmrflsapwvglledgawlrhgnhanhcaqllaslvsdlpgvelmfpveangvflqmpeha iealrgkgwrfytfigsggarfmcswdteearvrelaadirtiigg