

Fluoreszenzreporterproteine als Werkzeuge in der Biotechnologie

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Kathrin Emmi Scholz
aus Hagen (NRW)

Aachen, Juni 2012

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET)
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

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

Referent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Korreferentin: Frau Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2012

Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich im Rahmen des Graduiertenkollegs *Biocatalysis in non-conventional Media* (BioNoCo) der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen. Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, mich nicht nur bei den Menschen zu bedanken, die direkt zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben, sondern auch bei vielen anderen, durch die dieser Lebensabschnitt für mich zu etwas besonderem wurde. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei:

- Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger (Institut für Molekulare Enzymtechnologie in Jülich) für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation, für das große Vertrauen und die Freiheit die er mir entgegengebracht hat.
- Frau Prof. Dr. Martina Pohl (Institut für Bio- und Geowissenschaften in Jülich) für die freundliche Übernahme des Korreferats, ihr reges Interesse an meiner Arbeit und ihre zahlreichen Einfälle und Anregungen.
- Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Ulrich Krauss (Institut für Molekulare Enzymtechnologie in Jülich) für die Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit in großer Freiheit und herzlicher Atmosphäre zu arbeiten. Insbesondere möchte ich mich für die zahlreichen und interessanten Diskussionen bedanken.
- dem DFG-Graduiertenkolleg BioNoCo für die Finanzierung meiner Promotionsstelle im Rahmen des mir zuerkannten Stipendiums und allen Mitstipendiaten für die zahlreichen, interessanten und lehrreichen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Veranstaltungen und Kooperationen.
- Dr. Dietrich Kohlheyer und Alexander Grünberger (Institut für Bio- und Geowissenschaften in Jülich) für die Hilfsbereitschaft beim Mikroskopieren.
- Daniel Okrob (Institut für Bio- und Geowissenschaften in Jülich) für die gelungene Kooperation.
- Benita Kopka für ihren unermüdlichen 'Biss' bei ihrer Masterarbeit im Rahmen dieser Promotion und für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts. Ihr wünsche ich viel Erfolg bei der Fertigstellung ihrer Promotion.
- Dr. Wouter D. Hoff und Dr. Masato Kumauchi (Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, USA) für die freundliche und stets kooperative Zusammenarbeit.

-
- allen Kollegen der AG Molekulare Biophotonik und Tina Gerhards für ihre Hilfsbereitschaft, besonders während meiner Anfangszeit in Jülich.
 - den Studierenden, die mich mit ihren fleißigen, praktischen Arbeiten unterstützt haben.
 - den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie für die Kooperation, Hilfsbereitschaft, fruchtbaren Diskussionen und die angenehme Zeit.
 - meiner Liebe Marco dafür, dass er immer für mich da ist und mich in dieser speziellen Zeit ge- und ertragen hat.
 - meiner Mutter Sylvia und meinem Bruder Christopher für ihre fortwährende Unterstützung, Aufmunterung und Geduld.
 - meiner Familie und meinen Freunden, in der Hoffnung, sie würden auch ohne spezielle Nennung wissen, wie viel sie mir bedeuten.

Summary

Recently, the use of non-conventional reaction media such as organic solvents, ionic liquids and supercritical fluids, has become an industrially attractive alternative to conventional biotransformation carried out in aqueous media. However, due to their physicochemical properties, these reaction media are highly demanding for the employed biocatalyst. Their use often leads to rapid inactivation of the enzyme in the reaction system, resulting in sub-optimal yields and/or poor optical purity of the desired product. Therefore, it is of particular interest to understand the molecular basis for the loss of enzymatic activity. Here, translational fusion proteins consisting of a fluorescent reporter protein (FRP) and the respective enzyme, could be used as a non-invasive tool to track the fate of the enzyme in the reaction system. In this way, the respective fluorescent fusion enzyme can be traced, during biocatalysis, by using microscopic and spectroscopic methods. To investigate the suitability of various FRPs for the use as a translational fusion partner, fusion proteins consisting of different FRPs and various complex enzyme systems were generated. Hereby, in all cases, the well studied yellow fluorescent protein (YFP) was used as a reference fusion partner. Similarly, a less well studied flavin-based fluorescent protein (FbFP) and a protein of the photoactive yellow protein (PYP) family were tested for their suitability as fusion-FRP. As target enzymes, the monomeric lipase A from *Bacillus subtilis* (*BsLA*), the dimeric hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) and the tetrameric cofactor-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (*PfBAL*) were used. Hereby, the target enzymes were selected based on their structural complexity (quaternary structure, cofactor-dependence) to verify wide applicability of the employed FRPs. Moreover, for all selected target enzymes, the use of non-conventional reaction media can broaden their biocatalytic scope.

In the presented study, the suitability of FbFPs as a fluorescent fusion partner was demonstrated. The FbFP based on the light, oxygen, voltage (LOV) domain of the *B. subtilis* YtvA photoreceptor could, in most cases, be fused N- and C-terminally to the above mentioned enzymes, without loss of FbFP fluorescence and target enzymatic activity. Additionally, a fusion protein consisting of the *H. halophila* PYP and the *AtHNL* was generated. The resulting purified apo-protein was reconstituted with a strongly fluorescent *p*-Hydroxy-cinnamic acid analogue. The resulting fluorescent fusion protein was used as a reference construct for investigation of the FRP-*AtHNL* fusion system.

The fusion system consisting of various FRPs and the *AtHNL* was subsequently characterized in

more detail. Surprisingly, both FbFP-*AtHNL* fusion proteins showed a strong increase in enzymatic activity and stability in the weakly acidic pH range ($\text{pH} < 4.75$) compared to the wild-type *AtHNL*. The wild-type *AtHNL*, the YFP-*AtHNL* and the PYP-*AtHNL* fusion-proteins are unstable at those pH values. While HPLC-based size exclusion chromatographic studies showed that the three latter constructs are predominantly dimeric, the most stable fusion protein (cFbFP-*AtHNL*) exists largely in tetrameric form. Thus, the FbFP-induced change in quaternary structure could be a reason for the improved stability of the FbFP-*AtHNL* fusion proteins. The pH-stability of cFbFP-*AtHNL* enabled efficient synthesis of (*R*)-mandelonitrile in an aqueous-organic two-phase system. In contrast, at pH values below pH 5, the wild-type *AtHNL* is not stable and hence can not be used.

Finally, the FbFP-*AtHNL* fusion system was used to investigate a biotechnologically relevant non-conventional reaction system. Recombinant *AtHNL* and FbFP-*AtHNL* expressing *E. coli*-BL21(DE3)-cells were used as biocatalyst for the synthesis of various chiral cyanohydrins in microaqueous monophasic methyl *tert*-butyl ether (MTBE). By using lyophilized (dry) cells, most products could be obtained in high enantiomeric purity. Furthermore, fluorescence microscopy revealed cell shrinkage by about 20 % during three consecutive reaction cycles in MTBE. At the same time, fluorimetric studies using whole cells indicated that cellular- and fusion protein integrity was essentially retained during incubation in the reaction system.

Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die Verwendung von unkonventionellen Reaktionsmedien, wie organischen Lösungsmitteln, ionischen Flüssigkeiten oder superkritischen Fluiden, verstärkt Einzug in die Biokatalyse gehalten. Diese Reaktionsmedien stellen jedoch aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften hohe Anforderungen an den verwendeten Biokatalysator. Häufig kommt es hierbei zu einer raschen Inaktivierung des Enzyms im Reaktionssystem, was zu suboptimalen Ausbeuten und/oder einer schlechten Enantiomerenreinheit des Produkts führt. Daher ist es von besonderem Interesse, die molekularen Ursachen für die Inaktivierung des Enzyms zu kennen. Als nicht-invasives Hilfsmittel bietet sich hierbei der Einsatz von Fusionsproteinen, bestehend aus einem Fluoreszenzreporterprotein (FRP) und dem zu untersuchenden Enzym an. So kann das erzeugte fluoreszente Fusionsenzym vor, während und nach der Biokatalyse im Reaktionssystem mittels mikroskopischer- und spektroskopischer Methoden beobachtet und untersucht werden. Um die Eignung verschiedener FRPs für den Einsatz als translationeller Fusionspartner zu untersuchen, wurden Fusionsproteine, bestehend aus verschiedenen FRPs und unterschiedlich komplexen Enzymen, erzeugt. Als bereits gut untersuchtes FRP wurde das gelb fluoreszente Protein (YFP) als Referenz-Fusionspartner verwendet. Weniger gut untersuchte FRPs, wie ein Flavin-basiertes, fluoreszentes Protein (FbFP), sowie ein Protein der *photoactive yellow protein* (PYP)-Familie wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Fusions-FRP evaluiert. Als Zielenzyme wurden verschieden komplexe Enzyme, wie die monomere Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BsLA), die dimere Hydroxynitril Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) und die tetramere Kofaktor-abhängige Benzaldehyd Lyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (PfBAL) verwendet. Die Zielenzyme wurden hinsichtlich unterschiedlicher Komplexität (Quartärstruktur, Kofaktorabhängigkeit) ausgewählt, um eine möglichst breite Anwendbarkeit des FRPs zu verifizieren. Außerdem eröffnet der Einsatz unkonventioneller Reaktionsmedien für alle ausgewählten Enzym-Systeme neue biokatalytische Möglichkeiten.

Insbesondere für FbFPs konnte die Eignung als fluoreszenter Fusionspartner nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft wurde bisher nur unzureichend untersucht. Das hier verwendete FbFP, basierend auf der *light, oxygen, voltage* (LOV)-Domäne des *B. subtilis* YtvA-Photorezeptors, konnte in den meisten Fällen sowohl N- als auch C-terminal, ohne Verlust von FbFP-Fluoreszenz und enzymatischer Zielenzym-Aktivität mit dem jeweilige Zielenzym fusioniert werden. Zusätzlich konnte ein Fusionsprotein bestehend aus dem *H. halophila* PYP und der AtHNL erzeugt und *in vitro* mit einem

stark fluoreszenten *p*-Hydroxymizsäure-Analogen beladen werden. Das entsprechende Fusionsprotein wurde als Referenzkonstrukt zur Untersuchung des FRP-*AtHNL*-Fusionssystems eingesetzt. Das Fusionssystem bestehend aus den verschiedenen FRPs und der *AtHNL* wurde zudem eingehender charakterisiert. Beide FbFP-*AtHNL*-Fusionen besaßen überraschenderweise im schwach sauren pH-Bereich (< pH 4,75) eine im Vergleich zur wildtypischen *AtHNL* stark erhöhte Aktivität und Stabilität. Die wildtypische *AtHNL*, sowie die YFP-*AtHNL*- und die PYP-*AtHNL*-Fusionen sind in diesem pH-Bereich instabil. Mittels HPLC-basierter Größenausschlusschromatographie konnte nachgewiesen werden, dass die wildtypische *AtHNL*, das YFP-*AtHNL*-, sowie das PYP-*AtHNL*-Fusionsprotein vorwiegend als Dimer vorliegen. Im Gegensatz dazu ist die stabilste Fusion cFbFP-*AtHNL* ein Tetramer. Die veränderte Quartärstruktur könnte somit eine Ursache für die erhöhte Stabilität der FbFP-Fusionsproteine sein. Die pH-Stabilität der FbFP-Fusionen erlaubte zudem die Synthese von (*R*)-Mandelonitril in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem. Aufgrund der geringen Stabilität der *AtHNL* bei pH-Werten unter pH 5, kann die wildtypische *AtHNL* unter diesen Bedingungen nicht eingesetzt werden.

Abschließend wurde eine FbFP-*AtHNL*-Fusion zur Untersuchung eines biotechnologisch relevanten, unkonventionellen Reaktionssystems herangezogen. Hierfür wurden rekombinante *AtHNL* und FbFP-*AtHNL* produzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen als Biokatalysator in mikro-wässrigem, monophasischem Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) zur Synthese verschiedener chiraler Cyanhydrine eingesetzt. Unter Verwendung lyophilisierter (trockener) Zellen konnten die meisten Produkte in hoher Enantiomerenreinheit erhalten werden. Ferner konnte mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen- und spektroskopischen Methoden, welche durch Verwendung des FbFP-*AtHNL*-Fusionsproteins erst möglich wurden, gezeigt werden, dass die Zellen im Verlauf der Inkubation in MTBE um ca. 20 % schrumpften. Sowohl die zelluläre- als auch die Fusionsprotein-Integrität bleibt jedoch bei Inkubation in nahezu wasserfreien MTBE erhalten.

Publikationen

Publikationen in Fachjournalen

K. E. Scholz, D. Okrob, B. Kopka, A. Grünberger, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2012). **Synthesis of chiral cyanohydrins with recombinant *E. coli* cells in a micro-aqueous reaction system.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (14), 5025-5027

K. E. Scholz, B. Kopka, A. Wirtz, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2013). **Fusion of a flavin-based fluorescent protein to the hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* improves enzyme stability.** *Appl. Environ. Microbiol.*, DOI:10.1128/AEM.00795-13

Vorträge auf internationalen Tagungen

K. Klein, D. Okrob, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2010). **LOV-fluorescence reporters for the analysis of hydroxynitrile lyase from *A. thaliana* in unconventional media.** *5th International Congress of Biocatalysis, Biocat 2010*, Hamburg (Deutschland)

K. Scholz, M. Kaschner, K.-E. Jaeger, M. Pohl and U. Krauss (2010). **Biotechnological applications of LOV blue-light photoreceptors**, *Gordon-Kenan Research Seminar and Gordon Research Conference on Photosensory Receptors and Signal Transduction* Lucca (Barga) (Italien)

K. Scholz, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2011). **Fluorescence reporters for the analysis of whole-cell biocatalysts in non-conventional media.** *16th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology*, Toyama (Japan)

Posterpräsentationen auf internationalen Tagungen

K. Klein, B. Kopka, M. Kaschner, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2009). **LOV-based fluorescence reporters in biotechnology.** *VAAM-Jahrestagung 2009*, Bochum (Deutschland)

K. Klein, B. Kopka, M. Kaschner, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2009). **Fluorescent reporter proteins in non-conventional media.** *9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Biotrans*, Bern (Schweiz)

K. Klein, B. Kopka, M. Kaschner, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2010). **LOV-based fluorescent reporters for the analysis of biocatalysts in non-aqueous reaction media.** *Gordon Research Conference on Photosensory Receptors and Signal Transduction*, Lucca (Barga) (Italien)

K. Klein, B. Kopka, M. Kaschner, M. Pohl, K.-E. Jaeger und U. Krauss (2010). **Fluoreszenzproteine zur biotechnologischen Analyse in unkonventionellen Medien.** *DECHEMA ProcessNet-Jahrestagung 2010 und 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen (Deutschland).

A. Wirtz, K. Klein, L. Schneider, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2011). **A Rapid and Precise HPLC- Based Lipase Assay.** *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Budapest (Ungarn)

K. Scholz, D. Okrob, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2011). **Fluorescence reporters for the analysis of whole cell biocatalysts in non-conventional media.** *10th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Biotrans*, Giardini Naxos, Sizilien (Italien)

Preise und Ehrungen

Poster Award für die Präsentation des Posters: K. Klein, B. Kopka, M. Kaschner, M. Pohl, K.-E. Jaeger and U. Krauss (2009). **Fluorescent reporter proteins in non-conventional media.** *9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Biotrans*, Bern (Schweiz)

Inhaltsverzeichnis

Summary	vii
Zusammenfassung	ix
Publikationen	ix
1 EINLEITUNG	1
1.1 Einsatz von Reporterproteinen in den Lebenswissenschaften	2
1.2 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenzemission	3
1.3 Das grünfluoreszierende Protein (GFP) als Fluoreszenzreporterprotein und seine Anwendung in den Lebenswissenschaften	6
1.3.1 GFP: Struktur, Funktion und Optimierung	6
1.3.2 Anwendung von GFP und verwandten FRPs in den Lebenswissenschaften . .	7
1.3.3 Klassische Anwendungen: FRPs zur Quantifizierung und Lokalisierung von intrazellulären Vorgängen	8
1.3.4 Anwendung von FRPs in der Biosensorik	8
1.4 FRPs zur Untersuchung biotechnologischer Produktionsprozesse	9
1.4.1 Anwendung von FRPs als Reporter heterologer Proteinüberproduktion und zur Visualisierung und Verfolgung ganzer Zellen	9
1.4.2 Biotechnologische Anwendung von FRP-basierter Biosensorik	10
1.4.3 Nachteile vom "Klassiker" GFP	11
1.4.4 Neue Photorezeptor-basierte FRPs	12
1.5 Blaulicht-Photorezeptoren	14
1.6 Neuartige Fluoreszenz-Reporter basierend auf bakteriellen LOV-Proteinen	18
1.7 Die Lipase A aus <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.7.1 Aktivitätsbestimmung von Lipasen	21
1.8 Die Hydroxynitrillyase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
1.9 Die Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	26
1.10 FRPs zur Untersuchung von Inaktivierungsvorgängen bei der Biokatalyse in unkonventionellen Medien	28

1.11 Zielsetzung der Arbeit	29
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	30
2.2 Oligonukleotide und Sequenzierung	31
2.3 Sequenzierung von DNA	35
2.4 Nährmedien und Zusätze	36
2.5 Antibiotika	37
2.6 Übersicht über die verwendeten Enzyme und Chemikalien	37
2.7 Puffer und Lösungen	38
2.7.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	38
2.7.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	39
2.7.3 Puffer und Lösungen zur Mengenbestimmung von Proteinen und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.7.4 Puffer zur Proteinisolierung und Quartärstrukturanalyses mittels HPLC-SEC	41
2.7.5 HPLC-SEC-Äquilibrationpuffer	41
2.7.6 Assaypuffer	42
2.8 Geräte	43
2.9 Softwaretools	44
2.10 Mikrobiologische Methoden	44
2.10.1 Anzucht von Bakterien	44
2.10.2 Induzierte Genexpression in <i>E. coli</i> -BL21(DE3)	45
2.10.3 Bestimmung der Zelldichte	45
2.10.4 Lagerung von Bakterienstämmen	45
2.10.5 Herstellung von chemisch transformationskompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	45
2.10.6 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	46
2.11 Molekularbiologische Methoden	46
2.11.1 Nukleinsäureisolierung und -reinigung	46
2.11.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.11.3 "touch down"-PCR	49
2.11.4 "overlap extension"-PCR	49
2.11.5 Strategie zur Erzeugung der Vektoren für die Expression der YFP und PYP Referenzfusionsproteine	51
2.11.6 Strategie zur Erzeugung der pETnFbFP und pETcFbFP Vektoren als Ausgangskonstrukte zur einfachen Erzeugung von diversen FbFP-Zielenzym-Fusionen	52
2.11.7 Strategie zur Erzeugung der Vektoren zur Expression der FbFP-Fusionsproteine	52

2.12	Nukleinsäuremodifikationen	53
2.12.1	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	53
2.12.2	Agarosegelelektrophorese von DNA	53
2.12.3	Ligation von Vektor- und Fragment-DNA	54
2.13	Proteinchemische Methoden	54
2.13.1	Zellaufschluss durch French-Press	54
2.13.2	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen	55
2.13.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.13.4	Isoelektrische Fokussierung	56
2.13.5	Colloidal-Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von PAGE-Gelen	56
2.13.6	Lyophilisierung von gereinigten Proteinen	57
2.13.7	Proteinreinigung mittels immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	57
2.13.8	Rekonstitution des Fluoreszenzreporters PYP mit dem stark fluoreszenten <i>trans-locked-pCA</i> -Chromophor	57
2.13.9	Größenausschlusschromatographie mittels HPLC	59
2.14	Bestimmung der Lipaseaktivität mit <i>para</i> -Nitrophenylpalmitat als Substrat	60
2.14.1	Photometrische Bestimmung der lipolytische Aktivität	60
2.14.2	Bestimmung der <i>BsLA</i> Aktivität mittels HPLC	60
2.15	Bestimmung der <i>AtHNL</i> -Aktivität mit Mandelonitril als Substrat	63
2.15.1	HNL-Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mittels Mandelonitril-Spaltungsassay	63
2.16	Nachweis der <i>AtHNL</i> katalysierten Cyanhydrinsynthese	64
2.16.1	Präparation von 2 M HCN in MTBE Stock-Lösung	64
2.16.2	Cyanhydrin-Synthese mittels gereinigtem <i>AtHNL</i> -FbFP-Fusionsprotein in einem zweiphasigen Reaktionssystem	65
2.16.3	Ganzzellbiotransformation und Recycling	66
2.16.4	Detektion von Cyanhydrinsyntheseprodukten	66
2.17	Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der <i>PfBAL</i> -Aktivität	67
2.18	Berechnung des k_{cat} -Werts	68
2.19	Biophysikalische-Methoden	68
2.19.1	Messung von Fluoreszenz-Emissionsspektren	68
2.19.2	Messung von Absorptionsspektren	68
2.19.3	Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute	69
2.19.4	Messung des Lichtstreuungsverhaltens von ganzen Zellen mittels Fluorimetrie	69
2.20	Fluoreszenzmikroskopie	70
2.20.1	Bildanalyse und statistische Auswertung der Mikroskopiedaten	70

3	ERGEBNISSE	72
3.1	Etablierung von Fluoreszenzreporter-Enzymfusionen für den Einsatz in der Biokatalyse	72
3.1.1	Konstruktion von Fluoreszenzreporter-Enzym-Fusionen	75
3.1.2	Erzeugung verschiedener FRP-Enzym-Referenzfusionen mittels "overlap extension"-PCR	78
3.1.3	Expression und qualitative Untersuchungen zur Fluoreszenz der nFbFP- und nYFP-Enzym-Fusionen	80
3.2	Expression und Reinigung von FbFP- und YFP-Enzym-Fusionen	81
3.3	FbFP-spezifische Fluoreszenzeigenschaften als Indikator für Proteinfaltung	85
3.4	Charakterisierung der Fluoreszenzreporter-Enzym-Fusionen	86
3.5	Etablierung des <i>Photoactive Yellow Proteins</i> (PYP) als alternativen Fluoreszenzreporter	89
3.6	Anwendung der Fluoreszenzreporter-Enzym-Fusionen zur Analyse eines Ganzzellbiokatalysators in einem monophasischen mikro-wässrigem Reaktionssystem	90
3.6.1	Cyanhydrinsynthese mit ganzen Zellen	93
3.6.2	Cyanhydrinsynthese mit weiteren Substrataldehyden	94
3.6.3	Der Einsatz von FRP-Fusionen erlaubt eine mikroskopische und spektroskopische Untersuchungen des Biokatalysators im monophasischen, mikro-wässrigen Reaktionssystem	96
3.7	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der fluoreszenten AtHNL-Fusionen	100
3.7.1	Beeinflussung der Enzym-Quartärstruktur durch die Reporterfusion als eine mögliche Ursache für die Stabilisierung der FbFP-AtHNL-Fusionen bei niedrigen pH-Werten	102
3.7.2	Die FbFP-Fusionsproteine bilden stabile, von der Proteinkonzentration unabhängige Oligomere aus	106
3.7.3	Alternative Ursachen für die Stabilisierung der FbFP-Fusionen bei niedrigen pH-Werten	107
3.8	Die erhöhte pH-Stabilität der cFbFP-AtHNL-Fusion erlaubt die Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril in einem Zweiphasensystem	109
4	DISKUSSION	111
4.1	Die strukturellen Eigenschaften von bakteriellen FbFPs erlauben die einfache Fusion an verschieden komplexe Zielenzyme	111
4.2	Etablierung des <i>H. halophila</i> photoactive yellow proteins (PYP) als fluoreszentes Reporterprotein	116
4.3	Die Fusion FbFP-basierter FRPs an die AtHNL führt zu veränderten pH-Optima und pH-abhängigen Stabilitäten	119

4.4	Mögliche strukturelle Ursachen der erhöhten pH-Stabilität der FbFP-AtHNL-Fusionsproteine im schwach sauren pH-Bereich	120
4.5	FbFP-AtHNL-Fusionsproteine als Werkzeug zur Identifizierung geeigneter (unkonventioneller) Lösungsmittel für den Einsatz in der Ganzzellbiokatalyse	121
4.6	Vergleichende (<i>R</i>)-Mandelonitril Synthesen - Evaluation des Ganzzellbiotransformations-Systems	124
4.6.1	Recycling des Ganzzellbiokatalysators im Vergleich zu Protein-Immobilisaten	125
4.6.2	Synthese diverser Cyanhydrine - Einfluss von Wasser auf die Enantioselektivität	125
4.7	Fluoreszenzproteine als Werkzeug zur Untersuchung des monophasischen mikrowässrigen Reaktionssystems	127
4.8	Zusammenfassung und Ausblick	129
5	Anhang	131
	Literaturverzeichnis	136

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung der Energieniveaus anhand des Jabłoński-Diagramms	4
1.2	Dreidimensionale Struktur von GFP mit gebundenem Fluorophor	7
1.3	Reaktionsverlauf der Chromophorreifung bei GFP	11
1.4	Einteilung der Photorezeptoren auf Basis ihrer lichtabsorbierenden Chromophore in unterschiedliche Klassen	13
1.5	Das LOV-Protein YtvA aus <i>Bacillus subtilis</i> und das PYP aus <i>Halorhodospira halophila</i>	15
1.6	Schema des LOV-Photozyklus am Beispiel des YtvA-Proteins	17
1.7	Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triacylglycerids am Beispiel von Triacylglycerol .	21
1.8	Hydrolyse von <i>para</i> -Nitrophenylpalmitat zu <i>para</i> -Nitrophenolat und Palmitinsäure . .	23
1.9	Die katalytische, reversible Spaltung von Cyanhydrinen durch HNLs	24
1.10	Synthesereaktion von (<i>R</i>)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff (HCN)	25
1.11	Das Reaktionsschema und die Struktur der PfBAL	27
2.1	Modellhafte Darstellung einer "overlap extension"-PCR	50
2.2	Reaktion von <i>trans-locked-pCA</i> mit DCC um "aktiviertes" <i>trans-locked-pCA</i> -Anhydrid zu erhalten	58
2.3	Kalibrierung der Biosep-SEC S2000-Säule	59
2.4	Die enzymatische Spaltung von Mandelonitril zu Benzaldehyd und HCN durch die AtHNL	63
2.5	Das Reaktionsgefäß für die Cyanhydrinsynthese mit ganzen <i>E. coli</i> -Überexpressionszellen	65
2.6	PfBAL-katalysierte Synthese von 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin aus zwei Molekülen 3,5-Dimethoxybenzaldehyd	67
2.7	Die Vermessung von Feret-Werten anhand einer bakteriellen Zelle	71
3.1	Modularer Aufbau der FbFP basierten Fusionen	73
3.2	Schema zur Klonierung von nFbFP bzw. cFbFP in den Expressionsvektor pET28a . .	75
3.3	Übersicht zur Klonierung aller Zielenzyme	76
3.4	Veranschaulichung der Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Expressionsvektoren nYFP-Zielenzym bzw. nPYP-AtHNL.	78

3.5	<i>In vivo</i> -Fluoreszenz von <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen, welche die entsprechenden Fusionsproteine überexprimieren.	80
3.6	Reinigungsprofil und SDS-PAGE-Analyse der nFbFP- <i>AtHNL</i> -Reinigung mittels IMAC	81
3.7	UV/Vis Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren einer gereinigten nFbFP- <i>AtHNL</i> -Fusionsprotein-Probe und von Flavin	83
3.8	Fluoreszenzemissionsspektren und das Schmelzverhalten der nFbFP- <i>AtHNL</i> -Fusion unter erhöhter Temperatur	85
3.9	<i>Interday</i> und <i>intraday</i> Experimente für den HPLC-Lipaseassay	86
3.10	Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren des gereinigten, rekonstituierten nPYP- <i>AtHNL</i> -Fusionsproteins	89
3.11	Fluoreszente <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen, welche die Fusionen nFbFP- <i>AtHNL</i> und nYFP- <i>AtHNL</i> überproduzieren	91
3.12	<i>In vivo</i> Fluoreszenz von <i>E. coli</i> -Zellen, welche die entsprechende Fusion überproduzieren	92
3.13	Frische und eingefrorene <i>AtHNL</i> überproduzierende <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen in der Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und HCN	93
3.14	nFbFP- <i>AtHNL</i> überproduzierende <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen in der Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und HCN	96
3.15	Änderung der Verteilung des Zellumfangs während der Inkubation in MTBE	97
3.16	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nFbFP- <i>AtHNL</i> -überproduzierenden <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen	98
3.17	Entwicklung des Fluoreszenzsignals während der Inkubation von <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen, welche nFbFP- <i>AtHNL</i> -überproduzieren	99
3.18	Normiertes FbFP-Fluoreszenzemissionsspektrum ganzer <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Zellen, welche die Fusion nFbFP- <i>AtHNL</i> überproduzieren, vor und nach Inkubation in MTBE	99
3.19	Einfluss des pH-Werts auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit des jeweiligen Enzyms	101
3.20	HPLC-basierte Größenausschlusschromatographie-Analyse (SEC) aller in dieser Studie verwendeten Fusionen	103
3.21	Absorptionsspektren aller Fusionen	104
3.22	Analysen zur Konzentrationsabhängigkeit der Oligomerverteilung am Beispiel von cFbFP- <i>AtHNL</i>	106
3.23	Isoelektrische Fokussierung aller Fusionen	107
3.24	Umsatz von Benzaldehyd und HCN zu (<i>R</i>)-Mandelonitril im wässrig-organischen Zweiphasensystem bestehend aus Methyl- <i>tert</i> -Butylether und Acetatpuffer	109
4.1	Homologiemodell der LOV-Domäne des YtvA-Proteins aus <i>B. subtilis</i>	114
4.2	Vergleich der Emissionsfarbe in einer Quarzküvette und der Absorptions- und Fluoreszenzspektren von FbFP, YFP und PYP	117

4.3	Die relative Aktivität aller verwendeten <i>AtHNL</i> -Fusionen bei pH 4,75	119
4.4	Umsatz verschiedener Aldehyde als Substrate mittels Ganzzellbiokatalyse	126
4.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> -BL21(DE3)-Expressionszellen, welche nFbFP- <i>AtHNL</i> überproduzieren	128

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	30
2.2	Übersicht der verwendeten Plasmide	30
2.3	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	32
2.4	Übersicht der verwendeten Chemikalien	37
2.5	Reinigungspuffer	41
2.6	Übersicht der verwendeten Geräte	43
2.7	Übersicht der verwendeten Software- und Webservertools	44
2.8	Konzentrationen der Reaktionskomponenten bei einer PCR	48
2.9	Programm zur Durchführung einer PCR	48
2.10	Programm zur Durchführung einer "touch down"-PCR	49
3.1	Übersicht über die eingesetzten Zielenzyme	74
3.2	Proteingehalt und AtHNL-Aktivität des nFbFP-AtHNL-Fusionsproteins während der Reinigung durch Affinitätschromatographie und anschließender Entsalzung mittels G25-Material (SEC)	82
3.3	Zusammenfassung aller gereinigten Fusionsproteine	84
3.4	Enzymatische Aktivität und Fluoreszenz-Quantenausbeute (Φ_F) der gereinigten (Fusions-) Proteine	87
3.5	Enzymatische Aktivität des gereinigten nPYP-AtHNL-Fusionsproteins	90
3.6	Umsatz verschiedener Aldehyde durch AtHNL überproduzierende <i>E. coli</i> -BL21(DE3)- Zellen	95
3.7	pH-Wert abhängige Halbwertszeit (min) der in dieser Arbeit verwendeten Fusionen .	101
3.8	Zusammenfassung der isoelektrischen Punkte der Fusionsproteine	108
4.1	Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine	112
4.2	Zusammenfassung der Wasserlöslichkeit der Lösungsmittel Methyl- <i>tert</i> -butylether (MTBE), Diethylether (DEE) und Aceton	123
5.1	Übersicht der verwendeten AS-Sequenzen	131

Abkürzungen

Aminosäuren wurden nach dem gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

Abkürzung	Bezeichnung
A_{280nm}	Absorption bei 280 nm
AAC	Anionenaustauschchromatographie
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	<i>aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator</i>
AS	Aminosäure(n)
<i>AtHNL</i>	Hydroxynitrillyase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
A.U.	arbiträre Einheit
BA	Benzaldehyd
BAL	Benzaldehydlyase
BLUF	<i>Blue Light using FAD</i> Sensorfamilie
bp	Basenpaar(e)
Bph	bakterielle Phytochrome
BSA	Rinderserumalbumin
<i>BsLA</i>	<i>Bacillus subtilis</i> LipaseA
BZ	Benzoin
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
cFbFP	LOV-Modul für die carboxy-terminale Fusion am Zielenzym
4-CIBA	4-Chlorbenzaldehyd
4,4-DCIBZ	4,4-Dichlorbenzoin
Cph	cyanobakterielle Phytochrome
CRY	Cryptochrome
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diethylaminoethyl-Gruppe
DEE	Diethylether

Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIPE	Diisopropylether
DMBA	3,5-Dimethoxybenzaldehyd
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
em	Emission
ex	Extinktion
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FbFP	flavinbasiertes Fluoreszenzprotein
FMN	Flavinmononukleotid
FRP	Fluoreszenzreporterprotein
g	Gramm
GAF-Domäne	minimale Einheit, die autokatalytisch lineare Tetrapyrrole bindet
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β -Glucuronidase
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IFPs	infrarotfluoreszente Reporterproteine
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IP	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid
Kan _R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LacZ	β -Galaktosidase
LB	Luria Bertani
LOV	<i>light, oxygen, voltage</i>

Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
M	Molar
max.	maximal
min.	minimal
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
μ	micro
n	nano
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
nFbFP	LOV-Modul für die amino-terminale Fusion am Zielenzym
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
p	piko
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per-ARNT-Sim
<i>p</i> CA	<i>para</i> -Hydroxycimtsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	<i>Photodiode Array Detector</i>
Per	<i>Peroid</i>
<i>Pf</i> BAL	Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenolat
<i>p</i> NPP	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat
PYP	<i>photoactive yellow protein</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SIM	<i>single-minded</i>
STAS	Sulfat Transporter Anti-Sigma Faktor Antagonist
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
ThDP	Thiamindiphosphat

Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin
TMF	Transformationspuffer
<i>trans-locked-pCA</i>	7-Hydroxycoumar-3-carboxylsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit(s)</i>
ÜK	Übernachtskultur
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VK	Vorkultur
WT	Wildtyp
W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1 EINLEITUNG

Das Interesse der Menschen an fluoreszierenden Proteinen lässt sich bis ins erste Jahrhundert nach Christus zurückverfolgen, als der römische Naturforscher Plinius maior (Gaius Plinius Secundus Maior, 23 n. Chr. - 79 n. Chr.) in seinem Werk eine leuchtende Qualle (*Pulmo marinus*) im Mittelmeer beschrieb [1]. Er schilderte das Leuchten dieser Tiere als so intensiv, dass diese seiner Meinung nach fast als Fackel verwendet werden könnten. Neben dieser Qualle gibt es eine Vielzahl von Organismen, welche die Emission von Licht nutzen, um mit ihren Artgenossen zu kommunizieren (z.B. Glühwürmchen während der Paarungszeit), Beute anzulocken (z.B. Anglerfische) oder Fressfeinde abzuwehren (z.B. Zwergtintenfische). Einige dieser faszinierenden Geschöpfe leben in der Tiefsee (> 300 m Meerestiefe), wo Licht ein rares Gut ist. Während die oberen 200-300 m der Ozeane (Epipelagial) vom Sonnenlicht durchdrungen werden, kann in tieferen Regionen nur noch Licht bestimmter Wellenlängen nachgewiesen werden. Hierbei besitzt blaues Licht mit ca. 1000 m die größte Eindringtiefe [2]. Die nachzuweisenden Lichtintensitäten sind jedoch in dieser Zwiellicht-Zone (Mesopelagial) so gering, dass kein Pflanzenwachstum mehr möglich ist [2]. Unterhalb der Grenze von 1000 m (Bathypelagial, Abyssopelagial) wird Licht einzig von den dort lebenden Organismen erzeugt. Hierbei wird grundsätzlich zwischen zwei physikalischen Phänomenen unterschieden, welche zur Lichtemission führen. Erstens, Lichtemission ohne Anregung mit Licht (z.B. Chemo- und Biolumineszenz), und zweitens Lichtemission in Folge von Anregung oder Absorption von Licht einer definierten Wellenlänge. Nach mehr als drei Jahrhunderten nach Plinius major gab der irische Mathematiker und Physiker George Gabriel Stokes dem letzteren physikalischen Phänomen einen Namen: Fluoreszenz [3]. Der Begriff leitet sich hierbei vom Namen des bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Blaulicht-emittierenden Minerals Fluorit ab.

Dank der Arbeiten von Osamu Shimomura in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass in Quallen wie *Pulmo marinus* und der wohl bekannteren Spezies *Aequorea victoria*, welche von Shimomura untersucht wurde, sowohl Chemolumineszenz als auch Fluoreszenz zur Lichtemission beitragen [4]. Chemolumineszenz wird hierbei durch die Luciferase Aequorin hervorgerufen, welche Coelenterazin als Substrat in einer Calcium-abhängigen Reaktion unter Emission von Blaulicht oxidiert [4]. Die beobachtbare grüne Lichtemission der Qualle entsteht hierbei jedoch nicht direkt durch Aequorin Chemolumineszenz, sondern durch Fluoreszenzemission eines autofluoreszenten Proteins, welches durch das vom Aequorin emittierte Licht angeregt wird [5]. Die Bedeutung

dieser Entdeckung sollte jedoch erst Jahre später, nach Identifizierung und Klonierung des für das *Aequorea* grünfluoreszierendes Protein (GFP) kodierenden Genes, deutlich werden. So konnten Chalfie *et al.* im Jahr 1994 zeigen, dass GFP in prokaryotischen (*Escherichia coli*) und eukaryotischen (*Caenorhabditis elegans*) Zellen in autofluoreszenter Form produziert werden kann [6]. Diese und weiterführende Arbeiten aus dem Labor von Roger Y. Tsien zur Optimierung des GFP führten zu einer Revolution in den Lebenswissenschaften, welche im Jahr 2008 mit der Verleihung des Nobelpreises für Chemie an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien gewürdigt wurde [7, 8]. Heutzutage werden Fluoreszenz-Reporterproteine (FRPs), wie das GFP, zur zeitlich und räumlich aufgelösten quantitativen Analyse biologischer Systeme verwendet. Durch den Einsatz von FRPs wurden Einblicke in eine Welt ermöglicht, die bisher ungesehene Strukturen und dynamische Prinzipien in der biologischen, medizinischen und verfahrenstechnischen Forschung offenbarten. Dementsprechend sind FRPs heutzutage ein unverzichtbares, molekulares Werkzeug in nahezu allen Bio- und Lebenswissenschaften.

1.1 Einsatz von Reporterproteinen in den Lebenswissenschaften

Bereits vor Verwendung von GFP-basierten FRPs wurden Reporterprotein-Systeme zur Analyse biologischer Prozesse eingesetzt. Generell wird zwischen invasiven und nicht-invasiven Reportern unterschieden. Im Fall von invasiven Reporterproteinen ist für den quantitativen Nachweis der Reporterproteinaktivität eine Zerstörung der zu analysierenden Zellen notwendig. Ein bekanntes Beispiel für ein invasives Reporterprotein ist die β -Galaktosidase. Zum quantitativen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität wird das Substrat 2-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid gespalten, wobei der gelbe Farbstoff 2-Nitrophenol entsteht. Dieser lässt durch photometrische Detektion quantitativ Rückschlüsse auf die Menge und die Aktivität der β -Galaktosidase zu [9]. Der qualitative Nachweis von β -Galaktosidase-Aktivität findet als weitverbreiteter Reporterassay in der Molekularbiologie Verwendung [10]. Mögliche Anwendungen dienen z.B. dem (hier nicht-invasiven) Nachweis erfolgreicher Klonierung mittels Blau-Weiß Selektion oder dem qualitativen Nachweis von Protein-Protein Interaktionen z.B. in Hefe Zwei-Hybrid-Systemen [11, 12, 13, 14]. Dabei wird das synthetische, chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid [10] durch die β -Galaktosidase in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten. Durch Luftsauerstoff wird 5-Brom-4-chlor-indoxyl oxidiert, wobei der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo gebildet wird [15]. Weitere Beispiele für häufig eingesetzte invasive Reporterproteine sind die Chloramphenicol Acetyltransferase [16] und die β -Glucuronidase [17].

Nicht-invasive Reportermethoden basieren häufig auf dem Nachweis von Lichtemission, welche durch

das Reporterprotein hervorgerufen wird. Emittiertes Licht kann hierbei mittels sensitiver Kamerasysteme nachgewiesen werden, ohne dass die zu untersuchenden Zellen zerstört werden müssen. Quallen (z.B. *Aequorea victoria*), Insekten (z.B. *Photinus pyralis*, firefly) und Leuchtbakterien (z.B. *Vibrio fischeri*) besitzen das Sauerstoff-abhängige Enzym Luciferase, dessen Aktivität für die Lichtemission notwendig ist. Hierbei wird durch bakterielle Luciferasen reduziertes Flavinmononukleotid (FMNH₂) in mehreren Schritten und unter Beteiligung langkettiger Aldehyde (Dodecanal) und molekularem Sauerstoffs zu FMN oxidiert. Dabei entsteht als Reaktionsintermediat 4 α -Hydroxyflavin in einem elektronisch angeregten Zustand, bei dessen Übergang in den Grundzustand Energie in Form von Licht frei wird. Dieses relativ komplexe System, bestehend aus mehreren Enzymen, hat in den Lebenswissenschaften bereits Anwendungen gefunden. So werden Luciferasen in Kombination mit den entsprechenden Luciferinen, d.h. den in den verschiedenen biolumineszenten Organismen zur Erzeugung von Licht genutzten Liganden (z.B. FMNH₂ der Luciferase aus *Vibrio fischeri*), als Reporterprotein eingesetzt. Außerdem werden verschiedene Luciferase-Systeme für den quantitativen und qualitativen Nachweis von Ca²⁺, ATP, NADH und O₂ genutzt [18].

Im Gegensatz zu diesen Biolumineszenz-Reportersystemen benötigen FRPs Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge, um Licht emittieren zu können.

1.2 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenzemission

Abbildung 1.1 zeigt das sogenannte Jabłoński-Diagramm, benannt nach dem polnischen Physiker Aleksander Jabłoński. Dieses Schema veranschaulicht die möglichen elektronischen Übergänge bei Absorption von Licht durch Materie, sowie die möglichen strahlungslosen und radiativen Relaxationsprozesse. Physikalisch wird bei der Absorption von Licht durch Materie die Energie des Lichtes, d.h. der Photonen, auf die lichtabsorbierende Verbindung (im Grundzustand S₀) übertragen. Dabei kommt es zur Ausbildung eines elektronisch angeregten Zustands (angeregter Singulett-Zustand, S₁-S_n) im Molekül. Dies kann, vereinfacht dargestellt, durch eine geänderte Elektronenverteilung im Molekül beschrieben werden. Der jeweils niedrigste elektronische Zustand (Grundzustand S₀, die angeregten Zustände S₁, S₂ sowie der niedrigste Triplett-Zustand T₁) ist durch eine dicke waagerechte Linie gekennzeichnet. Über den entsprechenden Zuständen sind schematisch die entsprechenden assoziierten Schwingungszustände des jeweiligen elektronischen Zustands dargestellt.

Elektronen des Licht-absorbierenden Moleküls gelangen durch Photonenabsorption innerhalb von 10-15 ns auf ein höheres Energieniveau (z.B. S₁, S₂ - S_n). Aus einem höheren angeregten Zustand (z.B. S₂) ist ein Übergang nach S₁ möglich, ohne dass ein Photon emittiert wird (innere Umwandlung, *internal conversion*, IC, Abbildung 1.1). Innerhalb eines elektronischen Zustands erfolgt eine Schwingungsrelaxation (*vibrational relaxation*) auf das entsprechend niedrigste Schwingungsniveau innerhalb von 10⁻¹³ - 10⁻¹¹ s (Molekül in Lösung). Da dieser Prozess so effizient ist, findet die

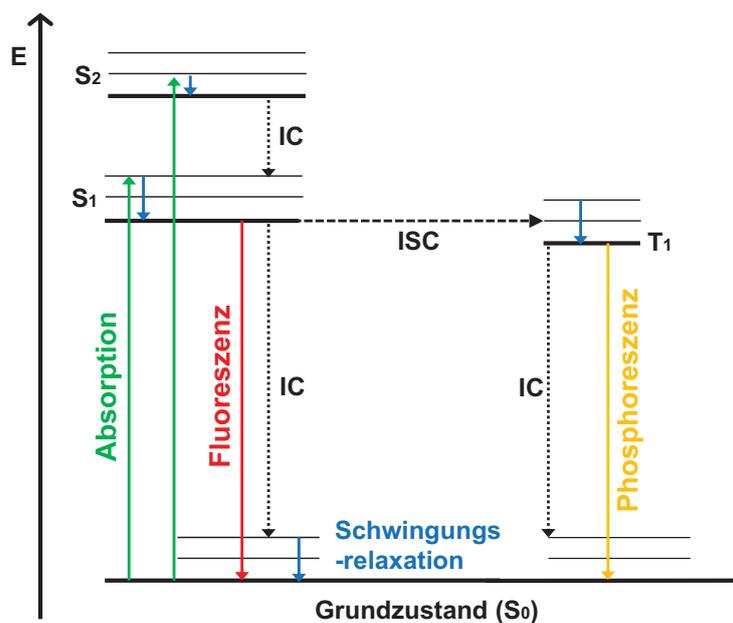


Abbildung 1.1: Darstellung der Energieniveaus (E) d.h. der elektronischen Zustände einer Verbindung anhand des Jablonski-Diagramms. Das Molekül wird durch Einstrahlung von Licht, d.h. durch Absorption von Photonen von einem energetisch niedrigen Grundzustand (S₀) innerhalb von 10-15 ns auf ein energetisch höher liegendes Energieniveau angehoben (S₁ oder S₂). Aus einem höheren angeregten Zustand (z.B. S₂) ist ein Übergang zu S₁ möglich, ohne dass ein Photon emittiert wird (*internal conversion*, IC). Vom ersten angeregten Singulett-Zustand S₁ kehrt das Molekül durch Abgabe von Licht in Form von Fluoreszenz in den Grundzustand S₀ zurück. Eine weitere Möglichkeit besteht im Übergang aus dem ersten angeregten Singulett-Zustand S₁ durch Interkombination (*intersystem crossing*, ISC) in einen energieärmeren Triplett-Zustand (T₁). Beim Übergang von T₁ in den Grundzustand (S₀) wird Licht in Form von Phosphoreszenz emittiert.

Fluoreszenz-Emission in der Regel vom niedrigsten (ersten) angeregten Zustand (S₁) statt. Dieses Energieniveau kann nur für kurze Zeit (10⁻⁷ - 10⁻⁸ s) von den Elektronen gehalten werden. Beim Übergang aus dem ersten angeregten Singulett-Zustand (S₁) in den Grundzustand (S₀) wird Licht in Form von Fluoreszenz abgegeben (Abbildung 1.1). Die Zeitspanne, die dieser Übergang benötigt, wird als Fluoreszenz-Lebensdauer bezeichnet. Bei einigen Substanzen kann es nach Lichtabsorption zu einem strahlungslosen Übergang aus dem ersten angeregten Singulett-Zustand (S₁) durch einen Spin-abhängigen internen Umwandlungsprozess (Interkombination, *intersystem crossing*, ISC, Abbildung 1.1) in einen energieärmeren Triplett-Zustand (T₁) kommen. Dieser Prozess, welcher unter Spinumkehr stattfindet, ist quantenmechanisch verboten und findet daher mit entsprechend geringer Wahrscheinlichkeit statt. Der S₁-T₁ Übergang wird jedoch dadurch begünstigt, dass die höheren Schwingungsniveaus des T₁ Zustands mit dem niedrigsten Energieniveau des ersten angeregten Singulett-Zustandes (S₁) überlappen (*vibrational coupling*). Da der direkte Übergang von T₁ nach S₀ ohne erneute Spinumkehr quantenmechanisch verboten ist, besitzt das Elektron in dieser "Triplett-Falle" eine mittlere Lebenszeit von 10⁻⁴ bis 10 s. Dieses, als Phosphoreszenz bezeichnetes Phänomen ist im Vergleich zur Emission von Licht in Form von Fluoreszenz ein eher langanhaltender

Prozess. Außerdem trägt die lange Lebenszeit des Triplett-Zustandes dazu bei, dass in einer Lösung bei Raumtemperatur Kollisionsprozesse die Energieabgabe aus dem Triplett-Zustand dominieren. In dieser Arbeit ist vor allem Fluoreszenz-Emission, z.B. durch ein FRP, von Bedeutung. Mit Ausnahme der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, welche im UV-Bereich des Spektrums emittieren, sind Proteine als gefaltene Polypeptidketten bestehend aus den 20 proteinogenen Aminosäuren, nicht fluoreszent. In einem Protein kann Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Spektrums i.d.R. nur durch die Bindung eines niedermolekularen Liganden erreicht werden, welcher aufgrund seiner elektronischen Eigenschaften Licht absorbieren und in Form von Fluoreszenz emittieren kann. Ein solcher Ligand wird aufgrund seiner Farbigkeit als Chromophor (Lat. *chromos* = Farbe) oder Fluorophor bezeichnet. Das Fluorophor-freie Protein wird als Apo-Protein bezeichnet. Um ein fluoreszentes Protein quantitativ hinsichtlich seiner Helligkeit zu beschreiben, werden in der Praxis mehrere Parameter verwendet. Einerseits wird zur Beschreibung des Lichtabsorptionsprozesses die Effizienz der Absorption durch den Fluorophor in Form des molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ , in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) herangezogen. Die Effizienz der Fluoreszenz-Emission wird durch die sogenannte Fluoreszenz-Quantenausbeute (Φ_F) charakterisiert. Unter Φ_F wird das Verhältnis aus der Anzahl vom Fluorophor absorbierter Photonen zu der Anzahl vom Fluorophor als Fluoreszenz emittierten Photonen verstanden. Der Vergleich einer Probe (X) unbekannter Fluoreszenz-Quantenausbeute (Φ_X) mit einem Standard (ST) bekannter Quantenausbeute (Φ_{ST}) stellt hierbei eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute dar [19] (Gleichung 1.1). Aus dem Produkt des molaren Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenz-Quantenausbeute ergibt sich die Helligkeit des Fluorophors. Diese wird für FRPs häufig relativ zu einem gut charakterisierten Protein (z.B. GFP) ausgedrückt.

$$\Phi_X = \Phi_{ST} \cdot \frac{\text{Grad}_X}{\text{Grad}_{ST}} \cdot \frac{\eta_X^2}{\eta_{ST}^2} \quad (1.1)$$

Der Brechungsindex (η) von Probe und Standard muss nur berücksichtigt werden, wenn die Probe und der Standard in unterschiedlichen Lösungsmitteln vorliegen. Der Wert der Steigung (Grad) für die jeweilige Probe ergibt sich aus der linearen Auftragung der Absorption der Probe beim Anregungsmaximum (z.B. $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ für FbFPs und FMN) gegen die Fläche des korrespondierenden Fluoreszenz-Emissionsspektrums (z.B. $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm} - 650 \text{ nm}$ für FbFPs und FMN).

1.3 Das grünfluoreszierende Protein (GFP) als Fluoreszenzreporterprotein und seine Anwendung in den Lebenswissenschaften

1.3.1 GFP: Struktur, Funktion und Optimierung

Das bereits einleitend beschriebene grünfluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*, sowie dessen optimierte Varianten, sind die wohl am besten charakterisierten und am häufigsten verwendeten FRPs. GFP ist ein 26 kDa großes Protein [20], welches in einer Vielzahl biolumineszenter *Coelenterata* (Hohltiere) des Tierstammes der *Cnidaria* (Nesseltiere) vorkommt [21]. GFP erhielt seinen Namen aufgrund der Tatsache, dass es bei Anregung mit ultraviolettem ($\lambda_{\max} = 395 \text{ nm}$) oder blauem ($\lambda_{\max} = 475 \text{ nm}$) Licht grün ($\lambda_{\max} = 509 \text{ nm}$) fluoresziert [5, 22]. Um dem natürlich vorkommenden GFP seine Fluoreszenz zu verleihen, muss kein exogener Ligand im Protein gebunden werden. Seine Fluoreszenzeigenschaften erhält das Protein durch die autokatalytische Bildung des Chromophors (Fluorophor) aus drei Aminosäureseitenketten (Serin 65, Tyrosin 66, Glycin 67). Aus diesen Aminosäuren bildet sich durch eine autokatalytische Zyklisierung, anschließende Dehydratisierung und finale Oxidation das Fluorophor 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-imidazolin-5-on (Abbildung 1.2) [22]. GFP besteht aus 11 β -Faltblättern, die eine zylindrische oder Fassähnliche Form (β -barrel) aufweisen, sowie einer α -Helix im Inneren des Fasses und weiteren flankierenden α -helikalen Elementen (Abbildung 1.2) [23]. Bereits Mitte der 1990er Jahre wurde gezeigt, dass sich GFP sowohl in prokaryotischen Zellen (*E. coli*) als auch in Hefen, Würmern und Fliegen als nicht-invasiver Fluoreszenzreporter eignet [6, 24]. Rasch folgten weitere Experimente, welche die Anwendbarkeit des Systems zur *in vivo* Fluoreszenzmarkierung für eine große Zahl von zellulären Systemen und transgenen Organismen belegten [25, 26].

Inzwischen existieren viele, durch gerichtete und ungerichtete Mutagenese erzeugte modifizierte Versionen des wildtypischen GFPs, die andere spektrale Charakteristika (d.h. Anregungs- und Emissionsfarben) besitzen. Abgeleitet von ihrer Emissionsfarbe tragen sie beispielsweise Namen wie z.B. CFP (*cyan fluorescent protein*). Es existiert ein breites Farbspektrum an Fluoreszenzreportern, deren Anregungs- und Emissionswellenlängen von blau bis infrarot reichen [27]. Ein bekanntes Beispiel dieser Farbpalette ist das gelbfluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) [28, 29]. YFP absorbiert maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 514 \text{ nm}$ und emittiert Licht mit einem Wellenlängenmaximum von $\lambda_{\max} = 527 \text{ nm}$. Durch die Mutation der Aminosäure Threonin 203 zu Tyrosin kommt es zu π - π -Wechselwirkungen zwischen dem neu eingeführten Tyrosinrest und dem Fluorophor, was eine Rotverschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima zur Folge hat. Von Bedeutung ist außerdem die Entwicklung von verbesserten, so genannten *enhanced* Varianten wie

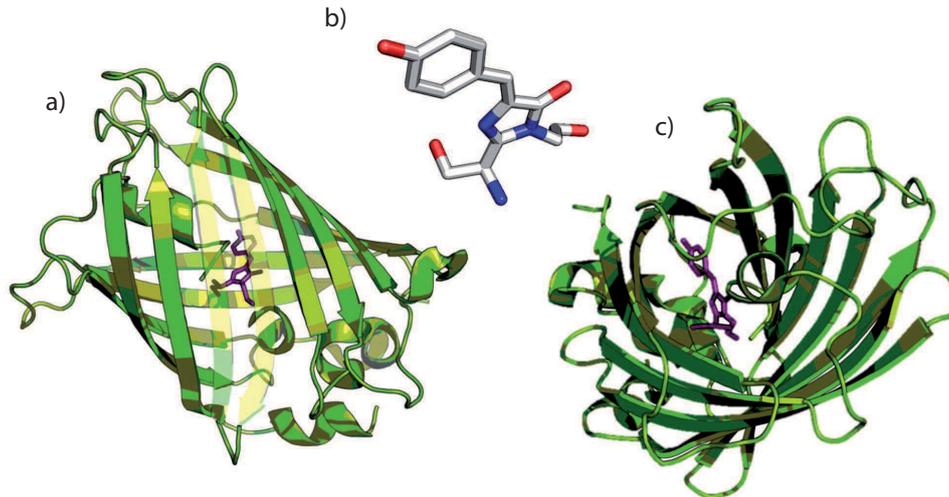


Abbildung 1.2: Dreidimensionale Struktur von GFP (grün) mit gebundenem Fluorophor (pink) (a) und c) orthogonale Ansicht). Die Strukturelemente des GFP ähneln einem Fass (β -barrel), das aus 11 antiparallelen β -Faltblattstrukturen gebildet wird. Umgeben wird das β -barrel von weiteren α -helikalen Strukturelementen. Die Fluorophor-bindende Koaxialhelix zeigt ins Innere des Fasses (PDB ID: 1EMA). b) Struktur des 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-imidazolin-5-on Fluorophors, gebildet aus den Aminosäuren Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67. Stickstoffatome sind in blau, Kohlenstoff in grau, Sauerstoff in rot dargestellt.

beispielsweise dem *enhanced* GFP (eGFP) oder *enhanced* YFP (eYFP) [30]. Die so verbesserten Varianten besitzen Eigenschaften wie eine größere Helligkeit, erhöhte Photostabilität, eine größere pH-Toleranz oder maturieren schneller [30, 31, 32, 33]. Ungeachtet ihres evolutionären Ursprungs oder ihrer biologischen Funktion produzieren viele Korallen und Anthozoen GFP-ähnliche Proteine. Diese marinen Organismen werden derzeit auf neue Proteine hin untersucht, um die Lücken in der Farbpalette zu schließen. Dies ist bereits erfolgreich mit der Klonierung und Charakterisierung einer Reihe von *Anthozoa*-Proteinen aus der Seeanemone [34] *Discosoma striata* für die Anwendung in bildgebenden Verfahren gelungen [35, 36]. Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel das rotfluoreszierende Protein drFP583 (DsRed) aus *Discosoma* (Scheibenanemone) [37, 38].

1.3.2 Anwendung von GFP und verwandten FRPs in den Lebenswissenschaften

Aufgrund der Fülle an experimentellen Studien, in welchen GFP und verwandte Proteine eingesetzt wurden, ist es unmöglich, jeden beschriebenen Anwendungsaspekt detailliert zu beleuchten. So listet PubMed (www.pubmed.org) gegenwärtig 24.234 Einträge (Stand: Mai 2012) für den Suchbegriff "green fluorescent protein". Daher sollen im Folgenden lediglich einige wichtige Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt werden.

1.3.3 Klassische Anwendungen: FRPs zur Quantifizierung und Lokalisierung von intrazellulären Vorgängen

In den meisten Studien wurden und werden GFP-FRPs zur Untersuchung von Promotoraktivitäten in Genexpressionsstudien eingesetzt. Hierzu wird das FRP unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt. Promotoraktivitäten lassen sich in einem solchen System mikroskopisch und spektrofluorometrisch untersuchen und quantifizieren [6, 39, 40]. Mittels GFP und dessen Verwandten ist es außerdem möglich, Proteinproduktions- und Faltungsvorgänge innerhalb lebender Zellen zu analysieren [6, 41]. Dies wird z.B. dadurch erreicht, dass das FRP mittels molekularbiologischer Methoden an den Amino- oder Carboxy- Terminus (N- oder C-Terminus) der zu untersuchenden Zielproteine fusioniert wird. Dies erlaubt die einfache Quantifizierung und Lokalisierung innerhalb der Zelle [42, 43, 44]. Des Weiteren wurden zur Untersuchung von Translokations-, Sekretionsvorgängen und Transportprozessen GFP-FRPs in bakteriellen und eukaryotischen Zellsystemen verwendet [45, 46].

1.3.4 Anwendung von FRPs in der Biosensorik

Ein weiteres Anwendungsfeld von GFP in Kombination mit dessen Farbvarianten ist der Einsatz als Marker für Strukturanalysen mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [47, 46]. Bei FRET-Experimenten wird die Energie eines Donorfluorophors auf einen Akzeptorfluorophor übertragen. Hierzu muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorfluorophores überlappen. Die Energie wird dabei strahlungsfrei und somit nicht über Emission und Absorption von Photonen ausgetauscht [48]. In der Strukturforschung findet FRET vor allem unter Verwendung von verschiedenen niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffen als "spektroskopisches Lineal" Anwendung [49]. Die FRET-Effizienz hängt hierbei vor allem vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül ab. Durch gezielte Kopplung von Donor- und Akzeptormolekülen an verschiedenen Positionen des gleichen Proteins, können mittels FRET Aussagen über den Abstand der Fluorophore und damit über die Struktur des Proteins getroffen werden [50].

Unter Ausnutzung dieses generellen Prinzips wurde eine Reihe von FRP-basierten Biosensoren zur Quantifizierung der verschiedensten intrazellulären Parameter entworfen. Hierzu wird eine Sensordomäne (z.B. für einen intrazellulären Metabolit wie Ca^{2+} , Glucose oder Citrat) zwischen Donor- und Akzeptor-FRP fusioniert [29, 51, 52, 53]. Bei einer durch die Bindung des Metaboliten induzierten Konformationsänderung der Sensordomäne wird im Biosensor die Orientierung und damit die FRET-Effizienz zwischen Donor- und Akzeptor-FRP moduliert. Dies erlaubt im Idealfall eine Quantifizierung des Metaboliten in der Zelle [54, 51]. In gleicher Weise finden isolierte FRPs in der Biosensorik Anwendung. Hierbei wird z.B. der Effekt, dass es durch die Bindung eines Ions

oder Liganden zu einer Änderung der Spektraleigenschaften des Reporterproteins kommt, genutzt [55, 56]. So können Änderungen des pH-Werts [57] oder der Chlorid-Konzentration [58] visualisiert und quantifiziert werden.

Überdies können mittels FRET Protein-Protein Interaktionen *in vivo* und *in vitro* untersucht werden [59, 60, 30, 61, 50]. FRET Experimente sind methodisch anspruchsvoll, da jedes Fluorophor ein Fluoreszenzsignal liefern muss. Um die gegenseitige Wechselwirkung der beiden Fluorophore nachzuweisen, müssen geringe Intensitätsänderungen oder die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donor- oder Akzeptor-Fluorophors ermittelt werden [62]. Diese Schwierigkeit wird überwunden, wenn das Fluoreszenzsignal erst bei einer tatsächlichen Interaktion detektiert wird. Dieses kann mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation erreicht werden. Hier wird z.B. GFP in zwei Teile getrennt (*split*-GFP), welche an die jeweiligen Interaktionspartner fusioniert werden. Bei Interaktion der beiden Zielproteine wird intaktes GFP rekonstituiert, sodass ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann [39, 42].

Die Vielzahl der hier lediglich exemplarisch zusammengefassten Anwendungsmöglichkeiten verdeutlicht die immense Bedeutung von FRPs für die Naturwissenschaften.

1.4 FRPs zur Untersuchung biotechnologischer Produktionsprozesse

Alle im vorherigen Kapitel 1.1 angesprochenen Verwendungsmöglichkeiten von FRPs in den allgemeinen Biowissenschaften lassen sich im Prinzip direkt auf biotechnologische relevante Anwendungsbereiche übertragen. Dennoch ist die direkte Anwendung von GFP basierten FRPs in der "Weißen Biotechnologie" weit weniger verbreitet als in den anderen Lebenswissenschaften, wie z.B. der Medizin oder den Neurowissenschaften.

1.4.1 Anwendung von FRPs als Reporter heterologer Proteinüberproduktion und zur Visualisierung und Verfolgung ganzer Zellen

Eine der ersten Anwendungen von GFP in der Biotechnologie war der Einsatz als Reporter zur Online-Analyse heterologer Proteinüberproduktionsprozesse [63]. So wurde z.B. die Produktion von Proinsulin in *E. coli* mittels eines Fusionsproteins bestehend aus einer Variante des menschlichen Proinsulins und YFP als Reporter verfolgt und optimiert [63]. Die wahrscheinlich am weitesten verbreitete

Anwendung von GFP-FRPs ist jedoch die Verfolgung oder Markierung ganzer Zellen. Dieser Ansatz wurde in der Umweltbiotechnologie verstärkt eingesetzt, um z.B. Schadstoff-abbauende Bakterien im Boden zu verfolgen oder um mikrobielle Populationen in Biofilmen zu analysieren. In ähnlicher Weise kann unter Verwendung genetisch modifizierter, Arsen-resistenter Bakterien Arsenbelastung im Trinkwasser [64] oder der Sprengstoff Trinitrotoluol [65] durch Fluoreszenzemission nachgewiesen werden.

1.4.2 Biotechnologische Anwendung von FRP-basierter Biosensorik

Darüber hinaus wurden GFP und verwandte Proteine als Reporter zur Überwachung von Bioprozessparametern eingesetzt. Häufig kommen hierbei transkriptionelle Fusionen mit einem Promotor zum Einsatz, welcher abhängig von dem zu untersuchenden Umwelt- oder Prozessparameter (z.B. pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt) aktiviert wird [63]. In ähnlicher Weise können FRPs zur Optimierung von Produktionsprozessen eingesetzt werden [66, 63, 67]. Hierbei ist insbesondere die Bioprozessoptimierung von Fermentationsprozessen im großen Maßstab ein schnell wachsendes Interessengebiet [68, 69]. Von besonderer Gewichtung ist, ob und wie zelluläre Heterogenität Fermentationsprozesse im großen Maßstab beeinflussen, da davon ausgegangen wird, dass in einem Fermentationsreaktor heterogene Zustände vorherrschen. Durch diese genetische und nicht-genetische (Umwelt-) Heterogenität befinden sich die Zellen vermutlich in unterschiedlichen Zuständen, was eine optimale Ausnutzung der Stoffproduktion verhindert [70, 71]. Um Zellheterogenität vorzubeugen finden inzwischen Methoden wie die Durchflusszytometrie in Kombination mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) Anwendung [72]. In einem FACS-Gerät passieren Zellen sehr schnell einen Anregungslaser sowie eine entsprechende Detektoroptik und werden anschließend entsprechend ihrer Fluoreszenzeigenschaften mit einem angelegten elektronischen Feld abgeleitet und somit sortiert [72]. So können unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Zellen in verschiedene Reagenzgefäße sortiert werden. Dabei erlaubt FACS, Zellen mit einem sehr hohem Durchsatz (1000 Zellen/s) zu sortieren [73]. Ein Beispiel für die biotechnologische Anwendung des FACS ist die Metabolit Detektion und Quantifizierung einzelner Bakterienzellen mit Hilfe eines Biosensor/FACS-Systems, das den intrazellulären Nachweis von L-Methionin oder verzweigten Aminosäuren ermöglicht [74]. Als Biosensor wurde hierbei der transkriptionelle Regulator Lrp aus *Corynebacterium glutamicum* verwendet. Dieser aktiviert als Reaktion auf erhöhte intrazelluläre L-Methionin, L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin Konzentrationen die Expression des Aminosäuretransporters BrnFE [74]. Im Biosensor-System wurde das FRP eYFP (*enhanced YFP*) unter die Kontrolle des Lrp-Promotors gestellt. Bei Erhöhung der intrazellulären Konzentration der oben genannten Aminosäuren kommt es zur Expression des FRPs. Somit können Aminosäureüberproduzenten anhand ihrer erhöhten Fluoreszenz identifiziert und mittels FACS aussortiert werden [75]. In weiteren

Experimenten wurde diese Methodik verwendet, um diejenigen Zellen auszusortieren, die nach Zufallsmutagenese eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Ziel-Aminosäuren aufwiesen [75]. So konnte ein Produktionsstamm identifiziert werden, welcher 78-fach mehr L-Methionin produziert als der entsprechende Wildtypstamm [75].

1.4.3 Nachteile vom "Klassiker" GFP

Trotz der weiten Verbreitung und des extensiven Einsatzes besitzen alle vom GFP abgeleiteten FRPs sowie alle *Anthozoa*-FRPs einige für verschiedenste Anwendungen nachteilige Eigenschaften. So benötigen alle GFP-ähnlichen Proteine für die Reifung des Chromophors molekularen Sauerstoff. Der erste Schritt der GFP Chromophorreifung ist eine Reihe von Anpassungen des Torsionswinkels im Polypeptidrückgrat während der Ausbildung der Tertiärstruktur. Durch die korrekte Ausrichtung der Aminosäuren gelangen Serin 65, Tyrosin 66 und Serin 67 in eine Position, in der ein nukleophiler Angriff des Amidstickstoffs des Glycin 67 auf die Carbonylgruppe des Serin 65 möglich ist. Diesem nukleophilen Angriff folgt eine Dehydratisierung, die zur Bildung eines heterocyclischen Imidazolin-5-on-Ringsystems führt. Fluoreszenz tritt erst auf, nachdem die $C\alpha$ - $C\beta$ -Bindung des Tyrosin 66 im GFP unter Wasserabspaltung durch molekularen Sauerstoff oxidiert wird (Abbildung 1.3) [30]. Das so entstehende *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidon verleiht dem GFP seine Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften. Nach der vollständigen Chromophorreifung (Abbildung 1.3) ist die GFP Fluoreszenz

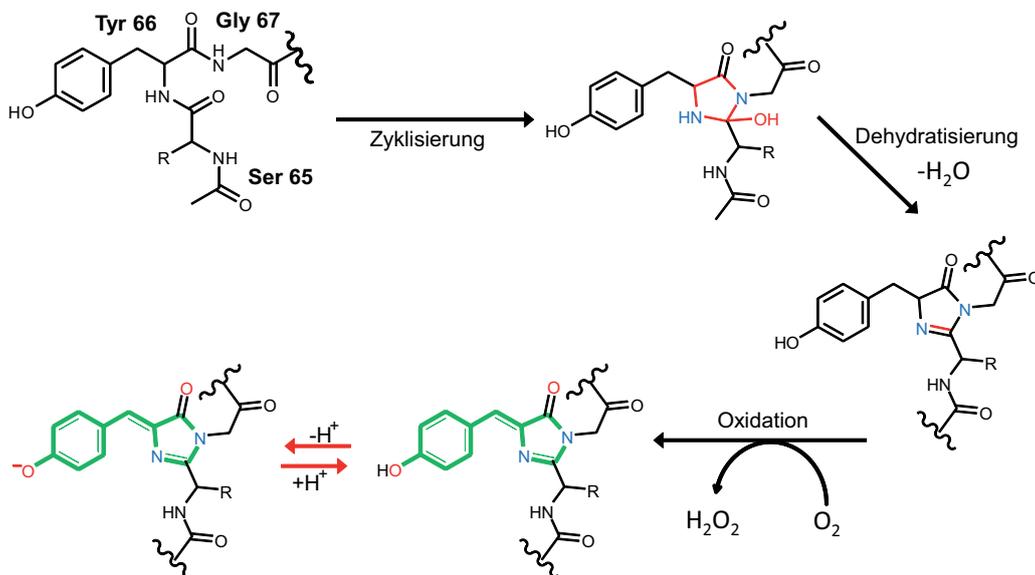


Abbildung 1.3: Reaktionsverlauf der Chromophorreifung bei GFP [76]. Bei dieser Reaktion kommt es zunächst zu einer spontanen intramolekularen Zyklisierung. Anschließend erfolgt eine Dehydratisierung gefolgt von einer Oxidationsreaktion. Diese Reaktionen finden unter Beteiligung der Aminosäuren Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67 statt. Das Ergebnis ist ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidon mit einem konjugierten π -Elektronensystem, das für die spektralen Eigenschaften des Proteins verantwortlich ist.

unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff.

Ein weiterer großer Nachteil von GFP ist, neben der Sauerstoffabhängigkeit bei der Chromophorreifung, sein relativ hohes Molekulargewicht (30 kDa). Die Größe von GFP und dessen Farbvarianten kann z.B. bei der Erzeugung von komplexen Fusionsproteinen problematisch sein, da unter Umständen die native Faltung, Funktion oder Translokation solcher Proteine beeinflusst werden kann [42]. In den letzten Jahren wurde vermehrt versucht, diese Probleme durch die Etablierung alternativer FRPs zu lösen. Hierbei fanden vor allem Chromoproteine Verwendung, welche für ihre native Funktion die Bindung eines Chromophors benötigen. So wurden vor allem bakterielle und pflanzliche Photorezeptoren der *light, oxygen, voltage* (LOV)- [77], *photoactive yellow protein* (PYP)- [78] und Phytochrom (Phy)- [79, 80] Familie eingesetzt. Diese Proteine binden verschiedene Kofaktoren als so genanntes Licht-sensitives Chromophor. Dieses Chromophor verleiht dem jeweiligen Photorezeptorprotein seine Farbe und ermöglicht die Absorption von Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums. Die natürlichen Photorezeptoren sind hierbei in der Regel wenig fluoreszent, da der größte Teil der durch Lichtabsorption aufgenommenen Anregungsenergie in strukturelle Änderungen des Photorezeptors umgesetzt wird. Durch gezielte Mutagenese der entsprechenden Photorezeptorproteine konnte die Photochemie so angepasst werden, dass ein großer Teil der nach Absorption aufgenommenen Anregungsenergie über radiative, d.h. Fluoreszenzprozesse, wieder abgegeben wird. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die verschiedenen Photorezeptorsysteme und deren Anwendung als FRP gegeben werden.

1.4.4 Neue Photorezeptor-basierte FRPs

Alle Lebewesen wurden durch Evolution den vorherrschenden Bedingungen durch natürliche Selektion angepasst. So entstanden verschiedene Überlebensstrategien zur effektiven Anpassung an geänderte Umweltbedingungen. Eine solche Evolutions-biologisch wichtige Anpassungsstrategie war die Ausbildung von Sensorproteinen, die es ermöglichen, chemische und physikalische Umweltreize zu erfassen, zu quantifizieren und auf diese zu reagieren. Neben diversen Chemosensoren [53, 81] kommen in der Natur verschiedenste, lichtsensitive Proteine vor, welche es dem Organismus erlauben, auf geänderte Lichtbedingungen (als physikalischen Reiz) zu reagieren [82]. Diese Angepasstheit war für viele photosynthetische Organismen essentiell, da diese Licht als Energiequelle nutzen. Zusätzlich zu ihrer biologischen Relevanz sind Photorezeptoren exzellente Modelle zur Untersuchung der Signalübertragung. Sie können mit kurzen Lichtimpulsen angeregt und ihr Verhalten bzw. ihre strukturellen Eigenschaften mit optischen oder spektroskopischen Methoden beobachtet werden. In der Regel bestehen Photorezeptoren aus einem Proteinteil (Apo-Protein) und einem Kofaktor (Chromophor). Wenn durch das Chromophor Licht absorbiert wird, verändert sich die Konfiguration des Chromophors, was zur Konformationsänderung des Proteins und zur Ausbildung eines Signalzustands

des Rezeptors führt. Durch diesen Vorgang wird Licht in ein strukturelles Signal übersetzt, welches letztendlich eine physiologische Antwort der Zelle ermöglicht. Um Photorezeptoren (Abbildung 1.4) besser einordnen zu können, wurden sie anhand ihrer Chromophor-Kofaktoren klassifiziert [83]. So werden Rhodopsine, die Retinal als ihren Chromophor binden, Phytochrome, die lineare Tetrapyrrole binden, Xanthopsine, die *para*-Hydroxycimtsäure (*pCA*) binden und letztlich die Flavin-bindenden Photorezeptoren unterschieden. Die Gruppe der Flavin-bindenden Photorezeptoren wird weiterhin aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in folgende Unterklassen unterteilt: Cryptochrome (CRYs), die *Blue Light using FAD* Sensorfamilie (BLUFs) und *light, oxygen, voltage* (LOV)-Proteine. CRYs und BLUFs binden Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Im Gegensatz dazu binden die Proteine der LOV-Photorezeptorfamilie Flavinmononukleotid (FMN) als Chromophor.

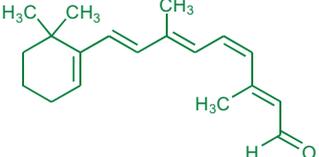
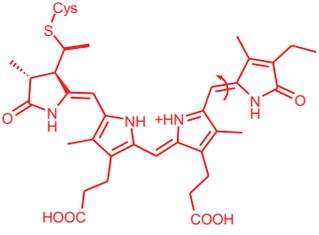
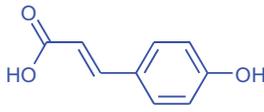
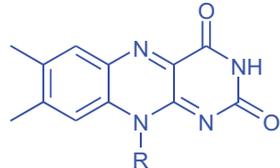
KLASSE	BEISPIEL	STRUKTURELEMENT	PHOTOSENSOR-FAMILIE
Polyene	Retinal		Rhodopsine
Tetrapyrrole	<i>cis</i> -Phytochromobilin		Phytochrome
„Aromaten“	<i>p</i> -Coumarinsäure		Xanthopsine
	Flavin		Cryptochrome BLUF Proteine LOV Proteine

Abbildung 1.4: Einteilung der Photorezeptoren auf Basis ihrer lichtabsorbierenden Chromophore in unterschiedliche Klassen. Die wichtigsten Vertreter sind die Rhodopsine, die Phytochrome, die Xanthopsine, die Cryptochrome, die LOV- und BLUF-Proteine. (Adapted with permission from [83]. Copyright (2004) American Chemical Society.)

Die wichtigste Klasse der Photorezeptoren neben den blaulichtabhängigen Proteinen sind die rot- und dunkelrotlicht-sensitiven Phytochrome. Sie messen unter anderem das Verhältnis von hellrotem

zu dunkelrotem Licht, und steuern so das Pflanzenwachstum in Abhängigkeit des Licht/Schatten-Regimes [84]. In Pflanzen sind sie an nahezu allen lichtabhängigen Prozessen, wie der Samenkeimung, der Deetiolerung, der Blüten- oder Fruchtbildung sowie der Kontrolle der zirkadianen Rhythmik beteiligt [85, 86]. Sie kommen jedoch nicht bloß im Pflanzenreich vor, sondern sind ebenfalls in Prokaryoten weit verbreitet [87, 80, 88, 89]. Beispiele sind die cyanobakteriellen und die bakteriellen Phytochrome. Cyanobakterielle Phytochrome sind in der Lage Phycocyanobilin an einen konservierten Cysteinrest in der GAF-Domäne (minimale Einheit, die autokatalytisch lineare Tetrapyrrole bindet) zu binden [90]. Bakterielle Phytochrome binden das Tetrapyrrol Biliverdin über eine Thioetherbrücke an einen konservierten Cysteinrest [91]. Varianten pflanzlicher, bakterieller und cyanobakterieller Phytochrome wurden für den Einsatz als infrarotfluoreszente Reporterproteine (IFPs) optimiert. Die Vorteile dieser Systeme liegen hierbei auf der Hand. Infrarotes Licht durchdringt biologische Materie viel leichter als z.B. grünes oder blaues Licht. Demzufolge eignen sich Phytochrom-basierte IFPs hervorragend für bildgebende Anwendungen an bzw. in lebenden Organismen wie Mäusen [92, 93, 94].

Interessanterweise existiert in Pflanzen, Pilzen und Bakterien ein breites Spektrum an verschiedenen Blaulicht-Photorezeptoren. Mit Ausnahme der Proteine der PYP Familie, sind Sensorsysteme der Cryptochrom-, BLUF- und LOV-Familien in nahezu allen Organismenreichen ubiquitär verbreitet.

1.5 Blaulicht-Photorezeptoren

Proteine der PYP-Familie sind die einzigen Vertreter der Xanthopsin Photorezeptorklasse. Bisher wurden 14 verschiedene PYPs in 12 verschiedenen Mikroorganismen entdeckt. Alle bisher beschriebenen PYPs binden *p*CA als Chromophor, welche durch eine Thioesterbindung mit einem Cysteinrest kovalent im Protein verankert wird [95]. Die physiologische Rolle von PYPs ist weitgehend ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, welche auf eine Rolle bei der Regulation des phototaktischen Verhaltens von *Halorhodospira halophila* hindeuten [96]. Ein definitiver experimenteller Nachweis fehlt jedoch weiterhin.

PYP ist ein kleines, gut wasserlösliches, im Cytosol lokalisiertes Protein (14 kDa, 125 Aminosäuren) mit einer maximalen Absorptionswellenlänge von $\lambda_{\max} = 430$ nm. Bei Belichtung mit Blaulicht durchläuft das native PYP einen Photozyklus, bei dem es zur *cis/trans*-Isomerisierung einer Doppelbindung im *p*CA-Chromophor kommt. Diese Änderung der Chromophor-Konfiguration hat eine massive strukturelle Änderung im Protein zur Folge. PYP ist der strukturelle Prototyp der Per-ARNT-Sim (PAS)-Faltungsfamilien. PAS ist das Akronym der drei zuerst identifizierten Proteine die dieses Faltungsmuster besitzen: das in *Drosophila* identifizierte Protein Per (*Peroid*), das im Menschen identifizierte Protein ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator*) und das *Drosophila* Protein SIM (*single-minded*) [97, 98]. PAS-Domänen besitzen häufig Kofaktoren und

kommen in allen drei phylogenetischen Reichen vor. Diese wichtige Signaltransduktionsmodule kontrollieren z.B. die Änderung von Lichtverhältnissen, des Sauerstoffgehalts und des Redoxpotentials in der Zelle [99, 100]. Eine interessante Beobachtung, die PYP gleichzeitig attraktiv als Reporterprotein erscheinen lässt, ist seine hohe Säurestabilität (pH 2,5) [103]. Erklären lässt sich diese durch die chemischen Eigenschaften des gebundenen *p*CA-Chromophors (Abbildung 1.5 c)). Dieses verhält sich signifikant unterschiedlich zum Retinal (in Rhodopsinen), welches über eine Schiff'sche Base gebunden ist. Es ist unmöglich das Chromophor unter Bedingungen, die das Gleichgewicht der Schiff'schen Base nicht stören, vom PYP-Apo-Protein zu lösen. Sogar SDS-induzierte PYP-Denaturierung führt nicht zur Chromophorlösung [103]. Außerdem existiert *H. halophila* in seinem Lebensraum unter extremem osmotischen Stress sowie hohen Temperaturen. Somit ist es wenig verwunderlich, dass PYP selbst bei Temperaturen von 82 °C immer noch stabil ist [104]. Diese hohe Thermostabilität sollte es prinzipiell erlauben, Experimente bei extrem hohen Temperaturen durchzuführen. PYP weist bei extrem niedrigen Temperaturen von -80,15 °C Stabilität auf [105]. Ein weiterer Vorteil des PYPs ist

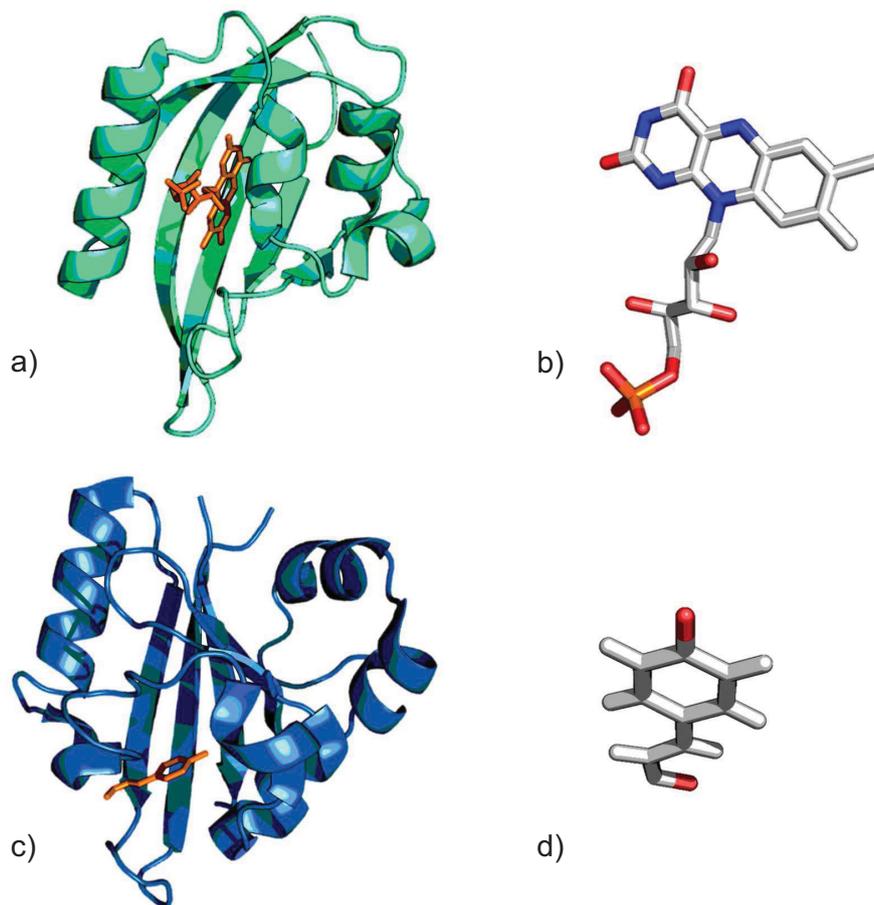


Abbildung 1.5: Dargestellt ist die LOV-Domäne des YtvA-Proteins aus *Bacillus subtilis* (PDB: 2PR6) [101] (a) neben seinem Chromophor Flavinmononukleotid (b)) und das PYP aus *Halorhodospira halophila* (PDB: 1NWZ) [102] (c)) mit seinem Chromophor *p*CA (d)). Im Hinblick auf die Zusammensetzung und Anordnung der α -Helices und β -Stränge weisen beide Strukturen eine gewisse Ähnlichkeit auf. Die Bindung des Chromophors erfolgt in beiden Proteinen über ein Cystein.

sein geringes Molekulargewicht. Mit etwa 15 kDa [106] ist es so groß wie LOV-Domänen und somit lediglich halb so groß wie GFP. Ebenso wie im Falle der LOV-Systeme ist die Chromophorbiosynthese unabhängig von molekularem Sauerstoff [107]. Diese Vorzüge machen PYP interessant für die Anwendung in der Biotechnologie. Dennoch besitzt PYP einige Nachteile, welche eine Anwendung vor allem als *in vivo* Fluoreszenzreporter komplizieren. Durch die geringe Fluoreszenz des natürlichen Chromophors *pCA* ($\Phi_F = 0,006$) [108] ist es von Vorteil, das stark fluoreszierende *pCA*-Analogon 7-Hydroxycoumar-3-carbonsäure (*trans*-locked-*pCA*) zu verwenden. Beide Fluorophore können jedoch nicht ohne Weiteres von der Zelle biosynthetisch produziert werden. Sie müssen daher der Zelle entweder von außen zugeführt oder nach Reinigung des Apo-PYPs *in vitro* an das Protein gebunden werden. Trotz dieser Problematik wurde PYP als alternativer Fluoreszenzreporter verwendet [109]. Eine strukturell mit PYP verwandte Familie von Blaulicht-Photorezeptoren ist die Familie der sogenannten LOV-Photorezeptoren. LOV-Proteine gehören, wie PYP, zur PAS-Faltungsfamilie, binden jedoch Flavine wie FMN als Chromophor (Kapitel 1.4.4) [110]. Der wohl bekannteste Vertreter der LOV-Photorezeptor-Proteine ist das pflanzliche Phototropin [83]. Phototropine (Phots) besitzen zwei amino-terminale LOV-Domänen (LOV1 und LOV2) als lichtsensitive Sensormodule [111] und eine carboxy-terminale Serin/Threonin-Kinase-Domäne als potentiellen Effektor. Phots regulieren blaulichtabhängige Prozesse in Pflanzen, wie die Ausrichtung der pflanzlichen Sprossachse in Richtung einer Blaulichtquelle. Weitere Phototropinkontrollierte Prozesse in Pflanzen sind z.B. die Chloroplastenbewegung und Stomataöffnung [112, 113]. In *Arabidopsis thaliana* reguliert z.B. das Phototropin 1 (Phot1) den Phototropismus des Hypokotyls und der Wurzel [114] und das Phototropin 2 (Phot2) die lichtabhängige Chloroplastenbewegung [111].

Interessanterweise sind LOV-Proteine, über alle Reiche des Lebens verteilt [115]. So kommen LOV-Photorezeptoren in allen Grünpflanzen (*Viridiplantae*), in Pilzen wie *Neurospora crassa*, so wie in chemotrophen Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Brucella abortus* und *Pseudomonas putida* vor [116, 117, 118, 115]. Das YtvA-Protein aus *B. subtilis* [110] stellt hierbei das am besten charakterisierte bakterielle LOV-Protein dar (Abbildung 1.5). Es setzt sich aus einer Amino-terminalen LOV-Sensor- und einer Carboxy-terminalen Sulfat Transporter Anti-Sigma Faktor Antagonist (STAS) Effektor-Domäne [119] zusammen. In *B. subtilis* spielt es bei der Einleitung der Blaulicht-induzierten Stressantwort eine Rolle [120]. Die Blaulichtsensitivität von LOV-Domänen beruht hierbei essentiell auf der blaulichtabhängigen Photochemie des FMN-Chromophors. Alle bisher beschriebenen LOV-Proteine durchlaufen denselben Photozyklus [88], welcher exemplarisch für das YtvA-Protein in Abbildung 1.6 dargestellt ist.

Im Dunkeln liegt das FMN-Molekül im Grundzustand des Photozyklus nicht-kovalent gebunden in der LOV-Domäne vor. Es weist in diesem Zustand ein für gebundenes FMN typisches Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 447$ nm auf. Dieser Zustand wird deshalb als LOV447 bezeichnet. Bei Anregung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 447 nm kommt es zu einer elektronischen Anregung des FMN-Moleküls in den ersten angeregten Singulettzustand (Abbildung 1.1). Dieser Zustand ist in-

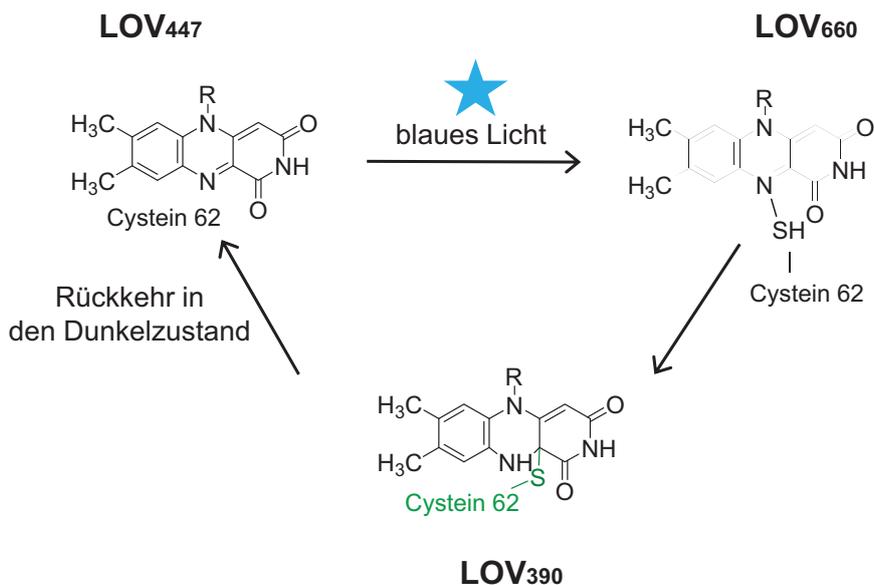


Abbildung 1.6: Schema des LOV-Photozyklus am Beispiel des YtvA-Proteins [118]. Aus dem Dunkelzustand LOV447, in dem FMN nicht-kovalent im Protein gebunden vorliegt, wird der FMN-Chromophor nach Beleuchtung mit Blaulicht in den ersten angeregten Singulett Zustand (S_1) angeregt. Es kommt innerhalb weniger ns zur Ausbildung des FMN Tripletzzustands (LOV660) durch *intersystem crossing*. Innerhalb von μs wird aus dem Tripletzzustand heraus eine kovalente Bindung zwischen dem Kohlenstoff an der Position 4a des FMNs und einer konservierten Cysteinseitenkette des LOV-Proteins ausgebildet. Dieser Zustand wird als langlebigster Zustand im LOV-Protein als Signalzustand oder Lichtzustand (LOV390) bezeichnet. Der Dunkelzustand (LOV447) wird wiederhergestellt, indem die entstandene kovalente Bindung zwischen Chromophor und Protein in Dunkelheit thermisch gelöst wird.

stabil und zerfällt teilweise [121], wobei während des Übergangs in den Grundzustand Licht in Form von Fluoreszenz emittiert wird. Der verbleibende Teil der angeregten FMN-Moleküle geht durch Spinumkehr (*intersystem crossing*) vom ersten angeregten Singulettzustand in den angeregten Tripletzzustand (LOV660) über, welcher ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$ besitzt [122]. Eine Identifizierung dieser teilweise extrem kurzlebigen Zustände ist nur mittels schneller absorptionspektroskopischer Methoden wie der Laserblitzlichtphotolyse (*laser flash photolysis*) möglich [110]. LOV660 zerfällt innerhalb weniger Mikrosekunden in den Licht- oder Signalzustand LOV390, wobei es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C4a Atom des FMN-Isoalloxazinrings und der Thiolgruppe eines in LOV-Domänen vollständig konservierten Cysteinrests kommt (YtvA, C62) [110, 123]. Im Lichtzustand besitzt das Protein kein Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$, sondern ein in den blauen Wellenlängenbereich verschobenes Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$. Daher kann im Lichtzustand keine elektronische Anregung des FMNs erfolgen, sodass keine Fluoreszenzemission möglich ist [124]. Die kovalente Bindung zwischen Protein und FMN wird im Dunkeln innerhalb von Sekunden bis Stunden, je nach LOV-Protein, thermisch aufgelöst, wobei das Protein in den Grundzustand LOV447 zurückkehrt [124]. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem FMN-Chromophor und dem Protein nach Anregung mit Blaulicht stellt hierbei das Hauptproblem für die Nutzung von LOV-Proteinen als FRP dar. Der Grund hierfür ist, dass die resultierende intrinsische Fluoreszenz lediglich eine geringe Intensität aufweist und nach wenigen Mikrosekunden in einen

nicht-fluoreszenten Zustand (Lichtzustand, LOV390) übergeht. Bevor eine erneute Anregung und somit Fluoreszenzemission möglich ist, muss der Grundzustand wieder erreicht werden, was je nach Protein Sekunden bis mehrere Stunden dauern kann [122, 125]. Um LOV-Proteine als Fluoreszenzreporter benutzen zu können, musste mittels Mutagenese die schwache intrinsische Fluoreszenz der LOV-Proteine erhöht bzw. die Ausbildung des kovalenten FMN-Cysteinylthioladduktes unterbunden werden.

1.6 Neuartige Fluoreszenz-Reporter basierend auf bakteriellen LOV-Proteinen

Im Jahre 2007 wurden LOV-Proteinvarianten entwickelt, welche eine erhöhte Fluoreszenzemission besitzen. In diesen, als FMN-basierte fluoreszente Proteine (FbFPs) bezeichneten LOV-Varianten, wurde der photoaktive Cysteinrest (C62 in YtvA) durch einen nicht-polaren Alaninrest ersetzt. In FbFPs ist daher durch Substitution des photoaktiven Cysteinrests die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen FMN und Protein unterbunden. Da jedoch eine elektronische Anregung des FMN-Moleküls bei Beleuchtung nicht verhindert werden kann, wird in der entsprechenden LOV-Variante die Rückkehr des FMN-Moleküls aus dem ersten angeregten Singulettzustand in den Grundzustand über Abgabe von Licht in Form von Fluoreszenz bevorzugt. Dieser Übergang erfolgt im Nanosekunden-Bereich und äußert sich daher in *steady-state* Fluoreszenz Messungen als Dauerfluoreszenz [77]. Ein Übergang aus dem ersten angeregten Singulett- in den Triplettzustand unter Spinumkehr ist weiterhin möglich, jedoch ist eine direkte Rückkehr aus dem Triplett- in den Grundzustand unter Abgabe von Phosphoreszenz aufgrund des verbotenen Spinübergangs entsprechend unwahrscheinlich und daher langsamer (Abbildung 1.1). Außerdem werden Phosphoreszenz-Prozesse in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff bei Raumtemperatur effektiv gequench [126]. Der Vorteil von FMN-basierten Fluoreszenzreporter-Systemen basierend auf pflanzlichen und bakteriellen LOV-Domänen gegenüber dem GFP liegt hierbei darin, dass die Biosynthese des FMN-Kofaktors unabhängig von Sauerstoff ist. Somit benötigen FbFPs keine Zeit zum Maturieren wie GFP und verwandte Proteine und sind somit völlig unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff.

FbFPs fanden als Reporterproteine bereits in unterschiedlichsten Applikationen und Systemen Verwendung. Hauptaugenmerk aller bisherigen Anwendungen war hierbei der Einsatz von FbFPs als Sauerstoffunabhängige FRPs [77, 44]. So konnte in einem Echtzeit-*in vivo*-Experiment in *E. coli* gezeigt werden, dass FbFPs unter limitierender Sauerstoffzufuhr z.B. aufgrund sehr schnellen Zellwachstums als quantitativer Fluoreszenzreporter dem YFP-Protein überlegen sind [44]. Ebenfalls erfolgreich war die Expression von FbFPs unter sauerstofflimitierenden Bedingungen in Hefen [127], *Rhodobacterales* [77] und obligat aneroben *Bacteroidales* [128]. Aufgrund seiner geringen Größe (ca.

10 kDa) konnte ein FbFP basierend auf der LOV2-Domäne des pflanzlichen Phototropins als Lokalisationsreporter für Virusübertragung im Pflanzensystem verwendet werden [129, 94]. Zur Untersuchung von Lokalisierungs- und Transportprozessen sowie zur Quantifizierung der Proteinexpression werden FRPs häufig in sogenannten Translationsfusionen verwendet. Hierfür wird eine Genfusion, bestehend aus dem FRP kodierenden Genfragment und dem für das entsprechende Zielprotein kodierenden Gen, erzeugt. Das resultierende Fusionsprotein besteht aus beiden Proteinmodulen: dem fluoreszenten Reporter sowie dem entsprechenden Zielprotein. GFP und verwandte Proteine wurden bereits ausführlich bezüglich ihrer Eigenschaften als Fusionspartner erforscht [130, 131, 132, 129]. Für bakterielle FbFPs wurde eine Anwendbarkeit als Fusionspartner in einer translationalen Fusion bisher noch nicht ausreichend untersucht. Um in *in vivo* Studien Anwendbarkeit zu finden, muss für die Fusion sowohl die Funktionalität des FbFPs als auch die des Fusionspartners erhalten bleiben. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Evaluierung der Fusionierbarkeit eines bakteriellen FbFPs an drei verschiedene Enzyme. Die verwendeten Zielenzyme unterschieden sich hierbei sowohl in ihrer Enzymklasse, in der von ihnen katalysierten Reaktion, als auch in ihrer Quartärstruktur. Bei den hier untersuchten Enzymen handelt es sich um die Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BsLA), welche ein monomeres Kofaktor-unabhängiges Enzym ist. Des Weiteren wurde die dimere Hydroxynitrillyase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) [133] sowie die tetramere Kofaktor-abhängige Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (PfbAL) [134] verwendet. Diese Enzyme wurden hierbei entsprechend ihrer Komplexität bezüglich ihrer Quartärstruktur (Monomer, Dimer, Tetramer) als auch bezüglich ihrer Kofaktorabhängigkeit ausgewählt. Im folgenden Abschnitt werden die verschiedenen komplexen Enzyme näher beschrieben.

1.7 Die Lipase A aus *Bacillus subtilis*

Lipasen (Carboxylesterasen, EC 3.1.1.3) sind aufgrund ihrer Stabilität und ihres breiten Substratspektrums bei gleichzeitig hohen Regio-, Chemo- und Enantioselektivitäten [135] biotechnologisch häufig verwendete Enzyme [136]. In wässrigen Systemen katalysieren Lipasen bevorzugt die Hydrolyse wasserunlöslicher Triacylglyceride zu Di- und Monoacylglyceriden bzw. zu Glycerol und den korrespondierenden Fettsäuren. Unter wasserfreien Bedingungen katalysieren Lipasen Estersynthesen durch Esterifizierungs-, Interesterifizierungs- und Transesterifizierungsreaktionen [137]. Das ständig wachsende Interesse an dieser Enzymklasse erklärt sich durch ihre biotechnologisch vielseitige Verwendbarkeit und der Tatsache, dass Lipasen ihre katalytische Aktivität in organischen Medien beibehalten, was für viele industrielle Prozesse von Vorteil ist [138].

Lipasen werden in nahezu allen Lebewesen gefunden [139]. Aufgrund ihrer Stabilität, ihrer einfachen Expression in Mikroorganismen und der unproblematischen Reinigung aus dem Zellrohextrakt ist es nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl mikrobieller Lipasen inzwischen käuflich zu erwer-

ben sind und ihnen in der Biokatalyse eine große Bedeutung beigemessen wird. Einige wichtige Lipase-produzierenden Bakteriengattungen sind *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* und *Chromobacterium* [140].

Lipasen nehmen heutzutage eine Schlüsselposition im industriellen Enzymsektor ein [141, 142, 143, 136]. Die meisten Lipasen aus niederen eukaryotischen Organismen wie *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* und *Aspergillus* sp. haben jedoch, bis auf CalB aus *Candida antarctica*, eine eher geringe industrielle Bedeutung [144]. Die bekannteste tierische, biotechnologisch relevante Lipase ist die Pankreaslipase des Schweins [145]. Industrielle Verwendung finden Lipasen z.B. als fettabbauende Enzyme in Waschmitteln [146, 147], in der Lebensmittelindustrie zur Herstellung von Käse [148], sowie in der chemischen Industrie zur Herstellung von chiralen Aminen [149].

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens besitzen Lipasen unterschiedliche und zum Teil weit auseinander liegende Temperatur- und pH-Optima, sowie unterschiedliche Stabilitäten [150, 151]. Bakterielle Lipasen zeichnen sich grundsätzlich durch ein breites pH-Stabilitäts- und pH-Aktivitätsspektrum aus [136]. Jedoch besitzen die meisten Lipasen ein pH-Optimum im neutralen bis alkalischen Bereich. Eine Lipase mit alkalischem pH-Optimum ist z.B. die in dieser Arbeit verwendete BsLA [152], wohingegen die Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* eines der wenigen Beispiele für Lipasen mit einem sauren pH-Optimum darstellt [153].

Wird die dreidimensionale Struktur von Lipasen betrachtet, lässt sich ein über alle phylogenetischen Reiche hinweg konserviertes Faltungsmuster, die sogenannte α/β -Hydrolasefaltung, erkennen. Dabei handelt es sich um eine konservierte strukturelle Anordnung, wobei das β -Faltblattgerüst aus sieben parallelen und einem antiparallelen Strang besteht, welches von sechs α -Helices umgeben wird. Das aktive Zentrum der α/β -Hydrolasen besteht aus einer katalytischen Triade, welche aus einem nukleophilen Aminosäurerest, einem sauren Aminosäurerest und einem Histidinrest aufgebaut ist (Abbildung 1.7). So wird z.B. das aktive Zentrum der BsLA durch eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Aspartat 133, Histidin 156 und Serin 77 gebildet [154]. Bei manchen Lipasen (z.B. aus *Geotrichum candidum*) ist Aspartat durch Glutamat ersetzt [155].

Die meisten Lipasen sind grenzflächenaktivierte Enzyme. Das heißt, dass sie im wässrigen Medium zunächst inaktiv oder wenig aktiv sind. Eine Aktivitätserhöhung ist zu beobachten, wenn die kritische mizellare Konzentration (*critical micellar concentration*, CMC) für das lipophile Substrat überschritten wird [156, 157]. Die Aktivierung der Lipase findet hierbei an der Grenzfläche zwischen der Mizelle und der wässrigen Phase statt [157]. Die Grenzflächenaktivierbarkeit ist hierbei in der Regel mechanistisch auf eine sogenannte "Deckelstruktur" (*lid*) zurückzuführen. Diese deckt in der geschlossenen Konformation (in Abwesenheit von Substratmolekülen) das aktive Zentrum ab. In Anwesenheit von Substrat-Mizellen interagiert die Lipase mit der Oberfläche der Mizelle wobei sich der "Deckel" öffnet und die Enzymaktivität erhöht wird. Dieses Phänomen wird als Interphasenaktivierung oder Grenzflächenaktivierung bezeichnet [158]. Hinsichtlich dieser Eigenschaft stellt

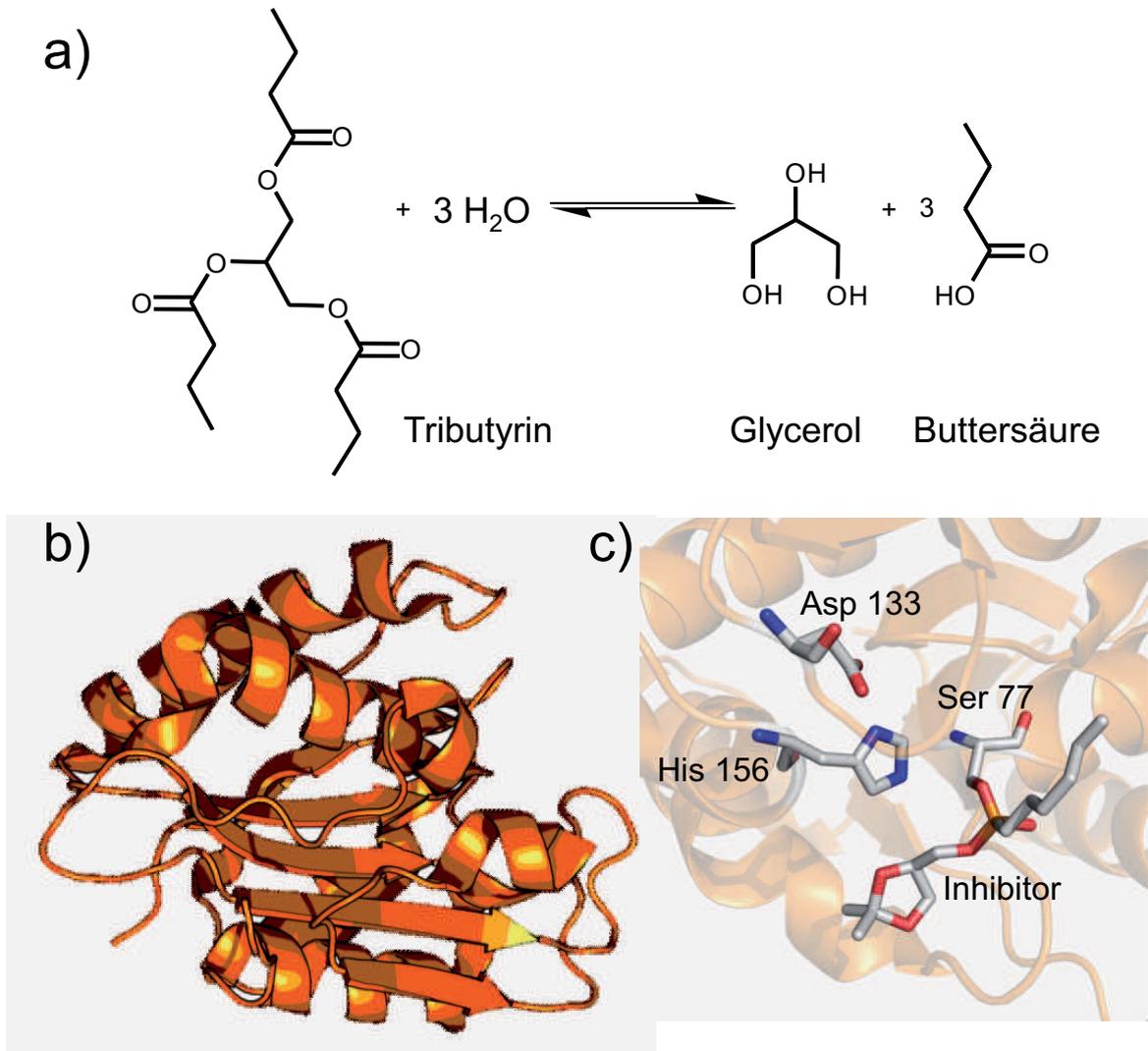


Abbildung 1.7: Lipase-katalysierte Hydrolyse am Beispiel von Tributyrin (a)). Die dreidimensionale Struktur der BsLA (PDB: 1I6W) (b)). Detailabbildung des aktiven Zentrums der BsLA mit den Aminosäuren Ser 77, Asp 133 und His 156, welche die katalytische Triade bilden (c)). Als Substratanalogen ist hier ein chiraler Phosphonatinhibitor (IPG-Phosphonat) [174] gebunden (PDB: 1I6W). Kohlenstoff in Grau, Phosphor in Orange und Sauerstoffatome in Rot dargestellt.

die BsLA eine Ausnahme dar, da sie keine dezidierte Deckelstruktur und damit keine Grenzflächenaktivierbarkeit besitzt. Diese Grenzflächenaktivierung stellt zudem einen wichtigen Unterschied zu den Esterasen dar, bei denen ein derartiger Effekt nicht beobachtet werden konnte [159].

1.7.1 Aktivitätsbestimmung von Lipasen

Es gibt viele gut etablierte Assay-Systeme mit Hilfe derer lipolytische Aktivität nachgewiesen werden kann. Sie können bezüglich der verwendeten analytischen Methode klassifiziert werden. Lipolytische Aktivität kann unter anderem mittels Agarplattentests, physikochemischer Verfahren (Titrimetrie mittels pH-Stat), Chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschroma-

tographie (GC)), Spektroskopie (Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)), Fluorometrie und UV/Vis-Spektrophotometrie bestimmt werden [160]. Mit Hilfe von Tributyrin enthaltenden Agarplatten ist es einfach und kostengünstig möglich, große Enzymbibliotheken qualitativ auf lipolytische Aktivität hin zu durchsuchen [161]. Jedoch müssen hier bei einem positiven Ergebnis quantitative Messungen folgen. Im Folgenden sollen einige quantitative Verfahren zur Bestimmung von lipolytischer Aktivität kurz vorgestellt werden.

Bei der Lipase-katalysierten Esterhydrolyse wird eine Fettsäure freigesetzt, wodurch sich der pH-Wert des Reaktionsmediums ins saure Milieu verschiebt. Im pH-Stat wird der pH-Wert des Reaktionsmediums während einer Lipase-katalysierten Esterhydrolyse kontinuierlich gemessen und mit Base gegentitriert, um den pH-Wert im System konstant zu halten. Dabei wird der Basenverbrauch aufgezeichnet. Dieser ist direkt proportional zur Aktivität der Lipase. Titrimetrische Methoden haben den großen Vorteil, dass natürliche Lipasesubstrate verwendet werden können. Von Nachteil sind die relativ großen Enzymmengen, die benötigt werden, sowie der geringe Probendurchsatz.

Der große Vorteil chromatographischer Methoden zur Bestimmung lipolytischer Aktivität ist ihre hohe Präzision. Mittels HPLC und GC ist es ebenfalls möglich, lipolytische Aktivität unter Verwendung von natürlichen Substraten zu bestimmen [162, 163]. Außerdem erlauben diese Methoden Aussagen über die Enantioselektivität der Enzym-katalysierten Reaktion [164, 165]. Von Nachteil ist die aufwendige Probenpräparation und der ebenfalls geringe Probendurchsatz [166].

Analyseverfahren unter Einsatz von fluorogenen Substraten sind meist sehr sensitiv. Wie bei UV/Vis spektrophotometrischen Enzymtests ist das erzeugte Signal proportional zur Aktivität des Enzyms. Ein Nachteil ist hierbei, dass fluorogene Substrate strukturell oftmals sehr unterschiedlich zu den nativen Enzymsubstraten sind. Viele der kommerziell erhältlichen fluorogenen Lipasesubstrate sind bei sauren pH-Werten sowie bei höheren Temperaturen instabil. Beispiele für fluorogene Lipasesubstrate sind Umbelliferon- und Resorufin-Ester [167, 168]. Beide Assays wurden in modifizierter Form als gekoppeltes Enzymassay zur Bestimmung von Enantioselektivitäten benutzt [169].

Der wohl am weitesten verbreitete Test zur Bestimmung der lipolytischen Aktivität ist der 1979 von Winkler und Stuckmann entwickelte *p*-Nitrophenyl-Palmitat (*p*NPP)-Assay. Dieser Assay basiert auf der Hydrolyse von *p*NPP, wobei das entstehende gelbe *para*-Nitrophenolat spektrophotometrisch detektiert wird (Abbildung 1.8). Alternativ können *p*NP-Ester mit Fettsäuregruppen unterschiedlicher Kettenlänge als Substrat eingesetzt werden [170].

Das Hauptproblem des *p*NPP-Assays liegt in der schlechten wasserlöslichkeit des Substrates ($< 1,5 \text{ mM}$) [171]. Standardmäßig werden jedoch 8 mM im Assay eingesetzt, was deutlich über der Löslichkeitsgrenze des Substrates liegt. Dies führt zu trüben Lösungen ($\text{OD}_{410 \text{ nm}} \geq 1,5$), die eine spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung erschweren und den Test sehr fehleranfällig machen. Selbst durch Zusatz des Lösungsvermittlers *gummi arabicum* wird keine vollständig klare Lösung erhalten. Problematisch ist zudem die Homogenität und Stabilität der verwendeten Wasser/Substrat Emulsion. Um diese Probleme zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weniger fehlerbe-

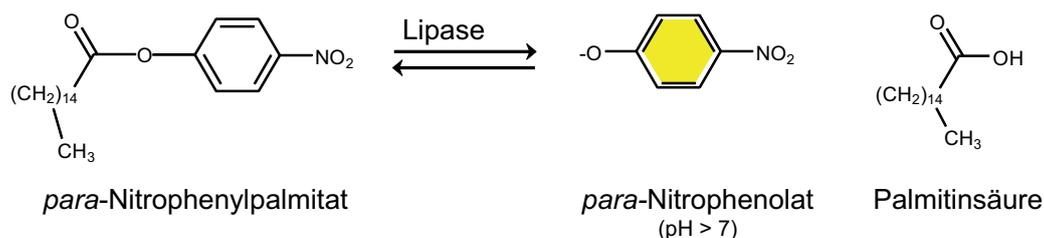


Abbildung 1.8: Hydrolyse von *para*-Nitrophenylpalmitat zu *para*-Nitrophenolat und Palmitinsäure.

hafteter Aktivitätstest basierend auf HPLC unter Verwendung von *p*NPP als Substrat entwickelt.

1.8 Die Hydroxynitrillyase aus *Arabidopsis thaliana*

Hydroxynitrillyasen (HNL), ebenfalls Oxynitrilasen genannt, werden der Enzymklasse der Aldehydlyasen (E.C. 4.1.2.) zugeordnet. HNLs katalysieren die reversible Spaltung von Cyanhydrinen (Hydroxynitrilen) in Aldehyde oder Ketone und Cyanwasserstoff (HCN, Blausäure) (Abbildung 1.9) [172, 173]. Diese Reaktion wird als Cyanogenese bezeichnet [174]. Die Umkehrreaktion, bei der eine Carbonylkomponente stereoselektiv mit HCN verknüpft wird, wird Hydrocyanierung (Abbildung 1.9) genannt. Industriell interessant ist hierbei die HNL katalysierte Hydrocyanierungsreaktion zwischen Aldehyden oder Ketonen und HCN zu chiralen Cyanhydrinen. Cyanhydrine finden unter anderem in der Produktion von Feinchemikalien und Pharmazeutika Verwendung [175].

In der Natur sind HNLs Teil des Abwehrsystems mancher Pflanzenarten gegen den Angriff von Schädlingen [176, 174]. So sind Cyanogene Pflanzen in der Lage bei Gewebeverletzungen durch Herbivoren oder Mikroorganismen [177] hochtoxische Blausäure freizusetzen. In Pflanzen kommen Cyanhydrine in chemisch gebundener Form als cyanogene Glykoside oder als cyanogene Lipide vor [178]. Ein solches cyanogenes Glykosid ist das Linamarin, das beispielsweise in Maniok (*Manihot esculenta*), der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) und in Lein (*Linum usitatissimum*) vorkommt [179, 180, 181]. Die Freisetzung von Cyanid aus Linamarin verläuft in zwei Schritten: zunächst wird Linamarin durch eine β -Glukosidase, die sogenannte Linamarase deglykosiliert. Anschließend wird das entstandene Acetoncyanohydrin in Aceton und HCN gespalten [182]. Um das Cyanid erst bei Schädigung der Pflanze freisetzen zu können, ist das cyanogene Glykosid in der Vakuole und das freisetzenden Enzym, die HNL, im Cytoplasma lokalisiert. Erst durch eine Schädigung der Zellen kommen Substrat und HNL zusammen, sodass HCN freigesetzt wird.

Mechanistisch beruht dieser Abwehrmechanismus auf der hohen Toxizität von HCN für aerobe Organismen. Das Cyanidion (CN^-) bindet irreversibel an das zentrale Eisen(III) des Häm-Kofaktors in der mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase, wodurch die Zellatmung (Atmungskette) unterbrochen wird und folglich zum Erliegen kommt. Der Elektronentransfer auf den Sauerstoff findet durch die Eisen(III)-Komplexbildung nicht mehr statt, was zum Zelltod durch Sauerstoffmangel führt.

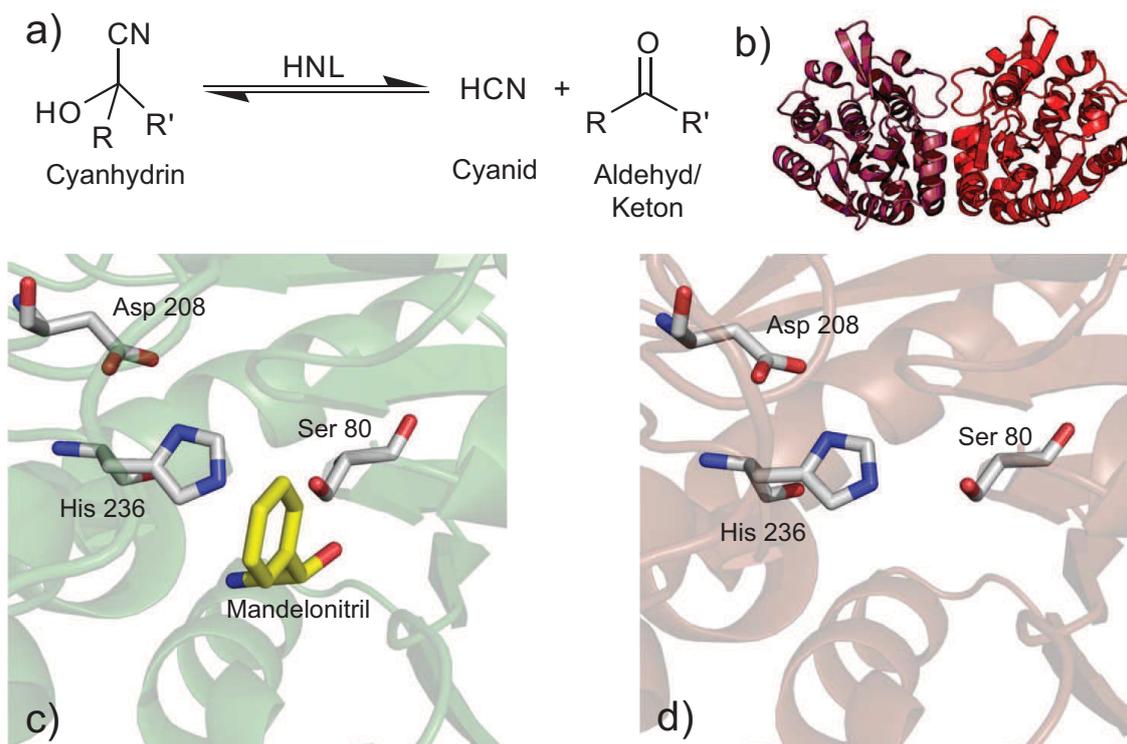


Abbildung 1.9: Die HNL-katalysierte reversible Spaltung von Cyanhydrinen. Durch HNLs werden Cyanhydrine in die korrespondierenden Aldehyde oder Ketone und Cyanwasserstoff (HCN) gespalten (Cyanogenese) (a). Bei der Umkehrreaktion wird eine Carbonylkomponente (Aldehyd oder Keton) stereoselektiv mit Cyanwasserstoff verknüpft (Hydrocyanierung). Die dimere AtHNL (PDB:3DQZ) (b)). Das aktive Zentrum der HbHNL (PDB: 1YB6) mit gebundenem Substrat ((S)-Mandelonitril, gelb hervorgehoben) und den Aminosäuren der katalytischen Triade (Serin 80, Aspartat 208, Histidin 236) (c)). Aktives Zentrum der AtHNL, mit den katalytischen Aminosäuren Asp 208, His 236 und Ser 80 (PDB: 3DQZ) (d)). Kohlenstoffatome sind in Grau, Stickstoffatome in Blau und Sauerstoffatome sind in Rot dargestellt.

Erstaunlicherweise verfügen ebenso nicht cyanogene Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* über eine HNL. Daher wird vermutet, dass es sich bei der HNL in *A. thaliana* um evolutionäres Relikt handeln könnte [133].

Die historische Klassifizierung von HNLs erfolgt anhand gebundener Kofaktoren, die strukturell relevant sind. Hierbei wird zwischen klassischen Kofaktor-abhängigen und Kofaktor-unabhängigen Enzymen unterschieden. So bindet z.B. eine Untergruppe von HNLs Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Kofaktor. Hierbei sorgt FAD jedoch nur für strukturelle Integrität, spielt aber für den katalytischen Mechanismus keine Rolle [183]. HNLs, die dieser Gruppe zuzuordnen sind, sind ausschließlich (*R*)-selektiv und kommen in der Mandel (*Prunus amygdalus*) und verwandten Rosaceae-Arten vor [184, 172]. Die (*R*)-selektive HNL aus *Linum usitatissimum* (Lein) gehört zwar ebenfalls zu der Gruppe der Kofaktor-tragenden HNLs, bindet jedoch Zinkionen und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) als Kofaktoren [185, 171]. Der zweiten Gruppe von HNLs gehören Vertreter ohne Kofaktoren, wie die HNLs aus *Sorghum bicolor* (Mohrenhirse) [186]), *Manihot esculenta* (Maniok) [187], *Phlebodium aureum* (Goldtüpfelfarn) [188]), *Hevea brasiliensis* (Kautschukbaum) [172] und Ara-

bidopsis thaliana (Ackerschmalwand) an. Die Enzyme unterscheiden sich, neben der Struktur und der phylogenetischen Verwandtschaft, hinsichtlich der Enantioselektivität, des Vorhandenseins post-translationaler Modifikationen, des natürlichen Substrats und bezüglich des Substratspektrums [172]. Strukturell werden die HNLs gleichfalls in zwei Gruppen unterteilt: HNLs mit α/β -Hydrolasefaltung, wie die HNL aus *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* und *Arabidopsis thaliana*, und HNLs mit Rossmannfaltung, wie die HNL aus Rosaceae und *Linum usitatissimum* [172].

Die in dieser Arbeit verwendete HNL aus *Arabidopsis thaliana* wurde 2007 erstmals beschrieben [133]. Das Enzym zeigt hohe Sequenzähnlichkeit (35 % identische und 56 % konservierte Aminosäurepositionen) zu den HNLs mit α/β -Hydrolase-Hydrolasefaltung aus *Mannihot esculenta* und *Hevea brasiliensis* [189]. Die α/β -Hydrolasefaltung konnte zusätzlich durch die Bestimmung der AtHNL Kristallstruktur nachgewiesen werden (PDB: 3DQZ, nicht publiziert). Die AtHNL liegt sowohl in der Kristallstruktur als auch in Lösung als Homodimer vor [190]. Im Vergleich zur HbHNL und MeHNL zeigt die AtHNL eine invertierte Enantioselektivität und war somit die erste (*R*)-spezifische HNL mit α/β -Hydrolasefaltung [133]. Das aktive Zentrum von HNLs, besteht aus der für α/β -Hydrolasen (wie z.B. Lipasen) typischen katalytischen Triade bestehend aus den Aminosäuren Serin 80, Histidin 236 und Asparagin 208 (Nummerierung entsprechend der AtHNL Struktur, PDB: 3DQZ) (Abbildung 1.9).

Die Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine stellen die industriell interessante HNL-katalysierte Reaktion dar. Prozesstechnisch stellt hierbei die unspezifische, chemische Nebenreaktion im wässrigen Milieu, welche zu racemischen Produkten führt, das Hauptproblem dar (Abbildung 1.10). Diese wird bei pH-Werten oberhalb von pH 5 und bei Temperaturen oberhalb von 20 °C je nach Substrat mehr oder weniger stark begünstigt [191]. Um HNLs für die Synthese von chiralen Cyanhydrinen einsetzen zu können, müssen geeignete Prozessbedingungen gefunden werden. Hierzu kann die unselektive chemische Nebenreaktion durch eine Senkung des pH-Werts und der Temperatur sowie durch Reduzierung des Wassergehalts im Reaktionsmedium unterdrückt werden.

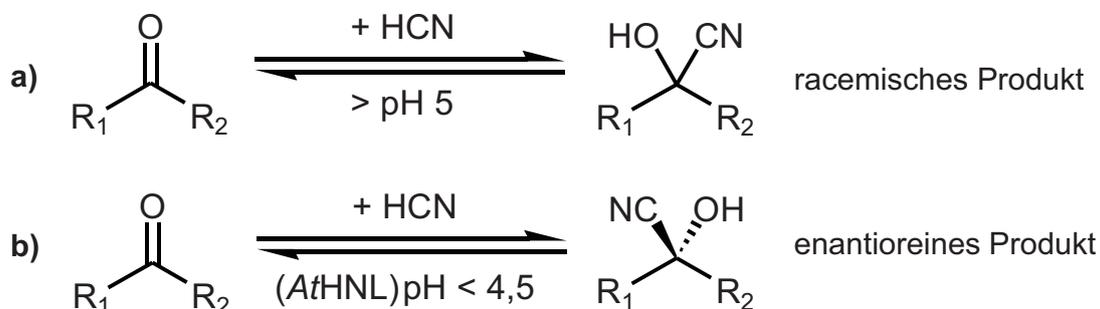


Abbildung 1.10: Synthesereaktion von (*R*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff (HCN). Bei pH-Werten über pH 5 findet eine chemische Reaktion statt, bei der racemisches Mandelonitril gebildet wird (a)). Diese spontane Reaktion kann unter anderem durch niedrige pH-Werte (b)) unterdrückt werden.

Typische Reaktionssysteme für die Anwendung von HNLs sind daher wässrig/organische Zweiphasensysteme mit möglichst niedrigem pH-Wert ($< \text{pH } 5$). Durch die organische Phase wird die Löslichkeit der aromatischen Substrate und Produkte verbessert, der Umsatz erhöht und die racemische Cyanhydrinbildung teilweise unterdrückt [192]. Manche HNLs wie die HNLs aus *Prunus amygdalus* und *Mannihot esculenta* besitzen eine hohe Toleranz im sauren pH-Bereich. Im Gegensatz hierzu aggregiert die AtHNL sehr schnell, wenn sie für einige Minuten pH-Werten $< \text{pH } 5$ ausgesetzt wird [190]. Dies führt zu einem sehr schnellen Verlust der enzymatischen Aktivität. Das Enzym wurde bereits in verschiedenen Reaktionssystemen und Präparationen getestet, so auch in nahezu wasserfreien organischen Lösungsmitteln und in wässrig/organischen Zweiphasen-Systemen [193, 194].

1.9 Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*

Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (EC 4.1.2.38) (*PfBAL*) katalysiert die reversible Spaltung von chiralen 2-Hydroxyketonen, wie Benzoin, in Aldehyde, wie z.B. Benzaldehyd [195, 134]. Von größerem Interesse ist jedoch die enantioselektive Carboligation [196]. Thiamindiphosphat (ThDP) und Mg^{2+} Ionen werden für diese Reaktionen als Kofaktoren benötigt [197], wobei ThDP direkt an der Katalyse beteiligt ist und durch das Magnesiumion im aktiven Zentrum des Enzyms verankert wird [198].

Die Kristallstruktur der *PfBAL* sowie deren biochemische Untersuchungen zeigen, dass es sich bei dem Enzym um ein Homotetramer mit vier aktiven Zentren handelt. Alle aktiven Zentren sind jeweils an der Interaktionsfläche zweier Untereinheiten zu finden (Abbildung 1.11). Eine *PfBAL*-Untereinheit besitzt eine Größe von ca. 60 kDa, sodass sich für die tetramere, aktive *PfBAL* ein Molekulargewicht von ungefähr 240 kDa ergibt [196].

Der Katalysemechanismus der Carboligation entspricht dem der übrigen ThDP-abhängigen Enzyme, wobei die Reaktion direkt am Kofaktor ThDP stattfindet [199, 200]. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums der *PfBAL* tragen zur korrekten Positionierung der Substratmoleküle, sowie zur Aktivierung des ThDPs bei. Hierbei ist die enzymatische Deprotonierung des ThDPs am C2-Atom des Thiazoliumrings der erste Schritt des Reaktionsmechanismus. Am aktivierten C2-Atom des ThDPs kann nun das erste Substratmolekül (Donor, z.B. Benzaldehyd) binden. Dabei erfolgt eine Umpolung der Reaktivität der Carbonylgruppe des Donors von einem elektrophilen zu einem nukleophilen Reaktionszentrum. Durch nukleophile Addition kann anschließend das zweite (elektrophile) Substratmolekül (Akzeptor, z.B. Benzaldehyd) binden. Es entsteht ein 2-Hydroxyketon (z.B. Benzoin), welches freigesetzt wird. ThDP wird im Laufe des Reaktionszyklusses selbständig regeneriert [201]. Durch *PfBAL*-Katalyse sind selektiv (*R*)-2-Hydroxyketone, wie (*R*)-Benzoin, mit einem Enantiomerenüberschüssen (*ee*) von $> 99 \%$ zugänglich. Die chemische Verknüpfung von Aldehyden unter C-C Bindungsbildung im Sinne der Benzoinkondensation ist ebenfalls eine Variante um

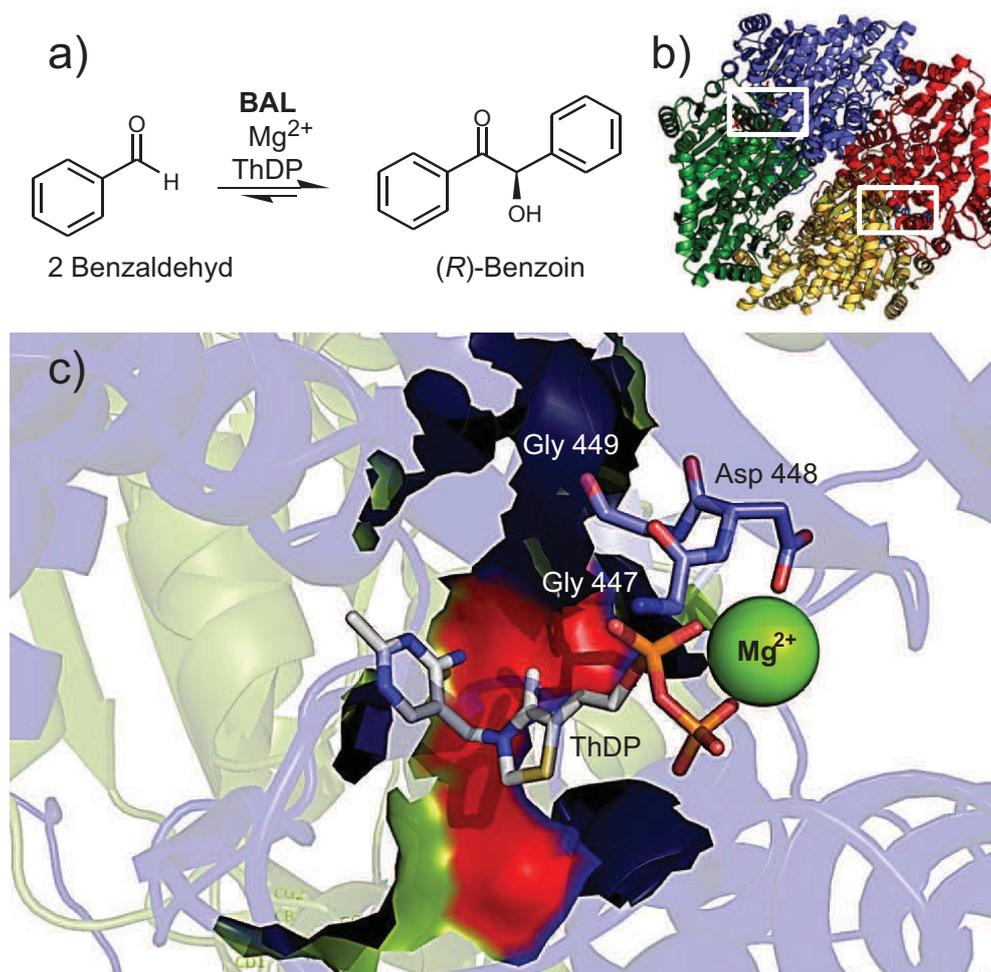


Abbildung 1.11: Das Reaktionsschema und die Struktur der *PfBAL*. Von der *PfBAL* katalysierte reversible Synthese von (*R*)-Benzoin (a). Struktur der *PfBAL* aus *P. fluorescens* (PDB: 2AG0). Die einzelnen Monomere sind in blau, grün, rot und orange dargestellt. Die aktiven Zentren befinden sich jeweils zwischen zwei Monomeruntereinheiten (weiße Boxen) (b)). Ausschnitt des aktiven Zentrums der *PfBAL*. Dargestellt sind die Aminosäuren, welche die Akzeptor-Bindestelle flankieren (c)). Kohlenstoffatome sind in Grau, Stickstoffatome in Blau, Phosphor in Orange und Sauerstoffatome in Rot dargestellt. Das Mg^{2+} Ion ist als grüne Kugel dargestellt.

2-Hydroxyketone zu produzieren. Als Katalysatoren können hier statt Cyanidionen Thiazoliumsalze verwendet werden. 2-Hydroxyketone finden eine breite Anwendung als Baustein zur Synthese bioaktiver Moleküle in der Pharmazie und der Agrarindustrie [202]. Die enzymatische Herstellung enantiomerenreiner 2-Hydroxyketone im präparativen Maßstab unter Verwendung der *PfBAL* wurde bereits gezeigt [203]. Die durch die *PfBAL* zugänglichen (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on (HPP)-Derivate, sind z.B. Vorstufen für die Synthese von Nitidanin, einem Malariamedikament [204].

Die schlechte Wasserlöslichkeit der Substrate und Produkte der *PfBAL*-katalysierten C-C-Verknüpfungsreaktion hat zur Folge, dass eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durch den Einsatz organischer Lösungsmittel einen wichtigen Aspekt in bisherigen Untersuchungen darstellte. Durch den Einsatz wasser-mischbarer organischer Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO) oder

Dimethylformamid (DMF) konnte die Reaktandenlöslichkeit erhöht werden [203, 205]. Der Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler hat sich hierbei als vorteilhaft erwiesen [197]. Für die *PfBAL* wurde darüber hinaus eine Stabilitätssteigerung bei DMSO Konzentrationen bis 30 % (v/v) beobachtet [203]. Höhere DMSO-Konzentrationen führten jedoch zu einer Inaktivierung des Enzyms [203, 205]. Für DMF zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 20 % (v/v) ein solcher Effekt [206]. Neben den beobachteten Enzym-Stabilitätsproblem behindert der Zusatz wasser-mischbarer organischer Lösungsmitteln, wie DMSO, die Produktaufarbeitung [203]. Ein Weg, dieses Problem zu umgehen, ist der Einsatz von Zwei-Phasen-Systemen unter Verwendung von beispielsweise Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) oder Diisopropylether (DIPE) [207].

Für alle verwendeten Enzyme stellt der Einsatz unkonventioneller Reaktionsmedien [208] aufgrund ihrer physikalische und chemischen Eigenschaften eine attraktive Alternative zur klassischen Biokatalyse in wässrigen Systemen dar.

1.10 FRPs zur Untersuchung von Inaktivierungsvorgängen bei der Biokatalyse in unkonventionellen Medien

Die Verwendung von Biokatalysatoren für die Produktion von Feinchemikalien, z.B. als Bausteine für chemische Folgereaktionen, hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. In vielen Fällen bietet die Verwendung von unkonventionellen Reaktionsmedien eine Vielzahl von Vorteilen. Beispielhaft zu nennen sind hierbei die erhöhte Löslichkeit von in Wasser schwer löslichen Substraten und Produkten. Gleichzeitig stellen jedoch unkonventionelle Reaktionsmedien sehr hohe Anforderungen an die eingesetzten Biokatalysatoren. Vor allem die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Medien (z.B. organische Lösungsmittel) können Auswirkung auf die strukturelle Integrität des Biokatalysators haben. Hierbei kommen unter anderem Denaturierungsprozesse und Aggregation durch mechanische Einflüsse und strukturelle Veränderungen des Enzyms zum Tragen. Weiterhin können physikalische Effekte durch das Reaktionssystem wie z.B. Scherkräfte, Reaktormaterialien, Grenzflächen aber auch inhibitorische Effekte, verursacht durch Substrate, Produkte und Pufferkomponenten auftreten.

Um die entsprechenden Deaktivierungsprozesse auf molekularer Ebene verstehen zu können, ist es möglich, analog zu *in vivo* Faltungs- und Lokalisationsstudien, welche in lebenden Zellen mittels fusionierten Fluoreszenzreportern durchgeführt werden, Fluoreszenzreporterfusionen *in situ* einzusetzen. Eine Translationsfusion bestehend aus einem fluoreszenten Reporterprotein und dem Zielenzym kann zu diesem Verständnis beitragen. Die Fusion kann im Gegensatz zum wildtypischen Enzym einfach mittels optischer Methoden detektiert und analysiert werden, vorausgesetzt der Fluoreszenzreporter ist unter den entsprechenden Bedingungen funktional.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zu GFP und verwandten Proteinen, wurden sowohl FbFPs als auch das PYP-Protein bisher nur unzureichend hinsichtlich ihrer Eignung als FRP in translationellen Fusionen untersucht. Deshalb sollten:

- i verschiedene translationelle Fusionsproteine bestehend aus einem FbFP und unterschiedlich komplexen Zielenzymen erzeugt und charakterisiert werden. Die Zielenzyme dieser Arbeit wurden hierbei, wie einleitend kurz ausgeführt, hinsichtlich unterschiedlicher struktureller Komplexität ausgewählt. Für alle Zielenzyme sind 3D-Strukturen bekannt, was eine rationale Planung der FRP-Fusionen erleichtert. Zudem können die isolierten Zielenzyme in rekombinanter Form in ausreichender Menge und Reinheit aus *E. coli* gewonnen werden. Das einfachste Zielenzym ist hierbei die monomere Lipase A aus *Bacillus subtilis* (*BsLA*). Die nächste Komplexitätsstufe für die in dieser Arbeit durchgeführten Fusionen mit FRPs, stellt die Kofaktor-freie, dimere Hydroxynitrillyase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) dar. Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*) stellt als Kofaktor-abhängiges, tetrameres Enzym die höchsten Anforderungen an die Herstellung funktionaler Fusionen mit FRPs. Die Fusion des FRPs darf hierbei die native Assemblierung der jeweiligen Untereinheiten (*AtHNL* und *PfBAL*) oder die Kofaktorbindung (zwischen zwei *PfBAL* Untereinheiten) nicht beeinflussen. In allen drei Fällen darf zudem die Fusion des FRPs die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum des Enzyms nicht behindern und somit die Katalyse stören. Alternativ zu FbFPs und GFP sollte
- ii das PYP-Protein als fluoreszentes Fusions-FRP etabliert werden. Nach erfolgreicher Erzeugung und initialer Charakterisierung der verschiedenen fluoreszenten Fusionsproteine sollte
- iii eines der Fusionssysteme eingehender biochemisch charakterisiert und
- iv zur Untersuchung eines biotechnologisch relevanten unkonventionellen Reaktionssystems verwendet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196(Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989 [209]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dem (λIts857 <i>indl Sam7 nin5 lavUV5-T7gene1</i>)</i>	Studier & Moffatt, 1986 [210]

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Vektor	Genotyp	Referenz
pET28a	<i>ColE1 lacZ' Kan^R P_{T7} P_{lac}</i>	Novagen
pETytvAC62A	<i>NdeI/ BamHI ytvA</i> -Gen mit C62A Substitution in pET28a (P _{T7} kontrolliert)	Marion Kötter, Diplomarbeit 2003
pET19b-lipA	549 bp <i>NdeI/XhoI lipA</i> PCR-Fragment in pET19b (P _{T7} kontrolliert)	Thorsten Rosenbaum, Diplomarbeit 2003
pET28a-AtHNL	777 bp <i>NcoI/XhoI AtHNL</i> PCR-Fragment in pET28a (P _{T7} kontrolliert)	Andexer 2007 [133]
BALHis/pKK233-2	pKK233-2 mit inseriertem Gen für <i>PfBALwt</i> mit C-terminalem Hexahistidin-Tag	Janzen 2006 [205]
pETYFP-His	717 bp <i>yfp</i> -Fragment in pET28a (P _{T7} kontrolliert)	Diese Arbeit
pET28a-BsLA	549 bp <i>NdeI/XhoI lipA</i> PCR-Fragment in pET28a (P _{T7} kontrolliert)	Diese Arbeit
pQE80L-PYP	378 bp <i>pyp</i> PCR-Fragment in pQE80L (P _{T7} kontrolliert)	W. Hoff, Oklahoma State University
pETnFbFP	412 bp <i>Sall/NdeI ytvA-LOV</i> PCR-Fragment in pET28a (P _{T7} kontrolliert)	Benita Kopka, Bachelorarbeit 2008

Vektor	Genotyp	Referenz
pETcFbFP	412 bp <i>SacI/NdeI ytvA-LOV</i> PCR-Fragment in pET28a (P_{T7} kontrolliert)	Diese Arbeit
pETnFbFP- <i>BsLA</i>	549 bp Blunt/ <i>Bpu1102I</i> -Fragment in pETnFbFP (<i>ytvA-LOV-lipA</i> Translationsfusion)	Benita Kopka, Bachelorarbeit 2008
pETcFbFP- <i>BsLA</i>	549 bp Blunt/ <i>Bpu1102I</i> -Fragment in pETcFbFP (<i>ytvA-LOV-lipA</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETnYFP- <i>BsLA</i>	549 bp <i>Sall/NdeI</i> -Fragment in pET28a (<i>ytvA-LOV-lipA</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETnFbFP- <i>AtHNL</i>	777 bp Blunt/ <i>Bpu1102I</i> -Fragment in pETnFbFP (<i>ytvA-LOV-AtHNL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETcFbFP- <i>AtHNL</i>	777 bp Blunt/ <i>NheI</i> -Fragment in pETnFbFP (<i>ytvA-LOV-AtHNL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETnYFP- <i>AtHNL</i>	777 bp <i>NdeI/NotI</i> -Fragment in pETnFbFP (<i>ytvA-linker-AtHNL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETnPYP- <i>AtHNL</i>	777 bp Blunt/ <i>NheI</i> -Fragment in pETnFbFP (<i>ytvA-linker-AtHNL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETnFbFP- <i>PfBAL</i>	1692 bp <i>Ecl136II/Bpu1102I PfBAL</i> -Fragment in pETnFbFP (<i>FbFP-PfBAL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETcFbFP- <i>PfBAL</i>	1692 bp Blunt/ <i>NheI PfBAL</i> -Fragment in pETcFbFP (<i>FbFP-PfBAL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit
pETnYFP- <i>PfBAL</i>	1692 bp <i>Ecl136II/Bpu1102I PfBAL</i> -Fragment in pETcFbFP (<i>YFP-linker-PfBAL</i> Translationsfusion)	Diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide und Sequenzierung

Alle synthetischen Oligonukleotide (Tabelle 2.3) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn) in HPLC-gereinigter, lyophilisierter Form bezogen. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen sterilem dH₂O aufgenommen, sodass sie in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l vorlagen. In den jeweiligen PCR-Ansätzen wurden die Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 10 pmol/ μ l verwendet.

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	T _m (°C)	Verwendung
cFbFP-SacI-fw	ACA GAG AGC TCA TGG CTA GTT TTC AAT CAT TTG GGA TAC	69,3	Amplifizierung von cFbFP mit angefügter <i>SacI</i> Schnittstelle zur Erzeugung von pETcFbFP
cFbFP-XhoI-rev	GCG CTC GAG TTA GAT ATC ATT CTG AAT TCC GAC AAA ATA C	69,8	Amplifizierung von cFbFP mit angefügter <i>XhoI</i> Schnittstelle zur Erzeugung von pETcFbFP
nFbFP-NdeI-fw	ACA GAC ATA TGG TCG GTG TGG TAA TTA CAG ATC CCG	69,7	Amplifizierung von nFbFP mit angefügter <i>NdeI</i> Schnittstelle zur Erzeugung von pETnFbFP
nFbFP-SacI-rev	CTG TGA GCT CTG AAA GTG CAG TAA TTT CCG TGA GGG	71,4	Amplifizierung von nFbFP mit angefügter <i>SacI</i> Schnittstellen zur Klonierung von pETnFbFP
nLOVBsLA-blunt-fw	GCT GAA CAC AAT CCA GTC GTT ATG GTT CAC GGT ATT GG	72,9	Amplifizierung von <i>BsLA</i> mit angefügtem 5'- <i>blunt</i> Ende zur Erzeugung von nFbFP- <i>BsLA</i>
nLOVBsLA-Stop-Bpu1102I-rev	ATA TGC TCA GCT TAA TTC GTA TTC TGG CCC CCG CCG	75,2	Amplifizierung von <i>BsLA</i> mit angefügter <i>Bpu1102I</i> Schnittstelle und Stopkodon zur Erzeugung von nFbFP- <i>BsLA</i>
cLOVBsLA-NheI-fw	ATG CGC TAG CCT GAA CAC AAT CCA GTC GTT ATG G	65,3	Amplifizierung von <i>BsLA</i> mit angefügter <i>NheI</i> Schnittstelle zur Erzeugung von cFbFP- <i>BsLA</i>
cLOVBsLA-blunt-rev	AAT CGT ATT CTG GCC CCC GCC GTT C	65,0	Amplifizierung von <i>BsLA</i> mit angefügtem 3'- <i>blunt</i> -Ende zur Erzeugung von cFbFP- <i>BsLA</i>
cLOVHNL-rev	CAT ATA ATC GGT GGC AAT AGC AGA GAG AGA GTC AAA GAG T	63,2	Amplifizierung von <i>AtHNL</i> mit angefügtem 3'- <i>blunt</i> -Ende zur Erzeugung von cFbFP- <i>AtHNL</i>
cLOVHNL-NheI-fw	ATA TGC TAG CAT GGA GAG GAA ACA TCA CTT CG	61,0	Amplifizierung von <i>AtHNL</i> mit angefügter <i>NheI</i> Schnittstelle zur Klonierung von cFbFP- <i>AtHNL</i>

MATERIAL UND METHODEN

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	T _m (°C)	Verwendung
nLOVHNL-rev	TTA CAT ATA ATC GGT GGC AAT AGC AGA GAG AGA G	60,1	Amplifizierung von <i>AtHNL</i> mit angefügtem 3'- <i>blunt</i> -Ende zur Klonierung von nFbFP- <i>AtHNL</i>
nLOVHNL-fw	ATG GAG AGG AAA CAT CAC TTC GTG TTA GTT CA	60,7	Amplifizierung von <i>AtHNL</i> mit angefügtem 5'- <i>blunt</i> -Ende zur Klonierung von nFbFP- <i>AtHNL</i>
nLOVBAL-fw	ATG GCG ATG ATT ACA GGC GGC GAA CTG GTT G	60,3	Amplifizierung von <i>PfBAL</i> mit angefügtem 5'- <i>blunt</i> -Ende zur Klonierung von nFbFP- <i>PfBAL</i>
nLOVBAL-rev	TTA TGC GAA GGG GTC CAT GCC GAT CAG AAT	64,4	Amplifizierung von <i>PfBAL</i> mit angefügtem 3'- <i>blunt</i> -Ende zur Klonierung von nFbFP- <i>PfBAL</i>
cLOVBAL-NheI-fw	ATA TGC TAG CAT GGC GAT GAT TAC AGG C	60,5	Amplifizierung von <i>PfBAL</i> mit angefügter <i>NheI</i> -Schnittstelle zur Klonierung von cFbFP- <i>PfBAL</i>
cLOVBAL-rev	TGC GGA GGG GTC CAT GCC GAT CAG AAT	65,5	Amplifizierung von <i>PfBAL</i> mit angefügtem 3'- <i>blunt</i> -Ende zur Klonierung von cFbFP- <i>PfBAL</i>
YFP-linker-fw	GAA GGA GAT ATA CAT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG T	66,5	1. und 2. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-Zielenzym (Kapitel 2.11.4)
YFP-linker-BSLA-rev	TTC AGC GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG AGT GAT CCC	66,5	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP- <i>BsLA</i> (Kapitel 2.11.4)
YFP-linker-BSLA-fw	TAC AAG GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC GCT GAA CAC AAT CCA GTC GTT ATG GTT CAC GGT ATT GG	64,8	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP- <i>BsLA</i> (Kapitel 2.11.4)

MATERIAL UND METHODEN

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	Tm (°C)	Verwendung
linker-BsLA-rev	TAT TAT GTC GAC CTA CGT ATT CTG GCC CCC GCC GTT CAG	66,0	1. und 2. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-BsLA (Kapitel 2.11.4)
YFP-linker-AtHNL-rev	CTC CAT GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG AGT GAT CCC	66,5	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-AtHNL (Kapitel 2.11.4)
YFP-linker-AtHNL-fw	TAC AAG GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC ATG GAG AGG AAA CAT CAC TTC GTG TTA GTT CAC AAC GC	69,3	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-AtHNL (Kapitel 2.11.4)
linker-AtHNL-rev	TAT ATA GCG GCC GCA AGC TTG TCG ACT TAC ATA TAA TCG G	64,5	1. und 2. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-AtHNL und des nPYP-AtHNL (Kapitel 2.11.4)
YFP-linker-PfBAL-rev	CGC CAT GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG AGT GAT CCC	66,5	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-PfBAL (Kapitel 2.11.4)
YFP-linker-PfBAL-fw	TAC AAG GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC ATG GCG ATG ATT ACA GGC GGC GAA CTG GTT GTT	67,2	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-PfBAL (Kapitel 2.11.4)
linker-PfBAL-rev	TAT ATA TGC GGC CGC TTA TGC GAA GGG GTC CAT GCC	68,5	1. und 2. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nYFP-PfBAL (Kapitel 2.11.4)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	Tm (°C)	Verwendung
PYP-linker-fw	TA TAT CAT ATG GAA CAC GTA GCC TTC GGT AGC GAG GAC AT	66,0	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nPYP-AtHNL (Kapitel 2.11.4)
PYP-linker-AtHNL-rev	CTC CAT GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC GCT GCC GCC GCC GAC GCG CTT GAC GAA GAC CCA GTA G	68,0	1. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nPYP-AtHNL (Kapitel 2.11.4)
linker-AtHNL-fw	CGC GTC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC AGC ATG GAG AGG AAA CAT CAC TTC GTG TTA GTT CAC	67,0	1. und 2. Schritt der "overlap extension"-PCR zur Konstruktion des DNA Fragments nPYP-AtHNL (Kapitel 2.11.4)
SeqYFP-Linker-for	AAG GTG AAC TTC AAG ATC CG		Sequenzierprimer für alle Mittelstücke der Genfusionen mit GS-Linker
SeqnLOVlongConfor	GAG GAT AAA ACG TAT TTT GTC GG		Sequenzierprimer für alle Mittelstücke aller FbFP-Genfusionen
SeqcLOVlongConrev	GCC TTG ATT TAC GTA GAC AAT AGG		Sequenzierprimer für alle FbFP-Genfusionen
pET-Bpu1102I	CCA ATC CGG ATA TAG TTC C		Sequenzierprimer für alle Fusionen welche über die <i>Bpu1102I</i> Schnittstelle des pET28a Vektors kloniert wurden

2.3 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Für eine Sequenzierung mussten mindestens 100 ng eines Plasmids bereitgestellt werden. Zur Sequenzierung aller pET28a-basierten Expressionsplasmide wurden die T7, T7-Term Standard-Sequenzierung-Oligonukleotide verwendet. In einigen Fällen mussten spezielle Sequenzier-Oligonukleotide verwendet werden. Diese wurden in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l dem jeweiligen Sequenzierungsauftrag beigelegt.

2.4 Nährmedien und Zusätze

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Nährmedienkomponenten 20 min bei 120 °C und 200 kPa autoklaviert. Hitzeinstabile Komponenten wurden steril filtriert (Schleicher & Schuell, Porengröße 0,2 μm) den autoklavierten Medien zugegeben.

LB-Flüssigmedium [211]

Trypton	10 g
Hefe	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

LB-Festmedium

Agar-Agar	15 g
LB-Flüssigmedium	1000 ml

Autoinduktionsmedium [212]

Medienkomponente:

Caseinhydrolysat	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerol	5 g
dH ₂ O.	ad 800 ml

Pufferkomponente (1 M KP_i):

K ₂ HPO ₄	53,3 g
KH ₂ PO ₄	26,4 g
dH ₂ O.	ad 500 ml

Induktionskomponenten:

- 5 % (w/v) Glukose
- 2 % (w./v) Laktose

Alle Medienkomponenten wurden einzeln autoklaviert. Um einen Liter Autoinduktionsmedium zu erhalten, wurden 800 ml der Medienkomponente mit 90 ml Pufferkomponente, 10 ml Glukose-Lösung und 100 ml Laktose-Lösung vermischt.

2.5 Antibiotika

Die Konzentration, in welcher Antibiotikum zur Selektion den Medien zugesetzt wurden, betrug für Kanamycin in *E. coli* 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und für Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.6 Übersicht über die verwendeten Enzyme und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme (Tabelle 2.4) wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril (HPLC-grade)	Roth
Acrylamid	Roth
Adenosintriphosphat, ATP	Fermentas
Agar	Roth
Ameisensäure, > 98 %	Roth
Ampicillin	Gerbu
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Pharmacia
APS	Pharmacia
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bromophenol	Serva
Dichlormethan	KFM
DMBA	Sigma
EDTA	Merck
Essigsäureanhydrid	Fluka
Flavinmononucleotid (FMN)	Sigma
Glycerol	Roth
Gummi Arabicum	Roth
Hefeextrakt	Roth
7-Hydroxycoumar-3-carbonsäure	Sigma
<i>para</i> -Hydroxizimtsäure	Sigma
Imidazol	Roth
Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG)	Roth

Chemikalie	Hersteller
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Gerbu
Mandelonitril (Racemat)	Jülich Fine Chemicals
MTBE	Merck
<i>para</i> -Nitrophenol (<i>p</i> NP)	Fluka
<i>para</i> -Nitrophenolpalmitat (<i>p</i> NPP)	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumcyanid	Sigma
Natriumdeoxycholat (NaDOC)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure(Ni ²⁺ -NTA)	Qiagen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Pharmacia
Pyridin	Sigma
Riboflavin	Sigma
SDS	Serva
TEMED	Pharmacia
Tris (ultrapure)	Pharmacia
Trypton	Roth

2.7 Puffer und Lösungen

2.7.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (pH 8,3)

Tris-Base	89 mM
Borsäure	89 mM
Na ²⁺ -EDTA	2,5 mM

DNA-Probenpuffer

EDTA	100 mM
Glycerol	30 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
SDS	1 % (w/v)

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid	0,5 % (w/v)
----------------	-------------

DNA-Molekulargewichtsstandard "GeneRuler 100 bp DNA Ladder" (Fermentas) 1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100 bp. "GeneRuler 1 kb DNA Ladder" (Fermentas).

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

Transformationspuffer (TMF-Puffer)

CaCl ₂	100 mM
RbCl ₂	50 mM
MnCl ₂	40 mM

Mg²⁺-Mix

MgCl ₂	500 mM
MgSO ₂	500 mM

2.7.3 Puffer und Lösungen zur Mengenbestimmung von Proteinen und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bradford-Reagenz:

Serva Blau G250	100 mg
85 % (v/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure	100 ml
Ethanol	86 ml
ad 1000 ml dH ₂ O.	

SDS-Probenpuffer (pH 6,8):

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

Elektrophorese-Puffer (pH 8,8):

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Acrylamid-Stammlösung:

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

Colloidal Coomassie Färbungslösung:

Coomassie Brilliant Blue G250	0,12 % (w/v)
ortho-Phosphorsäure	10 % (v/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Ethanol	20 % (v/v)

Molekulargewichtsstandard:

“PageRuler™ Unstained Protein Ladder“, Fermentas: 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70; 85; 100; 120; 150; 200 kDa

IEF-Standard:

“IEF Marker 3-10, Liquid Mix“,

Serva: 3,5; 4,2; 4,5; 5,2; 5,3; 6,0; 6,9; 7,4; 7,8; 8,0; 8,3; 9,5; 10,7 pH

2.7.4 Puffer zur Proteinisolierung und Quartärstrukturanalyses mittels HPLC-SEC

Im Folgenden werden tabellarisch die Pufferbedingungen der jeweiligen Fusionsproteine aufgelistet.

Tabelle 2.5: Reinigungspuffer

	<i>Bs</i>LA-Fusionen	<i>At</i>HNL-Fusionen	<i>Pf</i>BAL-Fusionen
Äquilibrierungspuffer	30 mM Imidazol 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl pH 8,0	50 mM KP _i -Puffer pH 7,5	50 mM KP _i -Puffer 2,5 mM MgSO ₄ 0,1 mM ThDP pH 7,0
Elutionspuffer	250 mM Imidazol 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl pH 8,0	50 mM KP _i -Puffer 250 mM Imidazol pH 7,5	50 mM KP _i -Puffer 2,5 mM MgSO ₄ 0,1 mM ThDP 150 mM Imidazol pH 7,5
Lagerpuffer	10 mM Glycin pH 11 (NaCl)	10 mM KP _i -Puffer pH 7,5	50 mM TEA 2,5 mM MgSO ₄ 0,1 mM ThDP pH 8,0

PBS (*phosphate buffered saline*) -Puffer:

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

2.7.5 HPLC-SEC-Äquilibrierungspuffer

HPLC-SEC-Puffer:

NaP _i	200 mM
NaCl	10 mM

2.7.6 Assaypuffer

Lipaseassaypuffer:

pNPP-Emulsion:

Lösung I:

Natriumdesoxycholat	5 mM
Gummi arabicum	50 mg
Sørensen-Phosphat-Puffer	45 ml

Lösung II:

<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat	8 mM
Isopropanol	5 ml

Sørensen-Phosphat-Puffer:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	50 mM
KH_2PO_4	50 mM

Die 50 mM Lösungen (Na_2HPO_4 und KH_2PO_4) für den Sørensen-Phosphat-Puffer werden im Verhältnis 17:1 gemischt, sodass sich ein pH-Wert von pH 8,0 ergibt. Lösung II wird unter ständigem Rühren zu Lösung I gegeben und innerhalb 1 h verbraucht.

HNL-Spaltungsassaypuffer:

Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5)	50 mM
--------------------------------	-------

60 mM Mandelonitril-Stocklösung (pH 3,5):

1,82 ml	Citrat 0,1 M
1,06 ml	Na_2HPO_4 0,1 M
	ad 10 ml H_2O
	ad 80 μl Mandelonitril

PfBAL-Assaypuffer:

PfBAL-Assaypuffer (pH 8):

KP _i	50 mM
MgSO ₄	2,5 mM
ThDP	0,1 mM

3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA)-Substratlösung:

DMBA in DMSO	12 mM
--------------	-------

2.8 Geräte

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseapparaturen	Mini-PROTEAN Gelkammer II	BioRad
Elektrophoreseapparaturen	XCell SureLock Mini-Cell	Satorius
Feinwaage	2004 MP	Sartorius
French Press	French Press 40K Cell	Thermo Electron Corporation
Gefriertrockner	Lyovac GT2	SRK System Technik
Inkubationsschüttler	Infors HT	Infors
Mikrotiterplatten-Lesegerät	SpectraMax 250	Molecular Devices
Spektralphotometer	DU 650	Beckmann
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ti	Nikon Instruments Inc.
Fluoreszenzphotometer	Fluorolog 3-22	HORIBA Jobin Yvon GmbH (München)
Fluoreszenzphotometer	LS-50B	Perkin-Elmer
Thermoblock Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonopuls HD60	Bandelin
Videodokumentation	Stella	Raytest
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Kühlzentrifuge	Rotina 35R	Hettich
HPLC	RF-LC-2010 Ai	Shimadzu
HPLC-Säule	Kinetex C-18	Phenomenex
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge	Rotina 35R	Hettich
Zentrifuge	RC-5B/RC-5B plus	Dupont Sorvall

Alle hier nicht aufgeführten Kleingeräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards.

2.9 Softwaretools

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Software- und Webservertools.

Programm	Hersteller
BioEdit	Bioscience (Carlsbad)
ChemDraw 7.0	CambridgeSoft (Cambridge)
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software (Cary)
ClustalW2	European Bioinformatic Institute (EBI) (Cambridge), http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
ExPASy Molecular Biology Server	Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (Lausanne), http://www.expasy.ch/
Matlab	The MathWorks, (Massachusetts)
ORIGIN 7	Microcal Software Inc. (Northhampton)
Pymol 0.99rc6	De Lano Scientific LLC (Palo Alto)
Unicorn 5.10	GE Healthcare (München)
Tex	Stanford (Stanford)
Tm-calculator	http://www.appliedbiosystems.com/support/tech-tools/calc/ (Applied Biosystems)
RCSB Protein Databank	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB), http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
YASARA	YASARA Biosciences GmbH, Wien, Österreich
FluorEssence™ 3.0 basiert auf Origin 8	Inkl. Multigroup 1.0 von Horiba Jobin Yvon (Minamiku Kyoto, Japan)
NIS Elements AR Softwarepakets	NIKON GmbH (Düsseldorf)

2.10 Mikrobiologische Methoden

2.10.1 Anzucht von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C in LB-Medium (Kapitel 2.4). Dabei wurden Stämme mit Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenzen unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (Kapitel 2.4). Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller angezogen (160 rpm). Diese Ansätze wurden als Vorkulturen (VK) bezeichnet. Größere Kulturen wurden im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: etwa 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Rundschtüttler bei 120 rpm bebrütet.

2.10.2 Induzierte Genexpression in *E. coli*-BL21(DE3)

Zur Expression T7-Promoter-kontrollierter Gene wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3), welcher mit dem entsprechenden Expressions-Plasmid transformiert 2.10.6 wurde, verwendet. Dieser wurde bei 37 °C unter Selektionsdruck in 10 ml LB-Medium über Nacht bebrütet. Anschließend wurde eine 1 l Hauptkultur Autoinduktionsmedium (Kapitel 2.4) mit der Vorkultur inokuliert und für 3 h bei 37 °C und 120 rpm schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde die Hauptkultur weitere 72 h bei 15 °C und 120 rpm schüttelnd bebrütet. Die Transkription aller Genfusionen unterliegt in dem Expressionsvektor pET28a der Kontrolle des P_{T7} -Promotors. Zellen dieses Stammes tragen das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Strukturgen unter Kontrolle des P_{lacUV5} Promotors im Genom integriert. Die im Autoinduktionsmedium (Kapitel 2.4) enthaltene Glukose verhindert eine vorzeitige Induktion der Expression durch Katabolit-Repression. So kann ein Wachstum bis in die logarithmische Phase erfolgen, ohne dass es zur Überexpression der Ziel-Gene kommt. Sobald die Glukose im Medium verstoffwechselt wurde, wird der Stoffwechsel der Zellen auf die aktive Aufnahme von Laktose durch die β -Galaktosid-Permease (kodiert durch *lacY*) umgestellt. Laktose induziert intrazellulär die Expression der T7-RNA-Polymerase, welche die Transkription des Zielgens unter P_{T7} Kontrolle ermöglicht.

2.10.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Messung der Zelldichte einer Kultur wurde die optische Dichte (OD) in einem Spektralphotometer bei 600 nm relativ zum jeweiligen Medium als Referenzwert bestimmt. Eine $OD_{600nm} = 1$ entsprach etwa 10^9 Zellen/ml.

2.10.4 Lagerung von Bakterienstämmen

Für eine langfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden Gefrierkulturen mit Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) angelegt. 1,3 ml einer Kultur wurden mit 0,1 ml DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung einer Glycerin-Gefrierkultur wurde die entsprechende Kultur 1:2 (für die Lagerung bei -80 °C) oder 1:5 (Lagerung bei -20 °C) mit Glycerin versetzt.

2.10.5 Herstellung von chemisch transformationskompetenten

E. coli-Zellen

LB-Medium (Kapitel 2.4) wurde mit 0,04 Volumen Mg^{2+} -Mix versetzt und mit der entsprechenden Menge einer *E. coli*-VK bis zu einer Zelldichte entsprechend einer $OD_{600nm} = 0,05$ inokuliert. Die

Kultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,5$) auf einem Schüttler (200 rpm) angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Zell-Pellet im 0,5-fachem Volumen eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in 1/10 Volumen eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 20 % (v/v) in Aliquots von 200 μ l bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10.6 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA [213]

Zur Transformation wurden 200 μ l transformationskompetente Zellen mit dem Ansatz einer vorausgegangenen Ligation (Kapitel 2.11) oder ca. 100 ng isolierter Plasmid-DNA vermischt, mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach direkter Zugabe von 600 μ l LB-Medium folgte die phänische Expression, bei der der Ansatz je nach Antibiotikaresistenz für 2 h bis 3 h bei 37 °C inkubiert wurde. 100 μ l dieses Ansatzes wurden auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (3 min, 1600 x g, RT), das Pellet in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren Selektivagarplatte ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden transformationskompetente Zellen ohne zugegebene Plasmid-DNA ausplattiert.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Nukleinsäureisolierung und -reinigung

Standard Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA in geringen Mengen wurde aus 1,5 - 5 ml *E. coli*-Kultur gemäß den Herstellerangaben mit dem "innuPREP Plasmid Mini Kit" (analytik jena, Jena) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit 50 μ l dH₂O eluiert. Wurden größere Mengen an DNA benötigt, so wurde die Präparation gemäß den Herstellerangaben mit dem "NucleoBond Xtra Midi"-Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in dH₂O. Durch die Elution mit Wasser konnten inhibitorische Effekte des im TE-Puffer enthaltenen EDTA auf nachfolgende Enzym-, Sequenzierungs- oder PCR-Reaktionen ausgeschlossen werden.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem "innuPREP DOUBLEpure" Kit der Firma Analytik Jena (Jena) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte abweichend von den Herstellerangaben in dH₂O.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Eine Mengenabschätzung von DNA-Proben erfolgte in Agarosegelen durch einen Vergleich mit einer geeigneten Bande des Molekulargewichtsstandards (Kapitel 2.11). Alle Banden des Standards enthalten hierbei eine herstellerdefinierte Menge an DNA.

2.11.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Gerät "TProfessional Basic Gradient" der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde entsprechend der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide (Tabelle 2.3) gewählt. Der Richtwert gibt an, welche Hybridisierungstemperatur eingesetzt wurde. Der Wert ergibt sich aus Gleichung 2.1.

$$\text{Richtwert} = \frac{T_{m1} + T_{m2}}{2} - 5^\circ\text{C} \quad (2.1)$$

Die Elongationszeit richtet sich hierbei nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Geschwindigkeit der eingesetzten Polymerase. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Die Konzentrationen der Reaktionskomponenten und ein Standardprogramm zur Durchführung einer PCR sind in Tabelle 2.8 und in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Konzentrationen der Reaktionskomponenten bei einer PCR.

Komponente	Konzentration
forward Oligonukleotid	5 - 100 pmol
reverse Oligonukleotid	5 - 100 pmol
dNTP-Mix	0,2 mM
Matrizen-DNA	1 - 100 ng
Polymerase-Puffer	1 x
DNA-Polymerase	2,5 U
dH ₂ O	ad 50 μ l

Tabelle 2.9: Programm zur Durchführung einer PCR.

Schritt	T (°C)	Dauer (min)
I. Initiale Denaturierung	98	5
II. Denaturierung	95	1
III. Hybridisierung	T_m	1
IV. Elongation	72	1000 kb/min
V. zurück zu Schritt II.	Zyklusschleife: 25 - 40 x	
VI. Finale Elongation	72	5-10 min

2.11.3 “touch down“-PCR

Die “touch down“-PCR ist eine Methode bei der die Spezifität der Oligonukleotid-Bindung an die Matrizen-DNA erhöht werden kann. Durch eine höhere Hybridisierungstemperatur in den ersten PCR-Zyklen wird in der initialen Amplifizierungsphase eine unspezifische Vervielfältigung der Matrize verhindert. Durch zyklusweise Senkung der Hybridisierungstemperatur wird sich dem T_m der Oligonukleotide angenähert. Anschließend erfolgen mehrere Zyklen mit einer niedrigeren Hybridisierungstemperatur (Tabelle 2.10). Durch die Zugabe von Additiven, wie 1 M Betain und DMSO, wurde zusätzlich das Auftreten von Sekundärstrukturen, wie zum Beispiel Haarnadelschleifen in GC-reichen DNA Regionen verhindert [214]. Außerdem wird in dieser Weise die Bindungsstärke zwischen AT- und GC-Basenpaaren angeglichen und die Amplifizierung von GC-reichen DNA-Sequenzen erleichtert.

Tabelle 2.10: Programm zur Durchführung einer “touch down“-PCR.

Schritt	T (°C)	Dauer (min)
I. initiale Denaturierung	98	5
II. Denaturierung	95	1
III. touchdown Hybridisierung	69*	1
IV. Elongation	72	5
V. zurück zu Schritt II.	Zyklusschleife: 15 x	
VI. Denaturierung	95	1
VII. Hybridisierung	54	1
VIII. Elongation	72	5
IX. zurück zu Schritt VI.	Zyklusschleife: 20 x	
X. finale Elongation	72	5-10

(* -1 °C je Zyklusschleife)

2.11.4 “overlap extension“-PCR

Bei der “overlap extension“-PCR (oe-PCR) werden in zwei PCR-Schritten zwei PCR amplifizierte Produkte (hier die beiden Gene kodierend für YFP bzw. PYP und die Zielenzyme: *BsLA*, *AtHNL* und *PfBAL*) zu einem längeren Produkt verknüpft. Die jeweils eingesetzten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass eines der Oligonukleotide eine Region besitzt, die nicht an die jeweilige Template-DNA bindet, sondern komplementär zu dem entsprechenden Primer aus der Amplifizierung des jeweils anderen DNA-Fragments ist. Dadurch besitzen die beiden amplifizierten DNA-Fragmente eine

zueinander komplementäre Region. Dieses wird anschließend im zweiten PCR-Schritt dafür genutzt die beiden Stücke zu verbinden [215]. Hierfür werden die Fragmente des ersten PCR-Schrittes als Matrizen im zweiten PCR-Ansatz eingesetzt und können über den komplementären Bereich miteinander hybridisieren und unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide amplifiziert werden. Zur Amplifizierung der Gene werden im ersten PCR-Schritt die Oligonukleotidkombination 1/2 und 3/4 (Abbildung 2.1) verwendet. Die Oligonukleotide 2/3 besitzen einen auf DNA-Ebene zueinander komplementären (überlappenden) Bereich. Nach Hybridisierung der PCR-Produkte aus dem ersten PCR-Schritt über den komplementären Bereich (hier der GS-linker) wird, im zweiten PCR-Schritt, das kombinierte PCR-Produkt amplifiziert. Dazu werden die die flankierenden Primer 1 und 4 des ersten PCR-Schrittes verwendet, um eine exponentielle Vervielfältigung der Genfusion zu ermöglichen.

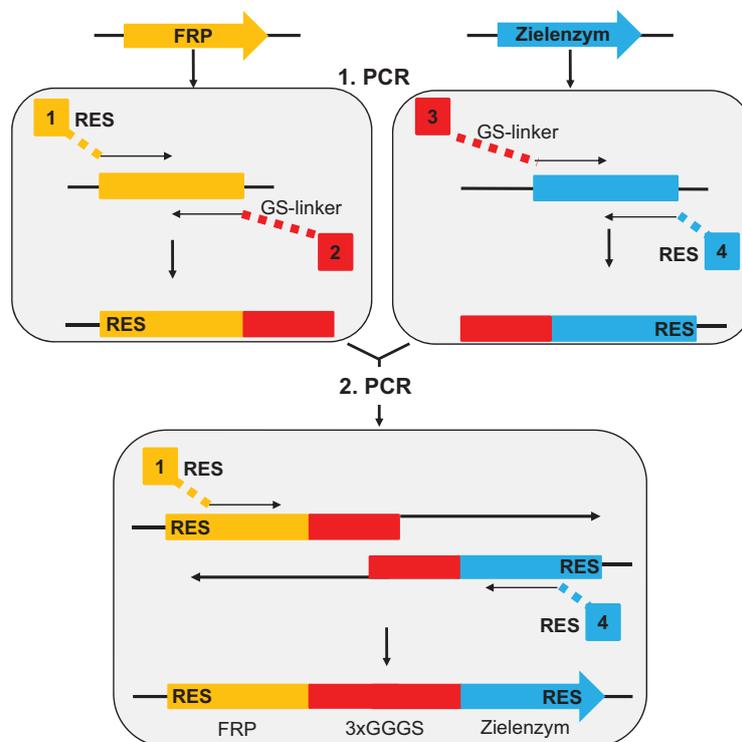


Abbildung 2.1: Modellhafte Darstellung einer "overlap extension"-PCR. Zwei Gene, lokalisiert auf zwei voneinander unabhängige Vektoren, sollen mittel oe-PCR miteinander verknüpft werden (hier: Reportergen (FRP) und das Zielenzymgen). Die erste PCR dient der unabhängigen Amplifizierung der beiden Zielgene. Hierzu werden im ersten PCR-Schritt die Oligonukleotidpaare 1/2 und 3/4 eingesetzt. Die beiden äußeren Oligonukleotide (1 und 4) enthalten je eine Restriktionsendonuklease-Schnittstelle (RES), während die beiden inneren Oligonukleotide je einen Bereich besitzen, der komplementär zum jeweils anderen Primer ist und später den 3xGGGS-Linker (GS-linker) zwischen YFP bzw. PYP und Zielenzym erzeugt. Die aus der ersten PCR erhaltenen Produkte, besitzen jeweils eine zum anderen Produkt komplementäre Region (3xGGGS-Linker). Die amplifizierten Fragmente wurden isoliert und in der zweiten PCR als Matrizen eingesetzt, da sie auf Grund ihrer komplementären Region miteinander hybridisieren können. In diesem Schritt entsteht die Genfusion, welche anschließend isoliert, unter Einsatz von Restriktionsendonukleasen restringiert und in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden kann.

2.11.5 Strategie zur Erzeugung der Vektoren für die Expression der YFP und PYP Referenzfusionsproteine

Die beiden PCR-Reaktionen des ersten Schrittes (Abbildung 2.1) wurden mittels einer PCR-Reaktion durchgeführt (Kapitel 2.11.2). Im zweiten Schritt (Abbildung 2.1) wurde ein "touch down"-PCR-Programm verwendet (Tabelle 2.10, Kapitel 2.10). Die für die oe-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 zusammengestellt. Zur Erzeugung der nYFP-*BsLA*-Fusion wurden im ersten PCR-Schritt die Oligonukleotide YFP-linker-fw und YFP-linker-*BsLA*-rev zur Amplifizierung des *yfp*-Gens sowie die Oligonukleotide YFP-linker-*BsLA*-fw und linker-*BsLA*-rev zur Amplifizierung des *bsla*-Gens eingesetzt. Die entstehenden PCR-Produkte wurden im zweiten Schritt als Matrizen eingesetzt (Abbildung 2.1). Beide Fragmente besitzen einen zueinander komplementären *linker*-Bereich und können somit miteinander hybridisieren. Um eine exponentielle Amplifizierung der gewünschten Genfusion zu gewährleisten, wurden im zweiten Schritt die beiden äußeren PCR-Oligonukleotide (YFP-linker-fw, linker-*BsLA*-rev) verwendet.

In ähnlicher Weise wurde die nYFP-*AtHNL*- und nYFP-*PfBAL*-Fusion erzeugt. Hierzu wurden zur Erzeugung der nYFP-*AtHNL*-Fusion im ersten PCR-Schritt die Oligonukleotide YFP-linker-fw und YFP-linker-*AtHNL*-rev zur Amplifizierung des *yfp*-Gens sowie die Oligonukleotide YFP-linker-*AtHNL*-fw und linker-*AtHNL*-rev zur Amplifizierung des *atHNL*-Gens eingesetzt. Das kombinierte PCR-Produkt wurde im zweiten PCR-Schritt mit den PCR-Produkten der ersten PCR als Matrize und mit Hilfe der Oligonukleotide YFP-linker-fw und linker-*AtHNL*-rev amplifiziert.

Zur Amplifizierung des *yfp* Genfragments der nYFP-*PfBAL*-Fusion wurden die Oligonukleotide YFP-linker-fw und YFP-linker-*PfBAL*-rev verwendet. Das *pfbal* Gen wurde mittels der Oligonukleotide YFP-linker-*PfBAL*-fw und linker-*PfBAL*-rev amplifiziert. Die nYFP-*PfBAL*-Genfusion wurde im zweiten PCR-Schritt mittels der entstandenen Fragmente aus der ersten PCR und der Oligonukleotide YFP-linker-fw und linker-*PfBAL*-rev erzeugt.

Der pQE80L-PYP Vektor [216] zur Amplifizierung des Gens kodierend für das PYP aus *H. halophila* wurde von Prof. Wouter Hoff (Oklahoma State University) zur Verfügung gestellt. Zur Erzeugung der nPYP-*AtHNL*-Fusion wurden im ersten PCR-Schritt die Oligonukleotide PYP-linker-fw und PYP-linker-*AtHNL*-rev zur Amplifizierung des PYP kodierende Gens sowie die Oligonukleotide linker-*AtHNL*-fw und linker-*AtHNL*-rev zur Amplifizierung des *atHNL*-Gens eingesetzt. Das kombinierte PCR-Produkt wurde in der zweiten "touch down"-PCR mit Hilfe der PCR-Produkte der ersten PCR als Matrizen und der Oligonukleotide PYP-linker-fw und linker-*AtHNL*-rev amplifiziert.

Um eine Klonierung der Genfusionen in einen entsprechenden Expressionsvektor zur ermöglichen, enthielten die beiden äußeren Oligonukleotide zur Amplifizierung des kombinierten PCR-Produktes an ihrem 5'- und 3'-Ende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NotI*. Alle mittels oe-PCR amplifizierten Genfusionen wurden entsprechend hydrolysiert (Kapitel 2.11), mittels Gelelektrophorese geprüft (Kapitel 2.11), aus dem Gel isoliert und gereinigt. Die so erhal-

tenen Genfusionen wurden in einen entsprechen restringierten pET28a Vektor ligiert (Kapitel 2.11, 3.1.2 und Abbildung 3.4).

Alle Genfusionen wurden mittels Sequenzierung (Seqlab GmbH, Göttingen) überprüft. Die Aminosäure-Sequenzen der entsprechenden Fusionen sind im Anhang 5.1 zusammengestellt.

2.11.6 Strategie zur Erzeugung der pETnFbFP und pETcFbFP Vektoren als Ausgangskonstrukte zur einfachen Erzeugung von diversen FbFP-Zielenzym-Fusionen

Zur Amplifizierung des *cFbFP* Genfragments mittels PCR wurden die Oligonukleotide aus Tabelle 2.3 verwendet. Das am 3'-Ende des *cFbFP* Genfragments bindende Oligonukleotid enthielt zusätzlich vor der entsprechenden Restriktionsendonuklease-Schnittstelle ein *E. coli*-Stoppkodon (TAA). Das *nFbFP* Genfragment wurde mittels der Oligonukleotide aus Tabelle 2.3 amplifiziert. Beide Fragmente wurden unter der Verwendung der im Oligonukleotidnamen angegebenen Restriktionsenzyme hydrolysiert und anschließend in einen identisch restringierten pET28a Vektor ligiert.

2.11.7 Strategie zur Erzeugung der Vektoren zur Expression der FbFP-Fusionsproteine

Alle für die Amplifizierung und Klonierung der Zielenzyme verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Alle Gene der verwendeten Zielenzyme wurden mittels PCR an bereits bestehenden Expressionsplasmiden amplifiziert [217, 205, 190]. Hierzu wurden folgende Oligonukleotide verwendet: *BsLA*: BSLAnLOV-blunt-fw, BSLAnLOV-Stop-Bpu1102I-rev, cLOVBsLA-NheI-fw, cLOVBsLA-blunt-rev; *AtHNL*: nLOVHNL-fw, nLOVHNL-rev, cLOVHNL-NheI-fw, cLOVHNL-rev; *PfBAL*: nLOVBAL-fw, nLOVBAL-rev, cLOVBAL-NheI-fw, cLOVBAL-rev. Zur Erzeugung der N-terminalen Fusionen wurde an den jeweiligen reverse Primer an das 3'-Ende zusätzlich das *E. coli*-Stopcodons (TAA) angefügt. Die Klonierungsschritte zur Erzeugung der jeweiligen Genfusion sind in Abbildung 3.3 zusammengefasst.

Zur Erzeugung der N-terminalen FbFP-*BsLA* Fusion besaß das entsprechende reverse Oligonukleotide ein Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bpu1102I* am 3'-Ende. Das so amplifizierte PCR-Produkt wurde entsprechend hydrolysiert. Das PCR Produkt wurde mittels Gelelektrophorese geprüft (Kapitel 2.11), aus dem Gel isoliert und gereinigt. Der Fusionsvektor pETnFbFP wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *Bpu1102I* restringiert. *Ecl136II* ist ein Isoschizomer von *SacI*, das ein "blunt-ended" Restriktionsprodukt erzeugt. Dies erlaubt die

direktionale Klonierung des *Bpu1102I* hydrolysierten PCR-Produktes in den pETnFbFP-Vektor mittels Ligation (Kapitel 2.11).

Zur Erzeugung der C-terminalen cFbFP-*BsLA*, cFbFP-*AtHNL*, sowie der cFbFP-*PfBAL* Fusionen, wurde an das 5'-Ende des jeweiligen PCR-Produktes, unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide, die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease *NheI* angefügt. Die *BsLA*, *AtHNL* und *PfBAL* PCR-Produkte wurde durch *NheI* hydrolysiert, mittels Gelelektrophorese geprüft, aus dem Gel isoliert und gereinigt (Kapitel 2.11). Der Fusionsvektor pETcFbFP wurde anschließend mit der Restriktionsendonuclease *Ecl136II* (*blunt*) und *NheI* restringiert. Die mittels PCR amplifizierten und hydrolysierten *BsLA*, *AtHNL* und *PfBAL* PCR-Produkte wurden in einen entsprechend hydrolysierten pETcFbFP-Vektor ligiert (Kapitel 2.11). Für die Erzeugung der nFbFP-*AtHNL* sowie der nFbFP-*PfBAL*-Fusion besaßen beide PCR-Oligonukleotide keine überhängende Restriktionsendonuclease-Erkennungssequenz. Das entsprechende PCR-Produkt wurde als *blunt-end* Produkt amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese geprüft (Kapitel 2.11), aus dem Gel isoliert und gereinigt. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde in einen *Ecl136II* (*blunt*) restringierten pETnFbFP Vektor mittels Ligation (Kapitel 2.11) kloniert.

Alle Genfusionen wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die Aminosäure- und DNA-Sequenzen der entsprechenden Fusionen sind im Anhang zusammengestellt.

2.12 Nukleinsäuremodifikationen

2.12.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

1 - 2 μg DNA wurden mit 1 - 2 Einheiten (*units*, U) der jeweiligen Restriktionsendonuclease unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation erfolgt eine hydrolytische Spaltung an einer für jedes Enzym spezifischen Erkennungssequenz in der DNA. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte über eine gelelektrophoretische Auftrennung (Kapitel 2.11). Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen vor Ligationsreaktionen wurden die Ansätze bei der vom Hersteller angegebenen Inaktivierungstemperatur und angegebener optimaler Zeit inkubiert.

2.12.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA wurde zur Identifizierung und Quantifizierung elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Herstellung der Gele sowie die

Durchführung der Elektrophorese erfolgte gemäß Sambrook [211]. Die Agarosekonzentration betrug falls nicht anderes angegeben 0,8 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer. Ethidiumbromid wurde den Gelen 0,01 %ig (v/v) zugegeben. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Vol. 5 x DNA-Probenpuffer (Kapitel 2.11) versetzt. Als DNA-Molekulargewichtstandard diente der GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas). Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt. Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem EagleEye II[®] (Stratagene La Jolla, CA) dokumentiert.

2.12.3 Ligation von Vektor- und Fragment-DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten [218] und entsprechend hydrolysierter Vektor-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Ligase ist in der Lage, unter Hydrolyse von ATP, die kovalente Verknüpfung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden sowohl zwischen kompatiblen, überhängenden (*“sticky ends“*) als auch zwischen zwei glatten Enden (*“blunt ends“*) doppelsträngiger DNA-Moleküle zu bilden. In einem Reaktionsvolumen von 10 μ l bis 50 μ l wurden die Fragment-DNA und die Vektor-DNA im molaren Verhältnis von mindestens 3 : 1 eingesetzt. Nach Zugabe des vom Hersteller mitgelieferten T4-DNA-Ligasepuffers und von 1 U Ligase (*“blunt end“*-Ligation: 5 U) wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Inaktivierung der T4-DNA-Ligase erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C. Zur Transformation (Kapitel 2.10.6) kompetenter *E. coli*-Zellen (Kapitel 2.10.2) wurden mindestens 5 bzw. 10 μ l des Ligationsansatzes verwendet.

2.13 Proteinchemische Methoden

2.13.1 Zellaufschluss durch French-Press

Nach erfolgter Überexpression (Kapitel 2.11) wurden die Zellen durch Zentrifugation (25 min, 5000 rpm, SLC-4000 Rotor, 4 °C) geerntet. Für den anschließenden Zellaufschluss wurden 10 g Zellen verwendet, die in 50 ml des jeweiligen Äquillierungspuffer resuspendiert wurden, um eine 20 %ige (w/v) Zellsuspension zu erhalten. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte in drei Durchgängen mittels French Press (Thermo Electron Corporation, 40K Cell) bei 1500 Psi (300 bar Zellinnendruck). Nicht lösliche Bestandteile wurden von den löslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt (30 min, 18000 rpm, F21 Rotor, 4 °C). Der Überstand wurde auf seinen Proteingehalt mittels Bradford-Test überprüft und anschließend mittels affinitätschromatographischen Methoden gereinigt (Kapitel 2.13.7). Von dem erhaltenen Ganzzellextrakt wurde eine Probe zur Analyse mittels SDS-PAGE abgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.13.2 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard [219]. Das Bradford-Reagenz wurde vor Licht geschützt über Nacht gerührt, anschließend filtriert und lichtgeschützt bei RT aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wurden in einer Küvette 900 μ l Bradford-Reagenz mit 100 μ l Probe vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Als Referenz dienten 900 μ l Bradford-Reagenz mit 100 μ l des entsprechenden Puffers. Die Konzentration des entstandenen Protein-Farbstoffkomplexes wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt. Anhand einer Kalibrierung mit bekannten Mengen von BSA wurde der Proteingehalt der Proben errechnet.

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

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem, wie es von Laemmli beschrieben worden ist [220]. Während der Elektrophorese werden die Proteine im Polyacrylamid-Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes getrennt.

Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Mengenangaben von Trenn- und Sammelgel beziehen sich auf das Volumen von 2 Minigelen in einer vertikalen Gelapparatur "Mini Protean II Dual Slap Cell" (Biorad, München). Die einzelnen Komponenten wurden miteinander vermischt. Die Zugabe von APS und TEMED erfolgte erst kurz bevor die Mischung in die Gelkammern gefüllt wurde.

Sammelgel (5 %):

Acrylamid-Stammlösung	0,83 ml
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10 % (w/v) SDS	50 μ l
10 % (w/v) APS	50 μ l
TEMED	10 μ l
dH ₂ O	ad 5 ml

Trenngel (12 %):

Acrylamid-Stammlösung	4 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 μ l
10 % (w/v) APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
dH ₂ O	ad 10 ml

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 99 °C denaturiert. Pro Geltasche wurden 15 μ l Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer. Hierbei betrug die angelegte Spannung zunächst 100 V und wurde nach Eintritt der Lauffront in das Trenngel auf 150 - 200 V erhöht. Zur Visualisierung wurden nach erfolgter Elektrophorese die Gele in dH₂O gewaschen und anschließend in Colloidal-Coomassie-Brilliant-Blue Färbungslösung gefärbt (Kapitel 2.13.5).

2.13.4 Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden native Proteine in einem speziellen Acrylamidgel entsprechend ihres isoelektrischen Punkts aufgetrennt. Die IEF-Gelelektrophorese wurde mit einem "Novex[®] pH 3-10 IEF Gel" (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde das "X-Cell Sure Lock System" der Firma Invitrogen mit dem programmierbaren "Novex PowerEase 500" verwendet. Als Marker wurde der "IEF Marker 3-10, Liquid Mix" von Serva (Heidelberg) verwendet. Nach erfolgter IEF, wurden die Proteine im Gel nach Herstellerangaben mit Phosphorsäure fixiert und anschließend in Colloidal-Coomassie-Brilliant-Blue Färbungslösung gefärbt (Kapitel 2.13.5).

2.13.5 Colloidal-Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von PAGE-Gelen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die PAGE-Gele für mindestens 1 h in Colloidal Coomassie-Färbelösung bei RT geschwenkt [221]. Anschließend wurde das Gel mehrmals mit dH₂O gewaschen. Die Gele wurden eingescannt und bei Bedarf in Folie eingeschweißt, um bei 4 °C gelagert zu werden. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (Stella, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

2.13.6 Lyophilisierung von gereinigten Proteinen

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden in gefriergetrockneter Form bei -20 °C gelagert. Für eine Lyophilisierung wurden die gereinigten und entsalzten Proteinfractionen in einer flachen Glasschale mit maximal 1,5 cm Füllhöhe und maximal 1 - 1,5 mg/ml Proteinkonzentration bei -80 °C eingefroren. Die gefrorene Lösung wurde in einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT2) getrocknet. Das Lyophilisat wurde bei -20 °C gelagert.

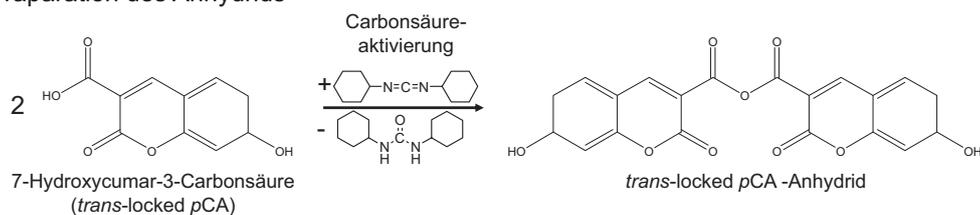
2.13.7 Proteinreinigung mittels immobilisierten Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Reinigung Hexahistidin-getaggtter Fusionsproteine erfolgte mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) [222] unter Verwendung eines ÄKTApurifier™ FPLC Systems (GE Healthcare). Dazu wurde die lösliche Fraktion eines Ganzzellextraktes, der aus 10 g Feuchtzellmasse hergestellt wurde, auf eine zuvor mit Äquilibrationpuffer (Tabelle 2.5) eingestellte Ni-NTA™- (QIAGEN, Hilden) oder Talon™ (Clontech, Saint-Germain-en-Laye)-Säule aufgetragen (Flussrate 3 ml/min). Ungebundenes Protein wurde durch einen Waschschriff mit Äquilibrationpuffer (Tabelle 2.5) von der Säule gespült. Anschließend erfolgte die Elution durch einen Gradienten von 0 - 250 mM Imidazol bei einer Flussrate von zunächst 3 ml/min. Die Fraktionen, bei denen im Elutionsprofil Protein detektiert wurde (Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm), wurden anhand ihrer gelben (FMN in FbFPs bzw.) oder gelb-grünen (YFP) Färbung, die für das jeweilige chromophortragende Fusionsprotein charakteristisch ist, vereinigt und anschließend über eine Sephadex G25-Säule entsalzt. Dazu wurde die Probe auf die zuvor mit Entsalzungspuffer (Tabelle 2.5) äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 5 ml/min aufgetragen. Die Fraktionen, in denen Protein enthalten war (Messung bei 280 nm), wurden anhand ihrer Gelbfärbung vereinigt. Zur Analyse der Reinigung wurden Proben aller Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE und Aktivitätsmessung (Kapitel 2.14, 2.14.2, 2.15 und 2.17) untersucht. Die gereinigten Fusionsproteine wurden lyophilisiert (Kapitel 2.13.6) und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

2.13.8 Rekonstitution des Fluoreszenzreporters PYP mit dem stark fluoreszenten *trans-locked-pCA*-Chromophor

Um das fluoreszente PYP-Fusionsprotein zu erhalten, muss nach der IMAC Reinigung (Kapitel 2.13.7) die chromophorbindende PYP-Domäne im Fusionsprotein mit dem stark fluoreszenten *trans-locked-pCA* beladen werden [223]. Um eine Beladung zu ermöglichen muss zuerst der Fluorophor

Präparation des Anhydrids



Reaktion der proteinogenen Thiolgruppe mit dem Anhydrid

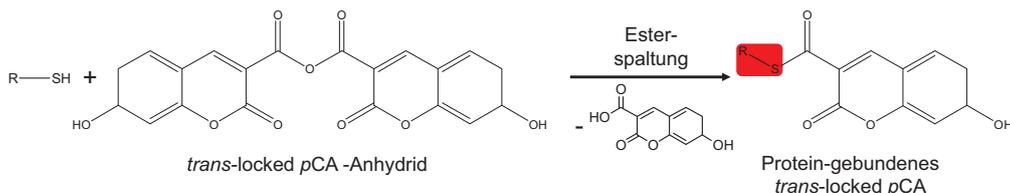


Abbildung 2.2: Reaktion von *trans*-locked-pCA mit DCC um "aktiviertes" *trans*-locked-pCA-Anhydrid zu erhalten (oben) und Reaktion von "aktiviertem" *trans*-locked-pCA-Anhydrid mit dem Cystein 69 aus PYP (roter Kasten).

durch Bildung des entsprechenden Anhydrids aktiviert werden (Abbildung 2.2). Hierfür werden 30 mg *trans*-locked-pCA unter einem Abzug mit 38 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) vermischt und in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Daraufhin wird der Reaktionsansatz auf 70 - 80 °C in einem Heizblock erwärmt. Sobald sich die Lösung nach etwa 15 min gelb gefärbt hat, wird sie für 15 min auf Eis oder im Gefrierschrank bei -20 °C inkubiert. Durch die Reaktion des *trans*-locked-pCA mit DCC entsteht Harnstoff, welcher als weißer Niederschlag ausfällt (Abbildung 2.2). Um den Harnstoff abzutrennen wird der Reaktionsansatz für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Um das entstandene Anhydrid bzw. das entstandene Fluorophor als Feststoff zu erhalten, wird das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers verflüchtigt. Typischerweise wurden aus 30 mg *trans*-locked-pCA etwa 4-6 mg des Anhydrids erhalten. Dies ist für etwa drei Rekonstitutionsansätze ausreichend. Das Anhydrid kann zu weiteren Aufbewahrung bei -20 °C gelagert werden. Um 15 mg Apo-PYP mit dem *trans*-locked-pCA Fluorophor zu beladen wurde das gereinigte nPYP-*At*HNL-Fusionsprotein mit 1-2 mg des Anhydrids bei 4 °C ÜN schwenkend inkubiert. Hierbei reagiert das Anhydrid mit der Thiolgruppe des Cystein 69 des PYP-Proteins. Unter Ester-Spaltung wird das Anhydrid gespalten und *trans*-locked-pCA kovalent im Protein gebunden. Durch Entsalzung mittels G25 Säule wurde ungebundener Chromophor vom Holo-PYP abgetrennt. Die Lagerung des rekonstituierten Fusionsproteins erfolgte in gelöster Form bei 4 °C.

2.13.9 Größenausschlusschromatographie mittels HPLC

Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der AtHNL-Fusionsproteine erfolgte durch HPLC-basierte Größenausschlusschromatographie (HPLC-SEC) an einer Biosep-SEC S2000-Säule, 300 × 7,8 mM (Phenomenex) und einer HPLC-Apparatur LC-10Ai (Shimadzu). Vor dem Probenauftrag wurde die Säule mit HPLC-SEC-Äquilibriumspuffer eingestellt. Als Probe wurden 10 µl gereinigtes Protein in einer Konzentration von 3,0- 0,03 mg/ml gelöst in den HPLC-SEC Äquilibriumspuffer injiziert. Zur Kalibrierung des Systems wurden folgende kommerziell erhältliche Mischung an Standardproteinen verwendet: IgG (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17 kDa) (Aqueous SEC1, Phenomenex,). Zur Bestimmung des Säulentotvolumens wurde Thyroglobulin (670 kDa) und zur Ermittlung des Nutzvolumens der Säule wurde Uridin aufgetragen. Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten (K_{AV}) der einzelnen Proteine erfolgte nach Gleichung 2.2.

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_t}{V_0 - V_t} \quad (2.2)$$

V_e gibt hierbei das Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins an, V_0 das Nutzvolumen der Säule (bestimmt durch Uridin) und V_t das Totvolumen der Säule (ermittelt durch die Retentionszeit des Thyroglobulins). Die Kalibrationsgerade (Abbildung 2.3) ergibt sich aus dem Auftrag des Verteilungskoeffizienten K_{AV} des jeweiligen Standardproteins gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes (MW).

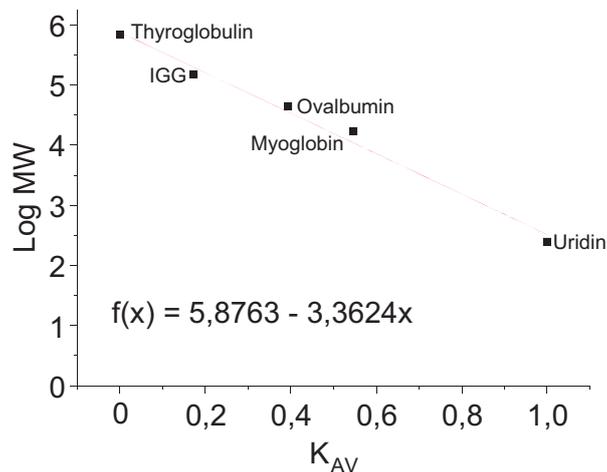


Abbildung 2.3: Kalibrierung der Biosep-SEC S2000-Säule. Als Eichproteine wurden Thyroglobulin, IgG, Ovalbumin, Myoglobin und Uridin verwendet.

2.14 Bestimmung der Lipaseaktivität mit *para*-Nitrophenylpalmitat als Substrat

2.14.1 Photometrische Bestimmung der lipolytische Aktivität

Zur Bestimmung lipolytischer Aktivität von Lipasepräparationen wurde der *para*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP)-Test, der auf der photometrischen Detektion des freigesetzten *para*-Nitrophenolats (*p*NP) beruht, eingesetzt [170].

Nach Vermischen einer *p*NPP-Emulsion mit einer entsprechend verdünnten Enzymprobe wird, bei Anwesenheit einer aktiven Lipase und einem pH-Wert > 7 , das farblose *p*NPP in Palmitinsäure und gelbes *p*NP gespalten, welches Licht bei 410 nm absorbiert. Aus der Absorptionzunahme bei 410 nm, die kontinuierlich mit einem Spektralphotometer (DU 650, Beckmann) verfolgt wurde, konnte auf die lipolytische Aktivität der Lipaseproben geschlossen werden. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der molare Absorptionskoeffizient ($\varepsilon_{410 \text{ nm}}$) von *p*NP verwendet. Zu je 900 μl der auf 30 °C temperierten Substratemulsion (Kapitel 2.7.6) wird eine entsprechende Menge (100 μl) Enzym (ggf. verdünnt) hinzugegeben und gut gemischt. Die einzusetzende Enzymmenge richtet sich nach der erwarteten Aktivität. Die Proben werden über einen Zeitraum von 2 min in Abständen von 7,5 s, einer Temperatur von 30 °C und bei einer Absorption von $\lambda = 410 \text{ nm}$ vermessen. 1 Unit (U) ist hierbei definiert als die Proteinmenge, die zur Bildung von 1 μmol *p*NP pro Minute in 50 mM Sørensen Phosphatpuffer bei 30 °C führt (Gleichung 2.3).

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot V_{ges}}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \quad (2.3)$$

Folgende Parameter werden verwendet um die spezifische Aktivität (U/ml) zu bestimmen:

- ΔE - Absorptionsdifferenz ($\text{Abs}_{Probe} - \text{Abs}_{Leerwert}$)
- V_{ges} - Gesamtvolumen
- ε - molarer Extinktionskoeffizient von *p*NP ($15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- d - Schichtdicke der Küvette (1 cm)
- v - Volumen der zugegebenen Proteinmenge (in ml)

2.14.2 Bestimmung der BsLA Aktivität mittels HPLC

Physikalische Eigenschaften, wie die geringe Löslichkeit langkettiger *p*NP-Fettsäureester wie *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) führen zu trüben Lösungen bereits bei geringen Konzentrationen von

8 mM zu einer OD_{410} von 1,5. Dies macht die photometrische Detektion der freigesetzten chromogenen Gruppe (*para*-Nitrophenol) schwierig. Darüber hinaus ist die Homogenität und Stabilität der Wasser / Substrat-Emulsion begrenzt, was wiederum die Präzision des Assays verringert. Um diese Probleme zu überwinden wurde ein diskontinuierlicher HPLC-basierter *p*NPP-Lipase-Aktivitätstest entwickelt. Dieser Assay basiert ebenfalls auf der Detektion des abgespaltenen *para*-Nitrophenolats. Im Gegensatz zum photometrischen Assay erfolgt jedoch die Quantifikation des gebildeten *p*NPs nach Abstoppen der Enzymreaktion unter sauren Bedingungen (pH 3). Nach Abtrennen des präzipitierten Enzyms durch Zentrifugation wird die Assaylösung über eine *reverse-phase* C18 HPLC Säule unter den im Folgenden beschriebenen Bedingungen aufgetrennt und quantifiziert.

Kalibrierung

***p*NP Stock-Lösung**(Eichlösung):

*p*NP 1 mM in (in Sørensen-Phosphat-Puffer gelöst) Zur Kalibrierung des HPLC-Systems wurde eine Konzentrationsreihe, bestehend aus 3, 9, 20 und 60 μ M *p*NP in Sørensen-Phosphat-Puffer, hergestellt.

Enzymatische Umsetzung und HPLC Bedingungen:

***p*NPP-Stock** (Substratlösung):

*p*NPP 15 mM (in Isopropanol gelöst)

Durch Erwärmen und Schwenken unter einem warmen Wasserstrahl wird *p*NPP gelöst.

Enzym-Stock:

Die Enzym-Stocklösung wird unmittelbar vor dem Start der Reaktion angesetzt, da die *Bs*LA bei starker Verdünnung instabil ist.

Durchführung

In 50 ml Reaktionsgefäßen werden 38,43 ml Sørensen-Phosphat-Puffer (supplementiert mit 5 mM NaDOC als Emulgator) auf 30 °C im Wasserbad vortemperiert. Kurz vor dem Starten der enzymatischen Reaktion (durch Zugabe von 766 μ l Enzymlösung (1 μ g/ml)) wird das Substrat *p*NPP dem Reaktionsgefäß in einer Endkonzentration von 0,75 mM zugegeben und durchmischt. Nach dem Starten der Enzymreaktion wird dem Reaktionsgefäß über 10 min Reaktionszeit in kontinuierlichen Abständen eine Probe entnommen (1 ml). Diese wird in vorbereitete Reaktionsgefäße, in welchen

0,45 ml 0,5 M Ameisensäure vorgelegt wurden, überführt. Durch die Ameisensäure wird die Reaktion durch Inaktivierung der Lipase abgestoppt. Präzipitiertes Enzym wird durch Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Anschließend werden 200 μ l der jeweiligen Proben in HPLC Glasvials überführt. Als Säule zur Trennung der Reaktanden wurde eine Kinetex[®] C18 (core shell) Säule (2,6 μ m Partikeldurchmesser) in den Dimensionen 75 x 4,6 mm verwendet. Als mobile Phase wurden die Eluenten in einem Mischungsverhältniss von 60:40 (Puffer A : Puffer B) eingesetzt. Alle Lösungen wurden filtriert (Porendurchmesser: 0,2 μ M) und durch Inkubation in einem Ultraschallbad entgast.

Puffer A: dH₂O + 0,1 % (v/v) HCOOH (pH 2,6)

Puffer B: Acetonitril + 0,1 % (v/v) HCOOH

Die Flussrate betrug 2 ml/min bei 25 °C. Die Elution erfolgte mit folgendem Gradienten-Programm:

Zeit (min)	Puffer A	Puffer B
0 - 0,75	60	40
0,75- 1	0	100
1 - 2	0	100
2 - 2,25	60	40
3	Ende	

Die Konzentration an pNP in der jeweiligen Probe wurde durch Detektion bei 310 nm quantifiziert. Unter den angegebenen Fluss- und Eluentenbedingungen beträgt die Retentionszeit von pNP 0,82 min.

Mit Hilfe der zuvor erstellten Kalibriergerade (Abbildung 2.3) lässt sich die Konzentration des pro Zeiteinheit gebildeten pNPs (Produktbildung) errechnen. Aus der linearen Auftragung der pNP Konzentration über die Reaktionszeit wird die volumetrische Aktivität des Enzyms in U/ml errechnet. 1 Unit (U) wird hierbei definiert als die Enzymmenge, welche zur Freisetzung von 1 μ mol pNP pro Minute im oben angegebenen Puffersystem bei 30 °C führt.

2.15 Bestimmung der *At*HNL-Aktivität mit Mandelonitril als Substrat

2.15.1 Die Bestimmung der HNL-Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten mittels Mandelonitril-Spaltungsassays [224]

Als Substratlösung-Stocklösung (60 mM Mandelonitril) wurden 10 ml des HNL-Assaypuffers mit 80 μ l Mandelonitril versetzt und durch Vortexen gemischt. Diese Mandelonitril-Stocklösung muss vor jeder Messung frisch angesetzt werden und ist bei RT über ca. 2-3 h stabil.

*At*HNL-Aktivität wurde photometrisch bestimmt, indem die Spaltung von (*R*)-Mandelonitril zu Benzaldehyd und Blausäure verfolgt wurde (Abbildung 2.4), wobei Bildung von Benzaldehyd bei einer Wellenlänge von 280 nm nachgewiesen wurde. Die Änderung der OD_{280nm} ist somit ein Maß für die Aktivität der *At*HNL. Die Bestimmung der *At*HNL-Aktivität wurde in einem Volumen von 1 ml in einer Quarz-Küvette (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt (Kapitel 2.15). Sowohl der HNL-Assaypuffer als auch die Enzymlösung wurde auf 25 °C vortemperiert. Zur Messung wurden 700 μ l Assaypuffer (pH 5,5) mit 100 μ l *At*HNL-haltiger Probe (Proteinkonzentration 0,3 μ g/ml) vermischt. Durch die Zugabe von 200 μ l Mandelonitril-Stocklösung (60 mM, pH 3,5) wurde die Reaktion sofort gestartet und der Anstieg der Absorption bei 280 nm über einen Zeitraum von 2 min an einem Spektralphotometer (SpectraMax 250 der Firma Molecular Devices, Sunnyvale) verfolgt. Da das Substrat Mandelonitril im wässrigen Milieu bei einem pH > 3,5 instabil ist, wurde als Kontrolle (Leerwert) bei jeder Messreihe ebenfalls der spontane Zerfall des Mandelonitrils aufgezeichnet. Hierfür wurde anstatt der *At*HNL-haltigen Probe 100 μ l des jeweiligen (ebenfalls vorgewärmten) Assaypuffers für die Messung verwendet. Der ermittelte Leerwert wurde anschließend von den Messwerten für die Enzymaktivität subtrahiert. 1 Unit (U) wird hierbei definiert als die Enzymmenge, welche zur Freisetzung von 1 μ mol Substrat pro Minute im beschriebenen bei 25 °C Puffersystem führt.

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener pH-Werte auf die HNL-Aktivität wurde der pH-Wert des HNL-Assaypuffers angepasst. Zur Berechnung der volumetrischen Aktivität der Ansätze

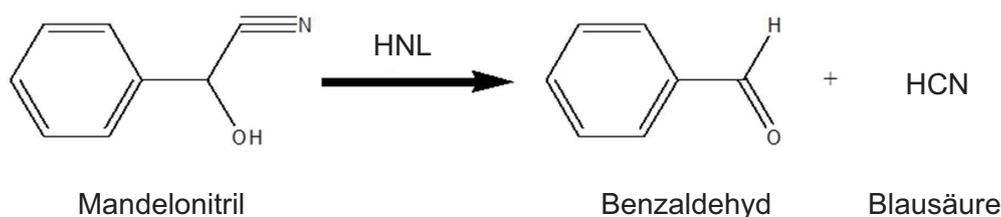


Abbildung 2.4: Die enzymatische Spaltung von Mandelonitril zu Benzaldehyd und HCN durch die *At*HNL. Die Bildung von Benzaldehyd kann bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt werden.

wurde Gleichung 2.4 verwendet:

$$\text{Aktivität (U/ml)} = \frac{(\Delta A_{/min} \text{ Probe} - \Delta A_{/min} \text{ Leerwert}) \cdot \text{Kuevettenvolumen (ml)}}{\text{Kuevettenvolumen (ml)} \cdot \varepsilon_{\text{Benzaldehyd}} \cdot \text{Schichtdicke (cm)}} \cdot f \quad (2.4)$$

Bestimmung von pH-Stabilitäten

Die Bestimmung der Stabilität der AtHNL-Fusionen verlief analog zu Kapitel 2.15. Zur Messung wurden 700 μl HNL-Assaypuffer mit dem entsprechenden pH-Wert, vortemperiert und mit 100 μl AtHNL-haltiger, ebenfalls temperierter Probe vermischt und über einen Zeitraum von bis zu 2 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Quarzküvette überführt und die Messung durch Zugabe von 200 μl Mandelonitril-Stocklösung gestartet. Das weitere Vorgehen entsprach Kapitel 2.15. Durch Auftragen der Restaktivität gegen die Inkubationszeit erhält man eine Inaktivierungskurve. Durch Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die experimentellen Daten kann die Lebenszeit und damit die Halbwertszeit ermittelt werden. Halbwertszeiten wurden durch einfach exponentiellen Fit (Formel: $y = y_0 + A_1 \cdot e^{(-\frac{x-x_0}{t_1})}$) aus Triplikaten ermittelt. Die Halbwertszeit wird aus der Zeitkonstante t_1 über die Korrelation $T_{1/2} = \ln 2(t_1)$ errechnet.

2.16 Nachweis der AtHNL katalysierten Cyanhydrinsynthese

2.16.1 Präparation von 2 M HCN in MTBE Stock-Lösung [193, 225]:

Natriumcyanid (4,9 g, 0,1 mol) wurde in einer Lösung aus 10 ml dH_2O und MTBE, mit Hilfe eines Magnetrührers, in einem Glasgefäß bei einer Temperatur von 0 °C gelöst, wobei sich das Glasgefäß in einem Eisbad befand. Das biphasische System wurde kontinuierlich für 15 min gerührt und 10 ml 30 % (v/v) HCl-Lösung sehr langsam hinzugegeben. Innerhalb von 25 min wurde die Lösung sehr langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Daraufhin wurden die Phasen im Scheidetrichter getrennt und 7 ml MTBE zur organischen Schicht hinzugefügt. Diese Mischung wurde weiterhin gerührt und das restliche H_2O abgetrennt. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 7 ml MTBE wiederholt. Zuletzt wurde die 2 M HCN-Lösung mit 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,5) gesättigt, wobei sich die organische MTBE-Phase oberhalb der wässrigen Phase befand. Die Lösung wurde vor Licht geschützt bei RT aufbewahrt [226].

2.16.2 Cyanhydrin-Synthese mittels gereinigtem *AtHNL*-FbFP-Fusionsprotein in einem zweiphasigen Reaktionssystem

Für die Cyanhydrinsynthese mit lyophilisierten *AtHNL*-Fusionskonstrukten wurden 5 mg lyophilisiertes Enzym in 50 ml KP_i (50 mM, pH 4,75 oder 4,5) gelöst. Unter Argonatmosphäre wurden 1 ml HCN (1,5-2 M) /MTBE-Lösung mit einer Spritze in das Reaktionsgefäß (Abbildung 2.5) hineingespritzt. Als interner Standard wurden 0,01 mmol (23 μ l) Dodecan mit einer Hamilton Spritze hinzugegeben. Um die Reaktion (RT) zu starten wurden 0,5 mmol Aldehyd hinzugegeben, das Gemisch mit der Spritze durch Auf- und Abbewegen des Kolbens resuspendiert und die erste Probe entnommen. Die nachfolgenden Proben wurden zu definierten Zeitpunkten in einem Zeitraum von 60 min entnommen und mittels chiraler GC analysiert (Kapitel 2.16.4).

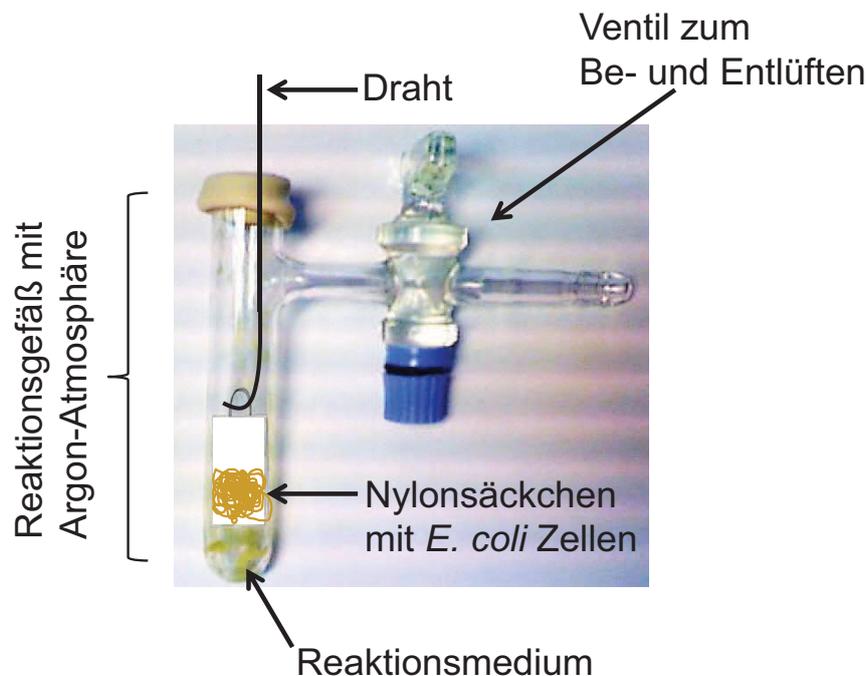


Abbildung 2.5: Das Reaktionsgefäß für die Cyanhydrinsynthese mit ganzen *E. coli*-Überexpressionszellen. Das Reaktionsgefäß steht unter Argon Atmosphäre, ist mit einem Kautschukstopfen verschlossen und besitzt ein Ventil zum Be- und Entlüften. Die Zellen befinden sich in einem Nylonsäckchen, das an einem Draht befestigt ist.

Probenvorbereitung für die Cyanhydrinsynthese mit ganzen Zellen im monophasischen mikrowässrigen Reaktionssystem

Für die Synthesereaktion mit frischen (feuchten) oder lyophilisierten *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen wurden entweder 350 mg Zellfeuchtmasse oder die entsprechende Menge an lyophilisierten Zellen (ca.

80 mg) eingesetzt. Die frischen Zellen wurden nach der Überexpression mittels Zentrifugation (5 min, 5000 rpm, 4°C) geerntet und anschließend dreimal mit je 2 ml frischem, Puffergesättigtem Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) gewaschen. Anschließend wurden die behandelten Zellen in ein Nylonsäckchen (Maschengröße: 0,4 μm , Polystar 100 GE-GS, Rische + Herfurth) überführt und darin verschweißt. Das Nylonsäckchen wurde an einem Metallhaken befestigt, der aus einem gebogenen Draht gefertigt wurde. Diese Vorrichtung wird in das oben dargestellte Reaktionsgefäß gegeben (Abbildung 2.5). Unter Argon- Atmosphäre wird 1 ml der 1,5 - 2 M HCN / MTBE Lösung in das Reaktionsgefäß mit einer Spritze hineingespritzt. Als interner Standard wurden 0,01 mmol Dodecan eingesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 mmol des jeweiligen Aldehyds gestartet. Während des Umsatzes wurden kontinuierlich über 60 Minuten hinweg Proben für die GC-Analyse entnommen. Für die Dauer des Versuches wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur gemischt (130 rpm).

2.16.3 Ganzzellbiotransformation und Recycling

Um die Zellen nach jedem Reaktionszyklus zu recyceln, wurden die Nylonsäckchen an dem Draht herausgezogen, in MTBE gewaschen und für den nächsten Zyklus eingesetzt. Hierfür wurde analog zu Kapitel 2.16.2 verfahren.

2.16.4 Detektion von Cyanhydrinsyntheseprodukten [227]

Die Syntheseprodukte aus Kapitel 2.16.2 und Kapitel 2.16.3 wurden mittels Gas-Chromatographie (GC) (Shimadzu Gaschromatographen GC-14B oder einem Agilent Technologies Gaschromatographen 6890N) unter Verwendung einer β -Cyclodextrin-Säule (CP-Chirasil-Dex CB 25 m x 0,25 mm) analysiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben (30 μl) der jeweiligen Cyanhydrin-Synthesereaktion entnommen und in 1,7 ml Dichlormethan gelöst. Zu jeder Probe wurden 40 μl Pyridin und 40 μl Essigsäureanhydrid hinzugegeben und für 3 h inkubiert, um die Proben in leichter flüchtige Derivate umzuwandeln, welche gaschromatographisch analysiert werden können [227]. Der Umsatz (%) und der Enantiomerenüberschuss (ee) wurden aus der relativen Peakfläche der eingesetzten Aldehyde und der entsprechenden Cyanhydrinenantiomere berechnet.

2.17 Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der PfBAL-Aktivität [228]

PfBAL Aktivität wurde mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays bestimmt. Hierbei wird die Umsetzung des fluoreszenten PfBAL Substrates 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) zu 3,3',-5,5'-Tetramethoxybenzoin (TMBZ) fluorimetrisch nachgewiesen (Abbildung 2.6). Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ emittiert DMBA Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$. Die Messung erfolgte am Fluoreszenzphotometer LS-50B (PerkinElmer, Rodgau). Im Folgenden sind die Einstellungen am Photometer aufgeführt.

Messeinstellungen:	Anregungswellenlänge:	360 nm
	Anregungsspaltbreite:	5 nm
	Emissionswellenlänge:	470 nm
	Emissionsspaltbreite:	7,5 nm
	Temperatur:	25 °C
	Messdauer:	1,5 min
	Messintervall:	0,1 min

Zunächst wurden 850 μl PfBAL-Assaypuffer (Kapitel 2.7.6) und 100 μl der DMBA-Substratlösung in eine 1 cm Halbmikro-Quarz-Küvetten (4x10 mm) gegeben, mit einem Rührstäbchen gründlich gemischt und ca. 10 min auf 25 °C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl einer PfBAL-haltigen Enzymlösung (gelöst in BAL-Assaypuffer(Kapitel 2.7.6)) gestartet. Die verwendete Enzymlösung wurde (falls erforderlich) mit PfBAL-Assaypuffer (Kapitel 2.7.6) verdünnt, sodass sich Intensitätsabnahmen von 10 - 15 Einheiten über den Messzeitraum ergaben. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibriergerade ließ sich der Substratverbrauch errechnen und bei bekannter Enzymkonzentration konnte die spezifische PfBAL-Aktivität in Units (U) pro mg Protein bestimmt werden,

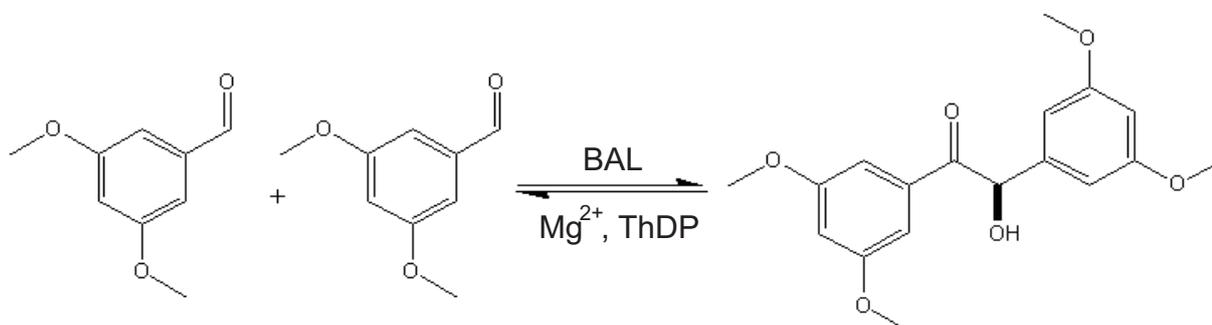


Abbildung 2.6: PfBAL-katalysierte Synthese von 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin aus zwei Molekülen 3,5-Dimethoxybenzaldehyd.

wobei 1 U als die Enzymmenge definiert ist, die 1 μmol DMBA pro Minute bei den oben genannten Bedingungen umsetzt.

2.18 Berechnung des k_{cat} -Werts

Zur Berechnung der Katalysekonstante (Wechselzahl) k_{cat} wurde das jeweilige Molekulargewicht der Enzyme und der entsprechenden Fusionsproteine berücksichtigt. Dazu wurden zunächst die spezifischen Aktivitäten (U/mg Enzym) auf die Enzymkonzentration in U/ μmol Enzym umgerechnet, wobei das jeweilige Molekulargewicht einer Untereinheit der Fusionsenzyme berücksichtigt wurde. Diese wurde basierend auf der Proteinsequenz unter Verwendung des ProtParam Webserverprogramms berechnet (www.web.expasy.org/protparam/). Unter Beachtung der verwendeten Unitdefinition (1 Unit entspricht der Menge an Enzym welche 1 μmol Substrat pro Minute umgesetzt) kann dieser Aktivitätswert (U/ μmol Enzym) in die entsprechende Wechselzahl k_{cat} (s^{-1}) umgerechnet werden.

2.19 Biophysikalische-Methoden

2.19.1 Messung von Fluoreszenz-Emissionsspektren

Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden mit Hilfe eines temperaturgeregelten (25 °C) T-format Fluoreszenz-Photometers Fluorolog-3 (Horiba, Kyoto, Japan), mit einer 450 W Xenon CW Lampe als Anregungsquelle, aufgenommen. Zur Messung der Fluoreszenzemissionsspektren wurden Proteinproben mit einer vergleichbaren Proteinkonzentration verwendet (1 mg/ml). Für die fluorimetrische Messung in Zellsuspensionen wurden die Fusionsprotein überproduzierenden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in 50 mM Natriumphosphatpuffer bis auf eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ auf 0,1 verdünnt. Nach Anregung des FRPs mit Licht der Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ (FbFP und PYP) oder $\lambda = 520 \text{ nm}$ (YFP) wurden Emissionsspektren im Wellenlängenbereich von $\lambda_{\text{em}} = 470 - 600 \text{ nm}$ (FbFP und PYP) oder $\lambda_{\text{em}} = 530 - 650 \text{ nm}$ (YFP) aufgenommen. Die Bandbreiten betragen sowohl auf der Emissions- als auch auf der Anregungsseite 1,5 nm.

2.19.2 Messung von Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren wurden mit Hilfe eines DU-650 Spektralphotometers der Firma Beckmann in einem Wellenlängenbereich von 250 nm bis 650 nm aufgenommen. Die Messung wurde in einer

1 cm Quarz-Küvette bei 20 °C mit dem jeweiligen Enzym-Lagerpuffer (Kapitel 2.5) als Referenz durchgeführt.

2.19.3 Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute [19]

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute (siehe Einleitung) wurde in dieser Arbeit die vergleichende Methodik nach Williams *et al.* [19] verwendet. Hierbei erfolgt die Bestimmung von Φ_F über einen Vergleich mit einem gut charakterisierten Standard bekannter Quantenausbeute. Zur Bestimmung der Φ_F der FbFP-basierten Systeme wurde Riboflavin als Standard verwendet. Zur Bestimmung der Φ_F der YFP-basierten Systeme wurde Fluorescein eingesetzt. Standard und Proteinproben wurden auf eine Absorption von maximal 0,1 bei der Anregungswellenlänge ($\lambda_{ex} = 450$ nm für Riboflavin/FbFP und $\lambda_{ex} = 495$ nm für Fluorescein/YFP) verdünnt. Ausgehend von diesem Ansatz wird eine Verdünnungsreihe angefertigt. Für jede Probe wird sowohl die Absorption bei der entsprechenden Anregungswellenlänge, als auch die Fluoreszenzemission nach Anregung mit dieser Wellenlänge gemessen. Die Bandbreite auf der Emissions- bzw. Anregungsseite betrug bei allen Messungen 2 nm. Alle Messungen wurden in einer 1 cm Quarz-Küvette bei 20 °C mit dem jeweiligen Enzym-Lagerpuffer als Referenz durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe des Origin7G Programms prozessiert. Zur Quantifizierung der Fluoreszenzemission wurde der entsprechende Emissionspeak integriert, um das Integral zu bestimmen. Aus der linearen Auftragung des Flächenintegrals des Fluoreszenz-Emissionspeaks gegen die Absorption wird eine Steigung, welche die Effektivität der Fluoreszenzemission der jeweiligen Probe beschreibt, erhalten. Aus dem Verhältnis der Steigung des jeweiligen Standards und der Proteinprobe kann nun die Quantenausbeute (Kapitel 2.19.3) ermittelt werden.

2.19.4 Messung des Lichtstreuungsverhaltens von ganzen Zellen mittels Fluorimetrie

Um die Änderung der Zellgröße in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in MTBE zu verfolgen wurde das statische Streusignal der Zellen bei $\lambda_{em} = 600$ nm (Anregungs- und Emissionswellenlänge) gemessen. Die Streudaten wurden dazu verwendet die Fluoreszenzemissionsspektren und die Emissionsintensitäten zu korrigieren. Der Versuchsaufbau sowie die eingestellten Parameter entsprachen weitgehend denen der Fluoreszenzspektroskopie.

2.20 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Bedingungen der Cyanhydrin-Synthesereaktion nachzuahmen, wurden nFbFP-AtHNL überproduzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in puffergesättigtem MTBE ohne die Zugabe von Benzaldehyd oder HCN für bis zu 4,5 h inkubiert und in bestimmten Intervallen Proben entnommen. Die experimentellen Bedingungen (Temperatur, Lösungsmittel, Reaktionsgefäß) waren identisch zu dem bereits beschriebenen Aufbau der Ganzzellsynthese (Kapitel 2.16.2). Diese Modifikation des Versuchsaufbaus aus Kapitel 2.16.2 war notwendig, da es aus Sicherheitsgründen nicht möglich war mit hochgiftigem HCN (2 M Konzentration im Assay) unter einem Standard-Fluoreszenzmikroskop (ohne Abzug) zu arbeiten. Zu festen Zeitpunkten wurden je 3 μl der verdünnten Zellsuspension ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$) auf einem Objektträger fixiert, welcher mit einem zuvor gegossenen Agarosefilm (1 % Agarose) überzogen war. Die Probe wurde mit einem Deckgläßchen bedeckt und unter ein voll motorisiertes, invertiertes Fluoreszenzmikroskop platziert (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments Inc., Melville, NY). Desweiteren war das Mikroskop mit einem Fokusassistenten (Nikon PFS) ausgestattet, der den thermischen Drift während der Mikroskopie mit dem Apo TIRF 100x Oil DIC N Objektiv, der ANDOR LUCA R DL604 Kamera und der Xenon Fluoreszenzlichtquelle kompensierte. Für die optimale Anregung und Detektion der FbFP-Reporter wurden Standardfilter verwendet ($\text{eCFP } \lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm} - 446 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm} - 500 \text{ nm}$). Es wurden sowohl DIC (Differentialinterferenzkontrast, *differential interference contrast*) Mikroskopiebilder als auch Fluoreszenzbilder aufgenommen und analysiert. Dies geschah mit Hilfe des Nikon NIS Elements AR Softwarepakets (NIKON).

2.20.1 Bildanalyse und statistische Auswertung der Mikroskopiedaten

Für jeden Zeitpunkt wurden 10×10 Bilder erzeugt, wobei jedes Bild zwischen 10 und 100 bakterielle Zellen umfasste. Diese Zellen wurden hinsichtlich ihrer Größe und Fluoreszenz analysiert. Um die Anzahl der Zellen in der Probe zu ermitteln wurde das in die Mikroskopsoftware integrierte, automatisierte Zellzählwerkzeug verwendet. Unter Verwendung des automatisierten *threshold picking tools* konnten Zellen oder Bereiche der Bilder ausgeschlossen werden, die für eine Analyse ungeeignet waren. Aggregate oder kleine Partikel wurden im Nachhinein manuell von der Auszählung ausgeschlossen. Alle akzeptierten Objekte wurden für folgende statistische Auswertungen der Zellmorphologie/Zellelongation verwendet.

Die Elongation ist hierbei definiert als der des Maximum des Feret's Durchmessers, durch das Minimum des Feret's Durchmessers. Der Feret-Durchmesser ist kein Durchmesser im eigentlichen Sinne. Er ist die Grundlage für eine Anzahl von Größen, die alle durch den Abstand zweier Tangenten (graue Linien) (Abbildung 2.7) an die Partikelkontur (bakterielle Zelle) in einer festgelegten Messrichtung

(Start und Ende) definiert sind. Der maximale oder minimale Feret-Durchmesser wurde über alle möglichen Messrichtungen ($0^\circ \dots 180^\circ$) ermittelt. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis des größten und kleinsten Werts möglichst vieler Winkelmessungen. Dies geschah automatisch mit Hilfe der Mikroskopiesoftware. Die Ergebnisse wurden exportiert und mit dem Programm Origin7G prozessiert, um die Graphen im Ergebnisteil (Abbildung 3.15) zu generieren. Sämtliche Werte repräsentieren den Durchschnitt des Zellumfangs, der sich aus der Analyse von 1000 - 10.000 Zellen je Zeitpunkt ergibt.

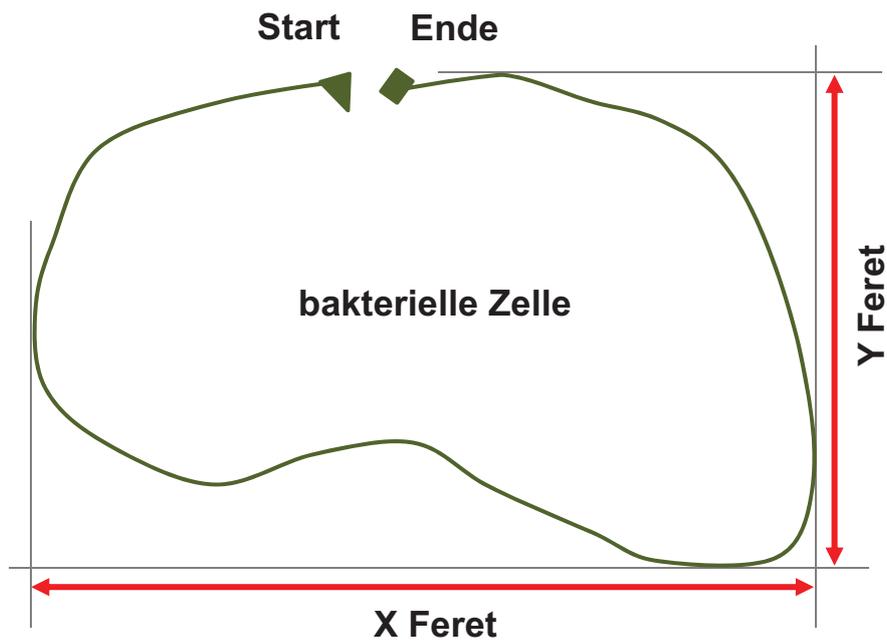


Abbildung 2.7: Die Vermessung von Feret-Werten anhand einer bakteriellen Zelle. Gekennzeichnet sind der Start- und Endpunkt der Vermessung und der sich daraus ergebenden Feret-Durchmesser.

3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierung von Fluoreszenzreporter-Enzymfusionen für den Einsatz in der Biokatalyse

In Reaktionssystemen, in denen Enzyme als Biokatalysatoren verwendet werden, ist es notwendig, den Zustand und die Verteilung des Enzyms innerhalb des Systems zu kennen. Von besonderem Interesse wäre z.B. der Zustand und die Verteilung des Enzyms in Hydrogelen und anderen Enzymimmobilisaten sowie innerhalb der Zellen eines Ganzzellbiokatalysators. Hierbei stellt die Analyse der Enzymverteilung und des Faltungszustandes ein Problem dar, welches nicht ohne weiteres mittels klassischer biochemischer Verfahren untersucht werden kann. Um diesen Vorgang überhaupt, und vor allem wenig invasiv durchführen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Eignung verschiedener Fluoreszenzproteine als Reporter (FRPs) zur Markierung von Enzymen untersucht. Hierfür wurden Translationsfusionen mit verschiedenen bereits etablierten, sowie neu charakterisierten FRPs erzeugt. Als bereits beschriebene Reporterproteine wurden ein Flavin-basiertes fluoreszentes Protein (FbFP) [77], sowie das *enhanced* gelbfluoreszierende Protein (eYFP) eingesetzt [44]. Als neuartiger *in vitro* Fluoreszenzreporter sollte das *photoactive yellow protein* (PYP) aus *Halorhodospira halophila* Anwendung finden. Der Hauptfokus der durchgeführten Versuche stellt das FbFP, abgeleitet vom bakteriellen LOV-Photorezeptorprotein YtvA aus *Bacillus subtilis*, dar.

Das *B. subtilis* YtvA-Protein besteht aus einer kanonischen "light, oxygen, voltage" (LOV)-Sensordomäne, die von einer N-terminal lokalisierten α -helikalen CAP-Struktur und einem C-terminalen, α -helikalen Verbindungselement (LINKER in Abbildung 3.1) flankiert wird (Abbildung 3.1). Im YtvA-Photorezeptor verbindet das C-terminale Linker-Element die Sensor LOV-Domäne mit der Effektor-Sulfat-Transporter-Anti-Sigma-Faktor-Antagonist (STAS)-Domäne (Abbildung 3.1) [119]. In dieser Arbeit wurde dieses modulare Aufbauprinzip (Abbildung 3.1), welches eine Eigenschaft der meisten natürlich vorkommenden LOV-Photorezeptoren ist [229], für die einfache Konstruktion von Translationsfusionen ausgenutzt. Hierbei wurden die N- und C-terminalen, helikalen Elemente außerhalb der kanonischen LOV-Kerndomäne als natürlich vorkommende Verbindungselemente verwendet, um eine räumliche Trennung des FbFP-Reportermoduls vom Zielenzym zu erreichen. Um die Eignung von FbFPs zur Erzeugung von Translationsfusionen zu evaluieren, wur-

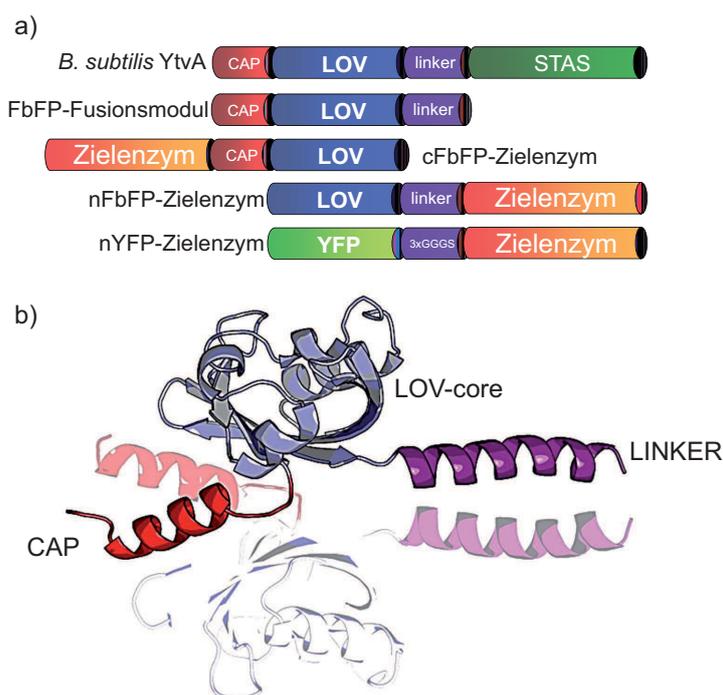


Abbildung 3.1: a) Modularer Aufbau der FbFP und YFP basierten Fusionen. Für das FbFP Modul wurde das natürliche, modulare Aufbauprinzip von LOV-Photorezeptoren, wie des YtvA-Proteins aus *B. subtilis*, ausgenutzt. Abkürzungen: LOV: *light, oxygen, voltage* -Domäne; STAS: Sulfat Transporter Anti-Sigma Faktor Antagonist Domäne; YFP: verbessertes gelb fluoreszierendes Protein; CAP: N-terminale α -helikale Struktur; LINKER: C-terminaler α -helikaler Linker; 3xGGGS: flexibler Linker bestehend aus einem sich 3-fach wiederholenden Motiv der Aminosäuren GGGGS. In den cFbFP-Zielenzym und nFbFP-Zielenzym-Fusionen wurde das FbFP-Fusionsmodul an den entsprechenden Terminus des Zielenzyms fusioniert. b) Homologiemodell der LOV-Domäne des YtvA-Proteins aus *B. subtilis*. Das Modell wurde mittels der YASARA Modelling and Simulation Software basierend auf der Kristallstruktur von PpSB1-LOV (PDB: 3SW1 [230]) erzeugt. Das Modell dient der Visualisierung der N- und C-terminalen helikalen Strukturelemente (CAP: rot und LINKER: violett) außerhalb der kanonischen LOV-Domäne: blau. Die zweite Untereinheit des parallelen Homodimers ist transparent dargestellt. Das Modell wurde generiert, da die YtvA-LOV-Domäne (PDB: 2PR5 [101]) ohne das N-terminale CAP kristallisiert wurde. Diese Strukturelement ist jedoch im Vollängen YtvA-Photorezeptor vorhanden [230]. (© American Society for Microbiology, [DOI:10.1128/AEM.00795-13])

den in allen Fällen N- und C-terminale Fusionen erzeugt. Als Kontrollfusion wurde YFP N-terminal an das jeweilige Zielenzym via eines flexiblen, sich dreifach wiederholenden GGGGS-Linkers fusioniert [231] (Abbildung 3.1 a)). Um eine möglichst breite Anwendbarkeit von FbFPs für den Einsatz als translationales Reportermodul zu verifizieren, wurde die Komplexität der generierten Fusionen graduell erhöht, indem Zielenzyme mit unterschiedlicher Komplexität (z.B. Quartärstruktur, Kofaktor-Abhängigkeit) verwendet wurden. Einige Eigenschaften der verwendeten Zielenzyme sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Reihe der eingesetzten Zielenzyme beinhaltet die monomere Lipase A aus *B. subtilis* (*BsLA*) [217], die dimere Hydroxynitrilase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) [133] und letztlich die tetramere Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*), die Thiamindiphosphat (ThDP) und Magnesium (Mg^{2+}) als Kofaktoren benötigt [232].

Tabelle 3.1: Übersicht über die eingesetzten Zielenzyme. Weitere Details zu den Zielenzymen sind der Einleitung zu entnehmen. (*Berechnet basierend auf der Aminosäuresequenz des Bioinformatiktools ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>))

	BsLA	AtHNL	PfBAL
			
Ursprungsorganismus	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Enzymklasse	Hydrolase (E.C. 1.3.3.1)	Lyase (E.C. 4.2.1.X)	Lyase (E.C. 4.1.2.38)
PDB-Code	1I6W	3DQZ	2AG0
Quartärstruktur	Monomer	Homodimer	Homotetramer
Kofaktor	-	-	ThDP und Mg ²⁺
Molekulargewicht/Untereinheit*	19 kDa	29 kDa	60 kDa
Gewicht des FbFP-Fusionskonstrukts*	35 kDa	90 kDa	300 kDa

3.1.1 Konstruktion von Fluoreszenzreporter-Enzym-Fusionen

Die Genfragmente, welche für die Reporterprotein-Module cFbFP und nFbFP kodieren (cFbFP: Rest 1 - 126; nFbFP: Rest 25 - 147), wurden mittels einer Standard-PCR (Kapitel 2.11.2) an einem pET28a-Vektor, der das *ytvA* Gen mit der Codonsubstitution TGC → GCG (kodierend für den Aminosäureaustausch C62A) enthält [77], amplifiziert. Dieser Aminosäureaustausch verhindert die Ausbildung des lichtabhängigen Cysteinyl-Thiol Adduktes. Hierdurch wird die LOV-Domäne autofluoreszent [77]. Die Strategie zur Klonierung der entsprechenden FbFP-Genfragmente in pET28a als Expressionsvektor ist detailliert im Material- und Methodenteil (Kapitel 2.11) beschrieben und schematisch in Abbildung 3.2 zusammengefasst.

In dieser Weise wurden die Konstrukte pETnFbFP und pETcFbFP erhalten, welche für alle weiteren Klonierungsschritte verwendet wurden (Abbildung 3.2). Gleichzeitig wurden diese Konstrukte zur Expression und Reinigung der entsprechenden FbFP-Kontrollproteine (ohne fusioniertes Zielenzym) eingesetzt. Diese bestehen aus dem jeweiligen isolierten FbFP Fusionsmodul und dienen als Kontrolle zur Bestimmung von Fluoreszenz-Quantenausbeuten (Kapitel 2.19). Im nächsten Schritt wurden die PCR amplifizierten Gene (Kapitel 2.11.5) kodierend für die entsprechenden Zielenzyme in diese Vektoren eingefügt (Abbildung 3.3). Die Strategie zur Klonierung der Zielenzymgene in pETnFbFP und pETcFbFP sind im Material- und Methodenteil (Kapitel 2.11.5) zusammengefasst. In Abbildung 3.3 ist die entsprechende Klonierungsstrategie dargestellt.

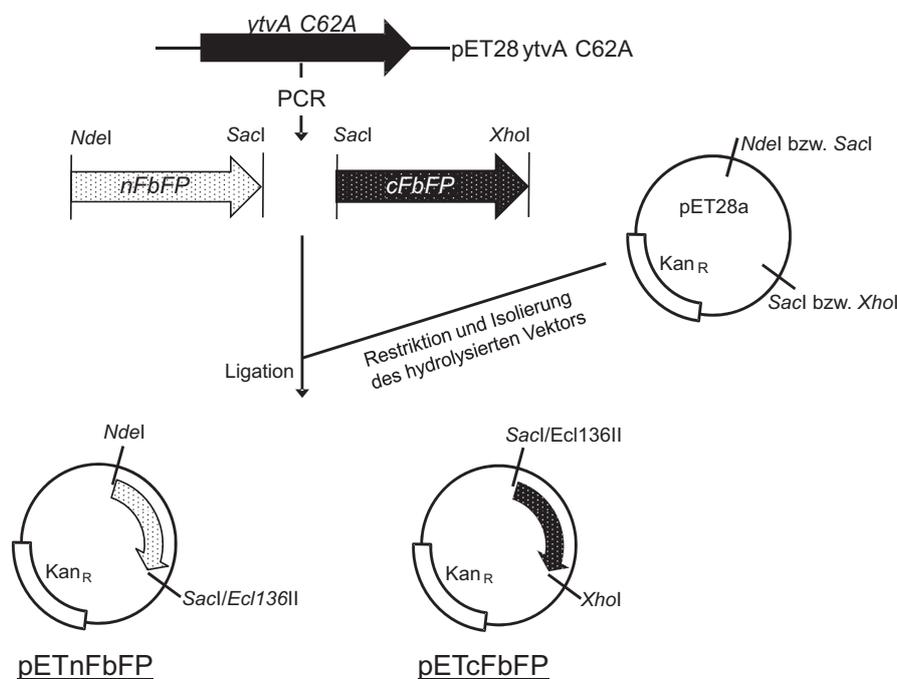


Abbildung 3.2: Schema zur Klonierung von nFbFP (helles Punktmuster) bzw. cFbFP (dunkles Punktmuster) in den Expressionsvektor pET28a.

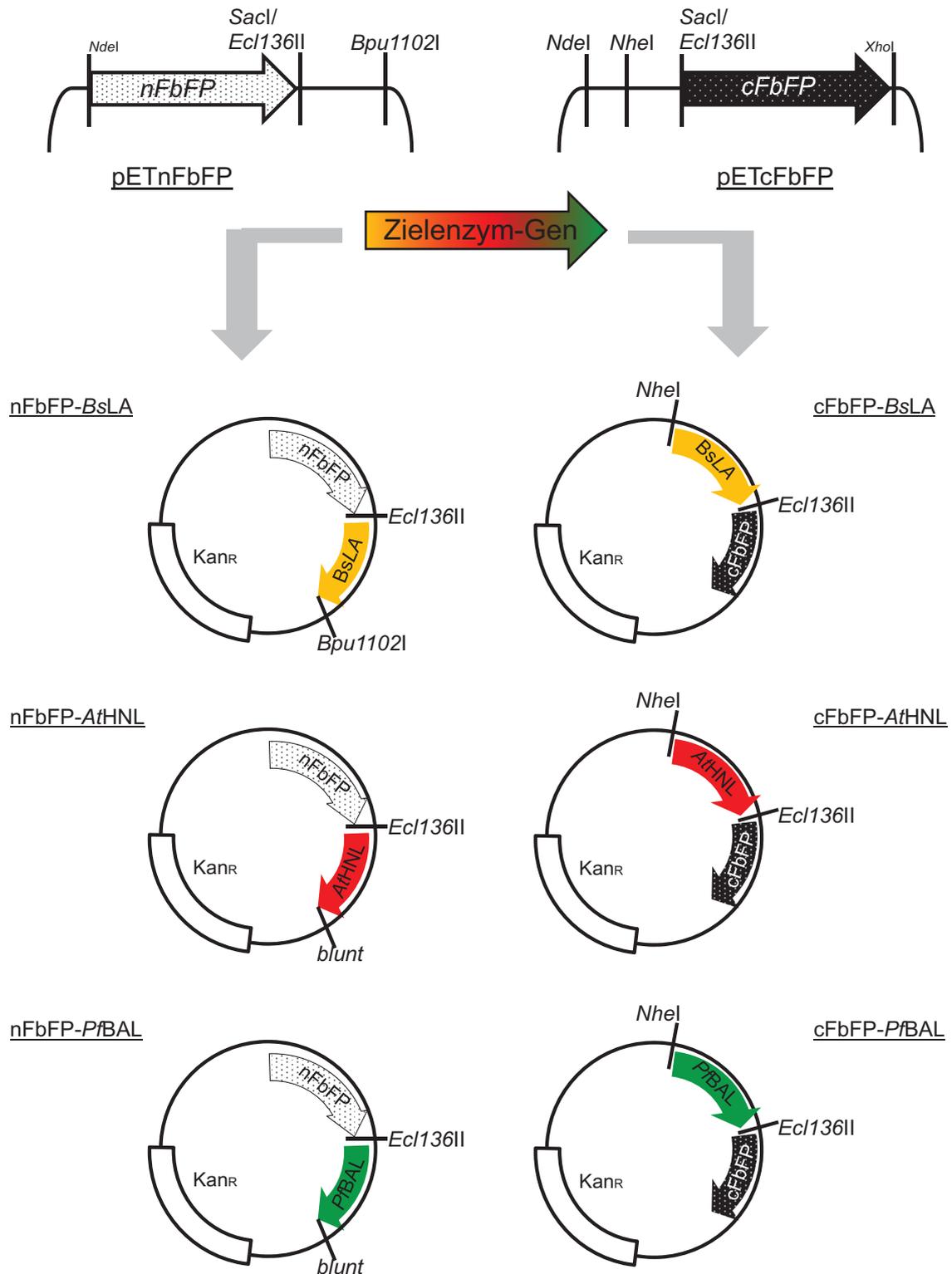


Abbildung 3.3: Übersicht zur Klonierung aller Zielenzyme in die Vektoren pETnFbFP und pETcFbFP. Zur Erstellung der Reporterfusionen mit weiteren Zielenzymen wurde das Zielgen aus dem jeweiligen Expressionsvektor mittels PCR amplifiziert und über die in der Abbildung dargestellten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen in einen entsprechenden, hydrolysierten Vektor pETnFbFP bzw. pETcFbFP ligiert.

Mittels dieser Klonierungsstrategie erfolgt zusätzlich die N-terminale Fusion eines 20 Aminosäure-Tags bestehend aus einer Hexahistidin-Sequenz und einer Erkennungssequenz für die Protease Thrombin (Aminosäuresequenz: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH). Die entsprechende DNA-Sequenz liegt bereits auf dem verwendeten pET28a-Vektor vor, die gewählte Klonierungsstrategie erlaubt lediglich die *in-frame*-Fusion des entsprechenden klonierten Genfragments. In dieser Weise wurden die Vektoren pETnFbFP-*BsLA*, pETcFbFP-*BsLA*, pETnFbFP-*AtHNL*, pETcFbFP-*AtHNL*, pETnFbFP-*PfBAL* und pETcFbFP-*PfBAL* erzeugt.

Die erzeugten Fusionsvektoren pETnFbFP und pETcFbFP erlauben eine einfache Fusion verschiedenster Zielgene an das 5'- bzw 3'-Ende des *fbFP*-Gens und somit an den N- und C-Terminus des FbFP-Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene kodierend für *BsLA*, *AtHNL* und *PfBAL* in die entsprechenden pET28a basierten FbFP-Fusionsvektoren kloniert. In dieser Weise wurden Genfusionen erzeugt, welche für die entsprechenden translationalen Fusionsproteine kodieren. Das verwendete pET28a Vektorsystem erlaubt hierbei die einfache T7-RNA-Polymerase-abhängige Überproduktion der zusätzlich mit einem His-Tag versehenen Fusionsproteine in *E. coli*.

3.1.2 Erzeugung verschiedener FRP-Enzym-Referenzfusionen mittels “*overlap extension*“-PCR

Als Referenz für die FbFP-Enzym-Fusionen wurden translationelle Fusionen des jeweiligen Zielenzym mit YFP und PYP erzeugt. Da im Zuge der Arbeit gezeigt werden konnte, dass die N-terminalen FbFP-Enzym-Fusionen generell einfacher als die C-terminalen Fusionen zu exprimieren waren, bessere Ausbeuten an rekombinantem Protein lieferten und höhere Fluoreszenz-Quantenausbeuten besaßen (Tabelle 3.4), wurden als Referenzfusionen lediglich N-terminale YFP-Zielenzym-Fusionen erzeugt. Ähnliches gilt für die Fusion mit PYP. Da sich im Laufe der Arbeit gezeigt hat, dass die FbFP-Fusionen an die *AtHNL* die Quartärstruktur des Fusionsproteins in unvorhersehbarer Weise beeinflussen (Kapitel 3.7.1), wurde PYP als monomeres FbFP-strukturverwandtes Protein als Referenz herangezogen. Hierzu wurde eine N-terminale Fusion zwischen PYP und der *AtHNL* erzeugt. In allen Referenzfusionen wurde das FRP über einen flexiblen 3xGGGS Linker mit dem jeweiligen Zielenzym verknüpft. Der Aufbau des nPYP-*AtHNL*-Konstruktes ist hierbei analog zu den in Abbildung 3.1 dargestellten YFP-Zielenzym-Fusionen.

Zur Erzeugung der YFP-Referenz-Fusionen sowie für die nPYP-*AtHNL*-Fusion wurde in einem ersten Schritt das Gen kodierend für YFP bzw. PYP mit dem Gen kodierend für das jeweilige Zielenzym mittels “*overlap-extension*“-PCR (oe-PCR) verknüpft (Kapitel 2.11.4) [233]. Die Fusion der beiden Gene wurde hierbei in zwei PCR-Schritten erzeugt (Kapitel 2.11.4) und mittels der in entsprechenden Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsendonuklease-Schnittstellen in einen in gleicher Weise restringierten pET28a-Vektor kloniert (Abbildung 3.4).

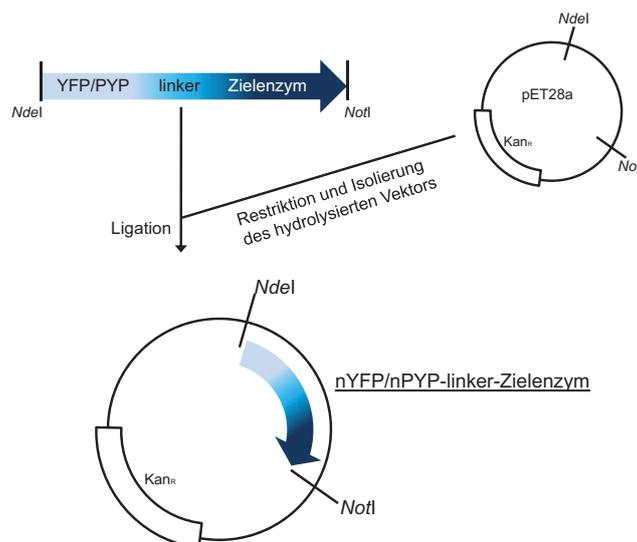


Abbildung 3.4: Veranschaulichung der Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Expressionsvektoren nYFP-Zielenzym bzw. nPYP-*AtHNL*. Die mit Hilfe einer “*overlap extension*“-PCR erzeugten Genfusionen wurden isoliert, restringiert und in pET28a ligiert.

Wie für die FbFP-Fusionen beschrieben, erfolgt mittels dieser Klonierungsstrategie eine zusätzliche N-terminale Fusion eines 20 Aminosäure-Tags bestehend aus einer Hexahistidin-Sequenz und eine Erkennungssequenz für die Protease Thrombin. In dieser Weise wurden die Vektoren pETnYFP-*BsLA*, pETnYFP-*AtHNL*, pETnYFP-*PfBAL* zur Expression der YFP-Referenz-Fusionen sowie der Vektor pETnPYP-*AtHNL* zur Expression der PYP-*AtHNL*-Fusion erzeugt.

Mittels “*overlap extension*“- PCR wurden eine Reihe von Genfusionen erzeugt, welche für verschiedene FRP-Zielenzym Referenz-Fusionsproteine kodieren. Als Referenz-FRPs wurden YFP und das PYP-Protein aus *H. halophila* an *BsLA*, *AtHNL* und *PfBAL* fusioniert. Die erzeugten Expressionsvektoren, basierend auf pET28a, erlauben hierbei eine einfache T7-RNA-Polymerase-abhängige Überproduktion der His-getaggten Fusionsproteine in *E. coli*.

3.1.3 Expression und qualitative Untersuchungen zur Fluoreszenz der nFbFP- und nYFP-Enzym-Fusionen

Um eine umfassende Charakterisierung der FbFP-Fusionsproteine zu ermöglichen, wurden diese zunächst heterolog in *E. coli* überproduziert. Dazu wurde *E. coli*-BL21(DE3) mit dem entsprechenden pET28a-basierten Fusionsprotein-Expressionsvektor (Kapitel 2.10.6) transformiert. Die Überexpression erfolgte zunächst im kleinen Maßstab wie im Material- und Methodenteil beschrieben in Autoinduktionsmedium (Kapitel 2.4). Erfolgreiche Überexpression kann qualitativ an Hand von *in vivo* Fluoreszenz der entsprechenden Zellen unter Blaulichtbeleuchtung nachgewiesen werden. Dazu wurde eine konzentrierte Zellsuspension der jeweiligen *E. coli*-BL21(DE3)-Überexpressionskultur unter Blaulichtbeleuchtung fotografiert (Abbildung 3.5).

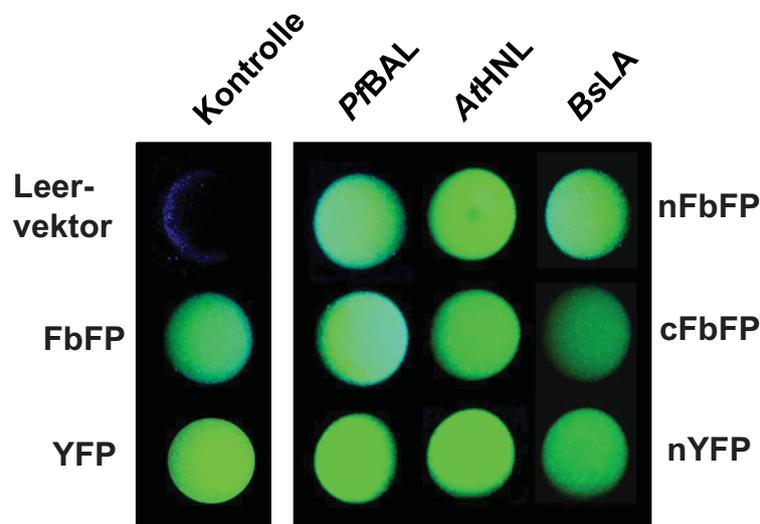


Abbildung 3.5: *In vivo*-Fluoreszenz von *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche die entsprechenden Fusionsproteine überexprimieren. Die Anregung erfolgte mit blauem Licht ($\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$). Hierzu wurden 500 mg der entsprechenden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in 500 μl PBS-Puffer (Kapitel 2.7.4), pH 7 resuspendiert. (Copyright © American Society for Microbiology, [DOI:10.1128/AEM.00795-13])

Da für alle Zellsuspensionen eine deutliche FbFP- oder YFP-spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, konnte von einer erfolgreichen Überexpression der entsprechenden Fusionsproteine ausgegangen werden.

Erste qualitative Tests deuten darauf hin, dass alle FbFP- und YFP-Fusionsproteine in fluoreszenter Form in *E. coli*-BL21(DE3) überproduziert werden können.

3.2 Expression und Reinigung von FbFP- und YFP-Enzym-Fusionen

Um eine umfassende Charakterisierung der FbFP-Fusionsproteine durchführen zu können, wurden diese heterolog im größeren Maßstab in *E. coli*-BL21(DE3) überproduziert und alle FbFP- und YFP-Fusionsproteine mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) (Kapitel 2.13.7) gereinigt. Da für alle Fusionsproteine die Reinigung in ähnlicher Weise und mit ähnlicher Effizienz durchgeführt werden konnte, wird im Folgenden der generelle Ablauf einer solchen Reinigung exemplarisch für das nFbFP-AtHNL-Fusionsprotein dargestellt. Unterschiede in den entsprechenden Protokollen liegen in der Verwendung verschiedener Affinitätsmaterialien sowie in der Verwendung unterschiedlicher Aufschluss-, Äquillibrierungs-, Wasch-, Elutions- und Lagerpuffer. Die entsprechenden Parameter sind im Material- und Methodenteil zusammengefasst (Tabelle 2.5).

Zur Überproduktion von nFbFP-AtHNL wurden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen mit pETnFbFP-AtHNL transformiert. Die Überproduktion von nFbFP-AtHNL erfolgte wie im Material- und Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 2.10.2) in 1 Liter Autoinduktionsmedium (Kapitel 2.4). Im Anschluss wurde das Fusionsprotein mittels IMAC unter Einsatz einer ÄKTApurifier™ FPLC-Anlage gereinigt (Kapitel 2.13.7). Die Reinigung der fluoreszenten Fusionsproteine wird dadurch erleichtert, dass das FbFP auf Grund seiner Gelbfärbung (gebundenes FMN als Chromophor) mit bloßem Auge während der Reinigung erfasst und somit bei jedem Schritt mühelos verfolgt werden kann. Für die in

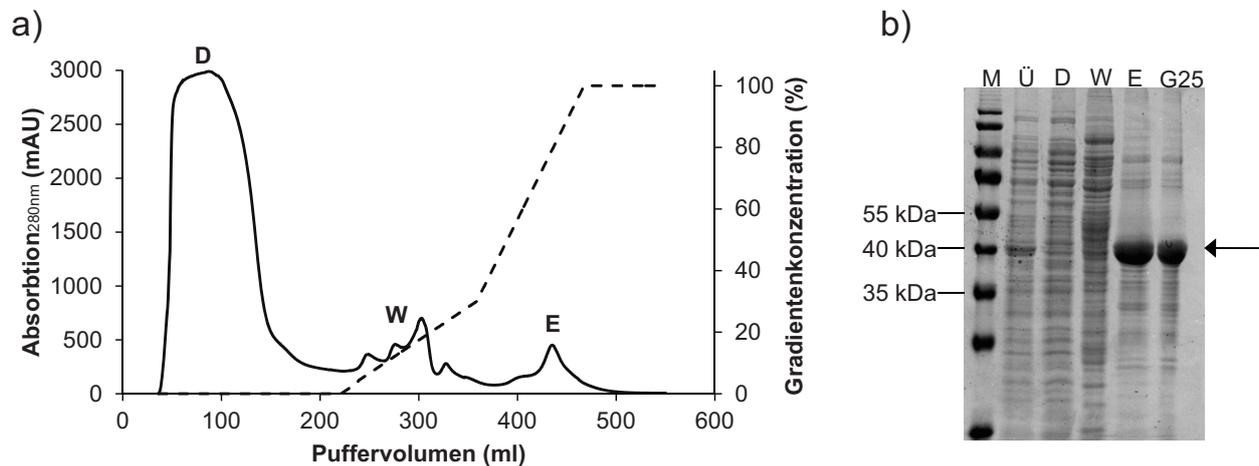


Abbildung 3.6: Chromatogramm und SDS-PAGE-Analyse der nFbFP-AtHNL-Reinigung mittels IMAC. a) Im Chromatogramm wurde die Proteinabsorption bei 280 nm, (durchgehende Linie) sowie der zur Elution verwendete Imidazolgradient (gestrichelte Linie) gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Nach Auftragen der löslichen Fraktion des Ganzzellextraktes (Probe Ü) wurde die Durchlauf fraktion gesammelt (Probe D). Im Konzentrationsbereich zwischen 0 - 75 mM Imidazol eluierten eine Reihe proteinhaltiger Verunreinigungen (Probe W). Die Elution des Zielproteins nFbFP-AtHNL erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von ca. 175 mM (Probe E). b) SDS-PAGE: M: Marker, Ü: Ganzzellextrakt, D: Durchlauf, W: vereinigte Waschfraktionen, E: vereinigte Elutionsfraktionen, G25: vereinigte Fraktionen nach G25-Entsalzung.

Tabelle 3.2: Proteingehalt und AtHNL-Aktivität des nFbFP-AtHNL-Fusionsproteins während der Reinigung durch Affinitätschromatographie und anschließender Entsalzung mittels G25-Material (SEC). Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels Bradford-Test und die AtHNL-Aktivität unter Einsatz des Mandelonitril-Spaltungsassays bestimmt.

*Ausbeute in % bezogen auf die HNL-Aktivität des Ganzzellextraktes

Probe	Volumen (ml)	Proteingehalt			AtHNL-Aktivität				
		Konzentration (mg/ml)	Gesamt (mg)	Ausbeute* (%)	Volumenaktivität (U/mg)	Gesamtaktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungsfaktor	Ausbeute* (%)
Überstand	53	25	1337	100	94	4987	4	1	100
Durchlauf	110	6	713	53	2	231	0,3	0,1	5
Waschfraktion nach Ni-NTA	10	2	23	32	2	16	0,7	0,2	0,3
nach G25	120	1	95	7	42	5010	21	14	101

Abbildung 2.7 dargestellte Reinigung wurden 10 g *E. coli*-BL21(DE3)-pETnFbFP-AtHNL-Zellen verwendet.

Die SDS-PAGE-Analyse des Reinigungsverlaufs für die nFbFP-AtHNL-Fusion zeigt eine deutliche Überexpressionsbande bei etwa 40 kDa. Diese wurde im Verlauf der IMAC-Reinigung immer weiter angereichert (Abbildung 3.6 b)). Diese Bande war in dem entsprechenden Durchlauf und der Waschfraktionen nicht zu beobachten, womit von einer starken Bindung des Fusionsproteins an die Säule ausgegangen werden kann. Nach erfolgter Reinigung mittels IMAC und Entsalzung mit Hilfe einer G25-Säule sind neben der Zielproteinbande nur wenige Verunreinigungen nachzuweisen (Reinheit ca. 85-90 %).

In Tabelle 3.2 ist der Reinigungsverlauf einer exemplarischen nFbFP-AtHNL IMAC-Reinigung quantitativ aufgeschlüsselt.

Um die Funktionalität des FRPs in der Fusion nFbFP-AtHNL zu überprüfen, wurden UV/Vis-Absorptions-, und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen (Abbildung 3.1). Beide Spektren zeigen das für LOV-Proteine (und somit für FbFPs) typische Absorptions- und Emissionsbandenmuster (Abbildung 3.7). Im Absorptionsspektrum kann im Wellenlängenbereich von 400 bis 500 nm ein für proteingebundenes FMN (bzw. für Flavin) charakteristisches Absorptionsmuster nachgewiesen werden. Die breite Bande im blauen Spektralbereich entspricht hierbei dem S_0-S_1 -Übergang inner-

halb der Isoalloxazin-Einheit des Flavins. Diese Bande besitzt zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 447 \text{ nm}$ und $\lambda_{\max} = 474 \text{ nm}$ sowie eine Schulter bei $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$. Im Vergleich zum freien FMN in Puffer zeigt LOV-Protein-gebundenes FMN diese ausgeprägte Schwingungsfinestruktur (Abbildung 3.7 a), blaue Linie). Die Feinstruktur wird vermutlich sowohl durch die unpolare Umgebung als auch durch die eingeschränkte Bewegungsfreiheit des FMN-Moleküls im Protein hervorgerufen. Das Muster der Flavin-Absorption von FbFPs kann somit als Indikator für intaktes, korrekt gefaltetes Fluoreszenzreporterprotein herangezogen werden. Bei Denaturierung des FbFP-Proteins würde der Flavin-Chromophor freigesetzt, wodurch die Struktur des Spektrums im blauen Spektralbereich verloren geht.

Im Fluoreszenz-Emissionsspektrum besitzt nFbFP-AtHNL (Abbildung 3.7) ein für LOV-Proteine (FbFPs) charakteristisches Bandenmuster mit Emissionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$ und $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$. Im selben Spektralbereich besitzt freies FMN in Puffer lediglich eine breite unstrukturierte Bande mit einem Maximum bei $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ und einer wenig ausgeprägten Schulter bei $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$. Das Maximum bei $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$, welches für Proteingebundenes FMN ausgeprägter nachgewiesen werden kann, ist hierbei höchstwahrscheinlich auf einen radiativen Übergang aus dem niedrigsten Schwingungszustand des ersten angeregten Singulett-Zustandes (S_1) auf ein anderes Schwingungsniveau des Grundzustandes (S_0) zurückzuführen. Im Protein wird dieser Übergang, im Vergleich zu freien FMN, durch die unpolare Umgebung in der FMN-Bindetasche des FbFPs bevorzugt hervorgerufen.

Wie für die FbFP Absorptionseigenschaften beschrieben, können die proteinspezifischen Fluoreszenz-

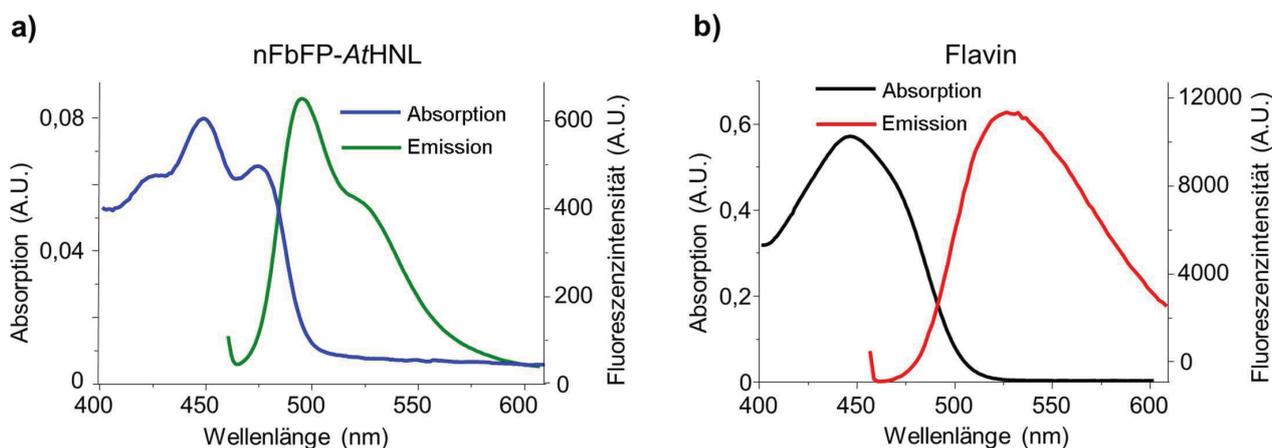


Abbildung 3.7: UV/Vis Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren einer gereinigten nFbFP-AtHNL-Fusionsprotein-Probe a) und von Flavin b). Das Absorptionsspektrum wurde im Spektralbereich von 400 nm bis 550 nm aufgezeichnet (blaue Linie). Alle Messungen wurden an gereinigten nFbFP-AtHNL-Protein bzw. in entsprechendem Puffer gelöstem FMN in einer 1 cm Quarz-Küvette bei 20 °C mit 10 mM Kp_i -Puffer pH 7,5 als Referenz durchgeführt. Die Proteinkonzentration der nFbFP-AtHNL Probe betrug 0,8 mg/ml. Als Referenz wurde FMN in Puffer bis zu einer $OD_{280nm} = 1,5$ gelöst. Zur Aufnahme des Fluoreszenz-Emissionsspektrums (grüne bzw. rote Linie) wurde die Probe mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$ angeregt und anschließend ein Emissionsspektrum im Bereich von 460 nm bis 610 nm aufgenommen. Die Spaltbreite auf Emissions- und Anregungsseite betrug 7,5 nm.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung aller gereinigten Fusionsproteine. Die Ausbeute in mg Protein pro 10 g Feuchtzellmasse. Die Reinheit wurde rein qualitativ anhand einer SDS-PAGE-Analyse abgeschätzt, wobei + einem Reinheitsgrad von > 90 % und - einem Reinheitsgrad von < 90 % entspricht.

	nFbFP	cFbFP	nYFP	nPYP
Referenzen				
Ausbeute (mg)	10	n.b.	15	16
Reinheit (%)	+	n.b.	+	+
BsLA				
Ausbeute (mg)	15	5	20	n.b.
Reinheit (%)	+	-	+	n.b.
AtHNL				
Ausbeute (mg)	20	6	21	18
Reinheit (%)	+	+	+	+
PfBAL				
Ausbeute (mg)	1,2	n.b.	12,8	n.b.
Reinheit (%)	+	n.b.	+	n.b.

eigenschaften als Indikator für ein intaktes, korrekt gefaltetes Fluoreszenzreporterprotein herangezogen werden. Für FbFPs kann das Verhältnis des $\lambda_{\max} = 495$ nm Emissionsmaximums zur Emission bei $\lambda_{\max} = 520$ nm als Indikator für vollständig gefaltetes Protein verwendet werden.

In identischer Weise wurde das cFbFP-AtHNL-Fusionsprotein sowie das nYFP-AtHNL-Referenzprotein gereinigt. Die Reinigung der nFbFP-BsLA, cFbFP-BsLA und nYFP-BsLA-Fusionsproteine erfolgte ebenfalls mittels IMAC an Ni-NTA-Material (Tabelle 3.3). Von den drei möglichen PfBAL-Fusionen konnten lediglich das nFbFP-PfBAL- sowie das nYFP-PfBAL-Fusionsprotein in ausreichender Reinheit erhalten werden. Für beide Fusionen war die Ausbeute jedoch gering (Tabelle 3.3). Die cFbFP-PfBAL-Fusion war unlöslich und konnte nicht gereinigt werden.

Mit Ausnahme der cFbFP-PfBAL-Fusion konnten alle FbFP-Fusionsproteine sowie die entsprechenden YFP-Referenzfusionen in fluoreszenter Form und in ausreichender Menge und Reinheit aus *E. coli*-BL21(DE3) gewonnen werden.

3.3 FbFP-spezifische Fluoreszenzeigenschaften als Indikator für Proteinfaltung

Wie bereits ausgeführt, können die FbFP-spezifischen Fluoreszenzeigenschaften als Indikator für korrekte Proteinfaltung herangezogen werden. Dies wurde beispielhaft im Folgenden zur Untersuchung der temperaturabhängigen Entfaltung des nFbFP-AtHNL-Fusionsproteins ausgenutzt. Hierfür wurde das nFbFP-AtHNL-Fusionsprotein in 10 mM K_p_i (pH 7,5) gelöst, sodass sich eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml ergab. Fluoreszenzemissionsspektren der Probe wurde unter schrittweiser Erhöhung der Temperatur kontinuierlich mit dem Temperaturanstieg aufgezeichnet. Hierbei beobachtet man eine Verschiebung des Emissionsmaximums von $\lambda_{\max} = 495$ nm in den langwelligeren Bereich nach $\lambda_{\max} = 520$ nm (Abbildung 3.8 a)). Diese Beobachtung deutet auf eine vollständige Denaturierung und damit auf die Freisetzung von FMN hin. Aus der Auftragung des Quotienten aus den beiden Maxima ($\lambda_{\max} = 495$ nm/ 520 nm) in Abhängigkeit von der Temperatur ergibt sich eine klassische Schmelzkurve (Abbildung 3.8 b)), aus welcher quantitative Rückschlüsse auf das thermisch bedingte Entfaltungsverhalten des Proteins gezogen werden kann.

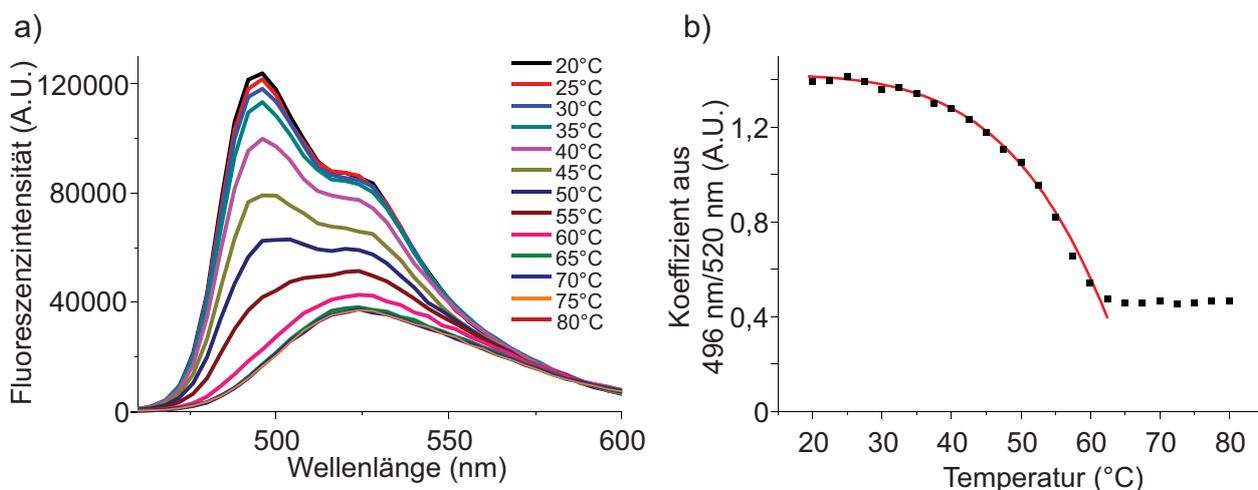


Abbildung 3.8: Fluoreszenzemissionsspektren und das Schmelzverhalten der nFbFP-AtHNL-Fusion in Abhängigkeit von der Temperatur. a) Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur verschiebt sich das Emissionsmaximum von $\lambda_{\max} = 495$ nm nach $\lambda_{\max} = 520$ nm. b) Die Schmelzkurve erhält man durch auftragen des Quotienten der beiden Emissionsmaxima ($\lambda_{\max} = 495$ nm / 520 nm) gegen die Temperatur.

3.4 Charakterisierung der Fluoreszenzreporter-Enzym-Fusionen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, konnten mit Ausnahme von cFbFP-PfBAL, alle FbFP-Zielenzym-Fusionen heterolog in *E. coli*-BL21(DE3) überproduziert und mittels IMAC (Kapitel 2.13.7) gereinigt werden (Tabelle 3.3). Im Folgenden wurden die entsprechenden Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und ihrer enzymatischen Aktivität eingehender charakterisiert (Tabelle 3.4). Die Aktivität aller gereinigten Fusionsproteine wurde mit den entsprechenden Standard Aktivitäts-Assays gemessen (Kapitel 2.14, 2.15 und 2.17). Lipaseaktivität wurde mittels eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-Aktivitätsassays bestimmt (Kapitel 2.14.2). Die Umsetzung wurde diskontinuierlich mittels HPLC verfolgt, wobei die Lipase-abhängige Bildung des Chromogens pNP nachgewiesen wurde. Der Vorteil des neu etablierten HPLC-Lipaseassays liegt hierbei in seiner hohen Präzision und guten Reproduzierbarkeit (Abbildung 3.9) in *interday* und *intraday* Experimenten.

Die AtHNL-Aktivität wurde mittels des Mandelonitril-Spaltungsassays nachgewiesen (Kapitel 2.15) [224] und für die Bestimmung der PfBAL-Aktivität wurde ein kontinuierlicher fluoreszenzbasierter Assay eingesetzt, der die Verknüpfung von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (fluoreszent) zu 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin (TMBZ) verfolgt (Kapitel 2.17) [228].

Die Fluoreszenz aller Fusionen wurde mittels Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute (Φ_F) quantifiziert (Kapitel 2.19).

Wird die Aktivität der FbFP- und YFP-Fusionsproteine mit den entsprechenden wildtypischen Enzymen verglichen, ergibt sich, dass die spezifischen Aktivitäten, mit Ausnahme von cFbFP-BsLA, sich

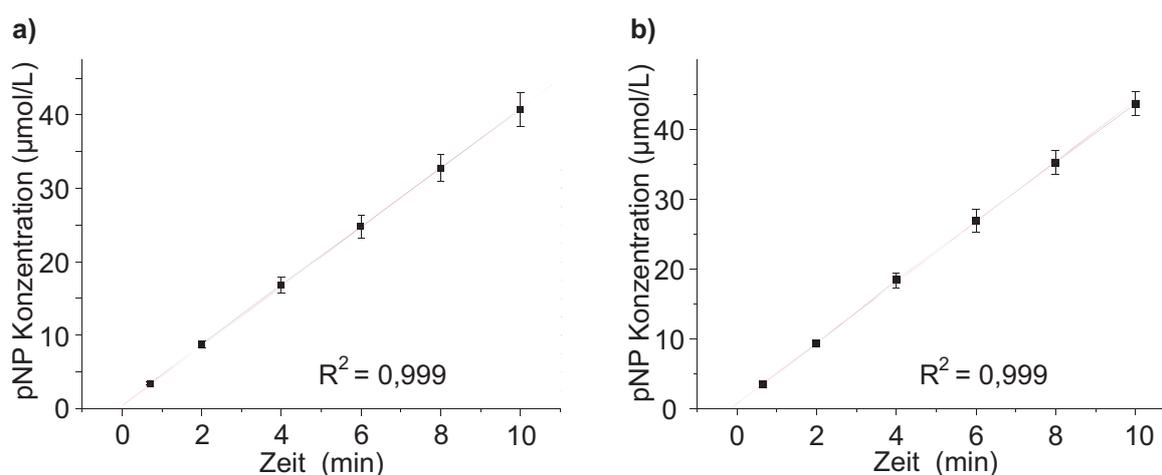


Abbildung 3.9: Darstellung der a) *interday* und b) *intraday* Experimente. Für die *interday* Daten wurden an vier verschiedenen Tagen Proben gemessen. Hieraus ergab sich eine Standardabweichung von 3,6 %. Für die *intraday* Experimente ergab sich aus der dreimaligen Messung an demselben Tag eine Standardabweichung von 3,8 %.

Tabelle 3.4: Enzymatische Aktivität und Fluoreszenz-Quantenausbeute (Φ_F) der gereinigten (Fusions-) Proteine. *AtHNL*- und *PfBAL*-Aktivität wurde mittels der entsprechenden Standard-Aktivitätsassays bestimmt. *AtHNL*-Aktivität wurde bei einem pH-Wert von pH 5 gemessen. Lipaseaktivität wurde mittels eines in dieser Arbeit etablierten HPLC-basierten Lipaseassays nachgewiesen. Φ_F der *PfBAL*- und *AtHNL*-Fusionen wurde im entsprechenden Lagerpuffer bestimmt. Die nFbFP-*PfBAL*-Fusion war visuell fluoreszent, jedoch war die Ausbeute der Reinigung zu gering, um die Fluoreszenz-Quantenausbeute (Φ_F) für das Fusionsprotein bestimmen zu können. (n.b.= nicht bestimmt). Ähnliches gilt für das Referenzfusionen nYFP-*PfBAL*.

Alle *BsLA*-Fusionen sind maximal im alkalischen pH-Bereich (>pH 10) stabil und löslich. Deshalb wurden Φ_F in 10 mM Glycinpuffer, pH 10 bestimmt. Unter diesen Bedingungen ist Φ_F der FbFPs entsprechend herabgesetzt. Kontrolle: FbFP (pH 7,5) Φ_F : 0,26, FbFP (pH 10) Φ_F : 0,28, YFP (pH 10) Φ_F : 0,83, YFP (pH 7,5) Φ_F : 0,63 [23].

	spezifische Aktivität (U/mg)	k_{cat} (s^{-1})	relative Aktivität (% k_{cat})	Φ_F
<i>BsLA</i>	36	12	100	
nFbFP-<i>BsLA</i>	30	18	150	0,18
cFbFP-<i>BsLA</i>	5	3	25	0,10
nYFP-<i>BsLA</i>	28	23	192	0,48
<i>AtHNL</i>	21	5	100	
nFbFP-<i>AtHNL</i>	15	14	280	0,19
cFbFP-<i>AtHNL</i>	18	14	280	0,23
nYFP-<i>AtHNL</i>	30	30	600	0,80
<i>PfBAL</i>	239	36	100	
nFbFP-<i>PfBAL</i>*	239	300	128	n.b.
nYFP-<i>PfBAL</i>*	224	332	142	n.b.

nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 3.4). Die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe wurde hierbei mittels des Bradford-Assays (Kapitel 2.13.2) bestimmt. Als Folge der Fusion des Reporterproteinmoduls an das Zielenzym besitzen die entsprechenden Fusionsenzyme jedoch ein signifikant höheres Molekulargewicht als das wildtypische Enzym. Daher ist davon auszugehen, dass die spezifischen Aktivitätswerte der Fusionsproteine eher unterschätzt werden. Demzufolge wurde für den Vergleich der Fusionsproteine mit dem jeweiligen Wildtyp die Wechselzahl (*turnover number*) k_{cat} berechnet (Tabelle 3.4).

Unter Beachtung der Größenzunahme durch die Fusion besitzen die Fusionsproteine in manchen Fällen anscheinend eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Zielenzym. So ist beispielsweise die Aktivität der nFbFP-*AtHNL*-Fusion 2,8-fach erhöht im Vergleich zur wildtypischen *AtHNL*. Die nYFP-*AtHNL*-Fusion besitzt sogar eine 6-fach erhöhten k_{cat} -Wert. Die einzige Ausnahme stellt die cFbFP-*BsLA*-Fusion dar, welche eine 4-fach geringere lipolytische Aktivität als *BsLA* besitzt.

Die Quantenausbeute (Φ_F) der Fusionsproteine ist in den meisten Fällen etwas geringer als die des unfusionierten FRPs. Im schlechtesten Fall (cFbFP-AtHNL) besitzt die Fusion lediglich 30 % der Φ_F des isolierten FRPs.

Die gereinigten Fusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer Aktivität und Fluoreszenz untersucht. Mit Ausnahme von cFbFP-BsLA, welches eine geringere Aktivität als die wildtypische BsLA besitzt, sind alle untersuchten FbFP- und YFP-Fusionsproteine genauso aktiv (oder aktiver) wie das jeweilige Wildtypenzym. Eine vergleichende Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute zeigt, dass die Fusion des FRPs an die verschiedenen Zielenzyme zu keiner drastischen Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften im Vergleich zum unfusionierten FRP führt.

3.5 Etablierung des *Photoactive Yellow Proteins* (PYP) als alternativen Fluoreszenzreporter

Die nPYP-AtHNL-Fusion wurde analog zur nYFP-AtHNL-Genfusion mittels oe-PCR erzeugt. Im Fusionsprotein sind die Fusionspartner über einen flexiblen 3xGGGS-Linker verbunden.

Die Überproduktion von nPYP-AtHNL erfolgte im 1 Liter Maßstab in *E. coli*-BL21(DE3), der mit dem pETnPYP-AtHNL-Fusionsvektor transformiert war, mittels Autoinduktionsmedium in ähnlicher Weise wie für die FbFP- und YFP-AtHNL-Fusionen. Das chromophorfrem nPYP-AtHNL-Apo-Protein wurde per IMAC gereinigt (Kapitel 2.13.7). Mittels IMAC-Reinigung (Kapitel 2.13.7) werden ca. 1 mg pro g eingesetzter *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in einer Reinheit von > 90 % erhalten.

Um das fluoreszente Fusionsprotein zu erhalten, muss nach der IMAC-Reinigung die chromophorbindende PYP-Domäne im Fusionsprotein mit dem fluoreszenten *pCA*-Derivat (*trans-locked-pCA*) beladen werden (Kapitel 2.13.8).

Nach Beladung des Apo-Proteins mit dem Fluorophor wurde die Probe lyophilisiert und bei 4 °C aufbewahrt oder in gelöster Form als Aliquot bei 4 °C gelagert. Die spezifische Aktivität des Fusionsproteins wurde mit dem Mandelonitril-Spaltungsassay gemessen (Kapitel 2.15). Diese betrug nach dem Lyophilisierungsvorgang etwa 20 U/mg. Das Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum des nPYP-AtHNL-Fusionsproteins ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Das Absorptionsspektrum zeigte im Wellenlängenbereich von 400 - 500 nm das für Holo-PYP charakteristische Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 448$ nm. Im Fluoreszenzemissionsspektrum (Abbildung 3.10) ergibt das für *trans-locked-*

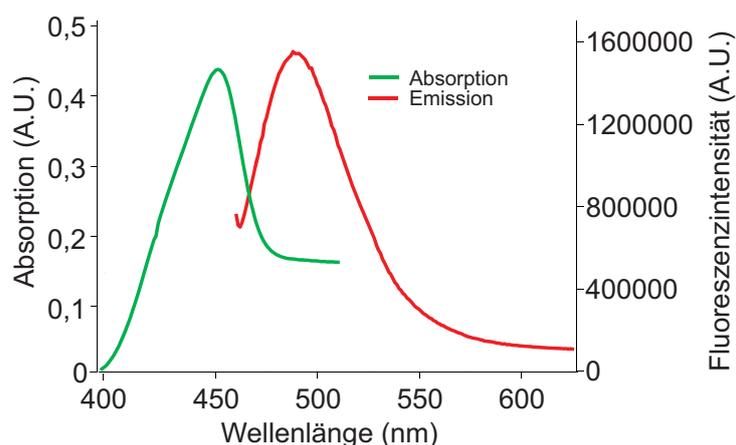


Abbildung 3.10: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren des gereinigten, rekonstituierten nPYP-AtHNL-Fusionsproteins. Das nPYP-AtHNL-Absorptionsspektrum (grüne Line) ist im sichtbaren Spektralbereich sowie das korrespondierende Fluoreszenzemissionsspektrum (rote Linie) im Bereich von 460 nm - 625 nm dargestellt. Die Messungen wurden mit dem gereinigten und rekonstituierten nPYP-AtHNL in einer 1 cm Quarz-Küvette bei 20 °C mit 10 mM K_p -Puffer pH 7,5 als Referenz durchgeführt. Die Konzentration der Proteinprobe betrug 0,6 mg/ml. Zur Aufnahme des Fluoreszenzemissionsspektrums wurde die Probe mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 448$ nm angeregt. Die verwendeten Spaltbreiten auf Emissions- und Anregungsseite betragen 2 nm.

Tabelle 3.5: Enzymatische Aktivität des gereinigten nPYP-AtHNL-Fusionsproteins. Die Enzymaktivität wurde mittels Spaltung von Mandelonitril (Kapitel 2.15) bei pH 5 bestimmt. Das nPYP-AtHNL-Fusionsprotein wurde bei 4 °C gelagert.

	spezifische Aktivität (U/mg)	k_{cat} (s^{-1})	relative Aktivität (% k_{cat})
AtHNL	21	5	100
nPYP-AtHNL	20	26	520

pCA typische Maximum bei 500 nm, was darauf hindeutet, dass *trans-locked-pCA* im PYP verankert wurde. Wie für die FbFP- und PYP-Referenzfusionen wurde das unterschiedliche Molekulargewicht von nPYP-AtHNL im Vergleich zur AtHNL berücksichtigt. Hierzu wurde k_{cat} für das Fusionsprotein nPYP-AtHNL berechnet (Kapitel 2.18). Die Daten zeigen, dass sowohl die spezifische Aktivität der nPYP-AtHNL-Fusion als auch die relative Aktivität (in % k_{cat}) im Vergleich zur wildtypischen AtHNL fünffach aktiver ist (Tabelle 3.5).

Das nPYP-AtHNL-Fusionsprotein kann in löslicher Form in ausreichender Menge in *E. coli*-BL21(DE3) überproduziert und mittels IMAC gereinigt werden. Durch Rekonstitution des Apo-Fusionsproteins mit dem fluoreszenten pCA-Derivat 7-Hydroxycumar-3-carbonsäure konnte das Fusionsprotein in fluoreszenter Form erhalten werden. Die Fusion von PYP an die AtHNL sowie die *in vitro* Beladung des Apo-Fusionsproteins mit dem Fluorophor hat hierbei keinen negativen Einfluss auf die AtHNL-Aktivität des Fusionsproteins.

3.6 Anwendung der Fluoreszenzreporter-Enzym-Fusionen zur Analyse eines Ganzzellbiokatalysators in einem monophasischen mikro-wässrigem Reaktionssystem

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben können fast alle FbFP-Fusionsproteine sowohl in ausreichenden Mengen als auch in fluoreszenter und enzymatisch aktiver Form rekombinant aus *E. coli* gereinigt werden. Somit konnte die Anwendbarkeit von FbFP-Reporterproteinen als fluoreszenter Fusionspartner in translationellen Fusionen mit verschiedenen komplexen Zielenzymen nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Anwendung eines solchen Reporterproteins zur Untersuchung eines biotechnologisch relevanten, nicht-wässrigen (unkonventionellen) Reaktionssystems. Im Folgenden soll eine solche biotechnologische Anwendung exemplarisch für das FbFP-AtHNL-System

beschrieben werden.

Die Herstellung von wiederverwertbaren Immobilisaten erfordert zusätzliche zeit- und kostenintensive Schritte und führt zu einem teilweisen Verlust der Enzymaktivität. In dieser Hinsicht stellt die Verwendung ganzer Zellen in einem monophasischen, mikro-wässrigen Reaktionssystem [234] eine attraktive und kostengünstige Alternative zum Einsatz von gereinigten und immobilisierten Enzymen dar, da im Wesentlichen alle oben genannten Probleme gelöst werden können. Um die Vorteile eines solchen Systems für die Synthese von chiralen Cyanhydrinen zu testen, wurde in dieser Arbeit ein *AtHNL*-basierter *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator für den Einsatz in einem monophasischen organischen Lösungsmittel etabliert.

Die Verwendung eines durch die Reporter-Fusion markierten Enzyms erlaubt hierbei die nicht-invasive Untersuchung des Ganzzellbiokatalysators im Reaktionssystem mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Spektroskopie. Die Grundvoraussetzung für die entsprechenden Analysen ist hierbei die Expression des entsprechenden Fusionsenzyms in fluoreszenter und enzymatisch aktiver Form in *E. coli*, welche für die *AtHNL*-Fusionen bereits in Kapitel 3.4. nachgewiesen wurde. Abbildung 3.11 a) zeigt eine mikroskopische Aufnahme, sowie die dazugehörigen Fluoreszenzemissionsspektren. Beide Ganzzellbiokatalysatoren weisen eine deutliche, für das jeweilige FRP charakteristische Fluoreszenz auf. Beim Einsatz von ganzen *E. coli*-Zellen in einem nahezu wasserfreien organischen Lösungsmittel sollte idealerweise während der Biotransformation, sowie während der entsprechenden Recycling-schritte, die Zellintegrität erhalten bleiben. Bei der Auswahl eines für die Synthese geeigneten Lösungsmittels ist daher darauf zu achten, dass das Lösungsmittel die entsprechenden Zellen nicht

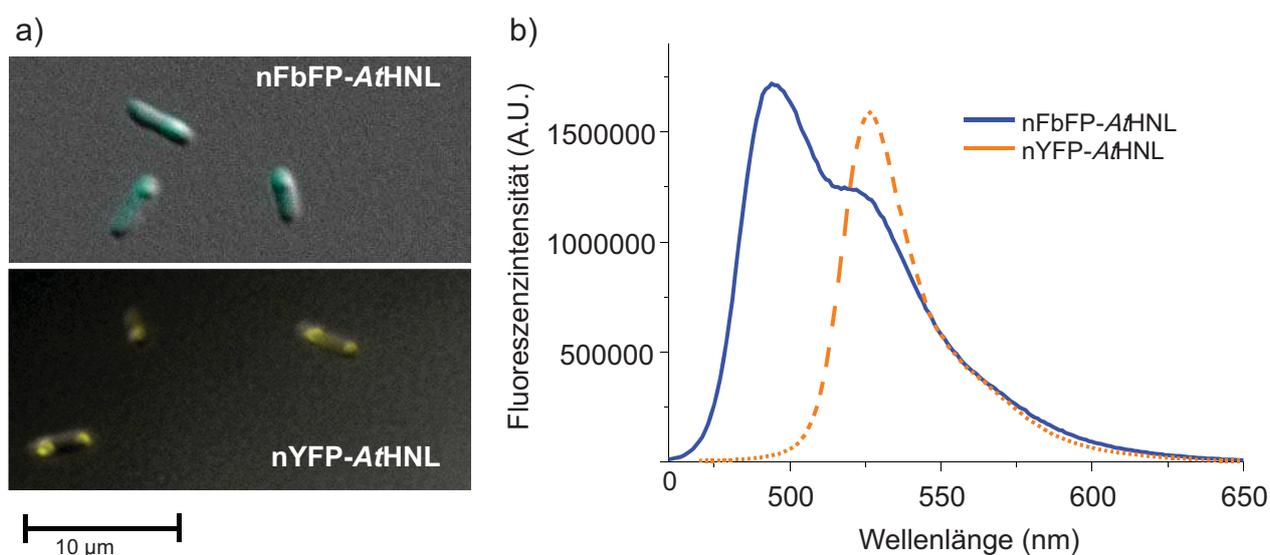


Abbildung 3.11: a) Fluoreszente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche die Fusionen nFbFP-*AtHNL* und nYFP-*AtHNL* überproduzieren. b) An den entsprechenden *E. coli*-BL21(DE3)-Expressionszellen aufgenommene FbFP und YFP spezifische Fluoreszenzemissionsspektren. Reporterprotein-spezifische Fluoreszenz ist sowohl qualitativ unter dem Mikroskop als auch quantitativ am Fluoreszenzphotometer nachzuweisen.

zerstört. Für ein erstes Screening zur Identifikation eines solchen Lösungsmittels wurde hierbei das Fluoreszenzreporter-System eingesetzt.

Um die Anwendbarkeit ganzer Zellen in organischen Medien zu bewerten, wurden Zellpellets von 350 mg (Feuchtmasse) in verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen und anschließend mittels Zentrifugation pelletiert. Für Lösungsmittel wie Diethylether und Aceton konnte eine Gelbfärbung (und Fluoreszenz unter Blaulichtanregung) des Überstandes beobachtet werden (Abbildung 3.12 b)). Dies lässt vermuten, dass entweder das Chromophor des FbFP-Reportermoduls (FMN) aus dem Protein ausgetreten und ins Lösungsmittel diffundiert ist, oder dass das ganze Fusionsprotein ins organische Medium übergegangen ist. Gleichzeitig legt diese Beobachtung nahe, dass die entsprechenden Expressionszellen zumindestens teilweise lysiert wurden. Lösungsmittel, die einen solchen Effekt hervorrufen, sind für den Einsatz im Reaktionssystem somit ungeeignet. Um den Effekt von Lösungsmitteln auf die Zellintegrität zu veranschaulichen, wurden neben MTBE, welches häufig in der Biokatalyse verwendet wird, in den hier dargestellten *proof-of-principle* Experimenten, zusätzlich zwei Lösungsmittel gewählt, die bekanntermaßen Lipide lösen. Bei diesen Lösungsmitteln handelt es sich um Aceton und Diethylether. Im Gegensatz zu Aceton und Diethylether ist nach dem Waschen mit Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) keine Gelbfärbung (oder Fluoreszenz) des Überstandes zu beobachten (Abbildung 3.12 b)). Dies legt nahe, dass bei Inkubation mit MTBE die Integrität von *E. coli*-Zellen zumindest während des Waschens der Zellen erhalten bleibt. Zudem konnte für die mit MTBE gewaschenen und in PBS resuspendierten Zellen, ein Fluoreszenzemissionspektrum welches für intakt gefaltene FbFPs charakteristisch ist, nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde MTBE als geeignetes Lösungsmittel für den Einsatz im

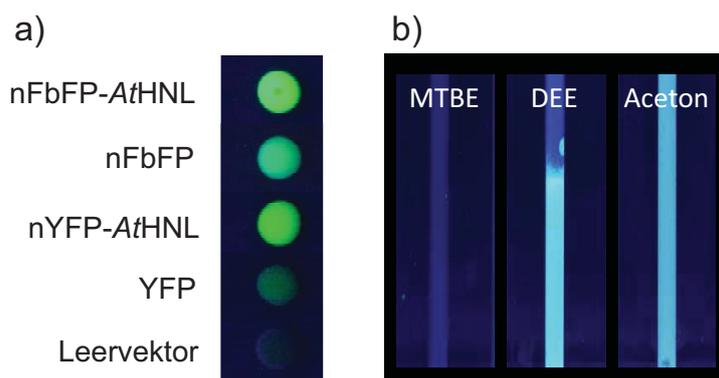


Abbildung 3.12: a) *In vivo* Fluoreszenz von *E. coli*-Zellen, welche die entsprechende Fusionen überproduzieren. Die Anregung erfolgt mit blauem Licht ($\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$). Hierzu wurden 500 mg der entsprechenden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in 500 μl PBS Puffer, pH 7 resuspendiert. b) Exemplarisches Lösungsmittel-Screening zur Identifikation des für die Biotransformation in ganzen Zellen am besten geeigneten Lösungsmittels. Fluoreszierende nFbFP-AtHNL überproduzierende *E. coli*-Zellen wurden mit den entsprechenden organischen Lösungsmitteln (Methyl-*tert*-Butylether (MTBE), Diethylether (DEE) und Aceton) gewaschen. Durch Zentrifugation der Proben konnte der Überstand vom Zellpellet getrennt und untersucht werden. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenz des entsprechenden Überstandes bei Anregung mit Blaulicht ($\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$).

Ganzzell-*AtHNL*-Reaktionssystem identifiziert. Außerdem konnte im Rahmen der Doktorarbeit von Daniel Okrob (IBG-1, Arbeitsgruppe Pohl) gezeigt werden, dass die isolierte *AtHNL* sowie entsprechende *AtHNL*-Immobilisate (Celitepartikel, Hydrogele) in nahezu wasserfreiem MTBE verwendet werden können.

Durch *in vivo*-Versuche mit *E. coli*-Zellen, die das FbFP-Fusionsprotein überproduzieren, konnte gezeigt werden, dass abhängig vom organischen Reaktionsmedium, die Zellen desintegrieren oder zerstört werden. MTBE konnte als geeignetes unkonventionelles Reaktionsmedium für den Einsatz des *AtHNL*-Ganzzellbiokatalysators identifiziert werden, da in diesem Lösungsmittel die Zellintegrität erhalten bleibt.

3.6.1 Cyanhydrinsynthese mit ganzen Zellen

Die generelle Anwendbarkeit des Ganzzellbiokatalysators zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen wurde zunächst für die Synthese von (*R*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff (HCN) untersucht. Die Reaktion (Abbildung 3.13) wurde in mit Puffer gesättigtem MTBE durchgeführt, da die Zellen unter Einfluss dieses Lösungsmittels nicht angegriffen wurden (Abbildung 3.12). Um zu überprüfen, ob die entsprechenden Zellen ohne Aktivitätsverlust bei -20 °C gelagert

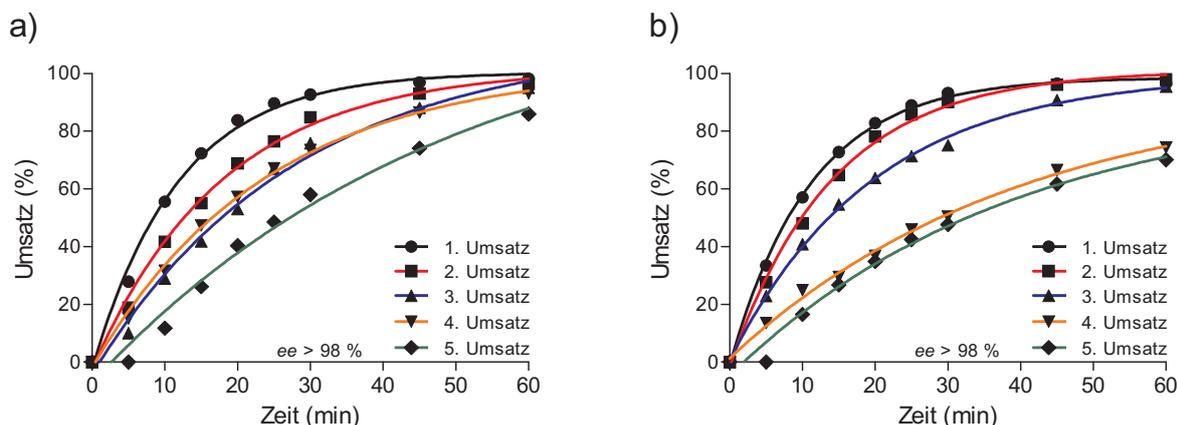


Abbildung 3.13: Frische a)) und eingefrorene b)) *AtHNL* überproduzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in der Synthese von (*R*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und HCN. Alle Reaktionen wurden bei 20 °C in puffergesättigtem MTBE (mm) mit 350 mg Feuchtzellmasse durchgeführt. Nach jeder Umsatzrunde wurde das Nylon-Netz, in dem sich die Zellmasse befindet, aus dem Reaktionssystem entfernt und mit frischem MTBE gewaschen. Zum Start einer neuen Umsatzrunde wurde das Nylon-Netz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe frischer Substrate gestartet. Bei allen Reaktionen wurde ein Enantiomerenüberschuss (ee) von über 98 % (*R*-Mandelonitril) erreicht. (Copyright © American Society for Microbiology, [AEM, volume 78 number 14, year 2012, page 5025-5027 and DOI: 10.1128/AEM.00582-12])

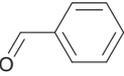
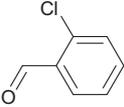
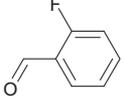
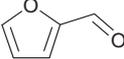
werden können, wurden sowohl frische als auch eingefrorene *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche die AtHNL überproduzieren, in der (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion getestet (Abbildung 3.13). Um ein Recycling der Zellen zu ermöglichen, wurden diese während des Versuches in ein Nylon-Netz eingeschlossen. Somit können die Zellen mühelos aus dem Reaktionsgefäß entfernt und wiederverwendet werden. Nach jedem Recyclingschritt wurden die Zellen mit MTBE gewaschen, in ein neues Reagenzgefäß überführt und frisches MTBE sowie die Substrate hinzugegeben. Pro Ansatz wurden bis zu fünf Reaktionszyklen durchgeführt. Wie in Abbildung 3.13 gezeigt, sind nach drei Reaktionszyklen verschlechterte Anfangsgeschwindigkeiten zu beobachten. Nach 60 min Reaktionszeit konnte jedoch immernoch ein nahezu vollständiger Umsatz nachgewiesen werden. So wurden z.B. nach fünf Reaktionszyklen mit frischen Zellen 85 % des eingesetzten Benzaldehyds mit einem ee von 98 % für (*R*)-Mandelonitril umgesetzt.

Sowohl frische als auch eingefrorene Zellen zeigen über drei Reaktionszyklen hinweg sehr ähnliche Umsatzraten und Produkt-Enantiomerenreinheiten (Abbildung 3.13). Das Recycling ganzer *E. coli*-Zellen führt zu langsameren Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und etwas geringeren Ausbeuten in den nachfolgenden Syntheserunden (Abbildung 3.13). Die Enantioselektivität des Ganzzellbiokatalysators bleibt jedoch über drei Reaktionszyklen hinweg erhalten ($ee > 98\%$ (*R*)-Mandelonitril).

3.6.2 Cyanhydrinsynthese mit weiteren Substrataldehyden

Im Folgenden wurde die Cyanhydrin-Synthese mit weiteren Aldehyden als Substrat untersucht, um eine breite Anwendbarkeit des Reaktionssystems zu demonstrieren (Tabelle 3.6). Der Einsatz von frischen (feuchten) Zellen ermöglicht einen guten Umsatz von substituierten Benzaldehyden wie 2-Chlorbenzaldehyd und 2-Fluorbenzaldehyd. Dieser erfolgt jedoch nur mit moderater Enantioselektivität ($ee > 70\%$ für 2-Chlorbenzaldehyd und $ee > 90\%$ für Fluorbenzaldehyd) (Tabelle 3.6). Im Gegensatz dazu wurde 2-Furaldehyd nicht nur schlecht umgesetzt (50 %), sondern lieferte das entsprechende Produkt mit nur geringer Selektivität ($ee > 30\%$). Eine mögliche Erklärung für die reduzierten Enantioselektivitäten beim Umsatz von 2-Chlorbenzaldehyd, 2-Fluorbenzaldehyd und 2-Furaldehyd könnte auf unterschiedliche nicht-enzymatischer Reaktionsraten für die verschiedenen Aldehyde zurückzuführen sein. So wurde bereits gezeigt, dass z.B. für 2-Chlorbenzaldehyd und 2-Fluorbenzaldehyd die nicht-enzymatische Nebenreaktion in wässrigem Milieu viel rascher abläuft als für Benzaldehyd [133]. Die Geschwindigkeit der nicht-enzymatischen Nebenreaktion hängt vom Wassergehalt des Systems ab [133]. So konnten beim Umsatz von 2-Chlorbenzaldehyd und 2-Furaldehyd mit trockenen AtHNL-Immobilisaten Enantioselektivitäten von $> 98\%$ erreicht werden

Tabelle 3.6: Umsatz verschiedener Aldehyde durch *AtHNL* überproduzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen. Alle Umsätze wurden mit 350 mg nasser Zellen oder der entsprechenden Menge lyophilisierter Zellen in puffergesättigtem MTBE durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 1 ml 2 M HCN gelöst in puffergesättigtem MTBE gemischt mit 0,5 mmol des entsprechenden Aldehyds. Über einen Zeitraum von 60 min wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und mittels chiraler Gaschromatographie analysiert. Die entsprechenden Umsatzraten und *ee*-Werte wurden aus den relativen Peakflächen der Aldehyde und der entsprechenden Cyanhydrin-Derivate bestimmt.

Substrat	frische (feuchte) Zellen		lyophilisierte Zellen	
	Umsatz (%)	<i>ee</i> (%)	Umsatz (%)	<i>ee</i> (%)
 Benzaldehyd	100	>98	45	>98
 2-Chlorbenzaldehyd	80	>70	43	>90
 2-Fluorbenzaldehyd	85	>90	33	>98
 2-Furaldehyd	50	>30	67	>88

[193]. Möglicherweise beeinträchtigt der Wassergehalt der mit MTBE gewaschenen, nassen *E. coli*-Zellen die Enantioselektivität im Reaktionssystem. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die entsprechenden *AtHNL*-überproduzierenden *E. coli*-Zellen lyophilisiert und anschließend in die Cyanhydrinsynthese mit den vier verschiedenen Aldehyden eingesetzt. Die erzielten Umsätze waren im Vergleich zum Einsatz von frischen Zellen deutlich geringer, die Enantiomerenreinheit der entsprechenden Produkte war jedoch für alle hier verwendeten Substrate deutlich erhöht. So konnte das (*R*)-Enantiomer bei der Umsetzung von 2-Chlorbenzaldehyd und 2-Fluorbenzaldehyd mit einem *ee*-Wert von 90 % bzw. 98 % erhalten werden (Tabelle 3.6). Die Umsetzung von 2-Furaldehyd lieferte das entsprechende Produkt mit einem *ee*-Wert von 88 % für das (*R*)-Enantiomer.

Die enantioselektive Synthese von verschiedenen Cyanhydrinen in einem monophasischen, mikro-wässrigen Reaktionssystem unter Einsatz eines *AtHNL* überproduzierenden *E. coli*-Ganzzellbiokatalysators konnte erfolgreich realisiert werden. Hierbei war die Enantiomerenreinheit der erhaltenen Produkte abhängig vom Wassergehalt des Systems. So war bei der Verwendung von lyophilisierten Zellen im Vergleich zu feuchten Zellen eine höhere Enantiomerenreinheit der entsprechenden Produkte zu beobachten.

3.6.3 Der Einsatz von FRP-Fusionen erlaubt eine mikroskopische und spektroskopische Untersuchungen des Biokatalysators im monophasischen, mikro-wässrigen Reaktionssystem

Bakterien, wie z.B. *E. coli*, sind ideal an ein Überleben im wässrigen Medium angepasst. Demnach sind die Auswirkungen einer Langzeitinkubation in einem organischen Lösungsmittel wie MTBE unklar. Um den Einfluss des mikro-wässrigen Reaktionssystems auf die Zellintegrität bewerten zu können, wurden fluoreszente nFbFP-AtHNL-überproduzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen verwendet. Da die entsprechenden Zellen das enzymatisch aktive nFbFP-AtHNL-Fusionsenzym produzieren, kann einerseits die Cyanhydrinsynthese untersucht und gleichzeitig die Zell- und Fusionsproteinintegrität mittels fluorimetrischer Methoden analysiert werden.

In Bezug auf die (*R*)-Mandelonitril-Synthese und das Ganzzellrecycling verhalten sich die nFbFP-AtHNL-exprimierenden *E. coli*-Zellen identisch zu den entsprechenden Zellen, welche die wildtypische AtHNL enthalten (Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14).

Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Fluorimetrie wurde die Zell- und intrazelluläre Fusionsproteinintegrität während der Inkubation in puffergesättigtem MTBE verfolgt. Der Beobachtungszeitraum entspricht hierbei einer Zeit von 4,5 h, in der die *E. coli*-Zellen während drei aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen im Reaktionssystem verbleiben.

Abbildung 3.15 zeigt die zeitliche Entwicklung der Zelldurchmesser-Verteilung einer repräsentativen Anzahl an Zellen während der Inkubation in MTBE. Da es auf Grund der extremen Giftigkeit des für die Synthesereaktion eingesetzten HCNs nicht möglich war, die Zellen unmittelbar aus dem Biotransformationssystem zu verwenden, wurden die Bedingungen der Synthesereaktion nachgeahmt. nFbFP-AtHNL-überproduzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen wurden in puffergesättigtem

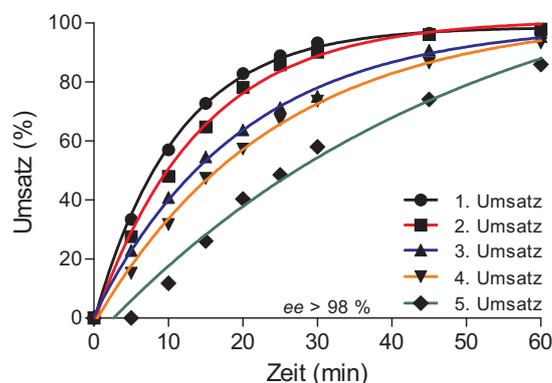


Abbildung 3.14: nFbFP-AtHNL überproduzierende *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen in der Synthese von (*R*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und HCN. Alle Reaktionen wurden bei 20 °C in puffergesättigtem MTBE mit 350 mg Zellmasse durchgeführt. Die Vorgehensweise ist dieselbe wie in Abbildung 3.13. (Copyright © American Society for Microbiology, [AEM, volume 78 number 14, year 2012, page 5025-5027 and DOI: 10.1128/AEM.00582-12])

MTBE ohne Zusatz von Benzaldehyd und HCN über 4,5 h inkubiert. Zu den beschriebenen Zeitpunkten wurde eine Probe für eine mikroskopische und spektroskopische Analyse entnommen. Um mittels Mikroskopie eine verlässliche Schätzung der mittleren Zellgröße bei jedem Zeitpunkt zu erreichen, wurden 1.000-10.000 Zellen in die Berechnung aufgenommen. Zellen wurden automatisch identifiziert und der Zellumfang mittels der Mikroskopie-Software vermessen.

Während der Inkubation in MTBE wurde eine Verringerung des Zellumfanges von 2,2 μm auf 1,9 μm (arithmetische Mittel) beobachtet. Dies entspricht einer Verringerung auf ca. 86 % des Ursprungszellumfanges. Die Verringerung des Zellenumfanges konnte außerdem mit bloßem Auge beobachtet werden (Abbildung 3.16 a)). Die Fluoreszenz des Reporterproteins ging jedoch während der ganzen Inkubationszeit nicht verloren (Abbildungen 3.16 a) und 3.17 b)). Zur Analyse der

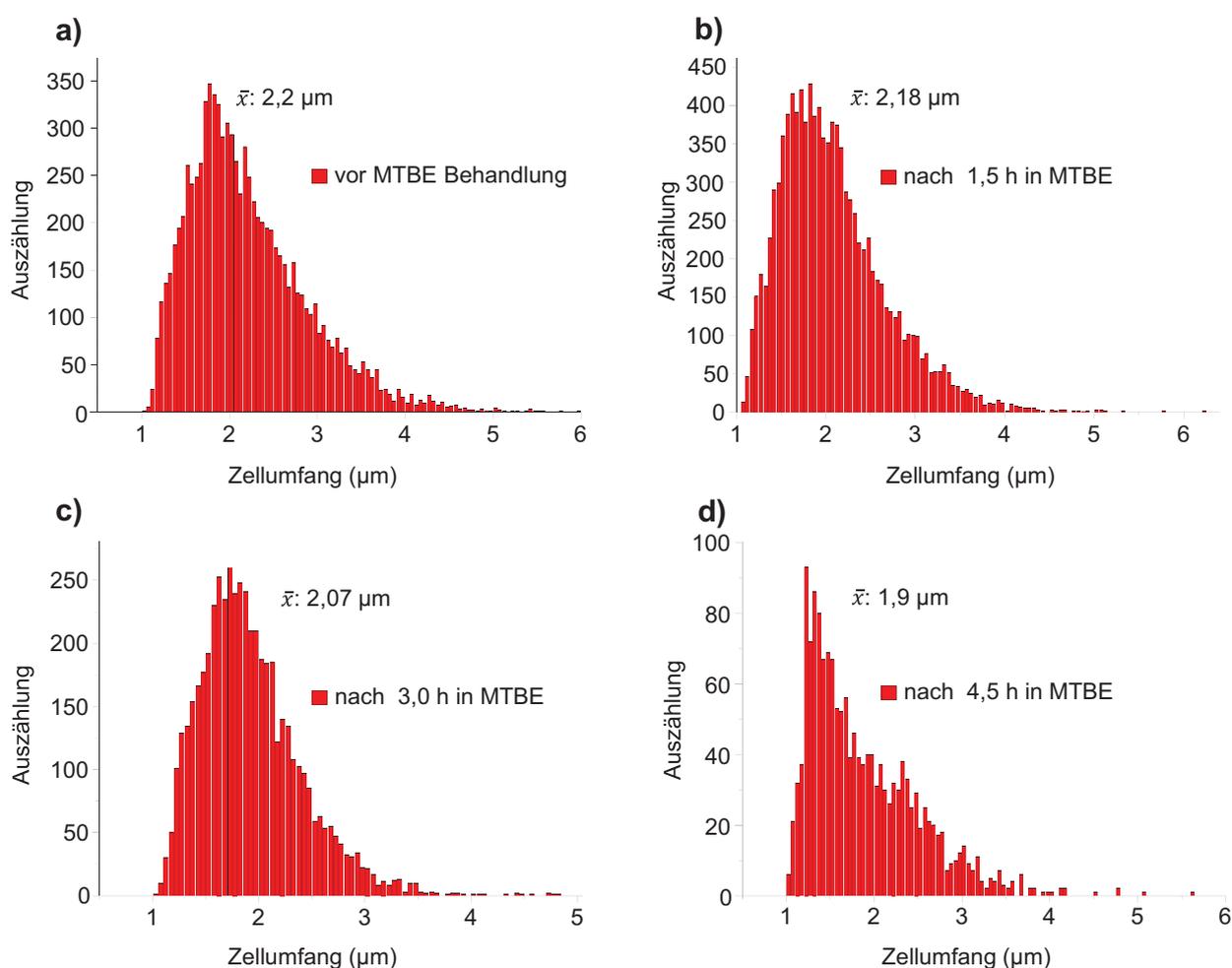


Abbildung 3.15: Änderung der Verteilung des Zellumfanges während der Inkubation in MTBE. Das arithmetische Mittel des Zellumfanges und dementsprechend die Ganzzellgröße nimmt mit der Dauer der Inkubation in MTBE ab. Dargestellt ist die mikroskopische Analyse von *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche nFbFP-AtHNL überproduzieren. Für die mikroskopische Vermessung einer entsprechenden Probe wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in 10 mM Kp_i Puffer pH 7,5 resuspendiert; a) vor der Inkubation in MTBE. b) Zellen nach 1,5 h in MTBE, c) nach 3,0 h MTBE-Inkubation und d) nach 4,5 h Inkubation in MTBE. (Copyright © American Society for Microbiology, [AEM, volume 78 number 14, year 2012, page 5025-5027 and DOI: 10.1128/AEM.00582-12])

FbFP-Proteinintegrität wurden FbFP-Fluoreszenzemissionsspektren der verdünnten Ganzzellproben aufgenommen. Die Probenentnahme der in MTBE inkubierten Zellen erfolgte zeitlich analog zu den Umsatzzyklen aus Abbildung 3.13. Die Fluoreszenzemission stieg im Lauf der Inkubation mit MTBE an (Abbildung 3.17 a), schwarze Punkte). Diese Beobachtung könnte auf eine Änderung des Lichtstreuungsverhaltens der Zellen aufgrund der Zellumfangsänderung zurückzuführen sein. Daher wurde analog zur Aufnahme der FbFP-Fluoreszenzemissionsspektren das statische Lichtstreuverhalten derselben Probe untersucht (Abbildung 3.17 a), rote Punkte). Um quantitative Rückschlüsse auf die FbFP-spezifische Fluoreszenzemission treffen zu können, wurden die entsprechenden Emissionsspektren in Bezug zu dem Lichtstreuverhalten der Proben gesetzt und so normiert (Abbildung 3.17 b)). Abbildung 3.17 zeigt die Entwicklung des normierten FbFP-Fluoreszenzsignals (Emissionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$). Unter Berücksichtigung des geänderten Lichtstreuverhaltens der Proben ist nahezu kein Unterschied in der FbFP Fluoreszenzemissionsintensität während der Inkubation in MTBE zu beobachten. Dies deutet auf eine korrekte Faltung des FbFP-Reporterproteins in den Zellen hin. Um dies zu verifizieren, wurden die FbFP-spezifischen Fluoreszenzemissionsspektren vor und nach 4,5 stündiger Inkubation in MTBE verglichen. Ein Fluoreszenzspektrum mit einem Maximum bei $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$ und einer Schulter bei $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ deutet auf korrekte Faltung des FbFP-Reportermoduls in der Fusion hin. Im Vergleich hierzu zeigt eine vollständig entfaltene Probe ein für freies FMN typisches Fluoreszenzemissionsspektrum mit einem Maximum bei $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$.

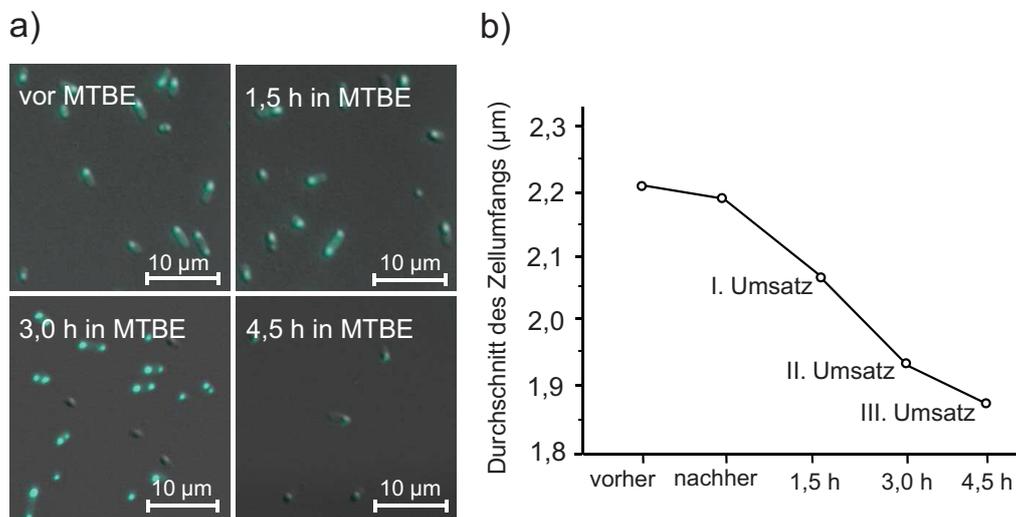


Abbildung 3.16: a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nFbFP-AtHNL überproduzierenden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen. Die Zellen wurden für insgesamt 4,5 h in puffergesättigtem MTBE inkubiert. b) Die Änderung des Zellumfangs nFbFP-AtHNL-überproduzierender *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen während der Inkubation in puffergesättigtem MTBE. Die Daten wurden durch statistische Auswertung der entsprechenden Mikroskopie-Bilder erhalten. Zellgrößen wurden mittels der im Mikroskop-System integrierten Software vermessen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert des Zellumfangs von mindestens 1.000-10.000 Zellen für den entsprechenden Zeitpunkt. (Copyright © American Society for Microbiology, [AEM, volume 78 number 14, year 2012, page 5025-5027 and DOI: 10.1128/AEM.00582-12])

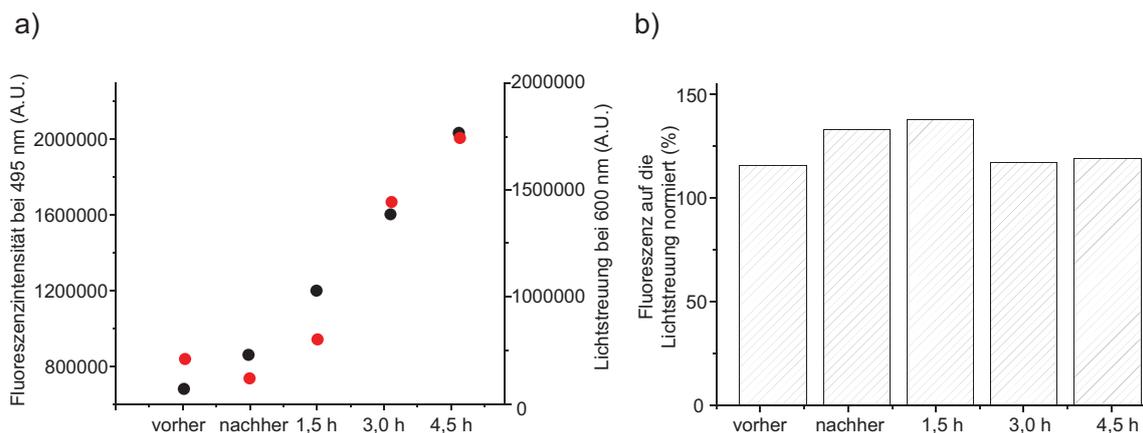


Abbildung 3.17: a) Entwicklung des Fluoreszenzsignals (FbFP-Emissionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 495$ nm) während der Inkubation von *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche nFbFP-AtHNL überproduzieren (schwarz). FbFP-Fluoreszenzemissionsspektren wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Hierzu wurden die entsprechenden Ganzzellproben auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Im selben Diagramm ist die Zunahme der Lichtstreuung bei 600 nm im Laufe der Inkubationszeit dargestellt (rot). b) Zur Quantifizierung der FbFP-spezifischen Fluoreszenzemission wurde das FbFP-Fluoreszenzsignal auf das Lichtstreuungsverhalten derselben Probe normiert. (Copyright © American Society for Microbiology, [AEM, volume 78 number 14, year 2012, page 5025-5027 and DOI: 10.1128/AEM.00582-12])

Hinsichtlich dieser Charakteristika scheint das nFbFP-AtHNL-Fusionsprotein in den in MTBE inkubierten Zellen korrekt gefaltet zu sein (Abbildung 3.18). Hierbei ist zu erwähnen, dass diese Messung lediglich über die Integrität des FbFP-Reporterproteins Aufschluss gibt, jedoch keine direkten Rück-

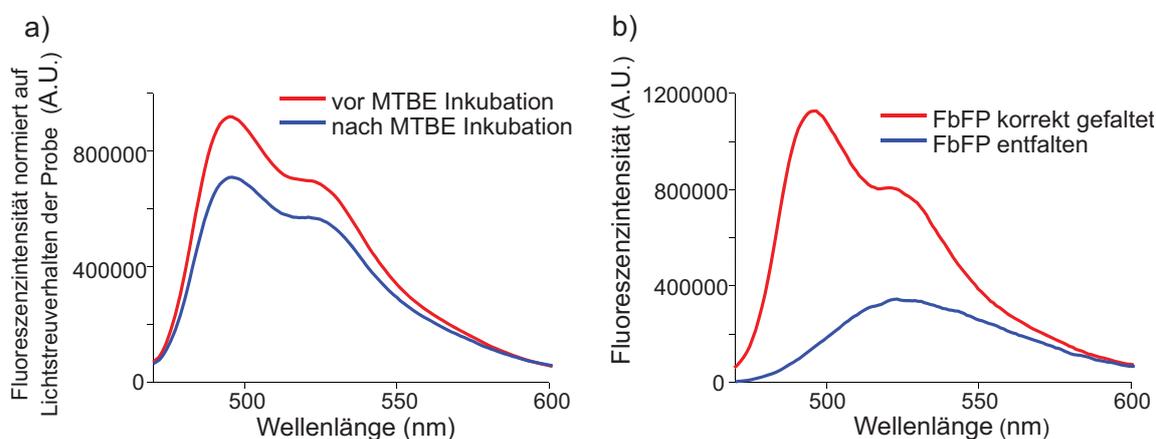


Abbildung 3.18: a) Normiertes FbFP-Fluoreszenzemissionsspektrum ganzer *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche die Fusion nFbFP-AtHNL überproduzieren, vor (rote Linie) und nach (blaue Linie) Inkubation in MTBE (4,5 h). b) Für nativ gefaltetes FbFP ist ein charakteristisches Emissionsspektrum mit einem Maximum bei $\lambda_{\max} = 495$ nm und einer Schulter bei 520 nm zu beobachten (rote Linie). Eine Denaturierung/Entfaltung des nFbFP-AtHNL-Fusionsproteins (insbesondere des FbFP-Reportermoduls) führt zum Verlust des FMN-Fluorophors. Dies führt zu einer Änderung des Fluoreszenzemissionsspektrums der Probe (blaue Linie). Für eine vollständig entfaltene Proteinprobe ergibt sich das charakteristische FMN-Emissionsspektrum mit nur einem Maximum bei $\lambda_{\max} = 520$ nm. Um eine vollständige Entfaltung zu erreichen, wurde die nFbFP-AtHNL-Probe (1 mg/ml) von 20 °C auf 80 °C mit einer Rate von 2,5 °C-Schritten innerhalb von 5 min erwärmt, bis keine Änderungen im Emissionsverhalten mehr zu beobachten waren (blaue Linie).

schlüsse auf die strukturelle Integrität der *AtHNL* in der Fusion zulässt. Die Cyanhydrinsynthesen, sowie die Rezyklierungsversuche, welche sowohl mit *AtHNL*- (Abbildung 3.14) als auch mit nFbFP-*AtHNL*-überproduzierenden-Zellen (Abbildung 3.13) durchgeführt wurden, zeigen jedoch, dass die strukturelle Integrität der *AtHNL* in der Fusion erhalten bleibt, da sonst in aufeinanderfolgenden Rezyklierungsschritten kein Umsatz mehr zu beobachten wäre.

Mechanistisch könnte, die während des Zellrezyklierung zu beobachtende reduzierte Umsatzrate dadurch erklärt werden, dass z.B. Zellmaterial durch das Nylon-Netz oder Enzym aus den Zellen verloren geht. In gleicher Weise könnte die teilweise Inaktivierung auf Toxizitätseffekte durch die Substrate HCN und Benzaldehyd zurückzuführen sein. So wurde z.B. für Lipasen gezeigt, dass Aldehyde wie Acetaldehyd mit der ϵ -Amino-Gruppe von Lysinresten im Protein reagieren können, was zur Inaktivierung des Enzyms führt [235].

Die Inkubation ganzer *E. coli*-BL21(DE3)-nFbFP-*AtHNL*-überproduzierender-Zellen in puffergesättigtem MTBE führt zu einer Verringerung des Zellumfanges auf 86 % der Ursprungsgröße. Mittels fluoreszenzphotometrischer Messungen an ganzen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sich die Integrität des FbFP-Reporters in der Fusion während Inkubation der Zellen in MTBE nicht maßgeblich ändert. Die entsprechenden Ganzzell-Cyanhydrinsynthesen, sowie Rezyklierungsversuche zeigen, dass während 4,5-stündiger Inkubation die strukturelle Integrität und Aktivität der *AtHNL* in der Fusion ebenfalls erhalten bleiben.

3.7 *In vitro*-Charakterisierung der fluoreszenten *AtHNL*-Fusionen

Im Folgenden wurden die in Kapitel 3.6.1 für die Ganzzellbiotransformation genutzten fluoreszenten *AtHNL*-Fusionsenzyme eingehend biochemisch charakterisiert. Hierbei wurde zusätzlich zu den FbFP-*AtHNL* und YFP-*AtHNL*-Fusionen die PYP-*AtHNL*-Referenzfusion untersucht. Ein Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Enzymstabilität, da diese für die Anwendung in unkonventionellen Lösungsmitteln bzw. unter industriell relevanten Prozessbindungen von großer Bedeutung sind. Insbesondere wurden pH-Optima (Abbildung 3.19) und pH-Stabilitäten (Tabelle 3.7) der Enzyme untersucht, da sich diese Faktoren in der Vergangenheit für die wildtypische *AtHNL* als kritisch für eine Anwendung in der Cyanhydrin-Synthese herausgestellt haben [190].

Wie in Abbildung 3.19 gezeigt, ist die Aktivität der wildtypischen *AtHNL* im schwach sauren Bereich ($< \text{pH } 5$) deutlich geringer als die Aktivität der Fusionsenzyme. So besitzt beispielsweise die *AtHNL* bei einem pH-Wert von pH 4,75 eine relative Aktivität von 5 %. Im Gegensatz hierzu zeigen

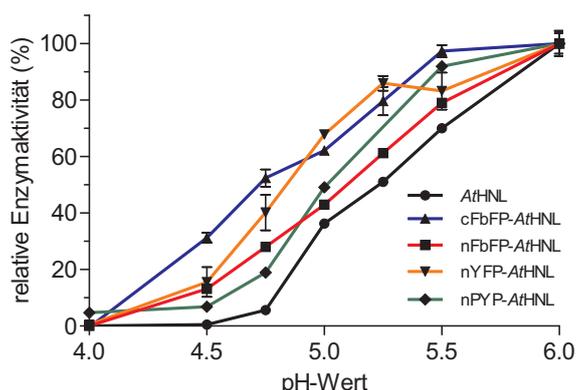


Abbildung 3.19: Einfluss des pH-Werts auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der jeweiligen Enzymfusion. Alle Enzympräparationen wurden mit 50 mM Acetatpuffer des entsprechenden pH-Werts verdünnt. Bevor Enzym in die Pufferlösungen gegeben wurde, wurden die Puffer 5 min auf 25 °C temperiert. Die *AtHNL*-Aktivität wurde mittels Mandelonitril-Spaltungsassay bestimmt. Zu jeder Messung wurde jeweils ein Kontrollwert gemessen, bei dem statt der Enzymprobe Acetatpuffer zugesetzt wurde. Dieser Referenzwert wurde von den Messwerten der Enzymproben subtrahiert. Zur besseren Übersicht sind in der Abbildung relative Enzymaktivitäten bezogen auf die Aktivität des jeweiligen Enzyms bei pH 6 (100 %) dargestellt. (Copyright © American Society for Microbiology, [DOI:10.1128/AEM.00795-13])

das *cFbFP-AtHNL*, *nFbFP-AtHNL*, *nYFP-AtHNL* und das *nPYP-AtHNL*-Fusionsenzym eine höhere oder gleich hohe relative Aktivität im Vergleich zur *AtHNL*. Ein möglicher Grund für die Unterschiede der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten könnte auf eine Überlagerung von raschen Deaktivierungsprozessen mit der eigentlichen enzymatischen Reaktion zurückzuführen sein. Ein solcher Effekt wäre besonders bei niedrigen pH-Werten gravierend, bei denen die wildtypische *AtHNL* schnell deaktiviert wird [190, 236]. Um einen solchen Effekt weiter zu überprüfen, wurden alle Fusionen in Bezug auf die ihre Stabilität bei pH 4,5 und pH 4,75 untersucht (Tabelle 3.7). Wie bereits beschrieben ist

Tabelle 3.7: pH-Wert abhängige Halbwertszeit (min) der in dieser Arbeit verwendeten Fusionen. Die Restenzymaktivität wurde mittels des Mandelonitril-Spaltungsassays nach Inkubation in a) 50 mM Acetatpuffer (pH 4,75) bzw. b) in 50 mM Acetatpuffer (pH 4,5) bei 25 °C bestimmt. (Copyright © American Society for Microbiology, [DOI:10.1128/AEM.00795-13])

pH	<i>AtHNL</i>	<i>nFbFP-AtHNL</i>	<i>cFbFP-AtHNL</i>	<i>nYFP-AtHNL</i>	<i>nPYP-AtHNL</i>
4,75 ^(a)	2 ± 0,5	55 ± 13	96 ± 0,7	5 ± 0,8	1 ± 0,1
4,50 ^(b)	0	5 ± 1,4	6 ± 0,3	1 ± 0,1	0

die *AtHNL* bei einem pH-Wert von pH 4,5 nicht stabil, und daher nicht aktiv. Vielmehr weist das Enzym bei einem pH-Wert von pH 4,75 eine Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von $2 \pm 0,5$ min auf. Die *nYFP-AtHNL*-Fusion und die *nPYP-AtHNL*-Fusion zeigen sowohl bei pH 4,5 als auch bei pH 4,75 eine ähnliche Stabilität (*nYFP-AtHNL*: $T_{1/2} = 5 \pm 0,8$ min, *nPYP-AtHNL*: $T_{1/2} = 1 \pm 0,1$ min) wie die wildtypische *AtHNL*. Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgt wie in Kapitel 2.15.1. Dies deutet darauf hin, dass die Fusion von YFP und PYP keinen Einfluss auf die pH-Stabilität der Fusionsenzy-

me hat. Sowohl das nFbFP-*AtHNL*- als auch das cFbFP-*AtHNL*-Fusionsenzym zeigen eine um 1-2 Größenordnungen erhöhte Stabilität im Vergleich zur Wildtyp *AtHNL* (Tabelle 3.7). So besitzt die nFbFP-*AtHNL*-Fusion eine Halbwertszeit von $5 \pm 1,4$ min bei pH 4,5 und bei pH 4,75 eine Halbwertszeit von 55 ± 13 min. Die cFbFP-*AtHNL*-Fusion ist mit Halbwertszeiten von $6 \pm 0,3$ min bei pH 4,5 und $96 \pm 0,7$ min bei pH 4,75 die stabilste Fusion.

Beide FbFP-*AtHNL*-Fluoreszenzreporterfusionen zeigen im schwach sauren pH-Bereich (pH 4,75 und pH 4,5), eine im Vergleich zur wildtypischen *AtHNL*, stark erhöhte Aktivität sowie Stabilität. Die wildtypische *AtHNL*- sowie die nYFP-*AtHNL*- und nPYP-*AtHNL*-Fusionsproteine sind in diesem pH-Bereich instabil.

3.7.1 Beeinflussung der Enzym-Quartärstruktur durch die Reporterfusion als eine mögliche Ursache für die Stabilisierung der FbFP-*AtHNL*-Fusionen bei niedrigen pH-Werten

Im Vergleich zur *AtHNL* sind andere HNLs, wie z.B. die HNL aus *Prunus sp.* (*PsHNL*), *Linum usitatissimum* (*LuHNL*) und *Manihot esculenta* (*MeHNL*) bei niedrigen pH-Werten sowohl aktiv als auch stabil [237]. Eine vergleichende Studie der *MeHNL* und *AtHNL* deutete auf Unterschiede in der Quartärstruktur als mögliche Ursache für die beobachteten Abweichungen in der Stabilität hin [190]. Hierbei scheint es, dass die *MeHNL* in einem Dimer-Tetramer Gleichgewicht steht, während die *AtHNL* in ausschließlich dimerer Form vorliegt, wie Größenausschlusschromatographische (SEC) Studien und die Kristallstruktur der *AtHNL* (PDB-Eintrag: 3DQZ) zeigen. Um einen Effekt der Quartärstruktur auf die Stabilität der FbFP-Fusionsenzyme zu untersuchen, wurde im Folgenden die native Quartärstruktur der verschiedenen Fusionsproteine mittels SEC (Abbildung 3.20) und HPLC (Abbildung 3.21) analysiert.

Die *AtHNL* liegt ebenso wie die nYFP-*AtHNL* und die nPYP-*AtHNL*-Fusionen in Lösung vorwiegend als Homodimer vor (Abbildung 3.20). Somit scheint in den beiden Fusionen der native *AtHNL*-Oligomerisierungszustand erhalten zu bleiben. Für diese Fusionen wurde zudem keine veränderte pH-Stabilität im Vergleich zur Wildtyp-*AtHNL* beobachtet (Tabelle 3.7). Diese Beobachtung wird durch frühere Studien unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass das hier verwendete isolierte YFP hauptsächlich Monomer und erst bei höheren Konzentrationen ($K_d = 0,11$ mM) eine schwache Tendenz zur Dimerisierung zeigt [238]. PYP liegt in isolierter Form als Monomer vor [239]. Die Ergebnisse in Abbildung 3.20 und Kapitel 3.7 lassen darauf schließen, dass durch Fusion von YFP und PYP die Bildung der nativen Quartärstruktur des Zielenzym nicht gestört wird [238].

Die stabilste Fusion, cFbFP-*AtHNL* (Tabelle 3.7), liegt im SEC-Experiment hauptsächlich als Te-

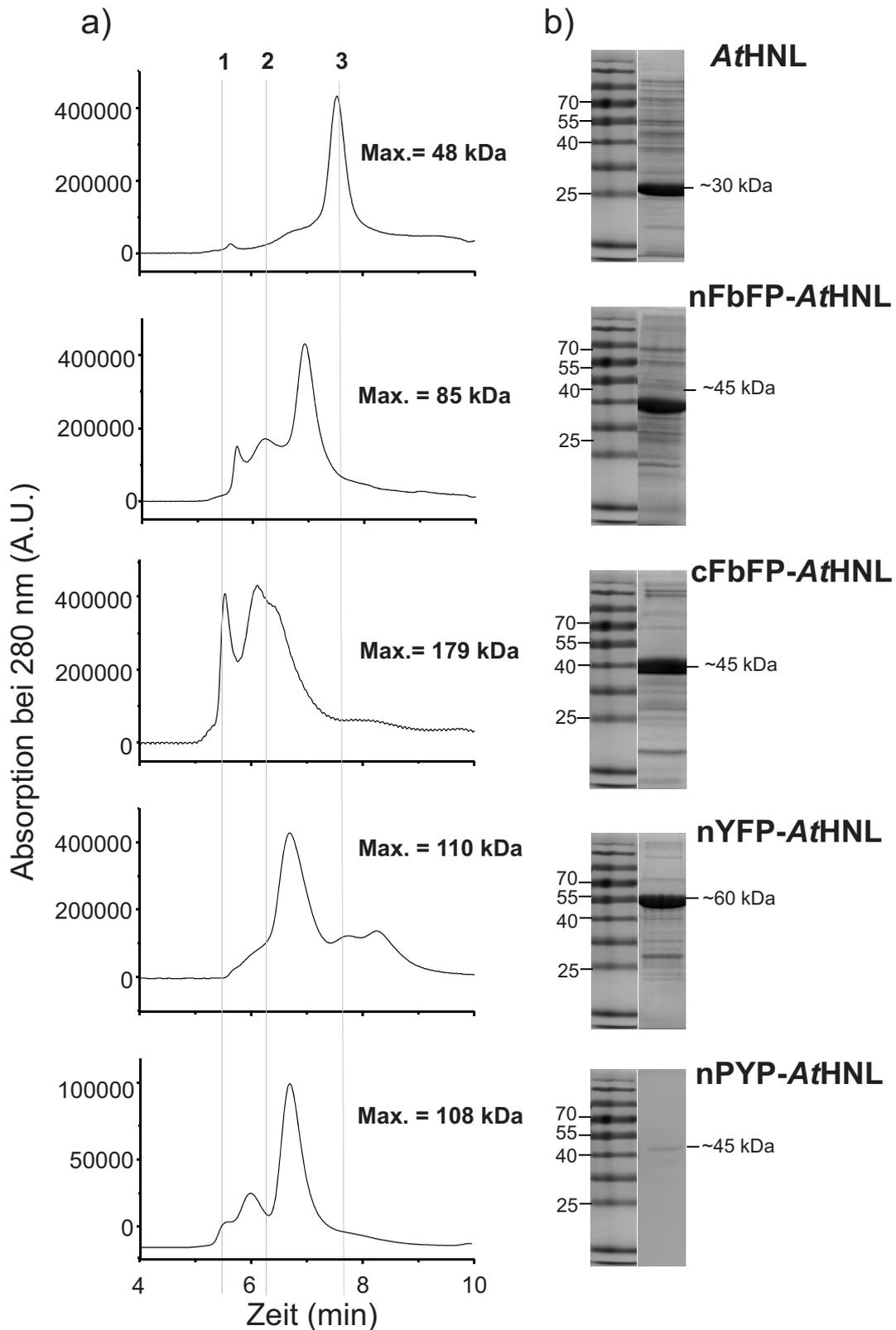


Abbildung 3.20: a) HPLC-basierte SEC-Analyse aller in dieser Studie verwendeten Fusionen. Die Elutionszeiten für die Standardproteine sind im Chromatogramm mit grauen Linien gekennzeichnet (1: Thyroglobulin = 670 kDa; 2: IgG = 150 kDa; 3: Ovalbumin = 44 kDa). b) SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Fusionen. Die Proteinkonzentration der Proben betrug in allen Fällen 2 mg/ml, gelöst in 10 mM Kp_i Puffer, 10 mM NaCl (pH 7,5). Die Standardproteine waren im selben Puffer gelöst. (Copyright © American Society for Microbiology, [DOI:10.1128/AEM.00795-13])

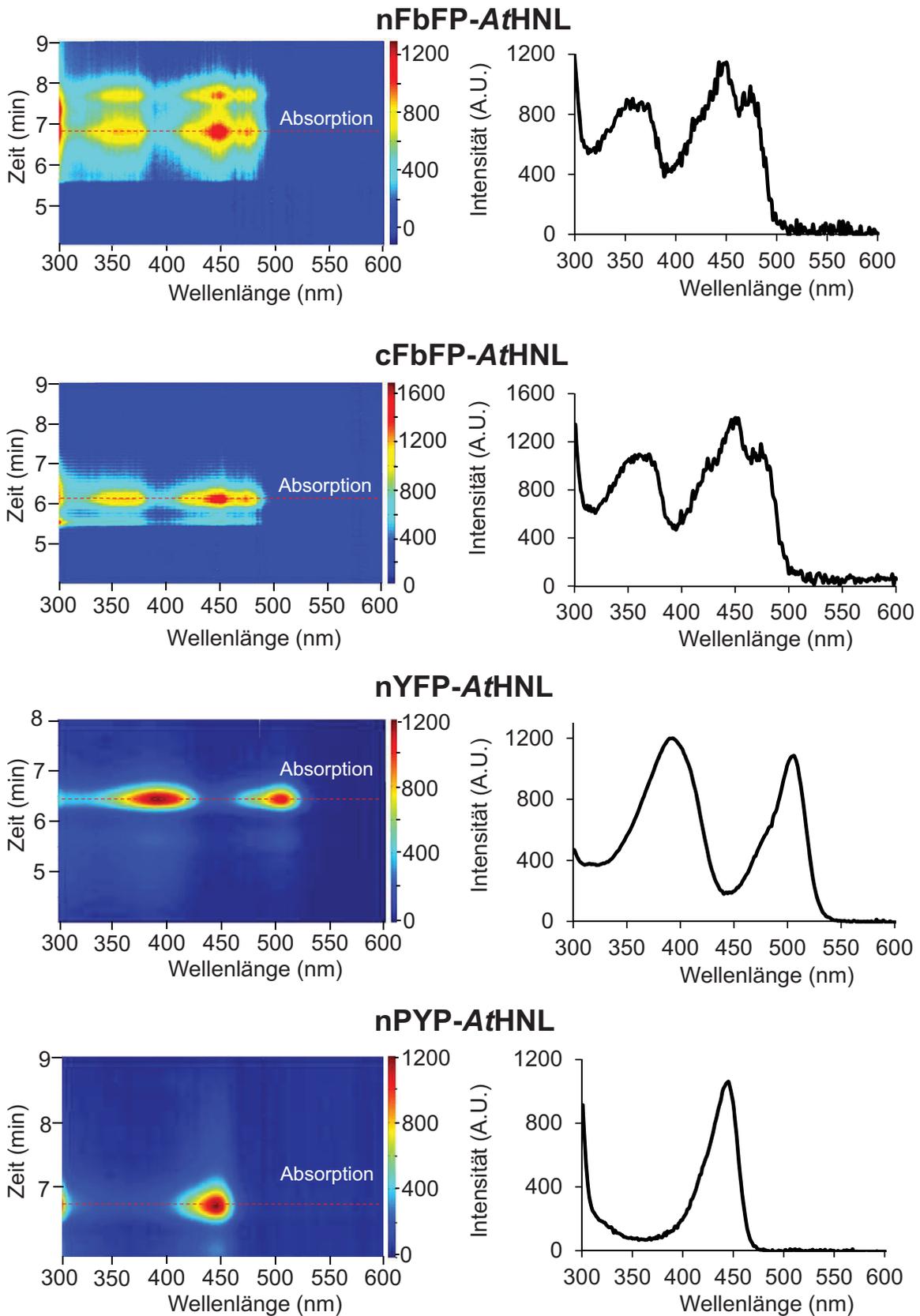


Abbildung 3.21: Absorptionsspektren aller Fusionen. cFbFP-AtHNL und nFbFP-AtHNL haben das Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 495$ nm. Die charakteristischen Maxima für nYFP-AtHNL und nPYP-AtHNL liegen bei $\lambda_{\max} = 500$ nm bzw. 445 nm.

tramer vor (Abbildung 3.20). Die zweitstabilste Fusion, nFbFP-AtHNL, existiert als eine Mischung aus hauptsächlich dimeren und einem größeren Anteil an tetrameren Spezies (ca. 50 % des Dimerpeaks abgeschätzt anhand der Peakhöhe) (Abbildung 3.20). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die beobachtete höhere Stabilität der cFbFP-AtHNL- und der nFbFP-AtHNL-Fusion eine Folge der Tetramerbildung, durch Fusion des FbFP-Moduls an die AtHNL, ist. Das hier verwendete FbFP-Modul ist in isolierter Form, im Gegensatz zu YFP und PYP, ein Homodimer [230]. Somit ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten tetrameren Spezies über das FbFP-Modul ausgebildet werden. Die Fusion des FbFP-Moduls an die AtHNL verändert sowohl bei N-terminaler als auch bei C-terminaler Fusion den Oligomerisierungszustand der Fusion im Vergleich zum nativen, wildtypischen Protein. Für die SEC-Analyse wurde ein HPLC-System verwendet, welches mit einem Photo-Dioden-Array-Detektor (PDA) ausgestattet ist. Dies erlaubt die Aufzeichnung eines Absorptionsspektrums des jeweiligen Elutionspeaks (Abbildung 3.21). Da alle verwendeten fluoreszenten Fusionsenzyme eine chromogene Gruppe als Fluorophor tragen, besitzen diese ein charakteristisches Absorptionsspektrum im sichtbaren Bereich des Spektrums. Anhand der vom HPLC-System aufgezeichneten UV/Vis-Spektren der jeweiligen Elutionspeaks (Abbildung 3.21) ist es möglich, das Fusionsprotein von möglichen Verunreinigungen zu unterscheiden. Diese Analysen zeigen, dass alle diskutierten Peaks (z.B. Dimer und Tetramer im Falle der nFbFP-AtHNL-Fusion) einen Fluorophor tragen und somit eindeutig als das jeweilige Fusionsprotein identifiziert werden können. Ähnliche Ergebnisse werden erzielt, wenn die spezifische Fluoreszenz-Emission des Reporter-Proteins mit einem Fluoreszenz-Detektor der HPLC-Anlage detektiert wird (nicht dargestellt).

HPLC-basierte SEC-Analysen zeigten, dass die wildtypische AtHNL in Lösung vorwiegend als Homodimer vorliegt. Die Fusionen nPYP-AtHNL und nYFP-AtHNL, welche ähnliche pH-Stabilitäten wie die AtHNL besitzen, liegen ebenfalls größtenteils als Dimer in Lösung vor. Somit führt die Fusion eines monomeren Reporterproteins zu keiner Beeinflussung der pH-Stabilität. Anders scheint dies bei der Fusion des dimeren FbFP-Reporterproteins zu sein. Für beide FbFP-Fusionsproteine konnte die Ausbildung einer tetrameren Form nachgewiesen werden. Hierbei liegt das stabilste Fusionsprotein cFbFP-AtHNL hauptsächlich in tetramerer Form vor. Die hier durchgeführten Analysen legen nahe, dass die erhöhte pH-Stabilität der FbFP-AtHNL-Fusionen eine direkte Folge der veränderten Quartärstruktur dieser Proteine ist.

3.7.2 Die FbFP-Fusionsproteine bilden stabile, von der Proteinkonzentration unabhängige Oligomere aus

Zusätzlich zum PDA-Detektor wird ein Fluoreszenzdetektor zum Nachweis des Elutionsverhaltens der FRP-Zielenzym-Fusionen in den HPLC-SEC-Analysen verwendet. So können im Vergleich zu herkömmlichen SEC-Analysen sehr niedrige Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob die beobachtete Quartärstruktur der verschiedenen Fusionen unter Assay-Bedingungen, d.h. bei niedrigen Proteinkonzentrationen, erhalten bleibt, wurden die Proben bis zu einer Endkonzentration von 0,03 mg/ml verdünnt. Wie Abbildung 3.22 b) zeigt, konnte bei diesen geringen Proteinkonzentrationen eine ähnliche Oligomerverteilung wie in den SEC-Läufen mit 2 mg/ml (Abbildung 3.21) nachgewiesen werden. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 3.22 a) zudem der direkte Vergleich zwischen PDA-Detektion und FbFP-Fluoreszenz-Detektion dargestellt.

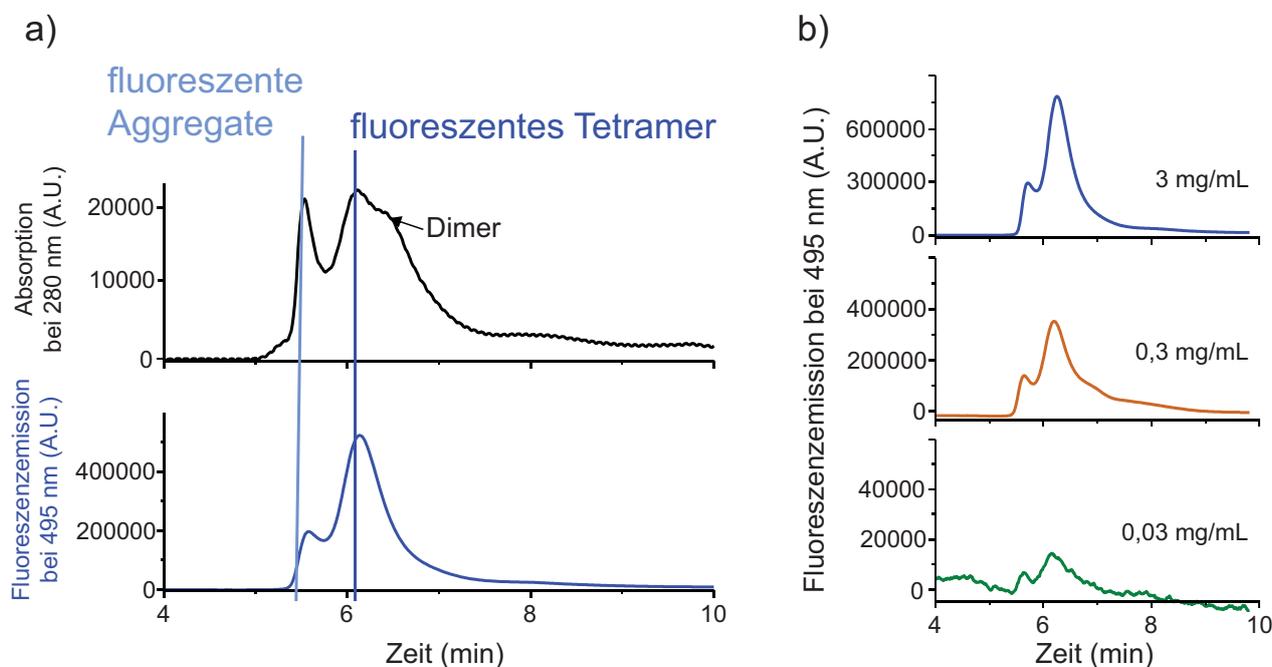


Abbildung 3.22: Analysen zur Konzentrationsabhängigkeit der Oligomerverteilung am Beispiel von cFbFP-AtHNL. a) Vergleich der HPLC-Chromatogramme für cFbFP-AtHNL aufgenommen mittels PDA-Detektor (Absorption bei 280 nm) (oben, schwarze Linie) und Fluoreszenzdetektion (unten, blaue Linie) (Extinktionsmaximum: $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, Emissionsmaximum: $\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$). b) Vergleich der HPLC-SEC-Chromatogramme, bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (0,03 - 3 mg/ml). Alle Proben waren in 200 mM Kp_i Puffer, 10 mM NaCl (pH 7,5) gelöst.

Mittels HPLC-SEC-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die tetramere Quartärstruktur der FbFP-AtHNL-Fusionen unter Assaybedingungen, d.h. bei geringen Proteinkonzentrationen erhalten bleibt.

3.7.3 Alternative Ursachen für die Stabilisierung der FbFP-Fusionen bei niedrigen pH-Werten

Um eine Ursache für die Stabilisierung der FbFP-Fusionen bei niedrigen pH-Werten zu finden, wurde ihr isoelektrische Punkt bestimmt. Die Fusion der verschiedenen Reporterproteine an die *AtHNL* könnte zu einer Veränderung des isoelektrischen Punkts (IP) führen. Nahe des IP besitzt das jeweilige Protein keine Nettoladung auf seiner Oberfläche und neigt somit zur Aggregation oder Präzipitation, was zu einem Verlust der Enzymaktivität führen kann. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde für alle hier verwendeten Fusionen der IP mittels des Internetportals ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) anhand der Sequenz des jeweiligen Proteins vorhergesagt. Außerdem wurde mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) der IP des entsprechenden Proteins experimentell bestimmt (Abbildung 3.23). Die Ergebnisse der Vorhersagen sowie der experimentellen Abschätzung des IP mittels IEF-Gel sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst [194]. Die Auswertung des IEF-Gels erfolgte mittels densitometrischer Methoden. Der experimentell ermittelte IP für die *AtHNL* weicht mit einem Wert von pH 5,7 leicht von den bereits publizierten Werten (pH 5,1 - pH 5,3) ab [193, 194]. Jedoch war die Fokussierung aller Proteine im IEF-Gel nicht ideal, sodass in den meisten Fällen keine definierten Banden identifiziert werden konnten. Tendenziell ist jedoch zu beobachten, dass der IP aller hier untersuchten Proteine im schwach sauren pH-Bereich (pH 5-6) liegt. Daher könnte eine Inaktivierung der entsprechenden Enzyme bei niedrigeren pH-Werten tatsächlich über

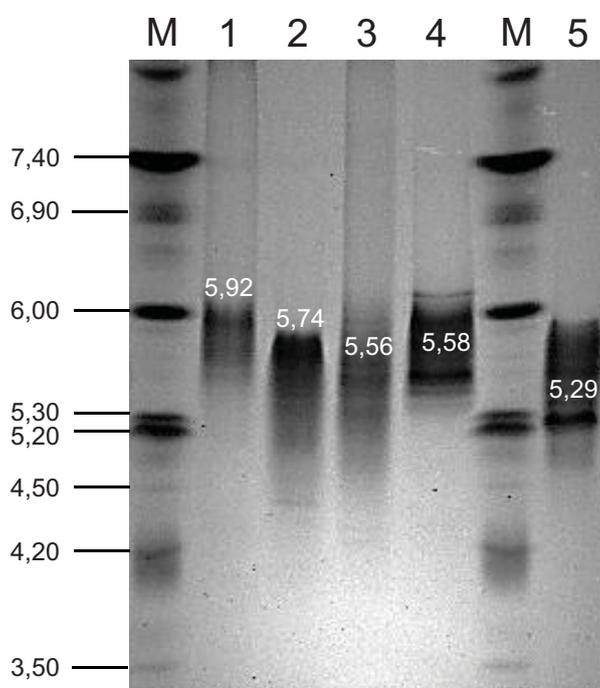


Abbildung 3.23: Isoelektrische Fokussierung aller in dieser Arbeit untersuchten *AtHNL*-Fusionen im Vergleich zur *AtHNL* (2). Die isoelektrischen Punkte wurden mit einem Novex-Gradientengel (pH 3-10, Invitrogen) ermittelt. M: Marker; 1: cFbFP-*AtHNL*; 2: *AtHNL*; 3: nFbFP-*AtHNL*; 4: nYFP-*AtHNL*; 5: nPYP-*AtHNL*.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der isoelektrischen Punkte der Fusionsproteine. Die Abschätzung erfolgte mittels IEF oder anhand der Proteinsequenz.

	<i>AtHNL</i>	<i>nFbFP-AtHNL</i>	<i>cFbFP-AtHNL</i>	<i>nYFP-AtHNL</i>	<i>nPYP-AtHNL</i>
IEF	5,7	5,6	5,9	5,6	5,3
ProtParam	5,7	5,4	5,2	5,6	5,4

Aggregation des Proteins in der Nähe des IP, erklärt werden. Für das *cFbFP-AtHNL*-Konstrukt wurde ein IP von pH 5,9 ermittelt, dieser liegt etwas über dem der wildtypischen *AtHNL*. Dennoch ist das *cFbFP-AtHNL*-Fusionsprotein um zwei Größenordnungen stabiler als die *AtHNL*. Zudem ist, trotz unvollständiger Fokussierung, auffällig, dass die zweitstabilste FbFP-Fusion *nFbFP-AtHNL* einen IP von ca. pH 5,6 besitzt. Dieser Wert ist nahezu identisch mit dem hier bestimmten IP der *AtHNL* (IP = pH 5,7). Demnach kann die erhöhte pH-Stabilität im Bereich unter pH 5 für die *nFbFP-AtHNL*-Fusion nicht über eine IP Änderung durch die Fusion erklärt werden. Des Weiteren besitzt die *nPYP-AtHNL*-Fusion einen experimentell bestimmten IP von pH 5,3 und liegt somit deutlich unter dem hier ermittelten IP der *AtHNL*. *nPYP-AtHNL* ist jedoch im schwach sauren pH-Bereich ähnlich instabil wie die *AtHNL*.

Basierend auf den hier durchgeführten IEF-Analysen scheint eine Stabilisierung im schwach sauren pH-Bereich über eine Verringerung des IP durch die Fusion wenig wahrscheinlich. In den entsprechenden Analysen ist kein eindeutiger Trend zu erkennen. So besitzt die stabilste Fusion *cFbFP-AtHNL* einen IP über dem der *AtHNL*, was für eine Stabilisierung mittels Erhöhung der pH-abhängigen Löslichkeit sprechen würde. Die instabile Referenzfusion *nPYP-AtHNL* zeigt jedoch einen IP deutlich unter dem der *AtHNL*. Weiterführende Untersuchungen zum Aggregationsverhalten der Fusionsproteine sind notwendig, um einer etwaigen pH-abhängigen Änderung der Proteinlöslichkeit nachzugehen. Somit erscheint als die wahrscheinlichste Erklärung für die erhöhte Stabilität der *FbFP-AtHNL*-Fusionen im schwach sauren pH-Bereich, eine durch die Fusion hervorgerufene Änderung der Quartärstruktur. Hierbei sind Fusionsproteine mit komplexerer Quartärstruktur anscheinend stabiler.

3.8 Die erhöhte pH-Stabilität der cFbFP-AtHNL-Fusion erlaubt die Synthese von (*R*)-Mandelonitril in einem Zweiphasensystem

Die erhöhte Stabilität der FbFP-AtHNL-Fusionen sollte eine effiziente Synthese von (*R*)-Mandelonitril in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem erlauben. Die Fusionen nFbFP-AtHNL und cFbFP-AtHNL zeigen eine erhöhte Stabilität im schwach sauren pH-Bereich im Vergleich sowohl zur wildtypischen AtHNL- als zur nYFP-AtHNL- und zur nPYP-AtHNL-Fusion (Tabelle 3.7). Dieser Stabilisierungseffekt ist bei der cFbFP-AtHNL-Fusion bei pH-Werten von pH 4,5 und pH 4,75 am größten (Tabelle 3.7). Daher wurde hier exemplarisch die cFbFP-AtHNL-Fusion für die Synthese von (*R*)-Mandelonitril in einem wässrig-organischen Zweiphasenreaktionssystem verwendet (Abbildung 3.24). Als organische Phase wurde mit Puffer gesättigtes MTBE eingesetzt. Der Einsatz dieses Lösungsmittels gewährleistet eine hohe Substrat- und Produktlöslichkeit. Der pH-Wert der wässrigen Puffer-Phase wurde auf pH 4,5 bzw. pH 4,75 eingestellt (50 mM Acetatpuffer). Bei diesen niedrigen pH-Werten wird die nicht-enzymatische, unspezifische Hydrocyanierungs-Reaktion nahezu vollständig unterdrückt [225]. Unter denselben Reaktionsbedingungen ist die Verwendung der wildtypischen AtHNL für nicht möglich, da das Enzym bereits bei einem pH-Wert von pH 4,75 innerhalb von 2 min vollständig inaktiviert ist ($T_{1/2} = 2 \pm 0,5$ min, Tabelle 3.7). Bei einem pH-Wert von pH 4,5 kann im Mandelonitril-Spaltungsassay keine Enzymaktivität nachgewiesen werden (Tabelle 3.7). Die cFbFP-AtHNL-Fusion setzt bei einem pH-Wert von pH 4,75 innerhalb von 60 min 96 % Benzaldehyd

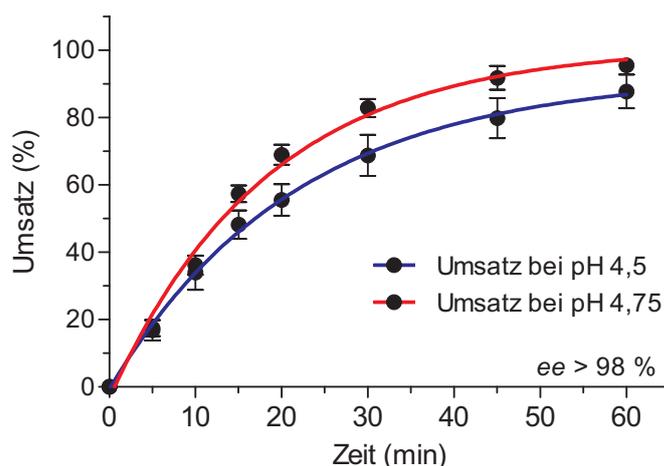


Abbildung 3.24: Umsatz von Benzaldehyd und HCN zu (*R*)-Mandelonitril im wässrig-organischen Zweiphasensystem bestehend aus MTBE und 50 mM Acetatpuffer (pH 4,5 und pH 4,75). Die Enzymkonzentration von cFbFP-AtHNL im Puffer betrug 0,3 mg/ml. Der enzymatische Umsatz wurde mittels chiraler Gaschromatographie verfolgt. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Nach 60 min wurde ein Enantiomerenüberschuss von (*R*)-Mandelonitril von 98 % erreicht. (© American Society for Microbiology, [DOI:10.1128/AEM.00795-13])

und HCN zu (*R*)-Mandelonitril um 90 % der Reaktion sind nach weniger als 15 min abgeschlossen. Die Umsetzung bei einem pH-Wert von pH 4,5 verlief anfänglich ähnlich schnell. Hierbei konnte jedoch lediglich 75 % Umsatz erreicht werden. Dies ist vermutlich auf die geringere Stabilität der cFbFP-*At*HNL-Fusion bei diesem pH-Wert ($T_{1/2} = 5 \pm 0,8$) zurückzuführen. In beiden Ansätzen konnte (*R*)-Mandelonitril mit > 98 % Enantiomerenüberschuss (*ee*) produziert werden.

Die pH-Stabilität des cFbFP-*At*HNL-Fusionsproteins gegenüber schwach sauren pH-Werten erlaubt die Synthese von (*R*)-Mandelonitril in einem wässrig-organischen Zweiphasenreaktionssystem. Um in einem solchen System enantiomerenreine Produkte zu erhalten, muss der pH-Wert der wässrigen Phase so niedrig wie möglich, jedoch deutlich unter pH 5, gehalten werden. Unter diesen Bedingungen kann die wildtypische *At*HNL aufgrund ihrer geringen pH-Stabilität nicht eingesetzt werden. Unter Verwendung des cFbFP-*At*HNL-Fusionsproteins konnten unter nicht optimierten Bedingungen Umsätze von 96 % (bei pH 4,75) bzw. 75 % (bei pH 4,5) bei gleichzeitig sehr guten *ee*-Werten (> 98 % (*R*)-Mandelonitril) erzielt werden.

4 DISKUSSION

Die Erzeugung und Charakterisierung von translationellen Fusionsproteinen bestehend aus einem FbFP und unterschiedlich komplexen Zielenzymen (Kapitel 3.1, Kapitel 3.2 und Kapitel 3.4) war Ziel dieser Arbeit. Alternativ zu FbFPs und GFP wurde im Rahmen dieser Arbeit PYP als fluoreszentes Fusions-FRP etabliert (Kapitel 3.5). Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem Erhalt der Fluoreszenzeigenschaften sowie der enzymatischen Aktivität des entsprechenden Fusionsproteins. Als Referenzsystem wurde in allen Fällen eYFP als Fusionspartner verwendet. Nach erfolgreicher Erzeugung und initialer Charakterisierung der verschiedenen fluoreszenten Fusionsproteine wurde das *AtHNL*-Fusionssystem eingehender biochemisch charakterisiert (Kapitel 3.7) und zur Untersuchung eines biotechnologisch relevanten, unkonventionellen Reaktionssystems verwendet (Kapitel 3.8).

4.1 Die strukturellen Eigenschaften von bakteriellen FbFPs erlauben die einfache Fusion an verschieden komplexe Zielenzyme

Wie einleitend in Kapitel 1.6 beschrieben, sollte die Eignung eines bakteriellen FRPs basierend auf der LOV-Domäne des Blaulichtphotorezeptors YtvA aus *B. subtilis* für die Erzeugung verschieden komplexer Fusionsproteine getestet werden. Als Zielenzyme wurden in dieser Arbeit die monomere Lipase A aus *B. subtilis* (*BsLA*), die dimere Hydroxynitrillyase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) sowie die tetramere, Kofaktor-abhängige Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (*PfBAL*) verwendet.

Alle FbFP-basierten Fusionsproteine dieser Arbeit konnten heterolog in *E. coli*-BL21(DE3) überproduziert und mit Ausnahme von cFbFP-*PfBAL* mittels IMAC in ausreichenden Mengen in fluoreszenter und enzymatisch aktiver Form gereinigt werden (Tabelle 3.3). Die entsprechenden Ergebnisse sind vergleichend in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Während alle *AtHNL*- und *BsLA*-Fusionen unproblematisch überproduziert werden konnten und einfach zu reinigen waren, erwies sich die Expression der FbFP-*PfBAL*-Fusionen als problematisch.

Tabelle 4.1: Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine. Die Ausbeute der Reinigung (IMAC) bezieht sich auf mg Protein je 10 g Feuchtzellmasse. (Die hier verwendeten Präparationen (wildtypische AtHNL und wildtypische PfBAL) wurden freundlicherweise von Daniel Okrob* und Melanie Schwarz** (IBG-1) bereitgestellt.)

	BsLA			AtHNL			PfBAL			
	Lipase A aus <i>B. subtilis</i>			Hydroxynitrilase aus <i>A. thaliana</i>			Benzaldehydase aus <i>P. fluorescens</i>			
	WT	nFBFP	cFbFP	WT*	nFBFP	cFbFP	WT**	nFBFP	cFbFP	nYFP
Expression	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ausbeute (mg)	3	15	5	n.b.	20	6	n.b.	1,2	-	12,8
spezifische Akt. (U/mg)	36	30	5	21	15	18	239	239	-	224
k_{cat} (s^{-1})	12	18	3	5	14	14	234	300	-	332
Φ_F		0,18	0,10	0,19	0,23	0,8	n.b.	n.b.	-	n.b.

Hierbei wurde zwar sehr viel Fusionsprotein überproduziert, dieses lag jedoch nahezu ausschließlich unlöslich in Form von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) vor [240]. In gleicher Weise problematisch verliefen anfängliche Reinigungsversuche mittels IMAC für die FbFP-*PfBAL*-Fusionen. So war unter Standard-IMAC-Reinigungsbedingungen keine Bindung des Fusionsproteins an die Säule zu beobachten [240]. Im Rahmen der Masterarbeit von Benita Kopka [240] wurden daher die Expressions- und Reinigungsbedingungen für nFbFP-*PfBAL* und nYFP-*PfBAL* optimiert. So konnte nFbFP-*PfBAL* und nYFP-*PfBAL* in geringen Ausbeuten erhalten werden (Tabelle 3.3). Das Referenzkonstrukt nYFP-*PfBAL* konnte hierbei in etwas höheren Ausbeuten isoliert werden. Die vergleichsweise schlechte heterologe Expression der nFbFP-*PfBAL*- und nYFP-*PfBAL*-Fusionen könnte auf die komplexe dreidimensionale Struktur der *PfBAL* zurückzuführen sein [196]. So könnte die Fusion des FRPs die Ausbildung der nativen Quartärstruktur (Tetramer) des Zielenzym verhindern, was zur Aggregation und Fehlfaltung des Fusionsproteins führen könnte. In dieser Hinsicht scheint sich die Fusion des FbFPs negativer auszuwirken als die Fusion von eYFP. Dies könnte auf die dimere Quartärstruktur [241] des verwendeten FbFPs zurückzuführen sein. So werden evtl. durch Fusion des FbFPs zusätzliche Interaktionen zwischen den Untereinheiten des Fusionsproteins induziert, was die Ausbildung des nativen Tetramers beeinflusst oder verhindert. In dieser Hinsicht sollte sich das hier verwendete YFP weniger nachteilig auswirken, da es hauptsächlich als Monomer vorliegt. Jedoch wurde für die in dieser Arbeit verwendete Variante des YFPs (Clontech, eYFP [23]) Dimerisierung bei höheren Konzentrationen ($K_d = 0,1 \text{ mM}$) nachgewiesen [238]. Dies könnte die relativ geringe Expression und Reinigungsausbeute für nYFP-*PfBAL* erklären. Für weiterführende Experimente sollte eine Variante des eYFPs verwendet werden, welche bei höheren Konzentrationen nicht zur Dimerisierung neigt [238]. Dieses Verhalten von FbFPs und YFP wurde im Rahmen dieser Arbeit z.B. für die *AtHNL*-FRP-Fusionsproteine nachgewiesen. Dabei führte die N- und C-terminale Fusion des FbFPs zu einer veränderten Quartärstruktur im Vergleich zum wildtypischen Zielenzym. Während die *AtHNL* im nativen Zustand als Dimer vorliegt, konnten für die FbFP-Fusionsproteine eine Mischung an Oligomerenzuständen (Dimer, Tetramer, höhere Oligomere) nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Die Fusion eines hauptsächlich monomeren FRPs, wie dem YFP oder PYP-Protein führten im Gegensatz dazu zu keiner Beeinflussung der nativen Quartärstruktur

Alternativ könnten daher monomere FbFPs [129] basierend auf pflanzlichen LOV-Domänen wie z.B. der LOV2-Domäne des Phototropin2 aus *Arabidopsis thaliana* oder das PYP-Protein verwendet werden.

Ferner könnte eine Fehlfaltung des FbFPs während der Proteinbiosynthese die korrekte Faltung des Fusionsproteins negativ beeinflussen. Hierbei kann im Gegensatz zu eYFP, in welchem die Synthese des fluoreszenten Chromophors autokatalytisch im Protein erfolgt, eine vollständige Beladung des FbFPs mit endogen in *E. coli* synthetisierten FMN Einfluss auf die korrekte Faltung des Reporters und somit des Fusionsproteins haben. Die geringe Fluoreszenz, d.h. der geringe Anteil an gebundenen

haben. Zusätzlich könnte die geringe Größe der CAP-Struktur ähnliche Effekte hervorrufen. So besitzt die C-terminale LINKER-Struktur etwa die doppelte Größe der CAP-Struktur (Abbildung 4.1). Durch den Einsatz alternativer Verbindungselemente zwischen FbFP und dem Zielenzym kann dieses Problem umgangen werden. Beispielsweise könnte der flexible GGGS-Linker, der bei den YFP-Fusionsproteinen verwendet wurde, zur Konstruktion C-terminaler FbFP-Fusionen verwendet werden. So wurde zur Erzeugung eines YFP-FbFP FRET-Biosensors, der eine nichtinvasive Sauerstoffdetektion in zellulären Systemen erlaubt, z.B. zusätzlich zur C-terminalen CAP-Struktur ein kurzer flexibler Peptid-Linker zur Separation des YFP-Proteins von der FbFP-Domäne gewählt [245].

Mit Ausnahme von cFbFP-BsLA zeigen alle FbFP-Fusionsproteine sehr ähnliche spezifische Aktivitäten (U/mg) im Vergleich zum jeweiligen (wildtypischen) Zielenzym (Tabelle 3.2, Kapitel 3.2). Einige Konstrukte wie nYFP-AtHNL und nPYP-AtHNL waren anscheinend sogar aktiver als das entsprechende wildtypische Enzym. Wobei hierbei nicht völlig geklärt ist, ob der Aktivitätsunterschied auf den Vergleich von frischen nYFP-AtHNL- und nPYP-AtHNL-Präparation mit einem Enzymlyophilisat der wildtypischen AtHNL zurückzuführen ist. Zudem ist der direkte Vergleich spezifischer Aktivitäten aus folgenden Gründen problematisch: Da die Fusionsproteine, je nach Fusion ein größeres Untereinheiten-Molekulargewicht als das entsprechende Wildtyp-Enzym besitzen, können diese mehr Coomassie-Farbstoff im Bradford-Assay binden. Es kann bei gleicher Anzahl an Fusionsprotein Molekülen mehr Farbstoff gebunden werden. Das fusionierte FRP trägt jedoch nicht zur enzymatischen Aktivität bei. Demzufolge führt eine Normierung der volumetrischen Aktivität (U/ml) auf die mittels Bradford-Assay bestimmte Enzymkonzentration wahrscheinlich zu einer Unterschätzung der enzymatischen Aktivität der Fusionsenzyme. Wird beim Vergleich der Enzymaktivitäten der Fusionsenzyme und der jeweiligen Wildtyp-Enzyme die Änderung des Molekulargewichtes durch die Fusion des FRPs (relative Enzymaktivität in % k_{cat}) berücksichtigt, so ergibt sich für alle Fusionsproteine, mit Ausnahme von cFbFP-BsLA k_{cat} -Werte, welche teilweise deutlich über den Werten der wildtypischen Zielenzyme liegen (Tabelle 3.2, Kapitel 3.2).

Die in dieser Arbeit bestimmten Fluoreszenz-Quantenausbeuten der Fusionskonstrukte entsprechen in etwa den Literaturwerten bzw. den in dieser Arbeit bestimmten Werten der isolierten FRPs (Tabelle 3.4). Allerdings konnte nicht geklärt werden, warum die Fluoreszenz-Quantenausbeute in einigen Fällen, jedoch insbesondere bei der cFbFP-BsLA-Fusion, so stark verringert ist. Mögliche Ursachen könnten jedoch in einer veränderten Faltung der FbFP-Domäne zu suchen sein, welche evtl. zu einer leicht veränderten Proteinumgebung des FMN-Fluorophors führt. Somit könnten geänderte Interaktionsmechanismen zwischen Fluorophor und Protein, z.B. durch eine Änderung hydrophober und ionischer, π - π -Stacking Wechselwirkungen, zur Verringerung der Fluoreszenz beitragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das in dieser Arbeit verwendete FbFP, basierend auf dem bakteriellen Blaulicht LOV-Photorezeptor YtvA als Partner für translationale Fusionen eignet. Unter Ausnutzung der natürlich vorhandenen Verbindungselemente (CAP und LINKER) ist sowohl eine N- als auch eine C-terminale Fusion an das Zielenzym möglich, ohne dass dies zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität des Zielenzym oder der Fluoreszenz des FbFP-Reporters führt. Für eine C-terminale Fusion sollte jedoch entweder das CAP-Element verlängert, oder komplett durch einen flexiblen Linker ersetzt werden, da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine direkte C-terminale Fusion des FbFPs an das Zielenzym über das CAP-Linkermodul wahrscheinlich zu Faltungsproblemen auf Grund sterischer Behinderung führt.

4.2 Etablierung des *H. halophila* photoactive yellow proteins (PYP) als fluoreszentes Reporterprotein

Das PYP aus *H. halophila* stellt eine mögliche Alternative zu FRPs wie GFP und FbFP dar. Die generelle Struktur ähnelt hierbei der der FbFPs (Abbildung 1.5), mit dem Unterschied, dass PYP vor seiner Verwendung als FRP mit seinem Chromophor *pCA* oder dessen Derivaten rekonstituiert werden muss (Abbildung 2.2).

Zur Evaluierung von PYP als Fusions-FRP wurde das Protein mit der *AtHNL* fusioniert, woraus sich die nPYP-*AtHNL*-Fusion ergab. Diese nPYP-*AtHNL*-Fusion wurde überexprimiert, gereinigt und mit einem *pCA* (*trans-locked-pCA*) beladen (Abbildung 2.2). In Abbildung 4.2 sind vergleichend die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften aller in dieser Arbeit verwendeten FRPs dargestellt. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer optimalen Anregungswellenlängen als auch in ihren Fluoreszenz-emissionsspektren.

Vorteile dieses alternativen FRP-Systems sind beispielsweise, wie beim FbFP, seine geringe Größe (14 kDa, 125 Aminosäuren) sowie dessen monomere Struktur [246] (Abbildung 1.5). Dadurch ist die Gefahr, die Zielenzyme in ihrer Faltung zu behindern, theoretisch geringer. Durch die Rekonstitution mit dem *trans-locked-pCA*-Chromophor erlangt PYP eine starke fluoreszenz. Außerdem weist das PYP eine große Photostabilität und eine hohe Thermo- und pH-Stabilität auf [246, 103, 104, 247]. PYP ist selbst bei einer Temperatur von 82 °C immer noch korrekt gefaltet [104] während YFP bereits innerhalb 10 min bei 70 °C denaturiert [248]. Dennoch besitzt PYP einige Nachteile, welche eine Anwendung vor allem als *in vivo* Fluoreszenzreporter komplizieren. Durch die geringe Fluoreszenz des natürlichen Chromophors *pCA* ($\Phi_F = 0,006$) [108] ist es von Vorteil, das stark fluoreszierende *pCA*-Analogon (*trans-locked*-Chromophor) als

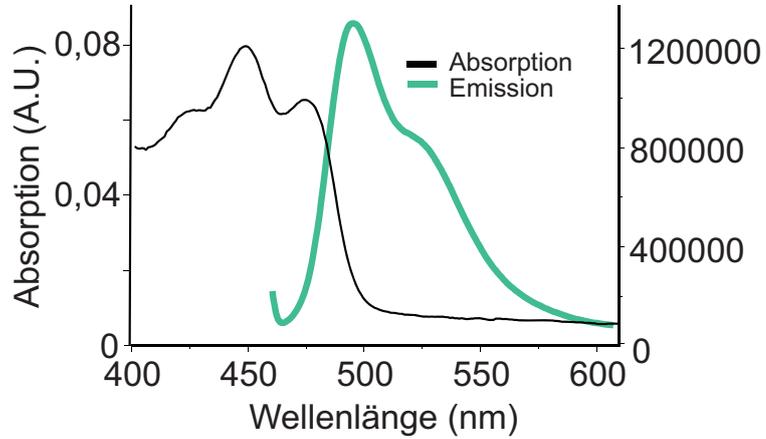
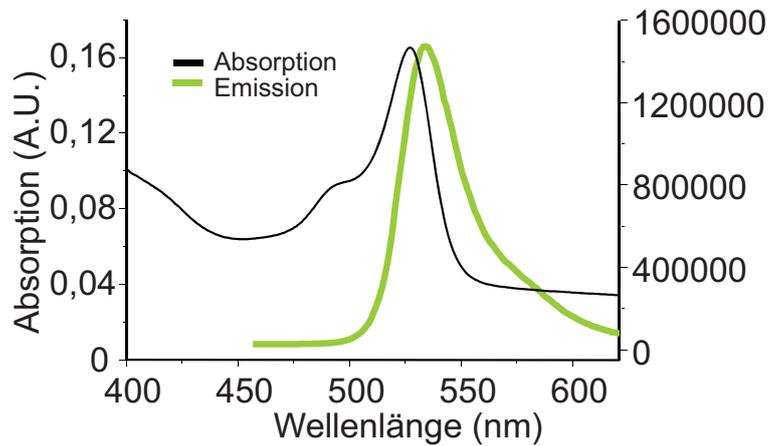
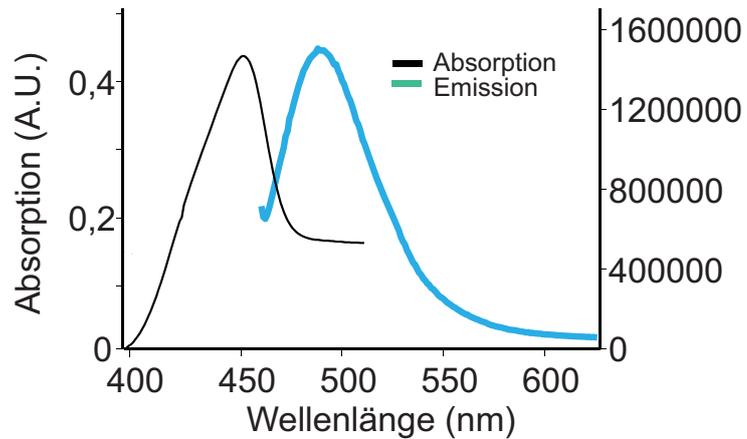
FbFP**YFP****PYP**

Abbildung 4.2: Vergleich der Emissionsfarbe in einer Quarzküvette (Foto) und der Absorptions- und Fluoreszenzspektren von FbFP (oben), YFP (mitte) und PYP (unten).

Fluorophor an das PYP zu binden. Sowohl *pCA* als auch der *trans-locked*-Chromophor lassen sich jedoch nicht ohne Weiteres in z.B. *E. coli* biosynthetisch zur Verfügung stellen, da die meisten Expressionsstämme diese Verbindungen nicht benötigen und daher nicht synthetisieren. Das natürliche, jedoch wenig fluoreszente *pCA* lässt sich prinzipiell durch Koexpression zweier Enzyme aus *Rhodobacter capsulatus* (einer Tyrosinammoniumlyase und *p*-Hydroxycinnamyl:CoA Ligase) biosynthetisch in der Zelle zur Verfügung stellen [249]. Dieser native, jedoch wenig fluoreszente, Chromophor kann *in vivo* in das PYP-Apo-Protein eingebaut werden [239]. Für den stark fluoreszenten nicht-natürlichen *trans-locked-pCA*-Chromophor, ist dies nicht so einfach umzusetzen. Daher scheint eine Verwendung von *trans-locked-pCA* beladenen und damit stark fluoreszierenden PYPs als *in vivo*-FRP wenig aussichtsreich. Um die Quantenausbeute des mit dem natürlichen *pCA*-Chromophor beladenen PYPs zu erhöhen, könnten Mutationen in das PYP eingeführt werden, welche die Quantenausbeute erhöhen. Methoden der gerichteten Evolution [250] könnten verwendet werden, um die Quantenausbeute des *pCA*-beladenen PYPs zu erhöhen. Unter Verwendung dieser modifizierten PYP-Varianten in Kombination mit einer Koexpression der beiden *pCA*-Biosynthesenzyme, wäre somit eine *in vivo*-Anwendung von PYP als FRP prinzipiell realisierbar. Für ein *E. coli*-Expressionssystem wurde dieser Ansatz zur *in vivo* Beladung von PYPs bereits erfolgreich demonstriert [249]. Inwieweit sich diese Methode auf andere Expressionssysteme (z.B. Hefen und höhere Eukaryonten) übertragen lässt, ist jedoch nicht abzusehen.

Da das PYP ebenso wie FbFPs während der Reifung nicht auf molekularen Sauerstoff angewiesen ist, könnte dieses FRP-System z.B. in anaeroben Mikroorganismen Anwendung finden. Die etwas von FbFPs abweichenden spektralen Eigenschaften (Abbildung 4.2) sind hierbei als ein weiterer Vorteil zu sehen, da so die für anaerobe Anwendungen zur Verfügung stehende Fluoreszenz-Farbpalette erweitert würde.

Für eine reine *in vitro*-Anwendung könnte sich die hohe Temperatur- und pH-Stabilität von PYPs sowie die kovalente Bindung des Chromophors an das Protein, als Vorteilhaft erweisen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PYP prinzipiell als *in vitro*-FRP Anwendung finden könnte. Von Vorteil sind hierbei dessen geringe Größe und hohe Stabilität. Die Notwendigkeit einer nachträglichen Beladung des Proteins mit dem fluoreszenten *trans-locked-pCA*-Chromophor kompliziert jedoch dessen Verwendung und macht eine *in vivo*-Anwendung des Systems in unmodifizierter Form nahezu unmöglich.

4.3 Die Fusion FbFP-basierter FRPs an die *AtHNL* führt zu veränderten pH-Optima und pH-abhängigen Stabilitäten

Cyanhydrine sind in wässrigen Medien bei einem pH-Wert über pH 5 meist instabil und zerfallen spontan in die Carbonylkomponente und HCN. Umgekehrt führen höhere pH-Werte in der Synthesereaktion zur nicht-enzymatischen racemischen Produktbildung. Beides kann durch Senkung des pH-Werts bzw. durch Senkung des Wassergehalts durch Einsatz von organischen Lösungsmitteln unterdrückt werden [133, 190]. Um die fluoreszenten *AtHNL*-Fusionsproteine in Cyanhydrinsynthesen analog zur isolierten *AtHNL* einsetzen zu können, wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität und Stabilität der verschiedenen *AtHNL*-FRP-Fusionsproteine untersucht. In dieser Weise sollte gleichzeitig verifiziert werden, ob die Fusion eines FRPs an die *AtHNL* einen Einfluss auf die biochemischen Charakteristika des Enzyms hat. Insbesondere bei niedrigen pH-Werten, bei denen die wildtypische *AtHNL* nahezu inaktiv ist, war für alle FRP-*AtHNL*-Fusionsproteine noch deutliche Aktivität messbar. Bei einem pH-Wert von pH 4,75 ist die nicht-enzymatische Mandelonitril-Spaltungsreaktion und somit die unspezifische Hydrocyanierung weitestgehend unterdrückt. In Abbildung 4.3 ist ein Vergleich der relativen Aktivitäten der verschiedenen Konstrukte bei diesem pH-Wert dargestellt. Der drastische Aktivitätsverlust der *AtHNL* bei pH-Werten unter pH 5 wurde bereits in früheren Studien beobachtet, in denen die pH-abhängige Aktivität von HNLs bei der Spaltung von Cyanhydrinen untersucht worden ist [190]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die beobachteten pH-abhängigen Aktivitätsunterschiede in den Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wahrscheinlich

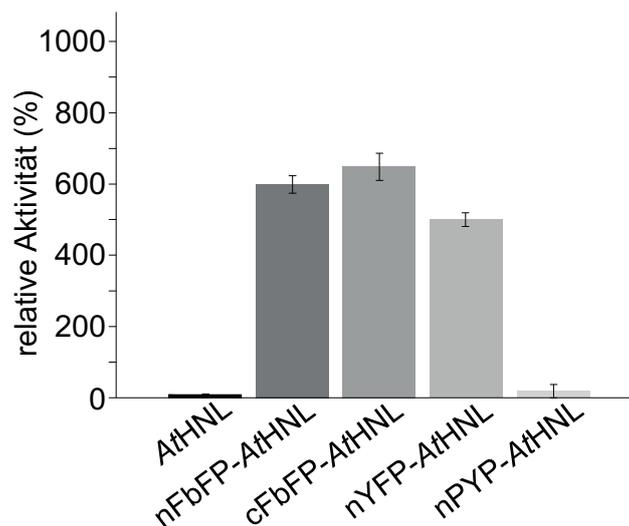


Abbildung 4.3: Die relative Aktivität aller verwendeten *AtHNL*-Fusionen bei pH 4,75. Alle Enzympräparationen wurden mit 50 mM Acetatpuffer (pH 4,75) verdünnt. Bevor Enzym in die Pufferlösungen gegeben wurde, wurden die Puffer 5 min auf 25 °C temperiert. Die *AtHNL*-Aktivität wurde mittels Mandelonitrilspaltung bestimmt (Kapitel 2.15). Die spezifische Aktivität der Fusionsproteine ist auf den Wert der *AtHNL* (20 U/mg = 100 %) normiert.

auf eine Überlagerung von raschen Deaktivierungsprozessen mit der eigentlichen enzymatischen Reaktion zurückzuführen sind. Hierbei wird die wildtypische AtHNL bei niedrigen pH-Werten sehr schnell deaktiviert (Tabelle 3.7) [190, 236]. Im Gegensatz dazu konnte für die nFbFP-AtHNL und cFbFP-AtHNL-Fusionsproteine gezeigt werden, dass diese eine um 1-2 Größenordnungen erhöhte pH-Stabilität im schwach sauren pH-Bereich ($< \text{pH } 5,0$) besitzen (Tabelle 3.7). Mögliche strukturelle Ursachen der erhöhten nFbFP-AtHNL und cFbFP-AtHNL pH-Stabilität werden im Folgenden diskutiert.

4.4 Mögliche strukturelle Ursachen der erhöhten pH-Stabilität der FbFP-AtHNL-Fusionsproteine im schwach sauren pH-Bereich

In Bezug auf die native Quartärstruktur existiert das stabilste Fusionsprotein (cFbFP-AtHNL Halbwertszeit: $96 \pm 0,7$ min bei pH 4,75) dieser Arbeit hauptsächlich als Tetramer, wohingegen die zweitstabilste Fusion (nFbFP-AtHNL Halbwertszeit: 55 ± 13 min bei pH 4,75) sowohl als Dimer als auch in tetramerer Form vorliegt (Abbildung 3.20). Die beiden Referenz-Konstrukte nYFP-AtHNL und nPYP-AtHNL sind in den entsprechenden Analysen nahezu ausschließlich als Dimer nachzuweisen (Abbildung 3.20). Somit scheint die wahrscheinlichste Ursache für die erhöhte Stabilität der beiden FbFP-AtHNL-Fusionsproteine eine geänderte Quartärstruktur im Vergleich zur wildtypischen AtHNL zu sein, wobei Fusionsproteine mit einer komplexeren Quartärstruktur (hier Tetramer vs. Dimer) stabiler zu sein scheinen. Unterstützung für diese Hypothese ist in einer vergleichenden Studie der MeHNL und AtHNL zu finden. Hierbei wurden Unterschiede in der Quartärstruktur beider Enzyme als mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede in der pH-Stabilität identifiziert [190].

Ein stabilisierender Effekt fusionierter Protein-Tags wurde bereits für verschiedene Proteine nachgewiesen. So kann eine Fusion des Maltosebindproteins (MBP) aus *E. coli* [251], der Glutathion-S-transferase aus *Schistosoma japonicum* [252], des Thioredoxins aus *E. coli* [253] oder des *E. coli*-Proteins NusA [254] die Löslichkeit und Stabilität des Fusionsproteins im Vergleich zum isolierten Zielenzym verbessern. Vermutlich basiert die verbesserte Stabilität auf der Stabilisierung der Proteinfaltung des Zielproteins in den Fusionsproteinen. Die Fusionspartner sind anscheinend so stabil, dass sie z.B. selbst unter dem Einfluss hoher Temperaturen nicht entfalten. Dies führt anscheinend zur Stabilisierung der Faltung des Zielproteins.

Basierend auf strukturellen Untersuchungen wurde zu dem für Proteine hyperthermophiler Herkunft postuliert, dass eine erhöhte Anzahl starker (ionischer) Wechselwirkungen die Interaktion zwischen Monomer-Untereinheiten stabilisiert [255]. Dies führt zur Ausbildung höherer Oligomere

und somit zu einer Stabilisierung dieser Proteine gegenüber monomeren Varianten derselben Enzymfamilie [255, 256]. Weitere Studien haben gezeigt, dass Oligomerisierung von Proteinen zu einer thermodynamisch höheren Stabilität führen kann. Dies wurde unter anderem am Beispiel der Alkoholdehydrogenase aus *Clostridium beijerinckii* oder der Glucosedehydrogenase gezeigt. In beiden Fällen führte die Erzeugung zusätzlicher ionischer Wechselwirkungen oder das Einbringen von Disulfidbrückenbindungen zwischen den Grenzflächen der Proteinstruktur, zur Unterstützung der nativen Quartärstruktur und damit zu einer erhöhten Stabilität [257, 258].

Die strukturelle Ursache für die erhöhte pH-Stabilität der FbFP-AtHNL-Fusionsproteine ist höchstwahrscheinlich in einer Veränderung der Quartärstruktur des jeweiligen Fusionsproteins im Vergleich zur wildtypischen AtHNL zu suchen. Dies ist für die biotechnologische Anwendung des Enzyms von Vorteil. So erlaubt dieser Stabilisierungseffekt die effektive (*R*)-Mandelonitrilsynthese unter Einsatz des gelösten Fusionsproteins in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem. In einem solchen Reaktionssystem muss der pH-Wert der wässrigen Phase so niedrig wie möglich gehalten werden, um eine unspezifische, nicht-enzymatische Hydrocyanierungsreaktion zu unterdrücken. Bei einem solchen niedrigen pH-Wert ist jedoch die wildtypische AtHNL nicht stabil und kann daher in gelöster Form nicht eingesetzt werden. Gleichzeitig stellt die beobachtete Veränderung der Quartärstruktur des Fusionsproteins im Vergleich zum isolierten Zielenzym, jedoch ein Problem für die Verwendung des FbFPs als nicht-invasives Reporterprotein dar. So sollte im Idealfall die Fusion eines Reporterproteins keinen Einfluss auf Aktivitäten, Stabilitäten und die Quartärstruktur des Zielenzyms haben.

4.5 FbFP-AtHNL-Fusionsproteine als Werkzeug zur Identifizierung geeigneter (unkonventioneller) Lösungsmittel für den Einsatz in der Ganzzellbiokatalyse

Für den Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren in reinem organischem Lösungsmittel ist die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels von besonderer Bedeutung. Ein wichtiger Aspekt für diese Anwendung ist, dass die Zellintegrität im Reaktionsmedium erhalten bleibt und es somit nicht zum "Ausbluten" des Enzyms aus der Zelle kommt. Des Weiteren sind eine gute Substrat- und Produktlöslichkeit, sowie eine leichte Separation der Produkte von Vorteil. Untersucht werden sollte im Vorfeld ebenfalls, ob die eingesetzten Stoffe toxisch auf das zelluläre System wirken.

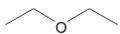
In der Literatur finden sich einige Beispiele für lösungsmitteltolerante Organismen, die für die Biokatalyse eingesetzt werden. Ein frühes Beispiel ist der Toluol-tolerante *P. putida* IH-2000-Stamm [259]. Inzwischen werden eine ganze Reihe lösungsmitteltoleranter Stämme für die Produktion verschiedenster Stoffe in organischen Systemen eingesetzt [260].

Der Einsatz herkömmlicher *E. coli*-Überexpressionszellen als Ganzzellbiokatalysator in einem monophasischen mikro-wässrigen Reaktionssystem ist jedoch weit weniger verbreitet [234]. Eine Vielzahl bisheriger Studien konzentriert sich auf die stereoselektive Reduktion von Ketonen durch Alkohol-Dehydrogenasen mittels lyophilisierter Hefezellen [261, 234]. Zwei Studien über die Verwendung rekombinanter *E. coli*-Zellen in wasserfreien oder mikro-wässrigen Reaktionssystemen wurden bisher veröffentlicht. In einer Studie wurden lyophilisierte *E. coli*-Zellen, die eine Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus ruber* produzierten, in einem mikro-wässrigen System mit 99 % (v/v) Isopropanol verwendet [234]. Eine ähnliche Strategie wurde in einer weiteren Studie angewandt, wobei die *Candida parapsilosis* Carbonyl-Reduktase heterolog in *E. coli* überproduziert wurde. Die entsprechenden lyophilisierten *E. coli*-Zellen wurden anschließend zur Reduktion von Acetophenon verwendet. Dabei kamen ausschließlich wasserfreie Substrate ohne Zusatz eines Lösungsmittels zum Einsatz [262].

Die Auswirkungen verschiedener organischer Lösungsmittel auf die zelluläre Integrität von *E. coli* sind unklar. Um ein effizientes Ganzzellbiotransformationssystem zu etablieren ist es daher notwendig, ein Lösungsmittel zu finden, welches die Zellintegrität des Biokatalysators während der Reaktion nicht negativ beeinflusst. Zur Identifizierung eines solchen Lösungsmittels bietet sich der Einsatz von FRPs in einfachen Voranalysen an. Fluoreszenzproteine der FbFP-Klasse sollten hierbei aus folgenden Gründen besonders für eine solche Voranalyse geeignet sein: In FbFPs liegt der fluoreszente Chromophor FMN nicht-kovalent im Protein gebunden vor. Ein Verlust der strukturellen Integrität des FbFP-Proteins bei gleichzeitigem Verlust der Zellintegrität würde dazu führen, dass freies FMN im Reaktionsmedium zu detektieren wäre. Werden ganze Zelle in dem zu untersuchenden Lösungsmittel inkubiert, sollte der Überstand, d.h. die organische Phase, nur dann FMN enthalten, wenn die Überexpressionszellen und das Fusionsprotein durch das Lösungsmittel zerstört werden. Die Fluoreszenz von freiem FMN und FbFP-gebundenem FMN lässt sich zudem fluorimetrisch unterscheiden (Kapitel 3.3). Um FbFPs als Werkzeug zur Identifizierung des am besten geeigneten Lösungsmittels für einen Ganzzellbiokatalysator-Einsatz zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit in *Proof-of-Principle*-Experimenten exemplarisch drei Lösungsmittel untersucht. Verwendet wurden MTBE, Diethylether (DEE) und Aceton. In ihren Eigenschaften sind die drei Lösungsmittel unterschiedlich (Tabelle 4.2).

Der Einsatz von DEE und Aceton führte zur Zellyse, sodass freies FMN anhand von Fluoreszenz in der entsprechenden organischen Phase detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu war beim Einsatz von MTBE keine Auswaschung erkennbar (Kapitel 3.6). Zudem blieben die entsprechenden Zellen optisch fluoreszent. Somit konnte MTBE als geeignetes Lösungsmittel für den Einsatz

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Eigenschaften sowie der Verteilungskoeffizient ($\log P$) der Lösungsmittel MTBE, DEE und Aceton. Alle Werte beziehen sich auf 20 °C und einen Umgebungsdruck von 1 bar.

	MTBE	DEE	Aceton
			
Polarität	unpolar	unpolar	polar
LogP	0,94	0,83	-0,24

konventioneller *E. coli*-Überexpressionszellen als Ganzzellbiokatalysator identifiziert werden. Ein möglicher Grund für die ungünstigen Auswirkungen von DEE und Aceton auf die bakterielle Zelle könnte im $\log P$ -Wert, d.h. vereinfacht dargestellt der Wassermischbarkeit des Lösungsmittels, zu suchen sein. Dieser Wert gibt den Partitionskoeffizient einer Substanz (hier das organische Lösungsmittel) in einem Wasser/Oktanol-Gemisch an. Er ist ein Maß dafür, wie gut oder schlecht eine Substanz in Wasser bzw. Oktanol löslich ist. Dabei besitzt ein Lösungsmittel mit einem niedrigen $\log P$ -Wert eine hohe Löslichkeit in Wasser wobei ein Lösungsmittel mit einem hohen $\log P$ -Wert gut in unpolaren Lösungsmitteln, wie Oktanol, löslich ist. Durch die im Verhältnis zu MTBE höhere Polarität von Aceton und DEE könnte der Wasseranteil in der Zelle zu schnell reduziert werden. Eine mögliche Ursache könnte eine lösungsmittelbedingte Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran sein, durch welche die Zelle rasch ausblutet.

FbFP-basierte Reportersysteme eignen sich aufgrund ihrer strukturellen und photochemischen Eigenschaften hervorragend für den Einsatz als Reporter zum Nachweis zellulärer Integrität, z.B. für ein initiales Lösungsmittel-Screening in der Biokatalyse. In weiterführenden Studien müsste dieses hier exemplarisch untersuchte Reportersystem jedoch systematisch getestet werden. So könnte der Einfluss weiterer Lösungsmittel, als auch die Stabilität verschiedener Expressionsstämme mittels, des im Rahmen dieser Arbeit etablierten, FbFP-Reportersystems analysiert werden. Darüber hinaus ist die Übertragung der Methodik auf die Untersuchung von Proteinintegrität in wässrig/organischen Zwei-Phasen-Systemen möglich.

4.6 Vergleichende (*R*)-Mandelonitril Synthesen - Evaluation des Ganzzellbiotransformations-Systems

Im Folgenden sollen die Vor- und Nachteile, des im Rahmen dieser Arbeit etablierten, Ganzzellbiokatalysators im Vergleich zu bereits beschriebenen, biokatalytischen Reaktionssystemen zur Cyanhydrin-Synthese diskutiert werden.

Werden frische *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche die wildtypische AtHNL überproduzieren, für die (*R*)-Mandelonitril-Synthese eingesetzt, so können bei vollständigem Umsatz des Substrates pro Syntheserunde etwa 100 mg Produkt erhalten werden (Kapitel 3.6). Fünf aufeinanderfolgenden Syntheseschritte ergeben 500 mg Produkt. Bezogen auf 1 g Zellfeuchtmasse ist es theoretisch möglich, 1500 mg (*R*)-Mandelonitril zu erhalten. Des Weiteren können sowohl frische als auch bei -20 °C gelagerte Zellen in der Synthesereaktion eingesetzt werden, ohne dass für gefroren gelagerte Zellen eine Verringerung der Umsatzrate nachweisbar wäre. Dies steigert die Attraktivität des Einsatzes ganzer Zellen, da so der Ganzzellbiokatalysator über lange Zeiträume, ohne Einbußen in der Syntheseaktivität, gelagert werden kann. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass die Herstellung von Ganzzellpräparationen ohne größeren Aufwand möglich ist. Da keinerlei aufwendige Chromatographieschritte anfallen, handelt es sich um ein sehr kostengünstiges Verfahren zur Synthese von chiralen Cyanhydrinen. Bei der Expression der AtHNL in *E. coli* aus einem Liter Medium ergeben sich etwa 4 g Zellfeuchtmasse. Aus 4 g ganzer Zellen werden somit nach fünf Rezyklierungsschritten (5 h) etwa 5,5 g Produktausbeute erwartet. Zudem ist zu erwähnen, dass das Zellwachstum in einer 1 l Schüttelkultur im Batch-Verfahren durchgeführt wurde. Bei einer Hochzelldichtfermentation unter Verwendung spezieller Medien bei gleichzeitiger Kontrolle der Zellwachstumsparameter (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, etc.) wären somit höhere Ausbeuten an Zellmaterial zu erwarten, was die theoretisch mögliche Ausbeute pro Fermentationsansatz weiter erhöhen könnte.

Eine Anwendung ganzer Zellen in einphasigem Lösungsmittel zur enantioselektiven Synthese von Cyanhydrinen wurde in der Vergangenheit bereits beschrieben. Jedoch wurden in diesen frühen Studien keine bakteriellen Zellen verwendet, sondern Pflanzenmehl der Mandel und der Hirse, welches in mit Puffer versetztem Diisopropylether als Biokatalysator eingesetzt wurde. Dieser Ansatz lieferte zwar gute Cyanhydrin-Enantiomerenüberschüsse ($ee \geq 90\%$) war jedoch begleitet von sehr geringen Umsatzraten (14 - 528 h Reaktionszeit um Vollumsatz zu erhalten). Die langen Reaktionszeiten waren wahrscheinlich der Grund, warum sich dieser Prozess industriell nicht durchsetzen konnte [263].

4.6.1 Recycling des Ganzzellbiokatalysators im Vergleich zu Protein-Immobilisaten

Sowohl für frische als auch für bei -20 °C gelagerte Zellen wurden fünf aufeinanderfolgende Synthesen durchgeführt. Dabei konnte bis zur dritten Syntheserunde immer noch nahezu vollständiger Umsatz nachgewiesen werden (Abbildung 3.13). Jedoch waren in darauffolgenden Syntheserunden etwas reduzierte Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und geringere Ausbeuten zu beobachten (Abbildung 3.13). Die Enantioselektivität des Ganzzellbiokatalysators bleibt über fünf Reaktionszyklen konstant ($ee \geq 98\%$ (*R*)-Mandelonitril).

Im Hinblick auf eine Rezyklierung ganzer Zellen ist deren Stabilität vergleichbar zu Ansätzen, in welchen Immobilisate wie Celite-Partikel verwendet wurden [193]. Bei beiden Ansätzen ist eine gleichbleibende Enantioselektivität ($ee \geq 98\%$ (*R*)-Mandelonitril) und eine leichte Aktivitätsabnahme zu beobachten. Im Vergleich zum Einsatz eines Hydrogels als Trägermaterial erlaubt die Verwendung ganzer Zellen eine effektivere Rezyklierung, denn im Gegensatz zum Ganzzellansatz ist sowohl die Enantioselektivität ($ee \geq 82\%$ (*R*)-Mandelonitril) als auch die Umsatzrate nach fünf Zyklen drastisch reduziert [193]. Es scheint somit, dass die Zellen das Enzym effektiv vor dem organischen Lösungsmittel schützen. Sie dienen dem Enzym vermutlich als eine Art natürliches Immobilisierungsträgermaterial, in welchem sich das Enzym in seiner natürlichen Umgebung befindet und daher optimal aktiv ist.

4.6.2 Synthese diverser Cyanhydrine - Einfluss von Wasser auf die Enantioselektivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein monophasisches mikro-wässriges Reaktionssystem für die Synthese verschiedener chiraler Cyanhydrine unter Einsatz herkömmlicher rekombinanter *AtHNL*-überproduzierender *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen etabliert (Tabelle 3.6). Unter Verwendung lyophilisierter Zellen konnten ohne Optimierung der Reaktionsbedingungen Benzaldehyd, 2-Chlorbenzaldehyd, 2-Furaldehyd und 2-Fluorbenzaldehyd mit ee Werten von 98 %, 90 %, 88 % und 98 % zum entsprechenden Produkt umgesetzt werden. In allen Fällen konnten durch den Einsatz lyophilisierte Zellen höhere ee -Werte erreicht werden.

Dieses Reaktionssystem sollte im Prinzip direkt auf andere HNL-Systeme übertragen werden können, die zum Beispiel rekombinant in *E. coli* überproduziert werden können.

In dieser Hinsicht sollte die *HbHNL*, die *MeHNL* sowie die *LuHNL* in ähnlicher Weise verwendet werden können, da diese Enzyme ebenfalls in *E. coli* produziert werden können. Somit könnte mittels Ganzzellbiotransformation ein breiteres Cyanhydrin-Produktspektrum in einfacher, effizienter und kostensparender Weise zugänglich gemacht werden. Ein limitierender Faktor für den Einsatz

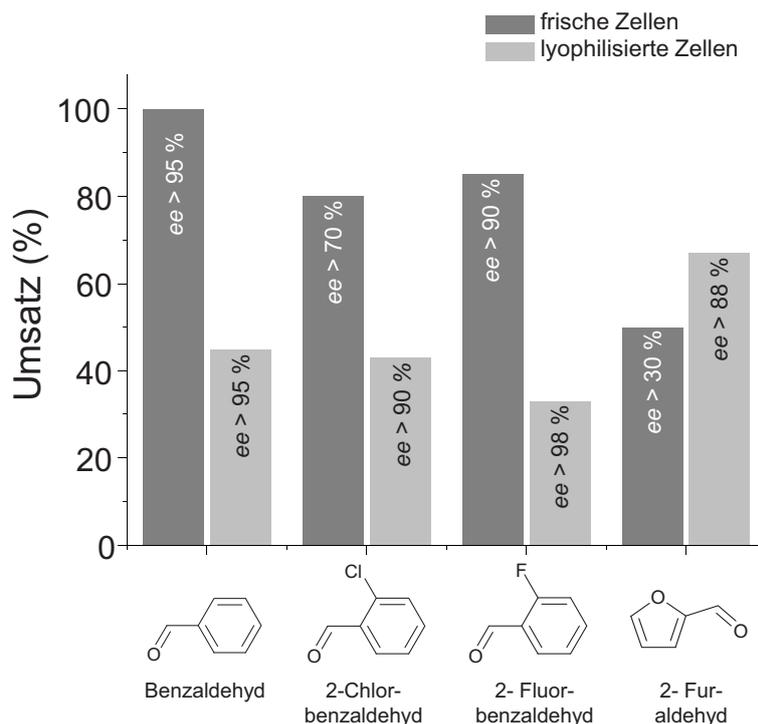


Abbildung 4.4: Hydrocyanierung mittels Ganzellbiotransformation verschiedener Aldehyde. Die *AtHNL*-überproduzierenden Zellen wurden entweder pelletiert und anschließend dreimal in frischem MTBE gewaschen oder als weitgehend trockenes Lyophilisat für 60 min in einphasigem, Puffer-gesättigtem MTBE zur Cyanhydrinsynthese eingesetzt. Reaktionsbedingungen: 1 ml Puffer-gesättigtes MTBE, 0,5 mmol Substrat, 1,5- 2 M HCN, 350 mg frische Zellen oder 80 mg lyophilisierte Zellen.

ganzer Zellen in der Cyanhydrin-Synthese könnte die Substratgröße darstellen. Es müsste im Vorfeld ausgeschlossen werden, dass die Substrate zu groß sind, um durch die Zellmembran in die Zellen zu gelangen.

Im industriellen Maßstab erfolgt die Cyanhydrin-Synthese bisher ausschließlich in wässrig-organischen Zweiphasensystemen [173]. Produziert werden mit diesem Verfahren hauptsächlich aromatische und heteroaromatische Cyanhydrine. Es finden sich zahlreiche Patente zur industriellen Herstellung von Cyanhydrinintermediaten, wie zum Beispiel die Synthese des Blutgerinnungshemmers (*R*)-2-Chlormandelonitril [264] durch die *PaHNL*, wobei jährlich 10 t (250 g/l/d) produziert werden (DSM) [173], oder die Synthese von (*S*)-3-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin (Insektizid) durch die *HbHNL*, wovon DSM jährlich etwa 10 t (1000 g/l/d) herstellt [265]. Unter Verwendung des in dieser Arbeit etablierten monophasischen mikro-wässrigen Reaktionssystems, unter Einsatz ganzer die entsprechende HNL-überproduzierende *E. coli*-Zellen, wäre es unter Umständen möglich diese Verfahren kostensparender zu gestalten.

Das in dieser Arbeit für die *AtHNL* etablierte Ganzzellbiotransformationssystem erlaubt die effektive Produktion verschiedener chiraler Cyanhydrine, welche unter Verwendung des isolierten Enzyms aufgrund dessen geringer pH-Stabilität nicht zugänglich wären. Die erreichten Produktmengen liegen hierbei unter den Werten etablierter Systeme. Die Kosten sparende Produktion und Lagerung des Ganzzellbiokatalysators stellt jedoch einen enormen Vorteil gegenüber dem etablierten System dar. Gleichzeitig könnte eine Übertragung des generellen Prinzips auf andere, bereits kommerziell genutzte HNLs, wie die *HbHNL*, einen kostensparenden Zugang zu diversen, bereits industriell produzierten, chiralen Cyanhydrinen ermöglichen.

4.7 Fluoreszenzproteine als Werkzeug zur Untersuchung des monophasischen mikro-wässrigen Reaktionssystems

Vergleichende Ganzzellbiotransformationen unter Einsatz der Wildtyp-*AtHNL*- und der nFbFP-*AtHNL*-Fusionen zeigten eine vergleichbare Aktivität und Stabilität bezüglich der Mandelonitril-Synthese sowie identisches Rezyklierungsverhalten (Abbildung 3.14).

Mittels Fluorimetrie und Fluoreszenzmikroskopie wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen des verwendeten organischen Lösungsmittels (MTBE) auf den Ganzzellbiokatalysator untersucht. Mikroskopische Analysen unter Detektion der FbFP-spezifischen Zell-Fluoreszenz wurden hierbei genutzt, um die Morphologie der Zellen während 4,5 h Inkubation in MTBE zu untersuchen. So konnte mittels statistischer Auswertung einer großen Anzahl fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden, dass sich der Zellumfang während der 4,5 h Inkubation in MTBE um ca. 20 % verringert (Abbildung 4.5). Die Änderung der Zellmorphologie deckt sich mit der leicht verringerten biokatalytischen Effizienz (Umsatz und Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten) in den späteren Reaktionszyklen. Eine mögliche Erklärung für die Verringerung des Zellumfangs bei Inkubation in MTBE wäre die osmotische Wirkung des nahezu wasserfreien Lösungsmittels wodurch den Zellen Wasser entzogen würde. Bisher ist wenig über die Gründe von morphologischen Änderungen einer bakteriellen Zelle in einem Lösungsmittelsystem bekannt. An zwei Stämmen wurde der Effekt der Morphologieänderung nachgewiesen und damit begründet, dass sich die verringerte Zellgröße bzw. das Oberflächen-Volumenverhältnis positiv auswirkt, da die Angriffsfläche für die möglicherweise giftigen Lösungsmittel verringert wird. *P. putida* und *Enterobacter sp.* zeigen bei Inkubation in Phenol, 4-Chlorophenol und Butanol (alle mäßig bis schlecht in Wasser löslich) eine Verringerung der Zellgröße [266]. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, die mit *E. coli*-Zellen im ebenfalls schlecht wasserlöslichen MTBE im Rahmen der Ganzzellbiotransformation gemacht worden sind.

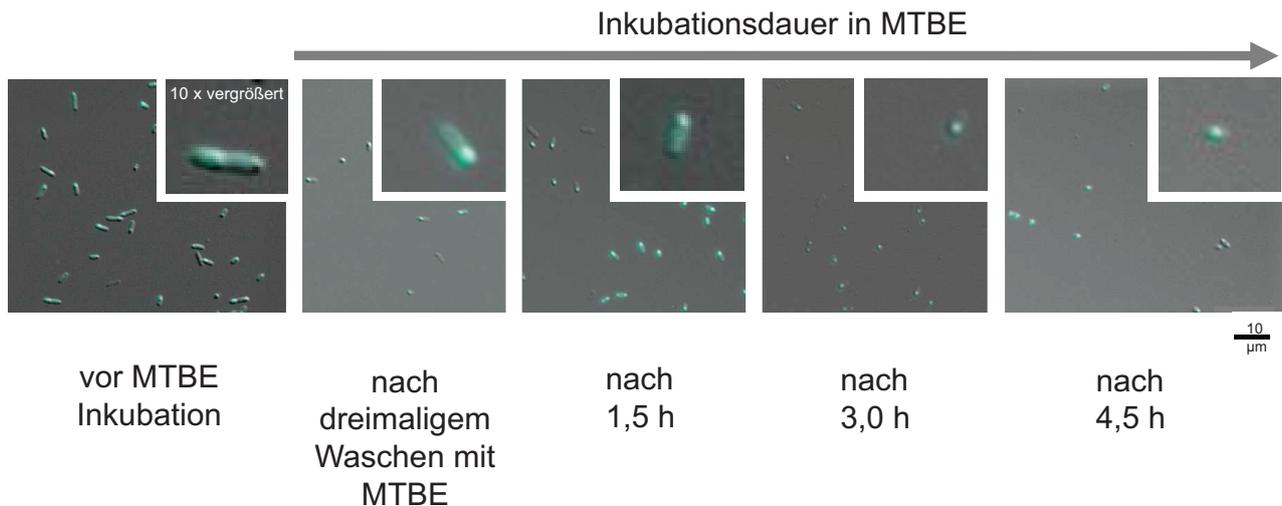


Abbildung 4.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli*-BL21(DE3)-Expressionszellen, welche nFbFP-AtHNL überproduzieren. Hierzu wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vor der Inkubation in MTBE, nach dreimaligem Waschen mit MTBE und während einer 4,5 h Inkubation in MTBE, aufgenommen. Hierbei ist mit fortschreitender Inkubationszeit eine deutliche Verringerung der Zellgröße zu erkennen. Die Zellen erscheinen jedoch selbst nach 4,5 h Inkubation in MTBE intakt. Die Bereiche, welche in jedes Bild integriert sind, stellen eine 10-fache Vergrößerung einer Zelle dar. Sie demonstrieren zusätzlich die fortschreitende Zellverkleinerung.

Des Weiteren legen fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an den entsprechenden fluoreszenten Zellen nahe, dass das Fusionsprotein während der Inkubation in MTBE in der Zelle intakt bleibt. So konnte für Zellen, welche für 4,5 h in MTBE inkubiert wurden, immer noch das klassische FbFP-spezifische Fluoreszenzemissionsspektrum nachgewiesen werden (Abbildung 3.16). Dasselbe gilt für die Funktionalität der AtHNL im entsprechenden Fusionsprotein, da selbst nach 4,5 h Inkubation in MTBE (entspricht fünf Reaktionszyklen) noch nahezu vollständiger Umsatz und hervorragende Enantioselektivitäten nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.13).

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass der Ganzzellbiokatalysator während der Inkubation in MTBE intakt bleibt. Eine Verringerung des Zellumfangs ist zu beobachten. Diese geht jedoch nicht mit dem Verlust enzymatischer Aktivität and Enantioselektivität einher. Fluoreszenzphotometrische Untersuchungen der FbFP-Reporterfluoreszenz ganzer Zellen während der Inkubation in MTBE legen zudem nahe, dass das Fusionsprotein, strukturell intakt in der Zelle vorliegt. Somit erlaubt die Verwendung von fluoreszenten Reporterproteinen eine *in situ*-Überwachung des biokatalytischen Systems. Die Verwendung einer Translationsfusion bestehend aus einem fluoreszenten Reporterprotein und dem zu untersuchenden Enzym ermöglicht zudem funktionelle Untersuchungen, welche mit spektroskopischen Untersuchungen korreliert werden können. Die Kombination beider Methoden eröffnet somit Einblicke in das biokatalytische System, welche mittels klassischer biochemischer Analysen nicht möglich gewesen wären.

4.8 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass sich FbFPs prinzipiell als fluoreszente Fusionspartner in verschiedenen komplexen translationalen Fusionen verwenden lassen. Allerdings besteht, wie für das anfänglich isolierte, wildtypische GFP, in einigen Bereichen Optimierungsbedarf. Die Quantenausbeute der FbFPs ist im Vergleich zu enhanced GFP-Derivaten wie YFP etwa 3,5-fach geringer (Tabelle 3.4). Ein weiterer Nachteil des hier verwendeten FbFPs liegt in seiner dimeren Quartärstruktur. Dies kann, wie in Kapitel 3.7.1 gezeigt zu einer Beeinflussung der nativen Quartärstruktur des Zielenzym führen. Im Fall der erzeugten FbFP-*AtHNL*-Fusionen hat sich diese Eigenschaft unerwarteterweise als vorteilhaft erwiesen, da die entsprechenden Fusionsproteine im Vergleich zu wildtypischen *AtHNL* im schwach sauren pH-Bereich stabiler waren (Tabelle 3.7). Im Hinblick auf eine Anwendung als nicht-invasives Reporterprotein ist dieses Verhalten jedoch als negativ zu bewerten. Bei komplexeren Zielenzymen ist es zudem möglich, dass es aufgrund der FbFP-vermittelten nicht-nativen Oligomerisierung des Fusionsproteins, zu einer Behinderung der Faltung des Fusionsproteins kommt, was letztendlich zur Akkumulation des Proteins in unlöslicher, enzymatisch nicht aktiver Form, führen kann. Durch rationales Proteindesign könnte in diesen Fällen Abhilfe geschaffen werden. Mutagenese-Studien, wie sie in ähnlicher Weise für GFP und dessen Varianten durchgeführt wurden, könnten angewendet werden, um eine Dimerisierung abzuschwächen oder idealerweise komplett auszuschließen.

Aus anwendungstechnischer Sicht liegt, basierend auf den hier vorliegenden Studien, das größte Anwendungspotenzial von FbFPs in der Biokatalyse, insbesondere in der initialen Untersuchung geeigneter Lösungsmittel für Ganzzellbiotransformationen (Lösungsmittel-Screening). Des Weiteren könnten mit Hilfe von FbFP-Fusionsproteinen (und anderer FRPs), in eleganter Weise die Beladung von Immobilisations-Trägermaterialien quantifiziert werden. Diese Trägermaterialien sind mittels klassischer biochemischer Verfahren nur schlecht zu analysieren. Zudem sollten nicht-invasive Fluoreszenz-Mikroskopische Verfahren unter Verwendung konfokaler Optik eine Lokalisierung des Fusionsproteins im Trägermaterial erlauben. Gleichzeitig könnten *leaching*-Phänomene, d.h. das "Ausbluten" des Enzyms vom Trägermaterial beobachtet und quantifiziert werden. Zudem wäre es möglich, mit Hilfe von FRP-Fusionen einen Fermentationsprozess auf erfolgreiche Überproduktion des Zielenzym hin zu untersuchen, ohne die Zellen zerstören zu müssen. Dies würde z.B. eine Normierung auf das gewünschte Expressionslevel, z.B. bei der Verwendung ganzer Zellen als Biokatalysator, erlauben.

Abschließend kann gesagt werden, dass Fluoreszenzreporterverfahren, wie sie heutzutage bereits breite Anwendung in den Lebenswissenschaften finden, prinzipiell in der "Weißen Biotechnologie" in ähnlicher Weise verwendet werden könnten. Insbesondere bei der Analyse unkonventioneller Reaktionssysteme, welche häufig extreme Anforderungen an den verwendeten Biokatalysator stellen, könnten FRPs, in all ihren diversen Ausführungen, zur Analyse von Inaktivierungsphänomenen

beitragen. Solche Untersuchungen könnten zur Prozessoptimierung herangezogen werden und Gleichzeitig die Bereitstellung effizienterer, optimierter und stabilerer Enzyme für die Biokatalyse in unkonventionellen Reaktionsmedien fördern.

5 Anhang

Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit erzeugten Fusionen mit Hexa-Histidin-tag und Thrombin Erkennungssequenz (unterstrichen).

Der Linker-Bereich der betreffenden Fusionen ist in einer anderen Schriftart hervorgehoben. Die Zielenzyme sind **fett** und die FRPs sind *kursiv* hervorgehoben.

Tabelle 5.1: Übersicht der verwendeten AS-Sequenzen.

Bezeichnung	AS-Sequenz
pETnFbFP	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> <i>MVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTG</i> <i>YETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDG</i> <i>TMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDIT</i> <i>KQKEYEKLEDSLTEITALSE*</i>
pETcFbFP	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> <i>MAFQSFQSGIPGQLEVIKALDHVRVGVV</i> <i>ITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTGYETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVD</i> <i>NIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGT</i> <i>TMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDI*</i>
pET28-BsLA	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> MAEHNPVVMVHGIGGASFNFAGIKSYLVSQ GWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVLRSFVQKVLDETGAKKVDIVAH SMGGANTLYYIKNLDGGNKVANVVTLGGANRLTTGKALPGTDPNQKILY TSIYSSADMIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLN GGGQNTN*
nFbFP-BsLA	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> <i>MVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTGY</i> <i>ETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGT</i> <i>MF</i> <i>WNELEIDPMEIEDKTYFVGIQNDIT</i> <i>KQKEYEKLEDSLTEITALSE</i> AEHN PVVMVHGIGGASFNFAGIKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNN GPVLSRFVQKVLDETGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGNKV ANVVTLGGANRLTTGKALPGTDPNQKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDG ARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSGTDPNQKILYTSIYSSADMIVMNYLS RLDGARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLN GGGQNTN*

Bezeichnung	AS-Sequenz
cFbFP- <i>BsLA</i>	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MASAEHNPVVMVHGIGGASFNFAGIK SYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVLRSRVQKVLDETGA KVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGNKVANVVTLGGANRLTTGKALP GTDPNQKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIGLLY SSQVNSLIKEGLNGGGQNTNLMASFQSGIPGQLEVIKKALDHVRV <i>GVVITDPALEDNPVYVNQGFVQMTGYETEEILGKNARFLQGKHTD</i> <i>PAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGTMFWNELNIDPMEIEDKT</i> <i>YFVGIQNDI*</i></p>
nYFP- <i>BsLA</i>	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN <i>GHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGL</i> <i>QCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK</i> <i>FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQK</i> <i>NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSY</i> <i>QSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGGGSGGGSGG</i> GSAEHNPVVMVHGIGGASFNFAGIKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWD KTGTNYNNGPVLRSRVQKVLDETGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIK NLDGGNKVANVVTLGGANRLTTGKALPGTDPNQKILYTSIYSSAD MIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGGQNT*</p>
nFbFP- <i>AtHNL</i>	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MVGVVITDPALEDNPVYVNQGFVQMT <i>GYETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKK</i> <i>DGTMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQKEYEKLEDSLTEIT</i> ALSEMERKHHFVLVHNAYHGAWIWYKPKLPLESAGHRVTAVELAASG IDPRPIQAVETVDEYSKPLIETLKSLPENEEVILVGFSGGINIALAA DIFPAKIKVLVFLNAFLPDTTHVPSHVLDKYMEMPGLGDCEFSSE TRNGTMSLLKMGPKFMKARLYQNCPIEDYELAKMLHRQGSFFTEDLSK KEKFSEEGYGSVQRVYVMSSDKAIPCDFIRWMIDNFNVSKVYEIDGG DHMVMSLKPQKLFDSLAIATDYM*</p>
cFbFP- <i>AtHNL</i>	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MASMERKHHFVLVHNAYHGAWIW YKPKLPLESAGHRVTAVELAASGIDPRPIQAVETVDEYSKPLI ETLKSLPENEEVILVGFSGGINIALAADIFPAKIKVLVFLNA FLPDTTHVPSHVLDKYMEMPGLGDCEFSSETRNGTMSLLKMG PKFMKARLYQNCPIEDYELAKMLHRQGSFFTEDLSKKEKFSE EGYGSVQRVYVMSSDKAIPCDFIRWMIDNFNVSKVYEIDGGD HMVMSLKPQKLFDSLAIATDYMMASFQSGIPGQLEVIKKA <i>LDHVRVGVVITDPALEDNPVYVNQGFVQMTGYETEEILGKNA</i></p>

Bezeichnung	AS-Sequenz
	<p><i>RFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGTMFWNE LNIDPMEIEDKTYFVGIQNDI*</i></p>
nYFP-AtHNL	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MVSKGEELFTGVVPILVELDGDV NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFG YGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT RAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVY IMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQVLADHYQQNTPIGDGPVLL PDNHYSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKG GGSGGGSGGGSMERKHHFVLVHNAYHGAWIWKLPPLLESAGHR VTAVELAASGIDPRPIQAVETVDEYSKPLIETLKSLPENEEVIL VGFSFGGINIALAADIFPAKIKVLVFLNAFLPDTTHVPSHVLDK YMEMPGGLGDCEFSHETRNGTMSLLKMGPKFMKARLYQNCPIE DYELAKMLHRQGSFFTEDLSKKEKFSEEGYGSVQRVYVMSSDKA IPCDFIRWMIDNFVNSKVYEIDGGDHMVMLSKPQKLFDSLAIAT DYM*</p>
nPYP-linker- AtHNL	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MEHVAFGSEDIENTLAKMDDG QLDGLAFGAIQLDGDGNILQYNAAEGDITGRDPKQVIGKNF FKDVAPCTDSPEFYGKFKEGVASGNLNTMFEYTFDYQMTPT KVVKVHMKKALSGDSYWVFKRVGGSGGGSGGGSMERKHHF VLVHNAYHGAWIWKLPPLLESAGHRVTAVELAASGIDPRP IQAVETVDEYSKPLIETLKSLPENEEVILVGFSFGGINIALA ADIFPAKIKVLVFLNAFLPDTTHVPSHVLDKYMEMPGLGDC EFSSHETRNGTMSLLKMGPKFMKARLYQNCPIEDYELAKMLH RQGSFFTEDLSKKEKFSEEGYGSVQRVYVMSSDKAIPCDFIR WMIDNFVNSKVYEIDGGDHMVMLSKPQKLFDSLAIATDYM*</p>
nFbFP- PfbAL	<p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u>MVGVVITDPALEDNPVYVNQGFVQMT GYETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKK DGTMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQKEYEKLLEDLSLTEIT ALSEMAMITGGELVVRTLKAGVEHLFGLHGAHIDTIFQAACLDHDVP IIDTRHEAAAGHAAEGYARAGAKLGVALVTAGGGFTNAVTPIANAWL DRTPVLFVTGSGALRDEETNTLQAGIDQVAMAAPITKWAHRVMATEH IPRLVMQAIRAALSAPRGPVLLDLPWDILMNQIDEDSVIIPDLVLSA HGARPDPADLDQALALLRKAERPVIVLGSEASRTARKTALSAFVAAT GVPVFADYEGLSMLSGLPDAMRGLVQNLVSFAKADAAPDLVLMMLGA RFGLNTGHGSGQLIPHSQVIQVDPDACELGRLQGIALGIVADVGGT</p>

Bezeichnung	AS-Sequenz
	<p>IEALAQATAQDAAWPDRGDWCAKVTDLAQERYASIAAKSSSEHALHP FHASQVIAKHVDAGVTVVADGALTYLWLSEVMSRVKPGGFLCHGYLG SMGVGFGTALGAQVADLEAGRRTILVTGDGSVGYSIGEFDTLVRKQL PLIVIIIMNNQSWGATLHFQQLAVGPNRVTGTRLENGSYHGVAAAF DGYHVDSVESFSAALAQALAHNRPACINVAVALDPIPEELILIGMD PFA*</p>
cFbFP- PfBAL	<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMAMITGGELVVRTLKAGVEHL FGLHGAHIDTIFQAACLDHDVPIIDTRHEAAAGHAAEGYARAGAKL GVALVTAGGGFTNAVTPIANAWLDRTPVFLTGTSGALRDETNTL QAGIDQVAMAAPITKWAHRVMATEHIPRLVMQAIRAALSAPRGPV LLDLPWDILMNQIDEDSVIIPDLVLSAHGARPDPADLDQALALLR KAERPVIVLGSEASRTARKTALSFAVAATGVPVFADYEGLSMLSG LPDAMRGGLVQNLVSFAKADAAPDLVLMGARFGLNTGHGSGQLI PHSAQVIQVDPDACELGRLQGIALGIVADVGGTIEALAQATAQDAA WPDRGDWCAKVTDLAQERYASIAAKSSSEHALHPFHASQVIAKHVDA GVTVVADGALTYLWLSEVMSRVKPGGFLCHGYLGSMGVGFGTALGA QVADLEAGRRTILVTGDGSVGYSIGEFDTLVRKQLPLIVIIIMNNQ SWGATLHFQQLAVGPNRVTGTRLENGSYHGVAAAFADGYHVDSVE SFSAAALAHNRPACINVAVALDPIPEELILIGMDPFAMASFQ SFGIPGQLEVIKKALDHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTG YETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKPEVTVQIQNYKK DGTMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDI*</p>
cYFP-PfBAL	<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVN GHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYG LQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMA DKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY LSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGGGSGGG SGGGSMAMITGGELVVRTLKAGVEHLFGLHGAHIDTIFQAACLDHD VPIIDTRHEAAAGHAAEGYARAGAKLGVALVTAGGGFTNAVTPIAN AWLDRTPVFLTGTSGALRDETNTLQAGIDQVAMAAPITKWAHRVM ATEHIPRLVMQAIRAALSAPRGPVLLDLPWDILMNQIDEDSVIIPD LVLSAHGARPDPADLDQALALLRKAERPVIVLGSEASRTARKTALS AFVAATGVPVFADYEGLSMLSGLPDAMRGGLVQNLVSFAKADAAPD LVLMGARFGLNTGHGSGQLIPHS AQVIQVDPDACELGRLQGIALG</p>

Bezeichnung	AS-Sequenz
	IVADVGGTIEALAQATAQDAAWPDRGDWCAKVTDLAQERYASIAAK SSSEHALHPFHASQVIAKHVDAGVTVVADGALTYLWLSEVMSRVKP GGFLCHGYLGSMGVGFGTALGAQVADLEAGRRTILVTGDGSVGYSIG EFDTLVRKQLPLIVIIMNNQSWGATLHFQQLAVGPNRVTGTRLENGS YHGVAAAFAGADGYHVDSVESFSAALAQALAHNRPACINVAVALDPIP PEELILIGMDPFA*

Literaturverzeichnis

- [1] J. Bostock and H.T. Riley. *The natural history of Pliny*, volume 4. HG Bohn, 1856.
- [2] Marine Resources Service (United Nations). *Review of the state of world marine fishery resources*. Number 457. Food & Agriculture Org, 2005.
- [3] G.G. Stokes. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142:463–562, 1852.
- [4] O. Shimomura, F.H. Johnson, and Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223–239, 1962.
- [5] H. Morise, O. Shimomura, F.H. Johnson, and J. Winant. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13(12):2656–2662, 1974.
- [6] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994.
- [7] J.K.M. Sanders and S.E. Jackson. The discovery and development of the green fluorescent protein, GFP. *Chemical Society Reviews*, 38(10):2821–2822, 2009.
- [8] M. Ehrenberg. The green fluorescent protein: discovery, expression and development. *Information Department of the Royal Swedish Academy of Sciences*, 2008.
- [9] P. Bülow. The ONPG-test in diagnostic bacteriology. Methodical investigations. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 60:376, 1964.
- [10] J.H. Miller. *Experiments in molecular genetics*, volume 60. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY:, 1972.
- [11] K.E. Langley, M.R. Villarejo, A.V. Fowler, P.J. Zamenhof, and I. Zabin. Molecular basis of β -galactosidase α -complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(4):1254, 1975.

- [12] K.H. Young. Yeast two-hybrid: so many interactions,(in) so little time... *Biology of Reproduction*, 58(2):302–311, 1998.
- [13] J.K. Joung, E.I. Ramm, and C.O. Pabo. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein–DNA and protein–protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13):7382, 2000.
- [14] R.D. Gietz, B. Triggs-Raine, A. Robbins, K.C. Graham, and R.A. Woods. Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 172(1):67–79, 1997.
- [15] S.J. Holt and P.W. Sadler. Studies in enzyme cytochemistry. Relationships between solubility, molecular association and structure in indigoid dyes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 148(933):495–505, 1958.
- [16] WV Shaw. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods in Enzymology*, 43:737, 1975.
- [17] R.A. Jefferson, S.M. Burgess, and D. Hirsh. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22):8447, 1986.
- [18] M. Hampf and M. Gossen. A protocol for combined *Photinus* and *Renilla* luciferase quantification compatible with protein assays. *Analytical Biochemistry*, 356(1):94–99, 2006.
- [19] A.T.R. Williams, S.A. Winfield, and J.N. Miller. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst*, 108(1290):1067–1071, 1983.
- [20] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, and M.J. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229, 1992.
- [21] M. Chalfie and S. Kain. *Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols*, volume 47. Wiley-Liss, 2006.
- [22] R. Heim, A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516):663–664, 1995.
- [23] M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, and S.J. Remington. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280):1392–1395, 1996.
- [24] M. Chalfie. Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 62(4):651–656, 1995.

- [25] S. Inouye and F.I. Tsuji. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*, 341(2):277–280, 1994.
- [26] C.N. Stewart. Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotechnology*, 24(4):155–162, 2006.
- [27] M.V. Matz, K.A. Lukyanov, and S.A. Lukyanov. Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays*, 24(10):953–959, 2002.
- [28] R. Heim and R.Y. Tsien. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6(2):178–182, 1996.
- [29] A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, and R.Y. Tsien. Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5):2135, 1999.
- [30] R.Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1):509–544, 1998.
- [31] T. Nagai, K. Ibata, E.S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, and A. Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, 20(1):87–90, 2002.
- [32] N.C. Shaner, P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12):905–909, 2005.
- [33] O. Zapata-Hommer and O. Griesbeck. Efficiently folding and circularly permuted variants of the sapphire mutant of GFP. *BMC Biotechnology*, 3(1):5, 2003.
- [34] V.V. Verkhusha and K.A. Lukyanov. The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature Biotechnology*, 22(3):289–296, 2004.
- [35] M.V. Matz, A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zaraisky, M.L. Markelov, and S.A. Lukyanov. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology*, 17(10):969–973, 1999.
- [36] D. Shcherbo, E.M. Merzlyak, T.V. Chepurnykh, A.F. Fradkov, G.V. Ermakova, E.A. Solovieva, K.A. Lukyanov, E.A. Bogdanova, A.G. Zaraisky, S. Lukyanov, and D.M. Chudakov. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature Methods*, 4(9):741–746, 2007.
- [37] U.K. Wiegand, R.R. Duncan, J. Greaves, R.H. Chow, M.J. Shipston, and D.K. Apps. Red, yellow, green go!—A novel tool for microscopic segregation of secretory vesicle pools according to their age. *Biochemical Society Transactions*, 31(4):851–856, 2003.

- [38] R. Mirabella, C. Franken, G.N.M. Van Der Krogt, T. Bisseling, and R. Geurts. Use of the fluorescent timer DsRED-E5 as reporter to monitor dynamics of gene activity in plants. *Plant Physiology*, 135(4):1879–1887, 2004.
- [39] S. Cabantous, T.C. Terwilliger, and G.S. Waldo. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 23(1):102–107, 2004.
- [40] D.M. Chudakov, S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov. Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends in Biotechnology*, 23(12):605–613, 2005.
- [41] G.S. Waldo, B.M. Standish, J. Berendzen, and T.C. Terwilliger. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 17(7):691–695, 1999.
- [42] B.N.G. Giepmans, S.R. Adams, M.H. Ellisman, and R.Y. Tsien. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science's STKE*, 312(5771):217, 2006.
- [43] J. Yu, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, and X.S. Xie. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*, 311(5767):1600–1603, 2006.
- [44] T. Drepper, R. Huber, A. Heck, F. Circolone, A.K. Hillmer, J. Büchs, and K.-E. Jaeger. Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17):5990–5994, 2010.
- [45] J.D. Thomas, R.A. Daniel, J. Errington, and C. Robinson. Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (TAT) pathway in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 39(1):47–53, 2001.
- [46] M. Zimmer. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Review*, 102(3):759–781, 2002.
- [47] A.B. Cubitt, R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross, and R.Y. Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11):448–455, 1995.
- [48] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [49] L. Stryer. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual Review of Biochemistry*, 47(1):819–846, 1978.

- [50] K. Truong and M. Ikura. The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes *in vivo*. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5):573–578, 2001.
- [51] K. Deuschle, B. Chaudhuri, S. Okumoto, I. Lager, S. Lalonde, and W.B. Frommer. Rapid metabolism of glucose detected with FRET glucose nanosensors in epidermal cells and intact roots of *Arabidopsis* RNA-silencing mutants. *The Plant Cell Online*, 18(9):2314–2325, 2006.
- [52] J. Wang. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2):814, 2008.
- [53] J.E. Dover, G.M. Hwang, E.H. Mullen, B.C. Prorok, and S.J. Suh. Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1):10–19, 2009.
- [54] L.L. Looger, S. Lalonde, and W.B. Frommer. Genetically encoded FRET sensors for visualizing metabolites with subcellular resolution in living cells. *Plant Physiology*, 138(2):555–557, 2005.
- [55] X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, and Y. Sun. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620(1):8–26, 2008.
- [56] M.J. McLachlan, J.A. Katzenellenbogen, and H. Zhao. A new fluorescence complementation biosensor for detection of estrogenic compounds. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12):2794–2803, 2011.
- [57] G. Miesenböck, D.A. De Angelis, and J.E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689):192–195, 1998.
- [58] S. Jayaraman, P. Haggie, R.M. Wachter, S.J. Remington, and A.S. Verkman. Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9):6047, 2000.
- [59] T. Pozzan. Protein–protein interactions: Calcium turns turquoise into gold. *Nature*, 388(6645):834–835, 1997.
- [60] J.M. Kendall and M.N. Badminton. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends in Biotechnology*, 16(5):216–224, 1998.
- [61] K.K. Jensen, L. Martini, and T.W. Schwartz. Enhanced fluorescence resonance energy transfer between spectral variants of green fluorescent protein through zinc-site engineering. *Biochemistry*, 40(4):938–945, 2001.
- [62] F.S. Wouters, P.J. Verveer, and P.I.H. Bastiaens. Imaging biochemistry inside cells. *Trends in Cell Biology*, 11(5):203–211, 2001.

- [63] J.C. March, G. Rao, and W.E. Bentley. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4):303–315, 2003.
- [64] F.F. Roberto, J.M. Barnes, and D.F. Bruhn. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta*, 58(1):181–188, 2002.
- [65] M.K. Habib. Controlled biological and biomimetic systems for landmine detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(1):1–18, 2007.
- [66] M. Boorsma, S. Hoenke, A. Marrero, R. Fischer, J.E. Bailey, W.A. Renner, and M.F. Bachmann. Bioprocess applications of a sindbis virus-based temperature-inducible expression system. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(6):602–609, 2002.
- [67] S. Daabrowski, A. Brillowska, and J. Kur. Use of the green fluorescent protein variant (YFP) to monitor MetArg human proinsulin production in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 16(2):315–323, 1999.
- [68] C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J.R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer, and C.A.M. Seidel. Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *Journal of Biotechnology*, 86(3):163–180, 2001.
- [69] J. Li, H. Xu, W.K. Herber, W.E. Bentley, and G. Rao. Integrated bioprocessing in *Saccharomyces cerevisiae* using green fluorescent protein as a fusion partner. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(6):682–693, 2002.
- [70] A.R. Lara, E. Galindo, O.T. Ramírez, and L.A. Palomares. Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular Biotechnology*, 34(3):355–381, 2006.
- [71] D. Huh and J. Paulsson. Non-genetic heterogeneity from stochastic partitioning at cell division. *Nature Genetics*, 43(2):95–100, 2010.
- [72] G. Nebe-von Caron, P.J. Stephens, C.J. Hewitt, J.R. Powell, and R.A. Badley. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1):97–114, 2000.
- [73] H.M. Davey and D.B. Kell. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*, 60(4):641–696, 1996.
- [74] C. Lange, N. Mustafi, J. Frunzke, N. Kennerknecht, M. Wessel, M. Bott, and V.F. Wendisch. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the *brnFE* operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids. *Journal of Biotechnology*, 158(4):231–241, 2012.

- [75] N. Mustafi, A. Grünberger, D. Kohlheyer, M. Bott, and J. Frunzke. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metabolic Engineering*, 14(4):449–457, 2012.
- [76] R.H. Newman, M.D. Fosbrink, and J. Zhang. Genetically-encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chemical Reviews*, 111(5):3614, 2011.
- [77] T. Drepper, T. Eggert, F. Circolone, A. Heck, U. Krauss, J.K. Guterl, M. Wendorff, A. Losi, W. Gärtner, and K.-E. Jaeger. Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nature Biotechnology*, 25(4):443–445, 2007.
- [78] R.E. Dale, J. Eisinger, and W.E. Blumberg. The orientational freedom of molecular probes. the orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophysical Journal*, 26(2):161–193, 1979.
- [79] P.H. Quail. The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1374):1399–1403, 1998.
- [80] M. Gomelsky and G. Klug. BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10):497–500, 2002.
- [81] M. Spehr and S.D. Munger. Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *Journal of Neurochemistry*, 109(6):1570–1583, 2009.
- [82] W. Haupt. Phototaxis in plants. *International Review of Cytology*, 19:267–299, 1966.
- [83] M.A. van der Horst and K.J. Hellingwerf. Photoreceptor proteins, star actors of modern times: a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Accounts of Chemical Research*, 37(1):13–20, 2004.
- [84] P.J. Aphalo, C.L. Ballaré, and A.L. Scopel. Plant-plant signalling, the shade-avoidance response and competition. *Journal of Experimental Botany*, 50(340):1629–1634, 1999.
- [85] J.J. Casal. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 71(1):1–11, 2000.
- [86] H. Smith. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature*, 407(6804):585–591, 2000.
- [87] J. Hughes, T. Lamparter, F. Mittmann, E. Hartmann, W. Gärtner, A. Wilde, and T. Börner. A prokaryotic phytochrome. *Nature*, 386(6626):663–663, 1997.

- [88] A. Losi. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3(6):566–574, 2004.
- [89] A. Espíndola, S. Buerki, M. Bedalov, P. Küpfer, and N. Alvarez. New insights into the phylogenetics and biogeography of *Arum* (*Araceae*): unravelling its evolutionary history. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163(1):14–32, 2010.
- [90] M. Ikeuchi and T. Ishizuka. Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7(10):1159–1167, 2008.
- [91] R. Tasler, T. Moises, and N. Frankenberg-Dinkel. Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Journal*, 272(8):1927–1936, 2005.
- [92] X. Shu, A. Royant, M.Z. Lin, T.A. Aguilera, V. Lev-Ram, P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science*, 324(5928):804–807, 2009.
- [93] G.S. Filonov, K.D. Piatkevich, L.M. Ting, J. Zhang, K. Kim, and V.V. Verkhusha. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nature Biotechnology*, 29(8):757–761, 2011.
- [94] X. Shu, V. Lev-Ram, T.J. Deerinck, Y. Qi, E.B. Ramko, M.W. Davidson, Y. Jin, M.H. Ellisman, and R.Y. Tsien. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biology*, 9(4):e1001041, 2011.
- [95] M. Kumauchi, M.T. Hara, P. Stalcup, A. Xie, and W.D. Hoff. Identification of six new photoactive yellow proteins-diversity and structure–function relationships in a bacterial blue light photoreceptor. *Photochemistry and Photobiology*, 84(4):956–969, 2008.
- [96] W.W. Sprenger, W.D. Hoff, J.P. Armitage, and K.J. Hellingwerf. The eubacterium *Ectothiorhodospira halophila* is negatively phototactic, with a wavelength dependence that fits the absorption spectrum of the photoactive yellow protein. *Journal of Bacteriology*, 175(10):3096–3104, 1993.
- [97] E.C. Hoffman, H. Reyes, F.F. Chu, F. Sander, L.H. Conley, B.A. Brooks, and O. Hankinson. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, 252(5008):954–958, 1991.
- [98] J.R. Nambu, J.O. Lewis, K.A. Wharton, and S.T. Crews. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, 67(6):1157–1167, 1991.

- [99] Y.Z. Gu, J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1):519–561, 2000.
- [100] N.C. Rockwell and J.C. Lagarias. The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *The Plant Cell Online*, 18(1):4–14, 2006.
- [101] A. Möglich and K. Moffat. Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *Journal of Molecular Biology*, 373(1):112–126, 2007.
- [102] E.D. Getzoff, K.N. Gutwin, and U.K. Genick. Anticipatory active-site motions and chromophore distortion prime photoreceptor pyp for light activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(8):663–668, 2003.
- [103] W.D. Hoff, B. Devreese, R. Fokkens, I.M. Nugteren-Roodzant, J. Van Beeumen, N. Nibbering, and K.J. Hellingwerf. Chemical reactivity and spectroscopy of the thiol ester-linked p-coumaric acid chromophore in the photoactive yellow protein from *Ectothiorhodospira halophila*. *Biochemistry*, 35(4):1274–1281, 1996.
- [104] T.E. Meyer, S. Devanathan, T. Woo, E.D. Getzoff, G. Tollin, and M.A. Cusanovich. Site-specific mutations provide new insights into the origin of ph effects and alternative spectral forms in the photoactive yellow protein from *Halorhodospira halophila*. *Biochemistry*, 42(11):3319–3325, 2003.
- [105] Y. Imamoto, Y. Shirahige, F. Tokunaga, T. Kinoshita, K. Yoshihara, and M. Kataoka. Low-temperature fourier transform infrared spectroscopy of photoactive yellow protein. *Biochemistry*, 40(30):8997–9004, 2001.
- [106] T.E. Meyer. Isolation and characterization of soluble cytochromes, ferredoxins and other chromophoric proteins from the halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halophila*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 806(1):175–183, 1985.
- [107] W.D. Hoff, P. Dux, K. Hard, B. Devreese, I.M. Nugteren-Roodzant, W. Crielaard, R. Boelens, R. Kaptein, J.V. Beeumen, and K.J. Hellingwerf. Thiol ester-linked p-coumaric acid as a new photoactive prosthetic group in a protein with rhodopsin-like photochemistry. *Biochemistry*, 33(47):13959–13962, 1994.
- [108] M.E. Van Brederode, T. Gensch, W.D. Hoff, K.J. Hellingwerf, and S.E. Braslavsky. Photoinduced volume change and energy storage associated with the early transformations of the photoactive yellow protein from *Ectothiorhodospira halophila*. *Biophysical Journal*, 68(3):1101–1109, 1995.

- [109] J.S. Khan, Y. Imamoto, Y. Yamazaki, M. Kataoka, F. Tokunaga, and M. Terazima. A biosensor in the time domain based on the diffusion coefficient measurement: intermolecular interaction of an intermediate of photoactive yellow protein. *Analytical Chemistry*, 77(20):6625–6629, 2005.
- [110] A. Losi, E. Polverini, B. Quest, and W. Gärtner. First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophysical Journal*, 82(5):2627–2634, 2002.
- [111] W.R. Briggs and J.M. Christie. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, 7(5):204–210, 2002.
- [112] T. Kinoshita, M. Doi, N. Suetsugu, T. Kagawa, M. Wada, and K. Shimazaki. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 414(6864):656–660, 2001.
- [113] T. Sakai, T. Kagawa, M. Kasahara, T.E. Swartz, J.M. Christie, W.R. Briggs, M. Wada, and K. Okada. *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12):6969, 2001.
- [114] E. Huala, P.W. Oeller, E. Liscum, I.S. Han, E. Larsen, and W.R. Briggs. *Arabidopsis* nph1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 278(5346):2120, 1997.
- [115] U. Krauss, B.Q. Minh, A. Losi, W. Gärtner, T. Eggert, A. Von Haeseler, and K.-E. Jaeger. Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *Journal of Bacteriology*, 191(23):7234–7242, 2009.
- [116] J.M. Christie, P. Reymond, G.K. Powell, P. Bernasconi, A.A. Raibekas, E. Liscum, and W.R. Briggs. *Arabidopsis* nph1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, 282(5394):1698–1701, 1998.
- [117] S. Crosson, S. Rajagopal, and K. Moffat. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, 42(1):2–10, 2003.
- [118] J.M. Christie. Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58:21–45, 2007.
- [119] L. Aravind and E.V. Koonin. The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Current Biology*, 10(2):53–55, 2000.
- [120] M. Avila-Pérez, J. Vreede, Y. Tang, O. Bende, A. Losi, W. Gärtner, and K. Hellingwerf. *In vivo* mutational analysis of YtvA from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37):24958–24964, 2009.

- [121] T.M. John, S. Crosson, M. Gauden, I.H.M. van Stokkum, K. Moffat, and R. van Grondelle. Primary reactions of the LOV2 domain of phototropin, a plant blue-light photoreceptor. *Biochemistry*, 42(12):3385–3392, 2003.
- [122] T.E. Swartz, S.B. Corchnoy, J.M. Christie, J.W. Lewis, I. Szundi, W.R. Briggs, and R.A. Bogomolni. The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39):36493–36500, 2001.
- [123] A. Losi, E. Ghirdelli, S. Jansen, and W. Gärtner. Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA. *Photochemistry and Photobiology*, 81(5):1145–1152, 2005.
- [124] A. Losi. Flavin-based blue-light photosensors: A photobiophysics update. *Photochemistry and Photobiology*, 83(6):1283–1300, 2007.
- [125] M. Kasahara, T.E. Swartz, M.A. Olney, A. Onodera, N. Mochizuki, H. Fukuzawa, E. Asamizu, S. Tabata, H. Kanegae, and M. Takano. Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 129(2):762–773, 2002.
- [126] A.J. Twarowski and L. Good. Phosphorescence quenching by molecular oxygen: zinc tetraphenylporphin on solid supports. *Journal of Physical Chemistry*, 91(20):5252–5257, 1987.
- [127] D. Tielker, I. Eichhof, K.-E. Jaeger, and J.F. Ernst. Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 8(6):913–915, 2009.
- [128] L.A. Lobo, C.J. Smith, and E.R. Rocha. Flavin mononucleotide (FMN)-based fluorescent protein (FbFP) as reporter for gene expression in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 317(1):67–74, 2011.
- [129] S. Chapman, C. Faulkner, E. Kaiserli, C. Garcia-Mata, E.I. Savenkov, A.G. Roberts, K.J. Oparka, and J.M. Christie. The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50):20038–20043, 2008.
- [130] H.J. Cha, C.F. Wu, J.J. Valdes, G. Rao, and W.E. Bentley. Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: monitoring protein expression and solubility. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5):565–574, 2000.
- [131] O.L. Moritz, B.M. Tam, D.S. Papermaster, and T. Nakayama. A functional rhodopsin-green fluorescent protein fusion protein localizes correctly in transgenic xenopus laevis retinal rods

- and is expressed in a time-dependent pattern. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30):28242–28251, 2001.
- [132] D.L. Spector and R.D. Goldman. Constructing and expressing GFP fusion proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(7):pdb-prot4649, 2006.
- [133] J. Andexer, J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, and M. Pohl. An *R*-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -hydrolase fold. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(45):8679–8681, 2007.
- [134] B. Gonzalez and R. Vicuña. Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PPI-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I. *Journal of Bacteriology*, 171(5):2401–2405, 1989.
- [135] S.H. Lee, J.I. Choi, S.J. Park, S.Y. Lee, and B.C. Park. Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using fadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9):5074–5080, 2004.
- [136] R. Gupta, N. Gupta, and P. Rathi. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6):763–781, 2004.
- [137] B. Joseph, P.W. Ramteke, and G. Thomas. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, 26(5):457–470, 2008.
- [138] G.M. Whitesides and C.H. Wong. Enzyme in der organischen Synthese. *Angewandte Chemie*, 97(8):617–638, 1985.
- [139] M.H. Lee, C.H. Lee, T.K. Oh, J.K. Song, and J.H. Yoon. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11):7406–7409, 2006.
- [140] U.T. Bornscheuer and R.J. Kazlauskas. *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. VCH Verlagsgesellschaft MbH, 2006.
- [141] R.D. Schmid and R. Verger. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie, International Edition*, 37(12):1608–1633, 1998.
- [142] K.-E. Jaeger and T. Eggert. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):390–397, 2002.
- [143] O. Kirk, T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):345–351, 2002.

- [144] R.J. Kazlauskas and H.K. Weber. Improving hydrolases for organic synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(1):121–126, 1998.
- [145] E. Rogalska, I. Douchet, and R. Verger. Microbial lipases: structures, function and industrial applications. *Biochemical Society Transactions*, 25(1):161, 1997.
- [146] D.C. Demirjian, F. Morís-Varas, and C.S. Cassidy. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2):144–151, 2001.
- [147] B. Van Den Burg. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3):213–218, 2003.
- [148] P.F. Fox and P.L.H. McSweeney. Cheese: an overview. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1:1–18, 2004.
- [149] R.D. Schmid. *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Wiley-VCH, 2002.
- [150] A. Houde, A. Kademi, and D. Leblanc. Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1):155–170, 2004.
- [151] M. Salameh and J. Wiegel. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*, 61:253–283, 2007.
- [152] J. Polaina and A.P. MacCabe. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer Verlag, 2007.
- [153] R.E. Andersson, C.B. Hedlund, and U. Jonsson. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 62(3):361–367, 1979.
- [154] M.E.M. Noble, A. Cleasby, L.N. Johnson, M.R. Egmond, and L.G.J. Frenken. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Letters*, 331(1-2):123–128, 1993.
- [155] J.D. Schrag, Y. Li, S. Wu, and M. Cygler. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351(6329):761, 1991.
- [156] F. Schønheyder and K. Volqvartz. Studies on the lipolytic enzyme action I. kinetics of pancreatic lipase activity on an ester in homogeneous aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 6:147–165, 1951.
- [157] L. Sarda and P. Desnuelle. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30(3):513–521, 1958.

- [158] M. Nardini and B.W. Dijkstra. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6):732–737, 1999.
- [159] R. Verger, GH De Haas, L. Sarda, and P. Desnuelle. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 188(2):272–282, 1969.
- [160] B. Franken, K.-E. Jaeger, and J. Pietruszka. *Screening for Enantioselective Enzymes*. Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [161] R.C. Lawrence, T.F. Fryer, and B. Reiter. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature*, 213:1264–1265, 1967.
- [162] V. Maurich, M. Moneghini, M. Zacchigna, A. Pitotti, and E. Lencioni. High-performance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9(5):427–431, 1991.
- [163] V. Maurich, M. Zacchigna, and A. Pitotti. *p*-nitrophenyllaurate: a substrate for the high-performance liquid chromatographic determination of lipase activity. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 566(2):453–459, 1991.
- [164] G. DeSantis, K. Wong, B. Farwell, K. Chatman, Z. Zhu, G. Tomlinson, H. Huang, X. Tan, L. Bibbs, P. Chen, K. Kretz, and M.J. Burk. Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis. *Journal of the American Chemical Society*, 125(38):11476–11477, 2003.
- [165] O. Trapp. High-throughput monitoring of interconverting stereoisomers and catalytic reactions. *Chimica Oggi*, 26(5):26–28, 2008.
- [166] M.T. Reetz. Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16):5716, 2004.
- [167] T.L. de Monpezat, B. de Jeso, J.L. Butour, L. Chavant, and M. Sancholle. A fluorimetric method for measuring lipase activity based on umbelliferyl esters. *Lipids*, 25(10):661–664, 1990.
- [168] J.L. Reymond, V.S. Fluxà, and N. Maillard. Enzyme assays. *Chemical Communications*, 34(1):34–46, 2009.
- [169] E. Henke and U.T. Bornscheuer. Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of

- mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biological Chemistry*, 380(7-8):1029–1033, 2005.
- [170] U.K. Winkler and M. Stuckmann. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3):663–670, 1979.
- [171] M. Abramic, I. Lescic, T. Korica, L. Vitale, W. Saenger, and J. Pigac. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(6):522–529, 1999.
- [172] M. Sharma, N.N. Sharma, and T.C. Bhalla. Hydroxynitrile lyases: at the interface of biology and chemistry. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3):279–294, 2005.
- [173] T. Purkarthofer, W. Skranc, C. Schuster, and H. Griengl. Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2):309–320, 2007.
- [174] E.E. Conn. Cyanogenic compounds. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1):433–451, 1980.
- [175] J. Holt and U. Hanefeld. Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins. *Current Organic Synthesis*, 6(1):15–37, 2009.
- [176] R. Ikan. *Naturally occurring glycosides*. John Wiley & Sons, 1999.
- [177] A. Nahrstedt. Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Plant Systematics and Evolution*, 150(1):35–47, 1985.
- [178] A. Hickel, M. Hasslacher, and H. Griengl. Hydroxynitrile lyases: functions and properties. *Physiologia Plantarum*, 98(4):891–898, 1996.
- [179] G.W. Butler and E.E. Conn. Biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin. *Journal of Biological Chemistry*, 239(6):1674, 1964.
- [180] J. Vetter. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38(1):11–36, 2000.
- [181] M. Frehner and E.E. Conn. The linamarin β -glucosidase in Costa Rican wild lima beans (*Phaseolus lunatus L.*) is apoplasmic. *Plant Physiology*, 84(4):1296, 1987.
- [182] J.M. McMahon, W.L.B. White, and R.T. Sayre. Review article. *Journal of Experimental Botany*, 46(7):731–741, 1995.

- [183] I. Dreveny, C. Kratky, and K. Gruber. The active site of hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*: modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Science*, 11(2):292–300, 2002.
- [184] A. Hickel, M. Graupner, D. Lehner, A. Hermetter, O. Glatter, and H. Griengl. Stability of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: a fluorescence and dynamic light scattering study. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(5):361–366, 1997.
- [185] H. Breithaupt, M. Pohl, W. Bönigk, P. Heim, K.L. Schimz, and M.R. Kula. Cloning and expression of (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum* (flax). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6(3):315–332, 1999.
- [186] H. Wajant, K.W. Mundry, and K. Pfizenmaier. Molecular cloning of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* (L.). Homologies to serine carboxypeptidases. *Plant Molecular Biology*, 26(2):735–746, 1994.
- [187] H. Lauble, B. Miehl, S. Förster, H. Wajant, and F. Effenberger. Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with acetone cyanohydrin. *Protein Science*, 10(5):1015–1022, 2001.
- [188] H. Wajant, S. Forster, D. Selmar, F. Effenberger, and K. Pfizenmaier. Purification and characterization of a novel (*R*)-mandelonitrile lyase from the fern *Phlebodium aureum*. *Plant Physiology*, 109(4):1231–1238, 1995.
- [189] U. Wäspi, B. Misteli, M. Hasslacher, A. Jandrositz, S.D. Kohlwein, H. Schwab, and R. Dudler. The defense-related rice gene *Pir7b* encodes an α/β hydrolase fold protein exhibiting esterase activity towards naphthol as-esters. *European Journal of Biochemistry*, 254(1):32–37, 1998.
- [190] J.K. Guterl, J.N. Andexer, T. Sehl, J. von Langermann, I. Frindi-Wosch, T. Rosenkranz, J. Fitter, K. Gruber, U. Kragl, T. Eggert, and M. Pohl. Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold. *Journal of Biotechnology*, 141(3-4):166–173, 2009.
- [191] T. Ueatrongchit, H. Komeda, Y. Asano, et al. Parameters influencing asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile by a novel (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Eriobotrya japonica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4):208–214, 2009.
- [192] M. Schmidt and H. Griengl. *Oxynitrilases: from cyanogenesis to asymmetric synthesis*. Springer, 1999.
- [193] D. Okrob, M. Paravidino, R.V.A. Orru, W. Wiechert, U. Hanefeld, and M. Pohl. Hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of reaction parameters for enantiopure

- cyanohydrin synthesis by pure and immobilized catalyst. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(13):2399–2408, 2011.
- [194] D. Okrob, J. Metzner, W. Wiechert, K. Gruber, and M. Pohl. Tailoring a stabilized variant of hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*. *ChemBioChem*, 13(6):797, 2012.
- [195] B. Gonzalez, A. Merino, M. Almeida, and R. Vicuña. Comparative growth of natural bacterial isolates on various lignin-related compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6):1428–1432, 1986.
- [196] T.G. Mosbacher, M. Müller, and G.E. Schulz. Structure and mechanism of the thdp-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *FEBS Journal*, 272(23):6067–6076, 2005.
- [197] A.S. Demir, M. Pohl, E. Janzen, and M. Müller. Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage. *Journal of the Chemical Society*, (7):633–635, 2001.
- [198] D. Dobritzsch, S. König, G. Schneider, and G. Lu. High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32):20196–20204, 1998.
- [199] H. Iding, T. Dünwald, L. Greiner, A. Liese, M. Müller, P. Siegert, J. Grötzinger, A.S. Demir, and M. Pohl. Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *Chemistry-A European Journal*, 6(8):1483–1495, 2000.
- [200] F. Jordan. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Natural Product Reports*, 20(2):184–201, 2003.
- [201] T. Stillger, M. Bönitz, M. Villela Filho, and A. Liese. Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren. *Chemie Ingenieur Technik*, 74(7):1035–1039, 2002.
- [202] O.P. Ward and A. Singh. Enzymatic asymmetric synthesis by decarboxylases. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(6):520–526, 2000.
- [203] P.D. de María, T. Stillger, M. Pohl, S. Wallert, K. Drauz, H. Gröger, H. Trauthwein, and A. Liese. Preparative enantioselective synthesis of benzoin and (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(1):43–47, 2006.
- [204] A. Kuboki, T. Yamamoto, M. Taira, T. Arishige, and S. Ohira. Total synthesis of nitidanin and novel procedures for determination of the location of the side chains on 1, 4-benzodioxane. *Tetrahedron Letters*, 48(5):771–774, 2007.

- [205] E. Janzen, M. Müller, D. Kolter-Jung, M.M. Kneen, M.J. McLeish, and M. Pohl. Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C–C bond formation. *Bioorganic Chemistry*, 34(6):345–361, 2006.
- [206] T.W. Schmidt. *Experimentelle Analyse, Modellierung und biochemische Charakterisierung von Ein- und Zweiphasenreaktionen für die technische Biokatalyse*. PhD thesis, Universitätsbibliothek RWTH Aachen, 2008.
- [207] T. Stillger. *Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen*. Forschungszentrum Jülich, 2006.
- [208] G.R. Castro and T. Knubovets. Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(3):195–231, 2003.
- [209] D.M. Woodcock, P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael, and M.W. Graham. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17(9):3469–3478, 1989.
- [210] F.W. Studier and B.A. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1):113, 1986.
- [211] J. Sambrook and D.W. Russell. *Molecular cloning: a laboratory manual*, volume 2. CSHL Press, 2001.
- [212] F.W. Studier. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1):207–234, 2005.
- [213] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4):557, 1983.
- [214] W. Henke, K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr, and S.A. Loening. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 25(19):3957–3958, 1997.
- [215] R.M. Horton, H.D. Hunt, S.N. Ho, J.K. Pullen, and L.R. Pease. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77(1):61–68, 1989.
- [216] A.F. Philip, M. Kumauchi, and W.D. Hoff. Robustness and evolvability in the functional anatomy of a PER-ARNT-SIM (PAS) domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42):17986–17991, 2010.

- [217] T. Eggert, G. van Pouderooyen, B.W. Dijkstra, and K.-E. Jaeger. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Letters*, 502(3):89–92, 2001.
- [218] A. Dugaiczky, H.W. Boyer, and H.M. Goodman. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of Molecular Biology*, 96(1):171–184, 1975.
- [219] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.
- [220] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [221] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P.G. Righetti. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9):1327–1333, 2004.
- [222] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258:598–599, 1975.
- [223] Y. Imamoto, T. Ito, M. Kataoka, and F. Tokunaga. Reconstitution photoactive yellow protein from apoprotein and *p*-coumaric acid derivatives. *FEBS letters*, 374(2):157–160, 1995.
- [224] U. Hanefeld, A.J.J. Straathof, and J.J. Heijnen. Study of the (*S*)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: mechanistic implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1432(2):185–193, 1999.
- [225] J. Von Langermann, J.K. Guterl, M. Pohl, H. Wajant, and U. Kragl. Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(3):155–161, 2008.
- [226] L.M. van Langen, F. van Rantwijk, and R.A. Sheldon. Enzymatic hydrocyanation of a sterically hindered aldehyde. Optimization of a chemoenzymatic procedure for (*R*)-2-chloromandelic acid. *Organic Process Research & Development*, 7(6):828–831, 2003.
- [227] L. Veum, U. Hanefeld, and A. Pierre. The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol–gel matrix. *Tetrahedron*, 60(46):10419–10425, 2004.
- [228] M. Schwarz. *Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus Pseudomonas fluorescens in Carboligasereaktionen mit Aromatischen Aldehyden*. Forschungszentrum Jülich, 2011.

- [229] J. Herrou and S. Crosson. Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10):713–723, 2011.
- [230] F. Circolone, J. Granzin, K. Jentzsch, T. Drepper, K.-E. Jaeger, D. Willbold, U. Krauss, and R. Batra-Safferling. Structural basis for the slow dark recovery of a full-length LOV protein from *Pseudomonas putida*. *Journal of Molecular Biology*, 417(4):362–374, 2012.
- [231] C.R. Robinson and R.T. Sauer. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11):5929, 1998.
- [232] B. Gonzalez, I. Olave, I. Calderon, and R. Vicuña. Degradation of diarylethane structures by *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Archives of Microbiology*, 149(5):389–394, 1988.
- [233] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, and L.R. Pease. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1):51–59, 1989.
- [234] G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, and W. Kroutil. Enzymatic reduction of ketones in “micro-aqueous” media catalyzed by adh-a from *Rhodococcus ruber*. *Organic Letters*, 9(11):2163–2166, 2007.
- [235] B. Franken, T. Eggert, K.-E. Jaeger, and M. Pohl. Mechanism of acetaldehyde-induced deactivation of microbial lipases. *BMC Biochemistry*, 12(1):10, 2011.
- [236] U. Hanefeld, L. Gardossi, and E. Magner. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2):453–468, 2009.
- [237] M. Dadashipour and Y. Asano. Hydroxynitrile lyases: insights into biochemistry, discovery and engineering. *ACS Catalysis*, 1(9):1121–1149, 2011.
- [238] D.A. Zacharias, J.D. Violin, A.C. Newton, and R.Y. Tsien. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science’s STKE*, 296(5569):913, 2002.
- [239] M.A. Horst, T.P. Stalcup, S. Kaledhonkar, M. Kumauchi, M. Hara, A. Xie, K.J. Hellingwerf, and W.D. Hoff. Locked chromophore analogs reveal that photoactive yellow protein regulates biofilm formation in the deep sea bacterium *Idiomarina loihiensis*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47):17443–17451, 2009.
- [240] B. Kopka. Fusionen von Biokatalysatoren mit LOV-Fluoreszenzreporterproteinen für biotechnologische anwendungen. Master’s thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010.

- [241] V. Buttani, A. Losi, T. Eggert, U. Krauss, K.-E. Jaeger, Z. Cao, and W. Gärtner. Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV-LOV dimerization and interdomain interactions. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6(1):41–49, 2007.
- [242] T. Mathes, C. Vogl, J. Stolz, and P. Hegemann. *In vivo* generation of flavoproteins with modified cofactors. *Journal of Molecular Biology*, 385(5):1511–1518, 2009.
- [243] T. Langer, C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer, and F.U. Hartl. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, 356(6371):683–689, 1992.
- [244] C. Schlieker, I. Tews, B. Bukau, and A. Mogk. Solubilization of aggregated proteins by ClpB/DnaK relies on the continuous extraction of unfolded polypeptides. *FEBS Letters*, 578(3):351–356, 2004.
- [245] J. Potzkei, M. Kunze, T. Drepper, T. Gensch, K.-E. Jaeger, and J. Büchs. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC Biology*, 10(1):28, 2012.
- [246] K.J. Hellingwerf, J. Hendriks, and T. Gensch. Photoactive yellow protein, a new type of photoreceptor protein: Will this “yellow lab” bring us where we want to go? *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(8):1082–1094, 2003.
- [247] T. Rocha-Rinza, O. Christiansen, D.B. Rahbek, B. Klærke, L.H. Andersen, K. Lincke, and M. Brøndsted Nielsen. Spectroscopic implications of the electron donor–acceptor effect in the photoactive yellow protein chromophore. *Chemistry*, 16(39):11977–11984, 2010.
- [248] K.M. Alkaabi, A. Yafea, and S.S. Ashraf. Effect of pH on thermal-and chemical-induced denaturation of GFP. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126(2):149–156, 2005.
- [249] J.A. Kyndt, F. Vanrobaeys, J.C. Fitch, B.V. Devreese, T.E. Meyer, M.A. Cusanovich, and J.J. Van Beeumen. Heterologous production of *Halorhodospira halophila* holo-photoactive yellow protein through tandem expression of the postulated biosynthetic genes. *Biochemistry*, 42(4):965–970, 2003.
- [250] P. Holliger, J.L.C. Ong, and F. Ghadessy. Directed evolution method, May 21 2008. EP Patent 1,505,151.
- [251] C. di Guana, P. Lib, P.D. Riggsa, and H. Inouyeb. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 67(1):21–30, 1988.

- [252] D. Walls and S.T. Loughran. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. *Methods in Molecular Biology*, 681:151–175, 2011.
- [253] E.R. LaVallie, E.A. DiBlasio, S. Kovacic, K.L. Grant, P.F. Schendel, and J.M. McCoy. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Nature Biotechnology*, 11(2):187–193, 1993.
- [254] G.D. Davis, C. Elisee, D.M. Newham, and R.G. Harrison. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4):382–388, 1999.
- [255] P.M. Schmidt, R.M. Attwood, P.G. Mohr, S.A. Barrett, and J.L. McKimm-Breschkin. A generic system for the expression and purification of soluble and stable influenza neuraminidase. *PloS one*, 6(2):e16284, 2011.
- [256] J. Peters, M. Nitsch, B. Kühlmorgen, R. Golbik, A. Lupas, J. Kellermann, H. Engelhardt, J.P. Pfander, S. Müller, and K. Goldie. Tetrabrachion: a filamentous archaebacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability. *Journal of Molecular Biology*, 245(4):385–401, 1995.
- [257] O. Bogin, I. Levin, Y. Hacham, S. Tel-Or, M. Peretz, F. Frolow, and Y. Burstein. Structural basis for the enhanced thermal stability of alcohol dehydrogenase mutants from the mesophilic bacterium *Clostridium beijerinckii*: contribution of salt bridging. *Protein Science*, 11(11):2561–2574, 2002.
- [258] S. Igarashi and K. Sode. Stabilization of quaternary structure of water-soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. *Molecular Biotechnology*, 24(2):97–103, 2003.
- [259] A. Inoue and K. Horikoshi. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 338(6212):264–266, 1989.
- [260] H.J. Heipieper, G. Neumann, S. Cornelissen, and F. Meinhardt. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5):961–973, 2007.
- [261] O. Rotthaus, D. Krüger, M. Demuth, and K. Schaffner. Reductions of keto esters with baker's yeast in organic solvents—a comparison with the results in water. *Tetrahedron*, 53(3):935–938, 1997.
- [262] A. Jakoblinnert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M.B. Ansorge-Schumacher, and P.D. de María. Asymmetric reduction of ketones with recombinant *E. coli* whole cells in neat substrates. *Chemical Communications*, 47(44):12230–12232, 2011.

- [263] E. Kiljunen and L.T. Kanerva. *Sorghum bicolor* shoots in the synthesis of (*S*)-mandelonitrile. *Tetrahedron*, 5(3):311–314, 1994.
- [264] J. Roos, U. Stelzer, and F. Effenberger. Synthesis of (*1R, cis, αS*)-cypermethrine via lipase catalyzed kinetic resolution of racemic *m*-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin acetate. *Tetrahedron: Asymmetry*, 9(6):1043–1049, 1998.
- [265] A. Liese, K. Seelbach, and C. Wandrey. *Industrial biotransformations*. VCH Verlagsgesellschaft MbH, 2006.
- [266] G. Neumann, Y. Veeranagouda, TB Karegoudar, Ö. Sahin, I. Mäusezahl, N. Kabelitz, U. Kappelmeyer, and H.J. Heipieper. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter sp.* adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles*, 9(2):163–168, 2005.

Eigenständigkeitserklärung

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

Aachen, 25. Mai 2012

Kathrin Emmi Scholz

Lebenslauf

Kathrin Emmi Scholz (geb. Klein)

Geboren am 12. August 1983 in Hagen (NRW)

Schulbildung

1995 - 2003 Theodor Heuss Gymnasium Hagen (NRW)

Studium

2003 - 2005 Vordiplom des Studiengangs Biologie an der Philipps Universität Marburg

2005 - 2007 Hauptstudium des Studiengangs Biologie an der Philipps Universität Marburg,
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie und Entwicklungsbiologie

2006 studentisches Forschungsprojekt an der University of East Anglia (UEA) in Nor-
wich (UK)

2007 studentisches Forschungsprojekt am Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie in Marburg

2008 Diplomprüfung des Studiengangs Biologie an der Philipps Universität Marburg

2008 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie: Die Rolle
der Klasse A Penicillin-Bindeproteine bei der Morphogenese von *Caulobacter
crescentus*

Promotion

2008 Stipendium der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG)

2008 - 2012 Promotion am Institut für molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum
Jülich: Fluoreszenzreporterproteine als Werkzeuge in der Biotechnologie