

Neue Benzoylformiatdecarboxylasen für die Biokatalyse

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Marion Wendorff

aus Hamm/ Westfalen

Düsseldorf, September 2006

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent : Prof. Dr. Hermann Sahm
Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2006

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Wendorff, M., Eggert, T., Pohl, M., Dresen, C., Müller, M. and Jaeger, K.-E. (2006) Evolving the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. In: Asymmetric synthesis with chemical and biological methods. Enders, D. and Jaeger, K.-E. (eds.) Wiley-VCH, Weinheim. *Im Druck*.

Weitere Veröffentlichungen

Brockmeier, U., Wendorff, M. and Eggert, T. (2006) Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* **52**: 143-148

Posterpräsentationen

Henning, H., Leggewie, C., Kötter, M., Jaeger, K.-E., Eggert, T. (2004) Metagenomic screening of thiamine diphosphate dependent enzymes using a *Pseudomonas putida* growth selection system. VAAM Jahrestagung, Braunschweig

Kühl, S., Dünkemann, P., Wendorff, M., Lütz, S., Pohl, M., Eggert, T., Müller, M. (2005) Higher yields in C-C bond formation via reaction engineering. Bioperspectives, Wiesbaden

Wendorff, M., Walter, L., Müller, M., Jaeger, K.-E., Pohl, M., Eggert, T. (2005) Benzoylformate decarboxylase carboligation: Accessibility of novel substrates by directed evolution. Kongress des Comité Adebitech, Nimes, Frankreich

Wendorff, M., Dresen, C., Gocke, D., Henning, H., Jaeger, K.-E., Kühl, S., Lütz, S., Müller, M., Pohl, M., Eggert, T. (2005) Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*: improvement of substrate specificity by directed evolution. 9. Symposium des SFB 380, Aachen

Dresen, C., Cosp, A., Walter, L., Gocke, D., Wendorff, M., Pohl, M., Müller, M. (2005) α,β -Unsaturated aldehydes as substrates for asymmetric C-C bond forming reactions with thiamine diphosphate (ThDP)-dependent biocatalysts. 9. Symposium des SFB380, Aachen

Kühl, S., Dünkemann, P., Wendorff, M., Pohl, M., Eggert, T., Müller, M., Lütz, S. (2005) Kinetic investigations of enzyme catalyzed synthesis of benzoin and (*R*)-2-hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenone. 9. Symposium des SFB380, Aachen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Biotransformationen	1
1.2	Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme	2
1.3	Die Benzoylformiatdecarboxylase	4
1.3.1	Die Struktur	5
1.3.2	Das aktive Zentrum	6
1.3.3	Die Decarboxylierung	8
1.3.4	Die Carboligation	9
1.4	Die gerichtete Evolution von Biokatalysatoren	14
1.4.1	Erzeugen genetischer Diversität	15
1.4.2	Identifizierung der optimierten Varianten	17
1.5	Aufgabenstellung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien und Enzyme	20
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	20
2.3	Oligonukleotide	22
2.4	Nährmedien	23
2.5	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	23
2.5.1	Schüttelkolbenkultivierung	23
2.5.2	Hochzelldichte (HZD)-Fermentation	24
2.6	Isolierung von Nukleinsäuren	24
2.7	Präzipitation von Nukleinsäuren	24
2.8	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	24
2.9	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA	25
2.10	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	25
2.10.1	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.10.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	25
2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.11.1	Standard-PCR-Reaktion	25
2.11.2	Ortsspezifische Mutagenese	26
2.11.3	Fehlerhafte PCR (epPCR)	27
2.11.4	Sättigungsmutagenese	27
2.12	Sequenzierung von DNA	28
2.13	Herstellen von ITCHY-Bibliotheken	28
2.14	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
2.15	TCA-Fällung von Proteinen	28
2.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.17	Chromatographische Reinigung der Benzoylformiatdecarboxylasen	29
2.18	Nachweis und Bestimmung von Enzymaktivitäten	30
2.18.1	Decarboxylaseaktivität	30
2.18.1.1	Bestimmung des pH-Optimums	31
2.18.1.2	Substratspektrum der Decarboxylierung	31
2.18.2	Carboligaseaktivität	31
2.18.3	High throughput screening (HTS) Assay zum Nachweis von Carboligaseaktivität	33
2.19	Computerprogramme und Online-Datenbanken	33

3.	Ergebnisse	35
3.1	Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen	35
3.1.1	Datenbankrecherche mit Protein-Protein BLAST	35
3.1.2	Vergleich der Primärstrukturen der PaBFD und der BjBFD mit der PpBFD	36
3.1.3	Überexpression der <i>mdlC</i> -Gene und Reinigung der putativen Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i>	38
3.1.4	Das Substratspektrum der PaBFD für die Decarboxylasereaktion	40
3.1.5	Die PaBFD zeigt Carboligase-Aktivität	42
3.2	Etablierung der Methode ITCHY für die Rekombination der strukturhomologen ThDP-abhängigen Enzyme	44
3.2.1	Erstellen von ITCHY-Bibliotheken	44
3.3	Optimierung der PpBFD: Erweiterung des Akzeptorspektrums mittels fehlerhafter PCR	47
3.3.1	Überexpression des <i>mdlC</i> -Gens aus <i>Pseudomonas putida</i> in <i>Escherichia coli</i>	47
3.3.2	Fehlerhafte PCR (epPCR) der BFD-Variante L476Q	48
3.3.3	Entwicklung eines High-Throughput-Screening Assays für Carboligase-Aktivität	49
3.4	Identifizierung einer BFD-Variante mit optimierten Akzeptoraldehyd-Spektrum	52
3.5	Biochemische Charakterisierung der PpBFD-Variante 55E4 im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q	54
3.5.1	Die Variante 55E4 zeigt eine verringerte Benzoylformiatdecarboxylaseaktivität	55
3.5.2	Synthese von 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon und Benzoin	57
3.5.3	Enantioselektivität der Carboligasereaktion	59
3.6	Lokalisierung der Aminosäureaustausche in der Proteinstruktur	60
3.7	Weiterführende Analyse der Austausch an Position 255 und 260 durch Sättigungsmutagenese	63
3.7.1	Herstellen der Sättigungsbanken an Position 255 und Position 260	63
3.7.2	Klone der Sättigungsbank an Position 255 zeigen erhöhte Carboligaseaktivität	64
3.7.3	Sequenzierung der positiven Klone der Sättigungsmutagenese an Position 255	64
4.	Diskussion	66
4.1	Identifizierung und Charakterisierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen	67
4.2	Etablierung der Methode ITCHY für die Rekombination nicht-homologer Gene	72
4.3	Erweiterung des Akzeptorspektrums der PpBFD durch fehlerhafte PCR	75
4.4	Ausblick	85
5.	Zusammenfassung	87
6.	Summary	89
7.	Literaturverzeichnis	90
8.	Anhang	100

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

	Seite
Abb.1 Struktur und allgemeiner Reaktionsmechanismus des ThDP	3
Abb.2 Die BFD als Homotetramer	5
Abb.3 Das aktive Zentrum der PpBFD	8
Abb.4 Reaktionsmechanismus der PpBFD	10
Abb.5 Gemischte Ligationsprodukte aus Benzaldehyd und Acetaldehyd, die durch die Katalyse mit BAL, BFD und PDC zugänglich sind	11
Abb.6 Enantioselektivität der BFD	13
Abb.7 Schematische Darstellung verschiedener Ansätze zur Erzeugung genetischer Diversität	17
Abb.8 Zielreaktion	19
Abb.9 Eichgeraden zur Quantifizierung von Benzoin und DMA-HPP	32
Abb.10 Sequenzvergleich der putativen PaBFD und BjBFD mit der PpBFD	37
Abb.11 SDS-PAGE Analyse der gereinigten PaBFD	39
Abb.12 SDS-PAGE Analyse der Protein-Aggregate der BjBFD	39
Abb.13 Carboligationspektrum	43
Abb.14 Schematische Darstellung der Herstellung der ITCHY-Bibliotheken mittels Zeit-abhängigen ExonukleaseIII-Verdau	45
Abb.15 Analyse der mit ITCHY hergestellten Klone über Testrestriktion	46
Abb.16 SDS-PAGE Analyse der Optimierung der Expression in Mikrotiterplatten	49
Abb.17 Farbassay zum Nachweis der Carboligaseaktivität	50
Abb.18 Konzentrationsreihe der Substrate und des Produktes 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiofenon im Farbassay	51
Abb.19 Test von Rohextrakten im Farbassay	52
Abb.20 Ablauf des Screenings zur Erweiterung des Akzeptoraldehydspektrums	52
Abb.21 SDS-PAGE Analyse der Reinigung der PpBFDL476Q und der PpBFD55E4	54
Abb.22 Umsätze der Screening-Variante 55E4 und der Ausgangsvariante L476Q für die Produkte Benzoin und DMA-HPP	58
Abb.23 Modell des aktiven Zentrums der BFD mit Markierung der mutierten Aminosäuren der Variante 55E4	61
Abb.24 Auswertung der positiven Klone der Sättigungsbank an Position 255	64
Abb.25 Produkte der Methode ITCHY	73
Abb.26 BFD katalysierte Reaktion zu den Produkten (<i>S</i>)-HPP und (<i>R</i>)-Benzoin	82
Abb.27 Karte der rekombinanten Plasmide pET_PaBFD und pET_BjBFD	100
Abb.28 Karte der rekombinanten Plasmide pET_BAL-NcoI und pET_PpBFDL476Q	101

	Seite	
Tab.1	Vorkommen und Reaktionen einiger ThDP-abhängiger Enzyme	4
Tab.2	Vergleich der konservierten Reste und ihrer Positionen in der Primärstruktur der Decarboxylasen BFD und ScPDC	7
Tab.3	Die verwendeten Bakterienstämme	20
Tab.4	Übersicht der für <i>E.coli</i> verwendeten Vektoren	21
Tab.5	Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide	21
Tab.6	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	22
Tab.7	Vergleich der Primärstruktur-Positionen katalytisch wichtiger Reste der PpBFD und den putativen BFDs PaBFD und BjbFD	36
Tab.8	Ausbeute bei der Reinigung der PaBFD	39
Tab.9	Substratspektrum der PaBFD für die Decarboxylasereaktion	41
Tab.10	Aminosäureaustausche und stille Mutationen der Ausgangsvariante L476Q und der Screeningvariante 55E4	53
Tab.11	Ausbeute bei der Reinigung der PpBFDL476Q und der PpBFD55E4	54
Tab.12	Substratspektrum der Decarboxylasereaktion der Screening-Variante 55E4 im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q	56
Tab.13	Einfluss der Aldehydkonzentration auf Enantioselektivität für (<i>R</i>)-Benzoin	60
Tab.14	Vergleich der Carboligaseaktivitäten der Varianten 55E4 und H281A	62

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Dabei sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten ausgenommen. Darüber hinaus wurden Aminosäuren in dem gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

A.dest	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildungen
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BjBFD	Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
GC	Gaschromatografie, gaschromatografisch
Da	Dalton
DMA-HPP	2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiofenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
epPCR	error-prone Polymerase Chain Reaction
GC	Gaschromatografie
HIADH	Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
2-HPP	2-Hydroxypropiofenon
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamidadenosindinukleotid (reduzierte Form)
OD	Optische Dichte

PAC	Phenylacetylcarbinol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PaBFD	Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PpBFD	Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i>
RT	Raumtemperatur
ScPDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
ThDP	Thiamindiphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
ZmPDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>

1. Einleitung

In lebenden Systemen laufen unentwegt chemische Reaktionen ab. Enzyme ermöglichen als sogenannte Biokatalysatoren den Ablauf dieser Reaktionen in einem überschaubaren Zeitrahmen, indem sie die Geschwindigkeit der Reaktionsabläufe um einen Faktor von bis zu 10^{14} erhöhen [Radzicka & Wolfenden, 1995; Neet, 1998]. Aber auch außerhalb der lebenden Zelle sind Enzyme aktiv. Dabei sind sie chemischen Katalysatoren in mancher Hinsicht aufgrund ihrer Stereo- und Regioselektivität und den meist milden Reaktionsbedingungen, d.h. Temperaturen von 20-40 °C, atmosphärischem Druck und einem pH nahe dem Neutralpunkt, überlegen. Dies vermindert unerwünschte Nebenreaktionen wie Isomerisierung, Racemisierung und Epimerisierung des Produktes [Patel, 2001].

1.1 Biotransformationen

Schon vor 6000 v.Chr. nutzte die Menschheit Biokatalysatoren in Form von Hefen bei der Herstellung von Bier und Brot. Erst ab dem 19. Jahrhundert erkannten Wissenschaftler wie Louis Pasteur, dass Mikroorganismen für eine Vielzahl der seit Jahrtausenden genutzten Stoffumwandlungen verantwortlich sind. 1897 konnte Buchner erstmals zeigen, dass keine intakten Zellen für biokatalytische Verfahren nötig sind: er wies in zellfreien Hefeextrakten die alkoholische Gärung nach. Eine der ersten Biotransformationen im industriellen Maßstab wurde 1930 von der Knoll AG, Ludwigshafen, durchgeführt [Hildebrandt & Klavehn, 1930]. Neuberg und Hirsch hatten zuvor die hefekatalysierte Kondensreaktion von Pyruvat und Benzaldehyd zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) entdeckt [Neuberg & Hirsch, 1921], welches die chirale Vorstufe in der Synthese des Antihistaminikums L-Ephedrin darstellt. Ansonsten wurden Enzyme vor allen Dingen in Waschmitteln, bei der Nahrungsmittelveredlung, der Abwasserreinigung und der Papierherstellung eingesetzt. Seit den 1990er Jahren ist die Biotransformation auch in der Chemie- und Pharmaindustrie als Synthesetechnologie in Form von Ganz-Zell-Systemen und Katalysen mit isolierten Enzymen fest etabliert. Im Vordergrund steht hier vor allem die hohe Stereoselektivität der von Enzymen katalysierten Reaktionen – der Bedarf an enantiomerenreinen Verbindungen steigt ständig.

Der Markt für enantiomerenreine Pharmaka wächst z.B. mit etwa 15 % pro Jahr verglichen mit ca. 8 % bei achiralen Wirkstoffen. Heute sind etwa 80 % der neu eingeführten Pharmaka enantiomerenrein, 1991 waren es erst ca. 20 % [Breuer & Stürmer, 2006].

Um den Bedarf an neuen Biokatalysatoren zu decken, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Beim sogenannten „database mining“ [Wackett, 2004] werden Aminosäuresequenzen von Proteinen mit bekannter mit denen unbekannter Funktion aus Protein-Datenbanken verglichen. In Metagenom-Ansätzen werden enzymkodierende DNA-Fragmente aus Umweltproben direkt kloniert, exprimiert und die entstehenden Proteine auf die gesuchte Aktivität durchgemustert [Streit *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2005; Lorenz & Eck, 2005]. Für das rationale Proteindesign ist ein detailliertes Wissen über Proteinstruktur, Funktion und Katalysemechanismus notwendig: durch gezielte Aminosäureaustausche werden die Eigenschaften des Biokatalysators verändert [Kazlauskas, 2000]. Im Gegensatz dazu steht die gerichtete Evolution. Die Biokatalysatoren werden auf molekularer Ebene zufällig verändert und die entstehenden Varianten auf die gewünschte Aktivität hin untersucht. Die gerichtete Evolution kann aber auch dann zum Einsatz kommen, wenn der Biokatalysator zwar die gewünschte Aktivität besitzt, in seinen weiteren Eigenschaften wie z.B Substratspektrum oder Stabilität jedoch dem entsprechenden Prozess angepasst werden soll [Rubin-Pitel & Zhao, 2006; Reetz, 2006].

1.2 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Enzyme, welche Thiamindiphosphat (ThDP) als Cofaktor besitzen, können sowohl die Spaltung als auch die Bildung von C-C Bindungen katalysieren [Jordan, 2003]. Dabei ist die (enantioselektive) Bildung von C-C-Bindungen eine der zentralen Reaktionen in der synthetischen organischen Chemie [Faber & Kroutil, 2005], z. B. auch bei der Synthese enantiomerenreiner Natur- und Wirkstoffe [Christoffers & Mann, 2001].

Für die Katalyse der Spaltung und Knüpfung von C-C-Bindungen aktiviert das Thiamindiphosphat Aldehyde und Ketone (R-CO-X) und überträgt diese dann auf ein anderes Molekül. Struktur und allgemeiner Reaktionsmechanismus sind in Abb. 1 dargestellt [Schellenberger, 1996].

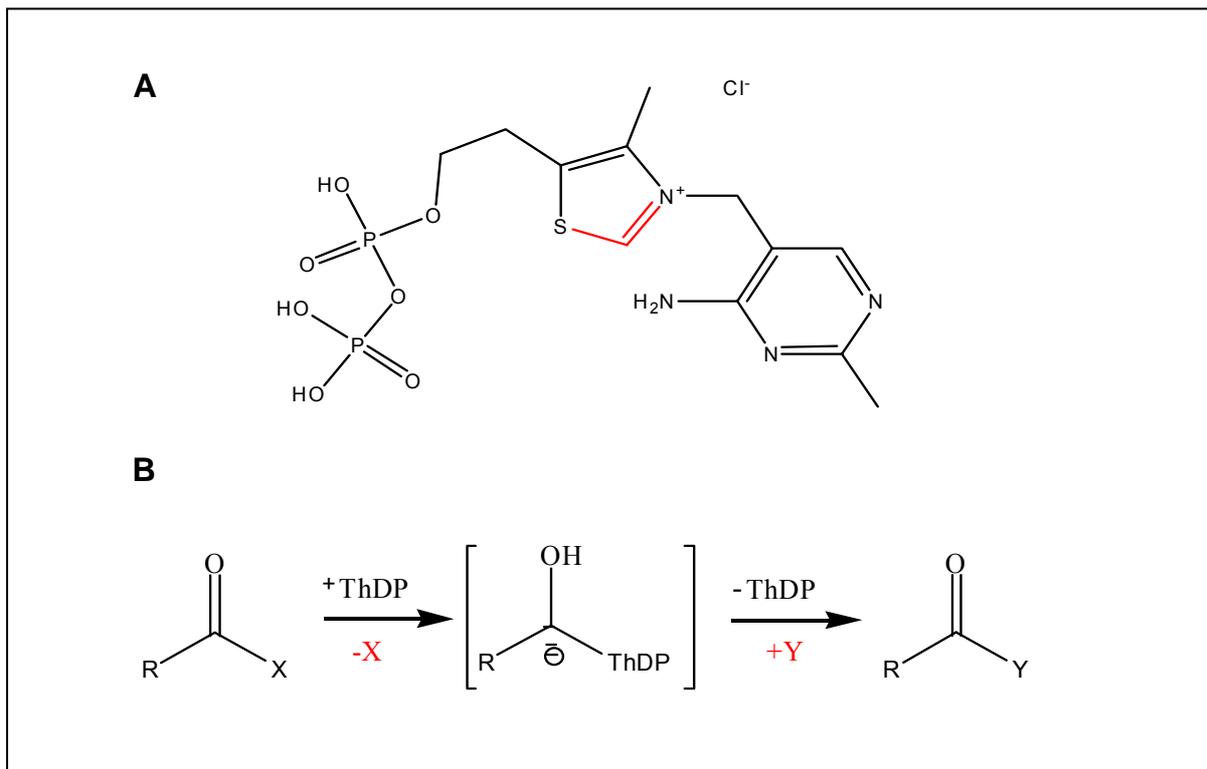


Abb. 1: Struktur und allgemeiner Reaktionsmechanismus des ThDP. **A:** Der Cofaktor Thiamindiphosphat besteht aus einem Aminopyrimidin- und einem Thiazolring, sowie einem Phosphatrest, über den das Molekül, kooperativ über ein zweiwertiges Metallion, im aktiven Zentrum des Biokatalysators gebunden wird. Der sogenannte „aktivierte Aldehyd“ wird am C2-Atom des Thiazolrings gebunden. **B:** Bei der durch Thiamindiphosphat katalysierten Reaktion wird im Allgemeinen eine Gruppe X von dem Substrat abgespalten, das Substrat wird dabei an den Cofaktor als „aktivierter Aldehyd“ gebunden. Das Produkt kann durch verschiedene Reagenzien Y vom ThDP freigesetzt werden.

Der charakteristische Übergangszustand der ThDP katalysierten Reaktion ist der „aktivierte Aldehyd“, welcher durch die Bindung des Substrates und unter Abspaltung der Gruppe X an den Cofaktor generiert wird. Der gebundene aktivierte Aldehyd kann durch verschiedene Reagenzien (Y) vom ThDP freigesetzt werden. Substratspezifität, Produktspektrum und Stereoselektivität werden vom Protein vorgegeben, welches das ThDP als Cofaktor bindet. Man unterscheidet z.B. Transketolasen, Acetolactatsynthasen und 2-Ketosäuredecarboxylasen. Entsprechend der unterschiedlichen katalysierten Reaktionen kommen ThDP-abhängige Enzyme in den unterschiedlichsten Organismen und Stoffwechselwegen vor. Tab.1 gibt eine Übersicht einiger Enzyme, der von ihnen katalysierten Reaktionen als auch der entsprechenden Stoffwechselwege.

Tab.1: Vorkommen und Reaktionen einiger ThDP-abhängiger Enzyme

X und Y entsprechen den in Abb. 1 ebenfalls mit X und Y vorgestellten Gruppen im Reaktionsmechanismus des ThDP.

Enzyme [E.C.-Nummer]	X	Y	Stoffwechselweg	Referenz
Acetohydroxysäuresynthetase [4.1.3.18]	CO ₂	CH ₃ -CO-CO ²⁻	Synthese verzweigt- kettiger Aminosäuren	Duggleby <i>et al.</i> , 2003
Transketolase [2.2.1.1]	R ¹ -CHO	R ² -CHO	Pentosephosphatweg	Schörken & Sprenger, 1998
Pyruvatoxidase [1.2.3.3]	CO ₂	PO ₄ ³⁻	Atmungskette	Tittmann <i>et al.</i> , 2000
Benzaldehydlyase [4.1.2.38]	PhCHO	H ⁺	unbekannt	Mosbacher <i>et al.</i> , 2005
Pyruvatdehydrogenase [1.2.4.1]	CO ₂	LipSH	Citratzyklus	Jordan, 2003
<i>Decarboxylasen</i>				
Pyruvatdecarboxylase [4.1.1.1]	CO ₂	H ⁺	Alkoholische Gärung	König, 1998
Benzoylformiatdecarboxylase [4.1.1.7]	CO ₂	H ⁺	Mandelsäureabbau	McLeish <i>et al.</i> , 2004
Indolpyruvatdecarboxylase [4.1.1.74]	CO ₂	H ⁺	Phytohormonsynthese	Schütz <i>et al.</i> , 2003

1.3 Die Benzoylformiatdecarboxylase

Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD, EC 4.1.1.7) gehört zu den ThDP-abhängigen 2-Ketosäuredecarboxylasen. Als drittes Enzym des Mandelatabbauweges katalysiert sie die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und Kohlendioxid (1.3.1). Entsprechend dem Schema in Abb. 1 wird dabei der aktivierte Aldehyd durch Protonierung vom ThDP freigesetzt. Dieser Stoffwechselweg erlaubt es Bakterien, auf (*R*)-Mandelsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, welche zu Benzoesäure umgesetzt wird, um anschließend im β -Ketoacidweg und Citronensäurezyklus metabolisiert zu werden.

Eine BFD-Aktivität wurde in *Pseudomonas putida* [Hegemann *et al.*, 1966a, b; 1970], *Pseudomonas aeruginosa* [Barrowman *et al.*, 1986] und *Acinetobacter calcoaceticus* [Barrowman und Fewson, 1985] nachgewiesen. Henning *et al.* isolierten 2006 mittels eines Selektionssystems, welches auf BFD-Aktivität beruht, drei weitere Proteine mit BFD-

Aktivität, zwei davon aus *P. putida*. Die Bedeutung für den Stoffwechsel ist jedoch noch nicht geklärt.

Die im Folgenden beschriebenen Erkenntnisse gehen auf Untersuchungen der BFD zurück, die als Teil des Mandelatoperons in *P. putida* beschrieben wurde (PpBFD) [Tsou *et al.*, 1990]. Von Tsou *et al.*, wurde 1990 das korrespondierende Gen *mdlC* (1587 bp) kloniert, und auch die Kristallstruktur liegt gelöst vor [Hasson *et al.*, 1998; Polovnikova *et al.*, 2003].

1.3.1 Die Struktur

Die aktive PpBFD ist ein Homotetramer und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 224 kDa (Abb.2) [Hasson *et al.*, 1998; Polovnikova *et al.*, 2003].

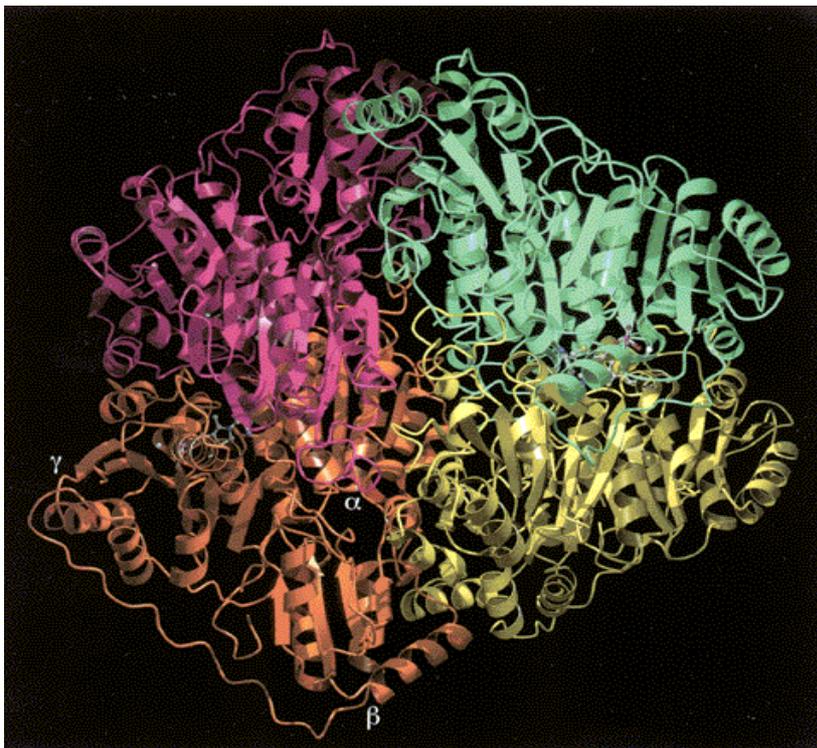


Abb.2: Die BFD als Homotetramer.

Die BFD aus *Pseudomonas putida* ist ein Homotetramer aus vier identischen Untereinheiten, dargestellt in den verschiedenen Farben. Eine Untereinheit ist in drei Domänen unterteilt (α , β , γ), welche in der orange dargestellten Untereinheit gekennzeichnet sind. Jeweils zwei Untereinheiten bilden zusammen zwei aktive Zentren (Pink und Orange, sowie Grün und Gelb). Die Abbildung wurde aus Hasson *et al.*, 1998 übernommen.

Eine Untereinheit ist gegliedert in drei Domänen, der α -, β - und γ -Domäne. Dabei sind die α - und γ -Domäne topologisch gleichartig, während die β -Domäne eine leicht abweichende Faltung aufweist. Bei der Bildung des aktiven Enzyms kommen ihnen entsprechend unterschiedliche Funktionen zu. Die aktiven Zentren, von denen es insgesamt vier im

Homotetramer gibt, werden jeweils zwischen zwei Untereinheiten gebildet. Dabei interagiert die α -Domäne (N-terminal) eines Monomers mit der γ -Domäne (C-terminal) einer benachbarten Untereinheit. Diese beiden Domänen binden dabei kooperativ den Cofaktor ThDP, welcher in jedem der vier Zentren vorliegt: die α -Domäne interagiert mit dem Pyrimidinring, während die γ -Domäne den Diphosphatrest des ThDPs über einen weiteren Cofaktor, ein zweiwertiges Metallion (Mg^{2+}), bindet. Der intermolekulare Kontakt zweier solcher Dimere zum Homotetramer wird maßgeblich durch die β -Domäne gewährleistet.

Die beschriebene Struktur gilt für die bisher bekannten ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDC) [Arjunan *et al.*, 1996] und *Zymomonas mobilis* (ZmPDC) [Dobritzsch *et al.*, 1998] gleichermaßen, und darüber hinaus wurde sie auch bei weiteren ThDP abhängigen Enzymen wie der Benzaldehydlyase [Mosbacher *et al.*, 2005] und der Pyruvatoxidase [Müller & Schulz, 1993] beobachtet. Dies ist umso erstaunlicher, betrachtet man die geringe Ähnlichkeit der Primärstruktur, welche für BFD, ScPDC, ZmPDC und BAL bei etwa 25 % liegt [Siegert, 2004]. Eine Einteilung der genannten Proteine aufgrund ihrer Strukturübereinstimmung in eine gemeinsame Gruppe innerhalb der ThDP-abhängigen Enzyme wurde 2005 von Mosbacher *et al.*, sowie 2006 von Duggleby vorgeschlagen.

1.3.2 Das aktive Zentrum

Wie unter 1.3.1 bereits beschrieben, liegt im aktiven Zentrum der Cofaktor ThDP vor, welcher koordinativ über seinen Diphosphatrest von einem zweiwertigen Metallion (Mg^{2+}) gebunden wird. Die Aminosäuren der γ -Domäne, die an der Bindung des Metallions beteiligt sind, sind hoch konserviert und bilden damit das für ThDP-abhängige Enzyme allgemein charakteristische Motiv (GDG X26 NN) [Hawkins *et al.*, 1989].

Darüber hinaus wechselwirkt der Cofaktor über konservierte Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrimidinrings mit der Proteinumgebung (Tab. 2) [Jordan, 2003].

Ein Vergleich der aktiven Zentren der BFD und der 2-Ketosäuredecarboxylase ScPDC, bzw. von Resten im aktiven Zentrum und deren Position in den Primärstrukturen, zeigte für die Anordnung in den Primärstrukturen kaum Ähnlichkeiten. Es wurde jedoch die Konservierung der Position der Aminosäuren im aktiven Zentrum in der Tertiär- bzw. Quartärstruktur unabhängig der Primärstruktur beobachtet. Zwei Histidinreste zeigen die gleiche Anordnung in dem aktiven Zentrum, welche keine übereinstimmende Positionierung in der Primärstruktur

besitzen: bei der ScPDC handelt es sich um die Reste an den Positionen 114 und 115, bei der PpBFD finden sich die beiden Histidine an den Positionen 70 und 281 [Hasson *et al.*, 1998]. Tab.2 verdeutlicht den Sachverhalt: Hier sind die im Folgenden beschriebenen Aminosäurereste der BFD und ihre Funktion in der Katalyse sowie ihre Position in der Primärstruktur im Vergleich zur ScPDC wiedergegeben.

Tab.2: Vergleich der konservierten Reste und ihrer Positionen in der Primärstruktur der Decarboxylasen BFD und ScPDC. Modifiziert nach Hasson *et al.*, 1998.

Funktion	BFD	ScPDC
Bindung des Metallions	D428	D444
	N455	N471
Bindung des Cofaktors	Y458	Y474
	G427	G433
	G429	G445
Interaktion mit N1'	E47	E51
Interaktion mit N4'	G401	G413
Substratbindung	S26	D28
Decarboxylierung/ Carboligation	H70	H114
	H281	H115

Das ThDP ist in der sogenannten V-Konformation [Shin *et al.*, 1977] gebunden. Stabilisiert wird diese Form neben Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrimidinrings durch Van-der-Waals Wechselwirkungen mit einer hydrophoben und voluminösen Aminosäure-Seitenkette (L403in PpBFD) [Guo *et al.*, 1998]. Diese Konformation bedingt die räumliche Nähe des reaktiven Kohlenstoffs (C2) zur 4'-Aminogruppe des Pyrimidinrings, welche an Protonierungs- und Deprotonierungsschritten während der Katalyse beteiligt ist. Die beschriebene V-Konformation des ThDP gehört zu den konservierten Merkmalen der Gruppe ThDP-abhängiger Enzyme [Jordan, 2003].

Wichtig für die Katalyse sind außerdem das Serin an Position 26, als auch zwei Histidinreste (H70, H281), sowie ein Glutamatrest an Position 28. Abb.3 zeigt ihre Positionen im aktiven Zentrum relativ zu einem im aktiven Zentrum gebundenen Inhibitor, dem (*R*)-Mandelat [Polovnikova *et al.*, 2003]. Darauf aufbauende Mutagenesestudien lassen Aussagen über ihre Funktion in der Decarboxylasereaktion [Polovnikova *et al.*, 2003; McLeish *et al.*, 2004] als

auch bei der Carboligation [Siegert, 2000] zu. Im Folgenden sollen deshalb diese Reste in Zusammenhang mit den jeweiligen Katalysemechanismen betrachtet werden

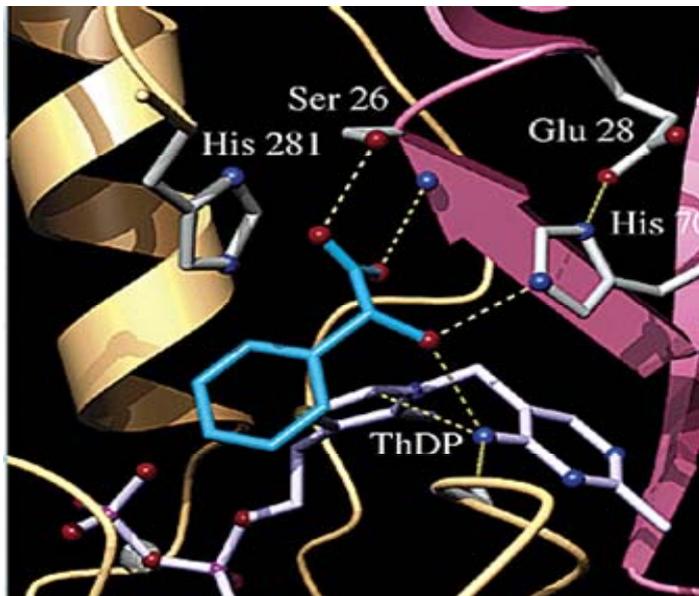


Abb.3: Das aktive Zentrum der PpBFD. Das aktive Zentrum der PpBFD wird zwischen zwei Untereinheiten (beige und pink) gebildet. Dargestellt ist das aktive Zentrum mit (*R*)-Mandelat (blau) gebunden, einem kompetitiven Inhibitor des Enzyms. Der Cofaktor Thiamindiphosphat (grau) liegt in der V-Konformation vor. Die katalytisch wichtigen Reste S26, E28, H70 und H281 reichen in das aktive Zentrum hinein [Polovnikova *et al.*, 2003].

1.3.3 Die Decarboxylierung

Die von der BFD katalysierte Hauptreaktion ist die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und Kohlendioxid. Die Katalyse von ThDP im freien und enzymgebundenen Zustand wurde intensiv untersucht [Jordan, 2003]. Auch wenn der Katalysezyklus für die BFD noch nicht analysiert worden ist, so können doch analoge Schritte zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen angenommen werden [Tittmann *et al.*, 2003; McLeish *et al.*, 2004; Jordan & Nemeria, 2005; Tittmann *et al.*, 2005]

Der Reaktionszyklus beginnt mit der Deprotonierung des C2-Atoms durch die N4'-Iminogruppe des ThDPs. Das erste Zwischenprodukt, Mandelyl-ThDP, wird durch den Angriff des C2-Ylids auf die Carbonylfunktion des Substrates (Benzoylformiat) gebildet. Durch die folgende Decarboxylierung des Mandelyl-ThDP entsteht das zweite Intermediat: der „aktivierte Aldehyd“, ein Enamin-Carbanion. In mehreren ThDP abhängigen Enzymen konnte der Enamin-Charakter dieses Zwischenproduktes inzwischen spektroskopisch nachgewiesen werden [Sandalova *et al.*, 2004]. Durch Protonierung des aktivierten Aldehyds wird der zu Benzoylformiat korrespondierende Benzaldehyd freigesetzt. Abb. 4 zeigt den beschriebenen Reaktionszyklus.

Mittels Mutagenesestudien wiesen Polovnikova *et al.* 2003 dem Aminosäurerest S26 eine Rolle bei der Substratbindung sowie bei der Decarboxylierung zu. Das Histidin an Position 70, stabilisiert durch das Glutamat 28, assistiert bei der Protonenübertragung bei der Decarboxylierung als auch bei der Freisetzung des Benzaldehyds. H281 ist involviert in die Protonierung des Enamins.

Für die Substratspezifität sind im aktiven Zentrum u.a. die Aminosäurereste A460 und F464 von Bedeutung [Siegert *et al.*, 2004, 2005].

1.3.4 Die Carboligation

Wilcocks *et al.* beobachteten erstmals 1992 die Bildung von (*S*)-2-Hydroxypropiofenon ((*S*)-2-HPP) bei der Decarboxylierung von Benzoylformiat unter Anwesenheit von Acetaldehyd in *Pseudomonas putida* Rohextrakten. Seitdem wurde die von der PpBFD katalysierte Carboligation intensiv untersucht [Demir *et al.*, 1999; Dünwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000; Dünkemann *et al.*, 2002]. Mechanistisch betrachtet, im Vergleich zur Reaktion der Decarboxylierung, fungiert anstelle eines Protons ein zweites Aldehydmolekül als Acylakzeptor (Abb. 4). Eine solche Katalyse alternativer Reaktionen durch den gleichen Biokatalysator wird auch als Promiskuität bezeichnet [Bornscheuer & Kazlauskas, 2004].

Die Produkte dieser enzymatischen C-C-Verknüpfung, chirale 2-Hydroxyketone, finden als Synthone in der organisch-synthetischen Chemie Anwendung. Auch pharmazeutische Wirkstoffe können mit 2-Hydroxyketonen als chiralen Vorstufen synthetisiert werden, z.B. Fungizide oder Antidepressiva [Dünkemann *et al.*, 2004]. Als bekanntestes Beispiel ist die Synthese des 2-Hydroxyketons (*R*)-PAC zu nennen, welches die chirale Vorstufe in der Synthese zum Antihistaminikum L-Ephedrin darstellt. Die (*R*)-PAC Bildung wird durch die Pyruvatdecarboxylase (Abb. 5) katalysiert, zur Herstellung wird Hefe unter Zugabe von Benzaldehyd fermentiert, einem der ersten großtechnischen biotechnologischen Verfahren (1.1) [Hildebrandt & Klavehn, 1930]. Bei der Decarboxylierung von Pyruvat wird der „aktivierte Aldehyd“ (hier Acetaldehyd) auf Benzaldehyd als Acylakzeptor übertragen. Decarboxylierung und Carboligation verlaufen über den „aktiven Aldehyd“ als gemeinsame Zwischenstufe (Abb. 4). Für die BFD konnten Iding *et al.*, 2000 zeigen, dass dieses Zwischenprodukt auch direkt durch Addition eines Donoraldehyds (z.B. Benzaldehyd, Abb. 4) an den Cofaktor generiert werden kann.

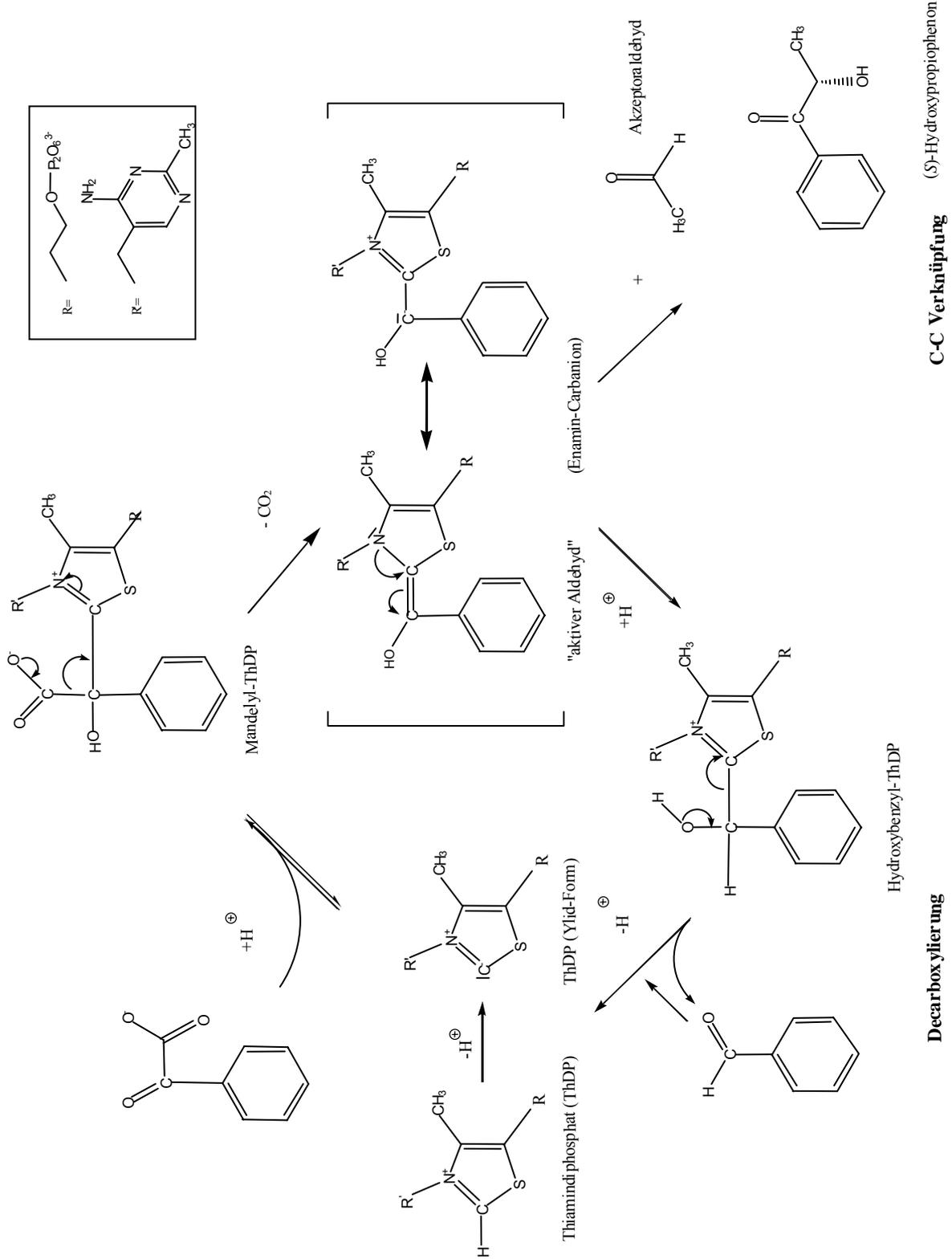


Abb. 4: Reaktionsmechanismus der PpBFD. Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd als Hauptreaktion und die C-C-Verknüpfung mit Acetaldehyd zu (S)-2-Hydroxypropiophenon als Nebenreaktion.

Des weiteren ist bekannt, dass Benzaldehyd als Donoraldehyd durch ringsubstituierte Derivate ersetzt werden kann, mit Ausnahme von Substitutionen an der *ortho*-Position [Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000]. Eine Variation des Akzeptors Acetaldehyd ist hingegen nur bedingt möglich [Iding *et al.*, 2000]. So konnte zwar die Carboligaseaktivität auch mit Benzaldehyd als Acylakzeptor beobachtet werden [Demir *et al.*, 1999], die Aktivität ist jedoch um ein Vielfaches geringer als mit Acetaldehyd als Akzeptor [Iding *et al.*, 2000].

Betrachtet man die beiden Decarboxylasen BFD und PDC bezüglich ihrer gebildeten Produkte aus den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd, so fällt auf, dass sie die Entstehung zueinander tautomerer Produkte mit entgegengesetzter Enantioselektivität katalysieren (Abb. 5). Ein weiteres ThDP-abhängiges Enzym, die Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens*, ergänzt dieses Produktspektrum: sie bildet das zur BFD enantio-komplemetäre Produkt (*R*)-2-HPP (Abb. 5) [Demir *et al.*, 2002]. Zusammen ermöglichen BFD, PDC und BAL den Zugang zu einer Vielzahl sich komplementierender 2-Hydroxyketone [Pohl *et al.*, 2002, 2004].

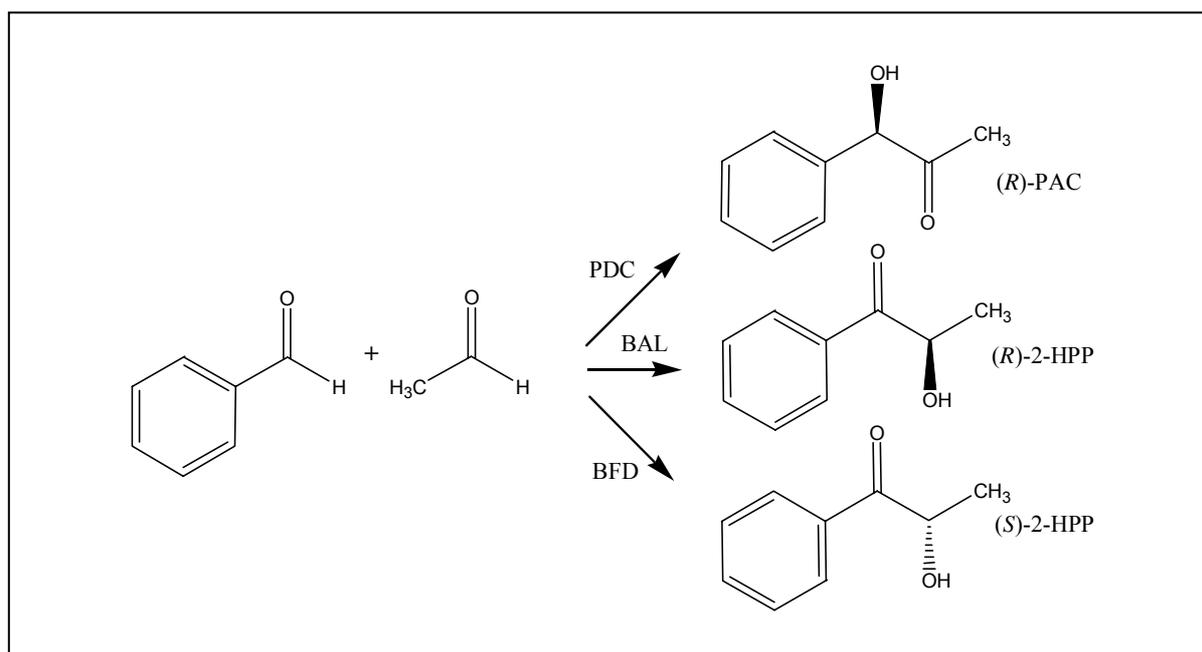


Abb.5: Gemischte Ligationsprodukte aus Benzaldehyd und Acetaldehyd, die durch die Katalyse mit BAL, BFD und PDC zugänglich sind. Die Biokatalysatoren PDC und BAL ermöglichen die Synthese der tautomerer Produkte PAC und 2-HPP mit einer Selektivität für das (*R*)-Enantiomer. Die BFD katalysiert aus Benzaldehyd und Acetaldehyd das zur BAL enantiokomplemetäre Produkt (*S*)-2-HPP.

Die Carboligation findet am selben aktiven Zentrum statt, das auch die Decarboxylierung katalysiert. Das bedeutet auch, dass die für den Mechanismus der Decarboxylierung beschriebenen katalytischen Reste z.T. auch die Carboligation beeinflussen. Dies konnte für die Histidinreste an Position 70 und 281 gezeigt werden. Während eine Mutation an Position 70 zu Alanin zu einem fast vollständigen Rückgang der Carboligasereaktion führt, kommt es durch den gleichen Austausch an Position 281 zu einer deutlichen Verbesserung der Reaktion mit Benzaldehyd als Acylakzeptor. Ob dafür mechanistische Effekte verantwortlich sind, rein sterische [Siegert, 2000] oder eine Kombination beider Möglichkeiten, ist noch nicht geklärt.

Enantioselektivität der Carboligasereaktion

Die BFD katalysiert die Bildung von (*S*)-2-HPP mit einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von bis zu 95 % [Iding *et al.*, 2000]. Tauscht man die Reste A460 und F464 jeweils gegen ein Isoleucin (analog dem aktiven Zentrum der PDC) so liegt der *ee* für (*S*)-2-HPP für die Einzelmutanten bei 10 bzw. 42%. Die Doppelmutante zeigt eine Umkehrung der Enantioselektivität: mit einem *ee* von 50% wird das entsprechende (*R*)-Enantiomer gebildet [Siegert *et al.*, 2004, 2005]. Mit Benzaldehyd als Acylakzeptor entsteht mit dem Wildtyp-Enzym (*R*)-Benzoin [Demir *et al.*, 1999, Iding *et al.*, 2000].

Die Stereoselektivität der 2-HPP Bildung ist zudem abhängig von der eingesetzten Menge an Benzaldehyd. Mit steigender Konzentration nimmt die chirale Induktion ab. Für Acetaldehyd wurde dieser Effekt nicht beobachtet [Iding *et al.*, 2000].

Iding *et al.* entwickelten 2000 ein Modell zur Erklärung der Enantioselektivität der Carboligation, katalysiert durch die BFD, aufbauend auf Daten der Kristallstruktur [Hasson *et al.*, 1998]. Abb. 6 zeigt dieses Modell.

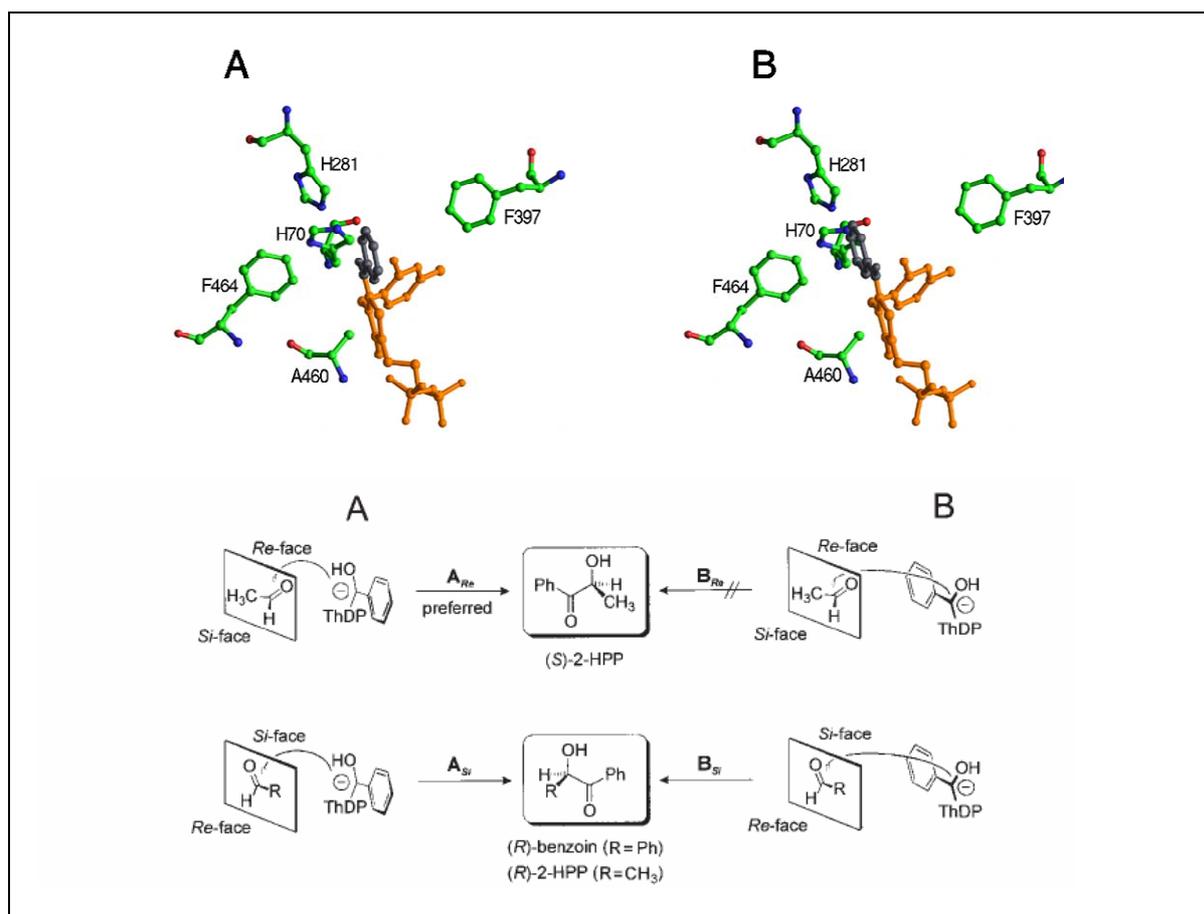


Abb.6: Enantioselektivität der BFD. Als Grundvoraussetzung wird angenommen, dass der Phenylring des „aktivierten Aldehyds“ coplanar zum Thiazoliumring des Cofaktors ausgerichtet ist, um eine Delokalisierung der Elektronen zu ermöglichen. Grundsätzlich sind dann zwei verschiedene Orientierungen (**A** und **B**) des Donors-ThDP Komplexes möglich. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem Phenylring des gebundenen Benzaldehyds und den Phenylringen der Aminosäuren F397 und F464 wird Orientierung **A** als die wahrscheinlichere angenommen. Bei dieser Ausrichtung kommt es zur bevorzugten Bildung von (*S*)-2-HPP aufgrund der favorisierten Orientierung des Carbonylkohlenstoffs des Akzeptors zum Phenylring des Donors. (*R*)-Benzoin und (*R*)-2-HPP werden geringfügig als Nebenprodukte gebildet [Iding *et al.*, 2000].

Wie bereits eingangs erwähnt, handelt es sich bei der durch die BFD katalysierte Carboligation um eine Nebenreaktion des Biokatalysators. Mittels gerichteter Evolution, welche den Vorteil bietet, dass die Kenntnis molekularer Struktur-Funktionsbeziehungen nicht gegeben sein muss, konnte von Lingen *et al.* 2002 eine Variante, PpBFDL476Q, erzeugt werden, welche eine fünffach erhöhte Carboligaseaktivität bezüglich (*S*)-2-HPP zeigt. Interessanterweise stellt diese Variante gleichzeitig die Lösung des „*ortho*-Problems“ dar. Die Mutation führte zu einer Variante, die *ortho*-substituierte Benzaldehyde als Acyldonoren akzeptiert [Lingen *et al.*, 2003].

Die mutagenisierte Position liegt nicht im aktiven Zentrum sondern auf einer dazu benachbarten Schleife. Letztendlich wird eine Erhöhung der Geschwindigkeit, mit der Substrat und Produkt das aktive Zentrum erreichen bzw. verlassen durch eine erhöhte

Flexibilität dieser Schleife als Ursache für die erhöhte Carboligase-Aktivität angenommen [Lingen *et al.*, 2002]. Die Erweiterung des Acyldonor-Spektrums durch die eingeführte Substitution ist nicht direkt erklärbar [Lingen *et al.*, 2003].

1.4 Die gerichtete Evolution von Biokatalysatoren

Die gerichtete Evolution ahmt die natürliche Evolution, das ungerichtete, zufällige Verändern von Eigenschaften mit anschließender Selektion („survival of the fittest“, bereits 1859 von Darwin beschrieben), in verkürzter Zeit in Laborexperimenten nach. Durch molekularbiologische Methoden wird dabei genetische Diversität in einem Zielgen erzeugt (1.4.1), die generierte Mutantenbank exprimiert und die korrespondierenden Proteinvarianten auf die gewünschte(n) Eigenschafte(n) hin untersucht. Dabei wird entweder ein Selektionsdruck erzeugt, oder jede einzelne Variante wird in einem entsprechenden Test geprüft (1.4.2). Die so identifizierten Varianten können zur weiteren Optimierung einem neuen Zyklus gerichteter Evolution unterzogen werden.

Spiegelman und Mitarbeiter führten bereits 1967 das Prinzip der „Evolution im Reagenzglas“ ein. Durch Chen & Arnold, 1993, sowie Roberts *et al.*, 1992, wurde dieses Prinzip erstmals für die Optimierung von Biokatalysatoren genutzt. Für die Anwendung dieser Methode sind weder Kenntnisse der Struktur noch von Struktur-Funktionsbeziehungen erforderlich [Roberts *et al.*, 1992; Chen & Arnold, 1993], welche jedoch mit Hilfe dieser Methode gewonnen werden können [Lee *et al.*, 2000]. Damit steht der Ansatz der gerichteten Evolution im Gegensatz zum rationalen Design, bei dem gezielt auf dem oben genannten Wissen aufbauend, Aminosäureaustausche in den Biokatalysator eingeführt werden [Bornscheuer & Pohl, 2001].

Inzwischen ist die gerichtete Evolution eine etablierte Technik, Biokatalysatoren zu optimieren, z.B durch Anpassung an die an sie gestellten Anforderungen bei dem Einsatz in Biotransformationen (pH, Temperatur, Lösungsmittel) [Bessler *et al.*, 2003; Sriprapundh *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004; Stephens *et al.*, 2006], Verbesserung der Aktivität [Ness *et al.*, 2002; Terao *et al.*, 2006], Veränderung der Substratspezifität [Cho *et al.*, 2004, Hancock *et al.*, 2006] und/ oder Optimierung der Stereoselektivität [Jaeger & Eggert, 2004; Reetz, 2006].

1.4.1 Erzeugen genetischer Diversität

Man unterscheidet bei den Methoden der gerichteten Evolution zur Erzeugung genetischer Diversität nicht-rekombinative und rekombinative Ansätze [Lutz & Patrick, 2004; Bloom *et al.*, 2005; Reetz, 2006], wobei die rekombinativen Methoden nochmals aufgeteilt werden können in Methoden zur Rekombination homologer Gene und nicht-homologer Gene.

Eine nicht-rekombinative Methode ist die fehlerhafte PCR (epPCR). Bereits 1989 beschrieb Leung *et al.* diese Methode zur Einführung zufälliger Mutationen. Von Cadwell und Joyce wurde sie weiter verbessert. Unter anderem durch veränderte $MgCl_2$ -Konzentrationen und die Zugabe von $MnCl_2$ kann die natürliche Fehlerrate der Taq-Polymerase, welche keine Korrekturfunktion besitzt, erhöht werden [Cadwell & Joyce, 1992]. Anstatt die Reaktionsbedingungen zu ändern, können auch andere Polymerasen mit höheren Fehlerraten eingesetzt werden [Cline & Hogrefe, 2000; Biles & Connolly, 2004]. Als Nachteil dieser Methode ist zu erwähnen, dass aufgrund des degenerierten genetischen Codes einige Aminosäureaustausche bevorzugt werden, während andere nicht zugänglich sind [Eggert *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006]. Um dieses Problem zu überwinden, wurden andere nicht-rekombinative Methoden entwickelt, die jedoch in ihrer Anwendung aufwendiger sind. Ein Beispiel ist die Sättigungsmutagenese, bei der Aminosäure(n) an einer oder an mehreren Positionen gegen alle natürlich vorkommenden Aminosäuren ausgetauscht werden. Dabei können alle 64 Basentriplets eingesetzt werden oder eine geringere Anzahl, bedingt durch die Degeneration des genetischen Codes [Airaksinen & Hovi, 1998; Georgescu, 2003], um den Aufwand beim anschließenden Screening zu minimieren. Bei *MAX-Randomization* werden nur 20 für *E. coli* optimierte Codons eingesetzt [Hughes *et al.*, 2003]. Einen guten Überblick über weitere Methoden bietet Wong *et al.*, 2006.

Aufgrund der einfachen und schnellen Anwendbarkeit stellt die epPCR immer noch den häufigsten Startpunkt für die gerichtete Evolution von Biokatalysatoren, bestätigt wird die Methode außerdem durch ihre durchaus erfolgreiche Anwendung bei der Optimierung von Thermostabilität [Stephens *et al.*, 2006], Stereoselektivität [Reetz *et al.*, 2004], Substratspezifität [Mahan *et al.*, 2004] und spezifische Aktivität [Kim *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005].

Vorreiter aller homologieabhängigen Rekombinationsmethoden ist das 1994 entwickelte DNA-Shuffling von Stemmer [Stemmer, 1994a, b]. Varianten eines Gens oder verschiedene, homologe Gene (Family Shuffling) [Cramer *et al.*, 1998] werden in einem DNase-Verdau

fragmentiert und die so entstandenen Teilstücke anschließend in einer PCR-ähnlichen Reaktion miteinander rekombiniert.

Mutationen, welche sich innerhalb eines epPCR-Ansatzes als nützlich herausgestellt haben bezüglich bestimmter Eigenschaften des zu evolvierenden Biokatalysators, können mit Hilfe des DNA-Shufflings miteinander kombiniert werden. Im Idealfall kommt es zur Vereinigung der Eigenschaften in einer Variante oder zur Addition und damit weiteren Verbesserung einer Eigenschaft. Solbak *et al.* erhielten 2005 so beispielsweise eine Variante, die eine höhere Thermostabilität aufzeigt als die im Vergleich zum Wiltyp bereits stabileren Ausgangsvarianten.

Werden homologe Gene miteinander rekombiniert (Family Shuffling) [Crameri *et al.*, 1998], eröffnet sich ein größerer Sequenzraum und damit größere Diversität. Allerdings ist die Methode, da sie auf Regionen mit Sequenzidentität für das Stattfinden von Crossovers basiert, auf Gene mit einer Sequenzübereinstimmung von mindestens 70-75 % beschränkt [Bloom *et al.*, 2005]. Von der Technik des DNA-Shufflings ausgehend wurden Variationen entwickelt. Dazu gehören auch Ansätze, bei denen statt durch einen DNase-Verdau generierte Fragmente ausgewählte Oligonukleotide in den Rekombinationsansatz eingesetzt werden, wie z.B. bei Degenerate Homoduplex Recombination [Coco *et al.*, 2002], Synthetic Shuffling [Ness *et al.*, 2002], ADO (*Assembly of Designed Oligonucleotides*) [Zha *et al.*, 2003] oder MUPREC (Multiplex-PCR-based recombination) [Eggert *et al.*, 2005]. Weitere Beispiele sind von Bloom *et al.*, 2005 und Lutz & Patrick, 2004 zusammengefasst worden.

Als erste Methode zur Rekombination nicht-homologer Sequenzen ohne Kenntnisse der Struktur der codierten Biokatalysatoren gilt ITCHY (*Incremental Truncation für the Creation of Hybrid Enzymes*) [Ostermeier *et al.*, 1999a, b; Lutz *et al.*, 2001a]. Es werden die zu rekombinierenden Gene einem Verdau mit der Exonuklease III unterzogen und anschließend die erhaltenen verkürzten Genfragmente miteinander fusioniert. So entstehen Gen-Chimären mit je einem Crossover. Ein ähnliches Prinzip verfolgt die Methode SHIPREC (*Sequence Homology Independent Protein Recombination*) [Sieber *et al.*, 2001]. SCRATCHY ist eine Kombination aus ITCHY und dem klassischem DNA-Shuffling, wobei die durch ITCHY erhaltenen Hybrid-Gene in einem DNA-Shuffling miteinander rekombiniert werden (Abb. 7). Die Fusionsorte der Hybride stellen die Orte der möglichen Crossover-Ereignisse dar [Lutz *et al.*, 2001b; Kawarasaki *et al.*, 2003; Griswold *et al.*, 2005]. Als weitere Methoden der nicht-homologen Rekombination sind z.B. SCOPE (*structure based combinatorial protein engineering*) [O'Maille *et al.*, 2002] oder SISDC (*sequence-independent site-directed*

chimeragenesis) [Hiraga & Arnold, 2003] zu nennen, im Gegensatz zu SCRATCHY sind hier allerdings strukturelle Daten erforderlich.

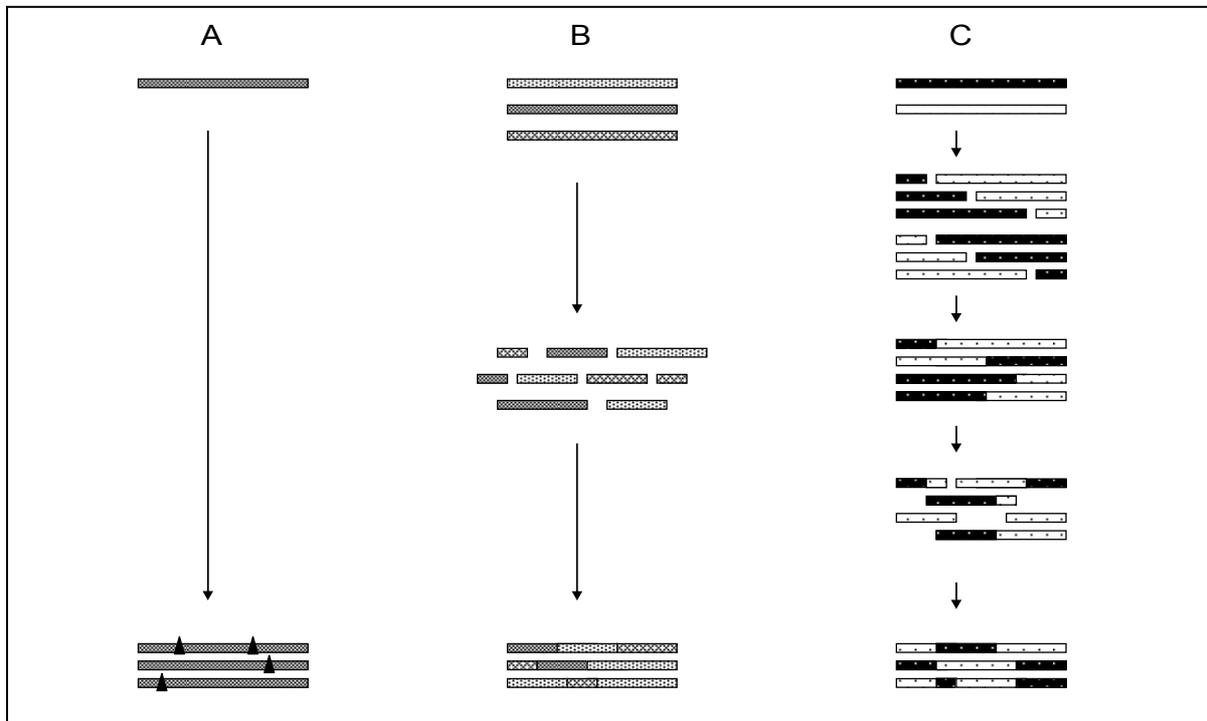


Abb. 7: Schematische Darstellung verschiedener Ansätze zur Erzeugung genetischer Diversität. **A** Nicht-rekombinativer Ansatz: zufällige Punktmutationen werden in das Zielgen eingeführt. **B** Rekombinativ-homologieabhängiger Ansatz: die homologen Ausgangsgene werden fragmentiert und anschließend durch PCR zufällig wieder verknüpft. **C** Rekombinativ-homologieunabhängiger Ansatz am Beispiel von SCRATCHY [Lutz *et al.*, 2001a]: Zwei Gene werden verdaut und die Fragmente unterschiedlicher Länge zufällig ligiert. Es entstehen chimäre Genvarianten, welche fragmentiert werden und durch ein PCR-ähnliches Verfahren zufällig wieder verknüpft werden. Schwarze Dreiecke stellen mutierte Genbereiche dar.

1.4.2 Identifizierung der optimierten Varianten

Die mittels molekularbiologischer Methoden generierten Mutanten müssen exprimiert und die korrespondierenden Enzymvarianten auf die gesuchte Eigenschaft hin getestet werden. Für die Einführung von Punktmutationen lässt sich eine theoretische Anzahl der zu erwartenden Varianten N unter Einbeziehen der Anzahl der Aminosäureaustausche M sowie Gesamtanzahl der Aminosäuren des Proteins X berechnen: $N = (19^M X!) / (X-M)! M!$. So ergibt ein Aminosäureaustausch für ein Modellprotein von insgesamt 300 Aminosäuren 5700 theoretisch mögliche Varianten, bei zwei Austauschen könnten es bereits 16.190.850 Varianten sein [Arnold, 1996].

Die Selektion kann am ehesten diesen enormen Zahlen gerecht werden, ihr größter Vorteil ist der hohe Durchsatz von bis zu 10^{10} Varianten [Brakmann, 2001; Taylor *et al.*, 2001]. Bei der

Selektion wird die Funktion der Variante (Phänotyp) direkt mit der zugrunde liegenden genetischen Information (Genotyp) verbunden. Es können intrazelluläre Expressionssysteme eingesetzt werden, aber auch Oberflächen-Displayssysteme. Werden die die Varianten kodierenden Gene in Mikroorganismen exprimiert, so kommt es zur Selektion, indem die korrespondierenden Enzyme den Organismen Wachstum unter selektiven Bedingungen ermöglichen, soweit sie die gewünschte Eigenschaft besitzen [Robertson *et al.*, 2004; Henning *et al.*, 2006]. Ein Beispiel für Display-Systeme ist das Phagen-Display [Aharoni *et al.*, 2005b]. Eine Selektion kommt dadurch zustande, dass die an der Oberfläche „präsentierten“ Proteine Bindungen mit (immobilisierten) Liganden eingehen. Diese Liganden können Analoge zu Zwischenprodukten der Katalyse oder Suizid-Inhibitoren sein [Widersten & Mannervik, 1995; Fernandez-Gacio *et al.*, 2003]. Inzwischen gibt es auch Display-Systeme mit denen auf Aktivität selektiert werden kann [Strobel *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2004].

Steht kein Selektionssystem zur Verfügung, müssen die Varianten mittels eines passenden Hochdurchsatz-Ansatzes (Screening) durchgemustert werden. Da dabei jede einzelne Variante auf die gewünschte Eigenschaft hin getestet wird, ist es wichtig, dass ein solcher Test schnell und möglichst automatisiert durchführbar ist [Bornscheuer, 2004]. Täglich können je nach System 1000 bis 10.000, insgesamt maximal $10^5 - 10^7$ Enzymvarianten getestet werden [Reetz, 2003]. Ein Screening basiert auf einem nachweisbaren Signal, welches durch die gewünschte Aktivität verursacht wird. Dabei kann bei einigen Ansätzen auch die Enantioselektivität der Katalyse bestimmt werden. Einen Überblick bietet hier Reetz, 2006. Einfach und schnell zu detektieren sind Farbänderungen, bzw. Wellenlängenänderungen, wie sie bei dem Einsatz von chromophoren oder fluorophoren Substraten beobachtet werden können. Hiermit kann nicht nur Aktivität überhaupt nachgewiesen, sondern direkt eine Kinetik der katalysierten Reaktion aufgenommen werden [Winkler & Stuckmann, 1979]. Ein Nachteil eines solchen Ansatzes ist allerdings, dass es sich bei den eingesetzten Substraten meist nicht um die später relevanten Substrate der Biokatalyse handelt. Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis von pH-Änderungen, verursacht durch die Biokatalyse, durch pH-Indikatoren [Deng & Chen, 2004; Liu *et al.*, 2006]. Anstatt ein chromophores Substrat einzusetzen, kann auch erst das Produkt der Katalyse durch Farbreagenzien nachgewiesen werden. Dies kann direkt geschehen [Breuer *et al.*, 2002] oder indirekt, indem das Produkt durch ein weiteres Enzym umgesetzt wird, was z.B. bei dem Nachweis enantioselektiver Enzyme Anwendung findet [Li *et al.*, 2004; Rejeb *et al.*, 2004]. Vorteil des direkten Nachweises ist sicherlich, dass keine Limitierungen durch zusätzlich eingesetzte Enzyme entstehen.

1.5 Aufgabenstellung

Betrachtet man chirale 2-Hydroxyketone als wichtige Synthone in der organischen Chemie, sind diese vor allem dann interessant, wenn sie zusätzliche funktionelle Seitenketten besitzen, die Folgereaktionen ermöglichen. Ziel dieser Arbeit war es (*S*)-2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiofenon, das Carboligationsprodukt aus Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd, zugänglich zu machen (Abb. 8).

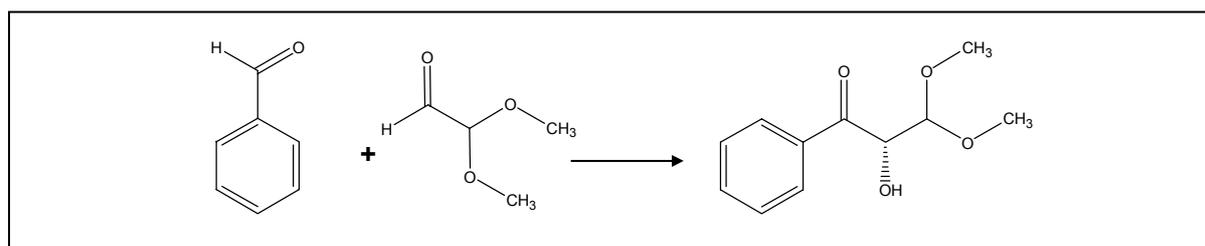


Abb. 8: Zielreaktion. Carboligation der Substrate Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd zu (*S*)-2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiofenon.

Die PpBFD ist ein wertvoller Katalysator für die Synthese von chiralen 2-Hydroxyketonen. Unter den auf ihr Carboligasepotential untersuchten Enzymen BAL und PDC zeigt die PpBFD als einzige eine (*S*)-selektive Katalyse (Abb. 5). Dabei ist das Spektrum der Akzeptoraldehyde allerdings auf Acetaldehyd beschränkt [Iding *et al.*, 2000].

Um die Zielreaktion mittels enzymatischer Katalyse zu etablieren, sollten drei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden.

(1) Über Datenbankrecherche sollten neue potenzielle BFD-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken identifiziert werden. Die kodierenden Gene sollten aus den entsprechenden Organismen isoliert, und die korrespondierenden Proteine bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften charakterisiert werden, sowie auf Katalyse der Zielreaktion untersucht werden.

Außerdem sollte die bereits bekannte PpBFD über Zufallsmutagenese bezüglich ihres Akzeptoraldehydspektrums optimiert werden.

(2) Zum einen sollte eine Sequenz-unabhängige rekombinative Methode etabliert werden, um die Rekombination der PpBFD mit strukturhomologen ThDP-abhängigen Proteinen zu ermöglichen und so neues Katalysepotential zu erschließen.

(3) Zum anderen sollte die PpBFD durch Einführung von Punktmutationen über fehlerhafte PCR auf die Zielreaktion optimiert werden. Die gewonnenen Ergebnisse sollten darüber hinaus zum Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen der BFD, als auch der Klasse der ThDP-abhängigen 2-Ketosäuredecarboxylasen beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A. Qualität bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg)

Chemikalien: Fluka (Sternheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St.Leon-Roth) bezogen, sowie auch T4-DNA-Ligasen und Klenow-Fragment. Turbo*Pfu*-Polymerasen wurden bei der Firma Stratagene (Heidelberg) erworben, Goldstar*Taq*-Polymerasen bei Eurogentec (Seraing, Belgien). Weitere Enzyme: Mungbohnen-Nuclease von New England Biolabs (MA, USA), Lysozym und Horse liver ADH (HlADH) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

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

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und alle verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide sind in Tab. 3, Tab. 4 und Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 3: Die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/ Bezugsquelle
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (λcI₈₅₇ ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Novagen, Madison, USA
<i>E.coli</i> XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZM15 Tn10 Tetr]</i>	Stratagene, Heidelberg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig

Tab. 4: Übersicht der für *E.coli* verwendeten Vektoren

Vektor	genetische Marken	Referenz/ Bezugsquelle
pET22b	ColE1 P _{T7lac} Amp ^r	Novagen, Madison, USA
pET28a	ColE1 P _{T7lac} Kan ^r	Novagen, Madison, USA

Tab. 5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Alle pET- und pKK- Konstrukte beinhalten eine C-terminale His-Tag Fusion.

Rekombinante Plasmide	Beschreibung	Referenz
pUC_BjBFD	pUC19 mit <i>mdlC</i> aus <i>B. japonicum</i> , kloniert über <i>SmaI</i> / <i>HindIII</i>	diese Arbeit
pET_BjBFD	pET22b mit <i>mdlC</i> aus <i>B. japonicum</i> , kloniert über <i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>	diese Arbeit
pET_PaBFD	pET22b mit <i>mdlC</i> aus <i>P. aeruginosa</i> , kloniert über <i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>	diese Arbeit
pKK_PpBFD	pKK233-2 mit <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> , kloniert über <i>NcoI</i> / <i>BglII</i>	Iding <i>et al.</i> , 2000
pET_PpBFD	pET28a mit <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> , kloniert über <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pET_PpBFD-ApaI	pET28a mit <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> ohne interne <i>ApaI</i> Schnittstelle, kloniert über <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pKK_BAL	pKK233-2 mit <i>bznB</i> aus <i>P. fluoreszens</i> , kloniert über <i>NcoI</i> / <i>BglII</i>	Janzen, 2002
pET_BAL	pET22b mit <i>bznB</i> aus <i>P. fluoreszens</i> , kloniert über <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pET_BAL-NcoI	pET28a mit <i>bznB</i> aus <i>P. fluoreszens</i> ohne interne <i>NcoI</i> Schnittstelle, kloniert über <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pKK_PpBFDL476Q	pKK233-2 mit <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> mit L476Q Substitution, kloniert über <i>NcoI</i> / <i>HindIII</i>	Lingen <i>et al.</i> , 2002
pET_PpBFDL476Q	pET28a mit <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> mit L476Q Substitution, kloniert über <i>NcoI</i> / <i>HindIII</i>	diese Arbeit
pET_PpBFD55E4	wie pET_PpBFDL476Q, <i>mdlC</i> -Gen mit A255G und I260T Substitution, kloniert über <i>NcoI</i> / <i>HindIII</i>	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma THERMO (Ulm) bezogen und sind im Detail in der Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name	DNA-Sequenz (5'-3' Richtung)	Merkmale/ Modifikationen
BjBFD_NdeI	ATAT CATATGA AGAACAAGATCAACGGCCGTC	<i>NdeI</i>
BjBFD_HindIII	ATATA AGCTT CACCTTCCCGTCCACCATTACCTCG	<i>HindIII</i>
PaBFD_NdeI	ATAT CATATG AAAACCGTCCATTCCGCG	<i>NdeI</i>
PaBFD_HindIII	ATATA AGCTT TGGGTTCGATGGTTTGCGTCG	<i>HindIII</i>
PpBFD_NcoI	ATAT CCATGG CTTCGGTACACGGCACCACATAC	<i>NcoI</i>
PpBFD_HindIII	ATATA AGCTT TCTTCACCGGGCTTACGGTGCTTAC	<i>HindIII</i>
PpBFD_XhoI	ATAT CTCGAG CTTCACCGGGCTTACGGTG	<i>XhoI</i>
pET28_MP_NcoI	CTTTAAGAAGGAGATATATA CCATGG	<i>NcoI</i>
PpBFD_MP_621	GACGTCCGG <u>A</u> CCCAGGACGATCG	G → A
MP_up_1PCR	TTGTGGTGACCGT CCATGG CGATGATTAC	<i>NcoI</i>
MP_down_1PCR	GGGCGCCGCCAT <u>C</u> GCGACC	G → C
MP_up_2PCR	TTGTGGTGACCGTCC	
MP_down_2PCR	ATAT CTCGAG TGCGAAGGGGTCCATGC	<i>XhoI</i>
pKK233-2for	CACACAGGAAACAG CCATGG	<i>NcoI</i>
pKK233-2rev	TCCGCCAAAACAG CCAAGCTT	<i>HindIII</i>
OvEx_255_up	GATGCCA <u>NS</u> GGCATCGCAGCGATTTCTCAG	
OvEx_255_low	CTGAGAAATCGCTGCGATGCC <u>SNNT</u> TGGCATC	
OvEx_260_up	GATGCCAGCTGGCATCGCAGCG <u>NNST</u> CTCAG	
OvEx_260_low	CTGAGAS <u>NN</u> CGCTGCGATGCCAGCTGGCATC	

Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt, Basensubstitutionen unterstrichen dargestellt. Der Buchstabe „N“ steht für alle 4 möglichen Basen, der Buchstabe „S“ für dGTP und dCTP.

2.4 Nährmedien

LB-Medium: 10g/l Trypton; 10g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt

TB-Medium: 900 ml Lösung 1 + 100 ml Lösung 2 + 4 ml Glycerin

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

Lösung 2 (10x): 23g/l KH₂PO₄; 164g/l K₂HPO₄

Die Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert. Die drei Komponenten des TB-Medium werden erst nach dem Autoklavieren zusammengegeben. Nicht-hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) und dem Medien nach dem Erkalten zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurde zu den entsprechenden Flüssigmedien vor dem Autoklavieren 1,5% Agar gegeben.

2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.5.1 Schüttelkolbenkultivierung

Kulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium angelegt und bei 37°C bebrütet. Überexpressionskulturen wurden in TB-Medium angezogen. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg) angezogen. Flüssigkulturen größerer Volumina wurden in Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler (GFL, Burgwedel) bei 150 UpM bebrütet. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyerkolbens betrug maximal 1:5. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h kultiviert. Hauptkulturen wurden jeweils aus einer Übernachtskultur mit 1/100 Volumen angeimpft. Zur Expression der heterologen Gene wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase bei dem Erreichen einer OD₅₈₀ = 0,6 – 1 durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,8-1 mM) induziert. Stämme mit Plasmid-kodierten Resistenzmarkern wurden stets unter Selektionsdruck durch Zugaben von 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin kultiviert. Zur dauerhaften Lagerung der Stämme wurden Übernachtskulturen mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

2.5.2 Hochzelldichte (HZD)-Fermentation

Die HZD-Fermentation wurde wie unter Detry *et al.*, 2006, angegeben durchgeführt.

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von Plasmid-Isolationskits der Firmen Qiagen (Hilden) und Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Chromosomale DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) aus Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 und *B. japonicum* USDA isoliert. In allen Fällen wurde gemäß Herstellerangaben vorgegangen. Die Konzentration der DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.7 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3 M Kaliumacetat-Lösung und 900 µl Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei -80°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation (14.000 UpM, 4°C). Das gewonnene Pellet wurde mit Ethanol 70% gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 14.000 UpM, RT) wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (Univapo 150). Das getrocknete Pellet wurde anschließend in A. dest aufgenommen.

2.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA, sowie zur gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989, in 0,8 – 2 %igen (w/v) Agarosegelen. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Größenstandard wurde die „1kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „EagleEye II“ der Firma Stratagene (Heidelberg) zusammen mit dem Drucker „Gel Jet Imager Plus“ der Firma Intas (Göttingen) genutzt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.9 *In vitro* Rekombination von DNA

Die Restriktion und die Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme durchgeführt. Die Reaktionen wurden in den mitgelieferten Puffern angesetzt.

2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

2.10.1 Chemische Transformation von *E.coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli* BL21(DE3)-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach der RbCl-Methode von Hanahan (1983) durchgeführt.

2.10.2 Elektroporation von *E.coli*

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Bei einer $OD_{580} = 0,4 - 0,7$ wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt und anschließend pelletiert (5000 UpM, 15 min, 4°C). In zwei Schritten wurde das Pellet mit abnehmenden Volumina eiskaltem, 10% igem Glycerol gewaschen (250 ml, 20 ml) und nach einer letzten Zentrifugation in 2 ml eiskaltem, 10% igem Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Elektroporation wurde mit Hilfe des MicroPulsers (BioRad, München) durchgeführt gemäß dem durch den Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll (BioRad, München). Nach der Elektroporation wurden die Zellen direkt in LB-Medium aufgenommen und nach Inkubation bei 37°C für 60 min auf Agar-Selektivmedium ausplattiert.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.11.1 Standard-PCR-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.*, 1988, durchgeführt. Standardmäßig wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

1 ng Matrizen-DNA (Plasmid oder genomische DNA), 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U Turbo*Pfu*-Polymerase. Die PCR-Reaktionen wurden in dem entsprechenden Puffer des Herstellers angesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in dem PCR-Automaten „Mastercycler gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Dabei kam folgendes Programm zur Anwendung: 1x (5 min 98°C), 35x (1 min 95°C, 1 min X°C, 1,5 min 72°C) und 1x (7 min 72°C). Die Annealing-Temperatur (X) wurde dabei den entsprechenden Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepaßt.

Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das „NucleoSpin Extract“-Kit der Firma Macherey & Nagel (Düren) nach Herstellervorschrift angewendet.

2.11.2 Ortsspezifische Mutagenese

Zielgerichtete Basenaustausche wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden in die zu mutagenisierenden Sequenzen eingeführt. Zum einen wurde nach der „Megaprimer“-Methode nach Baretino *et al.*, 1994, vorgegangen. Diese Methode wurde angewendet, um die interne *ApaI*-Schnittstelle im die PpBFD kodierenden Gen *mdlC* zu eliminieren. Dabei wurde in einer ersten Standard-PCR-Reaktion (2.10.1) ein Megaprimer synthetisiert, der durch den eingesetzten Mutagenese-Primer PpBFD_MP_621 die gewünschte Punktmutation enthielt. In dieser Reaktion wurde als weiteres DNA-Startermolekül der flankierender Primer pET28_MP_NcoI eingesetzt, zum Mutageneseprimer entgegengesetzt orientiert, und als Matrizen-DNA das Konstrukt pET_PpBFD. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde zur Amplifizierung des kompletten Gens der Megaprimer zusammen mit zwei das zu mutagenisierende Gen flankierenden Oligonukleotiden eingesetzt, pET_PpBFD und PpBFD_XhoI. Als Matrizen-DNA wurde pKK_PpBFDL476Q gewählt, so dass der flankierende Primer, welcher bereits in der ersten PCR eingesetzt worden war, nur an den Megaprimer binden konnte. So wurde eine Amplifizierung der Wildtyp-Sequenz vermieden.

In einem zweiten Ansatz zur Eliminierung der internen *NcoI*-Schnittstelle des *bznB*-Gens, welches die BAL kodiert, wurde die Megaprimer-Methode derart abgewandelt, dass ein Wechseln der Matrizen-DNA zwischen erster und zweiter PCR unnötig wurde. In der ersten PCR-Reaktion wurden die beiden Startermoleküle MP_up_1PCR und MP_down_1PCR eingesetzt. MP_down_1PCR diente dabei als Mutagenese-Primer. Das zweite Oligonukleotid MP_up_1PCR hingegen trug eine künstliche Sequenz stromaufwärts des Startcodons, welche in der zweiten PCR dem darauf abgestimmten Oligonukleotid MP_up_2PCR als Hybridisierungssequenz diente. Dadurch wurde ein Wechsel der Matrizen-DNA pET_BAL

vermieden. In der zweiten PCR wurde zusätzlich der das Gen stromabwärts flankierende Primer MP_down_2PCR eingesetzt, um die Amplifizierung des Volllängenprodukts zu ermöglichen. Die einzelnen PCR-Reaktionen wurden gemäß dem Protokoll der Standard-PCR (2.11.1) durchgeführt.

2.11.3 Fehlerhafte PCR (epPCR)

Es wurde eine Fehlerrate von 2-4 Basensubstitutionen pro Gen durch folgenden Reaktionsansatz erreicht: 5 pmol von jedem Oligonukleotid, 75 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,8), 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 MgCl₂, 0,5 mM MnCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,01% Tween 20, 1 ng Matrizen-DNA, 10 U Goldstar *Taq*-Polymerase (2.1). Die PCR Reaktion wurde wie unter 2.10.1 durchgeführt. Als Template diente das Konstrukt pKK_PpBFDL476Q, als Primer die Oligonukleotide pKK233-2for und pKK233-2rev. Durch mehrere parallele epPCR Ansätze, welche anschließend vermischt wurden, wurde eine höhere Diversität der eingeführten Mutationen gesichert.

2.11.4 Sättigungsmutagenese

Die Sättigungsmutagenese an den Aminosäurepositionen 255 und 260 des die PpBFD kodierenden Gens md1C wurde mit der Methode der overlap-extension PCR durchgeführt. Diese empfiehlt sich bei Mutagenesen, bei denen die zu verändernde Position im mittleren Sequenzbereich liegt [Georgescu *et al.*, 2003]. In einer ersten PCR wurden die gewünschten Substitutionen eingeführt, indem die zu mutagenisierende Position durch zwei sequenzhomologe Mutagenese-Oligonukleotide, allerdings unterschiedlicher Orientierung, abgedeckt wurde. Als Template diente das Konstrukt pET28_L476Q. Als Primer wurden für die Position 255 die Oligonukleotide OvEx_255_up und OvEx_255_low eingesetzt, für die Position 260 OvEx_260_up und OvEx_260_low. Die beiden entgegengesetzt orientierten Mutagenese-Primer wurden in zwei getrennten PCR-Reaktionen entsprechend mit einem der beiden das Gen flankierenden Primern PpBFD_NcoI und PpBFD_HindIII eingesetzt, sodass nach dem 1. Schritt der Overlap-Extension-PCR zwei Produkte vorlagen: der stromaufwärts von der zu mutagenisierenden Position liegende Bereich des Gens, sowie der stromabwärts liegende Bereich. Durch die Mutagenese-Oligonukleotide besaßen die beiden Teilstücke einen überlappenden Sequenzbereich, über die sie in einer zweiten PCR, in der beide Teilstücke als Template-DNA und die flankierenden Primer zusammen eingesetzt wurden, miteinander

hybridisieren. Alle PCR-Reaktionen wurden nach dem Protokoll der Standard-PCR durchgeführt. Die Annealing-Temperatur der ersten Reaktion betrug 65°C, die der zweiten 60°C.

2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.13 Herstellen von ITCHY Bibliotheken

Die Konstrukte pETBFD-ApaI und pETBAL-NcoI wurden mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* / *NcoI* bzw. *ApaI* / *XhoI* gemäß Herstellerangaben behandelt. Die daraus resultierenden DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und die BFD bzw. BAL kodierenden Fragmente mittels Gelelektion für die weitere Anwendung vom restlichen Ansatz getrennt. Der Verdau der Fragmente mit der Exonuklease III wurde gemäß dem Protokoll von Ostermeier & Lutz, 2003, durchgeführt mit einer Verdau-Rate von 50 bp/min, wobei alle 30 sec ein 1 µl Aliquot entnommen wurde. Die Reaktionen mit der Mung-Bohnen-Nuklease und dem Klenow-Fragment zur Erzeugung von glatten Enden wurde nach Ostermeier & Lutz, 2003, und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die notwendigen Umpufferungen zwischen den einzelnen Enzymreaktionen wurde die DNA über eine Ethanol-Fällung präzipitiert.

2.14 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) spektralphotometrisch (UV/ VIS Spektrophotometer 16A, Bechmann Instruments GmbH, München) bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.15 TCA-Fällung von Proteinen

1/10 Volumen einer 10 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat-Lösung wurden zur proteinhaltigen Lösung gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 1/10 Volumen einer 70 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und der Ansatz für eine

Stunde auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert (RT, 13.000 UpM) und das Pellet zweimal mit eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen und anschließend über Nacht getrocknet. Die Proteine wurden in 15 µl SDS-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH6,8; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03% (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen.

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970), welches sich aus einem 5% igem Sammelgel und einem 12 % igem Trenngel zusammensetzte. Dazu wurde die „Mini-Protean II Dual Slap Cell“-Gelapparatur der Firma BioRad (München) bei einer Spannung von 120V verwendet. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH6,8; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03% (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und 10 min bei 99°C denaturiert. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Elektrophorese durch eine TCA-Fällung präzipitiert und in A. dest aufgenommen. Die aufgetrennten Gele wurden mit „PageBlue“ der Firma Fermentas (St.Leon-Roth) gefärbt.

2.17 Chromatographische Reinigung der Benzoylformiatdecarboxylasen

Die Reinigung der Proteine erfolgte nach der intrazellulären Expression der korrespondierenden Gene mit Hilfe der Vektoren pET_PpBFDL476Q, pET_PaBFD und pET_BFD55E4 im heterologen Wirt *E.coli* BL21(DE3) als C-terminale Poly-Histidin-Fusionsproteine mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) nach Porath *et al.*, 1975. Nach der Expression im 3 L -Maßstab wurden die enzymhaltigen Zellen durch Zentrifugation geerntet (Sorvall „SLC-4000“, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, 5.000 UpM, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde in Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP) resuspendiert, sodass eine 30%ige (w/v) Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (200 W, 15 min) und die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B, SS34, 16.000 UpM, 30 min, 4°C) abgetrennt. Der dabei erhaltene Überstand wurde filtriert (Porengröße 5 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) und anschließend über eine mit mindestens 5 Säulenvolumen equilibrierte „NiNTA superflow“-Säule (40 ml Säulenvolumen, Qiagen,

Hilden) mit einer Flußrate von 2-3 ml/min gepumpt. Die Säule wurde mit Wasch-Puffer (50 mM KPi pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP, 20 mM Imidazol) gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm konstant blieb und anschließend mit Elutions-Puffer (50 mM KPi pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP, 250 mM Imidazol) bei einer Flußrate von 2-3 ml/min eluiert. Das BFD-haltige Eluat wurde zur Entsalzung direkt auf eine mit 2,5 Säulenvolumen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM, pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP) equilibrierte „Sephadex G-25 Medium“-Säule (1L Säulenvolumen, Amersham-Biosciences, Freiburg) gepumpt. Diese wurde mit dem Equilibrierungspuffer bei einer Flußrate von 5 ml/min gespült und die Proteinelutionsfraktion aufgefangen. Das Eluat wurde lyophilisiert und das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

2.18 Nachweis und Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.18.1 Decarboxylaseaktivität

Die Bestimmung der Decarboxylaseaktivität erfolgte durch einen gekoppelten enzymatischen Test. Dabei wird von der BFD Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO₂ umgesetzt. Der entstehende Benzaldehyd wird durch ein Hilfsenzym, der ADH aus Pferdeleber (HIADH), unter NADH Verbrauch zum Alkohol reduziert [Weiss *et al.*, 1988]. Die Abnahme des NADH wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt. Durch einen Überschuß an HIADH wurde gewährleistet, dass die Aktivität der Decarboxylase limitierend und somit die Abnahme der NADH-Konzentration direkt proportional zu dieser war. Die Messung erfolgte bei 30°C, wobei der Ansatz (950 µl Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 6, Benzoylformiat 5 mM, NADH 0,35 mM, HIADH 5 U) 5 min vorinkubiert wurde. Der Test wurde durch Zugabe der BFD (50 µl) gestartet und die Änderung der Extinktion über 90 sec verfolgt. Die Enzymaktivität [U/ml] berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{min} * \frac{V_{ges}}{V_{Probe} * d * \epsilon_{NADH}} * f$$

ΔE = Änderung der Absorption

V_{ges} = Gesamtvolumen (1 ml)

V_{Probe} = Probenvolumen (50 µl)

f = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ϵ_{NADH} = molarer Extinktionskoeffizient für NADH (6,3 L*mmol⁻¹*cm⁻¹) bei $\lambda=340$ nm

Als 1 U ist die Enzymmenge definiert, die 1 μmol Substrat pro Minute bei 30°C umsetzt. Die Konzentration der Enzymlösung wurde so eingestellt, dass die Abnahme der Absorption als Gerade über den gesamten Zeitraum von 90 sec beobachtet werden konnte.

2.18.1.1 Bestimmung des pH-Optimums

Mit dem gekoppelten Test konnte das pH-Optimum der PaBFD zwischen pH 5 und pH 9 untersucht werden, unter der Berücksichtigung der Stabilität des NADH, sowie der Aktivität des Hilfsenzym HIADH. Die Aktivität der PaBFD wurde bei pH 5; 6; 6,5; 7, 8 und 9 und bei 30°C bestimmt. Die höchste Aktivität wurde bei einem pH von 6,5 gemessen.

2.18.1.2 Substratspektrum der Decarboxylierung

Die nicht natürlichen Substrate der BFD wurden ebenfalls mit Hilfe des gekoppelten Assays untersucht. Auch hier konnte die HIADH als Hilfsenzym eingesetzt werden. Die Substrate wurden mit einer Konzentration von 30 mM eingesetzt, mit Ausnahme von Benzoylformiat. Dieses Substrat wurde mit 15 mM eingesetzt, da ansonsten die Eigenabsorption zu hoch gewesen wäre. Für die Messungen wurde in allen Fällen eine Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ ml eingesetzt. Für alle Substrate wurde eine parallele Blindmessung ohne Enzym durchgeführt, um etwaige nicht-enzymatische Effekte auszuschließen.

2.18.2 Carboligaseaktivität

Die im Folgenden beschriebenen Messungen wurden von dem Arbeitskreis M. Müller, Institut für pharmazeutische Chemie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, durchgeführt.

Chirale HPLC

200 μg bis 500 μg Enzym wurden in 1,2 -1,5 ml Batch-Ansätzen (Kaliumphosphatpuffer 50mM, pH7, 0,1 mM ThDP, 2,5 mM MgSO_4 , 20% DMSO) zusammen mit den entsprechenden Aldehyden (5 – 500 mM) bis zu 96 Stunden bei 30°C und 300 UpM auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion der Ansätze mit 200-300 μl Ethylacetat gestoppt. Die Konzentration der Produkte und deren *ee* wurden mittels chiraler HPLC bestimmt (Chiracel OD-H, Daicel, Düsseldorf). Als Laufmittel

diente Hexan/ Isopropanol (90:10), die Flussrate betrug 0,5 ml/ min, die Temperatur lag bei 40°C. Die Retentionszeiten betragen für das gemischte Produkt DMA-HPP 15,1 und 16,4 min, für Benzoin 20,3 und 28,5 min. Das jeweilige (*S*)-Enantiomer eluierte zuerst von der Säule. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Eichgeraden. Dabei wurde die Gesamtarea gemessen bei den Wellenlängen 254 nm, 210 nm und 280 nm berücksichtigt. Als Standard für DMA-HPP diente das durch die BAL zugängliche (*R*)-DMA-HPP.

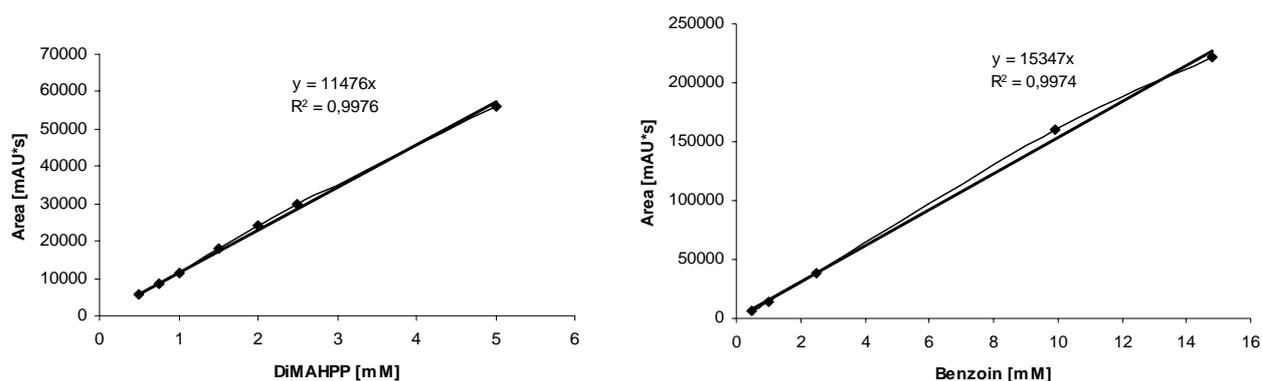


Abb. 9: Eichgeraden zur Quantifizierung von Benzoin und DMA-HPP. Zur Quantifizierung wurde die Gesamtarea detektiert bei den Wellenlängen 254nm, 210nm und 280nm herangezogen. Injiziert wurden 5 μ l. Als Standard für DMA-HPP diente das durch die BAL zugängliche (*R*)-DMA-HPP.

GC/ MS

GC/ MS-Spektren wurden mit dem Agilent Technologies 6890 N Series GC-System, sowie dem 5973 Network Mass Selective Detector aufgenommen. Es wurde die Säule CS 22545030 (FS-Supreme-5, ID 0,25 mm, Länge 30 m, df 0,25 μ m) verwendet. Als Trägergas wurde Helium (1 ml/ min, konstanter Fluss) eingesetzt, der Injektor im Split-Modus (41,7:1, 250°C), TGC (Injektor) = 250°C, TMS. Das Temperaturprogramm M1-300 (19 min) lautete: T 0 min = 60°C, T 3 min = 60°C, T 14 min = 280°C (Aufheizrate: 20°C/ min), T 19 min = 280°C. MS-Parameter: EI (70eV), Ionenquelle 230°C, Quadrupol 150°C, Transfer Line 300°C, detektierter Massenbereich 50-300 amu (M-300). Für die Probenvorbereitung wurden 60 μ l eines 0,5 – 1ml Ansatzes (s. HPLC-Ansätze) mit 300 μ l Ethylacetat (und 100 μ l gesättigter NaCL-Lösung) versetzt und gut geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation wurde die Probe der oberen organischen Phase entnommen. Die Retentionszeit für 2-HPP beträgt 8,05 min, für Benzoin 11,59 min.

2.18.3 High throughput screening (HTS) Assay zum Nachweis von Carboligaseaktivität

Die in *E.coli* BL21 (DE3) transformierte epPCR Bibliothek wurde zunächst auf LB_{Kan} Agarplatten ausplattiert. Einzelkolonien wurden in 96er Mikrotiterplatten übertragen (DW-MTP, 2 ml Greiner Bio-one, Frickenhausen), welche zuvor mit 100 µl LB_{Kan} pro Well befüllt worden waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 600 UpM auf einem Mikrotiterplattenschüttler (TiMix 5, Edmund Bühler GmbH, Hechingen) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden jeweils 600 µl LB_{Kan} zugegeben. Nach weiteren 2,5 h Inkubation auf dem Brutschüttler (37 °C, 600 UpM) wurde die Expression der Proteinvarianten durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,8 mM) induziert. Die Kulturen wurden weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die Lagerung der epPCR Bibliothek wurden die angezogenen Klone mit Hilfe eines Impfigels auf LB_{Kan}-Agarplatten transferiert. Nachdem eine solche Kopie der Klone erstellt worden war, wurden die Zellen für den folgenden Zellaufschluß abzentrifugiert (Hettich Rotina 35R, 4000 UpM, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 300 µl Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH7) mit Cofaktoren (ThDP 1 mM, MgSO₄ 5mM) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von Lysozym (1 mg/ ml Endkonzentration) und Inkubation bei 37 C° für 30 min auf dem Brutschüttler (600 UpM). Anschließend wurden je 100 µl Zellsuspension in eine neue Mikrotiterplatte (0,5 ml, Greiner Bio-one, Frickenhausen) transferiert. Zu jedem Well wurden zusätzlich 100 µl Substratlösung (Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 7, 40 % DMSO, 40 mM Benzaldehyd, 120 mM Dimethoxyacetaldehyd) gegeben. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurden 100-200µl des Ansatzes in eine neue Mikrotiterplatte (0,5 ml, Greiner Bio-one, Frickenhausen) übertragen, in die zuvor bereits 10 µl 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (0,4 % in EtOH) pro Well vorgelegt worden waren. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von jeweils 30 µl 3M NaOH gestartet.

2.19 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramme „Clone Manager für Windows 7.0“ und „Plasmid MapEnhancer 3.0“ (Scientific and Educational Software, Durham, USA), sowie „Translate“ des Servers „Expasy“. Homologie- und Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm ClustalW über den Server EBI durchgeführt. Datenbankrecherchen wurden mittels der Internet-Datenbank des

„National Center for Biotechnology Information“ mit den BLAST-Algorithmen durchgeführt [Altschul *et al.*, 1997, Schäffer *et al.*, 2001].

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners (HP Precisionscan Pro 3.1, Hewlett Packard, Böblingen) und einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Dies trifft auf die bei der Agarosegelelektrophorese, SDS-PAGE Analyse und im HTS-Assay gewonnenen Ergebnisse zu. Bei der Datenerfassung sowie deren Bearbeitung, wurden keine inhaltlichen Veränderungen der Abbildungen vorgenommen.

Die Abbildung 23 wurde von Herrn M. Knoll des Arbeitskreises Pleiss, Institut für technische Biochemie, Universität Stuttgart, mit dem Programm Pymol (Version 0.98) angefertigt und zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen

In frei zugänglichen Datenbanken steht in Form von DNA-Sequenzen aus Sequenzierprojekten eine große Zahl neuer Enzyme zur Verfügung. Neben Einzelsequenzen sind vollständig sequenzierte Genome vom Einzeller bis zum Säugetier hin veröffentlicht. Bei den Mikroorganismen überwiegen hierbei aufgrund ihres wirtschaftlichen Interesses Pathogene und Extremophile. Mittels Datenbankrecherche sollten neue Benzoylformiatdecarboxylasen (BFDs) und deren Katalysepotential zugänglich gemacht werden.

3.1.1 Datenbankrecherche mit Protein-Protein BLAST

Die Datenbankrecherche wurde mit Hilfe des Suchprogramms Protein- Protein BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (blastp) [Altschul *et al.*, 1997; Schäffer *et al.*, 2001] durchgeführt [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/]. Bei Eingabe einer Aminosäuresequenz wird diese mit allen zur Verfügung stehenden Sequenzen, bzw. den übersetzten Aminosäuresequenzen aus den öffentlichen Datenbanken PDB, SwissProt, PIR und PRF, sowie den übersetzten kodierenden Sequenzen der GenBank verglichen. Als Ausgangsequenz diente dabei die Primärsequenz der bereits bekannten BFD aus *Pseudomonas putida* (PpBFD).

Unter Berücksichtigung der Zugänglichkeit der Gene und möglicher Schwierigkeiten bei der Expression (Archaea, Anaerobier) wurden zwei putative BFD kodierende Sequenzen für weitere Untersuchungen ausgewählt: das Gen *mdlC* aus dem fakultativ pathogenen Stamm *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (1587bp), sowie das Gen *mdlC* aus dem symbiontischen Mikroorganismus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (1662bp). Beide sind als BFD codierende Gene annotiert [Stover *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002], wobei eine BFD-Aktivität im Rahmen des Mandelatabbauweges aus *P. aeruginosa* bereits bekannt ist [Barrowman *et al.*, 1986]. Im weiteren Verlauf werden die Enzyme kurz als PaBFD (BFD aus *P. aeruginosa*) und BjBFD (BFD aus *B. japonicum*) bezeichnet.

3.1.2 Vergleich der Primärstrukturen der PaBFD und der BjBFD mit der PpBFD

Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenz der PaBFD mit der bekannten PpBFD zeigt eine Übereinstimmung von 332 Aminosäuren (AS) (63 %). Die Primärstrukturen der beiden Pseudomonaden BFDs bestehen zudem aus insgesamt 528 AS. Die Aminosäure-Sequenz der BjBFD umfasst 553 AS und zeigt bei einem Vergleich mit der PpBFD 166 identische Aminosäuren (31 %). Mittels des Sequenzvergleichs wurden bestimmte Positionen und Regionen, welche für die Katalyse ThDP-abhängiger Enzyme und im Speziellen für die PpBFD bekannt sind, betrachtet (Abb. 10). Tabelle 7 fasst die wichtigsten Regionen/Positionen der PpBFD sowie deren Entsprechungen in den beiden putativen BFD zusammen.

Tab. 7: Vergleich der Primärstruktur-Positionen katalytisch wichtiger Reste der PpBFD und den putativen BFDs PaBFD und BjBFD. Die dargestellten Daten wurden mit Hilfe eines Sequenzvergleichs, erstellt mit dem Programm ClustalW, ermittelt.

Funktion in der PpBFD	Aminosäuren (Position)			Referenz
	PpBFD	PaBFD	BjBFD	
Bindemotiv für zweiwertiges Metallion	GDG...N (428... 455)	GDG...N (428...455)	GDG...N (450...478)	Hasson <i>et al.</i> , 1998
Interaktion mit N ¹	E (47)	E (47)	E (47)	Hasson <i>et al.</i> , 1998
Interaktion mit N ⁴	G (401)	G (401)	G (401)	Hasson <i>et al.</i> , 1998
Decarboxylierung/ Carboligation	H (70) H (281)	H (70) H (281)	H (75)	Siegert, 2000; Polovnikova <i>et al.</i> , 2003; McLeish <i>et al.</i> , 2004
Substratbindung/ Decarboxylierung	S (26)	S (26)	T (28)	Polovnikova <i>et al.</i> , 2003 McLeish <i>et al.</i> , 2004
Substratspezifität/ Enantioselektivität	A (460) F (464)	A (460) F (464)	I (460) R (464)	Siegert <i>et al.</i> , 2004, 2005

PpBFD	---MASVHGTTYELLRRQGIDTVFGNPGS N ELPFLKDFP--EDFRYILALQ E ACVVGIAD	55
PaBFD	---MKTVHSASYEILRRHGLTTVFGNPGS N ELPFLKDFP--EDFRYILGLH E GAVVGMAD	55
BjBFD	MKNKITGRSAFLALLKDEGITHLFGNPGT T ELPIMHALKDHPDLTYVVMAMQ E SLVVAIAD	60
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	GYAQASRKPAFINL H SAAGTGAMGALSNAWNSHSPLIVTAGQQTRAMIGVEALLTNVDA	115
PaBFD	GFALASGRPAFVNL H AAAGTGNGMGALTNAWYSHSPLVITAGQQVRSMIGVEAMLANVDA	115
BjBFD	GYSRASGKLVACNV H VAPGLGNAMGSLYNAQFTGTPMILTAGQ Q EGHGLMEPVLYGP-L	119
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	ANLPRPLVKWSYEPASAAEVPHAMSRAIHMASMAPQGPVYLSVPYDDWDKDADPQSHHLF	175
PaBFD	GQLPKPLVKWSHEPACAQDVPRALSQAIQTASLPPRAPVYLSIPYDDWAQPAPAGVEHLA	175
BjBFD	VRMAEPLVKWAVEVTRLEDLPRIVRRAAKVAMTPPTGPVVISLPGDILNSEAG--IDLGR	177
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	DRHVSSSVRLNDQDLIDLKALNSASNPAIVLGPDVDAANANADCVMMLAERLKAPVWVAP	235
PaBFD	ARQVSGAALPAPALLAELGERLSRSRNPVVLVLPDVGANANGLAVELAEKLRMPAWVAP	235
BjBFD	STRIDARTKPSDEALKAFARLLKAERPVIIVTMDEVVKSDALKEAAELAEELLGAAAYQSS	237
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	SAPRCFPFTRHPCFRGLMPAGIAAISQLLEGHDVVLVIGAPVFRY H QYDPGQYLKPGTRL	295
PaBFD	SASRCFPFTRHACFRGVLPAAIAGISRLLDGHDLILVVGAPVFRY H QFAPGDYLPAGAEEL	295
BjBFD	TPYGSHFLESPSFVGTLARVQKVARDTLAPYDLLIALGGDPLRMSVYSEVDPLPDGLPI	297
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	ISVTCDPLEAAR-APMGDAIVADIGAMASALANLVEESS-----RQLPTAAPE---	342
PaBFD	VQVTCDPGEAAR-APMGDALVGDIALTLEALLEQVRPSA-----RPLPEALPR---	342
BjBFD	LQVGLVDWEIAKNFGAEIALKADVKETLRALIPVLKEMGGAALAQRARQRLAELAPKNWS	357
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	-----PAKVDQDAG--RLHPETVFDTLNDMAPENAIYLNESTSTTAQMWRQLNMRNPGS	394
PaBFD	-----PPALAEEGG--PLRPETVFDVIDALAPRDAIFVKESTSTVTAFWRQVEMREPGS	394
BjBFD	ARRAALVEQIGKSAGRNPIDPDYLVLMQTEAMPGNAILVDEGLTSSRQITNLHPHRDRFG	417
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	YYFCAAG G LGFLPAAIGVQLAEPERQVIAVIG GDG SANYSISALWTAQYNIPTIFVIMN	454
PaBFD	YFFPAAG G LGFLPAAVGAQLAQRQVIGI GDG SANYGITALWSAAQYRVPVAVFIILK	454
BjBFD	YHGLAS G IGWGLPASVGVSIANPDRPVVCF S GDG S AMYSIQSLWTAHHKLPLNVVIAN	477
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	N GTY G AL R WF F AGVLEAENVPG--LDVPGIDFRALAKGYGVQALKADNLEQLKGS L QEAL	511
PaBFD	N GTY G AL R WF F AGVLEVPDAPG--LDVPGLD F CAIARGY G VEALHAATREE L E G AL K HAL	511
BjBFD	N GGY R I I K Q RL L AFHGDDNYVGMDFVDPVDFAGIA K AL G CEAI K ISDPSEL K AT L SSAF	537
	* * * * * * * * * *	
PpBFD	SAKGPVLI E VSTVSPVK	528
PaBFD	AADRPVLI E VPTQT I EP	528
BjBFD	GRPGTKL I EV M VDG K V-	553
	* * * * *	

Abb. 10: Sequenzvergleich der putativen PaBFD und BjBFD mit der PpBFD. Das Motiv GDG...N für die Bindung eines zweiwertigen Metallions, und darüber hinaus die Bindung des katalytischen Cofaktors ThDP, wurden blau hinterlegt. Die Reste, die mit dem Aminopyrimidinring des Cofaktors interagieren, wurden blau gedruckt dargestellt. Aminosäurereste, die für die Substratbindung, bzw. Substratspezifität und Enantioselektivität der Katalyse von Bedeutung sind, wurden gelb hinterlegt. Die katalytisch wichtigen Histidine wurden rot markiert, ebenso das Glutamat an Position 28. Mit einem Stern* sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die in allen drei Sequenzen identisch sind. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt.

Die putativen BFDs aus *P. aeruginosa* und *B. japonicum* besitzen beide das konservierte Motiv GDG...N zur Bindung des Cofaktors ThDP über ein zweiwertiges Metallion, sowie die Reste E47 und G401, welche in der PpBFD Interaktionen mit dem Aminopyrimidinring des Cofaktors eingehen. Die Primärstrukturen der beiden Pseudomonaden-Proteine PpBFD und PaBFD zeigen nicht nur Übereinstimmung aller betrachteten Reste, sondern auch Übereinstimmung der entsprechenden Positionen in der Primärstruktur. Die BjBFD zeigt Abweichungen bei Betrachtung der charakteristischen Reste bezüglich der Substratbindung und Substratspezifität (Tab. 7).

3.1.3 Überexpression der *mdlC*-Gene und Reinigung der putativen Benzoylformiat-decarboxylase aus *Pseudomonas putida*

Für eine weiterführende Charakterisierung der beiden putativen BFDs sollten die korrespondierenden Gene im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert werden und die Proteine über einen C-terminal fusionierten His-Tag gereinigt werden.

Über eine Standard-PCR wurden beide Gene mittels der Primer BjBFD_NdeI und BjBFD_HindIII (BjBFD), sowie PaBFD_NdeI und PaBFD_HindIII (PaBFD) (Tab. 6) aus der entsprechenden genomischen DNA amplifiziert. Bei dieser Reaktion wurde das jeweilige Stop-Codon deletiert und beide Gene mit flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen, über die die Gene anschließend jeweils in den Expressionsvektor pET22b kloniert wurden. Es entstanden die Konstrukte pET_PaBFD und pET_BjBFD (Tab. 5). Der Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) wurde mit den Vektoren transformiert. Nach der erfolgreichen Expression beider Gene lag die PaBFD als lösliches Protein im Rohextrakt vor. Der Rohextrakt zeigte bereits Aktivität gegenüber Benzoylformiat als Substrat. Über den C-terminalen His-Tag konnte die PaBFD in einem Schritt mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatografie (IMAC) bis zur Homogenität aufgereinigt werden (Abb. 11). Das PaBFD-haltige Eluat wurde mit Hilfe einer Sephadex G25-Säule entsalzt. Nach Reinigung und Entsalzung betrug die Ausbeute 50 % (Tab. 8). Zur Lagerung konnte das Protein mit geringem Aktivitätsverlust (5 - 10 %) lyophilisiert werden. Reinigung, Entsalzung und Lyophilisierung wurden nach dem von Iding *et al.*, 2000 veröffentlichten Protokoll für die PpBFD durchgeführt.

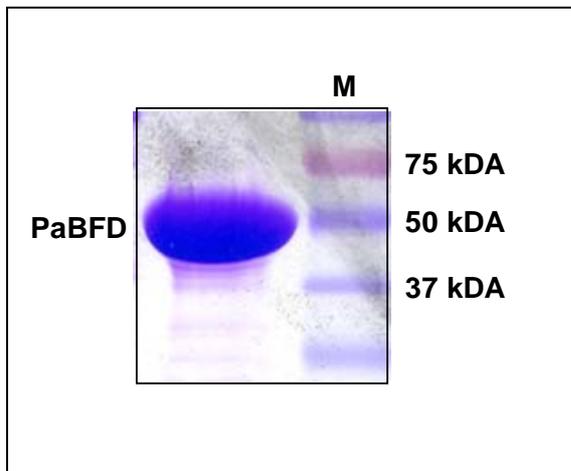


Abb. 11: SDS-PAGE Analyse der gereinigten PaBFD. Es wurde etwa 20 µg Protein aufgetragen. M: Marker

Tab. 8: Ausbeute bei der Reinigung der PaBFD. Die Reinigung erfolgte mittels immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie. Das enzymhaltige Eluat wurde anschließend mittels einer Sephadex G25-Säule entsalzt. Es wurden etwa 32 g Zellen Feuchtwicht eingesetzt. Die Gesamtaktivität im Rohextrakt betrug 6000 U. Die Ausbeute wurde anhand der Gesamtaktivitäten des Rohextraktes und des Eluats der G25-Säule berechnet.

Proteinmenge [mg]	Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]
35,5	3000	85	50

Das die putative BFD aus *B. japonicum* kodierende Gen wurde stark überexprimiert, allerdings bildeten sich Proteinaggregate in Form von „inclusion bodies“ (Abb. 12). Daraufhin wurde die Expression sowohl bei verminderter Temperatur durchgeführt (statt 37°C nun 25°C, 20°C, 4°C), als auch die Menge des Induktors IPTG von 1 mM auf 0,1 mM reduziert. Die Veränderung der beiden Parameter führte allerdings nicht zu löslich exprimiertem Protein (Abb.12).

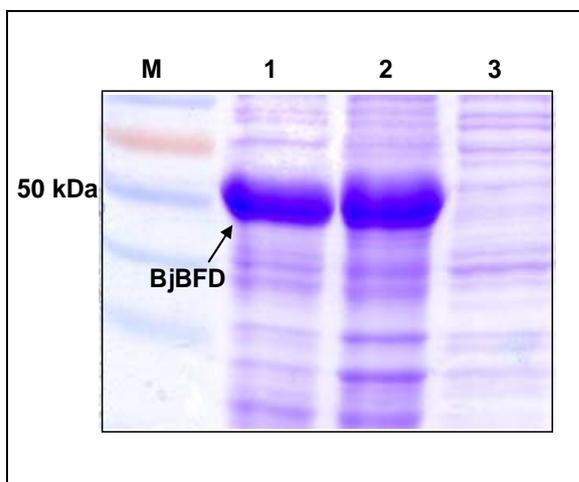


Abb. 12: SDS-PAGE Analyse der Protein-Aggregate der BjBFD. Dargestellt ist die bei 4°C durchgeführte Überexpression des die BjBFD kodierenden *mdlC*-Gens. In Spalte 1 wurden ganze Zellen aufgetragen, in Spur 2 und 3 wurden die unlösliche (2) und lösliche Fraktion (3) des Zellaufschlusses aufgetragen.

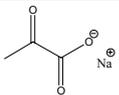
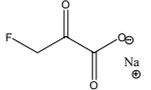
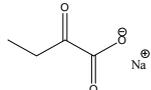
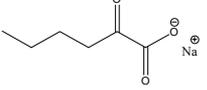
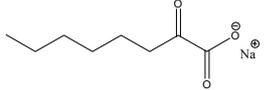
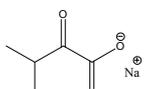
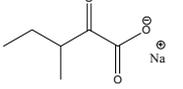
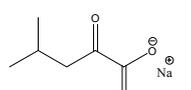
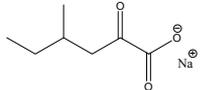
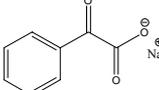
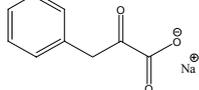
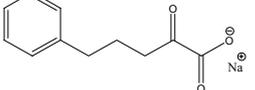
3.1.4 Das Substratspektrum der PaBFD für die Decarboxylasereaktion

In vorangegangenen Arbeiten [Iding *et al.*, 2000] war nachgewiesen worden, dass die PpBFD neben aromatischen 2-Ketocarbonsäuren [Hegemann, 1970] auch aliphatische 2-Ketocarbonsäuren decarboxylieren kann. Es konnte bereits gezeigt werden (3.1.3), dass die PaBFD Aktivität gegenüber dem Substrat Benzoylformiat besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Substratspektrum der PaBFD für die Decarboxylasereaktion untersucht werden. Zuvor wurde das pH-Optimum bei ca. 6,5 für diese Reaktion mit Benzoylformiat als Substrat ermittelt (ohne Abb.). Die Strukturformeln der Substrate sowie die für sie ermittelten spezifischen und relativen Aktivitäten sind in Tab. 9 dargestellt.

Die PaBFD setzt Benzoylformiat von den ausgesuchten Substraten mit der höchsten Aktivität von 75 U/mg (100 %) um. Es werden von der PaBFD neben Benzoylformiat weitere aromatische 2-Ketocarbonsäuren umgesetzt, allerdings mit einer weitaus geringeren Aktivität: die Aktivitäten für die Substrate 2-Keto-3-phenylpropionsäure und 2-Ketophenylpentansäure liegen bei maximal 3 % verglichen mit der Aktivität für Benzoylformiat.

Lineare 2-Ketocarbonsäuren werden ebenfalls von der PaBFD decarboxyliert. Die Aktivität nimmt mit Verlängerung der aliphatischen Kette bis zur 2-Ketooctansäure hin zu, liegt aber mit den hierfür gemessenen 3 U/mg (4 %) trotzdem noch deutlich unter der Aktivität für Benzoylformiat. Pyruvat, das Substrat der Pyruvatdecarboxylase und das „kleinste“ Substrat im analysierten Spektrum, wird von der PaBFD nicht umgesetzt. Verzweigungen am C3- und am C4-Atom bei den aliphatischen 2-Ketocarbonsäuren werden toleriert, wobei hier auch die kleinste der verzweigten Säuren, die 2-Keto-3-methylbutansäure, umgesetzt wird, allerdings äußerst langsam. Insgesamt ist die Aktivität für die verzweigten 2-Ketocarbonsäuren geringer als für die linearen und cyclischen 2-Ketosäuren. Außerdem erreichen die getesteten Substrate nur maximal 4 % der für Benzoylformiat gemessenen Aktivität.

Tab.9: Substratspektrum der PaBFD für die Decarboxylasereaktion. Dargestellt sind die ermittelten spezifischen Aktivitäten, sowie die relativen Aktivitäten, wobei die Aktivität für das Substrat Benzoylformiat gleich 100 % gesetzt wurde. Die Substrate wurden mit 30 mM in den gekoppelten Enzymtest eingesetzt, Benzoylformiat aufgrund der hohen Eigenabsorption mit 15 mM. Gemessen wurde bei 30°C.

Substrat	Spez.Aktivität [U/mg]	Relative Aktivität [%]
Lineare 2-Ketosäuren		
	0	0
	0	0
	0,65	0,9
	3	4,0
	3	4,0
C3-substituierte 2-Ketosäuren		
	0,06	0,08
	1,0	1,3
C4-substituierte 2-Ketosäuren		
	0,8	1,1
	1,33	1,8
Aromatische 2-Ketosäuren		
	75	100
	0,8	1,1
	2,5	3,1

3.1.5 Die PaBFD zeigt Carboligase-Aktivität

In einer Nebenreaktion katalysiert die PpBFD die Knüpfung chiraler C-C-Bindungen [Lingen *et al.*, 2004]. Hier sollte die PaBFD auf ihre katalytischen Fähigkeiten bezüglich der Knüpfung von C-C Bindungen untersucht werden, unter anderem auch auf die in der Aufgabenstellung dargestellte Zielreaktion, der Verknüpfung von Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd zu (*S*)-DMA-HPP. Die Analyse der Ansätze wurde mittels GC/MS und chiraler HPLC von dem Arbeitskreis Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, durchgeführt. Abb. 13 zeigt die eingesetzten Substrate sowie die möglichen Ligationsprodukte.

Für die Carboligation der Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd konnten die Produkte 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP) und Benzoin nachgewiesen werden (Abb. 13). Durch chirale HPLC wurde ein Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess, ee*) für (*S*)-2-HPP von 77 % bestimmt. Die Umsetzung zu Benzoin war für die Bestimmung der Enantioselektivität zu gering. Dimethoxyacetaldehyd als möglicher Akzeptor führte zu keiner Produktbildung, auch bei Austausch des Donors von Benzaldehyd zu *o*-Tolylaldehyd zeigte die PaBFD keine Carboligaseaktivität.

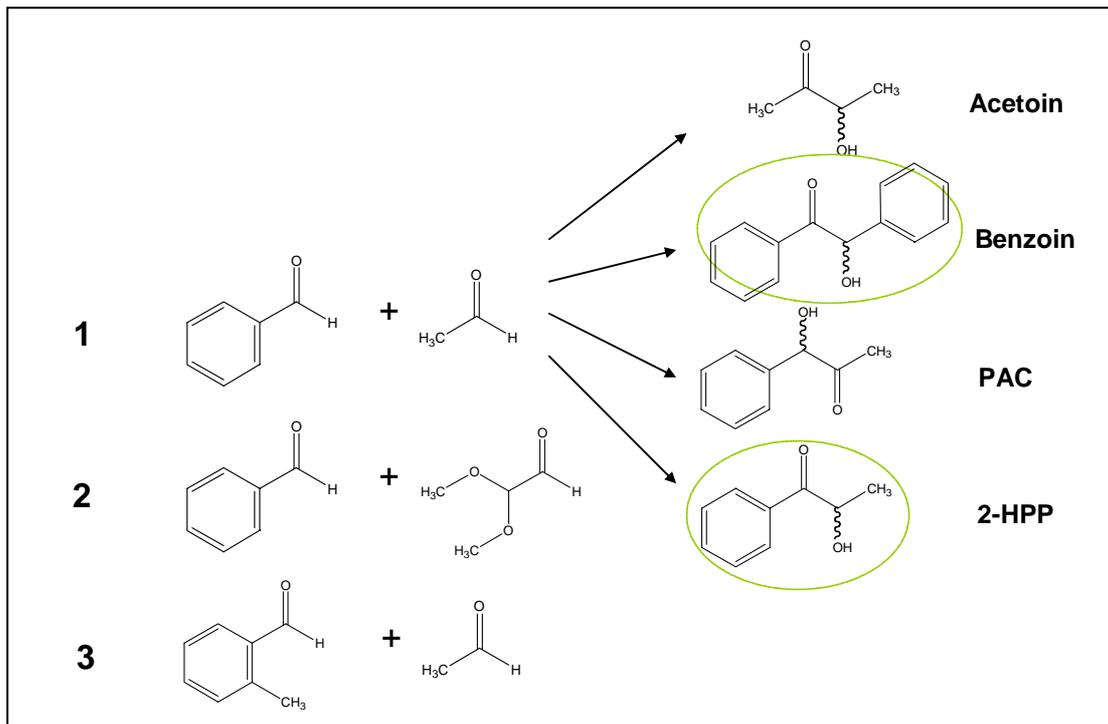


Abb. 13: Carboligationspektrum. In einem ersten Ansatz wurden die Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd zusammen eingesetzt. Zusätzlich zu Ansatz 1 wurden die Substrate Benzaldehyd mit Dimethoxyacetaldehyd (2), sowie o-Tolylaldehyd mit Acetaldehyd (3) getestet. Exemplarisch dargestellt sind die 4 möglichen Produkte ausgehend von Ansatz 1. Die dargestellten Produkte gelten mit den entsprechenden Substitutionen auch für die Ansätze 2 und 3. Für Ansatz 2 siehe auch Zielreaktion (Abb. 8; 1.5). Carboligaseaktivität konnte für die PaBFD mit den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd nachgewiesen werden (1), gebildet wurden (*S*)-HPP, sowie (*R*)-Benzoin. PAC Phenylacetylcarbinol, 2-HPP 2-Hydroxypropiofenon.

Die über Sequenzähnlichkeit identifizierte Sequenzen putativer BFDs aus den Organismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Bradyrhizobium japonicum* konnten isoliert, kloniert und exprimiert werden. Während die BjBFD nicht als lösliches Protein gewonnen werden konnte, wurde die PaBFD mit guter Ausbeute aufgereinigt. Für die PaBFD wurde Decarboxylaseaktivität mit verschiedenen aliphatischen und aromatischen 2-Ketosäuren nachgewiesen, wobei Benzoylformiat am besten umgesetzt wird. Das Enzym zeigt außerdem deutliche Carboligaseaktivität mit den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd, das Produkt (*S*)-2-HPP wird mit einem *ee* von 77% gebildet.

3.2 Etablierung der Methode ITCHY für die Rekombination der strukturhomologen ThDP-abhängigen Enzyme

Die sequenz-unabhängige Rekombination funktioneller, strukturhomologer Proteine eröffnet einen größeren Sequenzraum und dadurch Zugang zu neuen Enzymaktivitäten, als Basensubstitutionen oder homologe Rekombination. 1999 wurde von Ostermeier *et al.* mit der Veröffentlichung der Methode ITCHY eine Möglichkeit vorgestellt, Bibliotheken mit einem cross-over Ereignis von Genen niedriger Sequenzübereinstimmung herzustellen [Ostermeier *et al.*, 1999 a, b]. Die Anzahl der cross-over Ereignisse kann durch ein anschließendes DNA-Shuffling erhöht werden, wobei die durch ITCHY erzeugten Fusionsstellen als Orte für weitere Rekombinationsereignisse dienen (SCRATCHY) [Lutz *et al.*, 2001a]. Als Ausgangspunkt für die Etablierung von ITCHY sollten die korrespondierenden Gene der PpBFD (*mdlC*), sowie der BAL (*bznB*) dienen

3.2.1 Erstellen von ITCHY-Bibliotheken

Die sequenzunabhängige Rekombination wird bei ITCHY durch die Fusion von zwei Genfragmenten erreicht, es entstehen Gen-Chimären. Dabei wird ein Gen vom 3'-Ende her zufällig verkürzt, das andere vom 5'-Ende. Um ITCHY-Bibliotheken zu erzeugen, müssen deshalb die zu rekombinierenden Gene zunächst einem kontrollierten ExoIII-Verdau zugeführt werden. Die so erhaltenen Genfragmente unterschiedlicher Länge werden dann über eine blunt-end Ligation zufällig miteinander vereint, die resultierenden Hybride der beiden Ausgangssequenzen stellen die ITCHY- Bibliothek dar.

Als Vorlage bei der Erstellung von ITCHY-Bibliotheken diente das Protokoll von Lutz & Ostermeier, 2003. Die Ausgangssituation wurde allerdings dahingehend verändert, dass die zu rekombinierenden Gene auf zwei getrennten Vektoren vorlagen, wie zuvor in Ostermeier *et al.*, 1999 beschrieben [Ostermeier *et al.*, 1999 a, b]. Liegen die Gene auf einzelnen Vektoren vor, so kann die Methode flexibel auf unterschiedliche Gen-Kombinationen angewendet werden. Die sich daraus ergebende Abfolge der durchzuführenden Schritte ist in Abb. 14 schematisch dargestellt. Die Gene *mdlC* und *bznB* wurden jeweils über identische Schnittstellen in den Vektor pET28 kloniert. Für die Klonierung, bzw. die spätere Anwendung in ITCHY waren zuvor interne Schnittstellen (*mdlC* – *ApaI*, *bznB* - *NcoI*) mittels zielgerichteter Mutagenese entfernt worden. Die fertigen Konstrukte pETBFD-*ApaI* und

pETBAL-NcoI wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI*/ *ApaI*, bzw. *XhoI*/ *ApaI* behandelt und die Gen-tragenden Fragmente anschließend über Gelelektion von dem restlichen Ansatz getrennt. Diese DNA-Fragmente wurden einem kontrollierten Zeit-abhängigen Exonuklease-Verdau zugeführt (Abb. 15), wobei zu beachten ist, dass nur die 5' überlappenden Enden, nicht aber 3'-überlappende Enden durch die ExonukleaseIII angreifbar sind. Die so verdauten Fragmente wurden über die 3'-Schnittstelle zufällig miteinander ligiert. In zwei folgenden Schritten wurden die über ExonukleaseIII verdauten Enden mit Mung-Bohnen-Nuklease und Klenow-Fragment behandelt, sodass anschließend ein Ringschluss der linearen DNA über eine blunt-end Ligation erfolgen konnte. Der Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) wurde mit der ITCHY-Bibliothek transformiert.

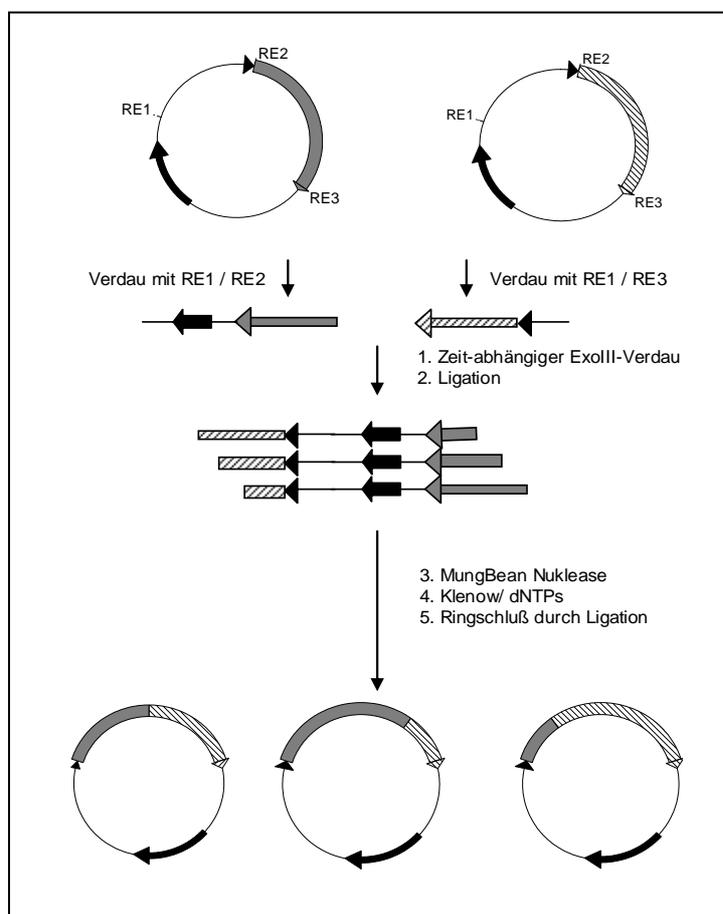


Abb.14: Schematische Darstellung der Herstellung der ITCHY Bibliotheken mittels Zeit-abhängigen ExonukleaseIII-Verdau. Die Ausgangskonstrukte werden mit den Restriktionsendonukleasen RE1/ RE2 bzw. RE1/ RE3 geschnitten. RE2 und RE3 produzieren dabei 5' überhängende Enden, welche von der ExonukleaseIII abgedaut werden können. Die resultierenden Fragmente der beiden Ansätze werden zufällig miteinander über die RE1 Schnittstelle ligiert. Mit Mung-Bohnen-Nuklease und Klenow-Fragment werden blunt-Enden erzeugt, über die ein Ringschluss der DNA erfolgt. Die entstanden Konstrukte mit den Hybriden der beiden parentalen Gene stellen die ITCHY Bibliothek dar. Es werden zwei Bibliotheken erzeugt, sodass jedes parentale Gen einmal den 5'- und einmal den 3'-Teil des Hybridgens stellt.

Die Transformation der ITCHY-Bibliotheken erbrachte bei Variation der Menge des zu transformierenden Ligationsansatzes pro ITCHY-Bibliothek eine geringe Ausbeute. Statistisch gesehen sind 1/3 der erstellten Hybride „in frame“ und damit geeignet, im zweiten Schritt, dem DNA Shuffling eingesetzt zu werden [Lutz *et al.*, 2002]. Die erhaltenen Klone

wurden mittels Testrestriktion und Testexpression analysiert. Es konnten keine „in frame“ Hybrid-Klone erzeugt werden, zudem zeigte sich eine Kontamination der Bank mit den Wildtypen (Abb. 15). Keiner der Klone zeigte eine Überexpression (ohne Abb.).

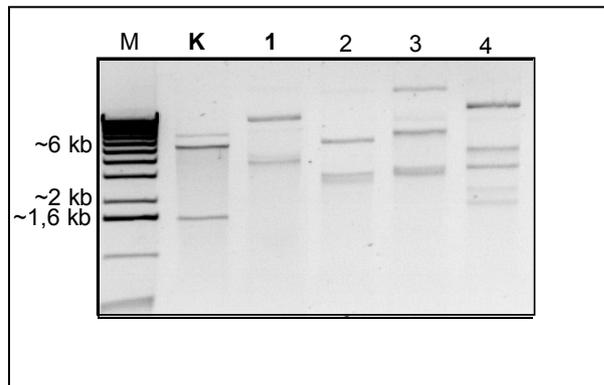


Abb. 15: Analyse der mit ITCHY hergestellten Klone über Testrestriktion. Die Plasmid-DNA der ITCHY-Klone wurde isoliert und einer Testrestriktion mit *NcoI* und *XhoI* unterzogen. Als Kontrolle (K) diente das entsprechend restringierte Ausgangskonstrukt pET_BAL-*NcoI*. Nur Klon 2 zeigt hier eine Bande auf der Höhe des Vektors pET28a bei ~5,5 kb. Die anderen Klone lassen keine eindeutigen Vektor-Banden erkennen. M: Marker

Auch Veränderungen der Reaktionsbedingungen und Menge der eingesetzten Mung-Bohnen-Nuklease und Klenow-Fragment ergaben keine verbesserte Ausbeute. Aufgrund dieser geringen Ausbeuten und der nicht gelungenen Erzeugung von „in frame“ Hybridproteinen wurde die Etablierung der Methode ITCHY nicht weiter verfolgt.

Stattdessen sollte die Zielreaktion (1.5) durch die Optimierung des Akzeptorspektrums der PpBFD zugänglich gemacht werden.

Die Anwendung der Methode ITCHY erbrachte nur geringe Ausbeuten und die isolierten Klone zeigten zudem keine Überexpression. Dieser Ansatz wurde daraufhin nicht weiter verfolgt, stattdessen sollte die Zielreaktion durch Optimierung des Akzeptorspektrums der PpBFD zugänglich gemacht werden.

3.3 Optimierung der PpBFD: Erweiterung des Akzeptorspektrums mittels fehlerhafter PCR

Die PpBFD ist bei der Katalyse der Carboligation zu (*S*)-Hydroxyketonen auf Acetaldehyd als Akzeptor beschränkt [Iding *et al.*, 2000]. Die in der Aufgabenstellung vorgestellte Zielreaktion mit Benzaldehyd als Donor und Dimethoxyacetaldehyd als Akzeptor (1.5) wird von der BAL enantioselektiv zu (*R*)-2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiofenon ((*R*)-DMA-HPP) katalysiert. Da BAL und PpBFD sich bezüglich der Carboligation zum 2-HPP als enantio-komplementäre Katalysatoren verhalten (Abb. 5) [Pohl *et al.*, 2002], sollte über fehlerhafte PCR das Akzeptorspektrum der PpBFD optimiert und damit das entsprechende (*S*)-Enantiomer zugänglich gemacht werden. In vorangegangenen Experimenten war mittels fehlerhafter PCR bereits eine Variante der PpBFD erzeugt worden, PpBFDL476Q, welche eine fünffach gesteigerte Carboligaseaktivität für das Produkt (*S*)-2-HPP gegenüber dem Wildtyp aufweist [Lingen *et al.*, 2002]. Diese sollte als Ausgangspunkt des hier verfolgten Ansatzes dienen.

3.3.1 Überexpression des *mdlC*-Gens aus *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*

In vorangegangenen Arbeiten lag das die BFD aus *P. putida* kodierende Gen in dem Vektor pKK233-2 kloniert vor, und wurde mit Hilfe des Wirtes *E. coli* SG13009 exprimiert [Iding *et al.*, 2000, Lingen *et al.*, 2002, 2003]. Zu diesem Expressionssystem gehört zusätzlich ein zweites Plasmid, pRep4, welches eine stärkere Kontrolle der Expressionsinduktion ermöglicht. Für den Ansatz eines Hochdurchsatzscreenings einer Varianten-Bank mit anschließender Sequenzierung der positiven Klone ist dieses Expressionssystem basierend auf zwei Vektoren hinderlich, da bei Plasmidpreparationen diese mit pRep4 verunreinigt sind. Als neues Expressionssystem sollte das pET-System (Vektor pET28a) mit dem Expressionswirt *E. coli* BL21 (DE3) dienen.

Das für die PpBFDL476Q kodierende Gen wurde über *NcoI* und *HindIII* in den Vektor pET28a kloniert mit einer C-terminalem His-Tag-Fusion. Der Wirt *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem fertigen Konstrukt pET_BFDL476Q transformiert. Der Stamm *E. coli*_BFDL476Q wurde im Screening als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde die BAL, kodiert durch das Gen *bznB* eingesetzt, da sie die Umsetzung von Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd zum entsprechenden (*R*)-Enantiomer des DMA-HPP

katalysiert. Zunächst wurde die interne *NcoI* Schnittstelle des Gens *bznB* mittels ortsgerichteter Mutagenese eliminiert. Anschließend wurde das Gen über die flankierenden Schnittstellen *NcoI*/*XhoI* in den Vektor pET28a kloniert. *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem Vektor transformiert.

3.3.2 Fehlerhafte PCR (epPCR) der BFD-Variante L476Q

Für die Optimierung der BFD-Variante L476Q wurde die Methode der fehlerhaften PCR (*error prone*, epPCR) gewählt. Das gesamte Gen wurde mutiert, da schon aus anderen Beispielen bekannt war, dass zum Teil weit vom aktiven Zentrum entfernte Veränderungen der AS-Sequenz zu einer Verbesserung der katalytischen Eigenschaften führen können [Liebeton *et al.*, 2000; Bocola *et al.*, 2004]. Die Reaktionsbedingungen der epPCR wurden durch erhöhte MgCl₂- und MnCl₂-Konzentrationen so eingestellt, dass man 1-3 AS Austausch pro BFD-Untereinheit erhielt. Als Template für die epPCR diente der Vektor pKK233_BFDL476Q [Lingen *et al.*, 2002]. Über die Primer pKK233-2_rev und pKK233-2_for wurden die Schnittstellen *NcoI* und *HindIII* angefügt. Die mutagenisierten PCR-Fragmente wurden in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektor pET28a kloniert. Der Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dieser epPCR-Bibliothek transformiert.

Für die Evolvierung der PpBFD wurde als Ausgangspunkt die Variante L476Q mit gesteigerter Carboligaseaktivität und erweitertem Donorspektrum ausgewählt. Die epPCR-Bibliothek wurde mit einer Austauschrate von 1-3 Aminosäureaustauschen pro BFD Untereinheit hergestellt.

3.3.3 Entwicklung eines High Throughput Screening Assays für Carboligase-Aktivität

Bei der Zufallsmutagenese entsteht eine Vielzahl von Varianten, welche anschließend auf ihre Eigenschaften getestet werden müssen. Das Screening muss dabei den jeweiligen Bedingungen angepasst werden. Zunächst wurden die Anzuchtbedingungen für eine optimale Expression der Mutantenbanken in Mikrotiterplatten optimiert. Die besten Ergebnisse konnten bei einer Expressionsdauer von 20 h bei 37°C und 600 rpm erzielt werden (Abb. 16). Die Zellen wurden anschließend in den Mikrotiterplatten durch Zentrifugation pelletiert und durch Resuspendierung in Puffer, welcher mit Lysozym versetzt war, aufgeschlossen.

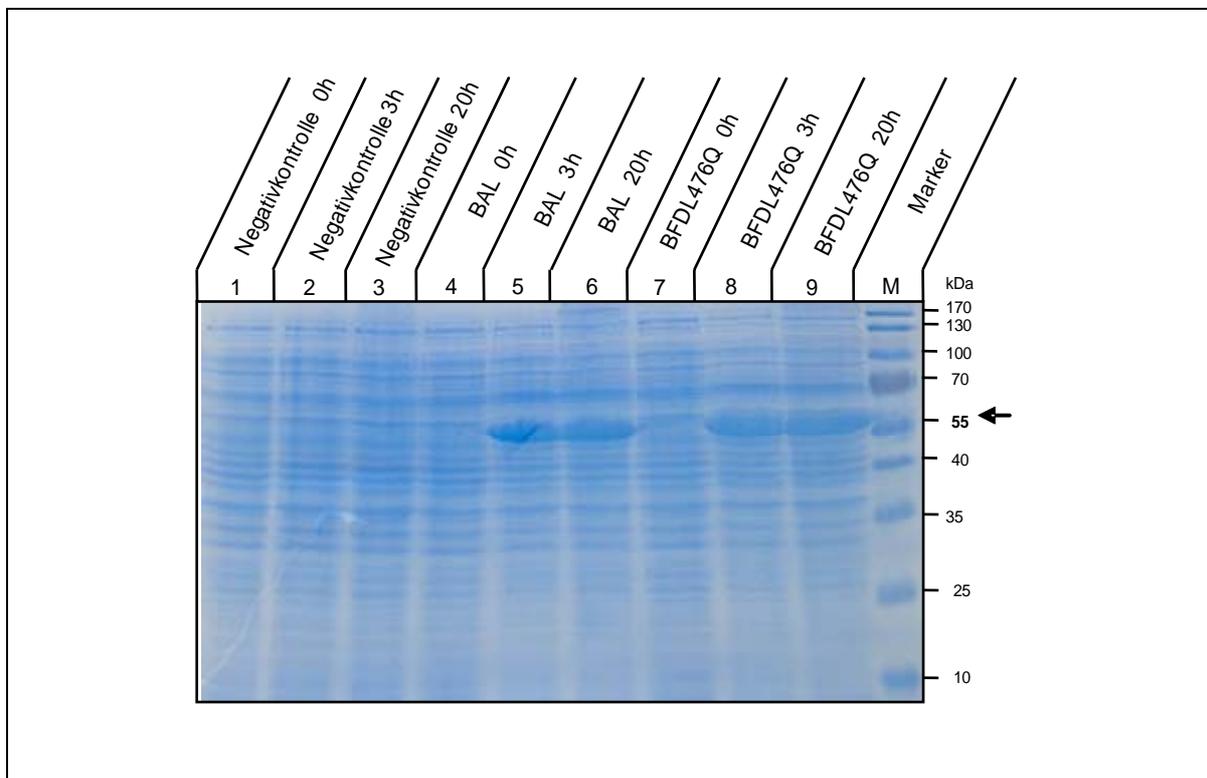


Abb.16: SDS-PAGE Analyse der Optimierung der Expression in Mikrotiterplatten. Die beiden Kontrollstämme *E. coli* BAL und *E. coli* L476Q, sowie *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit dem Leervektor (Negativkontrolle) wurden nach der Induktion 0 h, 3 h und 20 h in der Mikrotiterplatte inkubiert. Es wurde jeweils eine $OD_{580} = 0,15$ aufgetragen. Die Negativkontrolle zeigt keine Expressionsbande. Die beiden Kontrollstämme *E. coli* BAL und *E. coli* BFDL476Q zeigen nach 3 h und 20 h eine deutliche Expressionsbande auf der zu erwartenden Höhe von ~56 kDa (Pfeil). Die Expressionsdauer von 20 h wurde für das Screening auf Carboligaseaktivität übernommen.

Die Carboligase-Aktivität sollte durch einen einfachen Farbassay nachgewiesen werden [Breuer *et al.*, 2002], welcher bereits in anderen Zufallsmutagenese-Ansätzen angewendet worden war [Lingen *et al.*, 2002, 2003]. Der Test beruht auf der Reduktion des farblosen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), welches so zum intensiv rot gefärbten Formazan wird. Dieser Farbumschlag sollte im Screening durch das Produkt der Carboligaseaktivität, dem 2-HPP-Derivat, welches gleichzeitig oxidiert wird, ausgelöst werden (Abb. 17).

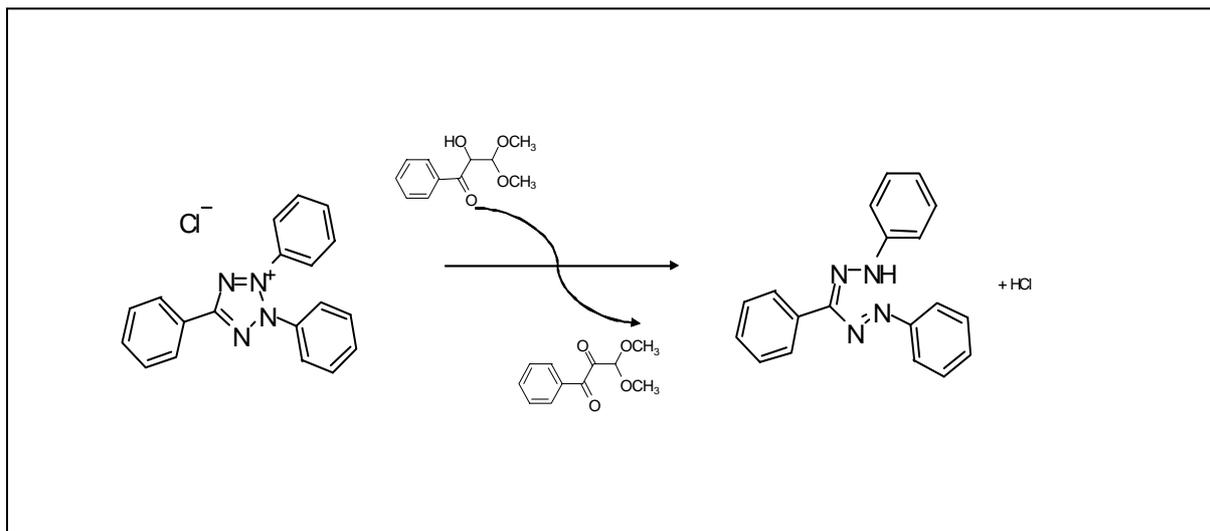


Abb.17: Farbassay zum Nachweis der Carboligaseaktivität. 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (links) wird von dem Produkt der Enzymaktivität, 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon (Mitte) zum Formazan reduziert, welches eine intensive rote Farbe besitzt.

Bevor mit dem Screening der Bibliothek begonnen werden konnte, mussten die eingesetzten Substrate und die erwarteten Produkte auf ihre Reaktionen im Farbassay getestet werden. Beide Substrate, Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd, verursachten keinen Farbumschlag, wohingegen das Produkt 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon (DMA-HPP) ab einer Konzentration von 2,5 mM zu einer Rotfärbung führte (Abb. 18). Auch das mögliche Produkt Benzoin (Abb. 13) verursachte bei dieser Konzentration einen Farbumschlag (ohne Abb.).

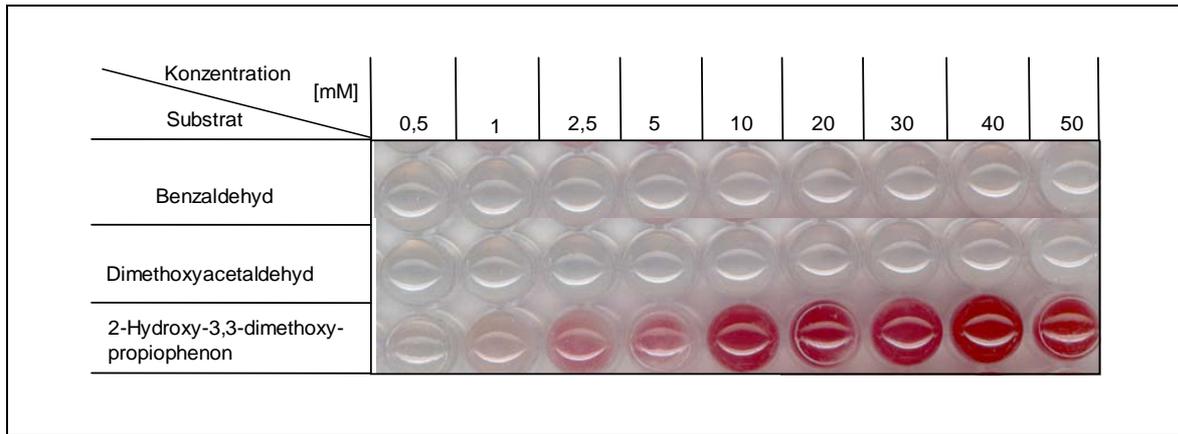


Abb.18: Konzentrationsreihe der Substrate und des Produkts 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiofenon im Farbassay. In der Farbreaktion des TTC-Assays zum Nachweis von Carboligaseaktivität im Screening der epPCR-Bank wurden die Substrate Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd, sowie auch das mögliche Produkt getestet. Wie erwartet, lösen die Substrate keine Farbreaktion aus, das Produkt hingegen ist in der Lage, den Farbstoff zu reduzieren.

Neben den Substraten und Produkten wurden auch die Zellextrakte im TTC-Assay getestet. Die Substrate Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd wurden dabei in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt (20 mM Benzaldehyd, 60 mM Dimethoxyacetaldehyd). Da von der PpBFD eine geringe Benzoin syntheseaktivität bekannt ist [Iding *et al.*, 2000], sollte durch den Überschuss an Dimethoxyacetaldehyd eine Optimierung dieser Aktivität ausgeschlossen werden. Nach 20-24 h Inkubation der Rohextrakte mit den Substraten führten die Ansätze der beiden Negativkontrollen, *E. coli*_pET28a (*E. coli* BL21 (DE3) mit dem Leervektor transformiert) als auch *E. coli*_BFDL476Q, im Farbtest zu keinem Farbumschlag, wohingegen die Positivkontrolle *E. coli*_BAL eine deutlichen Rotfärbung verursachte (Abb.19). Untersuchungen des Arbeitskreises Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwig-Universität Universität, Freiburg, ergaben, dass die BAL unter diesen Bedingungen quantitativ die Synthese des gemischten Ligationsproduktes katalysiert und ein dreifacher Überschuss an Dimethoxyacetaldehyd ausreichend ist, um die Benzoinbildung zu unterdrücken.

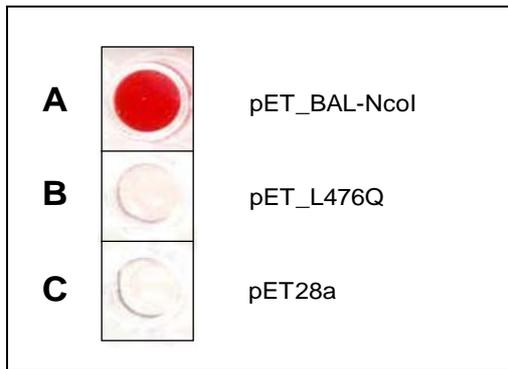


Abb. 19: Test von Rohextrakten im Farbassay. Die Zellextrakte von *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit **A** pET_BAL-NcoI (Positivkontrolle), **B** pET_L476Q und **C** pET28a (Negativkontrollen) eingesetzt im TTC-Farbassay, nach vorheriger Inkubation mit den Substraten Benzaldehyd und Dimethoxy-acetaldehyd für 24 h bei 30°C.

3.4 Identifizierung einer BFD-Variante mit optimiertem Akzeptoraldehyd-Spektrum

Die durch epPCR generierte Mutantenbibliothek wurde in Mikrotiterplatten exprimiert. 8.000 Klone wurden mittels des oben beschriebenen Farbassays auf Carboligaseaktivität mit den Substraten Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd durchgemustert. Die Reaktionsansätze wurden 24 h bei 30°C inkubiert (3.3). Abb. 20 zeigt den Ablauf des Screenings.

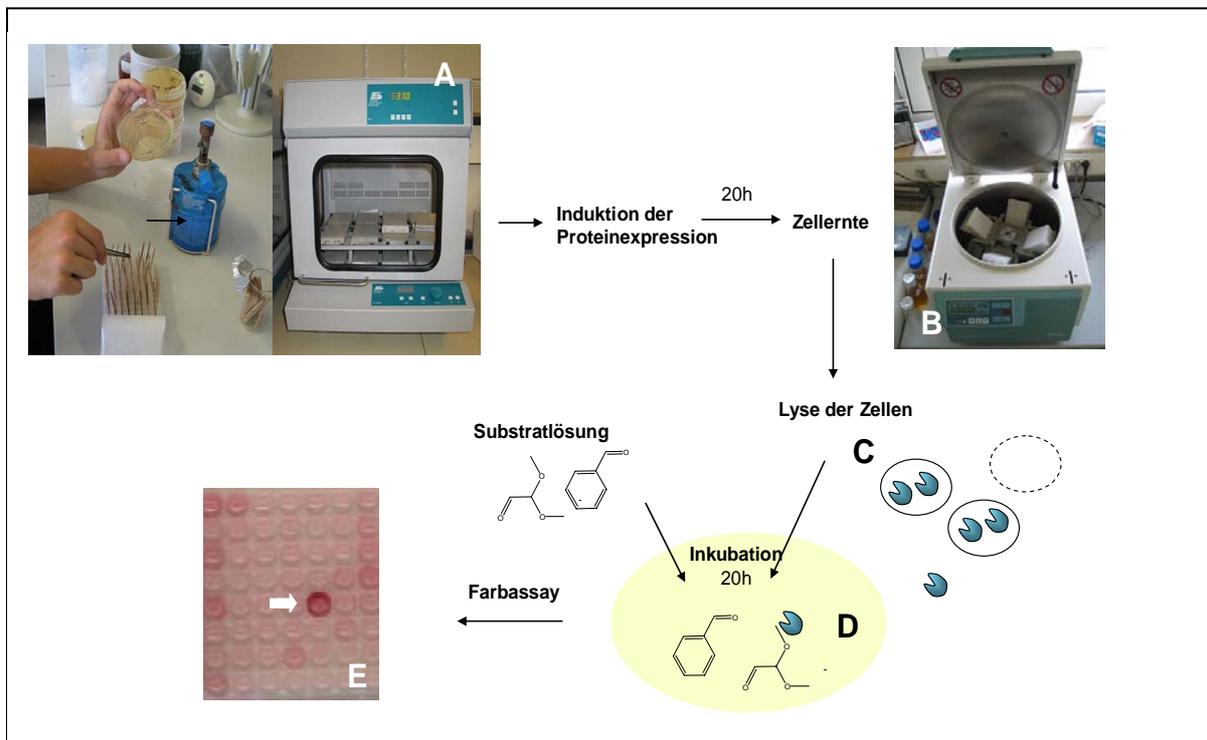


Abb. 20: Ablauf des Screenings zur Erweiterung des Akzeptoraldehydspektrums. **A** Die mit der epPCR-Bibliothek transformierten *E. coli*-Zellen wurden in deep-well-Mikrotiterplatten auf einem Brutschüttler angezogen. Nach der Induktion der Expression mit IPTG wurden die Zellen weitere 20 h inkubiert und **B** anschließend durch eine Zentrifugation pelletiert. Der Zellaufschluss **C** erfolgte in den Mikrotiterplatten durch die Zugabe von Lysozym. **D** Die resultierenden Rohextrakte wurden weitere 20 h bei 30°C mit der Substratlösung (20 mM Benzaldehyd, 60 mM Dimethoxyacetaldehyd) inkubiert, und **E** die Bildung von Hydroxyketonen mit dem Farbassay nachgewiesen. Positive Klone erscheinen im Screening rot (Pfeil).

Ein Klon zeigte Carboligaseaktivität mit den genannten Substraten. Daraufhin wurde das entsprechende, die PpBFD-Variante kodierende Gen dieses rekombinanten Stammes sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt vier Basenaustausche, zusätzlich zu dem Austausch CTG zu CAG, welcher in der parentalen PpBFDL476Q im Vergleich zu Wildtyp-PpBFD bereits vorhanden war. Zwei der neuen Austausche resultieren in einem Austausch der entsprechenden Aminosäuren an den jeweiligen Positionen: (1) das Basentriplett GCT an Aminosäureposition 255 wird mutiert zu GGT, sodass an dieser Stelle Alanin gegen Glycin ausgetauscht wird, und (2) das Basentriplett ATT an Aminosäureposition 260 lautet nun ACT, damit wird dort anstelle eines Isoleucins ein Threonin kodiert. Die beiden stillen Mutationen finden sich in den Basentripletts der Aminosäurepositionen 387 und 491 (Tab.10).

Tab. 10: Aminosäureaustausche und stille Mutationen der Ausgangsvariante L476Q und der Screeningvariante 55E4. Im Vergleich zur Ausgangsvariante PpBFD L476Q zeigt die Screeningvariante 55E4 vier weitere Basenaustausche, von denen zwei zu Aminosäureaustauschen führen. An Aminosäure-Position 255 wird statt eines Alanins ein Glycin kodiert, an Position 260 wird das Isoleucin durch ein Threonin ersetzt.

PpBFD-Variante	AS-Position	Basenaustausch (AS-Austausch)
L476Q	476	CTG (L) → CAG (Q)
55E4	476	CTG (L) → CAG (Q)
	255	GCT (A) → GGT (G)
	260	ATT (I) → ACT (T)
	387	still
	491	still

Nach der Durchmusterung von 8000 Klonen konnte ein Klon mit Carboligaseaktivität unter den gewählten Bedingungen identifiziert werden. Die Sequenzierung der korrespondierenden DNA der positiven Variante 55E4 zeigte vier zusätzliche Basenaustausche im Vergleich zur Ausgangsvariante PpBFDL476Q. Zwei der Basenaustausche führten zu entsprechenden Aminosäureaustauschen: A255G und I260T.

3.5 Biochemische Charakterisierung der PpBFD-Variante 55E4 im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q

Die im Screening identifizierte Variante 55E4 sollte im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften, Decarboxylierung und Carboligation, untersucht werden. Dazu wurden beide die die Varianten kodierenden *mdlC*-Gene in *E. coli* BL21 (DE3) als His-Tag-Fusionsproteine überexprimiert. Für die Variante 55E4 wurde Zellmasse mittels einer Hochzelldichte (HZD)-Fermentation gewonnen. Beide Proteine konnten mittels Affinitätschromatographie (IMAC) in einem Schritt aufgereinigt werden (Abb. 21). Die Eluate wurden mit Hilfe einer Sephadex G25 Säule entsalzt. Die Reinigung der L476Q Variante erzielte eine Ausbeute von 60 %, die Variante 55E4 konnte mit einer Ausbeute von 50 % gereinigt werden (Tab. 11). Für die anschließenden Untersuchungen konnten die Eluate mit geringem Aktivitätsverlust (weniger als 10 %) lyophilisiert werden.

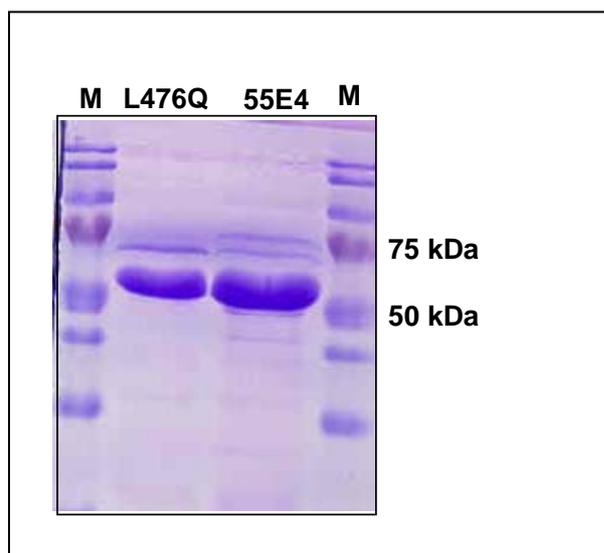


Abb. 21: SDS-PAGE Analyse der Reinigung der PpBFDL476Q und der PpBFD55E4. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. M: Marker

Tab.11: Ausbeute bei der Reinigung der PpBFDL476Q und der PpBFD55E4. Die Reinigung erfolgte über immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie. Das enzymhaltige Eluat wurde anschließend mittels einer Sephadex G25-Säule entsalzt. Es wurden etwa 22 g Zellen Feuchtgewicht eingesetzt. Die Gesamtaktivität im Rohextrakt betrug 16281 U für PpBFD55E4 und 9433 U für PpBFDL476Q. Die Ausbeute wurde anhand der Gesamtaktivitäten des Rohextraktes und des Eluats der G25-Säule berechnet.

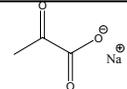
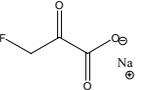
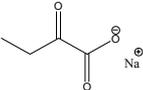
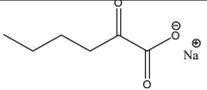
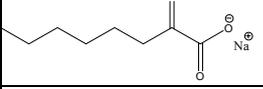
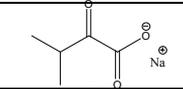
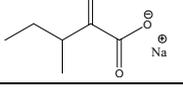
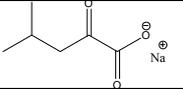
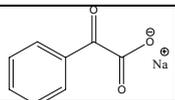
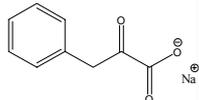
Protein	Proteinmenge [mg]	Aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]
PpBFDL476Q	16,5	5350	324	57
PpBFD55E4	33	7666	232	47

3.5.1 Die PpBFD-Variante 55E4 zeigt eine verringerte Benzoylformiat-decarboxylaseaktivität

Es wurde untersucht, ob die zusätzlichen Mutationen der Variante 55E4 zu einer Veränderung der Decarboxylaseaktivität verglichen mit der Ausgangsvariante L476Q führen. Neben dem natürlichen Substrat Benzoylformiat wurden weitere 2-Ketosäuren getestet, mit dem Ziel, Aufschluss über Veränderungen der sterischen Gegebenheiten im aktiven Zentrum der Screening-Variante 55E4 zu erhalten. Es wurden lineare, verzweigte und aromatische 2-Ketosäuren getestet. Tab. 12 zeigt die gemessenen spezifischen Aktivitäten, dabei wurde die Decarboxylaseaktivität der Ausgangsvariante L476Q gleich 100 % gesetzt, alle weiteren spezifischen Aktivitäten des Enzyms für die nicht-natürlichen Substrate, als auch die Messwerte der Variante 55E4, sind in Relation dazu aufgetragen.

Die Variante 55E4 zeigt mit 214 U/mg eine niedrigere Decarboxylaseaktivität für das natürliche Substrat Benzoylformiat als die Ausgangsvariante L476Q (305 U/mg). Bei Betrachtung der Aktivitäten für die nicht-natürlichen Substrate sind jedoch keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Die Variante 55E4 setzt die weiteren getesteten 2-Ketosäuren mit ähnlichen Aktivitäten wie L476Q um. Die gemessenen Aktivitäten für diese Substrate liegen dabei unter 2% der Benzoylformiat-Decarboxylaseaktivität von L476Q, langkettige lineare 2-Ketosäuren werden noch am besten umgesetzt. Verzweigt-kettige 2-Ketosäuren können ebenfalls decarboxyliert werden, dabei wird die 2-Ketosäure mit einer Verzweigung am C3-Atom unter den gewählten Bedingungen schneller umgesetzt als die 2-Ketosäure mit gleicher Kettenlänge mit Verzweigung am C4-Atom. Insgesamt sind für beide Varianten die gleichen Tendenzen bezüglich der spezifischen Aktivitäten für die nicht-natürlichen 2-Ketosäuren zu beobachten (Tab. 12).

Tab. 12: Substratspektrum der Decarboxylasereaktion der Screening-Variante 55E4 im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q. Die Substratkonzentration betrug 30mM, eine Ausnahme bildete Benzoylformiat mit 15mM, da die Eigenabsorption bei höheren Konzentrationen für den photometrischen Test zu hoch war. Die spezifische Aktivität der Variante L476Q für Benzoylformiat (304 U/mg) wurde gleich 100% gesetzt, alle weiteren Aktivitäten wurden in Relation dazu dargestellt.

Substrat	PpBFDL476Q		PpBFD55E4	
	spez. Aktivität [U/mg]	rel. Aktivität [%]	spez. Aktivität [U/mg]	rel. Aktivität [%]
Lineare 2-Ketosäuren				
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	1,9	0,6	1,7	0,6
	3,1	1,0	3,7	1,2
	4,4	1,4	2,7	0,9
C3-substituierte 2-Ketosäuren				
	0,4	0,1	0,8	0,2
	2,2	0,7	2,3	0,8
C4-substituierte 2-Ketosäuren				
	1,4	0,5	0,8	0,3
Aromatische 2-Ketosäuren				
	305	100	214	70
	1,4	0,5	1,4	0,5

Die Ausgangsvariante L476Q und die Screeningvariante 55E4 konnten über Metallchelataffinitätschromatographie effektiv gereinigt werden und standen somit für die weiterführenden Charakterisierungen in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Der Vergleich der Decarboxylaseaktivitäten für aliphatische und aromatische 2-Ketosäuren zeigte eine geringere Aktivität der Variante 55E4 für das natürliche Substrat Benzoylformiat. Für die weiteren getesteten nicht-natürlichen Substrate wurden keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitäten gemessen.

3.5.2 Synthese von 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon und Benzoin

Die Bildung von Benzoin war bereits als schwache Nebenaktivität der Ausgangsvariante PpBFDL476Q bekannt. Im Screening war deshalb Dimethoxyacetaldehyd (DMA) im Überschuss dazugegeben (1:3) worden, um die Benzoinbildung zu unterdrücken.

Erste Untersuchungen zum Carboligationspotential der Variante 55E4 wurden in 1,2 ml Ansätzen durchgeführt, und es wurde die gleiche Substratzusammensetzung wie auch im Screening (20 mM Benzaldehyd und 60 mM Dimethoxyacetaldehyd) gewählt. Die Reaktionsprodukte wurden nach vier Tagen mittels chiraler HPLC analysiert (Arbeitskreis Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwig-Universität, Freiburg). Die Ergebnisse zeigen, dass DMA-HPP und Benzoin in den Biotransformationen gebildet werden. Die Bildung der anderen möglichen Ligationsprodukte (Abb. 13) konnte durch NMR-Analyse der Ansätze ausgeschlossen werden (Arbeitskreis Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwig-Universität Freiburg). Bei einem Vergleich der PpBFD-Variante 55E4 mit der Ausgangsvariante L476Q fiel auf, dass die Variante 55E4 bezüglich beider Produkte eine höhere Aktivität zeigt.

Um die Umsetzung zu Benzoin zu unterdrücken und die Ausbeute des DMA-HPPs zu erhöhen, wurde in weiteren Ansätzen die Konzentration des Akzeptoraldehyds DMA erhöht, die beiden Substrate wurden nun in einem Verhältnis von 1:100 eingesetzt. Die Strategie war erfolgreich, auch wenn trotz des 100-fachen Überschusses des DMA die Bildung von Benzoin nicht vollständig zurückgedrängt werden konnte. Außerdem ging auch die Bildung des HPP-Derivates zurück um den Faktor 2,2 im Vergleich zum 1:3 Substratmix, jedoch war das Verhältnis der beiden Produkte zueinander zugunsten des DMA-HPPs verbessert. In

Gegenwart von 500 mM Dimethoxyacetaldehyd war die Carboligaseaktivität der Ausgangsvariante kaum noch vorhanden.

Die Bildung von Benzoin wurde zusätzlich untersucht durch Ansätze mit Benzaldehyd als alleinigem Substrat (5 mM und 20 mM). Verglichen mit der Ausgangsvariante PpBFDL476Q zeigt die Variante 55E4 eine signifikant höhere Benzoin-Katalyseaktivität, welche bei der niedrigen Konzentration von 5 mM stärker ausgeprägt war.

Die Ergebnisse der Umsetzungen zu Benzoin und DMA-HPP der beiden Varianten sind in Abb. 22 dargestellt.

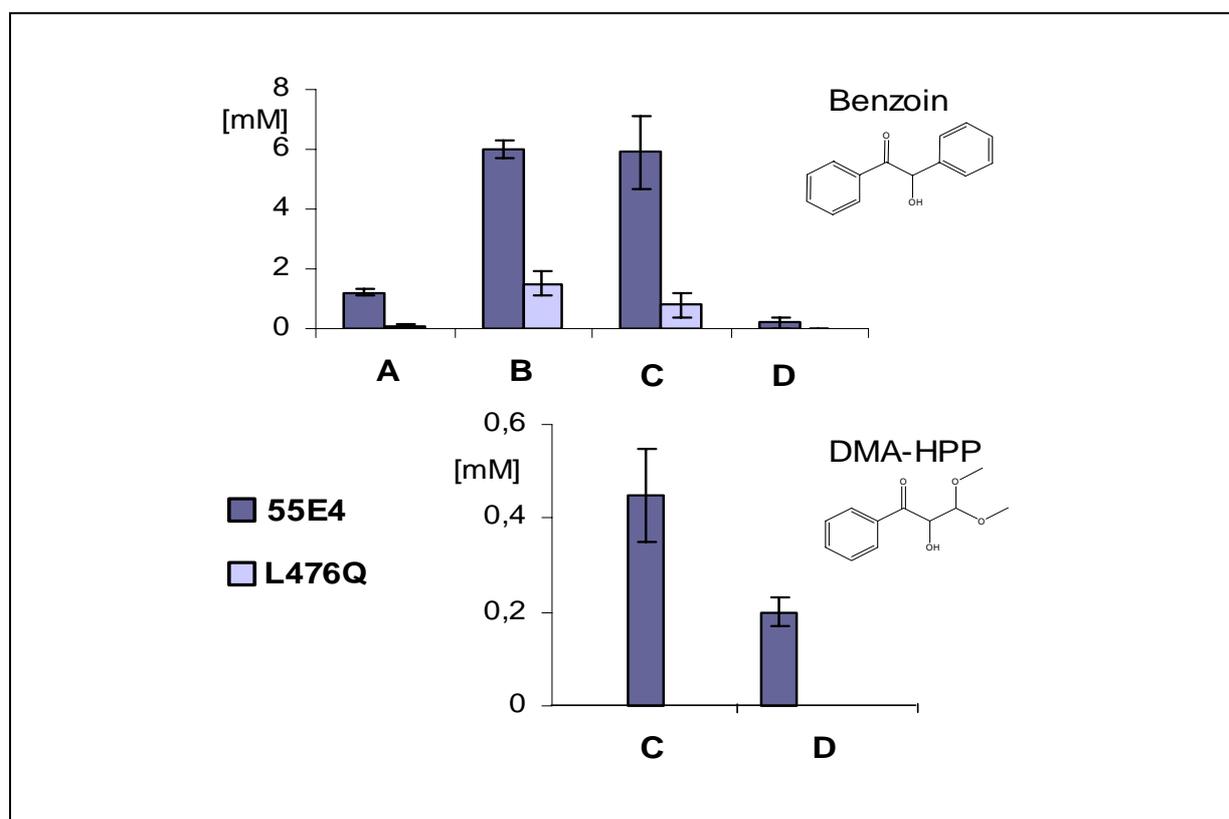


Abb. 22 : Umsätze der Screening-Variante 55E4 und der Ausgangsvariante L476Q für die Produkte Benzoin und DMA-HPP. Es wurden jeweils 0, 5 mg Enzym in 1,2 ml Ansätzen mit den Substraten Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd bei 30°C inkubiert. Benzoin und DMA-HPP wurden mittels (chiraler) HPLC quantifiziert. A 5 mM Benzaldehyd, B 20 mM Benzaldehyd, C 20 mM Benzaldehyd mit 60 mM Dimethoxyacetaldehyd, D 5 mM Benzaldehyd mit 500 mM Dimethoxyacetaldehyd. Die Ansätze A und B wurden nach 19 h gestoppt, Ansätze C und D nach 96 h. Das Produkt DMA-HPP konnte für die Ausgangsvariante L476Q nicht nachgewiesen werden. Alle Messungen wurden von dem Arbeitskreis Müller, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, durchgeführt.

Die Variante 55E4 katalysiert die Synthese des Produktes 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon. Bei einem dreifachen Überschuss des Akzeptors kommt es gleichzeitig zur Synthese von Benzoin. Ein hundertfacher Überschuss an Dimethoxyacetaldehyd vermindert zwar die Gesamtaktivität des Katalysators, die Produktbildung kann so aber zugunsten des gemischten Produktes verschoben werden.

3.5.3 Enantioselektivität der Carboligasereaktion

Für die in Abbildung 22 dargestellten Ansätze wurden die Enantioselektivitäten der Ausgangsvariante L476Q und der Screeningvariante 55E4 bestimmt. Für die Bildung des gemischten Produktes DMA-HPP, welches nur mit 55E4 zugänglich ist, zeigt die Variante eine schwache Selektivität von etwa 10 % für das (*R*)-Enantiomer, unabhängig von den Substratkonzentrationsverhältnissen. Anders ist es bei der Benzoinkatalyse. Für die Ansätze mit Benzaldehyd als alleinigem Substrat liegt der Enantiomerenüberschuss für das (*R*)-Enantiomer bei über 97 %. In den gemischten Ansätzen nimmt die Enantioselektivität des Katalysators mit steigenden Dimethoxyacetaldehydkonzentrationen ab: bei 60 mM Dimethoxyacetaldehyd liegt der *ee* bei 85 %, bei 500 mM des Substrates nur noch bei 77 % für (*R*)-Benzoin. Die Ausgangsvariante L476Q zeigt in allen Ansätzen, unabhängig von den Aldehydkonzentrationen einen *ee* von >99 % für (*R*)-Benzoin. Bei dem Ansatz mit den höchsten Gesamtaldehydkonzentrationen (5+500 mM) ist der Umsatz jedoch zu niedrig als dass man mit der gebildeten Produktmenge eine Aussage über den *ee* treffen könnte. In Tab. 13 sind die Enantiomerenüberschüsse für (*R*)-Benzoin zusammenfassend dargestellt.

Tab.13: Einfluss der Aldehydkonzentration auf die Enantioselektivität für (*R*)-Benzoin. Die angegebenen Werte wurden mittels chiraler HPLC bestimmt und bilden die Mittelwerte aus 2-3 voneinander unabhängigen Messungen. Die Standardabweichung betrug dabei weniger als 3,5 %. n.d.: Die Menge an umgesetzten Benzoin war zu gering für die Bestimmung eines *ee*.

Substrate	55E4	L476Q
	<i>(R)</i> -Benzoin <i>ee</i> [%]	
Benzaldehyd (5 mM)	99	99
Benzaldehyd (20 mM)	97	99
Benzaldehyd (20 mM) Dimethoxyaldehyd (60 mM)	85	99
Benzaldehyd (5 mM) Dimethoxyacetaldehyd (500 mM)	77	n.d.

Die Variante 55E4 katalysiert die Synthese zum gemischten Produkt 2-Hydroxy-3,3-propiofenon mit geringem Überschuß des (*R*)-Enantiomers. Die (*R*)-Benzoin-Synthese wird dagegen fast enantiomerenrein katalysiert, allerdings sinkt der *ee* für das (*R*)-Enantiomer mit steigender Gesamtaldehydkonzentration im Ansatz.

3.6 Lokalisierung der Aminosäureaustausche in der Proteinstruktur

Die über epPCR eingeführten Aminosäureaustausche A255G und I260T führten zu einer Variante mit veränderten biokatalytischen Eigenschaften (3.5). Das Akzeptorsubstratspektrum der Carboligasereaktion wurde im Vergleich zur Variante L476Q vergrößert: Dimethoxyacetaldehyd und Benzaldehyd können umgesetzt werden. An beiden Positionen kam es zur Einführung von Aminosäuren mit kleineren Seitenketten. Diese Aminosäureaustausche der Variante 55E4 sollten in der Tertiär – bzw. Quartärstruktur lokalisiert werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Pleiss, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, wurde von M. Knoll ein Strukturmodell anhand der Daten

zur Kristallstruktur [Polovnikova *et al.*, 2003] erstellt und die Positionen 255 und 260 markiert (Abb. 23).

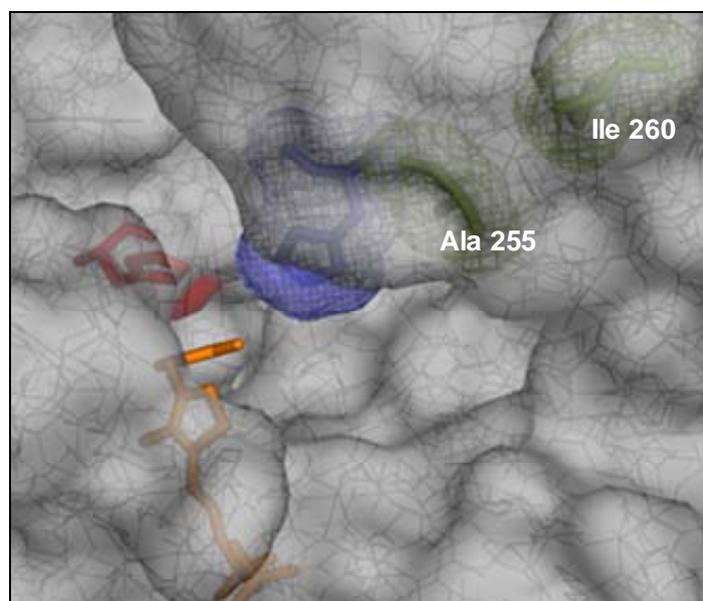


Abb.23: Modell des aktiven Zentrums der BFD mit Markierung der mutierten Aminosäuren der Variante 55E4. Die Perspektive zeigt den Blick vom Substratkanal in das aktive Zentrum. Der Cofaktor ThDP ist in Orange dargestellt, das Histidin 70 in Rot. Die beiden mutierten Aminosäuren sind in grüner Farbe wiedergegeben. Direkt vor dem Alanin 255, welches in Variante 55E4 durch ein Glycin ersetzt wurde, befindet sich das Histidin 281 (blau), welches in das aktive Zentrum hineinragt. Rot: H70.

Position 255 und 260 befinden sich nicht im aktiven Zentrum der BFD, jedoch in dessen unmittelbarer Umgebung. Beide Mutationen liegen in der dreidimensionalen Struktur nahe dem Histidin an Position 281, dessen Rest in das aktive Zentrum hineinragt und dessen Rolle für die Katalyse bereits untersucht wurde [Polovnikova *et al.*, 2003; Siegert, 2000]. Durch die Verkleinerung der Reste an Position 255 und 260 könnte der Histidinrest aus dem aktiven Zentrum zurückweichen, wodurch dort mehr Platz entstehen würde.

Aufgrund der Analyse des Strukturmodells und dem vermuteten Effekt der neuen Mutationen auf die Aminosäure H281 und der damit verbundenen Vergrößerung des aktiven Zentrums sollten die Variante 55E4 und die Variante H281A bezüglich ihrer Carboligaseaktivitäten mit den Substraten Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd vergleichend getestet werden. Es wurden die Substratverhältnisse 1:3 und 1:100, wie auch schon in den vorangegangenen Untersuchungen (3.5), für den Vergleich herangezogen. Tab. 14 zeigt die mittels (chiraler) HPLC ermittelten Umsetzungen für das DMA-HPP sowie für Benzoin.

Tab. 14: Vergleich der Carboligaseaktivitäten der Varianten 55E4 und H281A. Beide Enzyme (0, 2 mg/Ansatz) wurden in 1, 2 ml Ansätzen 4 Tage bei 30°C mit den Substraten Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd inkubiert. Die Angaben stellen die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Messungen dar. Die Bezeichnung 1:3 entspricht einer Substratzusammensetzung von 20 mM Benzaldehyd und 60 mM Dimethoxyacetaldehyd, die Bezeichnung 1: 100 entspricht 5 mM Benzaldehyd und 500 mM Dimethoxyacetaldehyd.

Enzym-Variante	DMA-HPP [mM]		Benzoin [mM]	
	1:3	1:100	1:3	1:100
55E4	0,33 (+/- 0,1)	0,18 (+/- 0,04)	4,7 (+/- 0,4)	0,23 (+/- 0,04)
H281A	0,35 (+/- 0,07)	0,08 (+/- 0,01)	3,3 (+/- 0,01)	0,08 (+/- 0,01)

Bei den Ansätzen mit niedriger Gesamtaldehydkonzentration (20 mM Benzaldehyd und 60 mM Dimethoxyacetaldehyd) sind die Umsätze der beiden Varianten vergleichbar. Auch bei der Variante H281A zeigt sich eine deutliche Bevorzugung der Katalyse der (*R*)-Benzoinbildung im Vergleich zur Bildung des gemischten Ligationsproduktes. Zudem wird das gemischte Produkt auch von dieser Variante nur mit einem geringen Enantiomerenüberschuss gebildet. Bei Änderung des Konzentrationsverhältnisses und damit Erhöhung der Gesamtaldehydkonzentration zu 5 mM Benzaldehyd und 500 mM Dimethoxyacetaldehyd zur Unterdrückung der Benzoin synthese zeigt die Variante 55E4 höhere Umsätze: sie katalysiert im betrachteten Zeitraum die Bildung von etwa doppelt soviel DMA-HPP und dreimal soviel Benzoin.

Mit Hilfe der 3D-Struktur der PpBFD konnte die Lage der beiden Aminosäureaustausche in der Screeningvariante 55E4 bestimmt werden. Beide befinden sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums in der Nähe der katalytisch aktiven Aminosäure H281. Ein Vergleich der Carboligaseaktivitäten der Variante 55E4 mit der Variante H281A zeigt vergleichbare Umsätze für DMA-HPP und Benzoin bei einem Substratverhältnis von 1:3. Bei dem Verhältnis der Substrate von 1:100 katalysiert die Variante 55E4 über den betrachteten Zeitraum die Bildung von etwa doppelt soviel DMA-HPP und dreifach soviel Benzoin.

3.7 Weiterführende Analyse der Austausche an Position 255 und 260 durch Sättigungsmutagenese

Die Sequenzierung der positiven Variante 55E4 hatte zwei zusätzliche Aminosäureaustausche im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q gezeigt: an Position 255 war die ursprüngliche Aminosäure Alanin gegen ein Glycin ausgetauscht worden, an Position 260 Isoleucin gegen Threonin (3.4). Es sollte die Frage geklärt werden, ob beide Austausche zusammen die beobachteten veränderten biochemischen Eigenschaften des Enzyms bedingen (3.5), oder ob nur eine Position hierfür verantwortlich ist. Zu diesem Zweck sollte eine Sättigungsmutagenesebank jeweils für beide Positionen angelegt werden. Dabei werden an den genannten Positionen alle 19 anderen möglichen Aminosäuren mittels PCR eingeführt. Die beiden Sättigungsbanken sollten dann mittels des unter 3.3.3 beschriebenen Farbossays mit Benzaldehyd als alleinigem Substrat auf erhöhte Carboligase-Aktivität durchgemustert werden. Durch Anlegen und Testen der Sättigungsbanken sollte nicht nur geklärt werden, welche Position für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, sondern auch, ob durch andere Aminosäurereste der bereits erzielte Effekt weiter optimiert werden kann.

3.7.1 Herstellen der Sättigungsbanken an Position 255 und Position 260

Zur Konstruktion der beiden Sättigungsbanken sollte die Methode der Overlap-Extension PCR zur Anwendung kommen. Diese empfiehlt sich bei Mutagenesen, bei denen die zu verändernde Position im mittleren Sequenzbereich liegt [Georgescu *et al.*, 2003].

Als Template diente das Konstrukt pET_L476Q. Die resultierenden Vollängen-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Hind*III in den Vektor pET28a kloniert und anschließend *E. coli* BL21 (DE3) als Expressionswirt mit den erstellten Banken transformiert. Es wurden jeweils 3 Klone jeder Bank sequenziert, in keinem Fall wurde an den mutagenisierten Positionen die ursprüngliche Aminosäure kodiert. Zusätzlich wurden jeweils 10 Klone einer Testrestriktion unterzogen, alle Plasmide trugen ein entsprechendes Insert. Pro Position wurden 200 Klone mittels des unter 3.3.3 beschriebenen Farbossays auf erhöhte Carboligase-Aktivität getestet.

3.7.2 Klone der Sättigungsbank an Position 255 zeigen erhöhte Carboligaseaktivität

In einem ersten Durchgang des Carboligase-Screenings, in dem jeweils 200 Klone getestet wurden, zeigten sechs Klone der Sättigungsbank an Position 255 und 2 Klone der Bank an Position 260 eine erhöhte Aktivität bezüglich der Formation von Benzoin im Farbttest. In diesem Screening diente die Ausgangsvariante L476Q als Negativkontrolle und die Screening-Variante 55E4 als Positivkontrolle. Die positiven Klone dieses ersten Durchgangs wurden noch jeweils viermal mittels des Farbbassays getestet, nur die Aktivität der Klone der Sättigungsbank an Position 255 war immer reproduzierbar (Abb. 24).

3.7.3 Sequenzierung der positiven Klone der Sättigungsmutagenese an Position 255

Die positiven Klone aus dem Screening der Sättigungsbanken wurden sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt, dass in allen 6 Fällen an Position 255 nun ein Glycin anstatt eines Alanins eingeführt wurde (Abb. 24). Keine der anderen 19 Aminosäuren führte zu einer nachweisbaren Erhöhung der Carboligase-Aktivität.

		Aminosäure Position 255		Codon Position 255
L476Q		CFRGLMP	A GIAAISQL	GCT
A		CFRGLMP	G GIAAISQL	GGG
B		CFRGLMP	G GIAAISQL	GGG
C		CFRGLMP	G GIAAISQL	GGG
D		CFRGLMP	G GIAAISQL	GGG
E		CFRGLMP	G GIAAISQL	GGC
55E4		CFRGLMP	G GIAATSQL	GGT

Abb. 24: Auswertung der positiven Klone der Sättigungsbank an Position 255. Dargestellt sind die in der Sättigungsbank an Position 255 identifizierten Klone (A-E). Alle besitzen an der mutagenisierten Position anstelle eines Alanins wie die Ausgangsvariante PpBFDL476Q ein Glycin. Die entsprechenden Basentriplets, welche die Position 255 kodieren, sind ebenfalls angegeben.

Für die Positionen der über Zufallsmutagenese eingeführten Aminosäureaustausche der Variante 55E4 wurde jeweils eine Sättigungsmutagenese durchgeführt. Die über Overlap-extension PCR generierten Bibliotheken wurden auf erhöhte Carboligaseaktivität getestet. Dabei konnte nur für Klone der Bibliothek, welche die Position 255 abdeckte, Aktivität nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der korrespondierenden DNA zeigte, dass es in allen Fällen zu dem Austausch A255G gekommen war.

4. Diskussion

Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzyme katalysieren die Spaltung und Bildung von C-C-Bindungen, darunter auch die Synthese chiraler 2-Hydroxyketone [Pohl *et al.*, 2002, 2004]. Für die Produktion chiraler Hydroxyketone, welche interessante Synthone in der organischen Chemie darstellen, werden die ThDP-abhängigen Enzyme bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts eingesetzt: die Pyruvatdecarboxylase (PDC), das Schlüsselenzym der alkoholischen Gärung, katalysiert in einer Nebenreaktion die Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC), welches als Vorstufe in der Synthese zu L-Ephedrin, einem Antihistaminikum, dient [Neuberg & Hirsch, 1921; Hildebrandt & Klavehn, 1930]. Wie die PDC besitzt auch die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) Carboligaseaktivität. Dabei stellt sie einen wertvollen Katalysator chiraler 2-Hydroxyketone dar: Unter den auf ihr Carboligasepotential bezüglich dieser Verbindungen untersuchten Enzymen, PDC und Benzaldehydlyase (BAL), zeigt die BFD aus *Pseudomonas putida* (PpBFD) als einzige eine (*S*)-selektive Katalyse. Zusammen ergänzen sich diese Biokatalysatoren in ihrem Produktspektrum. Aus den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd bilden BAL und BFD das zu PAC tautomere Produkt 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP) und bilden dabei die zueinander entgegengesetzten Enantiomere (Abb. 5) [Pohl *et al.*, 2002]. Die Katalyse der Synthese der tautomeren Produkte ergibt sich dadurch, dass im Falle der PDC Acetaldehyd als Donor vom ThDP gebunden wird, während bei der von BAL und BFD katalysierten Reaktion Benzaldehyd den Donor darstellt [Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004].

Chirale 2-Hydroxyketone als Synthone in der organischen Chemie sind vor allem dann interessant, wenn sie zusätzliche funktionelle Seitenketten besitzen, da sie Folgereaktionen ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verbindung (*S*)-2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon (Abb. 8) durch enzymatische Synthese zugänglich gemacht werden, welches das Produkt der Carboligation von Benzaldehyd mit Dimethoxyacetaldehyd darstellt, vorausgesetzt Benzaldehyd dient als Donor (Abb. 8). Unter den genannten Biokatalysatoren ist die PpBFD das einzige Enzym, bei dem die Carboligaseaktivität in einem (*S*)-Enantiomer resultiert. Allerdings ist bei dieser Reaktion das Spektrum der Akzeptoren auf Acetaldehyd beschränkt [Iding *et al.*, 2000].

Drei unterschiedliche Wege wurden in dieser Arbeit eingeschlagen, um die Zielreaktion (Abb. 8) zu etablieren und durch die Ergebnisse Wissen über die PpBFD als Biokatalysator zu gewinnen. Mittels Datenbankrecherche sollten (1) neue potentielle BFDs aus der Fülle der Sequenzinformationen aus veröffentlichten Genomprojekten gezielt ausgewählt, kloniert,

exprimiert und charakterisiert, sowie auf die gewünschte Reaktion hin untersucht werden. Mit den Methoden der gerichteten Evolution sollte (2) durch Etablierung einer rekombinativen Methode ein völlig neuer Sequenzraum und damit verbunden neues Katalysepotential erschaffen werden und (3) mittels bewährter fehlerhafter PCR das Akzeptorsubstratspektrum der bereits bekannten PpBFD erweitert werden.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen

Das „data base mining“, bei dem man in den aus Genomprojekten veröffentlichten Daten nach ähnlichen Sequenzen zu bereits bekannten Biokatalysatoren sucht, die kodierenden Gene aus den entsprechenden Organismen isoliert und in einem geeigneten Wirt exprimiert, ist eine Möglichkeit, neue Biokatalysatoren zu gewinnen [Wackett *et al.*, 2004]. Ausgehend von der Aminosäuresequenz der bereits gut charakterisierten PpBFD sollten ähnliche Primärstrukturen identifiziert werden und die Proteine durch Klonierung der korrespondierenden Gene und Expression in *E. coli* BL21(DE3) zugänglich gemacht werden. Mit Hilfe des Programms BLASTp [Altschul *et al.*, 1997; Schäffer *et al.*, 2001] und der Primärstruktur der bekannten PpBFD als Ausgangspunkt wurden die putativen Benzoylformiatdecarboxylasen aus den Organismen *Pseudomonas aeruginosa* (PaBFD) und *Bradyrhizobium japonicum* (BjBFD) ausgewählt. Bei dieser Auswahl spielte neben der Analyse der Primärstrukturen auch die Verfügbarkeit der genomischen DNA eine Rolle.

Um Aufschluss über das Katalysepotential der beiden potenziellen neuen BFDs zu erhalten, sollten die beiden korrespondierenden Gene mittels des T7-Expressionssystems in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert werden und das so gewonnene Protein durch die Fusion mit einem His-Tag in einem Schritt über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie gereinigt werden, um für die anschließenden Untersuchungen der Biokatalysatoren in ausreichender Menge zur Verfügung zu stehen.

Die PaBFD und die PpBFD zeigen eine hohe Übereinstimmung der Primärstrukturen

Ein Vergleich der Primärstrukturen der PaBFD und der PpBFD zeigte, dass diese nicht nur aus der gleichen Anzahl Aminosäuren (528 AS, 3.1.2) bestehen, sondern auch 63 % der Aminosäuren identisch sind (3.1.2). In der Gruppe der ThDP-abhängigen Decarboxylasen ist

eine solche Ähnlichkeit der Primärstrukturen nicht gegeben, eher ist eine hohe strukturelle Übereinstimmung zu beobachten [Hasson *et al.*, 1998; Mosbacher *et al.*, 2005]. Der Vergleich der Primärstrukturen zeigte zudem, dass neben den Resten, welche an der Bindung des zweiwertigen Metallions und des ThDPs beteiligt sind, auch die katalytisch wichtigen Reste S26, H70 und H281 der PpBFD, deren Bedeutung für den Katalysemechanismus mittels Mutagenesestudien untersucht wurden [Polovnikova *et al.*, 2003; Siegert *et al.*, 2005], in der Aminosäuresequenz der PaBFD konserviert sind.

Einen ersten Anhaltspunkt, dass über die Übereinstimmungen der Primärstrukturen hinaus auch die Faltung und damit die Tertiärstruktur der beiden Pseudomonaden-Proteine Parallelen zeigt, brachte die Aufreinigung der PaBFD über ein C-terminal fusioniertes His-Tag. Die strukturhomologen Proteine PDC, BAL und PpBFD konnten über ein C-terminales His-Tag gereinigt werden [Iding *et al.*, 2000; Janzen, 2002; Siegert *et al.*, 2005], der C-Terminus liegt bei diesen Biokatalysatoren frei. Die Aufreinigung der PaBFD konnte analog der Bedingungen für die PpBFD [Iding *et al.*, 2000] durchgeführt werden. Ein möglicher Aktivitätsverlust der PaBFD durch die Fusionierung des His-Tag kann natürlich erst ausgeschlossen werden, wenn aufgereinigtes Protein ohne His-Tag für einen Vergleich zur Verfügung steht.

PaBFD und PpBFD zeigen ähnliche katalytische Eigenschaften

Die Katalyse der C-C-Verknüpfung ist für die bereits bekannte PpBFD eine Nebenreaktion. Die physiologische Funktion des Enzyms liegt als Bestandteil des Mandelatkatabolismus in der Decarboxylierung von Benzoylformiat zu dem korrespondierenden Benzaldehyd [McLeish *et al.*, 2004, Lingen *et al.*, 2004]. Für die PaBFD ist bisher nicht bekannt, welche physiologische Funktion sie für den Organismus *P. aeruginosa* besitzt. Das Protein wurde in dieser Arbeit hinsichtlich beider Aktivitäten, Decarboxylierung und Carboligation, untersucht. Außer Benzoylformiat decarboxyliert die PpBFD auch unterschiedliche aromatische und aliphatische 2-Ketosäuren, allerdings mit vergleichsweise geringen Aktivitäten, die weniger als 2 % der Decarboxylaseaktivität für Benzoylformiat (320 U/mg) betragen [Iding *et al.*, 1998, 2000]. Die gemessene Benzoylformiatdecarboxylaseaktivität der PaBFD beträgt mit 75 U/mg nur etwa 24 % der Aktivität der PpBFD. Bei den für die bekannte PpBFD untersuchten nicht-natürlichen Substraten zeigt auch die PaBFD deutlich geringere Aktivitäten, welche in diesem Fall bei max. 4 % der Benzoylformiatdecarboxylaseaktivität liegen. Da diese bei der

PaBFD jedoch bereits geringer ist als bei der PpBFD, zeigen die beiden Pseudomonaden-Proteine keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieser Substrate. Für den beschriebenen direkten Vergleich wurden die Werte der PpBFD durch D. Gocke, Arbeitskreis Pohl, Institut für molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt (ohne Abb.). Die hier durchgeführten Messungen sollten jedoch nur erste Hinweise auf das Substratspektrum liefern. Ein quantitativer Vergleich ist nicht möglich, da berücksichtigt werden muss, dass die Messungen bei einer Substratkonzentration durchgeführt wurden. Substratüberschussinhibierungen der Biokatalysatoren sind genauso möglich wie eine zu geringe Substratkonzentration unterhalb der optimalen Sättigung. Genaue Aussagen können erst durch kinetische Untersuchungen gemacht werden.

Neben den Untersuchungen zur Decarboxylaseaktivität konnte für die neue, im Rahmen dieser Arbeit identifizierte PaBFD auch Carboligaseaktivität nachgewiesen werden. In einem Ansatz mit Benzaldehyd und Acetaldehyd katalysierte die PaBFD die Ligation der beiden Substrate zu 2-HPP, dem gleichen Produkt, welches auch von der bekannten PpBFD als gemischtes Ligationsprodukt gebildet wird (Abb. 13). Die Katalyse lief enantioselektiv ab, wie bei der PpBFD mit einem Überschuss für das (*S*)-Enantiomer. Dabei blieb die chirale Induktion der Katalyse unvollständig: der *ee* betrug etwa 77 %. Die PpBFD kann die Bildung des (*S*)-2-HPP mit einem *ee* für das (*S*)-Enantiomer von bis zu 95 % katalysieren. Dabei wurde eine Abhängigkeit der chiralen Induktion bei der Bildung des Produktes 2-HPP von der Konzentration des Donorsubstrats Benzaldehyd im Ansatz beobachtet [Iding *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus der gleiche negative Einfluss auf die Enantioselektivität der Carboligasereaktion einer Variante der PpBFD durch das Substrat Dimethoxyacetaldehyd beobachtet (4.3). Die Katalyse der PaBFD zu dem Produkt (*S*)-2-HPP wurde hier nur mit einer Substratkonzentration (20 mM Benzaldehyd, 60 mM Acetaldehyd) getestet. In den Untersuchungen von Iding *et al.*, 2000 zeigte die bekannte PpBFD bei dieser Benzaldehydkonzentration nur noch einen *ee* von ca. 89 % im Vergleich zu einem *ee* von ca. 95 % bei 1 mM Benzaldehyd [Iding *et al.*, 2000; Siegert 2000]. Durch Veränderung der Reaktionsbedingungen könnte daher möglicherweise auch die Enantioselektivität der PaBFD bezüglich der 2-HPP Bildung noch optimiert werden.

Wie gezeigt werden konnte, stimmt die PaBFD bezüglich des Spektrums der Akzeptoren für die Carboligation auch mit der bekannten PpBFD überein: die gesuchte Zielreaktion zum (*S*)-DMA-HPP katalysiert die PaBFD nicht. Daraufhin wurde auch in einem Ansatz versucht den Donor Benzaldehyd auszutauschen, die bekannte PpBFD akzeptiert als Donoren keine in der

ortho-Position substituierten Benzaldehyde [Iding *et al.*, 2000]. Wie die PpBFD zeigt die PaBFD keine Katalyse zum entsprechenden HPP-Derivat (3.1.5).

Bei der Expression der BjbFD in *Escherichia coli* BL21(DE3) kommt es zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten

Ein Vergleich der Sequenzen der neu identifizierten BjbFD mit der PpBFD zeigt größere Unterschiede: insgesamt besitzen die beiden Proteine ca. 30 % identische Aminosäuren im Vergleich zu 63 % Identität der beiden Pseudomonaden-Proteine. Die geringere Übereinstimmung betrifft auch Positionen von Aminosäuren, deren Funktion für die von der PpBFD katalysierten Reaktionen, Decarboxylierung und Carboligation, bekannt sind (Tab. 7, Abb. 10).

An Position 26 befindet sich in der Primärstruktur der PpBFD ein Serin, welches für die Substratbindung essentiell ist: ein Austausch zu Alanin führt zu einem vollständigen Verlust der Decarboxylaseaktivität [Polovnikova *et al.*, 2003]. Über die Carboligaseaktivität dieser Variante ist noch nichts bekannt. Äquivalent zu S26 der PpBFD ist laut Sequenzvergleich ein Threonin an Position 28 bei der BjbFD. Zwar unterscheiden sich die beiden Aminosäuren in ihrer Seitenkette, beide besitzen jedoch die gleiche funktionelle Gruppe (-OH). Die Aminosäure H70 findet sich auch in der Sequenz der BjbFD an entsprechender Stelle. Für die PpBFD ist dieser Rest katalytisch essentiell, für die Decarboxylasereaktion als auch für die Carboligasereaktion. Eine Variante mit einem Austausch zu Alanin an dieser Position zeigt noch 0,3 % der Decarboxylaseaktivität und 5 % der Carboligaseaktivität der PpBFD [Siegert, 2000; Polovnikova *et al.*, 2003]. Die PpBFD hat zusätzlich an Position 281 ein Histidin, das in der BjbFD nicht vorhanden ist, auch nicht in der Umgebung (+/- 40 Aminosäuren). Ein Austausch zu Alanin an der genannten Position der PpBFD führt zu einer Verringerung der Decarboxylaseaktivität (35 U/mg, ca.13 % der ursprünglichen Aktivität), jedoch nicht zu einer Verringerung der Carboligaseaktivität [Siegert, 2000; Polovnikova *et al.*, 2003]. Die beim WT-Protein nur schwach vorhandene (*R*)-Benzoin bildende Aktivität (ca. 0,25 U/mg) wird jedoch um den Faktor 140 verstärkt [Siegert, 2000].

Weitere Vergleiche auf der Basis von Erkenntnissen zur PpBFD sind möglich, sollen hier aber zunächst nicht weiter ausgeführt werden unter Berücksichtigung des Umstandes, dass die BjbFD nicht löslich exprimiert werden konnte (Abb. 12) und somit keine Daten zu Aktivitäten der BjbFD vorliegen. Für diese Vergleiche spricht sicherlich auf der einen Seite,

dass z.B. für die bisher bekannten PDC eine Konservierung der Position in der Primärsequenz gekoppelt mit der Konservierung der Position in der Struktur beobachtet wurde [König, 1998; Dorbitzsch *et al.*, 1998]. Auf der anderen Seite zeigte ein Vergleich der aktiven Zentren der beiden 2-Ketosäuredecarboxylasen PpBFD und der PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDC), dass die beiden bereits beschriebenen Histidinreste H281 und H70 im aktiven Zentrum der PpBFD die gleiche Position einnehmen wie zwei Histidinreste der ScPDC in deren aktiven Zentrum. Auf Ebene der Primärsequenz befinden sich die Reste der ScPDC an völlig anderen Positionen: 113 und 114 [Hasson *et al.*, 1998].

Trotz großer Differenzen in den Primärstrukturen konnten außerdem Übereinstimmungen innerhalb der Tertiär- und Quartärstrukturen erreicht werden, wie sie für die bereits erwähnten Enzyme PpBFD, ScPDC und BAL beobachtet wurden [Mosbacher *et al.*, 2005, Duggleby *et al.*, 2006]. Die BjBFD könnte durchaus ein interessantes Carboligasepotential besitzen. Ohne lösliches Protein konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden, ob die BjBFD überhaupt Benzoylformiat decarboxyliert, bzw. überhaupt aktiv ist.

Man nimmt an, dass die Aggregation von rekombinantem Protein im Cytoplasma des Expressionswirtes zum einen durch eine hohe Konzentration von Faltungszwischenzuständen verursacht wird, die über hydrophobe Bereiche miteinander interagieren, und zum anderen durch die Abwesenheit von Chaperonen, welche als Faltungshelfer mit den hydrophoben Bereichen der Polypeptidketten des zu faltenden Proteins interagieren [Sorensen & Mortensen, 2005]. Eine bekannte Strategie, um die Bildung von Proteinaggregaten zu verhindern, ist das Absenken der Kultivierungstemperatur der Überexpressionskulturen [Baneyx, 1999; Sorensen & Mortensen, 2005]. Auch in dieser Arbeit wurde diese Taktik verfolgt, führte jedoch nicht zu löslichem Protein. Diese Beobachtung führt im Moment zu der Annahme, dass die BjBFD für eine korrekte Faltung möglicherweise Faltungshelfer benötigt, eine Coexpression mit Chaperonen kodierenden Genen könnte zu löslichem Protein führen. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre die Expression des Gens in einem sogenannten Origami-Stamm (Novagen). Cysteine werden im Cytoplasma von *E. coli* konstant durch zwei Reduktasen reduziert gehalten, Disulfidbrücken können so nicht ausgebildet werden. In den Origami-Stämmen sind die entsprechenden Gene der Reduktasen zerstört.

4.2 Etablierung der Methode ITCHY für die Rekombination nicht-homologer Gene

Die Methode ITCHY wird in der Literatur als Ansatz vorgestellt, welcher es ermöglicht, Sequenzen unabhängig ihrer Übereinstimmungen miteinander zu rekombinieren [Ostermeier, 1999 a, b]. Die Methode sollte für die ThDP-abhängigen Enzyme etabliert werden, die eine Gruppe strukturhomologer Proteine bilden, welche jedoch auf DNA-Ebene nur wenig Übereinstimmung zeigen. Die ThDP-abhängigen Proteine BFD, PDC und BAL, welche eine hohe Übereinstimmung der Struktur besitzen [Mosbacher *et al.*, 2005], zeigen auf DNA-Ebene eine Übereinstimmung von weniger als 30 % [Siegert *et al.*, 2005]. Kombiniert mit dem klassischen DNA-Shuffling bildet ITCHY zudem den Ansatz SCRATCHY [Lutz *et al.*, 2001a]. Die mittels ITCHY erstellten Hybridgene werden dabei miteinander vermischt. Die Methode ITCHY sollte zunächst mit den korrespondierenden Genen der BAL und der PpBFD etabliert werden. Beide Proteine arbeiten bei der Carboligation mit Benzaldehyd als Donor. Bei erfolgreicher Etablierung sollten weitere ThDP abhängige Enzyme, wie z.B die PDC, hinzukommen.

Mit Anwendung der Methode ITCHY auf die beiden ausgewählten Sequenzen konnte keine entsprechende Bibliothek von Hybridgenen erzeugt werden. Die Analyse der Plasmid-DNA dieser Klone zeigte zum einen eine Kontamination durch die WT-Sequenzen. Zum anderen waren Plasmide entstanden, welche offensichtlich das Wachstum auf den selektiven Agarplatten ermöglichten, also die entsprechende Antibiotika-Resistenzkassette trugen, jedoch nicht dem ursprünglichen Vektor pET28 entsprachen. Die Testexpression dieser Klone zeigte kein Produkt (3.2.1).

Sicherlich wurde in dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz die Ausgangssituation im Vergleich zum Protokoll von Ostermeier & Lutz, 2003, verändert. Die beiden Autoren gingen von einem Konstrukt aus, in dem die beiden zu rekombinierenden Gene hintereinander in einem Vektor kloniert vorliegen. Um die Anwendung der Methode universell zu gestalten, wurde in dieser Arbeit mit den Sequenzen in zwei getrennten Vektoren, jedoch über identische Schnittstellen kloniert, gearbeitet (3.2.1). Als Anregung für diesen Weg hatte ein von Ostermeier 1999 veröffentlichtes Protokoll gedient, in dem eine ITCHY-Bibliothek ebenfalls ausgehend von zwei Konstrukten angefertigt worden war [Ostermeier *et al.*, 1999a]. Durch die veränderte Ausgangssituation ergab sich eine veränderte Abfolge der durchzuführenden Schritte. Sicherlich könnte dies der Grund für die nicht gelungene Durchführung sein, im Prinzip sollte der Erfolg dadurch jedoch nicht eingeschränkt sein.

Die gewonnenen Erfahrungen bei der Durchführung der Methode im Rahmen dieser Arbeit führen zur Zeit eher zu der Vermutung, dass zum Beispiel die zahlreichen Behandlungen der DNA mit unterschiedlichen Enzymen (Restriktionsendonukleasen, ExonukleaseIII, Mung-Bohnen-Nuklease, Klenow Fragment, T4 Ligase) und die notwendigen Umpufferungen zwischen den Reaktionsschritten, um Reaktionen abzustoppen oder ideale Reaktionsbedingungen für das Folgeenzym zu schaffen, problematisch sind. Bei jedem Schritt geht ein Teil der zu Beginn eingesetzten DNA verloren, was zur Verkleinerung der Bibliothek führt. Ein sensitiver Schritt könnte zudem die zufällige Zusammenführung der verdauten Fragmente sein, so dass es zum Zusammenfinden unterschiedlich stark verdauter Sequenzen kommt, in dem hier verfolgten Ansatz, sowie auch in dem von Ostermeier & Lutz, 2003 veröffentlichten Protokoll. Wie es zu dem Zusammenschluss funktionaler Plasmide mit entsprechenden Hybridgenen kommen kann, so können sich genauso „unsinnige“ Plasmide zusammenfinden, bei denen es dann auch nicht zur Bildung von Hybridgenen kommt (Abb. 25). Ein solcher Vorgang würde auch die in dieser Arbeit beobachteten Plasmide (Abb. 15) erklären.

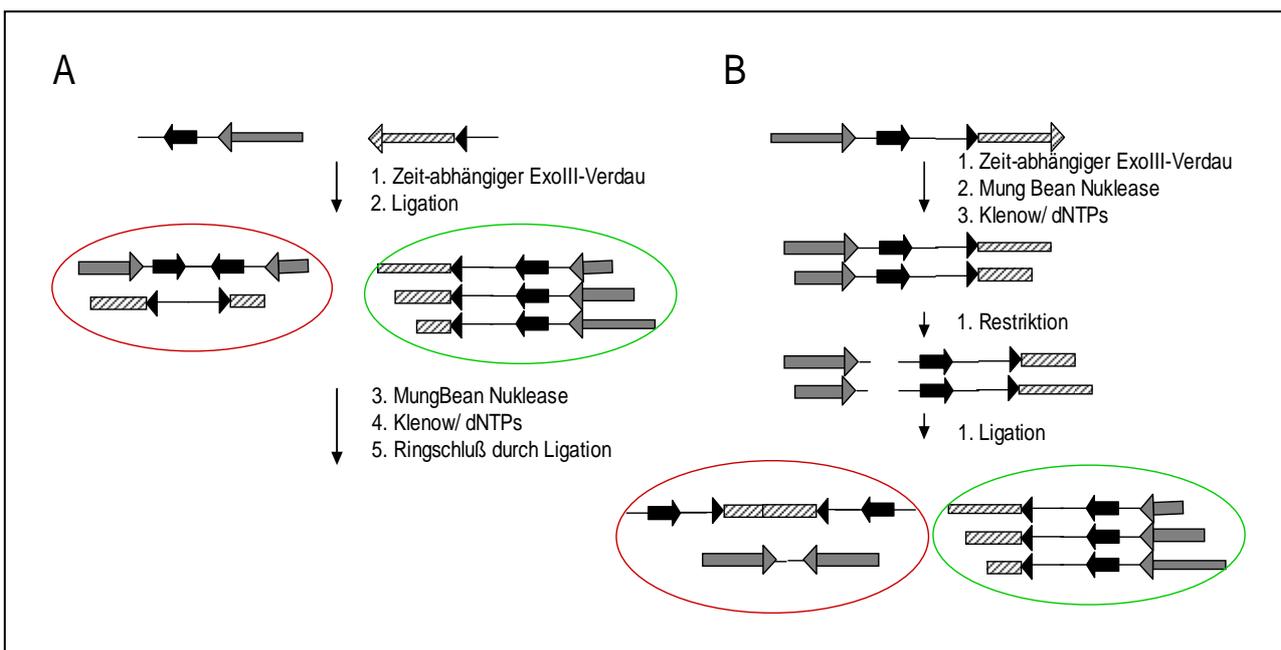


Abb. 25: Produkte der Methode ITCHY. Abfolge A zeigt den in dieser Arbeit durchgeführten Ansatz, Abfolge B entspricht der von Lutz & Ostermeier 2003 veröffentlichten Anleitung. In beiden Fällen kann es bei der Ligation der Fragmente zur Bildung von unerwünschten Konstrukten kommen. Diese sind rot markiert. Im Idealfall (grün) kommt es bei der zufälligen Ligation zu funktionellen Vektoren mit Insert. Im Fall B sind die markierten Produkte bereits geschlossene Vektoren. Neben den dargestellten Dimeren ist zusätzlich eine Bildung von Polymeren möglich.

Trotz der eigentlich universell gedachten Anwendung dieser Methode ist die Übertragung auf die gewählten Sequenzen ThDP-abhängiger Enzyme offenbar nicht möglich. Sucht man in der Literatur nach Publikationen mit Anwendung dieser Methode, so findet man, dass seit 1999 mittels ITCHY, trotz methodischer Variationen [Lutz *et al.*, 2001b]), erst drei unterschiedliche Bibliotheken erzeugt wurden [Ostermeier *et al.*, 1999a, b; Kawarasaki *et al.*, 2003], was die schlechte Übertragbarkeit auf andere als die von diesen beiden Gruppen verwendeten Gene unterstreicht.

4.3 Erweiterung des Akzeptorspektrums der PpBFD durch fehlerhafte PCR

Die PpBFD katalysiert die Ligation von zwei Aldehyden zu chiralen 2-Hydroxyketonen. Das Akzeptorsubstratspektrum der PpBFD ist dabei auf Acetaldehyd beschränkt. Es ist zwar eine schwache Katalyse der Benzoin synthese beobachtet worden, wobei Benzaldehyd als Donor und Akzeptor fungiert, diese ist aber im Vergleich zur Bildung des 2-Hydroxypropiofenons (Donor: Benzaldehyd, Akzeptor: Acetaldehyd) zu vernachlässigen [Iding *et al.*, 2000]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Variante erzeugt werden, welche Benzaldehyd mit Dimethoxyacetaldehyd zum (*S*)-DMA-HPP verknüpft. Als Ausgangspunkt sollte eine Variante der PpBFD dienen. Die PpBFDL476Q besitzt im Vergleich zum Wildtyp-Protein bereits eine 5x höhere Carboligaseaktivität bezüglich der Bildung von (*S*)-2-HPP.

Die Methode der Wahl, um dieses Ziel zu erreichen, war dabei die fehlerhafte PCR (epPCR) des kompletten Gens, welches eine Untereinheit des Homotetramers PpBFD kodiert. Da die Kristallstruktur der PpBFD vorliegt [Hasson *et al.*, 1998; Polovinkova *et al.*, 2003], wäre auf der Basis von Strukturmodellierungen sicherlich auch ein Ansatz rationalen Designs denkbar gewesen. Für die Zufallsmutagenese durch fehlerhafte PCR des kompletten Gens sprachen aber zwei Gründe:

(1) Schon oft wurde beobachtet, dass Reste außerhalb des aktiven Zentrums die katalytischen Eigenschaften des Enzyms verändern können, wie z.B. die Enantioselektivität [Liebeton *et al.*, 2000] oder das Substratspektrum [Lingen *et al.*, 2003].

(2) Eingeführte Mutationen, ob rational oder zufällig, können sich durchaus auch negativ auf die katalytischen Eigenschaften des Proteins auswirken. Bei der gerichteten Evolution, zu der auch die fehlerhafte PCR gehört, entsteht eine Vielzahl von Varianten, welche mittels Aktivitätstest, ob Screening oder Selektion, durchgemustert werden. Nur die Varianten, die den im Test gewählten Bedingungen entsprechen, werden auch identifiziert.

Bei der fehlerhaften PCR ist es wichtig, eine geeignete Fehlerrate für den Ansatz zu wählen. Besitzt das Enzym eine schwache promiskuitive Aktivität, welche verbessert werden soll, reichen meist kleine Änderungen, d.h. nur wenige Mutationen [Aharoni *et al.*, 2005; Bloom *et al.*, 2005]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass jede zusätzlich eingeführte Mutation zur Inaktivierung von 30 – 40 % der bis dahin aktiv verbliebenen Enzyme führt [Guo *et al.*, 2004]. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass auch hohe Fehlerraten zu verbesserten oder völlig neuen Funktionen führen [Zaccolo & Gherardi, 1999; Daugherty *et al.*, 2000; Drummond *et al.*, 2005], dabei enthalten die so erstellten Bibliotheken mehr „einmalige“ funktionelle Klone [Drummond *et al.*, 2005]. Bei der in dieser Arbeit

durchgeführten epPCR wurde die Fehlerrate auf 1-3 Aminosäureaustausche pro Untereinheit eingestellt. Nach dem derzeitigen Wissensstand stellte die Erweiterung des Akzeptorsubstratspektrums eher eine Optimierung einer vorhandenen Aktivität dar, für die eine solche Anzahl an Austauschen ausreichen sollte.

Das Durchmustern der erzeugten Bibliothek – Vor- und Nachteile des Tests für erhöhte Carboligaseaktivität

Zur Durchmusterung der Bibliothek wurde auf einen einfachen Farbassay zurückgegriffen, der bereits für die Evolution der PpBFD bezüglich der Erweiterung des Donorspektrums und Lösungsmittelstabilität erfolgreich eingesetzt worden war [Lingen *et al.*, 2002, 2003]. Das Produkt der Carboligationsreaktion reduziert dabei den Farbstoff TTC, es kommt zu einem leicht zu detektierenden Farbumschlag von farblos zu rot [Breuer *et al.*, 2002]. Der Farbassay konnte problemlos an die in dieser Arbeit getesteten Substrate Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd angepasst werden (3.3.3).

Ein solcher Test als Screeningsystem sollte schnell durchzuführen und automatisierbar sein [Bornscheuer, 2004]. Normalerweise können mit Hilfe eines einfachen Tests täglich 1.000 bis 10.000 Varianten automatisiert durchgemustert werden [Reetz, 2003]. Der in dieser Arbeit verwendete Farbassay entspricht diesen Anforderungen, konnte aber zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeiten noch nicht automatisiert werden. Der Grund hierfür lag in der Natur der als Substrate eingesetzten flüchtigen Aldehyde. Die Arbeiten sollten folglich unter einem Abzug vorgenommen werden. Eine solche Apparatur war für den institutseigenen Pipettierroboter zu dem Zeitpunkt noch nicht eingerichtet. Da die Arbeiten komplett manuell durchgeführt wurden, kam es zu der relativ niedrigen Anzahl durchmusterter Klone von insgesamt 8.000. Für Folgeprojekte ist jetzt aber aufgrund einer entsprechenden Vorrichtung eine Automatisierung des Prozesses möglich.

Der Test unterscheidet nicht zwischen den verschiedenen möglichen Produkten der Carboligaseaktivität. Das gemischte Produkt DMA-HPP sowie Benzoin lösen gleichermaßen den Farbumschlag aus. Ebenso die beiden jeweils möglichen Enantiomere (3.3.3). Die im Test positiven Varianten müssen anschließend einer genauen Analyse ihrer Carboligaseaktivität unterzogen werden. In dieser Arbeit wurde dafür die Methode der chiralen HPLC angewendet. Erst dann sind Aussagen über Produkt sowie Enantioselektivität möglich.

Bei der Durchmusterung der 8.000 Klone wurde eine positive Variante, die Variante 55E4, identifiziert. Die Variante 55E4 wurde im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q auf ihre katalytischen Eigenschaften getestet, sowie die Sequenz des die 55E4 kodierenden Gens analysiert, um so weitere Informationen zu den Struktur-Funktionsbeziehungen der BFD zu gewinnen. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

Die Variante 55E4 katalysiert die Reaktion zu 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon

Die positive Variante 55E4 zeigt bei der Analyse mittels chiraler HPLC tatsächlich Katalyseaktivität für das gemischte Produkt DMA-HPP. Es kommt allerdings gleichzeitig zu einer Verstärkung der Benzoin synthese. Diese wird auch nicht durch den dreifachen Überschuss des eigentlichen Akzeptoraldehyds, dem Dimethoxyacetaldehyd, unterdrückt. Dabei verläuft interessanterweise die Synthese zu Benzoin hoch enantioselektiv, es wird ein Überschuss des (*R*)-Enantiomers von bis zu 99 % erreicht. Die Katalyse des DMA-HPP führt hingegen nur zu einem geringen *ee* von etwa 10 % für das (*R*)-Enantiomer (3.5.3).

Die Katalyse des gemischten Produktes konnte durch weitere Erhöhung der Dimethoxyacetaldehyd-Konzentration von 60 auf 500 mM und Verringerung der Benzaldehyd-Konzentration von 20 auf 5 mM im Vergleich zur Benzoin synthese begünstigt werden (3.5.2). Dabei kam die Katalyse der Benzoin synthese zwar nicht völlig zum Erliegen, nahm jedoch um ca. das 30fache ab. Der Umsatz zum gemischten Produkt wurde unter diesen Bedingungen nur um die Hälfte verringert (Abb. 22).

Die Variante 55E4 zeigt die beiden zusätzlichen Aminosäureaustausche A255G und I260T

Die beiden Aminosäureaustausche A255G und I260T, welche in der Variante 55E4 im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q zusätzlich vorhanden sind (Tab. 10), befinden sich in der unmittelbaren Nähe des aktiven Zentrums, sowie auch in unmittelbarer Nähe zueinander, nahe der in das aktive Zentrum hineinragenden Aminosäure H281 (Abb. 23). In beiden Fällen kam es durch die Austausch zu Aminosäuren mit kleinen Seitenketten im Vergleich zu den ursprünglichen Resten. Anhand der Struktur wird erkennbar, dass eine Beeinflussung der Position H281 möglich ist. Dünkemann *et al.*, 2002, konnte mit einer Variante der PpBFD,

welche an Position 281 einen Austausch zu Alanin aufwies, erfolgreich die (*R*)-Enantiomere gemischter Benzoinen synthetisieren. Die Annahme lag deshalb nahe, dass bei der Screeningvariante 55E4 durch die kleineren Seitenketten in der Nähe von H281 ein vergleichbarer Effekt auftritt wie bei einem direktem Austausch des Histidins an Position 281 zu der kleineren Aminosäure Alanin. Der Histidinrest weicht in der Variante 55E4 vermutlich aufgrund der Änderungen in der Umgebung aus dem aktiven Zentrum zurück, und es entsteht daher mehr Platz für sterisch anspruchsvolle Substrate.

Die vergleichende Umsetzung von Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd mit der Variante H281A und der Variante 55E4 zeigte ein sehr ähnliches Umsatzprofil bei einem Substratverhältnis von 1:3, also 20 mM Benzaldehyd zusammen mit 60 mM Dimethoxyacetaldehyd (Tab. 14). Bei Erhöhung der Dimethoxyacetaldehydkonzentration auf 500 mM und gleichzeitiger Verringerung der Benzaldehydkonzentration auf 5 mM kam es bei der Variante H281A zu einer stärkeren Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Variante 55E4. Die Ausbeute des DMA-HPP sank bei der Variante H281A von 0,35 mM auf 0,08 mM, die Variante 55E4 zeigte im Ansatz 5 mM + 500 mM noch eine Ausbeute von 0,18 mM. Die Ausbeute der Benzoin synthese verringerte sich ebenfalls stark von 3,3 mM auf 0,08 mM, was in etwa 1/3 der Ausbeute durch die Variante 55E4 unter diesen Bedingungen entspricht.

Die vergleichbaren Ergebnisse bei einem Substratverhältnis von 1:3 und den damit verbundenen vergleichsweise niedrigen Aldehydkonzentrationen in den Ansätzen sprechen für die Annahme, es komme bei der Variante 55E4 zu einer Beeinflussung der Aminosäure H281. Die stärkere Inaktivierung der Variante H281A im Vergleich zur Variante 55E4 könnte bedeuten, dass die direkte Veränderung der Position 281 zu einer Destabilisierung des Biokatalysators führt, im Gegensatz zu der indirekten Beeinflussung, wie sie für die Variante 55E4 angenommen wird.

Da die beiden Varianten bei der Substratkonzentration 20 und 60 mM, mit der die Aldehyde auch im Screening eingesetzt worden waren, ähnliche Umsetzungen zeigen, ist es im ersten Moment verwunderlich, dass nicht auch die Variante H281A im Screening gefunden wurde. Schaut man sich jedoch das Basentriplett an, welches das Histidin an Position 281 kodiert, so fällt auf, dass für einen Austausch zu Alanin zwei Basenaustausche innerhalb dieses Codons erfolgen müssten. Ein solches Ereignis ist als unwahrscheinlich anzusehen. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes können bei einer fehlerhaften PCR nicht für alle Aminosäuren die entsprechenden kodierenden Triplets an jeder Position eingeführt werden, ein wichtiger Kritikpunkt dieser Methode [Eggert *et al.*, 2004]. In dem hier aufgetretenen Fall zeigt sich aber, dass die Struktur des Biokatalysators genug Raum für Lösungen lässt, um

bestimmte Effekte zu erreichen. Es wäre darüber hinaus interessant zu wissen, ob sich die Variante 55E4 unter Bedingungen wie z.B. hohen Temperaturen als stabiler erweist. Ist das der Fall, so könnte man dieses Ergebnis auch bei Ansätzen des rationalen Designs berücksichtigen, indem neben den direkten Austauschen interessanter Aminosäuren auch die Veränderung der Umgebung mit einbezogen wird als eine Art „sanfter“ Optimierung.

Der Austausch A255G führt allein zu den dem veränderten Akzeptorsubstratspektrum der Variante 55E4

Die biokatalytischen Eigenschaften der Variante 55E4 werden, wie oben diskutiert, vermutlich durch eine indirekt beeinflusste Positionsveränderung der Aminosäure H281 verursacht. Eine Sättigungsmutagenese an beiden veränderten Positionen 255 und 260 kann weitere Aussagen über die spezifischen Einflüsse der einzelnen Austausche ermöglichen. Dazu wurden alle Aminosäuren an den entsprechenden Positionen eingeführt.

Bei Erstellung der beiden Sättigungsbanken für die Aminosäurepositionen 255 und 260 wurde die Methode der „overlap-extension“-PCR angewendet [Georgescu *et al.*, 2003]. Da die beiden zu sättigenden Positionen sich in der Sequenzmitte des Gens befinden, eignet sich diese Methode hier besonders gut. Für die Mutagenese wurden Oligonukleotide eingesetzt, die an den zu sättigenden Positionen das Zufallstriplett NNS kodierten (N = alle Basen; S = Guanosin (G) oder Cytosin (C)). Durch diese Einschränkung möglicher Kombinationen halbiert sich die Zahl der theoretisch möglichen Codons von 64 auf 32. Eine geringere Anzahl von Klonen muss durchgemustert werden, und trotzdem sind alle 20 Aminosäuren kodiert. Ein mögliches Problem der Sättigungsmutagenese ergibt sich aus der Tatsache, dass Oligonukleotide, welche keine Watson-Crick Basenpaarungen mit dem ursprünglichen Codon ausbilden, eine geringere Hybridisierungseffizienz zeigen [Airaksinen & Hovi, 1998]. Es könnte sich also eine Bevorzugung der originalen Nukleotide des untersuchten Basentriplets ergeben. Durch das Einsetzen der 10fachen Anzahl möglicher Varianten im Farbbassay, hier jeweils 200 Klone, sollten dennoch alle möglichen Aminosäureaustausche getestet worden sein. Von den fertigen Sättigungsbanken wurden außerdem jeweils drei Klone sequenziert – keiner dieser insgesamt sechs Klone kodierte an den entsprechenden Positionen die ursprüngliche Aminosäure. Für eine sehr gute Qualität der Sättigungsbanken sprach außerdem, dass von jeweils 10 zufällig ausgesuchten Klonen bei einer Testrestriktion alle das entsprechende Insert trugen (3.7.1). Die jeweils 200 Klone der beiden Sättigungsbanken

wurden mit Hilfe des weiter oben bereits diskutierten Farbassays auf Carboligaseaktivität durchgemustert.

Positive Klone wurden nur bei der Durchmusterung der Sättigungsbank der Position 255 gefunden (3.7.2). Diese Beobachtung spricht für die Annahme, dass für die Veränderungen der katalytischen Eigenschaften im Vergleich zur Ausgangsvariante L476Q der Austausch an Position 255 allein ausreichend ist. Sechs Klone mit erhöhter Carboligaseaktivität wurden unter den 200 getesteten identifiziert. Die Sequenzierung der korrespondierenden DNA zeigte, dass alle Klone den gleichen Austausch trugen wie die durch fehlerhafte PCR generierte Variante 55E4: das zuvor an dieser Stelle kodierte Alanin war durch ein Glycin ersetzt worden (Abb. 24). Offensichtlich kommt es zu dem erweiterten Akzeptorsubstratspektrum nur bei einer Verkleinerung der Seitenkette an Position 255. Eine solche Verkleinerung kann ausgehend von Alanin nur durch ein Glycin erreicht werden.

Die Enantioselektivität der Benzoin synthese der Variante 55E4 nimmt mit steigenden Aldehydkonzentrationen ab

Die eingangs bereits dargestellte Abnahme der Produktausbeute bei dem Wechsel von den Ansätzen mit niedriger Aldehydkonzentration (20 mM Benzaldehyd, 60 mM Dimethoxyacetaldehyd) zu den Ansätzen mit hoher Aldehydkonzentration (5 mM Benzaldehyd, 500 mM Dimethoxyacetaldehyd) der Variante 55E4 ist zusätzlich von einer Abnahme der Enantioselektivität der Benzoin synthese begleitet. Die geringe Selektivität von ca. 10 % für das (*R*)-Enantiomer der Synthese des DMA-HPP änderte sich hingegen nicht (Tab. 13).

Iding *et al.*, 2000, hatten in ihren Studien zur PpBFD beobachtet, dass die Enantioselektivität der Reaktion zu (*S*)-2-HPP u.a. von der Benzaldehydkonzentration im Ansatz abhängt. Untersucht wurde die Konzentrationsspanne von 1 – 30 mM Benzaldehyd, der *ee* nahm dabei von 95 % auf etwa 85 % ab. Die Konzentration des Substrates Acetaldehyd hatte keinen Einfluss auf die Enantioselektivität der Reaktion. Um die Ursache der in dieser Arbeit beobachteten Verringerung der Stereoselektivität der Benzoin synthese eindeutig zu bestimmen, wurden außer den gemischten Ansätzen mit Dimethoxyacetaldehyd zusätzlich zum Benzaldehyd auch Ansätze mit Benzaldehyd als alleinigem Substrat (5 mM und 20 mM) ausgewertet. Der *ee* für das Produkt (*R*)-Benzoin nimmt bei Benzaldehyd als alleinigem Substrat nur geringfügig ab, von 99 % auf 97 %. Zu einer starken Abnahme der Selektivität

kommt es erst durch die Zugabe von Dimethoxyacetaldehyd. Durch Zugabe von 60 mM dieses Substrates zu 20 mM Benzaldehyd sinkt der ee von 97 % auf 88 %, bei Zugabe von 500 mM zu 5 mM Benzaldehyd liegt der ee nur noch bei 75 %. Die Ausgangsvariante L476Q hingegen zeigt keine Beeinflussung der Enantioselektivität. Allerdings ist die Benzoinbildung durch dieses Enzym insgesamt so gering, dass etwaige Änderungen möglicherweise messtechnisch nicht erfassbar sind (Tab. 13).

Iding *et al.*, 2000, erklärten die Abnahme der chiralen Induktion der 2-HPP Synthese in Abhängigkeit von der Benzaldehydkonzentration anhand eines Modells des aktiven Zentrums, welches in der Einleitung vorgestellt wurde (1.3.2). Die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der Selektivität der Benzoin synthese, ausgelöst durch Dimethoxyacetaldehyd, kann anhand dieses Modells nicht erklärt werden. Zurzeit ist die einzige mögliche Erklärung eine Destabilisierung des Biokatalysators in Gegenwart hoher Konzentrationen des Dimethoxyacetaldehyds.

Die von der 55E4 katalysierte Synthese zum gemischten Produkt DMA-HPP ist nicht stereoselektiv

Die PpBFD ist ein enantioselektives Enzym. Bei der Katalyse der Reaktion zu 2-HPP wird das (*S*)-Enantiomer mit einem ee von bis zu 95 % gebildet. Die, wenn auch schwache, Synthese von (*R*)-Benzoin erreicht einen ee von 99 % [Iding *et al.*, 2000].

Die Variante 55E4 zeigt bei der Synthese zu Benzoin eine unverändert hohe Selektivität für das (*R*)-Enantiomer. Das gemischte Produkt DMA-HPP hingegen wird mit einem geringem Überschuss des (*R*)-Enantiomers von ~ 10 % produziert (3.5.3). Wie sind diese Unterschiede zu erklären?

In der Einleitung ist ein Modell vorgestellt worden (1.3.2), welches die Unterschiede der Enantioselektivitäten für die Produkte 2-HPP und Benzoin erklären kann [Iding *et al.*, 2000]. Dieses Modell wurde vor kurzem von Knoll *et al.*, 2006, durch neue Erkenntnisse ergänzt, welche durch einen Strukturvergleich der BFD und der BAL mit den Substraten der entsprechenden Carbonylgruppenreaktionen. Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass Benzaldehyd, welcher das Donorsubstrat darstellt und damit an den Cofaktor zum aktiven Aldehyd gebunden wird, in einer bestimmten Orientierung am ThDP gebunden vorliegt: coplanar zum Thiazolring des Cofaktors. Diese coplanare Anordnung wird aufgrund der Mesomeriestabilisierung als die favorisierte im Modell angesehen. Durch den Benzaldehyd

wird unter dieser Bedingung ein Teil des aktiven Zentrums „abgeschirmt“ und ist für den Akzeptor nicht zugänglich. Für den Akzeptoraldehyd gibt es unter dieser Voraussetzung zwei Möglichkeiten, sich im aktiven Zentrum anzuordnen. Eine Rolle bei dieser Positionierung spielt die Größe des Akzeptoraldehyds. Knoll *et al.*, 2006, konnten in ihrem Modell die kleine Bindetasche bestätigen, die, wie bereits von Iding *et al.*, 2000, angenommen, bei der Bildung von (*S*)-2-HPP die Seitenkette des Acetaldehyd aufnimmt. Benzaldehyd als Akzeptoraldehyd ist für diese Tasche zu groß, das Substrat ist gezwungen, eine andere Ausrichtung zum Donor einzunehmen, was zu (*R*)-Benzoin als Produkt der Carboligasereaktion führt (Abb. 26). Für die Akzeptoren gibt es folglich zwei Orientierungsmöglichkeiten im aktiven Zentrum, welche ausschlaggebend für die Stereoselektivität des entstehenden Produktes sind.

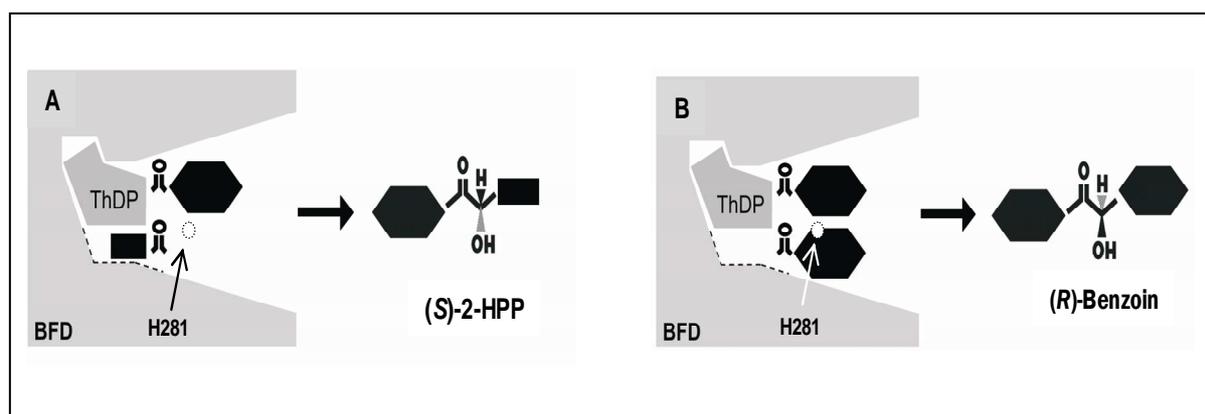


Abb. 26: BFD katalysierte Reaktion zu den Produkten (*S*)-HPP und (*R*)-Benzoin. Dargestellt ist das aktive Zentrum der BFD. Dieses liegt am Ende eines Substratkanals, welcher seitlich aufgeschnitten abgebildet ist. Bei der Carboligation der Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd kommt es aufgrund einer kleinen Bindetasche in Cofaktornähe im aktiven Zentrum der BFD zur Bildung des (*S*)-Enantiomers des gemischten Produktes 2-HPP. Dient Benzaldehyd als Akzeptor, wird aufgrund der Ausrichtung im aktiven Zentrum der beiden Substrate zueinander das (*R*)-Enantiomer gebildet. Die Aminosäure H281 reicht bei der dargestellten Sichtweise von oben in den Substratkanal, bzw. das aktive Zentrum hinein [modifiziert nach Knoll *et al.*, 2006].

In den Untersuchungen von Knoll *et al.*, 2006, wird die diskutierte Aminosäure H281A als Bestandteil des aktiven Zentrums beschrieben, die die Bindestelle des Donor- und Akzeptoraldehyds beeinflusst, allerdings die Bindestelle, welche für Benzaldehyd als Akzeptor in Frage kommt, nicht hingegen die Bindetasche, welche Acetaldehyd bei der Synthese zu (*S*)-2-HPP aufnimmt (Abb. 26). Anhand des Modells lässt sich folglich die erhöhte Aktivität der (*R*)-Benzoinbildung erklären, nicht aber die Synthese der beiden

Enantiomere des DMA-HPP. Folgende Möglichkeiten kommen für die Bildung der beiden Enantiomere des DMA-HPP in Frage.

(1) Bleibt man bei der Annahme, dass Benzaldehyd als Donor coplanar zum Thiazolring des Thiamindiphosphats angeordnet ist, welche das beschriebene Modell der zwei Bindestellen des Akzeptors stützt, so gibt es für die Beobachtung der Bildung beider Enantiomere nur eine Erklärung: Die Bindetasche, welche die Bildung des (*S*)-2-HPP ermöglicht, muss nun auch Dimethoxyacetaldehyd aufnehmen können. Das würde heißen, dass durch die Veränderung der Position 281 auch dieser Teil des aktiven Zentrums beeinflusst wird. Die in etwa vergleichbare Menge des (*S*)- und (*R*)- Enantiomers könnte dadurch zustande kommen, dass keine Präferenz des Substrates für eine der beiden Anordnungen, beispielsweise aufgrund von Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung, besteht.

(2) Die in dem Modell angenommene coplanare Stellung des Donors Benzaldehyd zum Cofaktor, welche, wie bereits erwähnt, aufgrund der Stabilität dieser Anordnung favorisiert werden soll, ist zwar die stabilste, aber nicht die einzig denkbare. In anderen ThDP-abhängigen Enzymen, in denen ein aliphatischer Donor an das Thiamindiphosphat bindet, ist eine solche Mesomeriestabilisierung von vornherein nicht gegeben, trotzdem kommt es oft zur enantioselektiven Synthese des jeweiligen Produktes. Wird der Benzaldehyd nicht coplanar, sondern in einem Winkel relativ zum Thiazoliumring gebunden, so könnten sich für den Akzeptor zu den oben genannten weitere zusätzlich mögliche Positionen relativ zum aktivierten Aldehyd ergeben. Während für Acetaldehyd und Benzaldehyd als Akzeptoren optimale Bindetaschen bestehen, welche gleichzeitig zu einer optimalen Ausrichtung der Substrate zum Donoraldehyd Benzaldehyd führen, liegt dieser in der ringstabilisierten Form vor, so könnte es zu einer optimalen Stellung des Dimethoxyacetaldehyds zum Donoraldehyd nur dann kommen, wenn dieser nicht coplanar vorliegt. In dem Moment würden dann Teile des aktiven Zentrums frei, die vorher durch den aktivierten Aldehyd nicht zugänglich waren, die es dem Substrat Dimethoxyacetaldehyd möglich machen, sich gegenüber dem Donoraldehyd so anzuordnen, dass es zu einer Ligation kommen kann. Dabei wären dann beide Anordnungen des Carbonylkohlenstoffs zum aktivierten Aldehyd [Iding *et al.*, 2000], die zum (*S*)- und auch die zur Bildung des (*R*)- Enantiomers führen, möglich. Ob auf die beschriebene Weise tatsächlich der Dimethoxyacetaldehyd im aktiven Zentrum der Variante 55E4 oder auch H281A genügend Platz findet, muss an der Struktur des aktiven Zentrums noch nachvollzogen werden.

Dass beide vorgestellten Möglichkeiten bei der Katalyse parallel existieren, ist auch denkbar.

Eine (S) – selektive Variante der BFD durch einzelne Punktmutationen ist nicht möglich

Die diskutierten Gründe für die nicht-stereoselektive Katalyse der Variante 55E4 zum 2-Hydroxy-3,3-propiofenon werfen die Frage auf, ob eine (S)-selektive Variante der PpBFD mit erweitertem Substratspektrum überhaupt denkbar ist.

Schon vor Beginn des Projektes der fehlerhaften PCR war aufgrund der Kristallstruktur der PpBFD die Existenz der Bindetasche für Acetaldehyd, welche die Synthese des (S)-HPP erlauben sollte, bekannt. Als AS-Reste, welche diese Bindetasche in ihrer Größe beeinflussen könnten, waren ein Leucin an Position 110 sowie ein Glycin an Position 25 benannt worden. Der Austausch von Leucin zu Alanin führte zum Aktivitätsverlust bei der Decarboxylase-reaktion. Die Carboligaseaktivität blieb unbeeinflusst, die erzeugte Variante zeigte jedoch kein erweitertes Akzeptorspektrum. Ein Austausch des Glycins an Position 25 zu Alanin führte zu einem fast vollständigen Verlust beider Aktivitäten [Siegert, 2000]. Bei dieser Proteinregion handelt es sich anscheinend um einen sensiblen Bereich des aktiven Zentrums, was die in beiden Fällen starke Abnahme der Decarboxylaseaktivität zeigte. Diese Ergebnisse beeinflussten auch die Entscheidung eine Optimierung der PpBFD bezüglich des Akzeptorsubstratspektrums mittels einer fehlerhaften PCR zu erreichen, in der Hoffnung, durch weiter entfernte Positionen diesen sensiblen Bereich indirekt beeinflussen zu können. Durch Modellierung der Substrate der (S)-selektiven Katalyse, Benzaldehyd mit Acetaldehyd, in das aktive Zentrum der PpBFD konnten Knoll *et al.*, 2006, weitere Reste als Teile der Bindetasche identifizieren: P24 und S26, und L461. In einem vor kurzem gestarteten Projekt werden die genannten Positionen mittels Mutagenesestudien untersucht [Gocke & Pohl, 2006]. Die Alanin-Variante der Position 461 wurde bereits untersucht und zeigte einen Aktivitätsverlust bei der Decarboxylierung als auch bei der Carboligation. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass es sich bei der beschriebenen Proteinregion um einen katalytisch wichtigen Bereich handelt, der empfindlich auf Veränderungen reagiert. Die Mutagenese der Position 110, welche keinen Aktivitätsverlust bezüglich der Carboligation zur Folge hatte, gleichzeitig aber auch nicht zu einem erweiterten Akzeptorspektrum führte, lässt jedoch vermuten, dass einzelne Punktmutationen nicht ausreichen, um die Zielreaktion zugänglich machen zu können. Interessanterweise zeigen bei den genannten Positionen beide in 4.1 betrachteten neuen BFD, PaBFD und auch die BjBFD, die gleichen Aminosäurereste (Abb. 10).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen außerdem, dass bei der Erzeugung einer (S)-selektiven Variante nicht nur die besprochene Bindetasche berücksichtigt werden muss.

Diese ist nämlich nur zugänglich über einen Bereich des aktiven Zentrums, welcher selbst als Bindestelle für Substrate dienen kann. Durch die Positionierung von Donor- und Akzeptorsubstrat zueinander kommt es dann zur (*R*)-selektiven Katalyse (Abb. 26). Um eine (*S*)-selektive Variante zu erhalten, muss entweder die bisherige Acetaldehyd-Binderegion optimal an Dimethoxyacetaldehyd angepasst werden, oder die vorgelagerte Binderegion vergleichsweise schlecht, was nicht nur die Größe der Taschen sondern z.B. auch mögliche Interaktionen der die Tasche ausbildenden Aminosäurereste mit dem Substrat betrifft. Auch diese Situation ist über einzelne Punktmutationen nicht erreichbar.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neue BFD identifiziert und bezüglich der Substratspektren charakterisiert, sowie die bekannte PpBFD durch fehlerhafte PCR mutagenisiert und die so erzeugte Mutantenbank auf Varianten mit erweitertem Akzeptorspektrum für eine (*S*)-selektive Katalyse der Carboligasereaktion durchgemustert. Die bei den Auswertungen gewonnenen und diskutierten Erkenntnisse dieser beiden Ansätze führen zu der Überzeugung, dass für eine (*S*)-selektive BFD mit erweitertem Akzeptorsubstratspektrum größere strukturelle Veränderungen erforderlich sind als sie z. B. durch das Einführen einzelner Austausche erreicht werden können. Denkbar wäre hier die Mutagenisierung bestimmter Bereiche des aktiven Zentrums oder in der Nähe dieser Region durch Kassettenmutagenese. Von Reetz *et al.* wurde z.B. 2005 der Ansatz CASTing (*combinatorial active-site saturation test*) vorgestellt. Dabei werden über die 3D-Struktur des zu optimierenden Biokatalysators gezielt Kombinationen von 2-3 Aminosäureresten in der Nähe der Bindetasche identifiziert, welche nah genug beieinander liegen, um eine parallele Sättigungsmutagenese über ein entsprechendes degeneriertes Oligonukleotid durchzuführen. Die erstellten Banken werden zunächst einzeln getestet. Positive Varianten können als Startpunkt für einen weiteren Durchlauf dienen, wobei diesmal eine andere Region entsprechend mutagenisiert wird. Die Austausche der einzelnen positiven Varianten können aber auch in einer Variante vereint werden über ortsgerichtete Mutagenese [Reetz *et al.*, 2006]. In beiden Fällen gelang es Varianten der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase zu generieren, welche sterisch anspruchsvolle Substrate im Vergleich zum Wildtyp hydrolysieren konnten.

Dieser Ansatz stellt eine mögliche Perspektive für die Optimierung der PpBFD dar. Vorteilhaft wäre hier auch, dass so die Struktur des aktiven Zentrums berücksichtigt werden

könnte, welche zwei Bindestellen für den Akzeptoraldehyd ermöglicht, wobei aber nur eine zur (*S*)-selektiven Katalyse führt.

Die Expression der BjBFD und die Untersuchung der katalytischen Eigenschaften stellen einen wichtigen nächsten Schritt dar, um das Bild der BFD zu ergänzen. Die BjBFD zeigt größere Differenzen zur bekannten PpBFD und auch zur neuen PaBFD, die wie die PpBFD für die Reaktion der Carboligation Dimethoxyacetaldehyd nicht als Akzeptor umgesetzt. Die unter 4.3 diskutierten Aminosäurereste finden sich in der BjBFD jedoch z.T. an gleicher Position in der Primärstruktur. Durch Untersuchungen zur Carboligaseaktivität der BjBFD könnten weitere Aussagen über diese Region und ihre Bedeutung für die Aktivität und Enantioselektivität gewonnen werden. Möglicherweise verbirgt sich hinter diesem Enzym bereits der gesuchte Biokatalysator. Ist die nicht der Fall, so tragen die gewonnenen Ergebnisse auf jeden Fall zur fokussierten Durchführung der oben genannten Ansätze zur Evolvierung der PpBFD bei. Unter 4.1 sind bereits Vorschläge für eine optimierte Expression der BjBFD gemacht, welche eine gute Aussicht auf Erfolg haben.

5. Zusammenfassung

Die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (PpBFD) ist ein wertvoller Katalysator für die Synthese von chiralen 2-Hydroxyketonen. Dabei zeigt die PpBFD eine (*S*)-Selektivität gegenüber Acetaldehyd als Akzeptor und nimmt damit eine Sonderstellung unter den für diese Verbindungsart eingesetzten Biokatalysatoren ein [Pohl *et al.*, 2002, 2004]. Durch die Untersuchung neuer BFDs, welche in Datenbanken über Sequenzvergleiche identifiziert wurden, sowie über Mutagenesestudien durch Zufallsmutagenese der bekannten PpBFD konnten neue Erkenntnisse zu dieser Enzymklasse gewonnen werden.

1) Identifizierung und Charakterisierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen

Zwei neue BFD-kodierende Gene konnten aus den Organismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Bradyrhizobium japonicum* isoliert und in *E. coli* exprimiert werden. Die BFD aus *P. aeruginosa* (PaBFD) konnte erfolgreich chromatographisch gereinigt werden und steht nun in ausreichender Menge für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die hohe Übereinstimmung der Primärstruktur spiegelt sich auch in den katalysierten Reaktionen der PaBFD und der bekannten PpBFD wieder. Für die PaBFD konnten in dieser Arbeit bereits Decarboxylaseaktivität als auch Carboligaseaktivität nachgewiesen werden. Dabei zeigte das Enzym bei der Carboligasereaktion zu (*S*)-2-HPP eine niedrigere Stereoselektivität als die PpBFD, obwohl beide Biokatalysatoren auf Ebene der Primärstruktur in allen für diese Reaktion wichtigen Aminosäureresten übereinstimmen. Weiterführende Untersuchungen der beiden Biokatalysatoren im Vergleich zueinander könnten dazu beitragen, die (*S*)-selektive Katalyse zu 2-Hydroxyketonen mit erweitertem Akzeptorspektrum zu ermöglichen.

2) Evolution der PpBFD

Bei der Evolvierung der PpBFD durch fehlerhafte PCR wurde von der Variante L476Q ausgegangen, welche im Vergleich zum Wildtyp-Protein bereits eine erhöhte Carboligaseaktivität zeigt. Für die Durchmusterung der generierten Bank konnte ein Screeningsystem, basierend auf einem einfachen Farbbassay, etabliert werden. Mit Hilfe dieses Assays konnten die erzeugten Varianten auf Carboligaseaktivität mit den Substraten Benzaldehyd als Donor und Dimethoxyacetaldehyd als Akzeptor überprüft werden. Eine Variante konnte identifiziert werden, welche die gewünschte Reaktion zum 2-Hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenon katalysiert, dabei wurden (*S*)- und (*R*)-Enantiomer in annähernd gleichen Mengen gebildet. Durch eine Mutagenesestudien in Form einer Sättigungs-

mutagenese und Strukturanalysen konnte der Grund für diese Beobachtung auf struktureller Ebene herausgearbeitet werden. Mit dem gewonnenen Wissen sollte es in naher Zukunft möglich sein, über darauf aufbauende zielgerichtete Mutageneseansätze eine (*S*)-selektive Variante der PpBFD mit erweitertem Akzeptorsubstratspektrum zu generieren.

6. Summary

Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* (PpBFD) is a valuable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. PpBFD shows a selectivity for the (*S*)-enantiomer with acetaldehyde being the acceptor in the carboligase reaction and therefore possesses an exceptional position amongst the biocatalysts being used for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones [Pohl *et al.*, 2002, 2004]. Through the investigation of new BFDs identified by sequence alignments in data base mining and by mutagenesis studies on PpBFD using random mutagenesis the knowledge base of this enzyme class could be expanded.

1) Identification and characterisation of new benzoylformate decarboxylases

Two novel BFD-encoding genes from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bradyrhizobium japonicum* were isolated and expressed in *E. coli*. The enzyme BFD of *Pseudomonas aeruginosa* (PaBFD) was purified using metal chelate affinity chromatography and is now available in sufficient amounts for further investigations. The high consistency of both PpBFD and PaBFD in their primary structure was also found in the reactions catalysed. In this thesis it was shown that PaBFD both has decarboxylase and carboligase activity. Regarding the carboligase activity to (*S*)-HPP the PaBFD showed a lower stereoselectivity than PpBFD although both enzymes show no differences on the primary structure in the important amino acid residues. Further investigations of both biocatalysts and their similarities and differences could potentially lead to the creation of a variant with an expanded acceptor spectrum for a (*S*)-selective catalysis of 2-hydroxy ketones.

2) Directed evolution of PpBFD

For the evolution of PpBFD using error prone PCR the variant L476Q was chosen, which already possesses a higher carboligase activity in comparison to the wild type protein. For the screening of the created library a system using a simple colour assay was established. This assay allowed for the screening of the created variants for carboligase activity with benzaldehyde serving as donor substrate and dimethoxy acetaldehyde serving as acceptor substrate. A variant was identified, which catalyses the production of 2-hydroxy-3,3-dimethoxypropiophenone with equal amounts of the (*S*)- and (*R*)-enantiomers being produced. Using a saturation mutagenesis and structural analysis the reason for this observation was found on the structural level. Based on the thereby gained knowledge it should be possible using target-oriented mutagenesis experiments to generate an (*S*)-selective variant of PpBFD with a broadened acceptor substrate spectrum in the near future.

7. Literaturverzeichnis

- Aharoni A., Gaidukov L., Khersonsky O., Gould S.M., Roodveldt C. & Tawfik, D.S. (2005a) The evolvability of promiscuous protein functions. *Nat Genet* **37**:73-76
- Aharoni, A., Griffiths, A.D. & Tawfik, D.S. (2005b) High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 210-216
- Airaksinen, A. & Hovi, T. (1998) Modified base compositions at degenerate positions of a mutagenic oligonucleotide enhance randomness in site-saturation mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **26**: 576-581
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. & Jordan, F. (1996) Crystal structure of the thiamine diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **256**: 590-600
- Arnold, F.H. (1996) Directed evolution: creating biocatalysts for the future. *Chem Eng Sci* **51**: 5091-5102
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 411-421
- Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcárcel, R. & Stunnenberg, H.G. (1994) Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **22**: 541-542
- Barrowman, M.M., Harnett, W., Scott, A.J., Fewson, C.A. & Kusel, J.R. (1986) Immunological comparison of microbial TPP-dependent non-oxidative alpha-keto acid decarboxylases. *FEMS Microbiol Lett* **34**: 57-60
- Barrowman, M.M. & Fewson, C.A. (1985) Phenylglyoxylate decarboxylase and phenylpyruvate decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr Microbiol* **12**: 235-240
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H. & Schmid, R.D. (2003) Directed evolution of a bacterial alpha amylase: toward enhanced pH performance and higher specific activity. *Protein Sci* **12**: 2141-2149
- Biles, B.D. & Connolly, B.A. (2004) Low-fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. *Nucleic Acids Res* **32**: e176
- Bloom, J.D., Meyer, M.M., Meinhold, P., Otey, C.R., MacMillan, D. & Arnold, F.H. (2005) Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 447-452
- Bocola, M., Otte, N., Jaeger, K.E., Reetz, M.T. & Thiel, W. (2004) Learning from directed evolution: theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem* **5**: 214-223
- Bornscheuer, U.T. (2004) Assay systems for screening and selection of biocatalysis. In: Enzyme functionality. Svenson, A. (ed.) Marcel Dekker, New York
- Bornscheuer, U.T. & Kazlauskas, R.J. (2004) Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**: 6032-6040

- Bornscheuer, U.T. & Pohl, M. (2001)** Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* **5**: 137-143
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brakmann, S. (2001)** Discovery of superior enzymes by directed molecular evolution. *ChemBioChem* **2**: 865-871
- Breuer, M. & Stürmer, R. (2006)** Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren. *Chem unserer Zeit* **40**: 104-111
- Breuer, M., Pohl, M., Hauer, B. & Lingen, B. (2002)** High-throughput assay of (*R*)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase. *Anal Bioanal Chem* **374**: 1069-1073
- Buchner, E. (1897)** Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber Dtsch Chem Ges* **30**: 1110-1113
- Cadwell, R.C. & Joyce, G.F. (1992)** Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* **2**: 28-33
- Chen, K. & Arnold, F.H. (1993)** Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5618-5622
- Christoffers, J. & Mann, A. (2001)** Enantioselective construction of quaternary stereocenters. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**: 4591-4597
- Cho, C.M., Mulchandani, A. & Chen, W. (2004)** Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos. *Appl Environ Microb* **70**: 4681-4685
- Cline, J. & Hogrefe, H. (2000)** Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit. *Strategies* **13**: 157-162
- Coco, W.M., Encell, L.P., Levinson, W.E., Christ, M.J., Loomis, A.K., Licato, L.L., Arensdorf, J.J., Sica, N., Pienkos, P.T. & Monticello, D.J. (2002)** Growth factor engineering by degenerate homoduplex gene family recombination. *Nat Biotechnol* **20**: 1246-1250
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E. & Stemmer, W.P.C. (1998)** DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288-291
- Darwin, C. (1859)** On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray
- Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (2000)** Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2029-2034
- Demir, A.S., Dünnwald, T., Iding, H., Pohl, M. & Müller, M. (1999)** Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase. *Tetrahedron: Asymmetry* **10**: 4769-4774
- Demir, A.S., Sesenoglu, Ö., Eren, E., Hosrik, B., Pohl, M., Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., Dünkemann, P. & Müller, M. (2002)** Enantioselective synthesis of α -hydroxy ketones via benzaldehyde lyase catalyzed C-C bond formation. *Adv Synth Catal* **344**: 96-103
- Deng, C. & Chen, R. (2004)** A pH-sensitive assay for galactosyltransferase. *Anal Biochem* **330**: 219-226
- Detry, J., Rosenbaum, T., Lütz, S., Hahn, D., Jaeger, K.E., Müller, M. & Eggert, T. (2006)** Biocatalytic production

of enantiopure cyclohexane-*trans*-1,2-diol using extracellular lipases from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-006-0391-9

Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. & Lu, G.G. (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* – Implication for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J Biol Chem* **273**: 20196-20204

Drummond, D.A., Iverson, B.L., Georgiou, G. & Arnold, F. (2005) Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *J Mol Biol* **350**: 806-816

Duggleby, R.G., Pang, S.S., Yu, H. & Guddat, L.W. (2003) Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *Eur J Biochem* **270**: 2895-2904

Duggleby, R.G. (2006) Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Acc Chem Res* **39**: 550-557

Dünelmann, P., Kolter-Jung, D., Nitsche, A., Demir, A.S., Siegert, P., Lingen, B., Baumann, M., Pohl, M. & Müller, M. (2002) Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: the first asymmetric cross-benzoin condensation. *J Am Chem Soc* **124**: 12084-12085

Dünelmann, P., Pohl, M. & Müller, M. (2004) Enantiomerically pure 2-hydroxy carbonyl compounds through enzymatic C-C bond formation. *Chemistry today* 24-28

Dünnwald, T., Demir, A.S., Siegert, P., Pohl, M. & Müller, M. (2000) Enantioselective synthesis of (*S*)-2-hydroxypropanone derivatives by

benzoylformate decarboxylase catalyzed C-C bond formation. *Eur J Org Chem* 2161-2170

Eggert, T., Reetz, M.T. & Jaeger, K.E. (2004) Directed evolution by random mutagenesis: a critical evaluation. In: Enzyme functionality. Svenson, A. (ed.) Marcel Dekker, New York

Eggert, T., Funke, S.A., Rao, N.M., Acharya, P., Krumm, H., Reetz, M.T. & Jaeger, K.E. (2005) Multiplex-PCR-based recombination as a novel high-fidelity method for directed evolution. *ChemBioChem* **6**: 1062-1067

Faber, K. & Kroutil, W. (2005) New enzymes for biotransformation. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 181-187

Fernandez-Gacio, A., Uguen, M. & Fastrez, J. (2003) Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol* **21**: 408-414

Ferrer, M., Martinez-Abarca, F. & Golshyn, P.N. (2005) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 588-593

Georgescu, R., Geethani, B. & Sun, L. (2003) Saturation mutagenesis. In: Directed Evolution Library Creation. Methods and Protocols. Arnold, F.H. and Georgiou, G. (eds), Humana Press Inc., New Jersey

Gocke, D. & Pohl, M. (2006) persönliche Mitteilung

Griswold, K.E., Kawarasaki, Y., Ghonheim, N., Benkovic, J., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (2005) Evolution of highly active enzymes by homology-independent recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 10082-10087

Guo, F., Zhang, D., Kahyaoglou, A., Farid, R.S. & Jordan, F. (1998) Is a hydrophobic amino acid required to

- maintain the reactive V conformation of thiamine at the active center of thiamine diphosphate-requiring enzymes? Experimental and computational studies of isoleucine 415 of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **37**: 13379-13391
- Guo, H.H., Chloé, J. & Loeb, L.A. (2004)** Protein tolerance to random amino acid change. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9205-9210
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hancock, S.M., Vaughan, M.D. & Withers, S.G. (2006)** Engineering of glycosidases and glycoltransferases. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 1-11
- Hasson, M.S., Muscate, A., McLeish, M.J., Polovnikova, L.S., Gerlt, J.A., Kenyon, G.L., Petsko, G.A. & Ringe, D. (1998)** The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6Å resolution: diversity of catalytic residues in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry* **37**: 9918-9930
- Hawkins, C.F., Borges, A. & Perham, R.N. (1989)** A common structural motif in thiamine pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett* **255**: 77-82
- Hegemann, G.D. (1966a)** Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida* I. Synthesis of enzymes by the wild type. *J Bacteriol* **91**: 1140-1154
- Hegemann, G.D. (1966b)** Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida* II. Isolation and properties of blocked mutants. *J Bacteriol* **91**: 1155-1160
- Hegemann, G.D. (1970)** Benzoylformate decarboxylase (*Pseudomonas putida*). *Methods in Enzymology* **17**: 674-678
- Henning, H., Leggewie, C., Pohl, M., Müller, M., Eggert, T. & Jaeger (2006)** Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. *Appl Environ Microbiol* Zur Veröffentlichung eingereicht
- Hildebrandt, G. & Klavehn, W. (1930)** Verfahren zur Herstellung von 1-L-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol. Knoll A.-G. Chemische Fabriken in Ludwigshafen, Ger. Patent DE 548459
- Hiraga, K. & Arnold, F.H. (2003)** General method for sequence-independent site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* **330**: 287-296
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V. & Morgan, A.F. (1979)** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**: 73-102
- Hughes, M.D., Nagel, D.A., Santos, A.F., Sutherland, A.J. & Hine, A.F. (2003)** Removing the redundancy from randomized gene libraries. *J. Mol. Biol.* **331**: 973-979
- Iding, H. (1998)** Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Iding, H., Dünnwald, T., Greiner, L., Liese, A., Müller, M., Siegert, P., Grötzinger, J., Demir, A.S. & Pohl, M. (2000)** Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as a stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *Chemistry* **6**: 1483-1495
- Jaeger, K.E. & Eggert, T. (2004)** Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 305-313.
- Janzen, E. (2002)** Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluoreszens*. Biochemische Charakterisierung und die

Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Jordan, F. (2003) Current mechanistic understanding of thiamine diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Nat Prod Rep* **20**: 184-201

Jordan, F. & Nemeria, N.S. (2005) Experimental observation of thiamine diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations. *Bioorg Chem* **33**: 190-215

Kazlauskas, R.J. (2000) Molecular modelling and biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 81-88

Kawarasaki, Y., Griswold, K.E., Stevenson, J.D., Selzer, T., Benkovic, S.J., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (2003) Enhanced crossover SCRATCHY: construction and high-throughput screening of a combinatorial library containing multiple non-homologous crossovers. *Nucleic Acids Res* **31**: e126

Kim, D. & Guengerich, F.P. (2004) Selection of human cytochrome P450 1A2 mutants with enhanced catalytic activity for heterocyclic amine N-hydroxylation. *Biochemistry* **43**: 981-988

Knoll, M., Müller, M., Pleiss, J. & Pohl, M. (2006) How thiamin-diphosphate-dependent enzymes modulate activity, selectivity, and substrate specificity. Zur Veröffentlichung eingereicht.

König, S. (1998) Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochim Biophys Acta* **2**: 271-286

Kumar, S., Chen, C.S., Waxman, D.J. & Halpert, J.R. (2005) Directed evolution of mammalian cytochrome P450 2B1: mutations outside of the active site enhance the metabolism of several

substrates including the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide. *J Biol Chem* **280**: 19569-19575

Laemmlı, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lee, N., Bessho, Y., Wei, K., Szostak, J.W. & Suga, H. (2000) Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nat Struct Biol* **7**: 28-33

Leung, D.W., Chen, E. & Goeddel, D.V. (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1**: 11-15

Li, Z., Butikofer, L. & Wutholt, B. (2004) High-throughput measurement of the enantiomeric excess of chiral alcohols by using two enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**: 1698-1702

Lingen, B., Grötzinger, J., Kolter, D., Kula, M.R. & Pohl, M. (2002) Improving the carbonylase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis. *Protein Eng* **15**: 585-593

Lingen, B., Kolter-Jung, D., Dünkemann, P., Feldmann, R., Grötzinger, J., Pohl, M. & Müller, M. (2003) Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase by directed evolution. *ChemBioChem* **4**: 721-726

Lingen, B., Pohl, M., Demir, A., Liese, A. & Müller, M. (2004) Enantioselective syntheses of hydroxyl ketones via benzoylformate decarboxylase- and benzaldehyde lyase- catalyzed C-C bond formation. In: *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. Edited by Jordan, F., Patel, M.S. New York: Marcel Dekker, Inc.; 113-129

- Liu, Z., Sun, Z. & Leng, Y. (2006)** Directed evolution and characterization of a novel D-Pantono-hydrolase from *Fusarium moniliforme*. *J Agric Food Chem* **54**: 5823-5830
- Lorenz, P. & Eck, J. (2005)** Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* **3**: 510-516
- Lutz, S., Ostermeier, M. & Benkovic, S.J. (2001a)** Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using α -phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Res* **29**: e16
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L. Maranas, C.D. & Benkovic, S.J. (2001b)** Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11248-11253
- Lutz, S., Fast, W. & Benkovic, S.J. (2002)** A universal, vector-based system for nucleic acid reading-frame selection. *Protein Eng* **15**: 1025-1030
- Lutz, S. & Patrick, W.M. (2004)** Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 291-297
- Mahan, S.D., Ireton, G.C., Knoeber, C., Stoddard, B.L. & Black, M.E. (2004)** Random mutagenesis and selection of *Escherichia coli* cytosine deaminase for cancer gene therapy. *Protein Eng Des Sel* **17**: 625-633
- McLeish, M.J., Polovnikova, E.S., Kenyon, G.L., Bera, A.K., Anderson, N.L. & Hasson, M.S. (2004)** Benzoylformate decarboxylase: lessons in enzymology. In: *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. Edited by Jordan, F., Patel, M.S. New York: Marcel Dekker, Inc.; 131-141
- Mills, D.R., Peterson, R.L. & Spiegelmann, S. (1967)** An extracellular darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**: 217-224
- Mosbacher T.G., Mueller, M. & Schulz, G.E. (2005)** Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *FEBS J* **272**: 6067-6076
- Müller, Y.A. & Schulz, G.E. (1993)** Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259**: 965-967
- Neet, K.E. (1998)** Enzyme catalytic power minireview series. *J Biol Chem* **273**: 25527-25528
- Ness, J.E., Kim, S., Gottmann, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C. & Minshull, J. (2002)** Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat Biotechnol* **20**: 1251-1255
- Neuberg, C. & Hirsch, J. (1921)** Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase). *Biochem Z* **115**: 282-310
- O'Maille, P.E., Bakhtina, M. & Tsai, M.D. (2002)** Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J Mol Biol* **17**: 1205-1209
- Ostermeier, M., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. (1999a)** A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat Biotechnol* **17**: 1205- 1209
- Ostermeier, M., Nixon, A.E., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. (1999b)** Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3562-3567
- Ostermeier, M. & Lutz, S. (2003)** The creation of ITCHY hybrid protein libraries. In: *Directed Evolution Library creation: Methods and Protocols*. Arnold, F.H. &

Georgiou, G. (eds), Humana Press, New Jersey

Pang, S.S., Duggleby, R.G., Schowen, R.L. & Guddat, L.W. (2004) The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. *J Biol Chem* **279**: 2242-2253

Patel, R.N. (2001) Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Curr Opin Biotechnol* **12**:587-604

Pohl, M., Sprenger, G.A. & Müller, M. (2004) A new perspective on thiamine catalysis. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 335-342

Pohl, M., Lingen, B. & Müller, M. (2002) Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C-C bond formation. *Chem Eur J.* **23**: 5289-5295

Polovnikova, E.S., McLeish, M.J., Sergienko, E.A., Burgner, J.T., Anderson, N.L., Bera, A.K., Jordan, F., Kenyon, G.L. & Hasson, M.S. (2003) Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamine diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry* **42**:1820-1830

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599

Radzicka, A. & Wolfenden, R. (1995) A proficient enzyme *Science* **267**:90-93

Reetz, M.T. (2003) An overview of high-throughput screening systems for enantioselective enzymatic transformations. In: *Directed enzyme evolution. Selection and screening methods.* Arnold, F.H., Georgiou, G. (eds.) Humana press, New Jersey

Reetz, M.T. (2006) Directed evolution of enantioselective enzymes as catalysts for organic synthesis. *Adv Catal* **49**: 1-69

Reetz, M.T., Brunner, B., Schneider, T., Schulz, F., Clouthier, C.M. & Kayser, M.M. (2004) Directed evolution as a method to create enantioselective cyclohexanone monooxygenases for catalysis in Baeyer-Villiger reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**: 4075-4078

Reetz, M.T., Carballeira, J.D., Peyralans, J., Höbenreich, H., Maichele, A. & Vogel, A. (2006) Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by casting. *Chem Eur J.* **12**: 6031-6038

Rejeb, I.B., Hamida, J.B. & Gargouri, M. (2004) Coupled-enzyme system for the determination of lipase activity. *Biotechnol Lett* **26**: 1273-1276

Roberts, B.L., Markland, W., Ley, A.C., Kent, R.B., White, D.W., Guterman, S.K., Ladner, R.C. (1992) Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2429-2433

Robertson, D.E., Chaplin, J.A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D.P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L.A., Tan, X., Snead, M.A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P.L., Burk, M.J. & Short, J.M. (2004) Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2429-2436

Rubin-Pitel, S.B. & Zhao, H. (2006) Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **9**: 247-257

- Sandalova, T., Fiedler, E., Thorell, S., Golbik, R., König, S. & Schneider, G. (2004)** Structure of the α -carbanion/enamine reaction intermediate in the active site of transketolase, determined by kinetic crystallography. In: *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. Edited by Jordan, F., Patel, M.S. New York: Marcel Dekker, Inc.; 159-172
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Schäffer, A.A., Aravind, L., Madden, T.L., Shavirin, S., Spouge, J.L., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. & Altschul, S.F. (2001)** Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* **29**: 2994-3005
- Schellenberger, A. (1996)** Problems in the understanding of thiaminpyrophosphate enzymes. In: *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes. Proceedings of the 4th international meeting on the function of thiamine diphosphate enzymes*. Bisswanger, H., Schellenberger, A. (eds.), A u. C. Intemann, Wissenschaftlicher Verlag, Prien
- Schörken, U. & Sprenger, G.A. (1998)** Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1385**:229-2443
- Schütz, A., Golbik, R., Tittmann K., Svergun, D.I., Koch, M.H., Hübner, G. & König, S. (2003)** Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic pathway. *Eur J Biochem* **270**: 2322-2331
- Shin, W., Pletcher, J., Blank, G. & Sax, M. (1977)** Ring stacking interactions between thiamine and planar molecules as seen in the crystal structure of a pricolonate dehydrate complex. *J Am Chem Soc* **111**: 674-683
- Sieber, V., Martinez, C.A. & Arnold, F.H. (2001)** Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat Biotechnol* **19**: 456-460
- Siegert, P. (2000)** Vergleichende Charakterisierung der Decarboxylase- und Carboligasereaktion der Benzoylformiat-decarboxylase aus *Pseudomonas putida* und der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* mittels gerichteter Mutagenese. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Siegert, P., McLeish, M.J., Baumann, M., Iding, H., Kneen, M.M., Kenyon, G.L. & Pohl, M. (2005)** Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Protein Eng Des Sel* **18**: 345-357
- Siegert, P., Pohl, M., Kneen, M.M., Pogozheva, I.D., Kenyon, G.L. & McLeish, M.J. (2004)** Exploring the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase, pyruvate decarboxylase, and benzaldehyde lyase. In: *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. Edited by Jordan, F., Patel, M.S. New York: Marcel Dekker, Inc.;
- Solbak, A.I., Richardson, T.H., McCann, R.T., Kline, K.A., Bartnek, F., Tomlinson, G., Tan, X., Parra-Gessert, L., Frey, G.J. & Podar, M. (2005)** Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *J Biol Chem* **280**: 9431-9438

- Sorensen, H.P. & Mortensen, K.K. (2005)** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **(4)**: 1
- Sriprapundh, D., Vielle, C. & Zeikus, J.G. (2003)** Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng.* **16**: 683-690
- Stemmer, W.P.C. (1994a)** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10747-10751
- Stemmer, W.P.C. (1994b)** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391
- Stephens, D.E., Rumbold, K., Permaul, K., Prior, B.A. & Singh, S. (2006)** Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. *J Biotechnol* DOI:10.1016/j.jbiotec.2006.06.015
- Streit, W.R., Daniel, R. & Jaeger, K.E. (2004)** Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 285-290
- Strobel, H., Ladant, D. & Jestin, J.L. (2003)** *In vitro* selection for enzymatic activity: a model study using adenylate cyclase. *J Mol Biol* **332**: 1-7
- Taylor, S.V., Kast, P. & Hilvert, D. (2001)** Genetische Selektion- eine Strategie zur Untersuchung und Herstellung von Enzymen. *Angew Chem* **113**: 3408-3463
- Terao, Y., Miyamoto, K. & Ohta, H. (2006)** Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI: 10.1007/s00253-006-0518-z
- Tittmann, K., Golbik, R., Ghisla, S. & Hübner, G. (2000)** Mechanism of elementary catalytic steps of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry* **39**: 10747-10754
- Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D.M., Duggleby, R.G. & Hübner, G. (2003)** NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* **42**: 7885-7591
- Tittmann, K., Vyazmensky, M., Hubner, G., Barak, Z. & Chipman, D.M. (2005)** The carboligation reaction of acethydroxyacid synthase II: steady-state intermediate distributions in wild type and mutants by NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 553-558
- Tsou, A.Y., Ransom, S.C., Gerlt, J.A., Buechter, D.D., Babbitt, P.C. & Kenyon, G.L. (1990)** Mandelate pathway of *Pseudomonas putida*: Sequence relationship involving mandelate racemase, (S)-mandelate dehydrogenase and benzoylformate decarboxylase and expression of benzoylformate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**: 9856-9862
- Wackett, L.P. (2004)** Novel biocatalysts by database mining. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 280-284
- Weiss, P.M., Gracia, G.A., Kenyon, G.L., Cleland, W.W. & Cook, P.F. (1988)** Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using ¹³C and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry* **27**: 2197-2205
- Widersten, M. & Mannervik, B. (1995)** Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J Mol Biol* **250**: 115-122

Wilcocks, R., Ward, O.P., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y. & Prosen, E. (1992) Acyloin formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1699-1704

Wong, T.S., Arnold, F.H. & Schwaneberg, U. (2004) Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng* **85**: 351-358

Wong, T.S., Zhurina, D. & Schwaneberg, U. (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb Chem High Throughput Screen* **9**: 271-288

Yin, J., Mills, J.H. & Schultz, P.G. (2004) A catalysis-based selection for peroxidase antibodies with increased activity. *J Am Chem Soc* **126**: 3006-3007

Zaccolo, M. & Gherardi, E. (1999) The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J Mol Biol.* **285**: 775-783

Zha, D., Eipper, A. & Reetz, M.T. (2003) Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution. *ChemBioChem* **4**: 34-39

8. Anhang

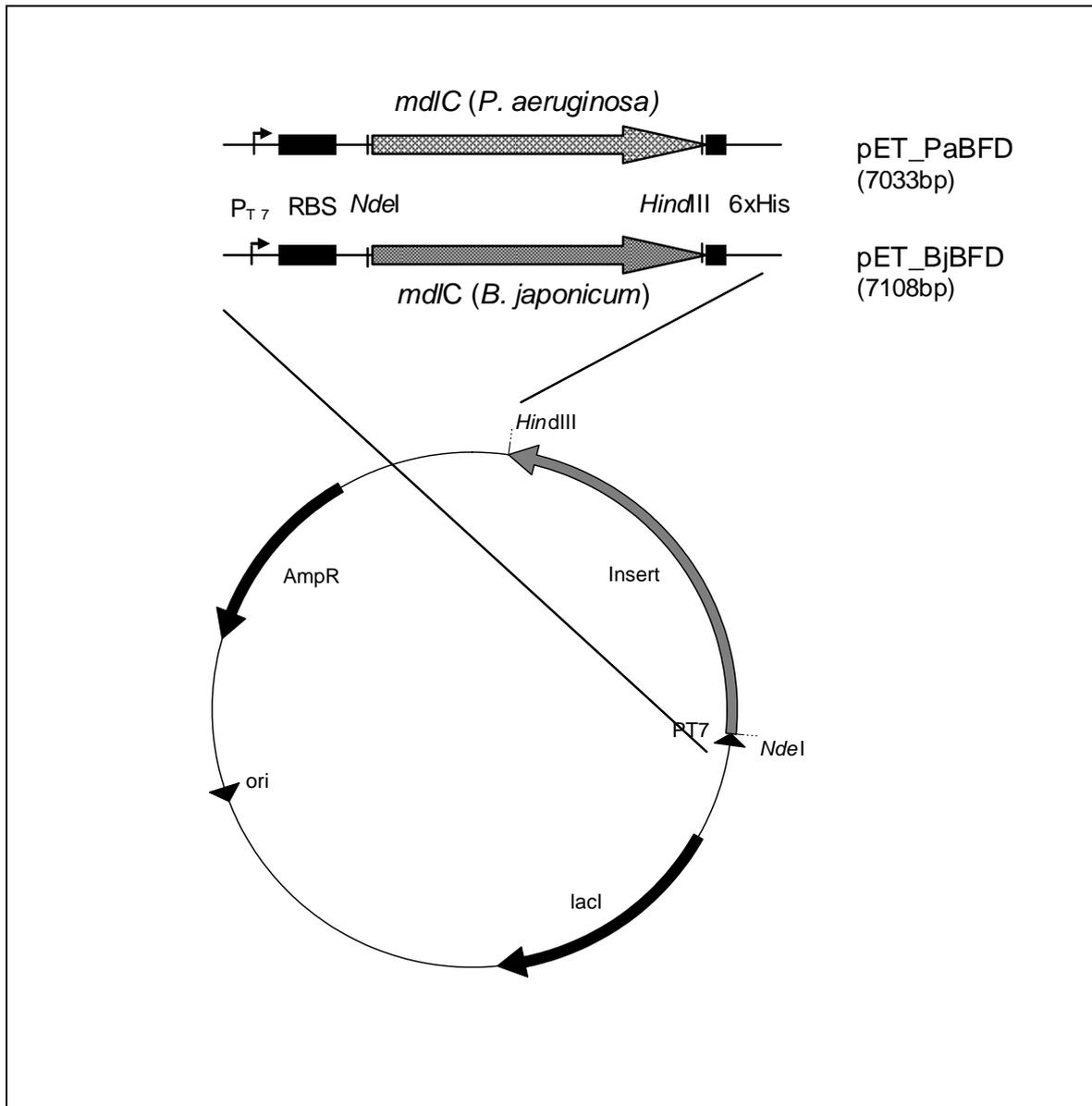


Abb. 27: Karte der rekombinanten Plasmide pET_PaBFD und pET_BjBFD. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7} : T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindestelle; 6xHis: His-Tag kodierender Bereich; *AmpR*: Ampicillinresistenzgen; *ori*: Origin.

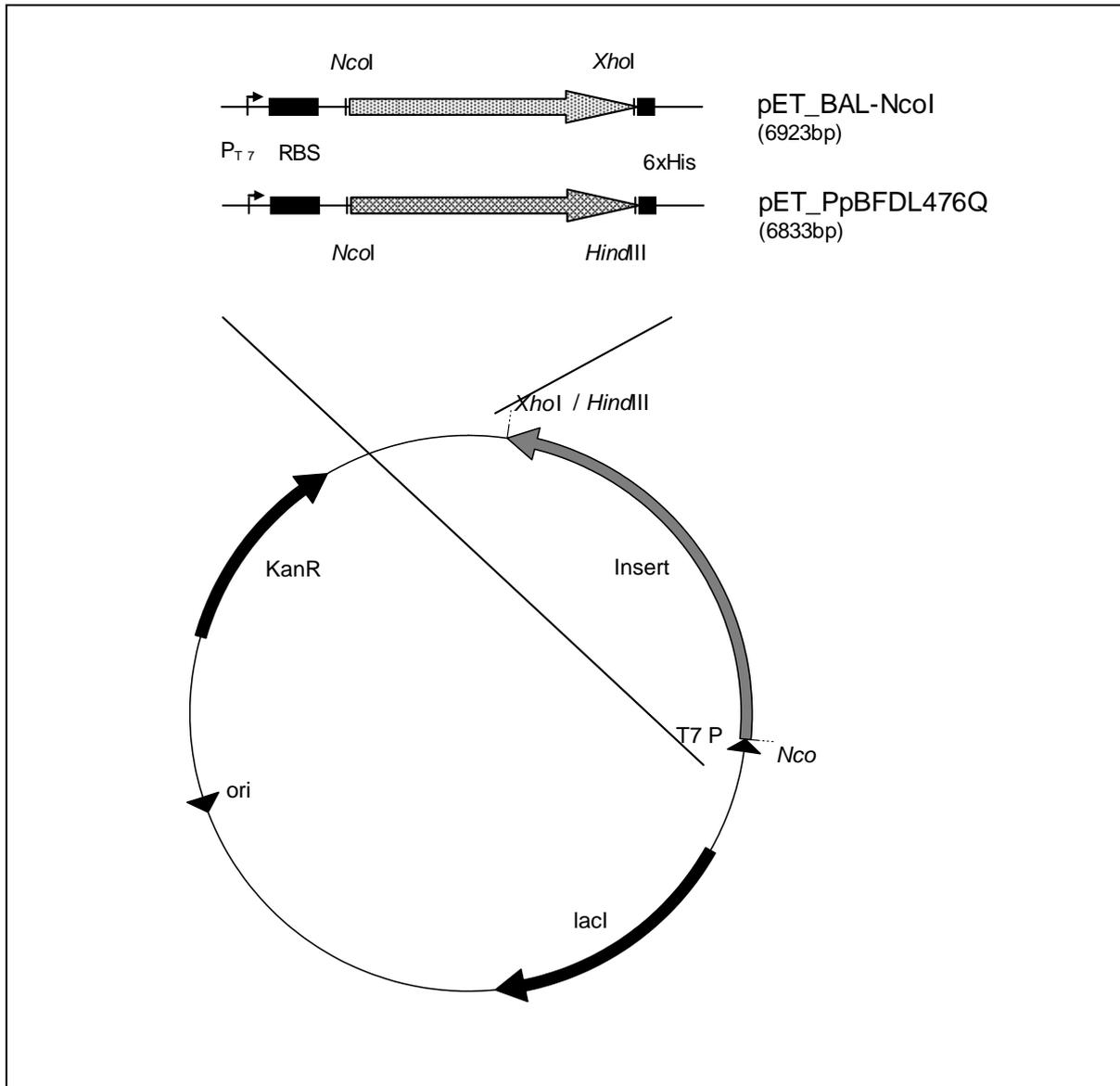


Abb. 28: Karte der rekombinanten Plasmide pET_BAL-NcoI und pET_PpBFDL476Q. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: PT7: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindestelle; 6xHis: His-Tag kodierender Bereich; AmpR: Ampicillinresistenzgen; ori: Origin. Das rekombinante Plasmid pET_BFD-ApaI wurde analog pET_BAL-NcoI erstellt und das rekombinante Plasmid pET_PpBFD55E4 analog pET_PpBFDL476Q.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 380, das Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Sahn bedanken.

Herrn Dr. T. Eggert und Frau Dr. M. Pohl danke ich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Promotionsarbeit, für die Hilfe bei der Lösung kleinerer und größerer wissenschaftlicher Probleme und die kritische und aufmerksame Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. M. Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, danke ich für die sehr gute Kooperation im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 380 und darüber hinaus. An dieser Stelle möchte ich besonders C. Dresen und L. Walter für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung zahlreicher Messungen danken.

Herrn Dr. S. Lütz, Arbeitsgruppe Technische Biokatalyse, IBT2, Forschungszentrum Jülich, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, und hier besonders S. Kühl.

Herrn PD J. Pleiss, Institut für technische Biochemie, und M. Knoll danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern des Instituts für molekulare Enzymtechnologie danke ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima während meiner gesamten Promotionszeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe „Gerichtete Evolution“ und der Arbeitsgruppe „Angewandte Enzymtechnologie“, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite gestanden und für eine heitere Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Ich danke C. Leggewie und M. Puls für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts.

Last but not least! Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und Daniel, der mich in „schlechten Zeiten“ aufgemuntert und sich in „guten Zeiten“ mit mir gefreut hat.

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.

Düsseldorf, den 04.09.2006

A handwritten signature in blue ink that reads "Marion Wendtorff". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end of the last name.