

**Von gezielter Oligomerisierung zu
katalytisch aktiven *inclusion bodies* –
Eine alternative Strategie zur Stabilisierung
und Immobilisierung von Biokatalysatoren**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Diener
aus Düsseldorf

Mönchengladbach, September 2014

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

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

Referent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Frau Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2014

*Das, wobei unsere Berechnungen versagen,
nennen wir Zufall.*

-ALBERT EINSTEIN

Zusammenfassung

Industrielle Verfahren stellen häufig hohe Ansprüche an die Stabilität von Biokatalysatoren. In vielen Fällen ist daher eine Stabilisierung von Enzymen notwendig, um den verschiedenen, oft extremen Prozessbedingungen gerecht zu werden und einen biokatalytischen Prozess effizient zu gestalten. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine neue Strategie zur Stabilisierung von Enzymen durch Erhöhung der Oligomerisierung etabliert werden, da es Beispiele für oligomere Enzyme gibt, welche stabiler sind als homologe monomere Varianten. Zu diesem Zweck wurde das dimere Modellenzym *Arabidopsis thaliana* Hydroxynitril Lyase (*AthHNL*) mit einem tetrameren *coiled coil*, der Tetramerisierungs-Domäne des Zelloberflächenproteins Tetrabrachion (TDoT) aus *Staphylothermus marinus*, fusioniert. Das Fusionsprotein wurde in *Escherichia coli* produziert, bildete allerdings unter verschiedensten Kultivierungsbedingungen lediglich große Mengen an *inclusion bodies* (IB), während kein lösliches Protein nachgewiesen werden konnte. Dennoch konnte überraschenderweise in der unlöslichen Fraktion aufgeschlossener Zellen Aktivität gemessen werden. Diese durch Fusion mit dem TDoT-*tag* erhaltenen katalytisch aktiven IBs (KatIBs) wurden eingehender charakterisiert. Dabei konnte im Vergleich zur wildtypischen *AthHNL* festgestellt werden, dass der pH-Wert einen geringeren Einfluss auf die Aktivität der *AthHNL*-KatIBs hatte und diese im schwach sauren pH-Bereich deutlich stabiler waren. Des Weiteren konnten *AthHNL*-KatIBs aufgrund ihrer Unlöslichkeit in wässrigen Puffersystemen und organischen Lösungsmitteln als natürliche Immobilisate zur Synthese von enantiomerenreinen (*R*)-Cyanhydrinen eingesetzt und in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionen wiederverwendet werden. Darüber hinaus konnte das Konzept der Bildung von KatIBs durch Fusion mit dem TDoT-*tag* auf weitere Zielproteine übertragen werden. So konnte die Bildung fluoreszenter YFP-IBs (*yellow fluorescent protein*) mittels Mikroskopie *in vivo* verfolgt werden. Anhand der komplexeren 2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carboxylat-Synthase aus *E. coli* (*EcMenD*) konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Bindung von Kofaktoren (ThDP, Mg²⁺) und eine korrekte Ausprägung von Quartärstrukturen keine Limitierung der KatIBs darstellen. Außerdem konnten *EcMenD*-KatIBs erfolgreich für die Synthese verschiedener 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoate eingesetzt und mittels einfachster Methoden in acht aufeinanderfolgenden Reaktionen ohne Aktivitätsverlust wiederverwendet werden. Ohne Optimierung der Expressionsbedingungen konnten KatIBs im Gramm-Maßstab aus einer 500 ml Expressionskultur gewonnen werden. Die entsprechenden Präparationen ähneln bezogen auf ihre Reinheit (> 85 %) einer mittels chromatographischen Methoden gereinigten Enzympräparation. Aufgrund dieser Eigenschaften sind KatIBs somit eine hervorragende Alternative zu konventionellen Enzymimmobilisaten, was in Zukunft eine breite Anwendung in der Biokatalyse ermöglichen könnte.

Summary

Industrial processes often require harsh reaction conditions and thus are challenging for the stability of the employed biocatalyst. In many cases, a stabilization of the enzyme is necessary to facilitate resistance to often extreme process conditions, thus rendering the respective biocatalytic process efficient. Therefore, the aim of this thesis was the development and evaluation of a new strategy to stabilize enzymes by induction of a higher oligomerization state, since there are examples of oligomeric enzymes that are more stable than monomeric homologous variants. To this end, a dimeric model enzyme, the *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase (*AtHNL*) was fused to a tetrameric coiled coil, namely the tetramerization-domain of the cell surface protein *Tetrabrachion* (TDoT) from *Staphylothermus marinus*. The fusion protein was produced in *Escherichia coli*, however, under a variety of culturing conditions formed only large amounts of inclusion bodies (IB), while no soluble protein could be identified. Surprisingly, after cell disruption activity was detected in the insoluble cell fraction. Hence, the respective catalytically active IBs (CatIBs), obtained by fusion with the TDoT-tag, were further characterized. Thereby, activity and stability measurements revealed that *AtHNL*-CatIBs are active at lower pH values and are significantly more stable in the weakly acidic pH range than the wild-type *AtHNL*. Due to their insolubility in aqueous buffered media and organic solvents *AtHNL*-CatIBs can be regarded as natural enzyme immobilizates, which enabled their application for the synthesis of enantiomerically pure (*R*)-cyanohydrins and the recycling of the biocatalyst in several consecutive reactions. Furthermore, the general concept of the CatIB formation through fusion with the TDoT-tag could be transferred to additional target proteins. In this way, the formation of fluorescent YFP-IBs (yellow fluorescent protein) could be followed *in vivo* by fluorescence microscopy. By the use of the more complex 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase from *E. coli* (*EcMenD*) it was possible to determine that even binding of cofactors (ThDP, Mg²⁺) and the need for correct assembly of quaternary structures pose no limitation for the formation of CatIBs. Additionally, *EcMenD*-CatIBs were successfully used to catalyze the synthesis of various 5-hydroxy-4-oxo-5-aryl pentanoates and enabled the simple recycling of the biocatalyst in eight consecutive reactions without loss of activity. In addition, CatIBs could be obtained on a gram scale without optimization of expression conditions from a 500 ml culture. The corresponding preparations were of similar purity as an enzyme preparation purified by chromatographic methods (> 85 %). Because of these properties CatIBs represent an excellent alternative to conventional enzyme immobilizates, which could facilitate a broad application in future biocatalysis.

Publikationen

Veröffentlichungen in Fachjournalen

B. Kopka, M. Diener, A. Wirtz, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2015). **Purification and simultaneous immobilization of *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase using a family 2 carbohydrate-binding module.** *Biotechnol J., early access*, DOI: 10.1002/biot.201400786

Vorträge

M. Diener*, B. Kopka, K. Scholz, M. Ansorge-Schumacher, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2013). **Alternative strategies for the stabilization of *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase.** *BioNoCo Summer School 2013*, Aachen (Deutschland)

K.-E. Jaeger*, M. Diener, B. Kopka, M. Pohl, U. Krauss (2014). **CatIBs – highly stable, catalytically-active enzyme inclusion bodies.** *10th International Conference on Protein Stabilisation, ProtStab*, Stresa (Italien)

*Vortragender Autor

Posterpräsentationen

M. Diener, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2013). **Natural enzyme immobilizates – catalytically active inclusion bodies.** *BioNoCo Summer School 2013*, Aachen (Deutschland)

M. Diener, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2013). ***Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase inclusion bodies – catalytically active bio-nanomaterials.** *11th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Biotrans*, Manchester (England)

M. Diener, T. Fettweiss, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2012). **Enzyme inclusion bodies – catalytically active bio-nanomaterials.** *Zing Biocatalysis Conference 2012*, Xcaret (Mexiko)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an meiner Arbeit teilhatten und ohne deren Unterstützung meine Arbeit kein solcher Erfolg geworden wäre.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, an einem sehr interessanten Thema zu forschen. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die überaus guten Bedingungen und die gewährten Freiheiten während der Ausführung meiner Experimente.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich Frau Prof. Dr. Martina Pohl. Auch die Begleitung und Hilfe bei der Entwicklung meiner Arbeit und die interessanten und anregenden Diskussionen sollen an dieser Stelle dankbar erwähnt werden.

Mein größter Dank gilt Dr. Ulrich Krauss dafür, dass er mich davon überzeugt hat, meine Doktorarbeit zu beginnen. Außerdem waren seine engagierte, freundschaftliche und sehr humorvolle Betreuung, die wissenschaftlichen Diskussionen, die permanente Verfügbarkeit für Fragen aller Art und der Satz: „Mach das doch mal eben!“ eine besonders große Motivation, die Zeit meiner Doktorarbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.

Für seine Unterstützung und seine Ideen in den ersten Monaten meiner Doktorarbeit danke ich Marco Kaschner.

Mein Dank gilt ebenfalls den AtHNL-Veteranen Daniel Okrob und Kathrin Scholz für die Einführungen in die verschiedenen HNL-Aktivitätsassays in den letzten Monaten ihrer eigenen Doktorarbeiten. Der ebenfalls mit der AtHNL verbundenen Aischarya Brahma danke ich für die Bereitstellung der gereinigten wildtypischen AtHNL und der entsprechenden Daten. Auch das Recht auf großzügige Nutzung ihres Laborplatzes und die gute Zusammenarbeit waren eine große Hilfe.

Meinem Auszubildenden Thomas Blees und meinem Masterstudenten Timo Fettweiß danke ich für die Durchführung von Arbeiten, die es leider nicht in meine Doktorarbeit geschafft haben, deren Überprüfung mir allerdings sehr viel Zeit erspart hat. Timo danke ich darüber hinaus für seine Kameradschaft und Freundschaft in den letzten Jahren. Außerdem danke ich meinem Praktikanten Kim Krott für die schnelle und effektive Durchführung der Klonierungen der Konstrukte pTDoT-Linker-YFP und pTDoT-Linker-EcMenD sowie aller Kontrollkonstrukte ohne den TDoT-*tag*.

Robert Westphal war eine wichtige Unterstützung meiner Arbeit in Bezug auf die EcMenD. Insbesondere bei der Reaktionsplanung und der anschließenden Analyse war er mir in den ersten Wochen mit einem für mich neuen Enzym eine große Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei Ursula Mackfeld für ihre helfende Hand an der HPLC-Anlage bedanken. Auch Heike Offermann hat sich meinen aufrichtigen Dank durch ihre Unterstützung an der zeitweise störrischen GC-Anlage „Igor“ und ihre Hilfe bei Destillationen verschiedener Substrate verdient.

Alexander Grünberger und insbesondere seiner Bachelorstudentin Sophie Weber möchte ich für die Durchführung und Rettung der Wachstumsexperimente mit YFP-IBs danken.

Allen bisher nicht namentlich genannten aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Molekulare Biophotonik und des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) sowie allen Mitgliedern der AG Biokatalyse und Biosensoren des Instituts IBG-1: Biotechnologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und freundliche Hilfe bei kleinen und großen Problemen im Labor.

Außerdem gilt mein Dank dem DFG-Graduiertenkolleg „Biocatalysis using non-conventional media“ (BioNoCo, GK1166) der RWTH Aachen für die Förderung meines Projekts im Rahmen eines Stipendiums und die Möglichkeit, uneingeschränkt an Konferenzen und verschiedensten Fortbildungskursen teilnehmen zu dürfen. Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs für die unterhaltsame gemeinsame Zeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, Freunde und insbesondere Benita Kopka, die mich seit den Anfängen meines Studiums bis zum heutigen Tag begleitet und in vielen Situationen während meiner Arbeit und im restlichen Leben einen großen Anteil an meinen Entscheidungen hatte.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Publikationen	III
Danksagung	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 Geschichte der Biotechnologie	1
1.2 Biokatalyse	2
1.3 Strategien zur Stabilisierung von Biokatalysatoren	4
1.3.1 Stabilisierung durch chemische Zusätze	4
1.3.2 Stabilisierung durch Proteindesign	5
1.3.3 Stabilisierung durch Immobilisierung	6
1.4 Die <i>Arabidopsis thaliana</i> Hydroxynitril Lyase	9
1.5 Die Stabilisierung der <i>At</i> HNL	12
1.5.1 Stabilisierung der <i>At</i> HNL mittels Immobilisierung	13
1.5.2 Verwendung von <i>At</i> HNL produzierenden <i>E. coli</i> Zellen als Katalysator ..	14
1.5.3 Stabilisierung der <i>At</i> HNL durch rationales Proteindesign	14
1.5.4 Fusion der <i>At</i> HNL mit einem Flavin-basierten Fluoreszenzprotein	16
1.6 Fusion mit <i>coiled coils</i> zur gezielten Oligomerisierung der <i>At</i> HNL	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Bakterienstämme	22
2.2 Plasmide	22
2.3 Oligonukleotide	23
2.4 Kultivierung von Bakterien	25
2.4.1 Nährmedien	25
2.4.2 Kultivierung von Flüssigkulturen	26
2.4.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) zur Überexpression von Genen	27
2.5 Nukleinsäureisolierungen und -reinigungen	28
2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.5.2 PCR-Produktreinigung	28

2.6	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	29
2.6.1	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	29
2.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.6.3	Generierung von kurzen DNA-Fragmenten zur Ligation	30
2.7	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	30
2.7.1	Herstellung von chemisch transformationskompetenten <i>E. coli</i> Zellen ..	30
2.7.2	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	31
2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
2.9	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.9.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	34
2.10	Proteinchemische Methoden.....	34
2.10.1	Zellaufschluss	34
2.10.2	Isolierung von KatIBs.....	35
2.10.3	Lyophilisierung von KatIBs.....	36
2.10.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	36
2.10.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	36
2.10.4.1.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bonde.....	37
2.10.4.2	Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm	37
2.10.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..	38
2.10.5.1	Kolloidal Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von SDS-Gelen	40
2.10.6	Messung von HNL-Aktivität mittels Mandelonitril-Spaltungsassay	40
2.10.6.1	Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität von <i>At</i> HNL-KatIBs	43
2.10.6.2	Ermittlung der pH-Stabilität von <i>At</i> HNL-KatIBs	43
2.10.7	Verwendung von <i>At</i> HNL-KatIBs zur Synthese von (<i>R</i>)-Cyanhydrinen... 44	
2.10.7.1	Herstellung von 2 M HCN/MTBE-Lösung	45
2.10.7.2	Test der Rückhaltung von <i>At</i> HNL-KatIBs durch eine Nylonmembran	45
2.10.7.3	Recycling von <i>At</i> HNL-KatIBs	46
2.10.7.4	Verbesserung des Umsatzes bei der Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril durch Vorbehandlung von <i>At</i> HNL-KatIBs	46
2.10.7.4.1	Steigerung des Umsatzes durch Inkubation von <i>At</i> HNL-KatIBs in MTBE	47
2.10.7.4.2	Erweitertes Protokoll zur Verbesserung des Umsatzes	47
2.10.8	Messung von <i>Bs</i> LA-Aktivität	48
2.10.9	<i>Ec</i> MenD-Aktivitätsassay	49

2.10.9.1 <i>EcMenD</i> -Reaktionsanalyse mittels GC und HPLC	50
2.10.9.2 Recycling von <i>EcMenD</i> -KatIBs	51
2.10.10 YFP-Fluoreszenzmessungen	52
2.10.10.1 Proteolytischer Verdau von YFP-IBs mit Faktor Xa Protease	52
2.11 Mikroskopie	53
2.11.1 Rasterelektronenmikroskopie	53
2.11.2 Fluoreszenzmikroskopie	54
2.11.3 Mikrofluidik	54
2.12 DNA-Sequenzierung	55
2.13 Gensynthese	55
2.14 Computerprogramme und Internettools	56
2.15 Geräte	56
3 Ergebnisse und Diskussion	58
3.1 Ein zur Stabilisierung von Proteinen geeigneter Fusionspartner konnte identifiziert werden	58
3.2 Erzeugung eines modularen Vektorsystems zur einfachen Konstruktion von Genfusionen	59
3.3 Die Überexpression von <i>tdot-linker-athnl</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) führt zur Bildung großer Mengen unlöslichen Fusionsproteins	62
3.3.1 Das Fusionsprotein TDoT-Linker-AtHNL ist in unlöslicher Form katalytisch aktiv	65
3.4 AtHNL-KatIBs sind biologisch herstellbare Enzymimmobilisate	67
3.5 AtHNL-KatIBs besitzen eine erhöhte Stabilität im schwach sauren pH-Bereich	69
3.6 Anwendung von AtHNL-KatIBs für die Synthese von (<i>R</i>)-Cyanhydrinen	72
3.6.1 Nasse AtHNL-KatIBs können zur Synthese von enantiomerenreinem (<i>R</i>)-Mandelonitril eingesetzt werden	73
3.6.2 AtHNL-KatIBs können für die Synthese von Cyanhydrinen einfach wiederverwendet werden	74
3.6.3 Die Produktion von Cyanhydrinen mittels AtHNL-KatIBs kann durch eine Vorbehandlung mit MTBE beschleunigt werden	77
3.6.4 Unter optimierten Bedingungen können AtHNL-KatIBs ohne großen Aktivitätsverlust mehrfach wiederverwendet werden	82
3.6.5 Die Verwendung der AtHNL in Form von KatIBs hat keinen Einfluss auf die Substratspezifität	84
3.6.6 Lyophilisierte AtHNL-KatIBs katalysieren die Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril schneller als vorbehandelte KatIBs	86
3.7 KatIBs – Interessante Enzymimmobilisate für die Biokatalyse	88

3.8	Übertragung der Strategie zur Produktion von KatIBs auf weitere Zielproteine	93
3.9	Die ausgewählten Zielproteine können in Form von KatIBs produziert werden	96
3.10	KatIBs können im großen Maßstab aus Zellen isoliert werden	99
3.11	Mittels Fluoreszenz lässt sich die Bildung von IBs in lebenden Zellen verfolgen	101
3.12	Die YFP-Fluoreszenz erlaubt <i>in vitro</i> eine Detektion der IBs und eine direkte Verfolgung eines proteolytischen Verdaus	103
3.13	Die Substratspezifität von <i>EcMenD</i> verändert sich durch die Produktion in Form von KatIBs nicht	108
3.14	<i>EcMenD</i> -KatIBs lassen sich problemlos wiederverwenden	109
3.15	Der TDoT- <i>tag</i> als hervorragende Alternative zur Induktion von aktiven IBs	111
3.16	Die für diese Arbeit gesetzten Ziele konnten auf einem unerwarteten Weg erreicht werden	115
3.17	Ausblick	116
4	Literatur	118
5	Anhang	131
6	Eigenständigkeitserklärung	139

Abkürzungen

Aminosäuren wurden nach den gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencodes abgekürzt.

α -KG	α -Ketoglutarat	LB	<i>lysogeny broth</i>
Abb.	Abbildung	LOV	<i>light, oxygen, voltage</i>
Amp	Ampicillin	M	Molar
APS	Ammoniumperoxodisulfat	μ	micro
AtHNL	<i>Arabidopsis thaliana</i> Hydroxynitril Lyase	m	milli
ATP	Adenosintriphosphat	min	Minute(n)
a.u.	arbiträre Einheit	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
bp	Basenpaar(e)	MTP	Mikrotiterplatte
BSA	Rinderserumalbumin	n	nano
BsLA	<i>Bacillus subtilis</i> Lipase A	NTA	Nitrilotriessigsäure
C	Celsius	OD	optische Dichte
CLEA	<i>cross-linked enzyme aggregate</i>	p	piko
Da	Dalton	Pa	Pascal
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
EC	<i>Enzyme Commission number</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
EcMenD	<i>Escherichia coli</i> 2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carboxylat-Synthase	PDB-ID	<i>Protein Data Bank identifier</i>
ee	<i>enantiomeric excess</i>	Psi	<i>pound-force per square inch</i>
FbFP	Flavin-basiertes Fluoreszenzprotein	RT	Raumtemperatur
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	s	Sekunde(n)
g	Gramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	mittlere Erdbeschleunigung	Tab.	Tabelle
GC	Gaschromatographie	TB	<i>terrific broth</i>
h	Stunde(n)	TDoT	Tetramerisierungs-Domäne von Tetrabrachion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	TEA	Triethanolamin
IBs	<i>inclusion bodies</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie	ThDP	Thiamindiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid	U	Units
k	kilo	UV	Ultraviolett
Kan	Kanamycin	UpM	Umdrehungen pro Minute
KatIBs	katalytisch aktive <i>inclusion bodies</i>	V	Volt
kb	Kilobase	v/v	Volumen pro Volumen
l	Liter	W	Watt
		w/v	Gewicht pro Volumen
		YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Biotechnologie

Bereits vor tausenden von Jahren nutzte die Menschheit unbewusst eine frühe Form der Biotechnologie, indem sie Mikroorganismen für die Verbesserung der Haltbarkeit oder die Produktion von Lebensmitteln verwendete (Abb. 1). Die bekanntesten Beispiele dafür sind der Einsatz von Hefen bei der Vergärung von zuckerhaltigen Flüssigkeiten zu Alkohol in Form von Bier oder Wein, aber auch die Herstellung von Käse, bei der die Fähigkeit von *Lactobacillus*-Stämmen zur Milchsäuregärung ausgenutzt wurde [1, 2].

Bei allen frühen Anwendungen der Biotechnologie wurden lebende Mikroorganismen verwendet. Erst 1897 konnte von dem deutschen Chemiker Eduard Buchner in einem Experiment gezeigt werden, dass für eine Umwandlung von Stoffen, einer sog. Biotransformation, keine lebenden Zellen notwendig sind. Dabei nutzte er ein zellfreies Hefeextrakt zur Fermentation von Zucker [3]. Etwa ein Jahrzehnt später (1908) beschrieb Ludwig Rosenthaler die erste mittels Enzymen katalysierte asymmetrische Synthesereaktion. Bei dieser Reaktion wurden Benzaldehyd, Blausäure (HCN) und Emulsin, eine aus Bittermandeln gewonnene Enzymmischung, gemischt, wobei (*R*)-Mandelonitril entstand [4].

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl an neuen biotechnologischen Prozessen etabliert. Dabei spielte insbesondere die Entwicklung neuer Methoden zur Identifizierung, Isolierung und Reinigung von Enzymen eine herausragende Rolle. Eins der großen Hindernisse, das auf dem Weg in die moderne Biotechnologie überwunden werden musste, war die Kultivierung von Mikroorganismen unter Laborbedingungen, da diese nur für einen sehr kleinen Teil der existierenden Organismen möglich ist [5, 6]. Dadurch war die Vielfalt der zugänglichen Enzyme stark eingeschränkt. Zur Lösung dieses Problems trug maßgeblich die Entwicklung von rekombinanten DNA-Methoden bei, wodurch der Transfer von Genen in einen gut kultivierbaren Wirtsorganismus sowie die heterologe, d. h. vom Spender des Gens unabhängige, Expression von Genen ermöglicht wurde [7-9]. Dies eröffnete einen einfachen Weg für die Produktion von großen Mengen Enzym. Einen weiteren Fortschritt zur Vergrößerung der verfügbaren Enzymvielfalt lieferte die Metagenomik,

die es in Verbindung mit weiteren Methoden erlaubt, neue Enzyme unabhängig von der Kultivierbarkeit des Ursprungsorganismus zu identifizieren [10, 11].

Heute ist in vielen Bereichen der Agrar-, Feinchemikalien- und Pharmaindustrie der Einsatz von biotechnologischen Prozessen nicht mehr wegzudenken. So werden beispielsweise viele Antibiotika, Hormone und Nahrungsmittelzusätze, wie Vitamine und Aminosäuren, mittels Enzymen oder unter Verwendung von Mikroorganismen produziert [12-14]. Auch für die Produktion von Biodiesel oder Biokunststoffen wurden erfolgreich biotechnologische Verfahren als Ersatz für die auf fossilen Brennstoffen basierenden Erzeugnisse entwickelt [15-17]. Selbst im alltäglichen Gebrauch finden Enzyme als biotechnologisches Produkt in Waschmitteln oder in Backwaren direkte Verwendung [18, 19].

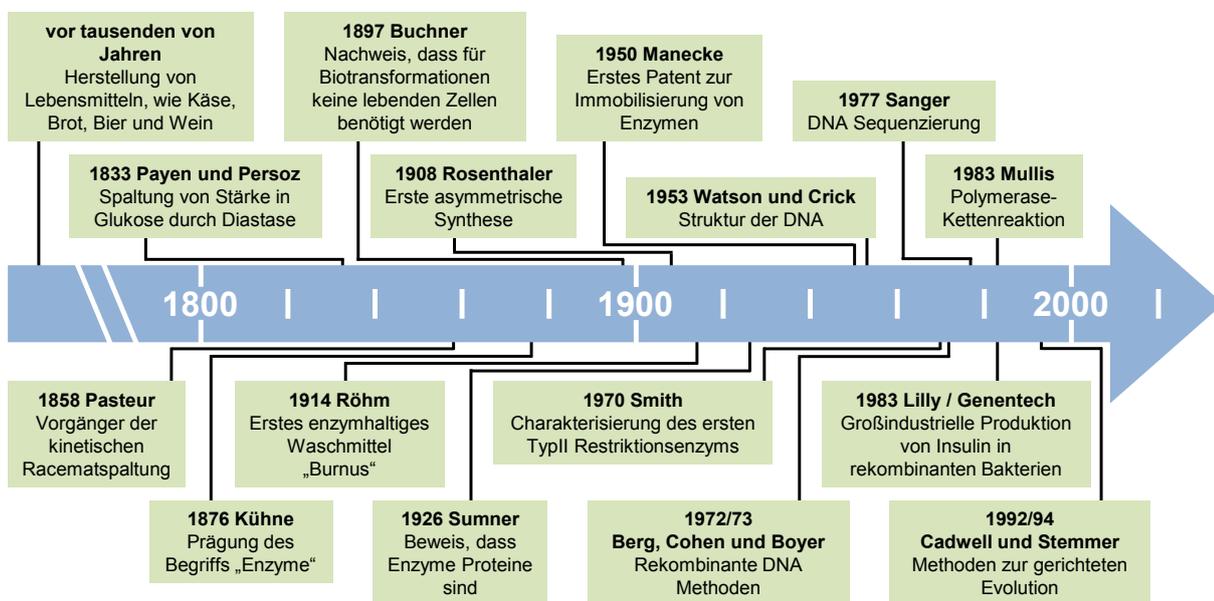


Abb. 1: Eine Auswahl wichtiger Meilensteine auf dem Weg zur modernen Biotechnologie.

1.2 Biokatalyse

In verschiedensten biotechnologischen Prozessen werden Enzyme, sowohl in isolierter als auch in Form ganzer Zellen, für die Katalyse chemischer Reaktionen verwendet. Der Begriff Katalyse leitet sich vom griechischen *katálysis* her und kann mit Auflösung übersetzt werden. Definiert wird Katalyse als die Beschleunigung einer langsam verlaufenden chemischen Reaktion in Gegenwart eines fremden Stoffes [20]. Dieser wird als Katalysator, bzw. im Falle von Enzymen als Biokatalysator, bezeichnet und wird während der katalysierten Reaktion nicht verbraucht. Dabei

senkt der Katalysator die Aktivierungsenergie einer Reaktion, wodurch Reaktionen beschleunigt werden, verändert jedoch nicht das thermodynamische Gleichgewicht [20].

Einer der Vorteile der Verwendung von Enzymen als Katalysator chemischer Reaktionen ist ihre hohe Regio-, Chemo- und Stereoselektivität, die es ermöglicht, auf einfache Weise enantiomerenreine Stoffe zu produzieren [21-23]. Darüber hinaus können mittels enzymatischer Katalyse häufig in einem Reaktionsschritt Produkte gewonnen werden, für die mehrere chemische Reaktionen notwendig wären [24]. Ein weiterer Vorteil ist, dass im Gegensatz zu vielen chemischen Prozessen die Biokatalyse unter vergleichsweise milden Bedingungen, wie moderaten Temperaturen und neutralem pH-Wert, in konventionellen, Puffer-basierten wässrigen Medien durchgeführt werden kann [25, 26].

Bereits in den 1930iger Jahren wurde allerdings entdeckt, dass Enzyme auch in organischen Lösungsmitteln, also einer nicht-wässrigen und somit nicht-konventionellen Umgebung, in der Lage sind, Reaktionen zu katalysieren [27]. Dieses Erkenntnis fand zu diesem Zeitpunkt keine weitere Anwendung und geriet in Vergessenheit bis sie u. a. von Alexander Klibanov in den 1980iger Jahren bei Experimenten mit einer lyophilisierten Lipase in organischen Lösungsmitteln mit keinem oder nur sehr geringem Wasseranteil wiederentdeckt wurde [28, 29]. Auch wenn in solchen Systemen lediglich eine, im Vergleich zu wässrigen Medien, verringerte Lipaseaktivität nachgewiesen werden konnte, eröffnete diese Entdeckung dennoch neue Möglichkeiten für die Biokatalyse.

In den letzten zwei Jahrzehnten hielten zusätzlich zu den bereits erwähnten organischen Lösungsmitteln weitere nicht-konventionelle Medien, wie beispielsweise ionische Flüssigkeiten und superkritische Fluide, die Katalyse in Gasphasen oder Reaktionen in reinen Substraten ohne zusätzliche Lösungsmittel, Einzug in die Biokatalyse [30-32]. Diese nicht-konventionellen Medien besitzen im Vergleich zu wässrigen Systemen mehrere besondere Eigenschaften und Vorteile. Zum Beispiel können schlecht in Wasser lösliche Substrate und Produkte in deutlich höheren Konzentrationen in nicht-konventionellen Medien gelöst und somit die Produktausbeute einer Reaktion erhöht werden, während gleichzeitig die sich an die Reaktion anschließende Aufarbeitung des Produktes erleichtert wird [33, 34]. Weiterhin kann das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion durch die Wahl des Reaktionsmediums verschoben werden. Durch einen geringen Wasseranteil in

dem Reaktionsmedium kann beispielsweise im Fall von Esterasen und Lipasen die Hydrolyse von Estern unterdrückt und im Gegenzug deren Synthese gefördert werden [29, 34, 35]. Auch unerwünschte Nebenreaktionen können durch die Verwendung von nicht-konventionellen Medien umgangen werden [34-36]. Zusätzlich ist für den industriellen Einsatz die geringere Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen durch Mikroorganismen, deren Wachstum in nicht-konventionellen Medien erheblich eingeschränkt oder komplett unterbunden wird, von großer Bedeutung [34, 37, 38].

Allerdings besitzen nicht-konventionelle Medien nicht nur Vorteile für die Biokatalyse, da sie aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften hohe Anforderungen an die verwendeten Enzyme stellen. Dabei kann es je nach Anwendung zum Beispiel zu Änderungen in den Selektivitäten, verringerter Aktivität bis hin zu vollständigem Aktivitätsverlust oder reduzierter Stabilität der Enzyme im Prozess kommen [35, 39].

1.3 Strategien zur Stabilisierung von Biokatalysatoren

In industriellen Verfahren bei denen konventionelle Medien (wässrige Reaktionsmedien) verwendet werden, können genau wie bei nicht-konventionellen Medien hohe Ansprüche an die Stabilität von Biokatalysatoren gestellt werden. Dabei stellen zum Beispiel hohe Temperaturen, hoch konzentrierte Salzlösungen oder extreme pH-Werte limitierende Faktoren dar [37, 40, 41]. Diesen Bedingungen halten die wenigsten Enzyme für lange Zeit stand, weshalb in vielen Fällen eine Stabilisierung der Biokatalysatoren mittels verschiedener Methoden notwendig ist, um einen biokatalytischen Prozess effizient zu gestalten.

1.3.1 Stabilisierung durch chemische Zusätze

Eine sehr häufig genutzte und mit wenig Aufwand verbundene Form der Stabilisierung von Enzymen ist die Verwendung von Zusätzen. Diese findet insbesondere Anwendung zur Verbesserung der Lagerstabilität von Biokatalysatoren und wird in vielen Fällen bei kommerziell erhältlichen Enzymen verwendet [42, 43]. Beispielsweise wird Enzymlösungen sehr oft Glycerin als Frostschutzmittel zur

Lagerung bei niedrigen Temperaturen hinzugefügt [44, 45]. Zur Verbesserung der Lagerstabilität von Enzymen können diese auch in Salzsuspensionen (z. B. Ammoniumsulfat) gefällt und somit gleichzeitig teilweise gereinigt werden [46]. Für die anschließende Verwendung kann das Protein in aktiver Form resuspendiert werden. Ähnliches gilt für das Lyophilisieren von Enzymen, wobei Zusätze, wie z. B. verschiedene Zucker, einen positiven Einfluss auf die Stabilität des Biokatalysators haben können [47]. Auch der Zusatz von Liganden, wie entsprechende Reaktionssubstrate, kann einen stabilisierenden Effekt haben [48, 49]. Allerdings ist dies nicht generell der Fall und kann keine oder sogar eine destabilisierende Wirkung auf den Biokatalysator zur Folge haben [42]. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, dass die Zusätze sich auf die von den Enzymen zu katalysierende Reaktion auswirken, Nebenreaktionen begünstigen oder im industriellen Maßstab in den notwendigen Konzentrationen ökonomisch nicht tragbar sind [42].

1.3.2 Stabilisierung durch Proteindesign

Ein breites Spektrum von Methoden zur Stabilisierung von Enzymen kann unter dem Begriff Proteindesign zusammengefasst werden. Einige wenige Änderungen in der Basensequenz eines Gens und der damit einhergehenden Änderung der Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins können einen sehr großen Einfluss auf die Stabilität von Enzymen haben. Dadurch ist es möglich, instabile Biokatalysatoren mittels Mutagenese an die hohen Ansprüche der industriellen Biotechnologie anzupassen.

In einigen Fällen konnte durch rationales Proteindesign, beispielsweise durch Einführung von Cysteinen zur Bildung von Disulfidbrücken, eine Steigerung der Stabilität erreicht werden [50-52]. Falls die Struktur eines im Vergleich zum Zielenzym stabileren homologen Biokatalysators bekannt ist, können auch Erfolge durch Homologie-Modellierung erreicht werden, indem z. B. eine entsprechende Anpassung der Oberfläche oder des hydrophoben Kerns vorgenommen wird [53-55]. Allerdings ist rationales Proteindesign bei vielen Enzymen aufgrund von fehlenden 3D-Strukturen nicht anwendbar und kann daher nicht als generelle Strategie zur Stabilisierung von Proteinen genutzt werden.

In den meisten Fällen ist darüber hinaus eine rationale Erklärung für den stabilisierenden Effekt eines Aminosäureaustausches nicht möglich, weshalb

insbesondere Methoden zur gerichteten Evolution große Erfolge vorzuweisen haben [56, 57]. Dabei werden mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden zufällige Änderungen in der Basensequenz des Strukturgens erzeugt, welche eine Änderung der Aminosäuresequenz des Zielproteins zur Folge haben. Da der Zufall bei diesem Vorgehen eine große Rolle spielt, müssen auf diese Weise Mutantenbibliotheken von entsprechendem Umfang erzeugt und auf stabilisierte Varianten des Ausgangsenzyms durchsucht werden. Dies ist gleichzeitig auch die Schwachstelle dieser Stabilisierungsstrategie, da die Etablierung und effiziente Durchführung eines solchen sog. *high-throughput screenings* keine triviale Aufgabe ist [58, 59]. Viele weitere Mutagenesemethoden, die auf kleineren Mutantenbibliotheken basieren, wie zirkuläre Permutation oder *domain shuffling*, können ebenfalls stabilisierte Varianten hervorbringen [60, 61].

1.3.3 Stabilisierung durch Immobilisierung

Die wahrscheinlich am häufigsten zur Verbesserung der Prozess-Stabilität von Enzymen verwendete Methode ist die Immobilisierung [62, 63]. Da für sie in den meisten Fällen keine Information über die Struktur des Enzyms erforderlich ist, kann die Stabilisierung mittels Immobilisierung prinzipiell bei jedem Enzym angewandt werden. Darüber hinaus existiert ein sehr breites methodisches Spektrum zur Immobilisierung von Enzymen, das grob in die drei Kategorien Adsorption, kovalente Bindung und Einschluss unterteilt werden kann (Abb. 2) [42, 64]. Daneben gibt es weitere Verfahren, die in keine dieser drei Kategorien eingeordnet werden können, allerdings zu speziell für den hier gegebenen allgemeinen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten der Immobilisierung sind.

Bei der Immobilisierung mittels Adsorption werden nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Protein und einem Trägermaterial ausgenutzt. Dabei bestimmen hauptsächlich van-der-Waals-Kräfte, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen die Bindung an die unterschiedlichsten Trägermaterialien, wie anorganische Träger, synthetische Polymere bis hin zu Biopolymeren (Abb. 2, A, B) [65-69]. Da die Immobilisierung mittels Adsorption in den meisten Fällen auf relativ schwachen Wechselwirkungen basiert, kommen mittels dieser Methode immobilisierte Enzyme meist in nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln

zum Einsatz. Unter diesen Bedingungen ist ein Auswaschen der Enzyme vom Trägermaterial unwahrscheinlicher [64].

Die zweite Gruppe von Immobilisierungsverfahren ist die kovalente Bindung an ein Trägermaterial oder die direkte Quervernetzung von Enzymmolekülen untereinander (Abb. 2, C, D) [69]. Als Träger können beispielsweise Polymere mit Amino- oder Epoxygruppen verwendet werden, wobei die Aminogruppen des Trägermaterials vor der Verwendung z. B. mit Glutardialdehyd aktiviert werden müssen [70], während Epoxygruppen direkt für die Immobilisierung zur Verfügung stehen [71]. In diesen beiden Fällen binden die funktionellen Gruppen des Trägers an oberflächenexponierte Aminogruppen des Zielproteins, wodurch dieses unter Umständen an mehreren Stellen kovalent gebunden wird. Diese mehrfache Verknüpfung des Trägermaterials mit dem Biokatalysator kann zu einer weiteren Stabilisierung beitragen [72].

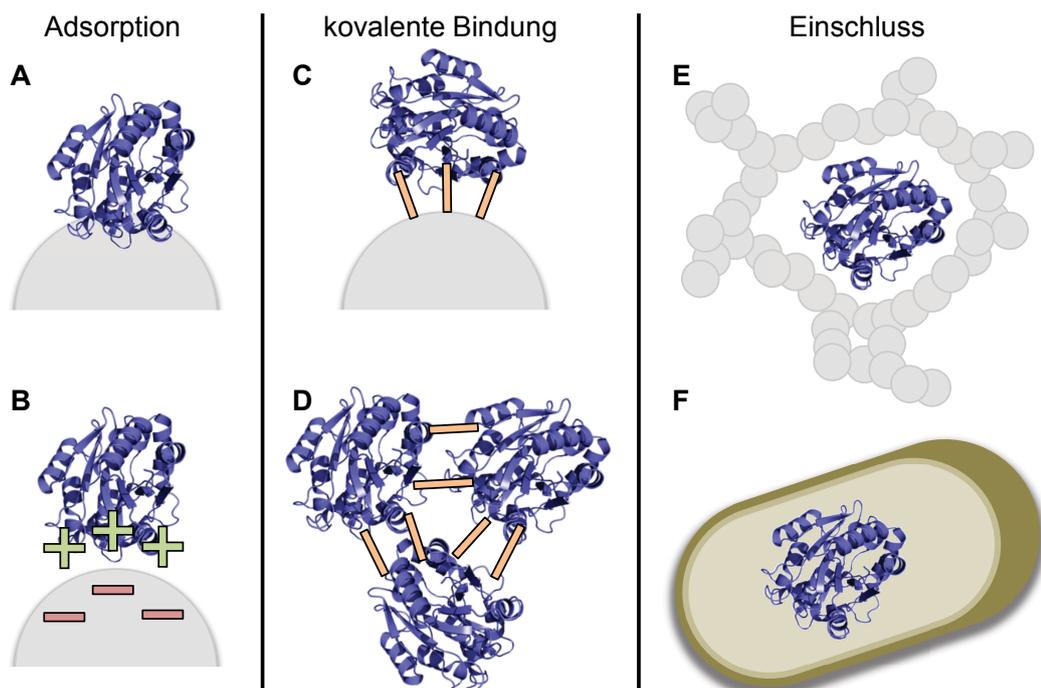


Abb. 2: Beispiele für Methoden zur Immobilisierung von Biokatalysatoren unterteilt in die Kategorien Adsorption, kovalente Bindung und Einschluss. A) Adsorption an ein Trägermaterial mittels hydrophober Wechselwirkung. B) Ionische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägermaterial erlauben ebenfalls eine Immobilisierung mittels Adsorption. C) Kovalente Bindung eines Biokatalysators an ein Trägermaterial mittels geeigneter funktioneller Gruppen. D) Quervernetzung von Enzymen untereinander durch Ausbildung kovalenter Bindungen. E) Einschluss von Enzymen in ein natürliches oder synthetisches Polymer zur Immobilisierung. F) Verwendung von ganzen Zellen zur Biokatalyse.

Eine ähnliche Strategie wird bei der Herstellung von *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) verfolgt, wobei diese Methode auf kovalenter Quervernetzung von Proteinen

beruht und somit ohne oft teure Trägermaterialien auskommt [73, 74]. Dabei wird das Zielenzym in einem ersten Schritt gefällt (z. B. durch Zugabe von gesättigten Salzlösungen, Säuren oder organischen Lösungsmitteln), wodurch aktive Aggregate gebildet werden sollen. Die Quervernetzung wird anschließend in einem zweiten Schritt beispielsweise mittels Glutardialdehyd durchgeführt, welches, wie bei dem bereits beschriebenen Verfahren zur kovalenten Immobilisierung auf Trägermaterialien, mit oberflächenexponierten Aminogruppen reagiert [64, 73]. Allerdings ist die Produktion von CLEAs eine zeitaufwendige Methode, da insbesondere die Fällung der Enzyme zur Erzeugung von aktiven Aggregaten für unterschiedliche Enzyme zunächst optimiert werden muss, um eine optimale Aktivität zu erreichen [73-75]. Trotzdem ist der Aktivitätsverlust durch das Herstellungsverfahren zumeist drastisch.

Sowohl kovalent an einen Träger gebundene als auch untereinander quervernetzte Enzyme erleiden häufig durch die Prozedur der Immobilisierung eine Verringerung der Aktivität [62, 75]. Diese ist wahrscheinlich durch die Fixierung der Enzyme an mehreren Stellen zu erklären, wodurch die für viele Reaktionen notwendige Flexibilität der Proteine reduziert wird [62, 63]. Allerdings liegt in der Fixierung und der damit einhergehenden Verringerung der Flexibilität gleichzeitig die Begründung für die durch Immobilisierung erhöhte Stabilität, da ein starres Enzym weniger leicht denaturiert werden kann [62, 63, 72].

In der dritten Gruppe von Immobilisierungsverfahren werden Methoden zusammengefasst, bei denen Enzyme ohne kovalente Bindung beispielsweise in Polymeren oder Mizellen eingeschlossen werden (Abb. 2, E) [76, 77]. Somit gehört im weitesten Sinne die Katalyse mit ganzen Zellen ebenfalls in diese Kategorie, da die Enzyme im Inneren der Zellen eingeschlossen und z. B. mittels Filtration abgetrennt bzw. wiedergewonnen werden können (Abb. 2, F) [78]. Diese natürliche Form der Immobilisierung benötigt keine Schritte zur Proteinreinigung oder zeitaufwendige Methoden zur Bindung der Enzyme. Darüber hinaus ist unter Umständen ein Zusatz von teuren Kofaktoren wie Flavinmononukleotid (FMN) oder Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) nicht notwendig, da diese in ausreichender Menge von den Zellen zur Verfügung gestellt werden [79, 80]. Allerdings können bei der Katalyse mit ganzen Zellen Nebenreaktionen begünstigt werden oder durch Zelllyse Kontaminationen des Produktes auftreten [78].

Neben dieser natürlichen Form der Immobilisierung durch Einschluss von Enzymen können diese auch in synthetischen oder natürlichen Polymeren eingeschlossen werden [64, 81]. Beispielsweise kommen dazu häufig Sol-Gele auf Silicium-Alkoxidbasis zum Einsatz, wobei $\text{Si}(\text{OR})_4$ oder $\text{RSi}(\text{OR})_3$ bzw. eine Mischung aus verschiedenen Silicium-Alkoxiden genutzt wird [82, 83]. Durch die Länge der Alkylketten, die verwendete Mischung oder die Durchführung einer Trocknung des Gels können Eigenschaften des Sol-Gels wie Hydrophobizität, Wassergehalt oder Porengröße beeinflusst werden [83, 84]. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass die in der Gelmatrix eingeschlossenen Enzyme von Puffer umgeben sind. Dadurch wird die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators hauptsächlich durch die Pufferumgebung definiert und nicht durch das verwendete Reaktionsmedium, wie z. B. bei einem Einsatz in organischem Lösungsmittel [81, 85]. Allerdings kann das Enzym bereits durch die bei der Ausbildung des Gels herrschenden Bedingungen inaktiviert werden [85].

Auch wenn die verschiedenen Immobilisierungstechniken unterschiedliche Vor- und Nachteile besitzen, gilt für alle, dass sie im Vergleich zu löslichem Protein die Möglichkeit eröffnen, das gebundene Enzym mehrfach wiederzuverwenden [86]. Dies ist in sehr vielen Fällen, insbesondere in Anbetracht der für die Reinigung von Enzymen anfallenden Kosten und Arbeitszeit, unverzichtbar, um einen Prozess effizient und rentabel zu gestalten [87]. Allerdings kann keine der beschriebenen Immobilisierungsverfahren als generelle Strategie zur Stabilisierung von Enzymen verwendet werden, da eine Immobilisierung auf jedes Enzym eine andere Auswirkung haben kann. So kommt es z. B. bei vielen der Methoden zu einer Verringerung der Aktivität des gebundenen Enzyms, wobei diese meist auf eine Diffusionslimitierung zurückzuführen ist [88, 89]. Darüber hinaus kann es bei einer Immobilisierung zu Änderungen in der Selektivität des Biokatalysators kommen [90, 91].

1.4 Die *Arabidopsis thaliana* Hydroxynitril Lyase

Für die Etablierung neuer Methoden zur Stabilisierung von Biokatalysatoren kann ein Enzym verwendet werden, welches ein Stabilitätsproblem unter möglichst definierten Bedingungen besitzt. Darüber hinaus sollte die Reaktion dieses Modellenzym auf einfache Weise verfolgt werden können, um den Einfluss der neuen Methode auf die

Stabilität des Enzyms direkt nachweisen zu können. Diese Kriterien erfüllt die Hydroxynitril Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) und ist daher sehr gut als Modellenzym zur Untersuchung der Stabilisierung von Enzymen geeignet.

HNLs werden in der Literatur häufig auch als Oxynitrilasen bezeichnet und gehören zu der Enzymklasse der Aldehydlyasen (EC 4.1.2; *AtHNL* EC 4.1.2.10) [92]. In ihrer natürlichen Funktion, zumeist in Pflanzen, katalysieren sie die sog. Cyanogenese, wobei Cyanhydrine gespalten und eine Carbonylkomponente (Aldehyd oder Keton) und Cyanwasserstoff (HCN) freigesetzt werden (Abb. 3) [93]. Diese Spaltungsreaktion dient cyanogenen Pflanzen als Abwehrstrategie gegen Fressfeinde [94, 95]. Dabei sind meist cyanogene Glykoside, wie Amygdalin oder Linamarin, und die für die Freisetzung von HCN benötigten Enzyme in unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanzenzellen (Vakuole und Zellwand) oder in verschiedenen Zellarten (z. B. Epidermis und Mesophyllschicht) lokalisiert [96, 97]. Auf diese Weise kann das HCN erst bei einer Beschädigung der Pflanze freigesetzt werden. Seine Toxizität entfaltet das HCN in der Atmungskette, wo es in Form von Cyanidionen an das Eisen(III)-Ion des Häm- a_3 -Kofaktors der Cytochrom-c-Oxidase bindet und somit den Elektronentransfer auf Sauerstoff unterbindet [98]. Dies führt zum Tod durch Ersticken.

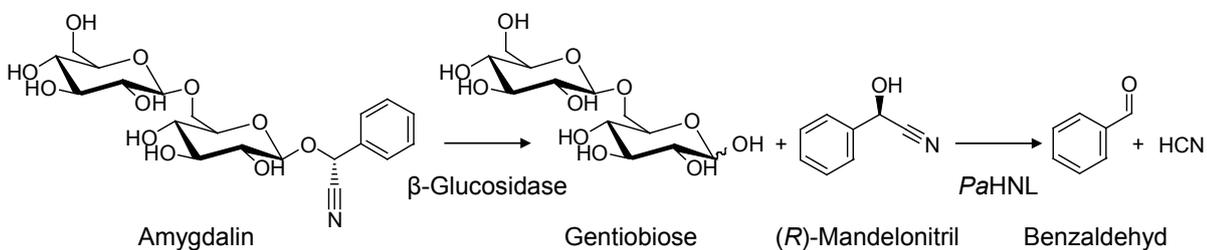


Abb. 3: Zweistufige Reaktion zur Freisetzung von Blausäure (HCN) in *Prunus amygdalus* (Bittermandel). Im ersten Schritt wird das cyanogene Glykosid Amygdalin durch eine β -Glucosidase in Gentiobiose und (*R*)-Mandelonitril gespalten. Dieses wird in einer zweiten Reaktion mittels der (*R*)-selektiven PaHNL zu Benzaldehyd und HCN umgesetzt [99]. Dieses Beispiel wurde gewählt, da die *AtHNL* in der nicht cyanogenen Pflanze *A. thaliana* wahrscheinlich keine natürliche Funktion besitzt, allerdings dieselbe Reaktion wie die PaHNL katalysieren kann.

Allerdings handelt es sich bei *A. thaliana* nicht um eine cyanogene Pflanze, weshalb vermutet wird, dass es sich bei der *AtHNL* um ein evolutionäres Relikt handelt [100]. Sie wurde 2007 im Rahmen einer Suche nach neuen HNLs gefunden, bei dem das Genom des Modellorganismus *A. thaliana* auf Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten HNLs durchmustert wurde [100]. Die *AtHNL* ist die erste (*R*)-selektive HNL mit einem α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv und besitzt eine molekulare Masse von 29 kDa pro Untereinheit. Darüber hinaus ist interessant, dass sie ein strukturelles

Dimer bildet, keinen Kofaktor für ihre katalytische Aktivität benötigt, ein breites Substratspektrum hat, keine Glykosylierung aufweist und das entsprechende Gen gut in dem Wirtsorganismus *Escherichia coli* heterolog exprimiert werden kann [100, 101]. Für eine industrielle Anwendung von HNLs ist nicht die natürliche Cyanogenese Reaktion interessant, sondern die Rückreaktion, welche Hydrocyanierung genannt wird. Dabei wird entsprechend enantioselektiv eine C-C-Bindung zwischen HCN und einem Aldehyd bzw. einem Keton geformt, wobei ein chirales Cyanhydrin entsteht. Je nach Wahl des Biokatalysators können auf diese Weise sowohl (*S*)- als auch (*R*)-Cyanhydrine produziert werden [92, 102, 103]. Diese sind in enantiomerenreiner Form wichtige Bausteine für komplexere Produkte in den verschiedenen Bereichen der Agro-, Pharma- und der Feinchemikalienindustrie [104, 105]. So wird beispielsweise für die Produktion des Thrombozytenaggregationshemmers Clopidogrel (*R*)-2-Chlormandelonitril als Vorstufe benötigt, welche in industriellem Maßstab durch die (*R*)-selektive HNL aus *Prunus amygdalus* (*Pa*HNL) hergestellt wird (Abb. 4) [104]. Ein Beispiel für die Nutzung einer (*S*)-selektiven HNL ist die Umsetzung von HCN und *m*-Phenoxybenzaldehyd unter Verwendung der HNL aus *Hevea brasiliensis* (*Hb*HNL) zu (*S*)-3-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin [105]. Letzteres ist ein Baustein für die Produktion von Pyrethroiden, eine der wichtigsten Klassen von Insektiziden [106].

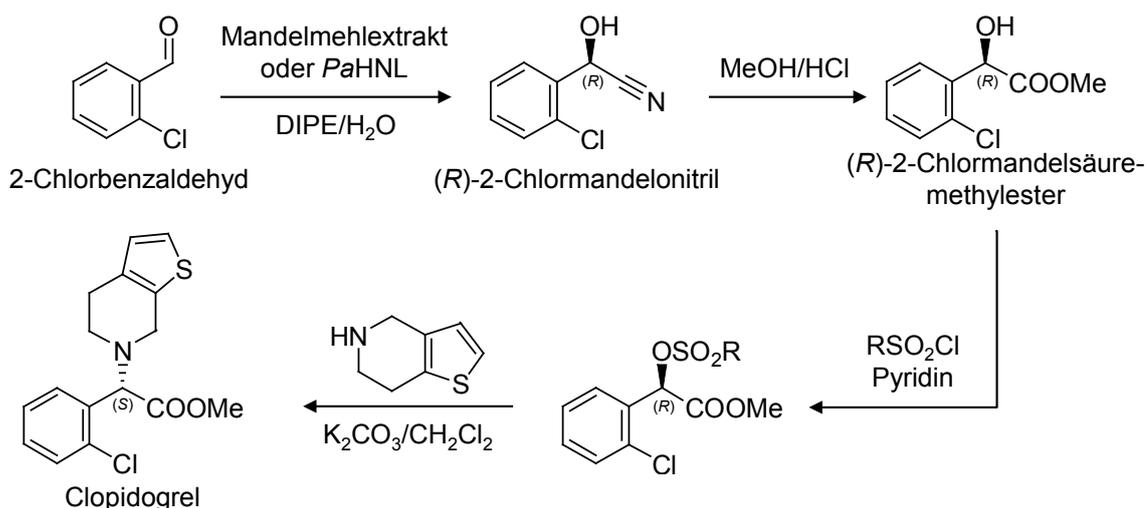


Abb. 4: Industriell relevante, HNL-katalysierte Hydrocyanierungsreaktion und anschließende Weiterreaktion zum Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel. In der ersten Reaktion wird 2-Chlorbenzaldehyd mit HCN zu (*R*)-2-Chlormandelonitril umgesetzt. Diese Hydrocyanierungsreaktion wird industriell durch teilgereinigte *Pa*HNL oder *Pa*HNL-enthaltendes Mandelmehlextrakt katalysiert. In drei einfachen Folgereaktionen kann aus (*R*)-2-Chlormandelonitril das pharmazeutische Produkt Clopidogrel erzeugt werden [104].

Allerdings behindert eine spontan ablaufende chemische Hydrocyanierungsreaktion, bei der das Carbonyl C-Atom des Aldehyds oder Ketons von einem Cyanidion angegriffen wird, die einfache Gewinnung von enantiomerenreinen Cyanhydrinen [107]. Durch diese nukleophile Addition entsteht racemisches Produkt, wobei bereits mehrere Lösungswege für dieses Problem existieren. So kann der pH-Wert der Reaktionslösung unter pH 5 gesenkt werden, um die Konzentration der Cyanidionen möglichst niedrig zu halten und somit die Reaktionsgeschwindigkeit der Nebenreaktion deutlich zu reduzieren [108, 109]. Dieser Ansatz beinhaltet allerdings ein neues Problem, da die zumeist aromatischen Substrate der HNL nur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser aufweisen. Daher wird in vielen industriellen Prozessen ein Zweiphasensystem, bestehend aus einer wässrigen Phase mit niedrigem pH-Wert ($\text{pH} \leq 5$) und einer organischen Phase mit den in hohen Konzentrationen gelösten Substraten, verwendet [110, 111]. Bei diesem Verfahren kann die wässrige Phase für mehrere Reaktionen wiederverwendet werden, sofern die eingesetzte HNL nicht durch den niedrigen pH-Wert der Lösung oder den Kontakt mit der Grenzfläche zwischen den Phasen inaktiviert wurde [112]. Als dritte Strategie wird häufig ein einphasiges System aus reinem organischem Lösungsmittel mit einem sehr geringen Wasseranteil verwendet, wodurch die chemische Nebenreaktion ebenfalls effizient unterdrückt wird [113]. Allerdings präzipitiert das eingesetzte Protein unter diesen Bedingungen häufig und kann daher nicht in einfacher Weise wiederverwendet werden [114].

Alle diese Lösungsansätze stellen an die *AthNL* große Anforderungen in Bezug auf ihre Stabilität. Insbesondere niedrige pH-Werte unter pH 5 sind ein großes Hindernis für die Anwendbarkeit der *AthNL*, da diese unter solchen Bedingungen sehr instabil ist und bereits bei einem pH von 5 lediglich eine Halbwertszeit von 0,16 h aufweist [115].

1.5 Die Stabilisierung der *AthNL*

Aufgrund der geringen Stabilität der *AthNL* unter den für eine Synthese von enantiomerenreinen Cyanhydrinen notwendigen Bedingungen, wurde in mehreren Arbeiten versucht, die *AthNL* zu stabilisieren und mittels verschiedener Methoden eine Wiederverwendung des Biokatalysators zu ermöglichen.

1.5.1 Stabilisierung der AtHNL mittels Immobilisierung

In einer ersten Studie wurde die AtHNL für die Hydrocyanierungsreaktion in einem mikrowässrigen Reaktionssystem mit Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) als Lösungsmittel verwendet [114]. Unter diesen Bedingungen präzipitiert das Enzym, bleibt allerdings aktiv und bildet Mandelonitril mit einem exzellenten Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, ee) von 99 % (*R*). Das Präzipitat kann jedoch nicht wiederverwendet werden. Um diesen Umstand zu ändern und die Prozessstabilität zu erhöhen, wurden verschiedene Methoden der Immobilisierung auf die AtHNL angewandt. Zum Einsatz kamen eine Methode zur Bildung von CLEAs [116], der Einschluss in ein Sol-Gel und die Bindung an Kieselgur (Celite) mittels Adsorption [114] (1.3.3). Die erhaltenen Immobilisate wurden anschließend für die Hydrocyanierungsreaktion unter denselben Bedingungen verwendet und mit der nicht immobilisierten AtHNL verglichen.

In allen Fällen konnte mit den Immobilisaten ein exzellenter ee von 99 % (*R*)-Mandelonitril erreicht werden. Allerdings besaßen die Enzyme je nach Präparation sehr unterschiedliche Restaktivitäten. So war bei den CLEAs mit einer Restaktivität von 10 bis 29 % (abhängig von der Trocknung) der stärkste Aktivitätsverlust im Vergleich mit nicht immobilisierter AtHNL zu beobachten. Aufgrund des hohen Präparationsaufwandes und der niedrigen Aktivität wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt [116]. Im Gegensatz dazu konnte für die in ein Sol-Gel eingeschlossene AtHNL eine nahezu 7-fach höhere Aktivität im Vergleich zu nicht immobilisierter AtHNL nachgewiesen werden. Diese wurde damit erklärt, dass der im Sol-Gel enthaltene Puffer eine weniger aggressive Umgebung als das verwendete organische Lösungsmittel darstellt und somit die Aggregation der AtHNL verhindert. Allerdings wurde in einem Recyclingexperiment festgestellt, dass bei wiederholter Verwendung die Aktivität sehr stark abnahm, wobei wahrscheinlich pro Zyklus mehr von dem Lösungsmittel MTBE in das Gel eindringen konnte und somit das Enzym inaktiviert wurde. Die Adsorption an Celite stellte sich als die geeignetste Methode heraus, um hohe Produktausbeuten zu erzielen. Zwar wurde die Aktivität der adsorbierten AtHNL während des Verfahrens auf 78 % im Vergleich zur nicht immobilisierten AtHNL verringert, allerdings konnte die Celite-AtHNL Präparation im Gegenzug 5- bis 6-mal wiederverwendet werden [114].

1.5.2 Verwendung von *AthNL* produzierenden *E. coli* Zellen als Katalysator

Einen mit deutlich weniger Arbeitsaufwand verbundenen Weg zur Wiederverwendung der *AthNL* als Katalysator verfolgten Scholz *et al.* [117]. Dabei wurden *AthNL* produzierende *E. coli* Zellen direkt für die Produktion von Cyanhydrinen in einem mikrowässrigen Reaktionssystem eingesetzt. Dies erspart Kosten und Zeit für die Reinigung und Immobilisierung des Enzyms, da es bereits in den Zellen eingeschlossen ist und somit einfach aus dem Reaktionssystem entfernt und wiederverwendet werden kann. Für die Hydrocyanierung von Benzaldehyd zu (*R*)-Mandelonitril konnten auf diese Weise drei Zyklen mit geringem Aktivitätsverlust durchgeführt werden, wobei selbst nach fünf Zyklen noch ein Umsatz von 85 % und ein exzellenter *ee* von 98 % (*R*) innerhalb von einer Stunde erreicht werden konnte. Allerdings zeigte sich, dass die Verwendung von nassen Zellen für die Umsetzung von für die chemische Nebenreaktion anfälligeren Substraten, wie 2-Chlorbenzaldehyd oder 2-Furaldehyd, lediglich schlechtere Umsätze und *ee*-Werte unter 70 % ermöglichte. Ein Lyophilisieren der *E. coli* Zellen konnte die *ee*-Werte zwar teilweise deutlich verbessern, allerdings wurde im Gegenzug die Aktivität der Ganzzellpräparation deutlich reduziert, was in Umsätzen der verschiedenen Substrate zwischen 40 und 70 % resultierte [117, 118].

1.5.3 Stabilisierung der *AthNL* durch rationales Proteindesign

In einer weiteren Arbeit wurde in einem Proteindesignansatz (1.3.2) die bei niedrigen pH-Werten im Vergleich zur *AthNL* deutlich stabilere HNL aus *Manihot esculenta* (*MeHNL*) [119] als Vorbild gewählt. Diese ist der *AthNL* strukturell sehr ähnlich und ist die stabilste HNL mit einem α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv. Die deutlich höhere Stabilität der *MeHNL* liegt wahrscheinlich darin begründet, dass sie im Unterschied zur *AthNL* nicht nur Dimere bildet, sondern sich darüber hinaus ein aus zwei Dimeren bestehender Tetramer mit schwacher Interaktion ausbilden kann [115]. Daher wurden durch einen Vergleich der Oberflächen der beiden Enzyme die Aminosäuren ermittelt, die für die Bildung des *MeHNL* Tetramers verantwortlich sind [120]. 27 Aminosäureseitenketten, welche einen positiven Einfluss auf die Tetramerisierung der *MeHNL* haben, konnten identifiziert werden. Dabei zeigte eine

Modellierung, dass elf dieser Aminosäuren ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Tetramerisierung der *AtHNL* haben sollten und wurden daher auf diese übertragen (Abb. 5).

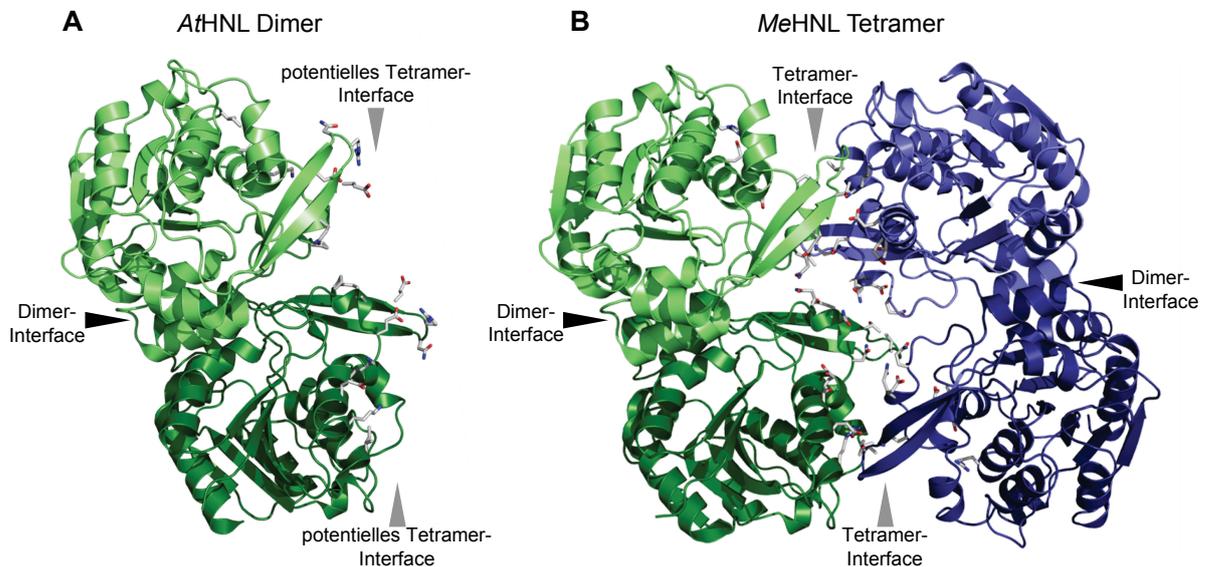


Abb. 5: Vergleich der A) dimeren *AtHNL* und der B) tetrameren *MeHNL*. Für die Erstellung einer potentiell tetrameren *AtHNL* Variante wurde das entsprechende Interface zur Bildung des Tetramers in der strukturell sehr ähnlichen *MeHNL* (PDB-ID: 1DWP [121]) untersucht. Durch einen Vergleich mit der *AtHNL* (PDB-ID: 3DQZ [101]) konnten elf Aminosäuren identifiziert werden, welche sowohl einen positiven Einfluss auf die Tetramerisierung der *MeHNL* als auch auf eine modellierte tetramere *AtHNL* hatten. Diese elf Aminosäureseitenketten sind in der Abbildung als Stäbchen dargestellt und entsprechend der enthaltenen Atome eingefärbt (C: grau, O: rot, N: blau). Grün bzw. blau gefärbte Moleküle stellen je ein Dimer dar, wobei das Interface zwischen hell und dunkel starke Dimerinteraktion repräsentieren (schwarze Pfeile). Das Interface zwischen grün und blau verdeutlicht die Interaktion zwischen je zwei Dimeren und stellt somit die schwächere Tetramerinteraktion dar (graue Pfeile).

Tatsächlich besaß die erzeugte *AtHNL* Variante (Surfmod-*AtHNL*) eine deutlich verbesserte Aktivität und Stabilität bei pH-Werten unter pH 5 im Vergleich zu der wildtypischen *AtHNL* [120]. Dabei konnte für die Surfmod-*AtHNL* eine Halbwertszeit von 13 min bei pH 4,5 gemessen werden, während die wildtypische *AtHNL* bei diesem pH-Wert für eine Messung zu schnell inaktiviert wird. Diese Erhöhung der Stabilität ermöglichte zum ersten Mal einen Einsatz für die Hydrocyanierungsreaktion in einem organisch/wässrigen Zweiphasensystem, in welchem zur Unterdrückung der chemischen Nebenreaktion eine Pufferphase mit einem pH-Wert von 4,5 verwendet wurde.

Allerdings konnte anhand einer Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass die Surfmod-*AtHNL* trotz der eingefügten Mutationen an ihrer Oberfläche kein Tetramer bildet, sondern weiterhin als Dimer vorliegt. Deswegen kann die erhöhte

Stabilität der Surfmod-AtHNL nicht in einer Änderung des Oligomerisierungszustands begründet liegen. Möglicherweise wurde der isoelektrische Punkt durch den Austausch der elf oberflächenexponierten Aminosäuren stark beeinflusst, was eine Erklärung für die verbesserte Aktivität und Stabilität der Surfmod-AtHNL sein könnte [120].

1.5.4 Fusion der AtHNL mit einem Flavin-basierten Fluoreszenzprotein

Die im leicht sauren pH-Bereich bisher stabilste AtHNL Variante wurde während eines Projektes entdeckt, welches nicht die Stabilisierung der AtHNL zum Ziel hatte. Dabei wurden mehrere Fusionen der AtHNL mit einem Flavin-basierten Fluoreszenzprotein (FbFP [122]) erstellt (Abb. 6, A) [118, 123]. Diese sollten anhand ihrer Fluoreszenz eine Lokalisierung der Fusionen in Zellen erlauben und darüber hinaus *in vitro* charakterisiert werden, um die Auswirkungen der Fusion des Fluoreszenzreporters auf die Eigenschaften der AtHNL zu analysieren.

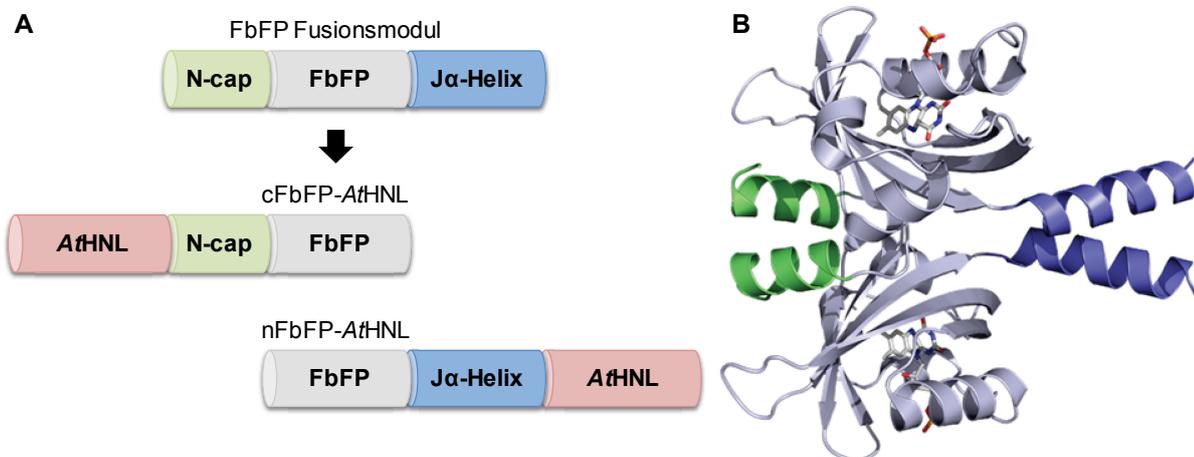


Abb. 6: Schematische Darstellung des Aufbaus von FbFP-AtHNL Fusionen und Struktur eines FbFP mit den natürlichen, *coiled coil* bildenden Linkern. A) Zur Untersuchung des Einflusses einer Fusion des Fluoreszenzreporters (FbFP) mit dem Modellenzym AtHNL wurden ausgehend von einem Fusionsmodul zwei Varianten erstellt. Dabei wurde das FbFP in einer ersten Version an den Carboxy-Terminus (cFbFP-AtHNL) und in einer zweiten Version an den Amino-Terminus (nFbFP-AtHNL) der AtHNL fusioniert. B) Cartoondarstellung der Struktur eines FbFP. Dabei wurde statt der Struktur der YtvA LOV-Domäne (*light, oxygen, voltage*) aus *Bacillus subtilis* die Struktur von *Pseudomonas putida* SB1 (PDB-ID: 3SW1 [124]) dargestellt, da diese sehr ähnlich ist [125] und mit beiden natürlichen Linkerregionen kristallisiert wurde. Das N-cap wurde in grün und die Jα-Helix in blau hervorgehoben. Das fluoreszente Flavinmononukleotid Chromophor der LOV-Domäne ist als Stäbchenmodell dargestellt und entsprechend der enthaltenen Atome eingefärbt (C: grau, O: rot, N: blau, P: orange).

Überraschenderweise zeigte sich, dass sowohl eine Fusion des Fluoreszenzreporters an den Amino- (nFbFP-AtHNL) als auch an den Carboxy-Terminus der AtHNL (cFbFP-AtHNL) auf das Enzym eine stabilisierende Wirkung im schwach sauren pH-Bereich hatte [118, 123]. Dabei besaß nFbFP-AtHNL mit einer Halbwertszeit von 55 min eine etwa 22-fach erhöhte und cFbFP-AtHNL mit 95 min eine 43-fach verbesserte Stabilität im Vergleich zur wildtypischen AtHNL bei pH 4,75. Diese Entdeckung ermöglichte, wie schon zuvor bei der SurfMod-AtHNL (1.5.3), einen erfolgreichen Einsatz des Fusionsproteins cFbFP-AtHNL in einem organisch/wässrigen Zweiphasensystem zur Synthese von enantiomerenreinen Cyanhydrinen.

Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung für die erhöhte Stabilität der Fusionen wurde eine größenausschlusschromatographische Analyse durchgeführt, um einen Einfluss der Fusion auf die Oligomerisierung der Enzym-FbFP-Fusionen zu überprüfen. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zur strikt dimeren, wildtypischen AtHNL die nFbFP-AtHNL Fusion zwar zu einem großen Teil ebenfalls als Dimer vorlag, allerdings zusätzlich Tetramere bilden konnte. Im Gegensatz dazu konnte bei der cFbFP-AtHNL Fusion nahezu kein dimeres Protein nachgewiesen werden, sondern hauptsächlich Trimere, Tetramere und zu einem geringeren Anteil sogar höhere Oligomere [118, 123]. Für die erhöhte Stabilität der FbFP-AtHNL Fusionen könnte somit eine Änderung des Oligomerisierungsgrades verantwortlich sein. Diese könnte durch die Verwendung α -helikaler Linker-Elemente für die Konstruktion der Fusionsproteine hervorgerufen worden sein. Die in den Fusionen enthaltenen Linker-Elemente flankieren das FbFP in seinem natürlichen Volllängeprotein (YtvA aus *Bacillus subtilis*) [126] und wurden in der Arbeit von Scholz *et al.* als natürliche Abstandshalter zwischen den Domänen genutzt (Abb. 6, B) [123]. Darüber hinaus tragen die Elemente zur Dimerisierung des nicht fusionierten FbFP bei, indem sie aneinander binden und auf diese Weise ein *coiled coil* bilden [125]. Dadurch könnten diese Linker ebenfalls in den Fusionen mit der AtHNL die beobachtete höhere Oligomerisierung induzieren.

1.6 Fusion mit *coiled coils* zur gezielten Oligomerisierung der AtHNL

Die Fusion eines *coiled coils* enthaltenden FbFPs an die AtHNL hatte eine Veränderung des Oligomerisierungsgrades zur Folge, die jedoch nicht vorhersehbar

war und unterschiedliche Oligomere hervorbrachte (1.5.4). Zudem führte die amino- und carboxy-terminale Fusion des FbFPs zu einem unterschiedlichen Oligomerisierungsverhalten des resultierenden Fusionsproteins [123]. Daher sollte in dieser Arbeit ein simples Faltungsmotiv mit definierter Quartärstruktur dazu genutzt werden, um eine gezielte Oligomerisierung der AtHNL zu erreichen und eine damit einhergehende mögliche Stabilisierung zu überprüfen.

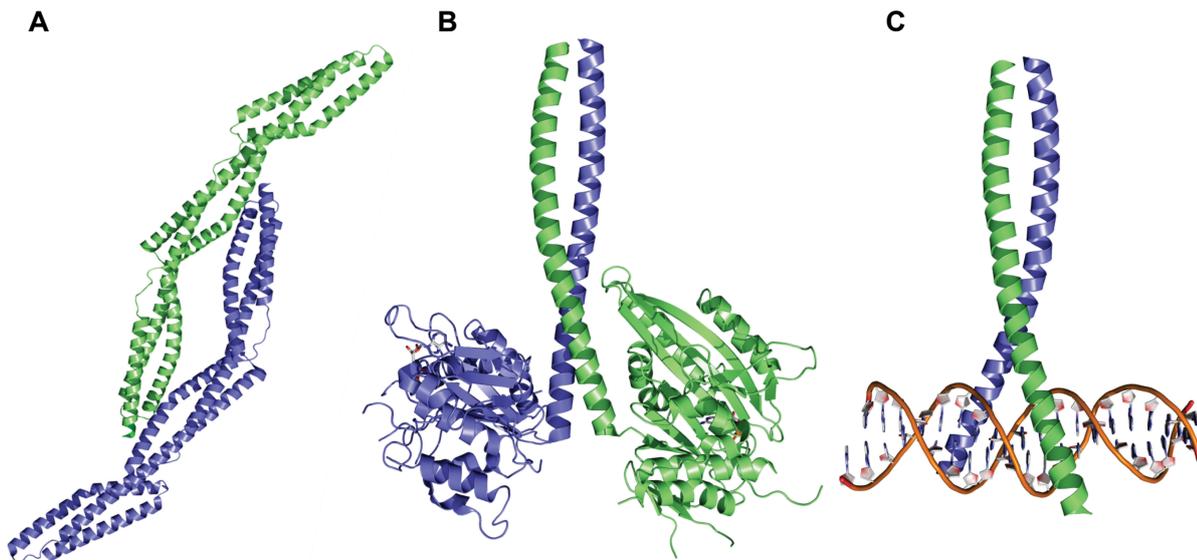


Abb. 7: Vorkommen von *coiled coils* in der Natur. A) Spektrin (PDB-ID: 3EDV [127]) bildet eine planare Schicht auf der Innenseite der Zellmembran tierischer Zellen und stellt somit einen Teil des Zytoskeletts der Zelle dar. Seine für die Zelle stabilisierende Wirkung entfaltet es durch die Bildung großer Netzwerke, wobei lediglich eine dimere Untereinheit dargestellt wurde. B) Kinesin (PDB-ID: 3L1C [128]) besteht aus einer Motordomäne, einer Bindungsdomäne (nicht dargestellt) und einem sehr langen *coiled coil* als Verbindung zwischen den Domänen. Das *coiled coil* besitzt in diesem Protein eine dynamische Funktion und ändert seine Struktur entsprechend der ausgeübten Kraft während der Bewegung der Motordomäne. C) Die Funktion des *coiled coils* in einem bZIP-Transkriptionsfaktor ist die Dimerisierung und die Bindung von DNA. Dargestellt ist lediglich die bZIP-Domäne (PDB-ID: 1FOS [129]) des insgesamt deutlich größeren Transkriptionsfaktors.

Das Strukturmotiv der *coiled coils* stellt ein solches einfaches Faltungsmotiv dar. In der Natur ist es ubiquitär verbreitet und dient in Proteinen und Zellen verschiedenen Zwecken [130-133]. Dabei können *coiled coils* u. a. eine stabilisierende Funktion für Zellen besitzen, indem sie geordnete zwei- oder dreidimensionale Netzwerke ausbilden, welche eine Ausdehnung im Bereich von Mikrometern besitzen können [134-136]. So bildet beispielsweise das zytoskelettale Protein Spektrin (Abb. 7, A) eine planare Schicht auf der Innenseite der Zellmembran tierischer Zellen [137, 138]. In vielen Fällen besitzen *coiled coils* in der Natur auch eine dynamische Funktion. Diese spielt insbesondere in verschiedenen Motorproteinen, wie Myosin, Dynein oder Kinesin (Abb. 7, B), bei der Bewegung der Motordomänen eine Rolle [139-141].

Dabei ändert sich die Struktur der *coiled coils* entsprechend der ausgeübten Kraft [142]. Die dritte Funktion, die *coiled coils* ausüben können, ist Bindung. Dabei kann die intramolekulare Zusammenlagerung einzelner *coiled coil* Stränge zur Bildung des hydrophoben Kerns von Proteinen beitragen oder die intermolekulare Bindung verschiedener Proteine aneinander induzieren [143, 144]. Beispielsweise kann auch DNA, wie bei der Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren (Abb. 7, C), von *coiled coils* gebunden werden [145].

Die allgemeine Struktur von *coiled coils* ist so simpel wie charakteristisch. Dabei winden sich zwei oder mehr α -Helices wie die einzelnen Stränge eines Seils in einer superhelikalen Weise umeinander (Abb. 8, A). Ihre Primärstruktur setzt sich aus einem sich wiederholenden sog. Heptadenmuster zusammen [146, 147]. Dieses besteht aus sieben Aminosäuren, deren Position in der jeweiligen Abfolge mit a-b-c-d-e-f-g beschrieben wird (Abb. 8, B). An den Positionen a und d des Musters befinden sich in der Regel Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten. Diese können bei einer Zusammenlagerung von mindestens zwei α -Helices einen dicht gepackten hydrophoben Kern ausbilden [146]. Dabei sind die Seitenketten auf eine Weise positioniert, die einem molekularen Klett- oder Reißverschluss ähnelt (Abb. 8, B, C) [148, 149]. Die Positionen a und d der Heptaden liegen bei aufeinanderfolgenden Wiederholungen nicht exakt untereinander in der Helix. Daher windet sich der aus den Seitenketten entstehende hydrophobe Streifen etwa alle 15 Wiederholungen (ca. 15 nm) einmal um die gesamte Achse einer α -Helix [144]. Dies führt bei einer Zusammenlagerung eines *coiled coils* dazu, dass sich die einzelnen Stränge umeinander winden und die superhelikale Struktur gebildet wird [144, 150]. Allerdings sind nicht die hydrophoben Reste an den Positionen a und d allein für die Stabilität und Bindungsspezifität der *coiled coils* verantwortlich. Auch die Positionen e und g, an welchen zumeist Aminosäuren mit gegensätzlich geladenen Seitenketten vorkommen, tragen durch Bildung von Salzbrücken ihren Teil zur Struktur des *coiled coils* bei [149, 150].

Die Struktur von *coiled coils* ist nicht auf die Bildung von parallelen Homodimeren beschränkt. So kommen in der Natur ebenfalls antiparallele Ausrichtungen und Heterooligomere vor [129, 131, 151]. Auch die Anzahl der an dem *coiled coil* beteiligten α -Helices kann stark variieren und eine Vielzahl von oligomeren Zuständen aufweisen [131, 147, 152, 153]. Aufgrund dieser großen Vielfalt an *coiled coils* in der Natur und insbesondere ihrer Eigenschaft zur spezifischen Bindung

aneinander sollte dieses Faltungsmotiv eine Stabilisierung der AtHNL durch gezielte Oligomerisierung ermöglichen.

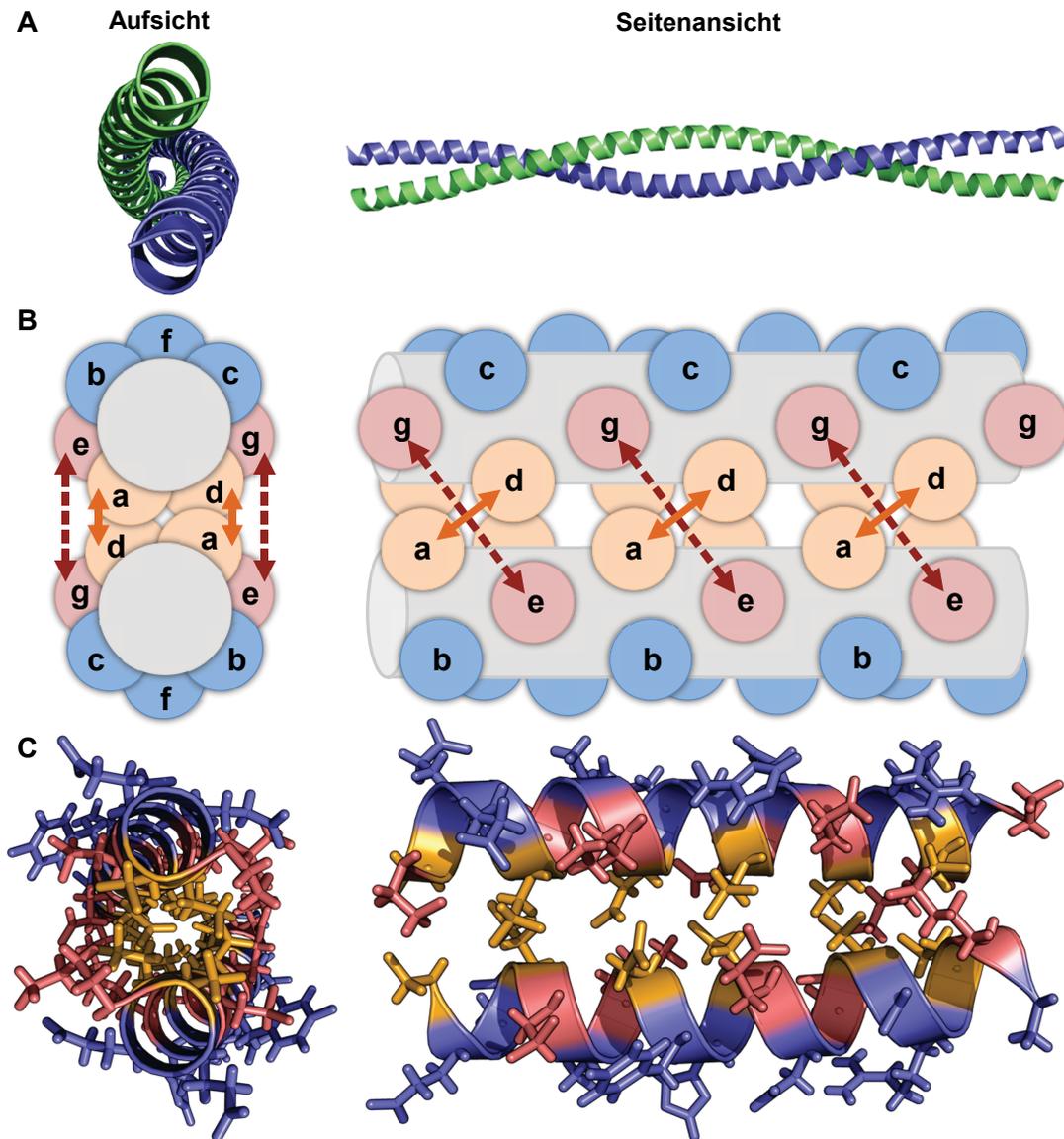


Abb. 8: Struktur und schematischer Aufbau von *coiled coils*. A) Zur Verdeutlichung der allgemeinen Struktur von *coiled coils* wurde eine 101 AS lange Variante dargestellt (PDB-ID: 1D7M [154]). Dabei ist besonders in der Seitenansicht die charakteristische superhelikale Struktur, bei der sich die einzelnen Stränge etwa alle 15 nm vollständig umeinander winden, erkennbar. B) Die Primärstruktur besteht aus einer sich wiederholenden Abfolge von sieben Aminosäuren, welche als Heptadenmuster bezeichnet und mit der Abfolge a-b-c-d-e-f-g beschrieben wird. Die Positionen a und d des Musters (orange Kreise) werden von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten besetzt. Diese bilden bei einer Zusammenlagerung mehrerer Stränge einen hydrophoben Kern (orange Pfeile), wobei die Reste so dicht gepackt werden, dass der Aufbau einem molekularen Klett- oder Reißverschluss ähnelt. Die superhelikale Struktur wird dadurch erzeugt, dass die hydrophoben Reste aufeinanderfolgender Wiederholungen des Musters nicht exakt untereinander positioniert sind. Zusätzlich können geladene Seitenketten an den Positionen e und g (rote Kreise) Salzbrücken (rote Pfeile) ausbilden und somit zur Stabilität des *coiled coils* beitragen. Die restlichen Positionen b, c und f (blaue Kreise) sind an die entsprechende Umgebung angepasst. Liegen die Reste beispielsweise exponiert vor, sind die Positionen hauptsächlich mit hydrophilen Aminosäuren besetzt. C) Die schematische Darstellung des Heptadenmusters wurde zur weiteren Verdeutlichung auf die Struktur der GCN4 Leucinzipper-Domäne (PDB-ID: 4DMD [155]) übertragen. Die Seitenketten wurden dem Schema entsprechend eingefärbt.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Stabilität von Biokatalysatoren spielt in der Industrie eine große Rolle bei der effizienten und ökonomischen Gestaltung verschiedener Prozesse. Daher sollte in dieser Arbeit als Kernaufgabe eine neue einfache Methode zur Stabilisierung von Biokatalysatoren etabliert werden. Als Modellenzym für die Durchführung der Experimente wurde die *AfHNL* ausgewählt, da sie in der Lage ist, industriell interessante enantiomerenreine Bausteine in Form von (*R*)-Cyanhydrinen zu produzieren, allerdings unter den für die Produktion notwendigen Bedingungen eine viel zu geringe Stabilität für eine sinnvolle industrielle Anwendung aufweist.

In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Fusionen der *AfHNL* mit FbFPs ein verändertes Oligomerisierungsverhalten und eine stark erhöhte Stabilität im schwach sauren pH-Bereich besitzen. Diese Veränderung der Eigenschaften könnte in den für die Fusionen verwendeten Linkern begründet liegen, welche in ihrem Ursprungprotein wahrscheinlich eine Dimerisierung durch Ausbildung eines *coiled coils* induzieren. Daher sollte in dieser Arbeit ein isoliertes *coiled coil* ausgewählt und dessen Einfluss auf die Eigenschaften der *AfHNL* in einer translationalen Fusion untersucht werden. Dabei sollte insbesondere die Stabilität des neuen Fusionsproteins gegenüber den für die Produktion von enantiomerenreinen Cyanhydrinen benötigten Bedingungen biochemisch charakterisiert werden. In weiteren Arbeiten sollte die Anwendung der *AfHNL* Fusion zur Synthese von enantiomerenreinen (*R*)-Cyanhydrinen getestet werden, wobei eine zusätzliche Immobilisierung des Biokatalysators in Betracht gezogen werden sollte, um eine Wiederverwendung des gereinigten Proteins zu ermöglichen und auf diese Weise die Ausbeute an Produkt pro mg Katalysator zu erhöhen.

Im Anschluss an diese Arbeiten sollte anhand weiterer Modellenzyme überprüft werden, ob die Fusion mit dem ausgewählten *coiled coil tag* als generelle Strategie zur Stabilisierung von Biokatalysatoren verwendet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Tab. 1: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.		
Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>)	Woodcock <i>et al.</i> , 1989 [156]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompThsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dem</i> (λ <i>Its857indI Sam7 nin5 P_{lacUV5}-</i> <i>T7gene1</i>)	Studier & Moffatt 1986 [157]

2.2 Plasmide

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.		
Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a	<i>ColE1 lacZ' Kan^R P_{T7} P_{lac}</i>	Merck Millipore
pETmPlum	762 bp <i>mPlum</i> PCR-Produkt <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a kloniert	M.Sc. Arbeit Martin Diener [158]
pEX-A	<i>pUC-ori Amp^R P_{lac}</i>	Eurofins Genomics
pEX-A-TDoT-Linker	234 bp Gensyntheseprodukt mittels Typ IIS Restriktion in pEX-A eingefügt	Eurofins Genomics
pTDoT-Linker	234 bp <i>NdeI/SalI</i> Restriktionsfragment aus pEX-A-TDoT-Linker in pET28a kloniert	Diese Arbeit
pET-nYFP-A θ HNL	1553 bp <i>overlap extension</i> PCR- Produkt <i>NdeI/NotI</i> in pET28a kloniert	Dissertation Kathrin Scholz [118]
pTDoT-Linker-A θ HNL	791 bp <i>athnI</i> PCR-Produkt aus pET- nYFP-A θ HNL <i>BamHI/NotI</i> in pTDoT- Linker kloniert	Diese Arbeit
pLinker-A θ HNL	25 bp <i>NdeI/NheI</i> Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT- Linker-A θ HNL kloniert	Diese Arbeit

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET-nYFP-BsLA	1305 bp <i>overlap extension</i> PCR-Produkt <i>NdeI/SalI</i> Fragment in pET28a kloniert	Dissertation Kathrin Scholz [118]
pTDoT-Linker-BsLA	569 bp <i>bsla</i> PCR-Produkt aus pET-nYFP-BsLA <i>BamHI/NotI</i> in pTDoT-Linker kloniert	Diese Arbeit
pLinker-BsLA	25 bp <i>NdeI/NheI</i> Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-BsLA kloniert	Diese Arbeit
pET22b_mYFP	726 bp PCR-Produkt <i>NdeI/XhoI</i> in pET22b kloniert. Austausch des für A206 kodierenden Kodons gegen K mittels ortsgerichteter Mutagenese (GCC nach AAA)	Benita Kopka unveröffentlicht
pTDoT-Linker-YFP	732 bp <i>yfp</i> PCR-Produkt aus pET22b_mYFP <i>BamHI/SalI</i> in pTDoT-Linker kloniert	Diese Arbeit
pLinker-YFP	25 bp <i>NdeI/NheI</i> Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-YFP kloniert	Diese Arbeit
pET19_MenD_NHis	1680 bp <i>NdeI/XhoI</i> Fragment in pET19b kloniert	Westphal <i>et al.</i> [159]
pTDoT-Linker-EcMenD	1683 bp <i>ecmend</i> PCR-Produkt aus pET19_MenD_NHis <i>BamHI/SalI</i> in pTDoT-Linker kloniert	Diese Arbeit
pLinker-EcMenD	25 bp <i>NdeI/NheI</i> Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-EcMenD kloniert	Diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide (Tab. 3) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn, Deutschland) in HPLC-gereinigter, lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen sterilem MilliQ Wasser aufgenommen, sodass sie in einer Konzentration von $100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ vorlagen. In den jeweiligen PCR-Ansätzen wurden die Oligonukleotide in einer Endkonzentration von $200 \text{ nmol } \mu\text{l}^{-1}$ verwendet.

Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und deren Verwendungszweck. Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.				
Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Verwendungszweck
1	<i>Bam</i> HI_ <i>Ath</i> NL_for	ATA TAT <u>GGA TCC</u> ATG GAG <u>AGG AAA</u> CAT CAC TTC G	60,4	Zusammen mit Oligonukleotid 2 Amplifizierung von <i>athn1</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>Ath</i> NL
2	<i>Ath</i> NL_oe_rev_neu	ATA TAT <u>GCG GCC</u> <u>GCT</u> TAC ATA TAA TCG GTG GCA ATA G	63,1	Zusammen mit Oligonukleotid 1 Amplifizierung von <i>athn1</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>Ath</i> NL
3	<i>Bam</i> HI_ <i>Bs</i> LA_for	ATA TAT <u>GGA TCC</u> GCT GAA CAC AAT CCA GTC GTT ATG	61,9	Zusammen mit Oligonukleotid 4 Amplifizierung von <i>bsla</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>Bs</i> LA
4	pET28_ <i>Sal</i> I_ <i>Not</i> I_rev	CTC GAG TGC <u>GGC</u> <u>CGC</u> AAG CTT <u>GTC</u> <u>GAC</u>	68,5	Zusammen mit Oligonukleotid 3 Amplifizierung von <i>bsla</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>Bs</i> LA
5	<i>Bam</i> HI_YFP_for	ATA TAT <u>GGA TCC</u> ATG GTG AGC AAG GGC GAG	62,8	Zusammen mit Oligonukleotid 6 Amplifizierung von <i>yfp</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker-YFP
6	YFP_stop_ <i>Sal</i> I_rev	ATA TAT <u>GTC GAC</u> TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G	60,2	Zusammen mit Oligonukleotid 5 Amplifizierung von <i>yfp</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker-YFP
7	<i>Bam</i> HI_ <i>Ec</i> MenD_for	ATA TAT <u>GGA TCC</u> ATG TCA GTA AGC GCA TTT AAC	58,5	Zusammen mit Oligonukleotid 8 Amplifizierung von <i>ecmend</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>Ec</i> MenD
8	<i>Ec</i> MenD_stop_ <i>Sal</i> I_rev	ATA TAT <u>GTC GAC</u> TCA TAA ATG GCT TAC CTG CG	59,5	Zusammen mit Oligonukleotid 7 Amplifizierung von <i>ecmend</i> mit angefügten <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I Schnittstellen zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>Ec</i> MenD
9	Minus_TDoT_for	TAT GAC TAG TAT TGA AGG CCG TG	54,1	Zusammenlagerung mit Oligonukleotid 10 zur Erstellung eines Fragments mit <i>Nde</i> I/ <i>Nhe</i> I Überhängen zur Klonierung der Kontrollkostrukte ohne <i>tdot</i> (2.6.3)
10	Minus_TDoT_rev	CTA GCA CGG CCT TCA ATA CTA GTC A	58,1	Zusammenlagerung mit Oligonukleotid 9 zur Erstellung eines Fragments mit <i>Nde</i> I/ <i>Nhe</i> I Überhängen zur Klonierung der Kontrollkostrukte ohne <i>tdot</i> (2.6.3)

2.4 Kultivierung von Bakterien

Alle Nährmedien wurden für mindestens 20 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: $\leq 0,22 \mu\text{m}$ Porendurchmesser) und anschließend dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur von unter 60 °C zugesetzt. Glukose- und Laktoselösung wurde separat autoklaviert und dem Medium nachträglich zugesetzt.

Um auf plasmidkodierte Resistenzen in *E. coli* zu selektieren, wurden die Medien mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

Tab. 4: Verwendete Antibiotika und ihre Endkonzentration in Nährmedien.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Kanamycin (Kan)	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$

2.4.1 Nährmedien

Flüssigmedien

LB-Medium (*lysogeny broth*) [160]

10	g l^{-1}	NaCl
10	g l^{-1}	Trypton
5	g l^{-1}	Hefeextrakt

Das LB-Medium wurde von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

TB-Medium (*terrific broth*) [160]

12	g l^{-1}	Caseinhydrolysat, enzymatisch verdaut
24	g l^{-1}	Hefeextrakt
9,4	g l^{-1}	K_2HPO_4
2,2	g l^{-1}	KH_2PO_4

Das TB-Medium wurde von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben vor dem Autoklavieren mit 4 ml Glycerin pro Liter Medium versetzt.

Autoinduktionsmedium [161]

890	ml	TB-Medium
100	ml	2 % (w/v) Lactose-Stammlösung
10	ml	5 % (w/v) Glucose-Stammlösung

Die einzelnen Komponenten des Autoinduktionsmediums wurden getrennt autoklaviert und erst kurz vor der Verwendung gemischt.

M9CA-Medium mit Glycerin

4	g l ⁻¹	Bacto Casamino Acids
6,8	g l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)
3	g l ⁻¹	KH ₂ PO ₄
0,5	g l ⁻¹	NaCl
1	g l ⁻¹	NH ₄ Cl

Vor der Verwendung wurden 0,2 % (v/v) Endvolumen einer 1 M MgSO₄ Lösung und 2 % (v/v) Endvolumen einer 400 g l⁻¹ Glycerin-Stammlösung zugegeben. Die drei Komponenten wurden getrennt autoklaviert und nach dem Mischen steril filtriert, um vor der Anwendung im Mikroskop größere Partikel zu entfernen.

Festmedien

Zur Herstellung von Agar-Platten wurden dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

2.4.2 Kultivierung von Flüssigkulturen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium (2.4.1). Dabei wurden Bakterien mit plasmidkodierten Antibiotika-resistenzen unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (Tab. 4). Kulturen bis zu

einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller inkubiert, während größere Kulturvolumina in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschtüttler angezogen wurden.

Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von Transformationsplatten und Hauptkulturen mit einer Vorkultur angeimpft.

2.4.3 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) zur Überexpression von Genen

Die erzeugten Genfusionen standen in dem verwendeten Expressionsvektor unter der Kontrolle des starken P_{T7} -Promotors, weshalb die Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt werden konnte. Dieser Stamm verfügt über das in sein Genom integrierte T7-RNA-Polymerase-Strukturgen, welches unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors P_{lacUV5} steht. Dadurch ist es möglich, die Expression des für die T7-RNA-Polymerase kodierenden Gens und zeitgleich die Expression des Zielgens unter der Kontrolle des Promotors P_{T7} durch Zugabe von Laktose bzw. dessen Analogon Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) zu induzieren.

Die Überexpression des Gens *tdot-linker-athnl* in *E. coli* BL21(DE3) wurde zu Testzwecken zuerst in drei je 25 ml Ansätzen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Alle Kulturen wurden mit einer Vorkultur (2.4.2) auf eine OD_{600nm} von 0,05 angeimpft und in allen Schritten unter Selektionsdruck auf einem Rundschtüttler bei 130 UpM kultiviert. Die erste Kultur wurde mit LB-Medium angesetzt, bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37 °C inkubiert, mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) induziert und für weitere 20 h bei 15 °C kultiviert. In der zweiten Kultur wurden dem LB-Medium zusätzlich 2 % (w/v) Glukose zugesetzt, die durch Katabolit-Repression einer vorzeitigen Induktion entgegenwirkt. Auch diese Kultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37 °C inkubiert und mit 1 mM IPTG induziert, gefolgt von einer 20-stündigen Inkubation bei 20 °C. Für die dritte Kultur wurde Autoinduktionsmedium (2.4.1) verwendet. Im ersten Schritt wurden die Bakterien bei 37 °C für 3 h angezogen, um anschließend bei 15 °C für 72 h zu wachsen und Protein zu produzieren. Da in dem Autoinduktionsmedium Glukose und Laktose enthalten sind, wird die Überexpression der Gene induziert, sobald die Glukose verbraucht ist und Laktose verstoffwechselt wird.

Als Negativkontrolle wurde unter jeder Bedingung eine Kultur mit *E. coli* BL21(DE3) angesetzt, die den Leervektor pET28a enthielten. Als weitere Kontrolle der

Expression wurde eine LB-Kultur mit *E. coli* BL21(DE3), welche mit pETmPlum transformiert waren, vorbereitet. Diese sollte zeigen, ob die verwendeten Zellen in der Lage sind, heterologes Protein zu produzieren, da mPlum als Fluoreszenzreporter eine Farbe besitzt und somit leicht auch ohne Zellaufschluss zu identifizieren ist.

Von jeder der Kulturen wurde ein kleines Volumen für den Zellaufschluss (2.10.1) verwendet und die Proteinzusammensetzung der Proben mittels SDS-PAGE (2.10.5) analysiert.

Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) zur Überexpression von Genen und Produktion von KatIBs in großem Kulturvolumen von jeweils 500 ml erfolgte analog zur beschriebenen Induktion mittels Autoinduktionsmedium.

2.5 Nukleinsäureisolierungen und -reinigungen

2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Kulturvolumen bis 5 ml wurde das „innuPREP Plasmid Mini Kit“ von Analytik Jena (Jena, Deutschland) verwendet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl Millipore-Wasser eluiert. Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 25 ml Kulturen angezogen und das Kit entsprechend fünf Mal mit je 5 ml Kultur verwendet.

2.5.2 PCR-Produktreinigung

Die Reinigung von PCR-Produkten (2.8) erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung (2.9) mit anschließender Gelextraktion des über die Größe identifizierten PCR-Produktes. Die Extraktion wurde nach Herstellerangaben mit dem „PCRExtract Mini Kit“ der Firma 5 Prime (Hilden, Deutschland) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

2.6 *In vitro*-Rekombination von DNA

2.6.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Eine Menge von 5 µg DNA wurde mit 1 - 2 Einheiten (Units, U) der jeweiligen Restriktionsendonuklease unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen 2 - 16 h bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation erfolgt eine hydrolytische Spaltung an einer, für jedes Enzym spezifischen, Erkennungssequenz in der DNA. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.9).

Um Restriktionsendonukleasen vor Ligationsreaktionen (2.6.2) aus den Ansätzen zu entfernen, wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und eine Gelextraktion nach Herstellerangaben mit dem „PCRExtract Mini Kit“ der Firma 5 Prime (Hilden, Deutschland) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysierter Vektor-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Unter Hydrolyse von ATP katalysiert die Ligase die kovalente Verknüpfung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden sowohl zwischen kompatiblen, überhängenden (*sticky-ends*) als auch zwischen glatten Enden (*blunt-ends*) doppelsträngiger DNA-Moleküle. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl bis 20 µl wurden die Fragment-DNA (*insert*) und die geöffnete Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Ein Ansatz mit Wasser anstelle der *insert*-DNA diente als Kontrolle. Nach Zugabe des vom Hersteller mitgelieferten T4-DNA-Ligasepuffers und 1 U T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) wurden die Ansätze für 30 bis 60 min bei RT inkubiert. Zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen (2.7.2) wurden anschließend 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.6.3 Generierung von kurzen DNA-Fragmenten zur Ligation

Mittels entsprechendem Design von kurzen Oligonukleotiden können kurze DNA-Fragmente generiert und für eine spätere Ligation verwendet werden. Dabei werden die Oligonukleotide nur zu einem Teil komplementär zueinander erstellt, sodass nach Anlagerung der Einzelstränge Überhänge an den Enden produziert werden, die zu den Überhängen nach einer Behandlung mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (2.6.1) passen.

Für die Generierung der DNA-Fragmente wurden je 1 µg der Oligonukleotide mit 5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) vermischt, der Ansatz mit sterilem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und 10 min bei 85 °C in dem PCR-Gerät „TProfessional Basic Gradient“ der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur im PCR-Gerät langsam auf 10 °C abgesenkt (75 Zyklen mit je 20 s und 1 °C pro Zyklus weniger). Während des Abkühlens lagern sich die komplementären DNA-Einzelstränge zu einem DNA-Doppelstrang mit den entsprechenden Überhängen zusammen. Für die Ligation (2.6.2) der DNA-Fragmente in ein entsprechend hydrolysiertes Plasmid wurden 2 µl des Ansatzes verwendet.

2.7 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

2.7.1 Herstellung von chemisch transformationskompetenten *E. coli* Zellen

Die Herstellung von chemisch transformationskompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach Hanahan *et al.* [162]. Dabei wurde LB-Medium (2.4.1) mit 0,02 Volumen Mg²⁺-Mix versetzt und auf eine Zelldichte entsprechend einer OD_{600nm} von 0,05 mit einer *E. coli* Vorkultur angeimpft. Bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0,5 - 0,7) wurde die Kultur bei 37 °C auf einem Rundschtüttler (120 UpM) angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 4.610 g, Tischzentrifuge, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet im Ausgangsvolumen eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min, 2.915 g, Tischzentrifuge, 4 °C) wurde das Pellet in 0,08 Volumen eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen, mit 0,02 Volumen sterilem Glycerin (Endkonzentration von 20 %

(v/v)) versetzt und in Aliquots von 200 µl auf Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Ansätze wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Transformationspuffer (TMF-Puffer):

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

Mg²⁺-Mix:

500	mM	MgCl ₂
500	mM	MgSO ₄

2.7.2 Transformation von *E. coli* Zellen

Für eine Transformation [162] wurden 100 µl transformationskompetente *E. coli* Zellen (2.7.1) auf Eis aufgetaut, mit ca. 100 ng isolierter Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz (2.6.2) vermischt, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s ausgesetzt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium (2.4.1) folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C, bei der die entsprechende plasmidkodierte Antibiotikaresistenz ausgeprägt wird. 100 µl wurden direkt auf LB-Agarplatten (2.4.1), die ein entsprechendes Antibiotikum (2.4) zur Selektion der transformierten Bakterien enthielten, ausplattiert. Im Falle eines Ligationsansatzes wurden die restlichen Zellen abzentrifugiert (1 min, 18.890 g, 4 °C), der Überstand bis auf 100 µl verworfen, das Pellet resuspendiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion [163] werden *in vitro* DNA-Bereiche aus einem Gemisch von DNA-Molekülen selektiv amplifiziert. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, DNA als Vorlage, zwei kurze Oligonukleotide, die am 5'- und 3'-

Ende komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind, sowie DNA-Polymerasepuffer und ein Nukleotid-Mix benötigt.

Das Prinzip der PCR beruht auf Wiederholung von drei Schritten. Zuerst wird die DNA-Matrize denaturiert, während sich im nächsten Schritt, der Hybridisierung, die Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen anlagern. Im dritten Schritt, der Elongation, verlängert die DNA-Polymerase die an die DNA gebundenen Oligonukleotide und kopiert auf diese Weise die Matrize. Innerhalb von einem Zyklus wird dabei die DNA verdoppelt, weil die Hybridisierung an beiden Strängen der DNA-Matrize erfolgen kann. Nach durchschnittlich 20 bis 30 Zyklen können ausreichende Mengen der gewünschten DNA aus dem PCR-Ansatz isoliert werden (2.5.2). Zur Amplifizierung wurde Pfu-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

Als Erweiterung der Standard PCR Methode wurde eine *touchdown* PCR-Methode [164] angewandt. Dabei wird die Hybridisierungstemperatur höher gewählt als normalerweise und mit jedem Zyklus um 1 °C abgesenkt. Dabei nähert sich die Temperatur der optimalen Hybridisierungstemperatur an, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nachdem genügend spezifisches Produkt gebildet wurde, können spätere Zyklen mit einer niedrigeren Temperatur durchgeführt werden.

Da die flankierenden Primer auf eine Weise erstellt wurden, dass Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen vorhanden sind, kann das erhaltene Produkt an die entsprechende Stelle in einem Plasmid mittels Restriktion (2.6.1) und Ligation (2.6.2) kloniert werden

Tab. 5: PCR-Programm zur Durchführung einer <i>touchdown</i> PCR			
Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Wiederholungen
vollständige Denaturierung	98	5	1
Denaturierung	98	0,75	15
Hybridisierung	68 (-1 °C pro Zyklus)	1	
Elongation	72	2	
Denaturierung	98	0,75	10
Hybridisierung	54	1	
Elongation	72	2	
finale Elongation	72	4	1
Beispielprogramm zur Amplifizierung des 791 bp <i>athn1</i> Fragments zur Klonierung von pTDoT-Linker- <i>AtHNL</i> (2.2, Tab. 2) unter Verwendung der Oligonukleotide 1 und 2 (2.3, Tab. 3) und der Pfu-Polymerase (500 bp min ⁻¹).			

Die Starttemperatur während des Hybridisierungsschrittes wurde für eine *touchdown* PCR auf 5 °C über der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide (2.3, Tab. 3) gesetzt.

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und damit von der Geschwindigkeit der eingesetzten Polymerase.

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert (2.9).

2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Trennverfahren, welches auf den unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht. Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats eine negative Ladung und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit hängt dabei vom Molekulargewicht der DNA-Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Felds ab. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen (2.6.1) und PCR-Ansätzen (2.8) angewendet. Für die Agarosegelmatrix wurde eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in 0,5x TBE-Puffer verwendet. Dem Gel wurde zur Färbung der DNA pro ml der aufgekochten Agarose-Lösung 0,1 µl Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt. Den Proben wurden vor dem Auftragen 0,1 Volumen 10x DNA-Probenpuffer hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 130 V in 0,5x TBE-Puffer. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach der Elektrophorese durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254 - 366$ nm). Das dem Gel zugegebene Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und bei UV-Bestrahlung Licht im sichtbaren Bereich ($\lambda = 590$ nm) emittiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte mithilfe einer Videodokumentationsanlage (EagleEye II, Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

TBE-Puffer (pH 8.3):

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

DNA-Probenpuffer (10 x):

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

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

DNA-Molekulargewichtsstandard:

„GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)

0,25; 0,5; 0,75; **1**; 1,5; 2; 2,5; **3**; 3,5; 4; 5; **6**; 8; 10 kb

2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration einer DNA-Probe in einem Agarosegel wurde anhand einer Bande des Molekulargewichtsstandards (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) abgeschätzt. Die Banden enthalten eine vom Hersteller definierte Menge an DNA.

2.10 Proteinchemische Methoden

2.10.1 Zellaufschluss

Die Zellen einer Überexpression (2.4.3) wurden durch Zentrifugation (30 min, 6750 *g*, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit entsprechendem Zellaufschlusspuffer resuspendiert (10 %ige Zellsuspension (w/v)). Anschließend wurden kleine Volumina (bis 10 ml) Zellsuspension mittels Ultraschall (3 x 2 min, 60 *cycles*, 50 % Leistung, Bandelin Sonopuls von BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland) und große Volumina (ab 10 ml) mittels FRENCH® Press (drei Durchgänge, *high*, 1000 Psi \equiv 1100 bar Zellinnendruck, 40K Cell, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) aufgeschlossen. Im Falle der Ultraschallbehandlung wurden die Proben zwischen den Durchgängen für mindestens 2 min auf

Eis gekühlt. Nicht lösliche Bestandteile wurden von den löslichen durch Zentrifugation getrennt (15.000 g, 20 min, 4 °C). Der Proteingehalt der löslichen und der unlöslichen Fraktion wurde mittels SDS-PAGE Analyse (2.10.5) überprüft und deren Aktivität mit den entsprechenden Assays (2.10.6, 2.10.8, 2.10.8, 2.10.10) ermittelt.

Zellaufschlusspuffer:

***At*HNL, *Bs*LA und YFP:**

50	mM	Natriumphosphat-Puffer pH 8
100	mM	NaCl

***Ec*MenD:**

50	mM	Triethanolamin-Puffer (TEA) pH 8
2	mM	MgSO ₄
0,1	mM	Thiamindiphosphat (ThDP)

2.10.2 Isolierung von KatIBs

Zur Präparation von KatIBs wurden dem Zellaufschluss (2.10.1) zwei zusätzliche Schritte hinzugefügt, um eine möglichst hohe Effizienz des Vorgangs zu gewährleisten. Dabei wurde die 10 %ige Zellsuspension vor dem Zellaufschluss und das im Anschluss gewonnene Ganzzellextrakt jeweils über Nacht bei -80 °C eingefroren und bei RT aufgetaut. Dieser Zusatz ist nötig, da ohne effizienten Zellaufschluss bei der Isolierung der KatIBs ebenfalls intakte Zellen abzentrifugiert werden. Das aufgetaute Extrakt wurde zentrifugiert (15.000 g, 20 min, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet im Ausgangsvolumen des entsprechenden Puffers (2.10.1) resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (15.000 g, 20 min, 4 °C). Dieser Waschschrift bestehend aus Resuspendieren und Zentrifugieren wurde insgesamt viermal mit den für die jeweiligen Proteine geeigneten Puffern durchgeführt. Im Falle der *At*HNL-KatIBs wurde für die letzten zwei Waschschriffe 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 verwendet, um die Nebenreaktion während der Mandelonitril-Synthese zu verringern. Alle erhaltenen Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt mittels SDS-PAGE überprüft (2.10.5). Die isolierten KatIBs wurden entweder lyophilisiert (2.10.3) oder in Spritzen gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10.3 Lyophilisierung von KatIBs

Vor der Lyophilisierung wurde eine 10 %ige (w/v) KatIB-Suspension in MilliQ Wasser hergestellt. Diese wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht bei -80 °C gelagert. Die anschließende Lyophilisierung erfolgte in einer Lyovac GT2 Gefriertrocknungsanlage (SRK Systemtechnik, Riedstadt-Goddelau, Deutschland) über einen Zeitraum von 48 h.

2.10.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.10.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgte nach Bradford [165] mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard. Das Bradford-Reagenz wurde vor Licht geschützt über Nacht gerührt, anschließend filtriert und abgedunkelt bei RT aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden in einer Küvette 100 µl Probe mit 900 µl Bradford-Reagenz vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Als Referenz dienten 900 µl Bradford-Reagenz mit 100 µl des entsprechenden Puffers. Die Konzentration des entstandenen Protein-Farbstoffkomplexes wurde spektrophotometrisch bei 595 nm bestimmt (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland). Anhand einer Kalibrierung mit bekannten Konzentrationen von BSA wurde der Proteingehalt der Proben errechnet.

Bradford-Reagenz:

100	mg	Coomassie-Brillant-Blau G250
100	ml	85 % (v/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure
50	ml	Ethanol (abs.)
ad 1000	ml	MilliQ Wasser

2.10.4.1.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bonde

Zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen in Immobilisaten bzw. KatIBs wurde unter anderem ein nach Bonde *et al.* [166] modifizierter Bradford-Assay verwendet. Dabei wird nicht die Absorption des entstandenen Protein-Farbstoffkomplexes bei 595 nm ermittelt, sondern die Absorption bei 465 nm des ungebundenen Coomassie-Farbstoffs. Hierbei wurden 100 µl der IB Suspension mit 900 µl des Bradford-Reagenz (2.10.4.1) in einem Reaktionsgefäß gemischt und unter gelegentlichem Invertieren für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert (18.890 g, 1 min, RT), 700 µl Überstand in eine Küvette überführt und die Absorption bei 465 nm bestimmt. Über eine erstellte Kalibrierungsgerade mit bekannten Mengen BSA wurde der Proteingehalt der Proben errechnet.

2.10.4.2 Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm

In Proteinen absorbieren insbesondere aromatische Aminosäurereste Licht der Wellenlänge 280 nm. Durch diese Eigenschaft lässt sich die Konzentration von gereinigten Proteinlösungen bestimmen, wobei der Extinktionskoeffizient des entsprechenden Proteins bei 280 nm benötigt wird. Dieser lässt sich theoretisch mithilfe des Internettools ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam>) aus der Aminosäuresequenz des Proteins ermitteln. Aus der Absorption bei 280 nm und dem Extinktionskoeffizienten des Proteins lässt sich über das Lambert-Beersche Gesetz die Proteinkonzentration berechnen.

Lambert-Beersches Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$

E: Absorption

ϵ : Extinktionskoeffizient [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

c: Konzentration [$mol \cdot l^{-1}$]

d: Schichtdicke [cm]

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in KatIB-Suspensionen kann ebenfalls die Absorption bei 280 nm verwendet werden. Allerdings muss dazu erst eine Probe der

Suspension in 6 M Guanidinhydrochlorid für 20 min bei 30 °C denaturiert werden. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert (18.890 g, 20 min, RT), ggf. in 6 M Guanidinhydrochlorid verdünnt und die Absorption bei 280 nm photometrisch bestimmt (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland). Als Leerwert diente hierbei eine Messung mit 6 M Guanidinhydrochlorid Lösung.

Tab. 6: Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Fusionsproteine nach Denaturierung	
Protein	Extinktionskoeffizient [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
TDoT-Linker-AtHNL (AtHNL-KatIBs)	34505
TDoT-Linker-EcMenD (EcMenD-KatIBs)	110265
TDoT-Linker-YFP (YFP-IBs)	26360
TDoT-Linker-BsLA (BsLA-KatIBs)	27390

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

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte nach einem Protokoll von Laemmli [167] unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. So wurden die Proteine während der Elektrophorese auf Grund ihres ähnlichen Masse/Ladungsverhältnisses nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Proteine wurden in einem Sammelgel fokussiert und anschließend in einem Trenngel ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 98 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Im Falle von selbst gegossenen Gelen (Tab. 7) wurde die Elektrophorese in einer vertikalen Gelapparatur „Mini-PROTEAN Gelkammer II“ (BioRad) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurde, während sich die Proben im Sammelgel befanden, eine Spannung von 120 V angelegt, welche beim Übertritt der Proben ins Trenngel auf 180 V erhöht wurde. Für kommerziell erhältliche NuPAGE® Novex® 4 - 12 % Bis-Tris Gradientengele (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde für die Elektrophorese eine „XCell SureLock® Mini“ Kammer verwendet. Hierbei wurde MES-Laufpuffer und eine konstante Spannung von 150 V zur elektrophoretischen Auftrennung genutzt.

SDS-Probenpuffer (5x):

225	mM	Tris-HCl, pH 6,8
250	mM	Dithiothreitol
50	% (v/v)	Glycerin
5	% (v/v)	SDS
0,05	% (w/v)	Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8):

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

MES-Laufpuffer (pH 7,3):

50	mM	MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)
50	mM	Tris-Base
0,1	% (w/v)	SDS
1	mM	EDTA

Molekulargewichtsstandards:

PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland):

10; 15; 25; 35; 40; 55; 70; 100; 130; 170 kDa (12 % Tris-Glycin Gel)

10; 15; 25; 30; 40; 50; 70; 80; 115; 140 kDa (4 - 12 % Bis-Tris Gradientengel)

Tab. 7: Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelen. Die Mengenangaben gelten für zwei Gele.

Lösungen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))	0,83 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,3 ml	-
MilliQ Wasser	2,8 ml	3,4 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.10.5.1 Kolloidal Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS-Gelen in kolloidaler Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung erfolgte im Anschluss an die Elektrophorese bei RT nach Candiano *et al.* [168]. Das Gel wurde über Nacht in der Färbungslösung schüttelnd inkubiert und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Dokumentation der Gele erfolgte mithilfe der Videodokumentationsanlage Stella (Raytest, Straubenhardt, Deutschland).

Färbungslösung:

0,12	% (w/v)	Coomassie-Brillant-Blau G250
10	% (v/v)	85 % <i>ortho</i> -Phosphorsäure
10	% (w/v)	Ammoniumsulfat
20	% (v/v)	Methanol

2.10.6 Messung von HNL-Aktivität mittels Mandelonitril-Spaltungsassay

Zur Messung der HNL-Aktivität wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay [169] verwendet. Dabei wird racemisches Mandelonitril als Substrat eingesetzt, wobei im Fall der *A*tHNL das (*R*)-Enantiomer zu Blausäure (HCN) und Benzaldehyd gespalten wird (Abb. 9).

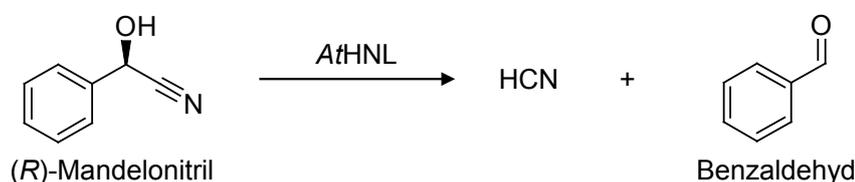


Abb. 9: Die zur Charakterisierung der *A*tHNL verwendete Reaktion. Bei dem Mandelonitril-Spaltungsassay wird racemisches Mandelonitril eingesetzt, wobei die *A*tHNL als (*R*)-selektives Enzym lediglich das (*R*)-Enantiomer zu HCN und Benzaldehyd umsetzen kann. Dabei ermöglicht die Zunahme der Absorption des freigesetzten Benzaldehyds (280 nm) eine spektrophotometrische Verfolgung der ablaufenden Reaktion und somit eine Ermittlung der Aktivität der *A*tHNL.

Die Zunahme von Benzaldehyd kann photometrisch (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durch Zunahme der Absorption bei 280 nm verfolgt werden. Alle Messungen wurden in 1 cm Quarzküvetten bei 25 °C in einem Endvolumen von 1 ml durchgeführt. Zum Starten der Reaktion wurden 800 µl HNL-Assaypuffer mit dem gewünschten pH-Wert und enthaltenem Enzym mit 200 µl

Mandelonitril-Stammlösung gemischt (13,4 mM Mandelonitril Endkonzentration). Eine Messung mit Puffer statt Enzym diente zur Ermittlung der nicht enzymatischen Hintergrundreaktion und wurde von den entsprechenden Messwerten subtrahiert. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Im Anschluss wurde die enzymatische Aktivität unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1,376 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) errechnet. Eine Unit (U) HNL-Aktivität ist dabei definiert als die Menge Enzym, die 1 μmol (*R*)-Mandelonitril pro Minute unter den beschriebenen Bedingungen bei 25 °C umsetzt. Das zur Aktivitätsbestimmung der gereinigten wildtypischen *At*HNL (3.5) verwendete Lyophilisat wurde von Frau Aischarya Brahma (IBG-1: Biotechnologie; Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{(\Delta A/\text{min}_{\text{Probe}} - \Delta A/\text{min}_{\text{Leerwert}}) \times \text{Küvettenvolumen [ml]}}{\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}} \times \text{Probenvolumen [ml]} \times \text{Schichtdicke [cm]}} \times f$$

$\Delta A/\text{min}$	Zunahme der Absorption bei 280 nm (min^{-1})
$\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}}$	Extinktionskoeffizient von Benzaldehyd bei 280 nm (1,376 Liter $\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
f	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

Aufgrund von hohen Partikeldichten und daraus resultierendem Streulicht musste der Assay für die Bestimmung von Aktivitäten von unlöslichem Enzym, wie *At*HNL-KatIBs, modifiziert werden, um eine Endpunkt-basierte Messung zu ermöglichen (etabliert von Benita Kopka, Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, unveröffentlicht). Da die Partikel schnell absinken, mussten alle Reaktionsgefäße während Inkubationen in einem Thermomixer stark geschüttelt werden (1.000 UpM). Das unlösliche Enzym wurde vor der Verwendung in HNL-Assaypuffer (siehe unten) resuspendiert, ggf. verdünnt und bei 25 °C inkubiert. 100 μl dieser Suspension wurden in ein neues Reaktionsgefäß mit 700 μl enthaltenem HNL-Assaypuffer überführt und die Reaktion umgehend durch Zugabe von 200 μl Mandelonitril-Stammlösung gestartet. Nach 2 min wurde der Reaktionsansatz für 1 min zentrifugiert (18.890 g, RT) und der Überstand direkt zur Bestimmung der Absorption bei 280 nm verwendet. Der auf diese Weise gemessene Wert entspricht der Menge an freigesetztem Benzaldehyd während der gesamten Reaktionszeit von 3 min (Inkubation und Zentrifugation). Um die nicht enzymatische Hintergrundreaktion zu bestimmen und von dem Messwert abziehen zu können,

wurde eine Kontrolle, mit entsprechendem Puffer statt unlöslichem Protein, auf dieselbe Weise analysiert. Da das Mandelonitril bereits in der Stammlösung langsam zerfällt, muss diese Kontrolle zeitaufgelöst parallel zu den Aktivitätsmessungen bestimmt werden, damit aus der erhaltenen Geradengleichung ein definierter Kontrollwert zu dem entsprechenden Aktivitätsmesspunkt ermittelt und subtrahiert werden kann ($A_{\text{Korrektur}}$). Als letztes muss sichergestellt werden, dass während der Inkubationen kein Protein in Lösung geht und somit die Absorptionsmessung bei 280 nm verfälscht. Dazu wird resuspendiertes unlösliches Protein unter Reaktionsbedingungen ohne Substrat inkubiert ($A_{\text{Probe ohne Substrat}}$). Sollte sich der erhaltene Wert von einer Messung der Küvette nur mit dem entsprechend zusammengesetzten Puffer ohne Enzym und Substrat unterscheiden, muss der Aktivitätsmesspunkt korrigiert werden. Unter Berücksichtigung aller Kontrollen kann die enzymatische Aktivität aus der Absorption mittels des molaren Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd berechnet werden.

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Probe ohne Substrat}} - A_{\text{Korrektur}}) \times \text{Küvettenvolumen [ml]}}{\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}} \times \text{Probenvolumen [ml]} \times \text{Schichtdicke [cm]} \times \text{Reaktionsdauer [min]}} \times f$$

A	Absorption bei 280 nm
$A_{\text{Korrektur}}$	Absorption durch nicht enzymatischen Zerfall in der Stammlösung
$A_{\text{Probe ohne Substrat}}$	Absorption inkubierte Enzymprobe ohne Substrat
$\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}}$	Extinktionskoeffizient von Benzaldehyd bei 280 nm ($1,376 \text{ Liter mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
f	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

HNL-Assaypuffer

50 mM Natrium-Acetat-Puffer (pH 3,5 bis 5,5)

Der pH-Wert des Puffers wurde durch Mischen von 50 mM Natriumacetat und 50 mM Essigsäure Lösungen auf den gewünschten Wert eingestellt. Für direkte Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde pH 5,5 genutzt, während für die pH-Stabilitäten (2.10.6.2) und die Ermittlung des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität (2.10.6.1) entsprechend niedrigere pH-Werte verwendet wurden.

Mandelonitril-Stammlösung

67	mM	Mandelonitril
50	mM	Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,5

2.10.6.1 Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität von *AfHNL*-KatIBs

Zur Messung von pH-abhängigen Aktivitäten von *AfHNL*-KatIBs im Bereich von pH 3,5 bis pH 5 wurde der Endpunkt-basierte Mandelonitril-Spaltungsassay verwendet (2.10.6). Für alle Messungen wurde eine *AfHNL*-KatIB-Suspension in HNL-Assaypuffer pH 5,5 hergestellt und soweit mit demselben Puffer verdünnt, dass die Absorption bei 280 nm, nach der Inkubation in pH 5,0 und der folgenden Reaktion, einem Wert von 0,9 entsprach. Die *AfHNL*-KatIB-Suspension wurde dabei mindestens 20-fach mit dem HNL-Assaypuffer des entsprechenden pH-Werts verdünnt und für 5 min bei 25 °C und 1.000 UpM inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der Mandelonitril-Stammlösung gestartet. Die entsprechenden Kontrollen (2.10.6) wurden zur Bestimmung der Aktivität einbezogen und alle Messungen in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die für den Vergleich zur wildtypischen *AfHNL* verwendeten Werte wurden von Frau Benita Kopka (Dissertation, Institut für Molekulare Enzymtechnologie; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, unveröffentlicht) bestimmt.

2.10.6.2 Ermittlung der pH-Stabilität von *AfHNL*-KatIBs

Die benötigte *AfHNL*-KatIB-Suspension in HNL-Assaypuffer pH 5,5 wurde für jeden der getesteten pH-Werte neu angesetzt. Dabei wurde die Anfangsaktivität so eingestellt, dass nach Inkubation in HNL-Assaypuffer des entsprechenden pH-Werts (pH 3,5 bis pH 4,5) und anschließender Reaktion die Absorption bei 280 nm einem Wert zwischen 0,7 und 0,9 entsprach. Für den Inkubationsschritt wurde die Suspension mindesten 20-fach in den auf pH 3,5, pH 3,75, pH 4,0, pH 4,25 oder pH 4,5 eingestellten HNL-Assaypuffer verdünnt. Anschließend wurden die Proben bis zu 24 h bei 25 °C und 1.000 UpM inkubiert. Während dieser Zeit wurden in bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen und die Restaktivität mittels des Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays (2.10.6) analysiert. Alle Messun-

gen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) wurden durch Anpassung der experimentellen Daten an eine Exponentialfunktion erster Ordnung ermittelt.

2.10.7 Verwendung von AtHNL-KatIBs zur Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen

In einem fest verschließbaren Glasgefäß mit Septum und Magnetrührstäbchen wurden die AtHNL-KatIBs vorgelegt, mit Argon begast und anschließend die Reaktion gestartet. Dafür wurden 1 ml 2 M HCN/Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) Lösung, 0,1 mmol Dodecan als interner Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM Endkonzentration) zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT unter konstantem Rühren für mindestens 1 h verfolgt, wobei zu definierten Zeiten Proben aus der Reaktion entnommen und für die Analyse mittels chiraler Gaschromatographie (GC) vorbereitet wurden. Dazu wurden 20 μ l Probe mit 1,5 ml Dichlormethan, 40 μ l Pyridin und 40 μ l Ethylacetat gemischt. Die letzten beiden Komponenten dienen der Derivatisierung, bei der die Reaktionsprodukte acyliert und in flüchtigere Stoffe für eine Trennung der (*R*)- und (*S*)-Enantiomere umgewandelt werden. Zur chromatographischen Trennung wurde ein Agilent 6890N Network GC-System mit Flammenionisationsdetektor (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) ausgerüstet mit einer CP-Chirasil-Dex CB Säule (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) und Wasserstoff als Trägergas verwendet. Der Umsatz wurde durch den Verbrauch der entsprechenden Substrate anhand von relativen Peakflächen berechnet. Aus dem Verhältnis der relativen Peakflächen der Reaktionsprodukte wurde weiterhin der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) ermittelt.

Zur Ermittlung eines Substratspektrums wurden zusätzlich zu Benzaldehyd die Aldehyde 2-Chlorbenzaldehyd, 2-Furaldehyd und Hexanal getestet. Dabei wurden je Substrat 150 mg AtHNL-KatIBs präpariert (2.10.7.4.2), aus dem Nylonbeutel entnommen und in die Synthesereaktion eingesetzt.

Tab. 8: Gaschromatographie-Programme zur Trennung verschiedener Produkte (Angabe sind die Namen der entsprechenden Substrate)

	Benzaldehyd und 2-Furaldehyd	Hexanal	2-Chlorbenzaldehyd
Start	120 °C; 3 min	70 °C; 6 min	110 °C; 5 min
Gradient	15 °C pro min bis 200 °C	15 °C pro min bis 200 °C	5 °C pro min bis 140 °C
Halten	200 °C; 1 min	200 °C; 1 min	140 °C; 5 min
Gradient	-	-	15 °C pro min bis 180 °C
Halten	-	-	180 °C; 1 min

2.10.7.1 Herstellung von 2 M HCN/MTBE-Lösung

Zur Herstellung von 2 M HCN/MTBE-Lösung [114] wurde 0,1 mol Natriumcyanid (4,9 g), 10 ml vollentsalztes Wasser und 25 ml MTBE in einem dicht verschlossenen 100 ml Rundkolben gemischt und unter konstantem Rühren für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 ml 30 % HCl Lösung mittels eines Tropftrichters langsam im Verlauf von 15 min zugegeben, sodass das HCN in Lösung ging. Im nächsten Schritt wurde das Eis entfernt und die Lösung langsam auf RT erwärmt. Mittels eines Scheidetrichters wurde die organische von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend noch zweimal mit je 5 ml MTBE gewaschen, um weiteres HCN aus der Lösung zu extrahieren. Die organischen HCN-haltigen Phasen wurden gesammelt und in 100 ml dicht verschließbaren Braunglasflaschen über 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 in Dunkelheit gelagert.

Die 2 M HCN/MTBE-Lösung und alle bei der Herstellung entstehenden Abfälle sind **hochgradig giftig!** Daher muss bei der Herstellung sehr vorsichtig gearbeitet werden und alle Gefäße und Abfälle im Anschluss an die Arbeit mit Natriumhypochlorid oxidiert werden. Dabei wird das HCN in ungiftigen Stickstoff und CO₂ umgewandelt. Trotz der Behandlung wurden die Abfälle nach der Oxidation gesondert entsorgt.

2.10.7.2 Test der Rückhaltung von *AfHNL*-KatIBs durch eine Nylonmembran

Für spätere Recyclingexperimente sollte eine Nylonmembran mit einer Porengröße von 40 µm in einem sog. Teebeutelansatz verwendet werden. Allerdings sind *AfHNL*-KatIBs mit einer Größe von 200 bis 500 nm deutlich kleiner als die Poren der

Membran. Ob die Membran dennoch in der Lage ist, die *AfHNL*-KatIBs im Inneren eines Beutels zurückzuhalten, sollte in einem Experiment überprüft werden. Dazu wurde ein Nylonbeutel mit 300 mg nassen *AfHNL*-KatIBs befüllt und mithilfe eines Drahtes so an dem Septum des Reaktionsgefäßes befestigt, dass der Beutel in die Reaktionslösung eintaucht, aber jeder Zeit durch Ziehen an dem Draht entfernt werden kann. Nach dem Start der Synthesereaktion (2.10.7) wurden Proben über einen Zeitraum von 15 min entnommen und anschließend der Nylonbeutel aus der Reaktion entfernt. Über die folgenden 45 min (60 min Gesamtreaktionszeit) wurden weitere Proben entnommen, um sicherzustellen, dass ohne den eingetauchten Beutel keine Reaktion stattfindet. Im Anschluss wurde der eingeschlossene Katalysator wieder abgesenkt und die Reaktion dadurch erneut gestartet. Drei zusätzliche Proben in den folgenden 30 min (90 min Gesamtreaktionszeit) wurden zur Kontrolle des weiteren Reaktionsverlaufs entnommen.

2.10.7.3 Recycling von *AfHNL*-KatIBs

Für die ersten Recyclingexperimente wurden 500 mg *AfHNL*-KatIBs in einen lösungsmittelresistenten Nylonbeutel (Porengröße 40 μm) eingeschweißt und in die erste Synthesereaktion (2.10.7) eingesetzt. Anschließend wurde der Beutel für 5 min in 20 ml trockenem MTBE (getrocknet mit MgSO_4) gewaschen bevor er in die nächste Reaktion eingesetzt wurde. Auf diese Weise wurden insgesamt vier aufeinanderfolgende Reaktionen mit dem Waschschrift zwischendurch durchgeführt. Aufgrund von erhöhten Aktivitäten durch zusätzliche Behandlung (2.10.7.4.2) der *AfHNL*-KatIBs konnte die eingesetzte Menge auf 150 mg reduziert werden. In dem finalen Recyclingexperiment (unter optimierten Bedingungen) wurde darüber hinaus auch das Lösungsmittelvolumen beim Waschen auf 1 ml MTBE und die Waschdauer auf 1 min reduziert.

2.10.7.4 Verbesserung des Umsatzes bei der Synthese von (*R*)-Mandelonitril durch Vorbehandlung von *AfHNL*-KatIBs

Aufgrund von Beobachtungen während Recyclingexperimenten (Aktivitätssteigerung und optische Veränderung der *AfHNL*-KatIBs) wurden zwei Versuchsreihen zur

Steigerung der Aktivität der *A*tHNL-KatIBs im mikrowässrigem Reaktionssystem zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril (2.10.7) durchgeführt. In diesen Experimenten wurden die verwendeten *A*tHNL-KatIBs in lösungsmittelresistente Nylonbeutel mit einer Porengröße von 40 µm eingeschweißt und in diesen sowohl behandelt als auch in die anschließende Reaktion durchgeführt.

2.10.7.4.1 Steigerung des Umsatzes durch Inkubation von *A*tHNL-KatIBs in MTBE

Für einen ersten Test wurden drei Nylonbeutel mit je 280 mg *A*tHNL-KatIBs vorbereitet. Mit dem ersten Beutel wurden zwei Runden Mandelonitril-Synthese mit einem zwischenzeitlichen Waschschrift für 5 min in 20 ml trockenem MTBE durchgeführt, um eine Referenz der Aktivitätssteigerung während eines Recyclings (2.10.7.3) zu erstellen. Von den anderen beiden Beuteln wurde einer in 20 ml trockenem MTBE und einer in 20 ml mit 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 gesättigter MTBE-Phase in fest verschließbaren Glasgefäßen für 1 h bei RT und leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Beutel kurz an der Luft getrocknet und für eine Synthesereaktion (2.10.7) verwendet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Inkubationsdauer in trockenem MTBE zur maximalen Steigerung des Umsatzes ermittelt. Hierzu wurden fünf Nylonbeutel mit je 150 mg *A*tHNL-KatIBs vorbereitet und anschließend unterschiedlich lange in fest verschließbaren Glasgefäßen in trockenem MTBE inkubiert (0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min). Im Anschluss wurden mit jedem Beutel eine Synthesereaktion (2.10.7) durchgeführt, um die Änderung der Aktivität verfolgen zu können.

2.10.7.4.2 Erweitertes Protokoll zur Verbesserung des Umsatzes

Zur weiteren Steigerung des Umsatzes in dem mikrowässrigen Reaktionssystem wurde ein Inkubationsprotokoll etabliert, bei dem die *A*tHNL-KatIBs getrocknet und gleichzeitig die Oberfläche vergrößert wird. Um den Erfolg jedes einzelnen Schritts (Tab. 9) zu überprüfen, wurden vier Nylonbeutel mit je 150 mg *A*tHNL-KatIBs präpariert. Während beim ersten Beutel nur der erste Schritt durchgeführt wurde, wurde bei den anderen Beuteln das Protokoll um je einen Schritt erweitert. Zwischen

den einzelnen Schritten wurde der Inhalt des Beutels kurz an der Luft getrocknet und mit einem Spatel soweit wie möglich zerkleinert, um die Zugänglichkeit für das Reaktionsmedium und die Substrate zu verbessern. Alle Inkubationen erfolgten in fest verschließbaren Glasgefäßen unter leichtem Rühren bei RT. Im Anschluss an die unterschiedlichen Behandlungen wurden die Beutel in einer Synthesereaktion (2.10.7) eingesetzt.

Tab. 9: Schritte des erweiterten Protokolls zur Behandlung von AtHNL-KatIBs zur Verbesserung des Umsatzes	
Schritt	Behandlung
1	30 min, 20 ml trockener MTBE
2	3 x 10 min je 10 ml trockener MTBE
3	20 min, 20 ml HNL-Assaypuffer pH 5,5 (2.10.6)
4	10 min, 10 ml trockener MTBE

2.10.8 Messung von BsLA-Aktivität

Zum Nachweis von Lipaseaktivität in den verschiedenen Fraktionen der aufgeschlossenen Zellen, wurde ein Assay basierend auf dem künstlichen Lipasesubstrat *para*-Nitrophenolbutyrat (*p*-NPB) verwendet. Dieser basiert auf der hydrolytischen Spaltung des farblosen *p*-NPB, wobei die Lipase die Esterbindung spaltet und das farbige *para*-Nitrophenolat (*p*-NP) freigesetzt wird. Dieses verfügt über ein erweitertes π -Elektronensystem und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 410 nm, wodurch die Reaktion photometrisch anhand der Absorptionzunahme verfolgt werden kann.

Der Assay wurde in Halbmikro-Küvetten in einem UV/Vis-Spektrophotometer (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand dabei aus 50 μ l enzymhaltiger Probe, 900 μ l BsLA-Assaypuffer und 50 μ l *p*-NPB-Stammlösung (0,8 mM Endkonzentration). Der Assaypuffer, die *p*-NPB-Stamm-lösung und das Photometer wurden auf 25 °C vortemperiert und die Zunahme der Absorption bei 410 nm über den Zeitraum von 1 min verfolgt. Als Referenz wurden die Ganzzellextrakte der beiden getesteten Konstrukte soweit mit BsLA-Zellaufschlusspuffer (2.10.1) verdünnt, dass nach 1 min Reaktionszeit eine Absorption bei 410 nm von 0,9 erreicht wurde. Die Proben der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden anschließend identisch zu ihrem entspre-

chenden Ganzzellextrakt verdünnt und die Aktivität gemessen. Als Leerwert wurden Reaktionen mit Puffer statt der enzymhaltigen Proben analysiert. Da relative Aktivitäten gemessen wurden, konnten diese direkt aus den Steigungen nach Abzug des Leerwerts ermittelt werden. Die Werte eines Konstruktes wurden jeweils auf die Aktivität des entsprechenden Ganzzellextraktes normiert. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

BsLA-Assaypuffer

50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8

p-NPB-Stammlösung

16 mM *p*-NPB in Acetonitril

2.10.9 *EcMenD*-Aktivitätsassay

Die Aktivität der wildtypischen *EcMenD* (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martina Pohl, IBG-1: Biotechnologie; Forschungszentrum Jülich) und *EcMenD*-KatIBs wurde anhand der Carboligasereaktion, bei der Benzaldehyd oder dessen Derivate mit α -Ketoglutarat zu den entsprechenden 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoaten umgesetzt wird, verfolgt [170]. Für die Messung der Aktivität in den verschiedenen Fraktionen aufgeschlossener Zellen (2.10.1) wurde die Proteinkonzentration im Ganzzellextrakt bestimmt (2.10.4.1) und entsprechende Volumina verwendet, um Endkonzentrationen von $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ für die wildtypische *EcMenD* und $2,8 \text{ mg ml}^{-1}$ für *EcMenD*-KatIBs zu erreichen. Für die anderen Fraktionen (löslich, unlöslich) wurde dasselbe Volumen, wie für die Messung des Ganzzellextraktes verwendet, um die genaue Aktivitätsverteilung zwischen den Fraktionen zu visualisieren. Die Reaktionen wurden in dicht verschließbaren Glasgefäßen mit einem Volumen von 1,5 ml durchgeführt. Dafür wurden 500 μl *EcMenD*-Puffer (2.10.1) mit den Substraten (24 mM Benzaldehyd und 72 mM α -Ketoglutarat) und 100 μl enzymhaltiger Probe gemischt (Endkonzentrationen: 20 mM Benzaldehyd und 60 mM α -Ketoglutarat) und 3 h bei 25 °C und 800 UpM in einem Thermomixer inkubiert. Im Anschluss wurden Proben entnommen, zentrifugiert (18.890 *g*, 1 min, 4°C) und der Überstand zur Herstellung von Proben für GC und *high performance liquid chromatography* (HPLC) Analysen verwendet (2.10.9.1). Als Leerwert wurden mehrere Reaktionen ohne

Enzym angesetzt und direkt nach Start bzw. nach Ende der Reaktionszeit ebenfalls für die Analyse mittels GC vorbereitet, um eine nicht enzymatische Abnahme von Benzaldehyd, z. B. durch Evaporation, nachweisen zu können.

Zur Bestimmung eines Substratspektrums der *EcMenD*-KatlBs wurden Umsätze mit den Substraten Benzaldehyd, 2-Fluorbenzaldehyd, 2-Chlorbenzaldehyd, 2-Brombenzaldehyd und 2-Methoxybenzaldehyd (Zusatz von 5 % (v/v) MTBE zur Verbesserung der Löslichkeit einiger Substrate) analog zu der Aktivitätsbestimmung der Zellfraktionen durchgeführt. Dabei wurden statt einer definierten Proteinmenge 18 mg ml^{-1} Nassgewicht *EcMenD*-KatlBs als Endkonzentration eingesetzt.

2.10.9.1 *EcMenD*-Reaktionsanalyse mittels GC und HPLC

Für die Analyse mittels GC wurden 200 μl Reaktionsüberstand mit 300 μl Ethylacetat (mit enthaltenem Dodecan als Standard) gemischt und stark geschüttelt, um nicht umgesetzten Benzaldehyd zu extrahieren. Nach Zentrifugation der Proben (18.890 g, 1 min, 4 °C) wurden 200 μl der organischen Phase in GC-Probengefäße überführt und 4 μl zur Injektion in das GC-System verwendet. Zur Ermittlung des Substratverbrauchs wurde ein Agilent 6890N Network GC-System mit Flammenionisationsdetektor (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) ausgerüstet mit einer CP-Chirasil-Dex CB Säule (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm , Willich, Deutschland) und Wasserstoff als Trägergas verwendet. Für die verschiedenen Substrate wurden die Proben bei den entsprechenden Temperaturen eingespritzt und diese für 8 min konstant gehalten (Benzaldehyd: 150 °C; halogenierte Benzaldehydderivate: 160 °C Methoxybenzaldehyd: 170 °C). Der Umsatz wurde durch den Verbrauch der entsprechenden Substrate anhand von relativen Peakflächen berechnet.

Der Enantiomerenüberschuss (ee) der produzierten 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoate wurde mittels HPLC anhand des Verhältnisses der relativen Peakflächen der Reaktionsprodukte ermittelt. Dafür wurden 200 μl Reaktionsüberstand mit 200 μl MTBE und 20 μl 10 % (v/v) Perchlorsäure gemischt und stark geschüttelt, um die Reaktionsprodukte zu extrahieren. Die Säure ist notwendig, um die Produkte in die organische Phase überführen zu können. Nach einer Zentrifugation (18.890 g, 1 min, 4 °C) wurden 200 μl der organischen Phase in HPLC-Glasgefäße überführt und davon 10 μl in die HPLC-Anlage injiziert. Für die Analyse mittels chiraler HPLC wurde ein 1260 Infinity Chromatographie-System (Agilent Technologies, Böblingen,

Deutschland) mit einer Diacel Chiralcel OD-H Säule (5 μm x 250 mm x 4.6 mm, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) verwendet. Alle Produkte wurden bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Die Trennung erfolgte durch isokratische Elution mit verschiedenen Mischungen von n-Hexan und 2-Propanol (5-Hydroxy-4-oxo-5-Phenylpentanoat 92:8, substituierte Derivate 90:10) angesäuert mit 0,25 % Trifluoressigsäure als Laufmittel bei einer konstanten Flussrate von 1,2 ml min⁻¹ und 20 °C. Zur Bestimmung der (*R*)- und (*S*)-Peaks wurden die Elutionszeiten mit unter identischen Bedingungen erhaltenen Literaturwerten verglichen [171].

2.10.9.2 Recycling von *EcMenD*-KatIBs

Der Ansatz für das Recycling der *EcMenD*-KatIBs für die Produktion von 5-Hydroxy-4-oxo-5-Phenylpentanoaten war der Bestimmung der *EcMenD* Aktivität (2.10.8) sehr ähnlich, wobei Ansatzgröße, verwendete Puffer und Substratkonzentrationen sowie die Substrat- und Produktanalyse (2.10.9.1) identisch waren. Dabei wurde allerdings das Material des Reaktionsgefäßes von Glas auf Plastik (1,5 ml Eppendorf-Gefäße) umgestellt, um die *EcMenD*-KatIBs leicht aus der Reaktionslösung durch Zentrifugation entfernen zu können.

Im ersten Versuchsteil wurde eine zeitaufgelöste Reaktion mit dem Ziel durchgeführt, die Zeit zu bestimmen in der 18 mg *EcMenD*-KatIBs (Nassgewicht) 20 mM Benzaldehyd vollständig umsetzen. Dazu wurden mehrere Reaktionen und die entsprechenden Leerwerte gleichzeitig gestartet und bei 25 °C und 800 UpM in einem Thermomixer inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Reaktion in Triplikaten durch Zentrifugation (18.890 g, 5 min, 4 °C) gestoppt und aus dem Überstand Proben für die Analyse mittels GC und HPLC (2.10.9.1) präpariert. Die erhaltenen *EcMenD*-KatIB Pellets wurden vom Überstand getrennt, mit 200 μl *EcMenD*-Puffer (2.10.1) gewaschen, zentrifugiert (18.890 g, 5 min, 4 °C) und nach Entfernen des Überstandes bei -20 °C gelagert. Dieser Versuch stellte gleichzeitig die erste Runde des Recyclings dar.

Unter Verwendung der in dieser Weise bestimmten optimalen Reaktionszeit und dem entsprechenden KatIB Pellet wurde die nächste Runde des Recyclings durchgeführt. Dabei wurden die *EcMenD*-KatIBs in 100 μl *EcMenD*-Puffer (2.10.1) resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 500 μl Puffer mit den enthaltenen Substraten gestartet. Die Reaktionslösung wurde für 360 min bei 25 °C und 800 UpM inkubiert.

Anschließend wurden die *EcMenD*-KatIBs erneut abzentrifugiert (18.890 *g*, 5 min, 4 °C) und aus dem Überstand Proben für die Analyse vorbereitet. Die KatIBs wurden von dem Überstand getrennt, gewaschen, erneut zentrifugiert und ohne Überstand bei -20 °C bis zum Start der nächsten Reaktion gelagert. Insgesamt wurden auf diese Weise acht Reaktionen mit recycelten *EcMenD*-KatIBs durchgeführt.

2.10.10 YFP-Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenz von YFP-IBs und der YFP-Kontrolle wurden in 100 µl Volumen in schwarzen Mikrotiterplatten (MTP) mit 96 *wells* in einem TECAN infinite M1000 PRO Fluoreszenzphotometer (TECAN, Männedorf, Schweiz) gemessen. Für die Messung der Fluoreszenz in den verschiedenen Fraktionen aufgeschlossener Zellen (2.10.1) wurde die Fluoreszenz des Ganzzellextraktes der YFP-Kontrolle als Referenz verwendet. Dafür wurde die Probe in YFP-Puffer (2.10.1) verdünnt und die Einstellungen des Fluoreszenzphotometers optimiert, bis die Probe knapp unter der maximal messbaren Fluoreszenz lag (Schlitze 5 nm, z-Position 18.909 µm, Verstärkung 120, Anzahl der Blitze 25, Blitzfrequenz 400). Alle weiteren Proben wurden identisch verdünnt und unter denselben Bedingungen gemessen, sodass ein direkter Vergleich zwischen den Fraktionen eines Konstruktes möglich war. Die Proben wurden mit Licht der Wellenlänge 485 nm angeregt, während die Fluoreszenzintensität bei 527 nm bzw. Fluoreszenzemissionsspektren von 500 bis 650 nm aufgenommen wurden. Um ein Absinken der YFP-IB-Partikel zu verhindern, wurde die MTP vor der Messung jedes einzelnen Werts geschüttelt (5 s, 1 mm Amplitude, orbital). Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.10.10.1 Proteolytischer Verdau von YFP-IBs mit Faktor Xa Protease

Anhand der Fluoreszenz von YFP sollte getestet werden, ob aus YFP-IBs, durch Entfernen des TDoT-tags, lösliches Protein gewonnen werden kann. Dazu wurde die im Fusionsprotein eingebaute Faktor Xa Proteaseschnittstelle (3.2) ausgenutzt. Für den Test wurden YFP-IBs in MilliQ Wasser resuspendiert und die Proteinkonzentration einer Probe mittels Denaturierung in 6 M Guanidinhydrochlorid und anschließender Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt (2.10.4.2). In den

Verdau wurde eine Endkonzentration von 1 mg ml^{-1} Protein eingesetzt und mit $15 \text{ }\mu\text{l}$ Faktor Xa Protease, einer entsprechenden Menge $10\times$ Spaltungspuffer und MilliQ Wasser in einem Endvolumen von $1,5 \text{ ml}$ gemischt (Protease und Spaltungspuffer aus dem „Factor Xa Cleavage Capture Kit“ von Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland). Als Kontrolle dienten Ansätze mit Wasser anstelle von Protease. Sowohl der Verdau als auch die Kontrollen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Alle Ansätze wurden nach dem Start der Reaktion bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1.000 UpM in einem Thermomixer inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden nach den Zeiten 10 min , 45 min , 180 min und 360 min zweimal $150 \text{ }\mu\text{l}$ entnommen. Mit den ersten $150 \text{ }\mu\text{l}$ wurde die Gesamtfluoreszenz gemessen und die Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE (2.10.5) analysiert. Die zweiten $150 \text{ }\mu\text{l}$ wurden mittels Zentrifugation (18.890 g , 5 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) fraktioniert, der Überstand abgenommen und das Pellet in $150 \text{ }\mu\text{l}$ $1\times$ Spaltungspuffer resuspendiert. Zur Messung der Fluoreszenz (2.10.10) wurden $100 \text{ }\mu\text{l}$ verwendet, während $20 \text{ }\mu\text{l}$ mit $5 \text{ }\mu\text{l}$ $5\times$ SDS-Probenpuffer (2.10.5) gemischt und für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.10.5) genutzt wurden.

2.11 Mikroskopie

2.11.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Morphologie von KatIBs wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Eine Probe einer KatIB-Suspension wurde als Tropfen auf eine polierte Siliziumscheibe aufgebracht und mittels 10 ml Glutardialdehyd-Lösung quervernetzt (2 h , RT, leichtes Schütteln). Anschließend wurde die Probe dreimal in einem Volumen von 10 ml gewaschen (100 mM Natriumphosphat-Puffer pH $7,2$, 10 min leichtes Schütteln), mithilfe einer Ethanolkonzentrationsreihe dehydriert (je 15 min in 10 ml 30% , 50% , 70% , 95% und 100% (v/v) Ethanol) und an der Luft getrocknet. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde als Auftragsarbeit am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) im Laboratorium für Elektronenmikroskopie (Karlsruhe, Germany) durchgeführt. Die Bilder wurden mit 10 kV und der auf den Bildern angegebenen Vergrößerung aufgenommen.

Glutardialdehyd-Lösung

100	mM	Natriumphosphat-Puffer pH $7,2$
2	% (w/v)	Glutardialdehyd

2.11.2 Fluoreszenzmikroskopie

Im Anschluss an die Genexpression und die Zellernte wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen, die YFP-IBs, YFP-Kontrolle oder pET28a Leervektor enthielten, in YFP-Puffer (2.10.1) resuspendiert und auf eine OD_{600nm} von 3 eingestellt. Anschließend wurden 10 μ l dieser Suspension auf einem Objektträger, der mit einer 1 % (w/v) Agarose-schicht von konstanter Dicke überzogen war, immobilisiert. Mit gereinigten YFP-IBs wurden verschiedene Verdünnungen einer Suspension hergestellt und unter dem Mikroskop analysiert, bis Fluoreszenzsignale einzelner IBs erkennbar waren. Alle Proben wurden mit Deckgläsern abgedeckt und mit einem vollautomatisierten invertierten Mikroskop (Nikon Eclipse Ti, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) betrachtet. Das System ist ausgerüstet mit einem Apo TIRF 100x Oil DIC N Objektiv, einer ANDOR LUCA R DL604 Kamera (Andor Technology Plc., Belfast, Nordirland), einer Xenon Lichtquelle für Fluoreszenzanregung sowie entsprechenden Filtern für die richtige Anregung und Detektion von YFP-Fluoreszenz (YFPHQ Filtersystem [Anregung, 490 bis 550 nm; Interferenzfilter, 510 nm; Absorptionsfilter, 520 bis 560 nm]; AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland). Die Fluoreszenzbilder wurden mit der Nikon NIS Elements AR Software aufgenommen und analysiert.

2.11.3 Mikrofluidik

Zur Beobachtung der Bildung von YFP-IBs in lebenden Zellen wurde ein Mikrofluidik-Experiment durchgeführt. Dabei werden *E. coli* BL21(DE3) Zellen in einem Pikoliter-Bioreaktor mit kleinen Kammern mittels Durchfluss einer *E. coli* Kultur vereinzelt und anschließend das Wachstum der Zellen und die Bildung der IBs mithilfe einer Kamera verfolgt.

Zur Vorbereitung des Experiments wurde eine erste Vorkultur mit 10 ml M9CA-Medium (2.4.1) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit einem Klon von einer frischen Transformationsplatte angeimpft und erst 2 h (37 °C, 130 UpM) sowie anschließend über Nacht bei 22 °C und 130 UpM inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine 10 ml M9CA Hauptkultur in einem 250 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD_{600nm} von 0,05 angeimpft und 3 h bei 22 °C und 130 UpM kultiviert. Diese Kultur wurde anschließend dazu verwendet, einzelne Zellen in die Kammern des

Pikoliter-Bioreaktors (hergestellt aus Polydimethylsiloxan, enthält mehrere hundert Kammern mit den Dimensionen 1 μm x 40 μm x 40 μm) zu spülen. Zur Induktion der Genexpression wurde dem Medium 0,5 mM IPTG zugesetzt und die Zellen für 10 h bei 22 °C in dem Pikoliter-Bioreaktor in einem Mikroskop-Inkubator-System (PeCon GmbH, Erbach, Deutschland) beobachtet. Dabei wurde alle 10 min ein Bild mit einem vollautomatisierten invertierten Nikon Eclipse Ti Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen. Um den thermischen Drift während der Mikroskopie zu kompensieren, war das Mikroskop mit einem Fokusassistenten (Nikon PFS) ausgerüstet. Außerdem besaß es ein Plan Apo 100x oil Ph3 DM Objektiv (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und eine *high-speed charge-coupled device* (CCD) Kamera (Andor Clara DR-3041, Andor Technology Plc., Belfast, Nordirland). Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberdampfampe (Intensilight; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und für die Fluoreszenzanregung und -emission von YFP entsprechende Filter (YFPHQ Filtersystem [Anregung 490 bis 550 nm; Interferenzfilter 510 nm; Absorptionsfilter 520 bis 560 nm]; AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) verwendet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit der Nikon NIS Elements AR Software aufgenommen und analysiert.

2.12 DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit erstellten Plasmide wurden vor ihrer Verwendung sequenziert und somit auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Verwendet wurden Oligonukleotide, die in den Bereichen des T7 Promotors und des Terminators binden und bei ausreichender Leselänge alle Gene abdecken konnten.

2.13 Gensynthese

Die Synthese von *tdot* wurde als Auftragsarbeit von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die Sequenz auf die Kodonnutzung von *E. coli* angepasst. Am 3'-Ende wurde eine Basensequenz, die für eine Linkerregion bestehend aus der Faktor Xa Proteaseschnittstelle (Xa) und der Aminosäuresequenz GGGSGGGSGGGS (3x GGGS) kodiert, hinzugefügt (auf die Kodonnutzung von

E. coli angepasst). Für die spätere Klonierung wurde die synthetisierte Sequenz am 3'- und 5'-Ende von den Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SaI* flankiert.

2.14 Computerprogramme und Internettools

Die Erstellung von Klonierungsstrategien erfolgte unter Verwendung des Programms „CloneManager“ (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA). Alle Auswertungen und grafischen Darstellungen von Messwerten wurden mithilfe von „Origin 7.0“ (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) angefertigt. Dreidimensionale Strukturen von Proteinen wurden mit „Pymol“ (Schrödinger Inc., New York, NY, USA) dargestellt. Die Berechnung von Proteinmassen und molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte unter Verwendung der Internetseite <http://web.expasy.org/protparam>. Zur Auswertung von DNA-Sequenzierungen wurden folgende Internetseiten verwendet: http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html und <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=merger>. Zur Auswahl eines geeigneten *coiled coils* wurde die Datenbank CC+ (<http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/>) verwendet. Fluoreszenzbilder von lebenden Zellen und isolierten YFP-IBs wurden mit der Nikon NIS Elements AR Software (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen und analysiert

2.15 Geräte

Tab. 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.		
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseapparaturen	Mini-PROTEAN Gelkammer II	BioRad
	XCell SureLock® Mini Kammer	Life Technologies
Feinwaage	2004 MP	Sartorius
Fluoreszenzphotometer	infinite® M1000 PRO	TECAN
French Pressure Cell	FRENCH® Press 40K Cell	Thermo Electron Corporation
Inkubationsschüttler	Infors HT	Infors
PCR-Automat	TProfessional Basic Gradient	Biometra
Spektrophotometer	DU 650 Spectrophotometer	Beckman
Stromversorgungsgerät	Electrophoresis Power Supply - EPS60A	GE Healthcare
Zentrifugen	RC-5B Plus	Sorvall
	Mikro 22R	Hettich
	Rotina 35R	Hettich

Tab. 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.		
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonopuls HD2070	Bandelin
Videodokumentation	Eagle Eye II Stella	Stratagene Raytest
Gaschromatographiesystem	Agilent 6890N Network GC-System	Agilent Technologies
HPLC System	1260 Infinity Chromatographie-System	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	Lyovac GT2	SRK Systemtechnik

Alle hier nicht aufgeführten Kleingeräte entsprachen den allgemeinen Laborstandards.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ein zur Stabilisierung von Proteinen geeigneter Fusionspartner konnte identifiziert werden

In der Industrie spielt die Stabilität von Biokatalysatoren eine große Rolle bei der effizienten und ökonomischen Gestaltung von Produktionsprozessen [87]. Daher sollte in dieser Arbeit eine neue Methode zur Stabilisierung von Enzymen etabliert werden, bei der durch Fusion eines *coiled coils* an einen Biokatalysator dessen Eigenschaften beeinflusst werden. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Oligomerisierungsgrad zu einer verbesserten Stabilität führen kann (1.5.4) [172]. Daher sollte durch die Fusion mit einem *coiled coil* insbesondere eine höhere Form der Oligomerisierung des entsprechenden Biokatalysators im Vergleich zum isolierten wildtypischen Enzym erreicht werden. Allerdings sind *coiled coils* ubiquitär in der Natur verbreitet und existieren in verschiedenen Längen und Oligomerisierungsformen (1.6) [144, 147], weshalb es nötig war, aus einer Vielzahl von potentiell geeigneten Domänen auszuwählen. Zu diesem Zweck wurde die *coiled coil* Datenbank CC+ (<http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/>) [131] mit bestimmten Kriterien durchsucht. So sollte das *coiled coil* beispielsweise eine möglichst einfache Struktur aufweisen und darüber hinaus ein paralleles Homotetramer ausbilden, um eine deutliche Änderung des Oligomerisierungsgrades des Modellenzym *AtHNL* (*Arabidopsis thaliana* Hydroxynitril Lyase) zu erreichen.

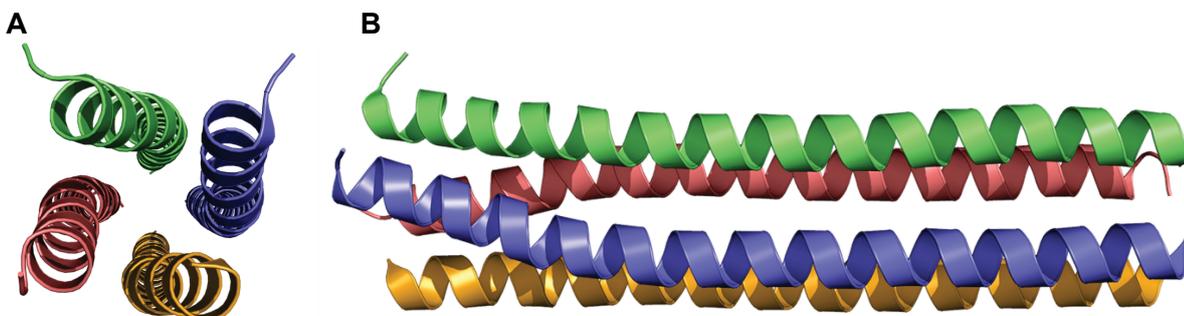


Abb. 10: Struktur der Tetramerisierungs-Domäne des Proteins Tetrabrachion (TDoT) in der A) Auf- und B) Seitenansicht. Ein Monomer des *coiled coils* besteht aus 50 Aminosäuren, wobei sich vier Monomere zu einem parallelen Homotetramer zusammenlagern (PDB-ID: 1FE6 [173]). Dabei sind die einzelnen Monomere zur besseren Visualisierung unterschiedlich eingefärbt. Der Amino-Terminus befindet sich in der Aufsicht oben und in der Seitenansicht auf der linken Seite.

Basierend auf diesen Kriterien wurde die Tetramerisierungs-Domäne des Zelloberflächenproteins Tetrabrachion (TDoT) (Abb. 10) aus dem Archaeon *Staphylothermus marinus* ausgewählt. Die entsprechende *coiled coil* Domäne des Tetrabrachion Proteins wurde zudem bereits eingehend in Bezug auf ihre Stabilität und Struktur charakterisiert [173-175]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Domäne eine außerordentliche Stabilität gegenüber extremen Temperaturen und sowohl hohen als auch niedrigen pH-Werten besitzt. So denaturiert die Proteindomäne erst bei über 130 °C und ist im Bereich von pH 1 bis pH 11 stabil [175]. Diese Eigenschaften könnten auf den extremophilen Ursprungsorganismus *S. marinus* zurückgeführt werden, welcher in der Tiefsee in der Nähe von sog. schwarzen Rauchern lebt [174, 175]. Ebenfalls entscheidend für die Wahl von TDoT war, dass die Domäne bereits als Fusionspartner an einer Influenza Neuraminidase getestet wurde und diese als Fusionsprotein stabiler gegenüber niedrigen pH-Werten war [176].

Mit der Tetramerisierungs-Domäne des Proteins Tetrabrachion (TDoT) konnte ein potentiell für die Stabilisierung von Proteinen durch Fusion geeignetes *coiled coil* identifiziert werden.

3.2 Erzeugung eines modularen Vektorsystems zur einfachen Konstruktion von Genfusionen

Nach der Auswahl des Fusionspartners wurde das für TDoT kodierende Gen als Auftragsarbeit von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert (2.13). Zusätzlich wurde eine Linkerregion bestehend aus den Basensequenzen, die für die Faktor Xa Proteaseschnittstelle (Xa, Sequenz: IEGR) und die Aminosäuresequenz GGGSGGGSGGGS (3x GGGS) kodieren, an das 3'-Ende des Genfragments angefügt. Dabei wurde die gesamte Basensequenz auf die Kodonnutzung von *E. coli* angepasst. Außerdem wurden mehrere Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen vor und zwischen den einzelnen Abschnitten eingefügt, um ein möglichst variables System für die Klonierung zu erhalten.

Aus dem erhaltenen Vektor pEX-A-TDoT-Linker konnte durch Restriktion (2.6.1) mit den Endonukleasen *NdeI* und *Sall* sowie spätere Ligation (2.6.2) des isolierten DNA-Fragments mit dem entsprechend hydrolysierten Vektor pET28a ein Basisvektor erzeugt werden (Abb. 11). Bei diesem Schritt erhielt das Konstrukt ebenfalls die für einen aminoterminalen His-tag kodierende Sequenz, die auf dem pET28a Vektor enthalten war, um produzierte Fusionsproteine mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) in einem Schritt reinigen zu können. Mit dem Plasmid wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α Zellen transformiert (2.7), anschließend die Plasmid-DNA isoliert (2.5.1) und zur Überprüfung der Richtigkeit sequenziert (2.12). Der erhaltene Basisvektor wurde pTDoT-Linker genannt und für die Erzeugung von Genfusionen mit diversen Zielgenen verwendet.

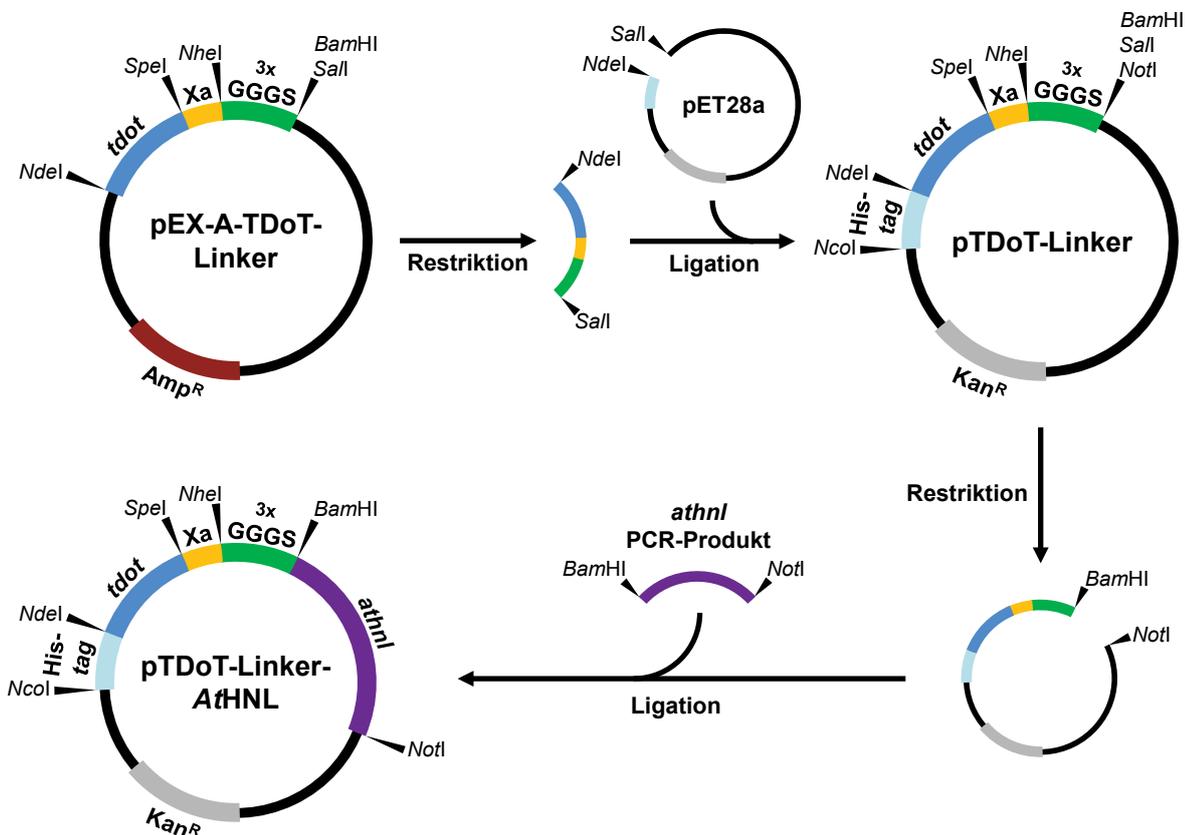


Abb. 11: Schema zur Verdeutlichung der verwendeten Klonierungsstrategie. Aus dem ursprünglichen Vektor pEX-A-TDoT-Linker konnte mittels Restriktion das entsprechende DNA-Fragment kodierend für TDoT und die Linkerregion (Xa und 3x GGGs) isoliert und in den Expressionsvektor pET28a ligiert werden. Der auf diese Weise erstellte Basisvektor pTDoT-Linker wurde dazu verwendet über erneute Restriktion und anschließende Ligation von PCR-Produkten (hier *athnI*) neue Genfusionen zu erstellen. Zur Verdeutlichung der Vielseitigkeit des Vektorsystems sind alle Endonukleaseschnittstellen, die zur Erzeugung von Genfusionen genutzt werden können, dargestellt. Unter Verwendung dieser Schnittstellen können einzelne Regionen gezielt deletiert oder ausgetauscht werden.

Im Folgenden wird die Klonierung der Genfusion *tdot-linker-athnl* (Abb. 11) als Beispiel für den simplen Einbau eines neuen Zielgens beschrieben. Dabei wurde zuerst das für die *AtHNL* kodierende Gen mit angefügten Schnittstellen für die Endonukleasen *Bam*HI und *Not*I mittels *touchdown* PCR (2.8) amplifiziert. Anschließend wurde das DNA-Fragment durch Restriktion (2.6.1) und Ligation (2.6.2) in den entsprechend hydrolysierten Basisvektor pTDoT-Linker eingefügt und das erhaltene Konstrukt nach Transformation (2.7) von *E. coli* DH5 α Zellen und Plasmidisolierung (2.5.1) sequenziert (2.12). Das Plasmid mit der korrekten Sequenz wurde als pTDoT-Linker-*AtHNL* bezeichnet und sowohl für weitere Klonierungen als auch für die Genexpression in *E. coli* BL21(DE3) (2.4.3) genutzt.

Aufgrund der Vielseitigkeit und Flexibilität des Vektorsystems lässt sich aus diesem eine Vielzahl von weiteren Konstrukten erzeugen. So kann beispielsweise die Sequenz, die für die Faktor Xa Proteaseschnittstelle kodiert, mittels der Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Nhe*I aus dem Konstrukt entfernt werden. Da die beiden Enzyme beim Hydrolysieren der DNA kompatible Überhänge erzeugen, kann der Vektor nach einer Reinigung (2.9) direkt ohne weitere Schritte re-ligiert (2.6.2) werden.

Weitere Beispiele für das breite Anwendungsspektrum des Vektors sind der einfache Austausch oder die Deletion von einzelnen Regionen, wie dem Linker, dem His-*tag* oder dem TDoT-Genfragment, mittels Restriktion und Ligation. Auch die für spätere Experimente benötigte Kontrolle, die zeigen soll, dass TDoT die Stabilität beeinflusst und nicht der verwendete Linker oder der His-*tag*, konnte mithilfe einfacher molekularbiologischer Methoden erzeugt werden. Dabei wurde die für TDoT kodierende Sequenz aus pTDoT-Linker-*AtHNL* mittels der Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Nhe*I entfernt (2.6.1), wobei ebenfalls die für die Faktor Xa Schnittstelle kodierende Sequenz aus dem Vektor deletiert wurde. Dies war nötig, um in einem weiteren Schritt die für die Xa Schnittstelle kodierende Sequenz mit neuen Überhängen wieder in den Vektor einfügen und diesen ligieren zu können. Das sehr kleine, für die Xa Schnittstelle kodierende DNA-Fragment wurde aus Oligonukleotiden erzeugt (2.6.3), die nur teilweise zueinander komplementär sind und somit nach einer Zusammenlagerung Überhänge aufweisen, die mit den Überhängen nach einer Behandlung mit entsprechenden Endonukleasen kompatibel sind. Dadurch war es möglich, das doppelsträngige Oligonukleotidfragment direkt in den hydrolysierten Vektor zu ligieren (2.6.2), um das entsprechende Kontrollkonstrukt zu

erzeugen, welches lediglich um die *tdot* Sequenz gekürzt wurde. Mit der erhaltenen DNA wurden *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (2.7.2), aus den Transformanten die Plasmid-DNA in größeren Mengen isoliert (2.5.1) und sequenziert (2.12). Das Plasmid mit der korrekten Sequenz wurde als pLinker-*AtHNL* bezeichnet und für die Genexpression (2.4.3) von *linker-athnl* verwendet, wobei das Genprodukt im Folgenden *AtHNL*-Kontrolle genannt wird.

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (2.2, Tab. 2) wurden, basierend auf den hier beschriebenen Vektoren, erzeugt und vor ihrer Verwendung auf ihre Korrektheit mittels Sequenzierung analysiert.

Durch geschickte Wahl der Klonierungsstrategie konnte erfolgreich ein sehr variables Basisvektorsystem erzeugt werden. Ausgehend von diesem Basisvektor wurde die Genfusion bestehend aus TDoT und der *AtHNL* sowie das entsprechende Kontrollkonstrukt (ohne TDoT) generiert.

3.3 Die Überexpression von *tdot-linker-athnl* in *E. coli* BL21(DE3) führt zur Bildung großer Mengen unlöslichen Fusionsproteins

Im Anschluss an die Klonierung wurde eine Testexpression der Genfusion *tdot-linker-athnl* durchgeführt (2.4.3). Dazu wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet, um optimale Bedingungen zur Produktion von möglichst großen Mengen an löslichem Fusionsprotein zu identifizieren. In zwei der getesteten Bedingungen wurde LB-Medium (2.4.1) verwendet, wobei einer der Kulturen zusätzlich 2 % Glukose zugesetzt wurde. Dies sollte, ähnlich dem im dritten Ansatz verwendeten Autoinduktionsmedium (2.4.1), eine vorzeitige Expression verhindern, da die Glukose durch Katabolit-Repression einer Induktion entgegenwirkt. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pET28a verwendet, während eine Kontrolle mit pETmPlum zeigen sollte, ob die verwendeten Zellen in der Lage sind, lösliches heterologes Protein zu produzieren.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen (2.10.1). Im Anschluss wurde das erhaltene Ganzzelleextrakt mittels Zentrifugation in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt. Die Protein-

zusammensetzung der jeweiligen Proben wurde mittels SDS-PAGE (2.10.5) untersucht (Abb. 12).

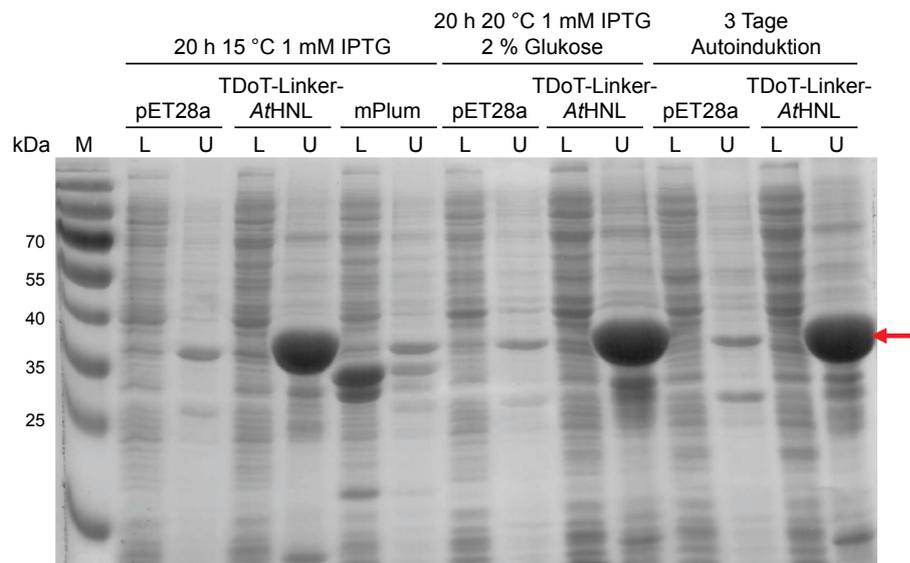


Abb. 12: SDS-PAGE Analyse der heterologen Expression von *tdot-linker-athnl* und den entsprechenden Kontrollen in *E. coli* BL21(DE3). Alle Kulturen wurden aus einer Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,05 angeimpft und entweder bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 (LB-Kulturen) oder 3 h (Autoinduktion) bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Induktion der Genexpression erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen. Der rote Pfeil markiert die erwartete molekulare Masse von TDoT-Linker-AthNL (39 kDa). Für die SDS-PAGE (12 % Gel) wurden jeweils 10 µg Protein der löslichen Fraktionen und das entsprechende Volumen der im Ausgangsvolumen resuspendierten unlöslichen Fraktionen eingesetzt. Das Gel wurde mit kolloidalen Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung (2.10.5.1) zur Visualisierung der Proteine gefärbt. M = Marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder); L = lösliche Proteinfraction; U = unlösliche Proteinfraction.

In allen unlöslichen Proteinfractionen der Überexpressionskulturen ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen eine sehr deutliche Überexpressionsbande mit der erwarteten molekularen Masse von ca. 39 kDa nachweisen. Dagegen war in den löslichen Fraktionen auf gleicher Höhe keine Veränderung im Vergleich zu der Negativkontrolle festzustellen. Dies lässt darauf schließen, dass das Fusionsprotein TDoT-Linker-AthNL in komplett unlöslicher Form unter den gewählten Bedingungen produziert wurde. Daher wurden weitere Bedingungen mit anderen Temperaturen, Medien und *E. coli* Stämmen getestet. Die Experimente lieferten allerdings identische Ergebnisse, d. h. in allen Fällen wurde das Fusionsprotein in unlöslicher Form produziert (Daten nicht gezeigt).

Unlösliches Protein wird typischerweise in bakteriellen Zellen in sog. *inclusion bodies* (IB) angereichert. Dieser Prozess ist keine Seltenheit bei heterologen Überexpressionen, insbesondere bei der Verwendung eines starken Promotors [177]. Für die Produktion von TDoT-Linker-AthNL in IBs kann es darüber hinaus mehrere

Gründe geben. Während der Translation könnten beispielsweise Probleme dadurch auftreten, dass lediglich die Sequenz von *tdot-linker* auf die Kodonnutzung von *E. coli* angepasst wurde. Dies könnte zu einer schnellen Produktion des aminoterminalen TDoT-*tags* führen, welcher bereits während der Synthese mit weiteren *tags* interagieren und Homo- oder Heterooligomere bilden könnte. Dabei wäre es möglich, dass es bei der carboxyterminal lokalisierten *AtHNL* zu Fehlfaltungen kommt und somit inaktives unlösliches Protein entsteht. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Linker zwischen dem TDoT-*tag* und der *AtHNL* zu kurz ist, sodass eine korrekte Zusammenlagerung mehrerer Moleküle räumlich nicht möglich ist. Da die einzelnen Stränge eines *coiled coils* mittels hydrophober Wechselwirkungen zusammen gehalten werden, wären die hydrophoben Flächen, die dafür nötig sind, bei einem Monomer dem wässrigen Medium ausgesetzt. Dies könnte dazu führen, dass das Protein in der Zelle aggregiert und als unlösliches Protein vorliegt. Als weitere Möglichkeit kann in Betracht gezogen werden, dass in diesem Fusionsprotein ein tetramerisierender *tag* mit einem dimeren Zielprotein kombiniert wurde. Wenn die *AtHNL* nicht innerhalb des beabsichtigten Tetramers ihre dimeren Wechselwirkungen ausbildet, sondern zu einem *AtHNL*-Molekül in einem anderen Tetramer, könnten sich daraus große unlösliche Proteinnetzwerke ergeben.

Trotz der großen Menge unlöslichen Proteins in IBs könnten geringe Mengen TDoT-Linker-*AtHNL* in der löslichen Fraktion vorhanden sein. Diese lassen sich allerdings nicht auf dem SDS-Gel nachweisen. Um dies dennoch zu überprüfen, könnten wesentlich sensitivere Methoden zum Nachweis von Proteinen angewandt werden. Beispielsweise könnte ein Westernblot mit einem Antikörper gegen den an dem Fusionsprotein vorhandenen His-*tag* durchgeführt werden. Da dieser lediglich das Vorhandensein von Protein, aber nicht dessen Funktionsfähigkeit nachweisen kann, sollte ein HNL Aktivitätsassay durchgeführt werden.

Die heterologe Genexpression von *tdot-linker-athnl* in *E. coli* BL21(DE3) resultierte trotz unterschiedlichster Expressionsbedingungen ausschließlich in der Bildung großer Mengen unlöslichen Fusionsproteins.

3.3.1 Das Fusionsprotein TDoT-Linker-A θ HNL ist in unlöslicher Form katalytisch aktiv

Für die Bestimmung der Aktivitätsverteilung in den Fraktionen aufgeschlossener Zellen wurde die Expression (2.4.3) von *tdot-linker-athnl* in Autoinduktionsmedium durchgeführt (2.4.1). Zusätzlich wurde die A θ HNL-Kontrolle, welcher der TDoT-tag fehlt, unter denselben Bedingungen produziert. Mit dieser Kontrolle sollte sich eindeutig feststellen lassen, welchen Einfluss der TDoT-tag auf die Löslichkeit und die Aktivitätsverteilung des Enzyms hat. Im Anschluss an die Zellernte und den Zellaufschluss (2.10.1) wurden die Zellextrakte mittels Zentrifugation in ihre löslichen und unlöslichen Bestandteile fraktioniert. Die Proben des Zellextraktes (ZE), der löslichen (L) und der resuspendierten unlöslichen Fraktion (U) wurden mittels SDS-PAGE (2.10.5) sowie zur Bestimmung der A θ HNL Aktivität mit dem Mandelonitril-Spaltungsassay und dessen modifizierter Endpunktvariante (2.10.6) analysiert.

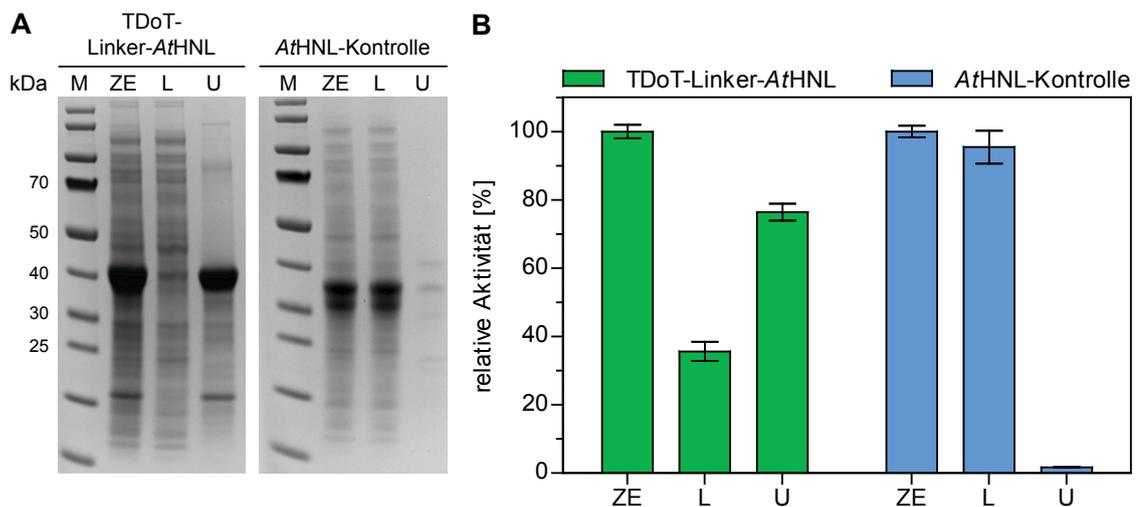


Abb. 13: Analyse der Protein- und Aktivitätsverteilung von TDoT-Linker-A θ HNL und A θ HNL-Kontrolle im Zellextrakt (ZE) sowie der löslichen (L) und unlöslichen Proteinfraction (U). Im Anschluss an die Expression der entsprechenden Gene in *E. coli* BL21(DE3) mittels Autoinduktionsmedium wurden die Zellen aufgeschlossen und das ZE mittels Zentrifugation in die Fraktionen L und U getrennt. A) SDS-PAGE Analyse (4 - 12 % Gradientengel, 2.10.5) der verschiedenen Fraktionen. Die Proteinkonzentration der L Fraktionen wurden mittels Bradford bestimmt und 3 μ g Protein aufgetragen, während auf diesen Wert bezogene Volumen ZE und U verwendet wurden. Das Gel wurde mit kolloidalen Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung zur Visualisierung der Proteine gefärbt (2.10.5.1). M = Marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder). B) Relative A θ HNL Aktivität in den verschiedenen Fraktionen. Verwendet wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay in HNL-Assaypuffer bei pH 5,5 und einer Endkonzentration von 13,4 mM *rac*-Mandelonitril als Substrat. Für die L Fraktion wurde der kontinuierliche Assay (2.10.6) genutzt, während im Falle von ZE und U aufgrund hoher Partikeldichten der Endpunkt-basierte Test (2.10.6) verwendet wurde. Die Aktivität in den ZE Fraktionen wurde als 100 % des jeweiligen Proteins definiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert, welcher in drei unabhängigen Messungen bestimmt wurden.

Bei der SDS-PAGE Analyse (Abb. 13, A) war eindeutig erkennbar, dass TDoT-Linker-AtHNL nahezu komplett in der unlöslichen Fraktion lokalisiert war, während die AtHNL-Kontrolle vollständig löslich war. Auch in Bezug auf die Aktivität konnte bei der Kontrolle die erwartete Verteilung festgestellt werden, da im Rahmen des Fehlers 100 % der Aktivität in der löslichen Fraktion gefunden werden konnte (Abb. 13, B). Bei TDoT-Linker-AtHNL konnte ebenfalls Aktivität in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnten 70 % der Gesamtaktivität von TDoT-Linker-AtHNL in der unlöslichen, IB-enhaltenden Fraktion detektiert werden.

Für eine eingehendere Charakterisierung des löslichen TDoT-Linker-AtHNL Anteils sollte das Protein über den vorhandenen aminoterminalen His-tag mittels IMAC gereinigt werden. Allerdings konnte weder Aktivität noch Protein in den Elutionsfraktionen der Reinigung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da eine weitere Verfolgung dieser Strategie nur eine geringe Aussicht auf Erfolg bei hohem Zeitaufwand bot, wurde der Fokus der weiterführenden Arbeiten auf die unerwartete Aktivität in der unlöslichen Proteinfraction gelegt.

Aus den Experimenten zur Protein- und Aktivitätsverteilung ließ sich eindeutig schließen, dass der TDoT-tag im Vergleich zu der AtHNL-Kontrolle für die Änderung der Löslichkeit verantwortlich gemacht werden kann. Der tag bewirkte eine verstärkte Bildung von IBs während der heterologen Genexpression in *E. coli*, wobei diese deutliche AtHNL Aktivität zeigten. Das ist keine generelle Eigenschaft von IBs. Diese wurden für eine lange Zeit als fehlgefaltete und inaktive Proteinaggregate und daher in den meisten Fällen als „Abfall“ angesehen oder als Quelle reinen Proteins für Rückfaltungsstudien genutzt [178]. Entgegen dieser Annahme zeigten neueste Studien, dass dies nicht immer richtig ist. So existieren bereits mehrere Beispiele für sowohl native Enzyme [179, 180] als auch Fusionsproteine mit verschiedenen tags [181, 182], die als IB gebildet wurden und dennoch Aktivität zeigten.

Mit diesen Informationen sollten weitere Tests mit den katalytisch aktiven AtHNL inclusion bodies (im folgenden AtHNL-KatIBs genannt) hinsichtlich einer möglichen Nutzung in der Biokatalyse durchgeführt werden.

Bei einer Analyse der HNL-Aktivitätsverteilung in den Fraktionen aufgeschlossener TDoT-Linker-AtHNL produzierender *E. coli* BL21(DE3) Zellen konnte in der unlöslichen Proteinfraction deutliche Aktivität nachgewiesen werden.

3.4 *A*tHNL-KatIBs sind biologisch herstellbare Enzymimmobilisate

Die Verwendung von Autoinduktionsmedium zur Produktion von *A*tHNL-KatIBs führte zu deutlich höheren Zelldichten und damit im Vergleich zu den anderen getesteten Expressionsbedingungen zu größeren Mengen an isolierbaren *A*tHNL-KatIBs. Daher wurde die Expression der entsprechenden Genfusion in *E. coli* BL21(DE3) für weitere Experimente mittels Autoinduktionsmedium für 72 h bei 15 °C durchgeführt. Im Anschluss an die Expression (2.4.3) wurden die Zellen aufgeschlossen (2.10.1), wobei im Vergleich zum bisherigen Verfahren die Zellsuspension vor und direkt nach dem Zellaufschluss mittels FRENCH[®] Press eingefroren wurden, damit möglichst wenige lebende Zellen in der Suspension enthalten sind. Diese würden bei späteren IB Präparationen mit den KatIBs zusammen abzentrifugiert werden.

Um zu testen, ob die *A*tHNL-KatIBs auch nach mehrfacher Behandlung mit Puffern noch unlöslich bleiben oder mit jedem Resuspendierungsschritt ein Teil des Proteins in Lösung übergeht, wurde nach der Trennung des Zellextraktes in die lösliche und die unlösliche Fraktion das *A*tHNL-KatIB-enhaltende Pellet in *A*tHNL-Zellaufschlusspuffer pH 8 (2.10.1) resuspendiert und zentrifugiert. Dieses Waschen der KatIBs wurde mehrfach wiederholt, wobei im letzten Schritt der HNL-Assaypuffer (2.10.6) mit einem pH-Wert von 5,5 für das Resuspendieren der *A*tHNL-KatIBs verwendet wurde. Das Absenken des pH-Werts war nötig, um bei einer späteren Verwendung der KatIBs zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese die chemische Hydrocyanierungsreaktion zu unterdrücken (1.4) und gleichzeitig zu überprüfen, ob ein niedrigerer pH-Wert eine Veränderung der Löslichkeit des Proteins zur Folge hat. Alle erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.10.5) analysiert.

Auf dem SDS-Gel (Abb. 14) ließ sich erkennen, dass hauptsächlich der erste Zentrifugationsschritt zur Trennung des Zellextraktes in die lösliche und unlösliche Proteinfraction einer groben Proteinreinigung gleichkommt (Abb. 14, vergl. ZE und U1). Im Vergleich zum Zellextrakt waren deutlich weniger Fremdproteine in den isolierten *A*tHNL-KatIBs enthalten, allerdings noch immer mehr als beispielsweise nach einer IMAC. In den weiteren Waschschritten konnte nur eine sehr geringfügige Veränderung bezüglich der Proteinmenge der Probe sowie deren Zusammensetzung festgestellt werden. In den Überständen, insbesondere beim Waschen mit einem Puffer mit niedrigerem pH-Wert (Abb. 14, L4), ließen sich Banden mit der für das Fusionsprotein erwarteten molekularen Masse von 39 kDa identifizieren. Diese

waren allerdings im Vergleich zu den Banden in der KatIB Fraktion (Abb. 14, U4) so schwach, dass sie vernachlässigt werden konnten.

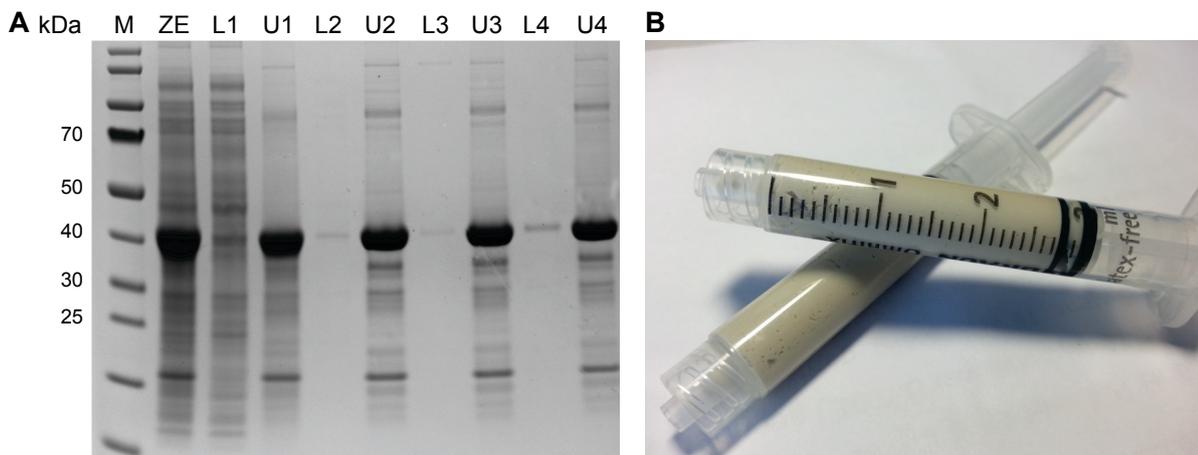


Abb. 14: A) SDS-PAGE Analyse der Schritte zur Isolierung von AtHNL-KatIBs und B) isolierte AtHNL-KatIBs. Im Anschluss an die Genexpression mittels Autoinduktion (2.4.3) wurden die *E. coli* BL21(DE3) Zellen aufgeschlossen (2.10.1) und das Zellextrakt (ZE) zentrifugiert, um die lösliche (L1) von der unlöslichen Proteinfraction zu trennen. Das erhaltene Pellet wurde im Ausgangsvolumen Zellaufschlusspuffer (2.10.1) resuspendiert (U1) und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde mehrfach wiederholt (L2, U2, L3, U3, L4, U4), wobei im letzten Schritt statt Zellaufschlusspuffer HNL-Assaypuffer pH 5,5 (2.10.6) verwendet wurde. Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE (4 - 12 % Gradientengel, 2.10.5) analysiert. B) Nach der Isolierung der KatIBs wurden diese zur leichteren Handhabung in Spritzen bei -80 °C gelagert.

Das Experiment zeigte, dass nach mehrfacher Behandlung der AtHNL-KatIBs keine Veränderung der Löslichkeit oder der Proteinzusammensetzung auftrat. Dieses Verhalten ist mit einer Proteinimmobilisierung (1.3.3, 1.5.1) vergleichbar, wobei allerdings kosten- und zeitintensive Arbeitsschritte und Materialien [87] vermieden werden können. Daher stellen KatIBs als biologisch herstellbares Enzymimmobilisat eine kostengünstige Alternative zu herkömmlichen Enzymimmobilisaten dar.

Eine Immobilisierung kann darüber hinaus die Eigenschaften des Zielenzym ändern und dessen Aktivität bzw. Stabilität beeinflussen [62, 63]. Daher sollte die Aktivität der AtHNL-KatIBs und der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität im Rahmen einer eingehenden Charakterisierung überprüft werden.

AtHNL-KatIBs konnten durch Zentrifugation aus wässrigen Suspensionen vollständig zurückgewonnen werden. Daher können sie als natürlich produzierte Enzymimmobilisate angesehen werden, für deren Herstellung keine zusätzliche Arbeitszeit oder Material investiert werden muss.

3.5 *A*tHNL-KatIBs besitzen eine erhöhte Stabilität im schwach sauren pH-Bereich

Für die Charakterisierung der *A*tHNL-KatIBs wurde in einem ersten Schritt ihre spezifische Aktivität ermittelt. Dazu wurden die isolierten *A*tHNL-KatIBs in HNL-Assaypuffer pH 5,5 (2.10.6) resuspendiert und die Proteinkonzentration der Suspension mittels der Bonde-Methode (2.10.4.1.1), einem modifizierten Bradford-Assay, bestimmt. Anschließend wurde die Probe soweit verdünnt, dass die Aktivität im Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassay (2.10.6) messbar war. Aus der Proteinkonzentration und dem Umsatz von Mandelonitril konnte die spezifische Aktivität errechnet werden. Als Vergleichswert wurde die spezifische Aktivität der gereinigten wildtypischen *A*tHNL ermittelt. Da die Proteine allerdings eine unterschiedliche molare Masse besitzen und somit unterschiedlich viele Moleküle des jeweiligen Enzyms eingesetzt wurden, wurde für einen genaueren Vergleich der Aktivitäten die molekulare Masse miteinbezogen und die Wechselzahl k_{cat} ermittelt. Diese gibt die Anzahl der Umsätze pro Enzymmolekül und Sekunde wieder. Für die wildtypische *A*tHNL ergab sich ein Wert von $38,6 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$, während die *A*tHNL-KatIBs mit $4,3 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ lediglich 11 % dieses Werts erreichen konnten.

Anhand der ermittelten k_{cat} -Werte scheinen die *A*tHNL-KatIBs gegenüber der wildtypischen *A*tHNL eine verringerte Aktivität zu besitzen. Allerdings sind die *A*tHNL-KatIBs nicht im gleichen Maße gereinigt, wie die wildtypische *A*tHNL. Dadurch wird in der Berechnung der Aktivität die Menge an aktivem Enzym überschätzt, wodurch der Aktivitätswert niedriger ausfällt als er in Wirklichkeit ist. Darüber hinaus bestehen die *A*tHNL-KatIBs nicht nur aus korrekt gefaltetem Protein, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem großen Teil aus fehlgefaltetem, inaktivem Protein. Dies trägt zusätzlich zu einer scheinbar verringerten Aktivität bei. Auch die Form und Beschaffenheit der KatIB-Partikel könnte zum Beispiel die Zugänglichkeit für Substrat zum Enzym limitieren und auf diese Weise deren messbare Aktivität verringern.

Als nächsten Schritt der Charakterisierung der *A*tHNL-KatIBs wurde der Einfluss der pH-Werts auf die Aktivität bestimmt (2.10.6.1). Dazu wurden Proben resuspendierter *A*tHNL-KatIBs in HNL-Assaypuffer (2.10.6) mit verschiedenen pH-Werten zwischen pH 3,5 und pH 5,0 verdünnt und nach fünf Minuten Inkubation die Restaktivität mittels des Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays (2.10.6) bestimmt. Als

Referenz dienten Werte der wildtypischen *A β HNL* [183] und der bisher stabilsten Fusion *cFbFP-A β HNL* [123].

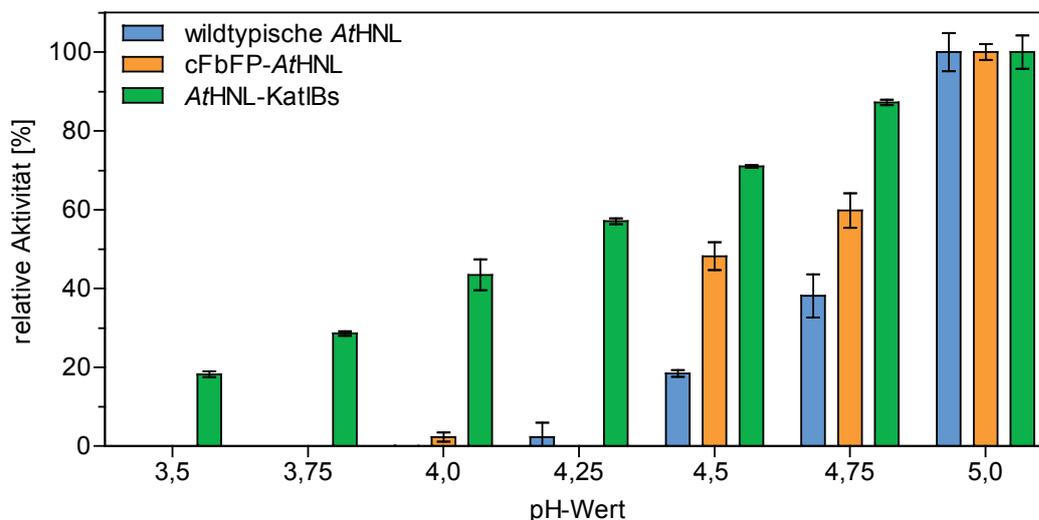


Abb. 15: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der wildtypischen *A β HNL* [183] und der stabilisierten *cFbFP-A β HNL* Fusion [123] im Vergleich zu *A β HNL-KatIBs*. Für die Aktivitätsmessung wurden resuspendierte KatIBs mit HNL-Assaypuffer (2.10.6) des entsprechenden pH-Werts verdünnt und für 5 min bei 25 °C und 1000 UpM in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität des jeweiligen Ansatzes mithilfe des Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays (2.10.6) gemessen. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen vom Mittelwert einer unabhängigen Dreifachbestimmung.

Wie erwartet wurde für alle Konstrukte mit sinkenden pH-Werten eine reduzierte Aktivität nachgewiesen (Abb. 15). Allerdings konnte bei pH-Werten, bei denen sowohl die wildtypische *A β HNL* als auch die deutlich stabilere *cFbFP-A β HNL* Fusion keine Aktivität mehr zeigten, für *A β HNL-KatIBs* noch deutliche Aktivität gefunden werden. Zum Beispiel besaßen die KatIBs bei pH 4,25 57 % ihrer Anfangsaktivität und sogar bei dem niedrigsten gemessenen pH-Wert von 3,5 noch immer 18 % Restaktivität. Dies deutete bereits auf eine stark erhöhte Stabilität der *A β HNL-KatIBs* in Bezug auf Lösungen mit niedrigen pH-Werten hin.

Aufgrund des stark veränderten Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität der *A β HNL-KatIBs* im Vergleich zur wildtypischen *A β HNL* wurde im nächsten Schritt der Charakterisierung die pH-Stabilität in Form von pH-abhängigen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der KatIBs im Bereich von pH 4,5 bis pH 3,5 bestimmt (2.10.6.2). Dazu wurden resuspendierte *A β HNL-KatIBs* mit HNL-Assaypuffer des jeweiligen pH-Werts verdünnt und bis zu 24 Stunden inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden aus den Ansätzen Proben entnommen und die Restaktivität mittels des Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays (2.10.6) bestimmt. Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$)

wurden durch die Anpassung der experimentellen Daten an eine Exponentialfunktion erster Ordnung ermittelt.

Tab. 11: pH-abhängige Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der <i>A</i> tHNL-KatIBs im Vergleich zur wildtypischen <i>A</i> tHNL und der stabilisierten cFbFP- <i>A</i> tHNL Fusion.			
pH-Wert	wildtypische <i>A</i> tHNL [183]	cFbFP- <i>A</i> tHNL [123]	<i>A</i> tHNL-KatIBs ^[a]
4,50	1,5 ± 0,2 min	5,7 ± 0,2 min	287,4 ± 9,7 min
4,25	n.b.	n.b.	105,9 ± 10,5 min
4,00	n.b.	n.b.	80,8 ± 2,3 min
3,75	n.b.	n.b.	22,4 ± 1,5 min
3,50	n.b.	n.b.	11,2 ± 1,2 min

n.b.: nicht bestimmt. Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) wurden durch die Anpassung der experimentellen Daten an eine Exponentialfunktion erster Ordnung ermittelt. Die angegebenen Fehler stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert einer unabhängigen Dreifachbestimmung dar. ^[a]Reaktion: Endpunkt-basierter Mandelonitril-Spaltungsassay (2.10.6). Die Inkubation erfolgte in HNL-Assay-puffer des entsprechenden pH-Werts bei 25 °C und 1000 UpM.

Als Referenz dienten hier ebenfalls das cFbFP-*A*tHNL Fusionsprotein [123] und die wildtypische *A*tHNL [183]. Für beide Referenzproteine war pH 4,5 der niedrigste pH-Wert, bei dem Halbwertszeiten bestimmt werden konnten. Bei niedrigeren pH-Werten war der Verlust an Aktivität zu schnell für die Handhabung des Assays. Wie bereits bei der Überprüfung des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität, zeigte sich bei den Messungen, dass die *A*tHNL-KatIBs über eine stark erhöhte Stabilität verfügten (Tab. 11). Bei pH 4,5 zeigten die *A*tHNL-KatIBs nach 287,4 ± 9,7 min noch immer etwa 50 % ihrer Anfangsaktivität. Das entspricht einer 190-fachen Verbesserung gegenüber der wildtypischen *A*tHNL und einer 50-fachen Verbesserung gegenüber der bisher stabilsten cFbFP-*A*tHNL Fusion [123]. Die hohe Resistenz gegenüber Lösungen mit niedrigen pH-Werten ermöglichte es, Halbwertszeiten bis zu einem pH-Wert von 3,5 zu bestimmen. Bei dem niedrigsten getesteten pH-Wert besaßen die *A*tHNL-KatIBs nach ca. 11 min noch immer 50 % ihrer Anfangsaktivität.

Eine mögliche Erklärung für diese drastische Verbesserung der Stabilität könnte in der Größe und der Struktur der *A*tHNL-KatIBs begründet sein. IBs sind runde bis fassförmige Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 500 nm [184] und bestehen daher aus vielen Proteinschichten. In den Partikeln sind die Proteine so dicht gepackt, dass die einzelnen Moleküle sich gegenseitig stabilisieren. Zusätzlich könnte die poröse Struktur [185, 186] von KatIBs auch während der Inkubation noch Puffer mit einem höheren pH-Wert enthalten. Auf diese Weise würde nur die äußere

Proteinschicht durch den niedrigen pH-Wert der Umgebung inaktiviert werden, während die inneren Proteinmoleküle einer weniger „aggressiven“ Umgebung ausgesetzt wären.

*A*tHNL-KatIBs zeigten im Vergleich zu der wildtypischen *A*tHNL und der stabilisierten cFbFP-*A*tHNL Fusion Aktivität bei deutlich geringeren pH-Werten bis zu einem pH von 3,5. Dabei konnten bereits bei einem pH-Wert von 4,5 eine 190-fache Verbesserung der Halbwertszeit gegenüber der wildtypischen *A*tHNL erzielt werden.

3.6 Anwendung von *A*tHNL-KatIBs für die Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen

Für eine biotechnologische Anwendung von HNLs ist nicht die für die bisherige Charakterisierung verwendete Spaltungsreaktion (Cyanogenese) interessant, sondern die entsprechende Rückreaktion, bei der aus Cyanwasserstoff (HCN) und einem Aldehyd bzw. einem Keton ein Cyanhydrin gebildet wird (Hydrocyanierung, Abb. 16).

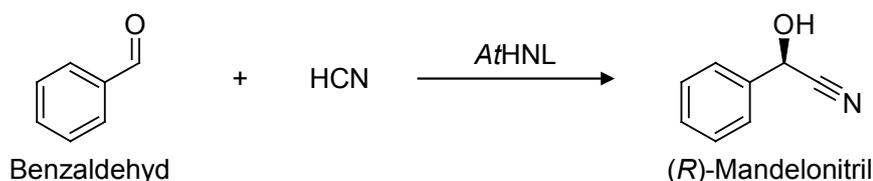


Abb. 16: Zur Charakterisierung verwendete Hydrocyanierungsreaktion. Die *A*tHNL katalysiert die Umsetzung von Benzaldehyd mit HCN zu (*R*)-Mandelonitril.

Die bei dieser Reaktion gebildeten enantiomerenreinen Cyanhydrine sind interessante Grundbausteine für komplexere Produkte [92]. Deren Synthese wird allerdings durch eine Racemat-bildende Nebenreaktion behindert [107], welche zum Beispiel durch eine sehr geringe Wassermenge im Reaktionssystem unterdrückt werden kann (1.4). Daher wird die *A*tHNL in einem monophasischen mikrowässrigen Ansatz in Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) mit hohen Substratkonzentrationen verwendet. Um unter diesen Bedingungen ein Recycling des Biokatalysators zu ermöglichen, wurden bereits mehrere verschiedene Methoden zur Immobilisierung getestet (1.5) [114]. Da die in dieser Arbeit verwendeten *A*tHNL-KatIBs ebenfalls natürliche Immobilisate

darstellen, sollte getestet werden, ob diese in einer Cyanhydrin-Synthesereaktion einsetzbar sind.

3.6.1 Nasse *A*tHNL-KatIBs können zur Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-Mandelonitril eingesetzt werden

In einem ersten Versuch zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese (2.10.7) wurden die *A*tHNL-KatIBs im Anschluss an die Isolierung und die Waschschrirte (2.10.2) direkt in zwei verschiedenen Mengen in die Reaktion eingesetzt. Für die Synthesereaktion wurde MTBE als monophasisches organisches Reaktionsmedium verwendet. In diesem konnten die Substrate, insbesondere der schlecht in Wasser lösliche Benzaldehyd, in hohen Konzentrationen eingesetzt werden (2 M HCN, 500 mM Benzaldehyd, 2.10.7.1). Nach dem Start der Reaktion wurden nach definierten Zeitpunkten Proben aus der Reaktion entnommen und der Umsatz sowie der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) des gebildeten Produktes mittels chiraler Gaschromatographie (GC) analysiert (2.10.7).

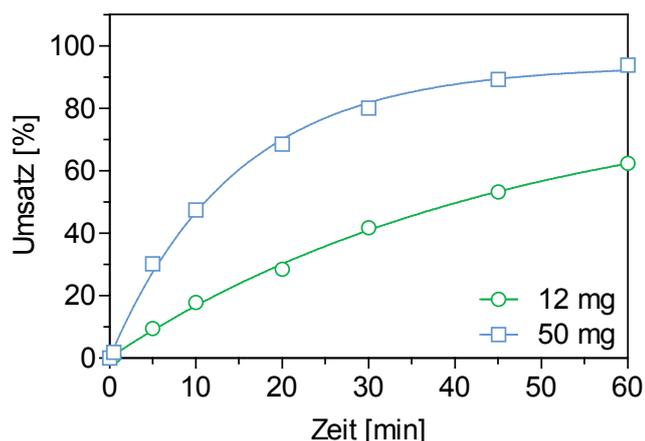


Abb. 17: (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen mit *A*tHNL-KatIBs als Biokatalysator. In die Synthesereaktion (2.10.7) wurden in zwei Ansätzen 12 und 50 mg *A*tHNL-KatIBs (Nassgewicht) eingesetzt. Die Reaktion wurde in fest verschließbaren Glasgefäßen mit Septum durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) unter Argon gestartet und über einen Zeitraum von 60 min Proben entnommen. Der Benzaldehydverbrauch, die Produktzunahme sowie der *ee* des Produktes wurden mittels chiraler GC analysiert (2.10.7). In beiden Reaktionen wurden *ee*-Werte von über 99 % für das (*R*)-Produkt erreicht.

Mit sowohl 50 mg als auch 12 mg der *A*tHNL-KatIBs ließen sich deutliche Umsätze der Substrate zu dem Produkt (*R*)-Mandelonitril nachweisen (Abb. 17). Dabei konnte mit 50 mg KatIBs nach einer Stunde Reaktionszeit 94 % Umsatz und somit nahezu

Vollumsatz von Benzaldehyd erreicht werden. Bei Verwendung von 12 mg Biokatalysator konnte innerhalb von einer Stunde immerhin 62 % Umsatz nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurden ausgezeichnete ee-Werte des Produktes mit über 99 % (*R*)-Mandelonitril gemessen. Diese Ergebnisse zeigen die generelle Anwendbarkeit von AtHNL-KatIBs in der Biokatalyse zur Gewinnung enantiomerenreiner Cyanhydrine.

AtHNL-KatIBs zeigten in einem monophasischen mikrowässrigen Reaktionssystem deutliche Aktivität. So konnten bis zu 94 % Benzaldehyd mit HCN innerhalb einer Stunde zu (*R*)-Mandelonitril mit einem ausgezeichneten ee von über 99 % umgesetzt werden.

3.6.2 AtHNL-KatIBs können für die Synthese von Cyanhydrinen einfach wiederverwendet werden

AtHNL-KatIBs sollten aufgrund ihrer Eigenschaft als natürliche Immobilisate die Möglichkeit bieten, aus der Reaktionslösung auf einfache Art und Weise zurückgewonnen und in einer neuen Reaktion wiederverwendet zu werden. Um dieses Recycling des Biokatalysators zu ermöglichen, sollten die AtHNL-KatIBs in einer Nylonmembran mit einer Porengröße von 40 μm versiegelt werden und in einem sog. Teebeutelansatz wiederverwendet werden. Dabei können die gesamten, in die Reaktion eingesetzten KatIBs, durch einfaches Entnehmen des Nylonbeutels aus der Reaktion entfernt werden.

Im Allgemeinen sind IBs allerdings mit einer Größe von 50 bis 500 nm [184] deutlich kleiner als die 40 μm großen Poren der verwendeten Membran. Daher wurde in einem einfachen Experiment überprüft, ob die Membran dennoch in der Lage ist, die AtHNL-KatIBs zurückzuhalten (2.10.7.2). Für das Experiment wurden nasse KatIBs in der Membran versiegelt und im Inneren eines Reaktionsgefäßes an einem durch das Septum gestochenen Draht befestigt. Auf diese Weise ließen sich die KatIBs durch Ziehen an dem Draht jederzeit aus dem Reaktionsmedium entfernen. Nach dem Start der Mandelonitril-Synthesereaktion (2.10.7) wurden über einen Zeitraum von 90 min Proben entnommen, wobei die KatIBs nach 15 min aus der Lösung entfernt und nach 60 min wieder eingetaucht wurden.

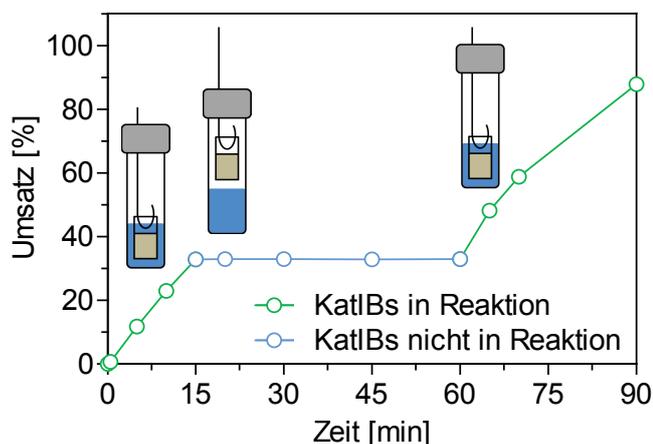


Abb. 18: Test der Rückhaltung von $AfHNL$ -KatIBs durch eine Nylonmembran. 300 mg KatIBs (Nassgewicht) wurden in einer Nylonmembran (Porengröße 40 μm) versiegelt und im Inneren eines fest verschließbaren Reaktionsgefäßes an einem durch das Septum gestochenen Draht befestigt. Unter Argon wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde durch Probenentnahme über einen Zeitraum von 90 min mittels chiraler GC-Analyse verfolgt (2.10.7). Nach 15 min wurde durch Ziehen an dem Draht die Reaktion unterbrochen und nach 60 min durch Absenken des Beutels erneut gestartet (2.10.7.2).

In den ersten 15 min der Reaktion konnte deutlicher Umsatz festgestellt werden (Abb. 18). In dieser Zeit wurden 33 % des maximal möglichen Produktes gebildet. Nachdem die in dem Nylonbeutel versiegelten KatIBs aus der Reaktionslösung entfernt wurden, konnte in den entnommenen Proben keine weitere Produktzunahme nachgewiesen werden (Abb. 18, blaue Linie). Erst nachdem die KatIBs nach 60 min Reaktionszeit wieder in die Reaktion eingesetzt wurden, fand erneut Produktbildung statt.

Anhand der Daten ließ sich eindeutig feststellen, dass die Nylonmembran trotz der im Vergleich zu den KatIBs deutlich größeren Poren die IB-Partikel komplett zurückhalten konnte. Wäre dies nicht der Fall gewesen, wäre nach der Entnahme des Beutels aus der Reaktion weiterhin eine (wenn auch schwächere) Produktbindung erwartet worden, da KatIBs in der Reaktionslösung zurückbleiben würden. Aufgrund dieses Experiments wurde die Nylonmembran als ausreichend dicht identifiziert und für weitere Recyclingexperimente verwendet. Allerdings konnte trotz einer deutlich größeren Menge an eingesetzten $AfHNL$ -KatIBs lediglich ein ähnlicher Umsatz wie bei den ersten Syntheseexperimenten (3.6.1) erzielt werden (vergl. Abb. 17 und Abb. 18). Wahrscheinlich führt die Verwendung der Nylonmembran zu einer Diffusionslimitierung, die durch eine geringere Beweglichkeit der KatIBs in dem Reaktionsmedium im Vergleich zum Einsatz ohne Beutel erklärt werden kann.

In einem neuen Ansatz wurden die *A*tHNL-KatIBs in der Nylonmembran versiegelt und dieses Mal ohne die Befestigung an dem Septum des Deckels verwendet. Anschließend wurde die Mandelonitril-Synthesereaktion (2.10.7) gestartet und über einen Zeitraum von 60 min verfolgt. Nach der ersten Reaktion wurde der Beutel aus dem Reaktionsgefäß entfernt, mit MTBE gewaschen, um Substrate und Reaktionsprodukte zu entfernen und für eine neue Reaktion verwendet (2.10.7.3). Auf diese Weise wurden vier aufeinanderfolgende Reaktionen durchgeführt.

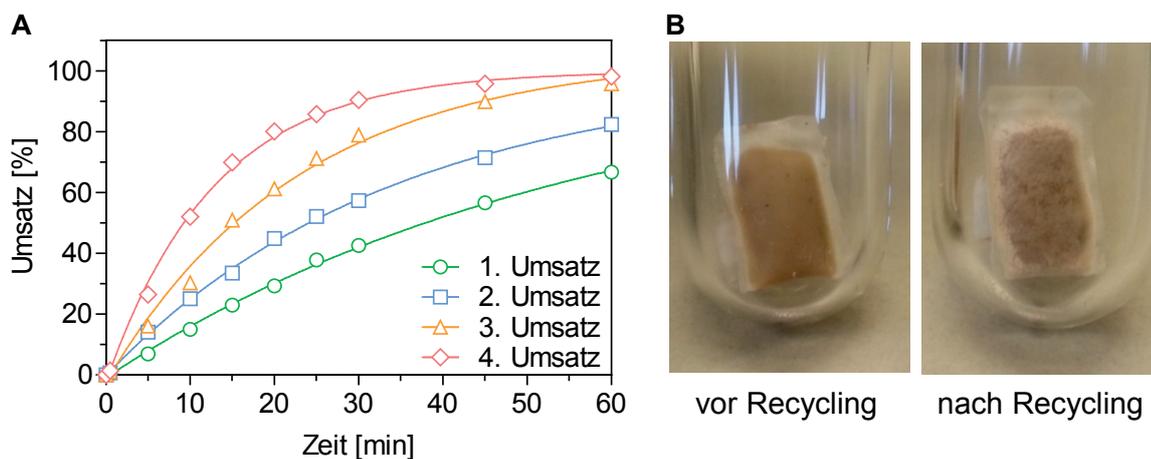


Abb. 19: Recycling von *A*tHNL-KatIBs zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril. Für das Recycling wurden 500 mg *A*tHNL-KatIBs (Nassgewicht) in einer Nylonmembran versiegelt und in einem fest verschließbaren Reaktionsgefäß aus Glas platziert. Anschließend wurde die erste Reaktion durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) gestartet (2.10.7). Nach dem Ende der Reaktion wurden die KatIBs aus dem Gefäß entfernt und mit MTBE gewaschen, bevor sie für eine weitere Syntheserunde verwendet wurden. Auf diese Weise wurden vier aufeinanderfolgende Umsätze durchgeführt (2.10.7.3). A) Verlauf der vier Reaktionen. Zu definierten Zeiten wurden Proben entnommen und Benzaldehydverbrauch sowie Produktbildung und *ee* des Produktes mittels chiraler GC analysiert. B) Vergleich von *A*tHNL-KatIBs in Nylonbeuteln vor und nach dem Recycling.

Innerhalb der Reaktionszeit fand in allen Ansätzen die Umsetzung von Benzaldehyd mit HCN zu (*R*)-Mandelonitril statt (Abb. 19, A), wobei in jedem der Umsätze ein ausgezeichnetes *ee* von über 98 % (*R*)-Produkt beobachtet werden konnte. Vor der Durchführung des Experiments wurde erwartet, dass der von den *A*tHNL-KatIBs katalysierte Umsatz in den vier aufeinanderfolgenden Reaktionen entweder unverändert bleibt oder im Vergleich zum ersten Umsatz abnimmt. Allerdings war das genaue Gegenteil der Fall. Mit jeder weiteren Reaktion, die mit den KatIBs durchgeführt wurde, stieg der erzielte Umsatz deutlich um einen zwischen den Reaktionen vergleichbaren Wert an. Dabei wurde in der ersten Reaktion nach einer Stunde 67 % Umsatz erzielt (Abb. 19, A, grün), während dieser Wert in der vierten Reaktion bereits nach 15 min, also lediglich einem Viertel der Zeit, überschritten

wurde (Abb. 19, A, rot). Auch an den im Nylonbeutel enthaltenen *AfHNL*-KatIBs konnte eine Veränderung festgestellt werden (Abb. 19, B). Der Beutelinhalt besaß nach dem Recycling eine veränderte Farbe und war an den Rändern sichtlich heller als vor dem Recycling. Darüber hinaus waren die KatIBs nach dem Recycling deutlich trockener und fester, während unbehandelte KatIBs einer zähen Paste ähneln.

Insbesondere die optische Veränderung und die verringerte Feuchtigkeit der verwendeten *AfHNL*-KatIBs deuteten auf eine scheinbar erhöhte Aktivität durch Verringerung des in den KatIBs enthaltenen Wassers hin. Dabei könnte das Wasser in den KatIBs eine Diffusionsbarriere für das in Wasser schlecht lösliche Substrat Benzaldehyd bilden und somit die messbare Aktivität der *AfHNL*-KatIBs beeinträchtigen. Bei einem niedrigeren Wassergehalt könnte diese Barriere verringert werden und somit die Aktivität im Vergleich zu nassen KatIBs höher erscheinen lassen. Da zum Waschen der KatIBs zwischen den einzelnen Umsätzen trockener MTBE verwendet wurde, ist dies die wahrscheinlichste Ursache für den Entzug des Wassers. Um dies zu überprüfen, wurden weitere Versuche mit *AfHNL*-KatIBs in dem mikrowässrigen Reaktionssystem durchgeführt.

In einem sog. Teebeutelansatz konnte gezeigt werden, dass *AfHNL*-KatIBs dazu geeignet sind, wiederverwendet zu werden. Allerdings zeigte sich entgegen der Erwartungen nach jeder weiteren Verwendung eine Verbesserung des während der Reaktionszeit erzielten Umsatzes.

3.6.3 Die Produktion von Cyanhydrinen mittels *AfHNL*-KatIBs kann durch eine Vorbehandlung mit MTBE beschleunigt werden

Um zu überprüfen, ob der MTBE während der Waschschritte des Recyclings für den Wasserentzug aus den *AfHNL*-KatIBs verantwortlich ist, wurde ein Test mit drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt (2.10.7.4.1). Für jeden der Ansätze wurden 280 mg *AfHNL*-KatIBs (Nassgewicht) in einem Nylonbeutel versiegelt. Mit dem ersten Beutel wurden als Referenz zwei aufeinanderfolgende Synthesereaktionen mit einem Waschschrift in trockenem MTBE dazwischen durchgeführt, um einen Recyclingschritt nachzustellen. Der zweite Beutel wurde vor der Verwendung für eine Stunde

in mit Puffer-gesättigtem MTBE inkubiert, während der dritte Beutel für eine Stunde mit trockenem MTBE behandelt wurde, um anschließend in eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion (2.10.7) eingesetzt zu werden.

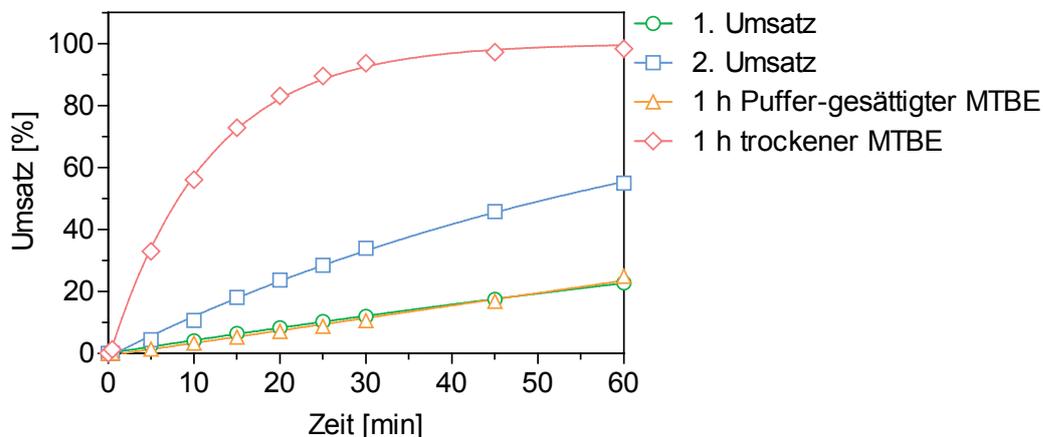


Abb. 20: (*R*)-Mandelonitril-Synthese mit unterschiedlich vorbehandelten AtHNL-KatIBs. Für den Versuch wurden drei Nylonbeutel mit je 280 mg AtHNL-KatIBs (Nassgewicht) vorbereitet und unterschiedlich verwendet (2.10.7.4.1). Der erste Beutel wurde direkt in eine Synthesereaktion eingesetzt (grün), anschließend mit trockenem MTBE gewaschen und für eine zweite Reaktion verwendet (blau). Dies sollte als Referenz die im zuvor durchgeführten Recyclingexperiment beobachtete Aktivitätssteigerung nachstellen. Der zweite Beutel wurde für 1 h in mit 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 gesättigtem MTBE inkubiert (orange), während der dritte Beutel 1 h mit trockenem MTBE vorbehandelt wurde (rot). Alle Reaktionen wurden unter Argon durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) gestartet (2.10.7). Über einen Zeitraum von 60 min wurden aus den Reaktionen Proben entnommen und mittels chiraler GC der Umsatz sowie der *ee* des gebildeten Produktes verfolgt.

Mit den ersten beiden aufeinanderfolgenden Reaktionen konnte die Aktivitätssteigerung, die während des zuvor durchgeführten Recyclingexperiments beobachtet wurde, erfolgreich reproduziert werden (Abb. 20, grün und blau). Der zweite Ansatz, bei dem die AtHNL-KatIBs in mit Puffer-gesättigtem MTBE inkubiert wurden, zeigte keine veränderte Aktivität und lieferte im Vergleich zu der ersten Reaktion mit unbehandelten KatIBs einen identischen Umsatz (Abb. 20, orange). Im Gegensatz dazu wurde nach einer Stunde Inkubation in trockenem MTBE eine drastische Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt (Abb. 20, rot). Dabei konnte der Umsatz von 24 %, den die unbehandelten und die mit Puffer-gesättigtem MTBE behandelten AtHNL-KatIBs nach 60 min erreichten, bereits nach weniger als 5 min erzielt werden.

Mit den Ergebnissen aus diesem Experiment lässt sich eindeutig belegen, dass die Steigerung der Aktivität während des Recyclingexperiments (3.6.2) auf die Behandlung mit trockenem MTBE zwischen den einzelnen Umsätzen zurückzuführen ist. Dabei funktioniert die Verbesserung der Aktivität nur mit trockenem MTBE, da es im

Gegensatz zu Puffer-gesättigtem MTBE den feuchten KatIBs Wasser entziehen kann. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Entfernung eines Wasserfilms um die KatIBs in einer verbesserten Zugänglichkeit des schwer wasserlöslichen Substrats Benzaldehyd resultiert. Darüber hinaus können durch das vorhandene Wasser in den feuchten *A*tHNL-KatIBs auch Grenzflächen zwischen Wasser und MTBE entstehen, die als Diffusionsbarriere wirken.

Im nächsten Schritt zur Optimierung der Anwendbarkeit von *A*tHNL-KatIBs zur Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen sollte die Inkubationsdauer in trockenem MTBE bestimmt werden, die für das Erreichen maximaler Aktivität notwendig ist (2.10.7.4.1). Dazu konnte aufgrund der im vorherigen Experiment erhaltenen Ergebnisse die Menge an verwendeten *A*tHNL-KatIBs auf 150 mg (Nassgewicht) pro Ansatz verringert werden. Insgesamt wurden fünf Nylonbeutel mit *A*tHNL-KatIBs präpariert, jeweils für unterschiedliche Zeiten in trockenem MTBE inkubiert und in eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion (2.10.7) eingesetzt.

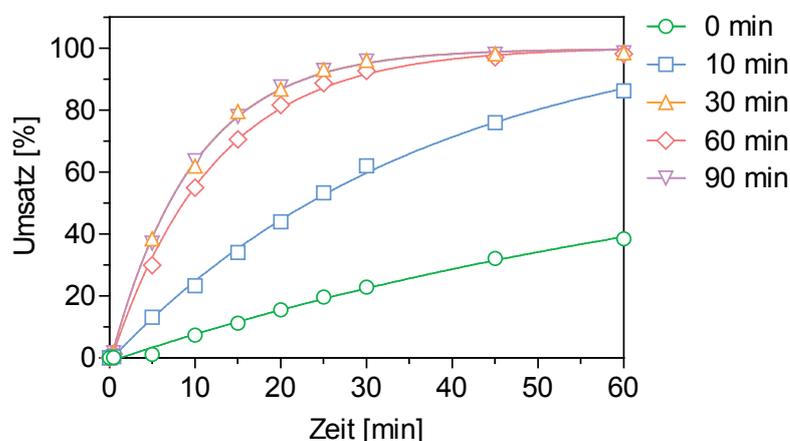


Abb. 21: Mittels *A*tHNL-KatIBs katalysierte Umsätze nach unterschiedlich langer Inkubation in trockenem MTBE. In fünf Nylonbeuteln wurden je 150 mg *A*tHNL-KatIBs (Nassgewicht) vorbereitet und für unterschiedliche Zeiten (siehe Bildlegende) in trockenem MTBE inkubiert (2.10.7.4.1). Im Anschluss wurde mit jedem Beutel eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionen unter Argon durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) gestartet (2.10.7). Innerhalb von 60 min wurden zu definierten Zeiten Proben aus den Reaktionen entnommen und mittels chiraler GC in Bezug auf den Umsatz und den ee des Produktes analysiert.

Wie erwartet war für die unbehandelten *A*tHNL-KatIBs ein langsamerer Umsatz als für die behandelten KatIBs nachzuweisen (Abb. 21, grün). Bereits nach 30 min Inkubation in trockenem MTBE war die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, da die beiden Proben, die länger inkubiert wurden, keine Verbesserung gegenüber

dem 30 min Wert zeigten (Abb. 21, vergl. orange mit rot und lila). Die entsprechenden *ee*-Werte waren mit 97 - 98 % (*R*)-Produkt in allen Fällen ausgezeichnet.

Dabei gibt es mehrere Erklärungen, warum nach einer Inkubationsdauer von 30 min keine weitere Beschleunigung der Reaktion stattfindet. Eine mögliche Ursache ist, dass das gesamte Wasser aus den KatIBs entzogen wurde. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass sich zwischen den KatIBs und dem MTBE ein Gleichgewicht eingestellt hat und somit ein gewisser Teil Wasser in den KatIBs enthalten bleibt. Dazu beitragen könnte ebenfalls, dass die *A*tHNL-KatIBs in dem Nylonbeutel nicht in einer dünnen Schicht, sondern in einem dicht gepackten Volumen vorliegen. Dadurch könnte das Wasser aus den äußeren Schichten entzogen worden aber im unzugänglicheren Zentrum des Beutels noch vorhanden sein. Gleichzeitig folgt aus dieser Hypothese, dass sich durch die dichte Packung der KatIBs in dem Nylonbeutel eine weitere Diffusionslimitierung, auch während der Synthesereaktion, ergibt.

In allen vorangegangenen Experimenten mit *A*tHNL-KatIBs konnte nach einer Behandlung mit trockenem MTBE festgestellt werden, dass sie deutlich trockener und fester wurden (Abb. 19, B). Dies sollte in einem weiteren Experiment ausgenutzt werden, wobei der Beutelinhalt durch wiederholte Inkubationen in MTBE getrocknet sowie durch Zerdrücken zerkleinert wurde und somit die zugängliche Oberfläche vergrößert werden sollte. Für das Experiment wurde ein aus vier Schritten bestehendes Protokoll entworfen (Abb. 22) (2.10.7.4.2). Um die Veränderungen in Bezug auf die Geschwindigkeit der Umsetzung zu überprüfen, wurden vier Nylonbeutel mit jeweils 150 mg *A*tHNL-KatIBs (Nassgewicht) vorbereitet. Während beim ersten Beutel nur der erste Schritt durchgeführt wurde, wurde bei den anderen Beuteln das Protokoll um je einen Schritt erweitert. Der Inhalt der Beutel wurde nach jedem einzelnen Schritt kurz an der Luft getrocknet und mit einem Spatel, soweit möglich, zerkleinert. Im Anschluss an die jeweilige Anzahl an Inkubations- und Zerkleinerungsschritten wurde mit den KatIBs eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion (2.10.7) gestartet.

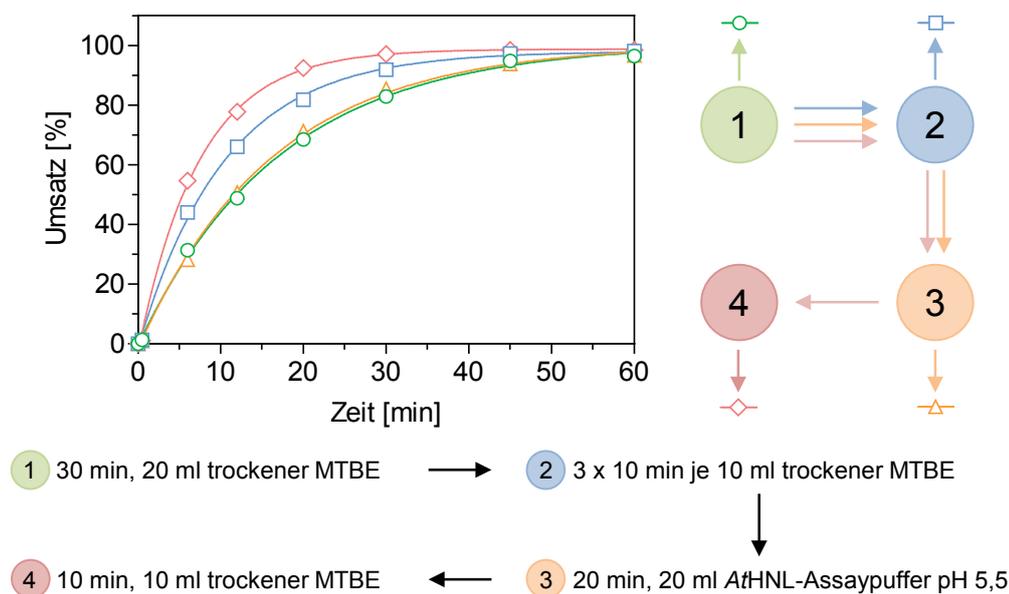


Abb. 22: (*R*)-Mandelonitril-Synthese mit unterschiedlich behandelten AtHNL-KatIBs. Vier vorbereitete Nylonbeutel mit je 150 mg KatIBs (Nassgewicht) wurden einem vierstufigen Inkubationsprotokoll unterzogen (2.10.7.4.2). Dabei wurde für den ersten Beutel lediglich der erste Schritt durchgeführt, während für jeden weiteren Beutel ein weiterer Schritt des Protokolls angewandt wurde. Im Anschluss an die unterschiedlich langen Inkubationen wurde mit den AtHNL-KatIBs eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion durchgeführt, um die Veränderungen in Bezug auf die Aktivität zu überprüfen. Alle Reaktionen wurden unter Argon durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) gestartet (2.10.7). Über einen Zeitraum von 60 min wurden aus den Reaktionen Proben entnommen und mittels chiraler GC der Umsatz sowie der ee des gebildeten Produktes verfolgt.

In allen durchgeführten Reaktionen konnte innerhalb von 60 min Vollumsatz mit einem ausgezeichneten ee von über 98 % (*R*)-Produkt erreicht werden (Abb. 22). Während bei dem Zerdrücken der KatIBs nach dem ersten Schritt des Protokolls noch deutlich Feuchtigkeit zu erkennen war, ließ sich diese durch den nächsten Schritt, welcher weitere drei Inkubationen in MTBE beinhaltete, optisch weiter reduzieren. Dabei entstand ein grobes Pulver, das immer noch von der Nylonmembran zurückgehalten werden konnte. Bei dem Vergleich des Umsatzes nach dem ersten und zweiten Schritt des Inkubationsprotokolls konnte festgestellt werden, dass weiteres Waschen und Zerkleinern des Beutelinhalts zu einer schnelleren Umsetzung der Substrate führt (Abb. 22, grün und blau). Der nächste Schritt, der dem Protokoll hinzugefügt wurde, sollte zeigen, ob den KatIBs zu viel Wasser entzogen wurde. Dazu wurden diese in HNL-Assaypuffer pH 5,5 (2.10.6) inkubiert, um dem System mehr Wasser zur Verfügung zu stellen. Nach diesem Schritt ging der erreichte Umsatz auf den Ausgangswert zurück (Abb. 22, orange), wobei die AtHNL-KatIBs als grobes und nasses Pulver vorlagen und nicht in ihre homogene Ausgangsform zurückkehrten. Insbesondere der Rückgang des Umsatzes auf den

Anfangslevel stützt ebenfalls die Hypothese, dass zu viel in den KatIBs enthaltenes Wasser eine Diffusionsbarriere für Benzaldehyd in dem mikrowässrigen Reaktionssystem darstellt. Auch der nächste Schritt des Protokolls könnte zur Bestätigung der Hypothese beitragen, denn durch erneutes Waschen mit trockenem MTBE konnte ein neuer Höchstwert in Bezug auf den Umsatz beobachtet werden (Abb. 22, rot). Dies könnte durch erneuten Entzug des Wassers und weiteres Zerkleinern der KatIBs zu begründen sein.

Da der schnellste Vollumsatz mit der Probe erreicht wurde, die das gesamte Protokoll durchlaufen hatte, wurde das Protokoll genutzt, um *A*tHNL-KatIBs für ein Recycling unter optimierten Bedingungen vorzubereiten.

In mehreren Schritten konnte die Verwendung der *A*tHNL-KatIBs optimiert werden. Dabei konnten potentielle Diffusionslimitierungen reduziert und die einzusetzende Menge an KatIBs in einem Nylonbeutel pro Reaktion von 500 mg auf 150 mg verringert werden.

3.6.4 Unter optimierten Bedingungen können *A*tHNL-KatIBs ohne großen Aktivitätsverlust mehrfach wiederverwendet werden

Unter den zuvor optimierten Bedingungen wurde das Recyclingexperiment erneut durchgeführt (2.10.7.3). Dazu wurden 150 mg *A*tHNL-KatIBs (Nassgewicht) in einem Nylonbeutel versiegelt und dem vollständigen Protokoll zur Steigerung des Umsatzes (2.10.7.4.2) unterzogen. Anschließend wurde der Beutel in eine erste (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion eingesetzt und nach Ende der Reaktion mit MTBE gewaschen. Auf diese Weise wurden vier aufeinanderfolgende Umsätze durchgeführt. Nach dem vierten Umsatz wurden die *A*tHNL-KatIBs über Nacht bei RT in HNL-Assaypuffer (2.10.6) gelagert und am nächsten Tag nach einem kurzen Waschschrift in MTBE in einer fünften Reaktion verwendet.

Im Unterschied zum ersten Recyclingversuch (3.6.2) wurde das zum Waschen verwendete MTBE-Volumen und die Dauer verringert, um einen weiteren Einfluss dieser Schritte auf die Aktivität der *A*tHNL-KatIBs zu reduzieren.

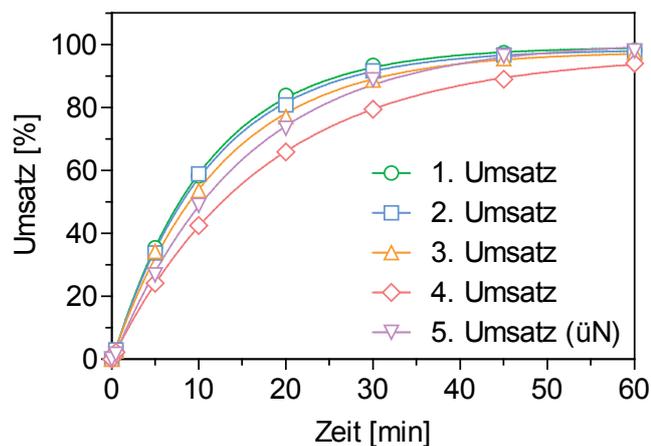


Abb. 23: Recycling von AtHNL-KatIBs unter optimierten Bedingungen zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril. Für das Recyclingexperiment (2.10.7.3) wurden 150 mg AtHNL-KatIBs (Nassgewicht) in einem Beutel aus Nylonmembran versiegelt, dem vollständigen Protokoll (2.10.7.4.2) unterzogen und in einem fest verschließbaren Reaktionsgefäß aus Glas platziert. Die erste Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) gestartet (2.10.7). Nach Ende der Reaktion wurde die Reaktionslösung abgenommen und der Beutel in 1 ml trockenem MTBE für 1 min gewaschen, bevor die nächste Reaktion gestartet wurde. Auf diese Weise wurden vier aufeinanderfolgende Umsätze durchgeführt. Nach der vierten Reaktion wurden die KatIBs in dem Beutel über Nacht in HNL-Assaypuffer (2.10.6) bei RT gelagert und am nächsten Tag nach einer 10 min Behandlung mit trockenem MTBE in eine fünfte Reaktion eingesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden den Reaktionen Proben entnommen und in Bezug auf den Umsatz sowie den ee des Produktes mittels chiraler GC analysiert. Das gebildete Produkt besaß in allen Fällen einen ee von über 98 % (*R*).

Während der vier aufeinanderfolgenden Reaktionen verringerte sich der erzielte Umsatz nur geringfügig (Abb. 23, grün, blau, orange und rot) und selbst nach der vierten Anwendung konnte ein Umsatz von 94 % mit einem ee von 98,5 % (*R*) nachgewiesen werden (Abb. 23, rot). Nach der Lagerung über Nacht in Puffer und der kurzen Behandlung der KatIBs mit trockenem MTBE zur Entfernung überschüssigen Wassers (2.10.6), konnte ein leicht verbesserter Umsatz im Vergleich zur vierten Reaktion des Recyclings beobachtet werden (Abb. 23, vergl. rot und lila). Dabei konnte ein Umsatz von 98 % und ein ee von 98,5 % (*R*) erzielt werden. Für diese Beobachtung kann es mehrere Erklärungen geben. Eine könnte sein, dass ein Teil der AtHNL-KatIBs während der ersten vier Runden des Recyclings inaktiviert wird, wobei diese Inaktivierung in Wasser reversibel ist. Auch der Wassergehalt der KatIBs könnte erneut Einfluss auf die Reaktion haben. Dabei könnte in den ersten vier Reaktions- und Waschschritten des Recyclings ein Teil des restlichen, für den Erhalt der optimalen Aktivität notwendigen Wassers aus den KatIBs entzogen werden, was zu einer Verringerung des Umsatzes führen könnte. Die Lagerung über Nacht in Puffer könnte den KatIBs eine gewisse Menge an Wasser zuführen, wodurch der Umsatz wieder steigt. Daher sollte wahrscheinlich nach drei bis vier Synthesereaktionen ein Inkubationsschritt mit Puffer erfolgen, um eine fortschreitende

Inaktivierung zu vermeiden und die Produktausbeute pro mg *A*tHNL-KatIBs zu erhöhen.

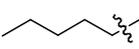
Nach der Optimierung des Vorbehandlungsverfahrens konnten *A*tHNL-KatIBs in fünf aufeinanderfolgenden Reaktionen mit nur geringem Aktivitätsverlust zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril eingesetzt werden. Dabei konnte in allen Reaktionen ein ausgezeichneter ee von über 98 % (*R*) nachgewiesen werden.

3.6.5 Die Verwendung der *A*tHNL in Form von KatIBs hat keinen Einfluss auf die Substratspezifität

Als weiterer Schritt zur Charakterisierung der *A*tHNL-KatIBs sollte überprüft werden, ob die Produktion als unlösliches Protein einen Einfluss auf die Substratspezifität im Vergleich zur wildtypischen *A*tHNL zur Folge hat. Dafür wurden pro Ansatz 150 mg KatIBs (Nassgewicht) dem Vorbehandlungsprotokoll (2.10.7.4.2) unterzogen und für die Synthese verschiedener Cyanhydrine verwendet (2.10.7). In die Reaktion wurden die behandelten KatIBs ohne den Nylonbeutel eingesetzt, um diesen als zusätzliche Diffusionsbarriere auszuschließen (vergl. 3.6.1 und 3.6.2). Die Reaktion sollte auf diese Weise beschleunigt und somit weniger Racemat durch die chemische Hintergrundreaktion gebildet werden. Letztere wurde zwar bei den bisher beschriebenen Versuchen mit Benzaldehyd als Substrat nicht in nennenswertem Ausmaß beobachtet, ist jedoch Substrat-abhängig. Als Substrate wurden zusätzlich zum Benzaldehyd die drei strukturell sehr unterschiedlichen Aldehyde 2-Chlorbenzaldehyd, 2-Furaldehyd und Hexanal gewählt.

Durch die frei eingesetzten *A*tHNL-KatIBs war die Reaktion, wie erwartet, deutlich schneller und mit allen Substraten konnte bereits nach 10 min fast vollständiger Umsatz (> 97 %) erzielt werden (Tab. 12). In Bezug auf den ee der verschiedenen Produkte konnten leichte Unterschiede festgestellt werden. So wurden die Produkte 1a und 1c mit ee-Werten von über 99 % (*R*) nahezu enantiomerenrein gebildet, während 1b und 1d mit ee-Werten von 96 % und 97 % geringfügig niedriger ausfielen. Im Vergleich zur wildtypischen *A*tHNL, die bei den Produkten 1a - c einen ee von 99 % und bei 1d von 96 % erreicht [114], sind diese Werte nahezu identisch.

Tab. 12: Synthese verschiedener Cyanhydrine katalysiert durch unterschiedliche *AfhNL* Präparationen.^{[a][b]}

$\text{R}^1\text{-CHO} + \text{HCN} \xrightarrow{\text{AfhNL-KatIBs}} \text{R}^1\text{-CH(OH)CN}$ Aldehyd 1a-d					
Produkt	R ¹	ee [%] ^[c]			
		AfhNL-KatIBs	wildtypische AfhNL [114]	Celite-AfhNL [114]	<i>E. coli</i> (AfhNL) ^[d] [117]
1a		> 99	99	99	98
1b		96	99	99	70
1c		> 99	99	98	30
1d		97	96	86	-

^[a]Reaktionsbedingungen: 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 500 mM Aldehyd und 0,1 mmol Dodecan als internen Standard; 150 mg (Nassgewicht) vorbehandelte *AfhNL*-KatIBs (2.10.7.4.2); 25 °C; 10 min. ^[b]Umsätze sind aufgrund verschiedener Reaktionszeiten und eingesetzter Proteinkonzentrationen nicht vergleichbar und daher nicht angegeben. ^[c]Bestimmt durch Aldehydverbrauch und Produktbildung anhand von chiraler GC-Analyse (2.10.7). ^[d]Reaktion katalysiert durch *AfhNL* (wildtypisch) produzierende *E. coli* Zellen.

Auch im Vergleich mit anderen immobilisierten *AfhNL* Präparationen lieferten *AfhNL*-KatIBs ähnliche oder sogar deutlich bessere *ee*-Werte für die gebildeten Produkte (Tab. 12). Die geringen Unterschiede im Vergleich zur wildtypischen *AfhNL*, insbesondere bezogen auf 1b, könnten sich anhand der Reaktionsbedingungen erklären lassen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass Reste des in den *AfhNL*-KatIBs enthaltenen Puffers bei dem stärker für die Nebenreaktion anfälligen 2-Chlorbenzaldehyd, die Racemat-bildende chemische Reaktion fördern. Eventuell könnten daher die *ee*-Werte durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen verbessert werden.

Alle getesteten Substrate wurden von den *AfhNL*-KatIBs akzeptiert und die entsprechenden Produkte mit ausgezeichneten *ee* Werten gebildet. Geringe Abweichungen im *ee*-Wert relativ zur wildtypischen *AfhNL* könnten vermutlich auf nicht optimierte Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein.

3.6.6 Lyophilisierte *A*tHNL-KatIBs katalysieren die Synthese von (*R*)-Mandelonitril schneller als vorbehandelte KatIBs

Nach den Beobachtungen in Bezug auf verbesserte Umsätze bei verringertem Wassergehalt der *A*tHNL-KatIBs sollte in einem letzten Versuch geklärt werden, ob die (*R*)-Mandelonitril-Synthese durch lyophilisierte KatIBs katalysiert werden kann. Dazu wurden 12 mg nasse und die äquivalenten Mengen an vorbehandelten (6 mg) (2.10.7.4.2) und lyophilisierten (4 mg) (2.10.3) KatIBs ohne Nylonbeutel in die Synthesereaktion eingesetzt (2.10.7).

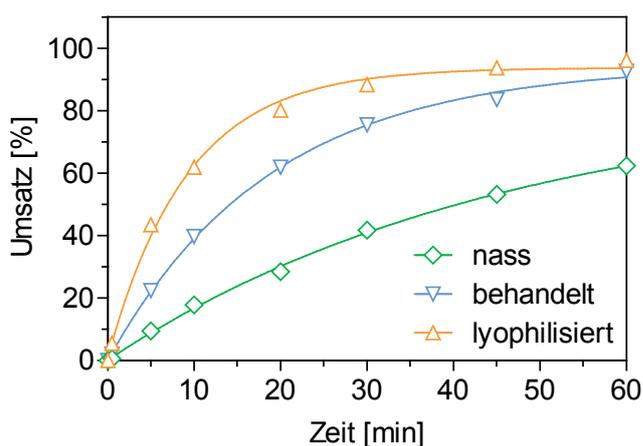


Abb. 24: Vergleich von nassen, behandelten und lyophilisierten *A*tHNL-KatIBs zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril. Zur Synthese wurden 12 mg nasse (grün) und die entsprechenden Mengen an behandelten (6 mg; blau) sowie lyophilisierten (4 mg; orange) KatIBs ohne Nylonbeutel eingesetzt (2.10.7). Die Reaktion wurde in fest verschließbaren Reaktionsgefäßen mit Septum durch Zugabe von 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) unter Argon Atmosphäre gestartet und über einen Zeitraum von 60 min Proben entnommen. Der Benzaldehydverbrauch, die Produktzunahme sowie der ee des Produktes wurden mittels chiraler GC analysiert.

In allen Reaktionen konnten deutliche Umsätze beobachtet werden, wobei überraschenderweise die Reaktion mit den lyophilisierten *A*tHNL-KatIBs am schnellsten ablief (Abb. 24). Im Vergleich zu den vorbehandelten KatIBs, mit denen nach 60 min 92 % Umsatz erzielt wurde (Abb. 24, blau), konnte bei Verwendung lyophilisierter KatIBs (Abb. 24, orange) bereits nach 45 min 93 % gebildetes Mandelonitril nachgewiesen werden. Auch in Bezug auf den ee des Produktes überraschten die trockenen *A*tHNL-KatIBs und erreichten genau wie die vorbehandelten und nass eingesetzten KatIBs einen ee-Wert von über 99 % (*R*).

Dieses Experiment zeigt, dass lyophilisierte *A*tHNL-KatIBs für die Synthese von enantiomerenreinen Cyanhydrinen verwendet werden können. Darüber hinaus

konnte durch den Vergleich von lyophilisierten mit behandelten KatIBs festgestellt werden, dass für die letzteren, trotz Reduzierung des enthaltenen Wassers, noch immer eine Diffusionslimitierung besteht.

Da die geringe Menge von lediglich 4 mg lyophilisierter *At*HNL-KatIBs für vollen Umsatz des Substrats innerhalb von 60 min ausreichte, wurde der Proteingehalt der *At*HNL-KatIBs bestimmt (2.10.4.2), damit ein besserer Vergleich mit der wildtypischen *At*HNL möglich war. Dabei ergab sich, dass 3,4 mg Protein in die Reaktion eingesetzt wurden. Um einen ähnlich guten Umsatz mit der wildtypischen *At*HNL zu erreichen, müssen 2 bis 6 mg gereinigten Enzyms in die Synthesereaktion eingesetzt werden [114, 116]. Daraus lässt sich schließen, dass die *At*HNL-KatIBs trotz ihrer scheinbar geringeren Aktivität in der Spaltung von Mandelonitril (3.5) in einem wässrigen Reaktionssystem, in der industriell interessanteren Synthesereaktion zur Gewinnung von (*R*)-Cyanhydrinen eine zum Wildtyp vergleichbare Aktivität zeigen.

Aufgrund des schnelleren Umsatzes der Substrate mit lyophilisierten im Vergleich zu mit MTBE behandelten *At*HNL-KatIBs, könnte durch Lyophilisieren das gesamte Behandlungsprotokoll übersprungen werden. Dadurch könnte der organische Abfall, der während der Behandlung anfällt, vermieden und somit die Verwendung von KatIBs in dem mikrowässrigen Reaktionssystem umweltfreundlicher gestaltet werden. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Recyclingversuch (2.10.7.3) mit lyophilisierten (2.10.3) *At*HNL-KatIBs durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass lyophilisierte KatIBs nicht durch die bisher verwendete Nylonmembran zurückgehalten werden können und sich sofort im Reaktionsmedium verteilen (Abb. 25).



Abb. 25: Vergleich der in einer Nylonmembran eingeschlossenen lyophilisierten, nassen bzw. behandelten *At*HNL-KatIBs im mikrowässrigen Reaktionsmedium. Während nasse und behandelte *At*HNL-KatIBs durch die Nylonmembran zurückgehalten werden (klares Reaktionsmedium), durchdringen lyophilisierte *At*HNL-KatIBs die Membran und verteilen sich schnell im gesamten Reaktionsmedium (trübes Reaktionsmedium).

Eine Möglichkeit, eine Wiederverwendung trotzdem durchführen zu können, wäre eine dichtere Membran zu verwenden. Diese würde allerdings erneut zu Diffusionslimitierungen führen, wodurch das Erzielen eines hohen Umsatzes fraglich wird. Für

das Recycling lyophilisierter KatIBs müsste daher wahrscheinlich eine neue Methode etabliert werden, um die KatIB-Partikel aus dem Reaktionsmedium abtrennen zu können. Dabei wäre ebenfalls eine Kombination mit anderen Immobilisierungsstrategien denkbar. So wurden aktive IBs in anderen Studien bereits mittels Glutardialdehyd quervernetzt oder in Alginat eingeschlossen, um die Partikel zu vergrößern und somit die Wiedergewinnung des Biokatalysators zu vereinfachen [187, 188].

Lyophilisierte *AthNL*-KatIBs waren bei einem Einsatz in dem mikrowässrigen Reaktionssystem zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril deutlich aktiver als nasse bzw. mit MTBE vorbehandelte KatIBs. Dadurch war es möglich, die für einen vollständigen Umsatz der Substrate nötige Menge an KatIBs auf ein Niveau zu reduzieren, das mit wildtypischem Enzym vergleichbar war. Lyophilisierte KatIBs ließen sich jedoch nicht mit dem bisherigen Teebeutelansatz für mehrere Reaktionen wiederverwenden.

3.7 KatIBs – Interessante Enzymimmobilisate für die Biokatalyse

In der vorangegangenen eingehenden Charakterisierung der *AthNL*-KatIBs konnte ihre Anwendbarkeit für biotechnologische Verfahren eindrucksvoll demonstriert werden. Dabei wurden viele Vorteile der KatIBs gegenüber löslichem Protein identifiziert. So wurden beispielsweise bereits während der heterologen Überexpression von Genen in *E. coli* BL21(DE3) große Mengen an Protein in Form von IBs gebildet (3.3), wobei die anschließende Teilreinigung des Proteins deutlich einfacher und ohne zusätzliche Materialien durchführbar war (3.4). Auch die Lagerung erwies sich als unproblematisch, da KatIBs ohne Verlust der Aktivität eingefroren oder sogar lyophilisiert werden konnten (3.6.6). Außerdem eröffnet die Eigenschaft als natürliches Immobilisat einfache Wege für ein Recycling des Biokatalysators und einer damit verbundenen höheren Ausbeute an Produkt pro g Katalysator (3.6.4). Darüber hinaus zeigten die KatIBs in verschiedenen Experimenten, dass sie besonders resistent gegenüber niedrigen pH-Werten und sogar organischen Lösungsmitteln sind (3.5, 3.6). Trotz der veränderten Eigenschaften blieb die Enantioselektivität und das Substratspektrum im Vergleich zum wild-

typischen Enzym unbeeinflusst (3.6.5), was für breite Anwendungsmöglichkeiten der KatIBs in der Biotechnologie spricht.

Insbesondere machen der verringerte Aufwand für die Isolierung der KatIBs und die direkte, natürliche Immobilisierung des Biokatalysators *A α HNL-KatIBs* zu einer attraktiven Alternative zu löslichem Protein und anderen aufwendiger zu produzierenden Enzymimmobilisaten. So werden beispielsweise die Kosten bereits durch einen Zellaufschluss und Abtrennen der Zelltrümmer im Vergleich zur Verwendung von ganzen Zellen verdoppelt (Abb. 26, A) [87]. Allerdings wird dennoch der größte Anteil an den Kosten für ein Enzym durch dessen Reinigung verursacht und kann eine weitere 5- bis 10-fache Steigerung der nötigen Investitionen bedeuten. Auch im Vergleich zu Immobilisierungen kann die Verwendung von KatIBs eine deutlich günstigere Alternative darstellen, da diese auf kein Trägermaterial angewiesen sind. Letzteres kann einen bedeutenden Anteil an den Kosten einer Immobilisierung haben, wie in dem Immobilisierungsbeispiel (Abb. 26, B) dargestellt ist.

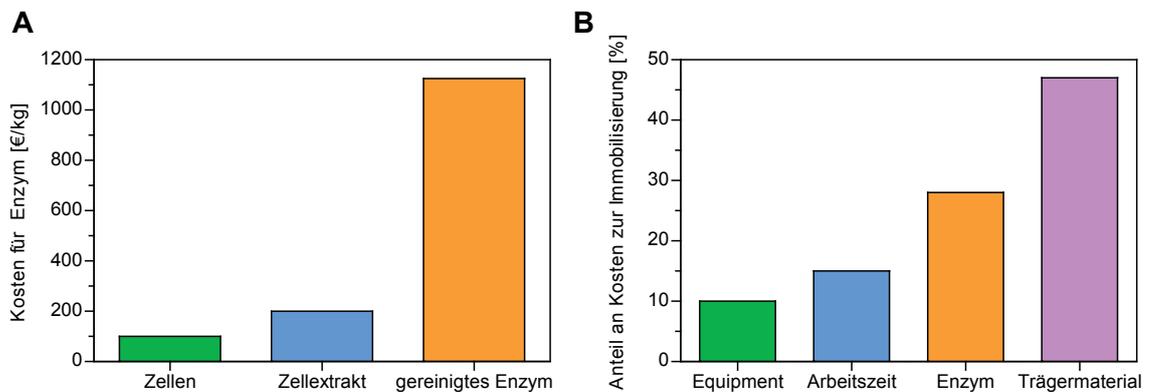


Abb. 26: Aufstellung der Kosten für Enzyme je nach Reinigungsgrad und die Kostenverteilung für eine Enzymimmobilisierung (modifiziert nach Tufvesson *et al.* 2011 [87]). A) Für die Enzymkosten je nach Reinheitsgrad im industriellen Maßstab wurde ein Beispiel für einen Prozess zur Herstellung einer β -Galaktosidase gewählt. Dabei werden Zellen mit enthaltenem Enzym durch Mikrofiltration gewonnen (Zellen), durch Homogenisierung aufgeschlossen, Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und der Überstand ultrafiltriert (Zellextrakt). Zur Reinigung des Enzyms wurden anschließend Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie sowie zwei Ultrafiltrationen durchgeführt. Bei anderen Enzymen können die Kosten stark variieren. B) Bei der Immobilisierung von Enzymen im industriellen Maßstab tragen insbesondere das verwendete Enzym (28 %) und das Trägermaterial (47 %) zu den Kosten bei. Dabei wurde als Beispiel ein poröses Polymer gewählt, auf dem die Immobilisierung mittels Adsorption erfolgt. Durch die Wahl des Trägermaterials können die entstehenden Kosten stark variieren, da sowohl teurere Materialien mit funktionellen Gruppen und einem erhöhten Aufwand für die Immobilisierung als auch günstigere natürliche Materialien erhältlich sind.

Dabei machen gereinigtes Enzym und Trägermaterial zusammen bereits 75 % der Gesamtkosten aus, wobei das Trägermaterial mit 47 % einen doppelt so großen Anteil hat wie das Enzym. Dieses Verhältnis ist allerdings stark von dem

verwendeten Enzym und dem Trägermaterial abhängig. In dem Beispiel wurde ein poröses Polymer, an welches das Enzym mittels Adsorption gebunden wird, verwendet. Daher könnte eine Immobilisierung sowohl teurer, durch Verwendung eines Materials mit funktionellen Gruppen, als auch günstiger, durch Verwendung eines natürlichen Materials wie Celite, ausfallen. Die Produktion und Nutzung von KatIBs hätte dagegen den großen Vorteil, dass das Protein weder aufwendig gereinigt noch immobilisiert werden muss, woraus deutliche geringere Ausgaben resultieren können.

Auch in einem direkten Vergleich mit bereits für die AtHNL verwendeten Reinigungs- und Immobilisierungsverfahren überzeugen AtHNL-KatIBs in Bezug auf benötigte Materialien und Arbeitszeit (Tab. 13). Für die Teilreinigung der AtHNL-KatIBs sind beispielsweise keine Chromatographiematerialien notwendig, wohingegen für die Reinigung der wildtypischen AtHNL der Anionenaustauscher Q Sepharose® Fast Flow (1,6 € pro ml) und das Gelfiltrationsmaterial Sephadex® G-25 (0,42 € pro ml) sowie ein FPLC-System (*fast protein liquid chromatography*) zur Durchführung benötigt werden. Dabei würde eine Umstellung der Reinigungsmethode auf eine IMAC den Preis deutlich erhöhen (Ni-NTA Superflow, 10 € pro ml) und müsste daher eine ebenfalls deutlich erhöhte Ausbeute und Reinheit im Vergleich zu dem Anionenaustauscher liefern. Auch bei dem für die Präparationen nötigen Zeitaufwand besitzt die Isolierung von KatIBs Vorteile. So begrenzt sich die aktive Arbeitszeit auf ca. 1 - 1,5 h je nach weiteren Behandlungsschritten im Anschluss an die Isolierung. Diese Zeit wird bereits bei einem Zellaufschluss und der folgenden Proteinreinigung mit 2 h aktiver Arbeitszeit überschritten. Lediglich die Verwendung ganzer Zellen benötigt weniger Arbeitsaufwand. Allerdings zeigten sich bei Verwendung von AtHNL-produzierenden Zellen Probleme bei Umsätzen von Substraten, die anfälliger für die chemische Nebenreaktion sind (1.5.2) [117].

Der beste Vergleich lässt sich wahrscheinlich zwischen AtHNL-KatIBs und CLEA-AtHNL ziehen, da diese beiden Immobilisate kein Trägermaterial für die Immobilisierung benötigen. Allerdings ist die Präparation von CLEAs deutlich zeitaufwendiger, da die Methode für jedes Enzym neu angepasst werden muss, um durch Fällung der Proteine aktive Aggregate zu erhalten [73-75]. Im Fall von KatIBs kann dieser Schritt übergangen werden, da das Protein direkt in Form von aktiven Partikeln produziert wird.

Tab. 13: Vergleich des Material- und Arbeitsaufwands von Proteinreinigung und -immobilisierung mit der Isolierung von AtHNL-KatIBs.

Methoden	Material	Arbeitsschritte	Zeitaufwand
Zellaufschluss für Proteinreinigung ^[a]	Zentrifuge FRENCH [®] Press	1. Zellaufschluss 2. Zentrifugation	Aktiv: 0,5 h Passiv: 0,3 h
Proteinreinigung ^[a]	FPLC System Ionenaustauscher Sephadex G25 Material	1. Gelfiltration (Sephadex G25) 2. Ionenaustauscher 3. Gelfiltration (Sephadex G25)	Aktiv: 1,5 h Passiv: 3 h
		Alle Schritte mittels FPLC	
Adsorption an Celite ^[b]	Celite R-633 Exsikkator	1. Benetzen der Partikel mit Enzymlösung 2. Trocknen	Aktiv: 0,2 h Passiv: 16 h *Aktiv: 2,2 h *Passiv: 19,3 h
Einschluss in ein Sol-Gel ^[b]	Tetramethoxysilan Methyltrimethoxysilan Wasser (pH 2,85) Rotationsverdampfer Laborabzug Magnetrührer Eis	1. Herstellung des Polymergemischs 2. Verdampfen des Methanols 3. Mischung von Enzymlösung und gelierendem Sol-Gel 4. Lagerung bei 4 °C 5. Zermahlen des Sol-Gels	Aktiv: 2 h Passiv: 16 h *Aktiv: 4 h *Passiv: 19,3 h
Herstellung von CLEAs ^[b]	gesättigte Salzlösung Glutardialdehyd Laborabzug Magnetrührer Zentrifuge Eis Exsikkator Gefriertrocknungsanlage	1. Fällung des Enzyms durch gesättigte Salzlösung 2. Trennung durch Zentrifugation 3. Quervernetzen 4. mehrfache Waschschrte 5. Trocknung	Aktiv: 3 h Passiv: 24 - 35 h *Aktiv: 5 h *Passiv: 27,3 - 38,3 h
Verwendung ganzer Zellen ^[b]	Laborabzug MTBE	1. Trocknung der Zellen durch Waschen in MTBE	Aktiv: 0,5 h Passiv: -
Isolierung von AtHNL-KatIBs	Zentrifuge FRENCH [®] Press Gefrierschrank	1. Einfrieren & Auftauen 2. Zellaufschluss 3. Einfrieren & Auftauen 4. Zentrifugieren 5. Resuspendieren und Zentrifugieren (je 3x)	Aktiv: 1 h Passiv: 7,3 - 37,3 h ^[c]
Reduzierung von Diffusionslimitierungen der AtHNL-KatIBs	Laborabzug MTBE	1. Waschschrte mit MTBE und Zerkleinern (2.10.7.4.2)	Aktiv: 0,5 h Passiv: 1 h §Aktiv: 1,5 h §Passiv: 8,3 - 38,3 h
Lyophilisieren von AtHNL-KatIBs	Gefriertrocknungsanlage	1. Resuspendieren 2. Einfrieren 3. Lyophilisieren	Aktiv: 0,1 h Passiv: 48 h §Aktiv: 1,1 h §Passiv: 55,3 - 85,3 h
Kultivierung von Bakterien, Überexpression, Zellernte und Resuspendieren der Zellen wurden nicht in den Vergleich mit einbezogen, da diese Schritte für alle Methoden notwendig sind. ^[a] Zeitaufwand für diese Methoden wurde aus Laborpraxis abgeschätzt. ^[b] Methoden und Zeitaufwand für die Präparation der verschiedenen Immobilisate wurden aus der Dissertation von Daniel Okrob [116] übernommen. ^[c] Die große Zeitspanne resultiert aus der Möglichkeit, die Probe für 2 h oder länger bei -80 °C einzufrieren. *Arbeitsaufwand inkl. Zellaufschluss und Reinigung. §Zeitaufwand inkl. Isolierung von AtHNL-KatIBs.			

Für die Präparation von CLEA-*AfHNL* wird gereinigtes Enzym durch Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und anschließend mittels Glutardialdehyd quervernetzt und getrocknet. Der aktive Arbeitsaufwand für die Durchführung dieser auf die *AfHNL* optimierten Methode beläuft sich bereits auf 3 h, was im Vergleich zu behandelten oder lyophilisierten *AfHNL*-KatIBs einer 2- bis 3-fachen Steigerung entspricht. Allerdings ist die passive Zeit für Inkubationen, Zentrifugationen, Wasch- und Trocknungsschritte nahezu identisch.

In Bezug auf die Aktivität lassen sich nasse *AfHNL*-KatIBs ebenfalls sehr gut mit CLEA-*AfHNL* vergleichen, da diese mit 27 % und 33 % der Aktivität der präzipitierten *AfHNL* beim Umsatz von Benzaldehyd zu Mandelonitril nur einen geringen Unterschied zeigen (Tab. 14). Dahingegen entspricht die Aktivität vorbehandelter nasser *AfHNL*-KatIBs eher der von präzipitierter *AfHNL*, wobei KatIBs ähnlich der – bezogen auf die Enzymmasse – leicht geringer aktiven Celite-*AfHNL* den klaren Vorteil besitzen, in mehreren Reaktionen wiederverwendbar zu sein. Lyophilisierte *AfHNL*-KatIBs zeigten von den KatIB Präparationen die besten Umsätze und sind im Vergleich mit den anderen Immobilisierungsmethoden lediglich Sol-Gel-*AfHNL* unterlegen. Daher wäre es erstrebenswert, eine Möglichkeit zu finden, diesen überaus potenten Biokatalysator für mehrere Reaktionen wiederzuverwenden und somit das Potential der *AfHNL*-KatIBs voll auszuschöpfen.

Tab. 14: Vergleich der Aktivität verschiedener Immobilisate und KatIBs in einem mikrowässrigen Reaktionssystem bezogen auf präzipitierte, nicht immobilisierte *AfHNL*.

	Präzipitierte <i>AfHNL</i> ^[a]	Celite- <i>AfHNL</i> ^[a]	Sol-Gel- <i>AfHNL</i> ^[a]	CLEA- <i>AfHNL</i> ^[a]	Nasse <i>AfHNL</i> -KatIBs ^[b]	Vor-behandelte <i>AfHNL</i> -KatIBs ^[b]	Lyophilisierte <i>AfHNL</i> -KatIBs ^[b]
Aktivität [%]	100	78	671	27	33	94	192

Für den Vergleich der Aktivitäten wurde die für einen Umsatz von 50 % des eingesetzten Benzaldehyds benötigte Zeit unter identischen Reaktionsbedingungen ermittelt und die verwendete Proteinmenge einbezogen. Von der präzipitierten *AfHNL* wurden 5 mg verwendet [114], während die eingesetzte Menge *AfHNL*-KatIBs lediglich 3,4 mg Protein entsprach. Daher wurde die von den KatIBs benötigte Zeit mit einem Faktor von 0,68 multipliziert. Die Werte wurden anschließend auf die Zeit bezogen, die die gereinigte präzipitierte *AfHNL* benötigte (9 min für 50 % Umsatz). Reaktionsbedingungen in dem verwendeten mikrowässrigen Reaktionssystem: 1 ml 2 M HCN/MTBE-Lösung, 0,1 mmol Dodecan als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (500 mM) unter Argon Atmosphäre. ^[a]Die Aktivitätswerte wurden aus Okrob *et al.* [114] und der Dissertation von Daniel Okrob [116] entnommen. ^[b]Für die Berechnung der *AfHNL*-KatIB Aktivitäten wurden die Ergebnisse aus 3.6.6 (Abb. 24) verwendet.

Die Isolierung und Verwendung von *AfHNL*-KatIBs stellt im Vergleich zu anderen Methoden zur Proteinreinigung und -immobilisierung eine zeit- und kosteneffektive Alternative dar.

3.8 Übertragung der Strategie zur Produktion von KatIBs auf weitere Zielproteine

Inspiziert durch die Erfolge mit der *AtHNL* als Zielenzym sollte überprüft werden, ob die Fusion mit dem verwendeten TDoT-tag als generelle Strategie zur Produktion von aktivem Enzym in Form von IBs anwendbar ist. Dazu wurden weitere Zielproteine mit unterschiedlicher Komplexität ausgewählt.

Als erstes wurde als ein wenig komplexes Zielprotein der Fluoreszenzreporter YFP (*yellow fluorescent protein*) ausgewählt. Dieser ist ein Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* stammt und erstmals von O. Shimomura im Jahre 1962 beschrieben wurde [189]. Der für die Fluoreszenz benötigte Chromophor wird im Falle von GFP aus den Seitenketten dreier benachbarter Aminosäuren (Thr65, Tyr66, Gly67) gebildet, wobei sich diese Seitenketten durch eine autokatalytische Zyklisierung gefolgt von einer Dehydrierungs- und einer abschließenden Sauerstoff-abhängigen Oxidationsreaktion zu dem Chromophor 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-5-Imidazolidinon verbinden [190].

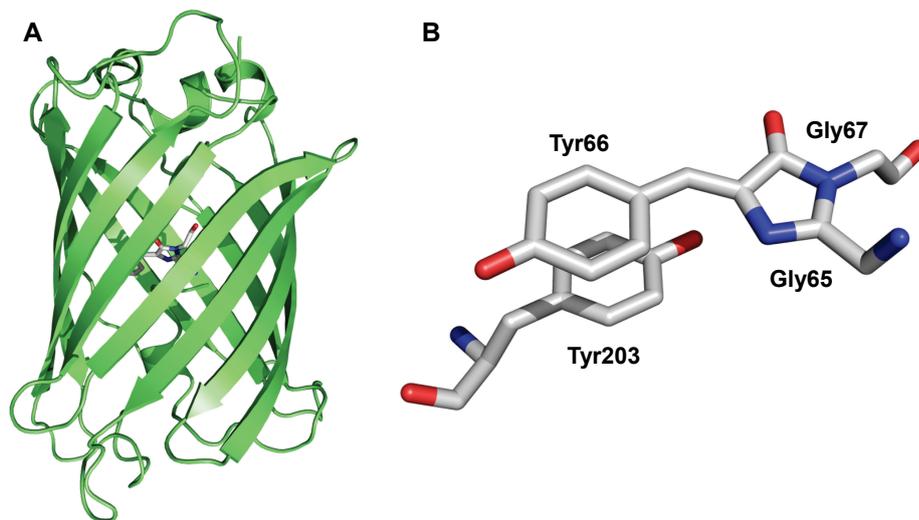


Abb. 27: Dreidimensionale Struktur und Chromophor von YFP. A) YFP besitzt die für GFP und dessen Derivate charakteristische fassähnliche Struktur aus elf zylindrisch angeordneten β -Faltblättern und einer zentralen α -Helix (PDB-ID: 1YFP [191]). B) Im Zentrum der Struktur befindet sich der für die Fluoreszenz benötigte Chromophor, welcher aus den Aminosäureseitenketten Gly65, Tyr66 und Gly67 in einer Sauerstoff-abhängigen Reaktion gebildet wird. Der Tyrosinrest Tyr203 verändert sowohl die Absorption als auch die Fluoreszenzemission des Chromophors über π - π -Wechselwirkungen [191]. Der Chromophor ist als Stäbchen dargestellt (C: grau; N: blau; O: rot).

Aus GFP wurde mittels Mutagenese YFP erhalten, welches Licht mit einer Wellenlänge von 514 nm absorbiert und nach einer Anregung Licht mit einem Maximum bei

527 nm emittiert [192]. Die Änderungen im Vergleich zu GFP wurden mittels Aminosäureaustauschen herbeigeführt, wobei das in den Chromophor eingebundene Thr65 durch Glycin ersetzt wurde und eine zusätzliche π - π -Wechselwirkung zwischen einem neu eingebauten Tyrosinrest an Position 203 (T203Y) und dem Chromophor eine Rotverschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge zur Folge hatte (Abb. 27, B). Weiterhin erhalten blieb die für GFP und dessen Derivate charakteristische fassähnliche Struktur aus elf zylindrisch angeordneten β -Faltblättern und einer zentralen α -Helix (Abb. 27, A) [191]. YFP wurde als neues Zielprotein aufgrund seiner einfachen Struktur und der nicht vorhandenen katalytischen Aktivität ausgewählt. Darüber hinaus sollte die YFP-spezifische Fluoreszenz eine einfache Verfolgung und Lokalisierung des Fusionsproteins ermöglichen, wodurch beispielsweise die Bildung von KatIBs in lebenden Zellen verfolgt werden könnte. Aus einer Vielzahl von YFP Derivaten wurde die monomere Variante A206K ausgewählt [193]. Dies sollte mögliche weitere Einflüsse durch Oligomerisierung des Zielproteins minimieren.

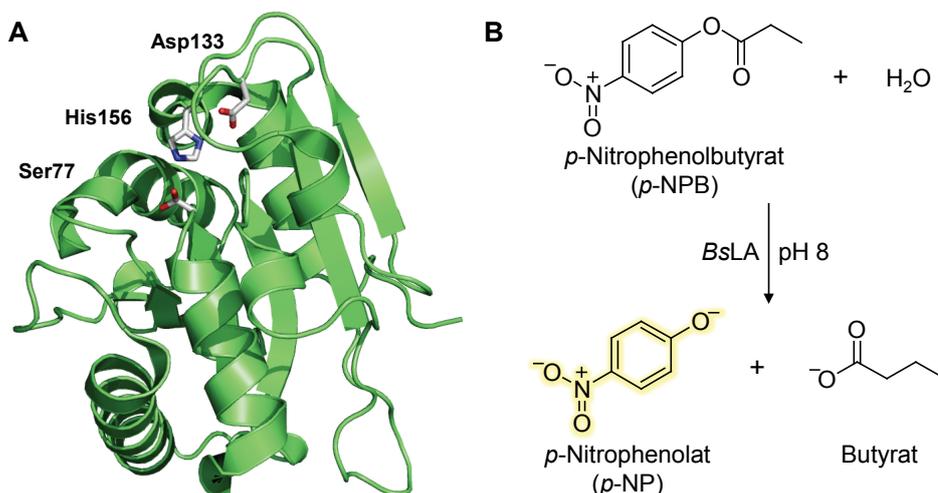


Abb. 28: Struktur der *Bacillus subtilis* Lipase A (BsLA) und die für die Charakterisierung verwendete Reaktion. A) Die BsLA ist ein 19,3 kDa großes Monomer und besteht aus 181 Aminosäuren. Damit ist sie einer der kleinsten Vertreter der Lipasefamilie und weist ein minimales α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv auf (PDB-ID: 1ISP [194]). Darüber hinaus besitzt sie keinen für Lipasen typischen Deckel, wodurch das aus den drei Aminosäuren Ser77, Asp133 und His156 (dargestellt als Stäbchen; C: grau; N: blau; O: rot) aufgebaute aktive Zentrum frei zugänglich ist. B) Für die Charakterisierung der BsLA kann das nicht-natürliche Substrat *para*-Nitrophenolbutyrat (*p*-NPB) verwendet werden. Dieses wird von der Lipase zu Butyrat und *para*-Nitrophenolat umgesetzt. Letzteres verfügt über ein erweitertes π -Elektronensystem, wodurch es Licht maximal bei einer Wellenlänge von 410 nm absorbiert und auf diese Weise die spektrophotometrische Verfolgung der ablaufenden Reaktion ermöglicht.

Als zweites Zielprotein wurde die Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BsLA) ausgewählt, da sie sich durch eine sehr einfache Struktur auszeichnet und mit lediglich 19,3 kDa

und 181 Aminosäuren einer der kleinsten Vertreter der Lipasefamilie (EC 3.1.1.3) ist [195]. Sie besitzt ein minimales α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv, das aus sechs parallelen β -Faltblättern umgeben von fünf α -Helices besteht (Abb. 28, A) [196]. Darüber hinaus ist die *BsLA* ein Monomer und besitzt keinen für Lipasen typischen Deckel über dem aktiven Zentrum, wodurch dieses frei zugänglich ist und die *BsLA* somit über keine Grenzflächenaktivierung verfügt. Das aktive Zentrum besteht aus der für Lipasen charakteristischen katalytischen Triade, welche durch die Seitenketten der Aminosäuren Ser77, Asp133 und His156 ausgebildet wird [196]. Die *BsLA* katalysiert die reversible hydrolytische Spaltung von Esterbindungen unter Wasserverbrauch (Abb. 28, B) und besitzt ein breites Substratspektrum [197].

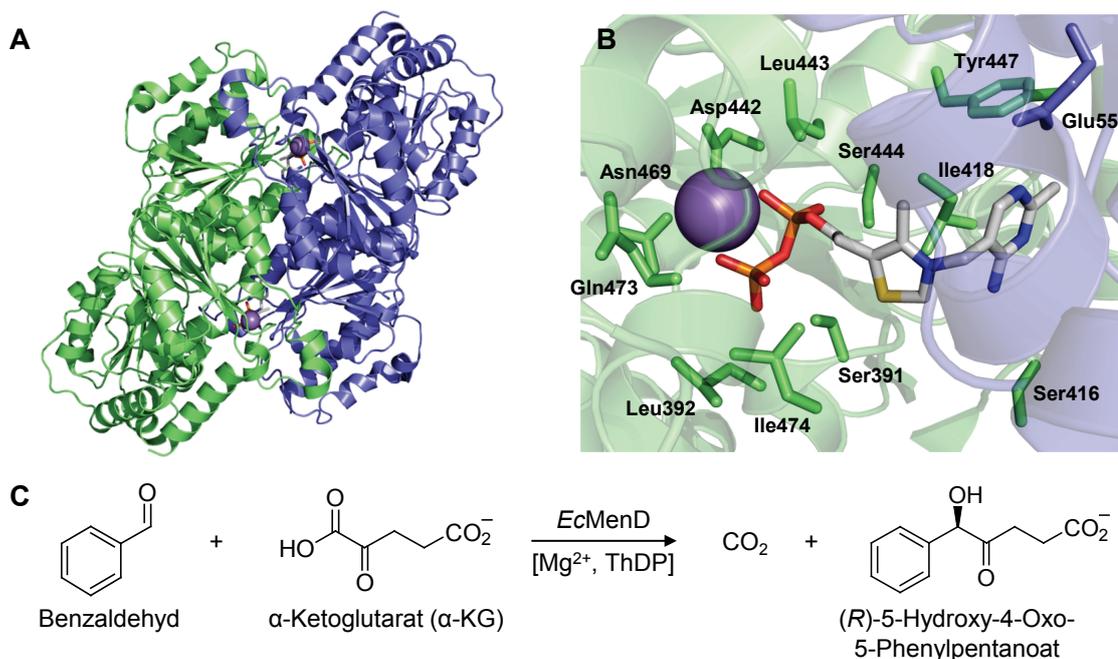


Abb. 29: Zusammenstellung der Quartärstruktur und der Bindungsstelle der Kofaktoren sowie der nicht-physiologischen Reaktion der *EcMenD*. A) *EcMenD* bildet ein funktionelles Dimer (PDB-ID: 2JLA [198]), wobei die aktiven Zentren an der Grenzfläche zwischen den einzelnen Proteinmolekülen des Dimers (Monomer1: grün, Monomer2: blau) lokalisiert sind. B) Im aktiven Zentrum sind die für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiellen Kofaktoren Mg^{2+} (lila Sphäre) und ThDP (dargestellt als Stäbchen; C: grau; N: blau; S: gelb; O: rot; P: orange) gebunden. Dabei sind Aminosäureseitenketten aus beiden *EcMenD* Monomeren (grün und blau), die ein Dimer bilden, an der Bindung beteiligt. Während die Seitenketten des grünen Monomers hauptsächlich die Bindung des Mg^{2+} -Ions und die Positionierung des ThDP übernehmen, besitzt Glu55 aus dem blauen Monomer eine wichtige Funktion im Reaktionsmechanismus. C) *EcMenD* katalysiert u. a. die nicht-physiologische 1,2-Addition von α -Ketoglutarat (α -KG) an Benzaldehyd mit sehr hoher (*R*)-Selektivität.

Als drittes und letztes Zielprotein wurde die 2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carboxylat-Synthase aus *E. coli* (*EcMenD*) ausgesucht, die zu der Enzymklasse der Transferasen (EC 2.2.1.9) gehört. Im Gegensatz zu den bisher ausgewählten Proteinen ist *EcMenD* strukturell deutlich komplexer und ein

funktionelles Dimer (Abb. 29, A) [198]. Zusätzlich benötigt die *EcMenD* für die katalytische Aktivität die Kofaktoren Thiamindiphosphat (ThDP) und Mg^{2+} , welche an der Grenzfläche zwischen den zwei Monomeren eines Dimers gebunden werden (Abb. 29, B) [198, 199]. Während Aminosäureseitenketten des einen Monomers hauptsächlich an der Bindung und Positionierung des ThDP und Mg^{2+} beteiligt sind (Abb. 29, B, grüne Stäbchen), spielt Glu55 aus dem zweiten Monomer (Abb. 29, B, blaues Stäbchen) eine wichtige Rolle bei der katalysierten Reaktion [198, 200]. Dabei wird das ThDP durch den in der Proteinfamilie der ThDP-abhängigen Enzyme konservierten Glutamatrest deprotoniert, um ein starkes Nukleophil für die Reaktion zu bilden [201-203]. In ihrer natürlichen Rolle katalysiert die *EcMenD* die Carboligationsreaktion von decarboxyliertem α -Ketoglutarat (α -KG) mit Isochorismat – den zweiten Schritt der Menaquinon (Vitamin K) Biosynthese [199]. Allerdings kann das Enzym ebenfalls die nicht-physiologische 1,2-Addition von α -KG an verschiedenste Aldehyde mit einer sehr hohen (*R*)-Selektivität katalysieren (Abb. 29, C) [204]. Diese Reaktion liefert wertvolle chirale Bausteine [205]. Anhand der TDoT-Linker-*EcMenD* Fusion sollte die Frage geklärt werden, ob der TDoT-*tag* bei sehr komplexen Biokatalysatoren zur Bildung von KatIBs führt, wobei gleich mehrere Voraussetzungen, wie die erfolgreiche Bindung von Kofaktoren (ThDP, Mg^{2+}) und eine korrekte Dimerisierung, erfüllt werden müssen.

Mittels neuer Zielproteine sollte überprüft werden, ob die Fusion mit dem TDoT-*tag* als generelle Strategie zur Erzeugung von KatIBs angewandt werden kann. Dazu wurden die beiden unterschiedlich komplexen Enzyme *BsLA* und *EcMenD* sowie eine monomere Variante des Fluoreszenzreporters YFP ausgewählt.

3.9 Die ausgewählten Zielproteine können in Form von KatIBs produziert werden

Die Gene der neu ausgewählten Zielproteine wurden mittels PCR (2.8) amplifiziert und anschließend in den Basisvektor pTDoT-Linker unter Verwendung geeigneter Restriktionsschnittstellen kloniert. Die entsprechenden Kontrollkonstrukte (ohne den TDoT-*tag*) wurden analog zur Erzeugung des *AfHNL* Kontrollkonstruktes generiert (3.2). Alle Genfusionen wurden mittels Autoinduktion in *E. coli* BL21(DE3) über-

exprimiert (2.4.3). Anschließend wurden die Zellen aufgeschossen (2.10.1) und das Zellextrakt (ZE) sowie nach einer Zentrifugation die lösliche (L) und unlösliche (U) Proteinfraction in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE (2.10.5) und ihre Aktivität (2.10.8, 2.10.9) bzw. Fluoreszenz (2.10.10) untersucht.

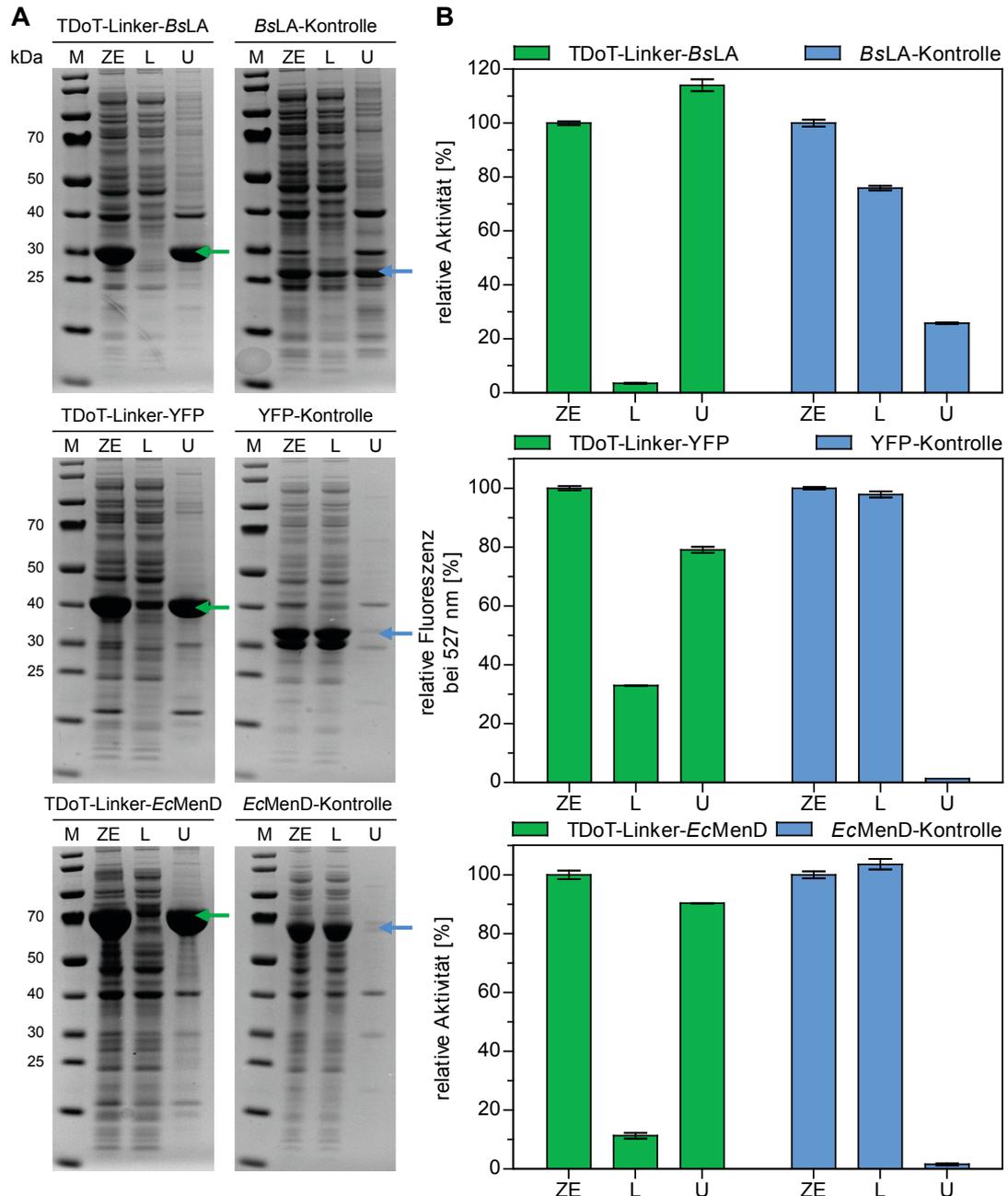


Abb. 30: Einfluss des TDoT-tags auf die A) Protein- und B) Aktivitäts- bzw. Fluoreszenzverteilung von BsLA, EcMenD und YFP in den Fraktionen aufgeschlossener Zellen. Im Anschluss an die Genexpression mittels Autoinduktion in *E. coli* BL21(DE3) wurden die Zellen aufgeschossen (2.10.1). Das erhaltene Zellextrakt (ZE) und die nach einer Zentrifugation gewonnene lösliche (L) und unlösliche (U) Proteinfraction wurden in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung (mittels SDS-PAGE, 4 - 12 % Gradientengel, 2.10.5) und ihre Aktivität (2.10.8, 2.10.9) bzw. Fluoreszenz (2.10.10) untersucht. Die angegebenen Fehlerbalken sind die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

Auf den SDS-Gelen (Abb. 30, A) war erkennbar, dass in den unlöslichen Fraktionen der YFP- und *EcMenD*-Kontrollen lediglich sehr geringe Proteinmengen mit der erwarteten Größe der Kontrollproteine identifiziert werden konnten. Dagegen war im Fall der *BsLA*-Kontrolle bereits ohne den TDoT-*tag* ein großer Teil des gebildeten Proteins unlöslich. Im Vergleich dazu konnte bei den Konstrukten mit *tag* eine deutliche Zunahme an unlöslichem Protein festgestellt werden, wobei gleichzeitig die Menge an löslichem Protein drastisch reduziert wurde. So konnte in der löslichen Fraktion von TDoT-Linker-*BsLA* keine und bei TDoT-Linker-YFP sowie TDoT-Linker-*EcMenD* lediglich schwache Banden mit der erwarteten molekularen Masse der Fusionsproteine beobachtet werden. Dies zeigte, dass der verwendete TDoT-*tag* auch bei den neuen Zielproteinen einen starken Einfluss auf die Löslichkeit hatte. Auch in Bezug auf die Aktivität bzw. Fluoreszenz der neuen Zielproteine konnten Änderungen durch die Fusion mit dem TDoT-*tag* festgestellt werden (Abb. 30, B). Während bei den Kontrollkonstrukten von YFP und *EcMenD* 100 % der Fluoreszenz bzw. Aktivität in der löslichen Fraktion gefunden werden konnte, war bei der *BsLA* bereits ohne TDoT-*tag* 26 % der Gesamtaktivität in der unlöslichen Fraktion lokalisiert. Durch Fusion mit dem TDoT-*tag* wurde in allen Fällen der in der unlöslichen Fraktion gemessene Anteil der Gesamtaktivität bzw. -fluoreszenz erhöht. Dabei hatte der TDoT-*tag* auf YFP den geringsten Einfluss, wobei immer noch 30 % der Gesamtfluoreszenz in der löslichen Fraktion gemessen werden konnte. Auf die *BsLA* und die *EcMenD* war der Einfluss des TDoT-*tags* größer, wodurch die in der löslichen Fraktion verbliebene Aktivität auf 4 % und 10 % reduziert wurde.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der TDoT-*tag* ebenfalls bei anderen Proteinen als der *AtHNL* dazu genutzt werden kann, die Bildung von KatIBs zu induzieren. Daher konnte die Fusion mit dem TDoT-*tag* als generelle Strategie zur Gewinnung von leicht isolierbarem, aktivem Protein bestätigt werden. Insbesondere interessant dabei ist, dass durch die Fusion mit der *EcMenD* gezeigt werden konnte, dass die Bildung von KatIBs unabhängig von der Komplexität des Zielproteins funktioniert. Dabei kann die *EcMenD* sogar bei der Einlagerung in IBs ihre korrekte, biologisch aktive dimere Struktur einnehmen und die Kofaktoren ThDP und Mg^{2+} binden.

Die Fusion mit dem TDoT-*tag* konnte als generelle Strategie zur Bildung von KatIBs bestätigt werden, da in Fusion mit weiteren Zielproteinen (*BsLA*, *EcMenD* und YFP) unlösliches, aber dennoch aktives bzw. fluoreszentes Protein gebildet wurde. Anhand der *EcMenD* konnte im gleichen Experiment bewiesen werden, dass die Bildung von KatIBs unabhängig von der Komplexität des Zielproteins mit Kofaktor-abhängigen Enzymen funktioniert.

3.10 KatIBs können im großen Maßstab aus Zellen isoliert werden

Durch die Fusion des TDoT-*tags* an die verschiedenen Zielproteine wurden große Mengen an KatIBs gebildet. Um die mögliche Ausbeute aus 500 ml Kultur zu bestimmen, wurden die entsprechenden Gene von allen KatIB-bildenden Konstrukten in *E. coli* BL21(DE3) mittels Autoinduktionsmedium überexprimiert (2.4.3), die Zellen aufgeschlossen (2.10.1) und die KatIBs isoliert (2.10.2). Danach wurden diese gewogen, lyophilisiert (2.10.3) und die enthaltene Proteinmenge bestimmt (2.10.4.2).

Tab. 15: Vergleich der Ausbeuten und Reinheit verschiedener KatIBs und YFP-IBs aus 500 ml Kultur.

	Zellen [g]	Nass- gewicht IBs [mg] ^[a]	Trocken- gewicht IBs [mg] ^[b]	Protein- menge [mg] ^[c]	Proteinanteil am Nassgewicht [%]	Proteinanteil am Trockengewicht [%]	Wasser- gehalt [%]
<i>AthNL</i> -KatIBs	15,0	3270	1089	923	28	85	67
<i>BsLA</i> -KatIBs	11,4	3500	985	779	22	79	71
<i>EcMenD</i> -KatIBs	13,8	3900	1683	1556	40	93	57
YFP-IBs	15,7	3740	1064	1014	27	95	72

^[a]Im Anschluss an die Überexpression (2.4.3) und die Zellernte wurden die Zellen aufgeschlossen (2.10.1), die IBs isoliert (2.10.2) und das Nassgewicht durch Wiegen bestimmt. ^[b]Zur Bestimmung des Trockengewichts wurde eine definierte Menge IBs in einem Glasgefäß eingewogen und in MilliQ Wasser resuspendiert. Die Probe wurde 48 h lyophilisiert (2.10.3) und anschließend erneut gewogen. Anhand des erhaltenen Faktors aus dem Vergleich zwischen nassen und trockenen IBs wurde das aus 500 ml Kultur gewonnene Trockengewicht an IBs hochgerechnet. ^[c]Die in den IBs enthaltene Proteinmenge wurde durch Denaturierung einer definierten Menge IBs in 6 M Guanidinhydrochlorid und anschließender Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt (2.10.4.2).

Aus einer 500 ml Kultur konnten auf diese Weise zwischen 3 und 4 g nasse KatIBs gewonnen werden (Tab. 15). Dabei konnte festgestellt werden, dass aus einer größeren Zellmasse nicht zwangsläufig mehr KatIBs isoliert werden können. Zum Beispiel konnten aus 15 g *AthNL*-KatIB produzierenden Zellen 3,3 g nasse bzw. 1,1 g trockene KatIBs isoliert werden, während aus 13,8 g *EcMenD*-KatIB produ-

zierenden Zellen 3,9 g nasse und 1,7 g trockene KatIBs gewonnen wurden. Auch in Bezug auf ihren Wassergehalt sind die isolierten KatIBs sehr unterschiedlich, wobei *EcMenD*-KatIBs mit 57 % die geringste und YFP-IBs mit 72 % die größte Menge an Wasser beinhalteten. Von der erhaltenen KatIB-Trockenmasse waren 0,9 bis 1,5 g Protein, was einem Proteingehalt von 85 bis 95 % entsprach.

Die unterschiedlichen erhaltenen Werte deuten darauf hin, dass die KatIBs auch strukturell verschieden sein könnten. So könnte zum Beispiel ein Unterschied im Wassergehalt auf unterschiedliche Porosität der KatIBs hinweisen.

Tab. 16: Vergleich der Ausbeuten konventioneller Proteinreinigungen und der entsprechenden Isolierung von KatIBs.

	Expressionsbedingungen	Reinigung	Ausbeute [mg/10 g Zellen]^[d]
<i>AtHNL</i> ^[a]	Autoinduktion, 72 h, 15 °C	IMAC	220
<i>AtHNL</i> -KatIBs	Autoinduktion, 72 h, 15 °C	-	615
<i>BsLA</i> ^[b]	Autoinduktion, 72 h, 15 °C	IMAC	44
<i>BsLA</i> -KatIBs	Autoinduktion, 72 h, 15 °C	-	683
<i>EcMenD</i> ^[c]	LB, IPTG, 12 h, 20 °C	IMAC	150
<i>EcMenD</i> -KatIBs	Autoinduktion, 72 h, 15 °C	-	1128

^[a]Persönliche Mitteilung von Frau Aischarya Brahma, IBG-1: Biotechnologie; Forschungszentrum Jülich. ^[b]Persönliche Mitteilung von Herrn Timo Fettweiß, IMET; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. ^[c]Dissertation Anja Kurutsch, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg [206]. ^[d]Die für KatIBs angegebenen Werte wurden aus der gewonnenen Proteinmenge einer 500 ml Kultur (Tab. 15) errechnet.

Auch im Vergleich der Proteinausbeuten der KatIB-Isolierungen mit konventionellen Reinigungen der entsprechenden Proteine mit *His-tag* lassen sich große Unterschiede feststellen (Tab. 16). So konnte die 2,8-fache Proteinmenge in Form von *AtHNL*-KatIBs aus 10 g Zellen isoliert werden, während es das 15,5-fache bei *BsLA*-KatIBs und das 7,52-fache bei *EcMenD*-KatIBs war.

Die verschiedenen KatIBs konnten im Gramm-Maßstab aus 500 ml Kulturen isoliert werden. Dabei zeigten die KatIBs Unterschiede im enthaltenen Protein- und Wassergehalt.

3.11 Mittels Fluoreszenz lässt sich die Bildung von IBs in lebenden Zellen verfolgen

Zur weiteren allgemeinen Charakterisierung der KatIBs sollte die Fluoreszenz der YFP-IBs ausgenutzt werden. Diese ermöglicht die nicht-invasive Beobachtung der Bildung von sowohl löslichem als auch unlöslichem Protein auf zellulärem Level.

Für einen ersten Versuch wurden *E. coli* BL21(DE3) mit den entsprechenden Plasmiden zur Produktion von YFP-IBs und einer YFP-Kontrolle (lösliches YFP, ohne TDoT-tag) sowie dem Leervektor pET28a als Negativkontrolle transformiert (2.7). Im Anschluss wurden die Zellen zur Expression der entsprechenden Gene in Autoinduktionsmedium kultiviert (2.4.3), geerntet und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (2.11.2). Zum weiteren Vergleich wurden isolierte YFP-IBs ebenfalls für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen sich zwischen den *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit den verschiedenen Plasmiden deutliche Unterschiede feststellen. Während in den mit dem Leervektor transformierten Zellen wie erwartet keine Fluoreszenz zu erkennen war (Abb. 31, C), konnte mit der YFP-Kontrolle eine über die gesamte Zelle uniform verteilte Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 31, A). Im Gegensatz dazu wurde bei den YFP-IB-produzierenden Zellen lediglich eine an den Zellpolen lokal begrenzte Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 31, B). Dies ist typisch für die Produktion von Fluoreszenzreportern in Form von IBs und wurde bereits häufiger beobachtet [182, 207]. Die isolierten YFP-IBs erwiesen sich unter dem Mikroskop als verteilte, fluoreszente, runde Partikel, die keine zellähnlichen Strukturen aufwiesen (Abb. 31, D).

Um die Struktur der IBs weiter zu untersuchen, wurden Proben von isolierten IBs für eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet (2.11.1) und am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) im Laboratorium für Elektronenmikroskopie analysiert (Abb. 31, E, F). Dabei zeigte sich, dass die IBs eine runde bis fassförmige Struktur mit Durchmessern von 200 bis 500 nm aufweisen. Diese Beobachtungen stimmten mit bisherigen Studien in Bezug auf sowohl natürliche als auch induzierte IBs überein [184]. Aus einem Vergleich der Rasterelektronen- und der Fluoreszenzmikroskopie-Daten lässt sich schließen, dass die auf den Rasterelektronenmikroskop-Bildern erkennbare Form der IBs auf die Form einer *E. coli* Zelle zurückzuführen ist. Daher repräsentiert jede der sichtbaren Strukturen ein einzelnes KatIB-Partikel, wovon pro Zelle bis zu zwei produziert werden können.

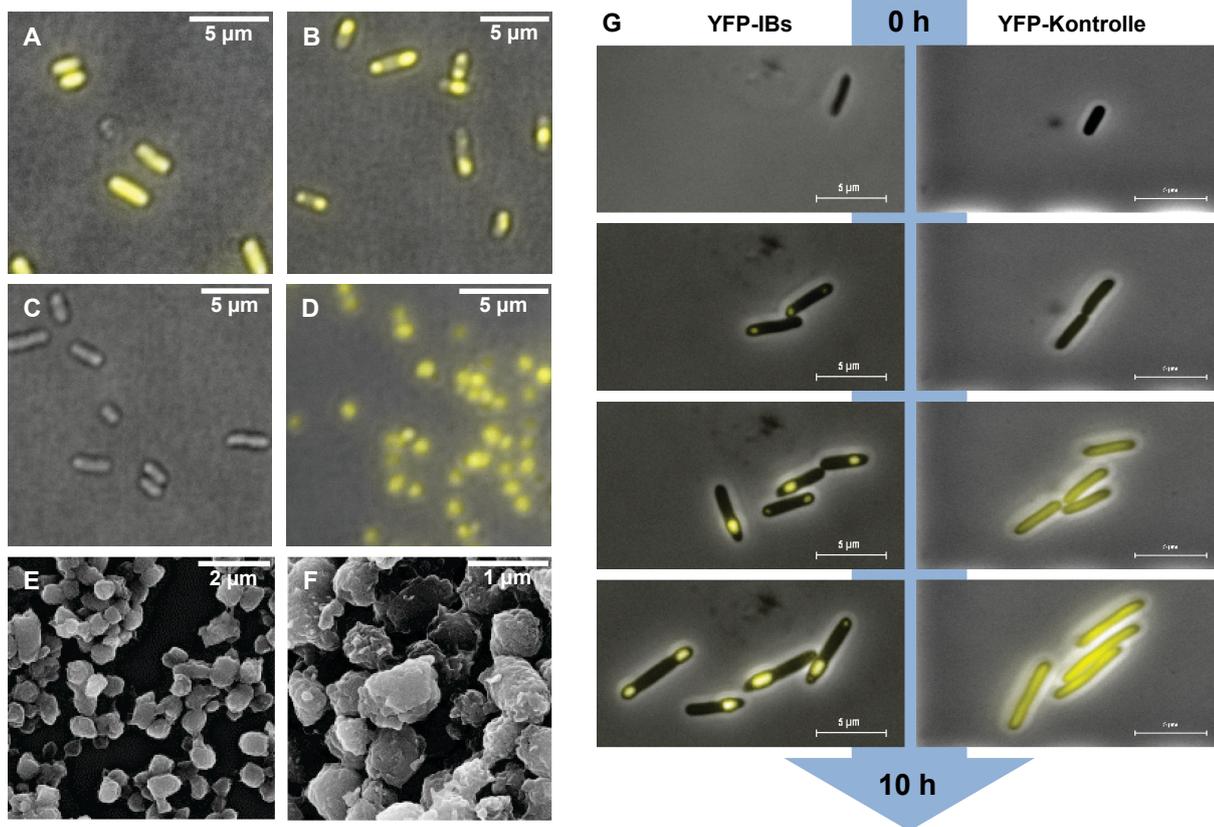


Abb. 31: Zusammenstellung verschiedener Mikroskopieexperimente zur Untersuchung der Morphologie und Bildung von IBs. Fluoreszenzmikroskopie von *E. coli* BL21(DE3) Zellen (2.11.2), die A) YFP-Kontrolle und B) YFP-IBs produzieren sowie eine C) Leervektorkontrolle. Zusätzlich wurden D) isolierte YFP-IBs analysiert. E und F) Rasterelektronenmikroskopie von KatIBs in zwei verschiedenen Vergrößerungen (2.11.1). Durchgeführt am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) im Laboratorium für Elektronenmikroskopie. G) Mikrofluidik-Experiment mit YFP-IB- und YFP-Kontrolle-produzierenden Zellen. Aus einer 10 ml M9CA-Medium Kultur (2.11.3) wurden Zellen in den Pikoliter-Bioreaktor gespült und dadurch vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen unter konstantem Fluss von M9CA-Medium mit zusätzlichen 0,5 mM IPTG zur Induktion der Genexpression für 10 h bei 22 °C kultiviert.

In einem weiteren Experiment sollte der zeitliche Verlauf der Bildung von YFP-IBs untersucht werden. Dazu wurde erneut die Fluoreszenz der YFP-IBs und der YFP-Kontrolle ausgenutzt und einzelne *E. coli* Zellen in einem Pikoliter-Bioreaktor [208] direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop kultiviert (2.11.3). Allerdings konnte in diesem System eine Induktion der Genexpression nicht unter den bisher im Schüttelkolben-Maßstab verwendeten Bedingungen durchgeführt werden, da in der Mikrofluidik ein kleiner Reaktor betrieben wird, der die Zellen konstant mit neuem Medium versorgt und somit die Umgebung der Zellen kontinuierlich ausgetauscht wird. Daher wurden für das Experiment ein M9CA-Medium (2.4.1) und eine direkte Induktion mittels IPTG gewählt. Das Wachstum der *E. coli* Zellen und die Bildung der fluoreszenten Proteine wurden über einen Zeitraum von zehn Stunden verfolgt (Abb. 31, G). Dabei ließ sich erkennen, dass die YFP-Kontrolle-produzierenden Zellen

innerhalb der Kultivierungsdauer eine uniforme Fluoreszenz annehmen. Dagegen war in YFP-IB-bildenden Zellen deutlich sichtbar, dass an den Polen der Zellen zuerst kleine fluoreszente Punkte entstanden, deren Intensität im Verlauf der Inkubation zunahm.

Trotz der im Vergleich zur Produktion von KatIBs in Schüttelkolben veränderten Bedingungen, konnte die Fluoreszenz der YFP-IBs und der YFP-Kontrolle erfolgreich dazu genutzt werden, die Bildung der Proteine in lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum zu verfolgen und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (vergl. Abb. 31, A, B, G). Dies zeigt, dass die KatIBs auch unter unterschiedlichen Produktionsbedingungen aktiv sein können.

In verschiedenen Experimenten mit den fluoreszenten YFP-IBs in lebenden *E. coli* BL21(DE3) Zellen konnte beobachtet werden, dass KatIBs an den Polen der Zellen gebildet wurden. In einer weiteren Untersuchung mittels Raster-elektronenmikroskopie konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die runde bis fassförmige Struktur durch die Zelle vorgegeben wird.

3.12 Die YFP-Fluoreszenz erlaubt *in vitro* eine Detektion der IBs und eine direkte Verfolgung eines proteolytischen Verdaus

Zusätzlich zu den bereits gezeigten Möglichkeiten der nicht-invasiven Verfolgung der YFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen (3.11) bietet die Verwendung des Fluoreszenz-reporters weitere Vorteile. Dabei kann beispielsweise die Detektion von YFP während der Isolierung von YFP-IBs aus Zellen und der Vergleich zu der löslichen YFP-Kontrolle direkt unter UV-Licht (365 nm) erfolgen (Abb. 32).

So war eindeutig anhand der Fluoreszenz erkennbar, in welchen Fraktionen die YFP-Kontrolle bzw. die YFP-IBs enthalten waren (Abb. 32). Bei der YFP-Kontrolle konnte lediglich in den Fraktionen ZE, L1, U1 und L2 Fluoreszenz festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fluoreszierten im Fall der YFP-IBs das ZE und alle Fraktionen, in denen das unlösliche Pellet resuspendiert wurde (U1, U2, U3). Diese Verteilung der Proteine in den Fraktionen konnte auch mittels SDS-PAGE Analyse bestätigt werden (nicht gezeigt).

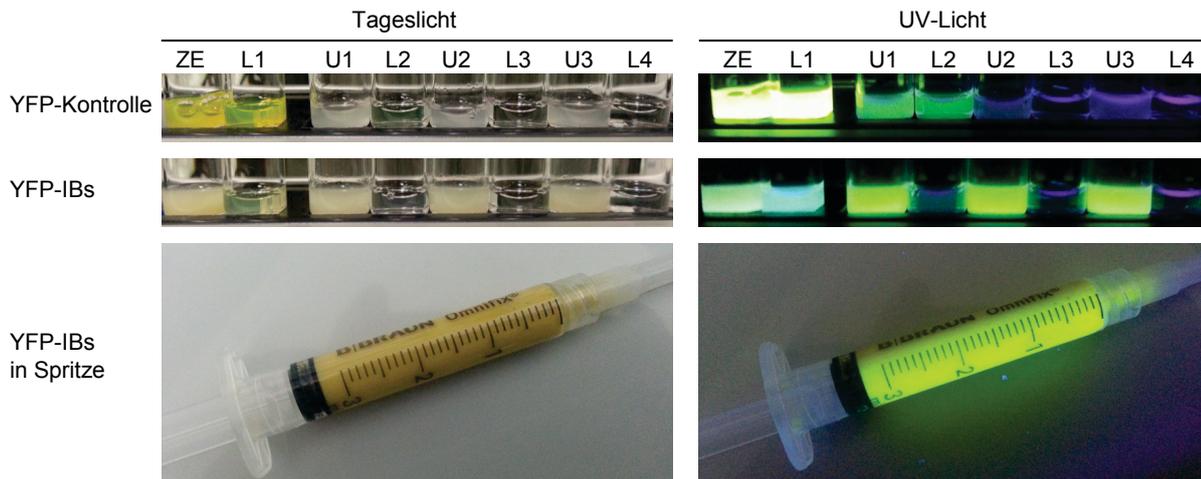


Abb. 32: Isolierung von YFP-IBs im Vergleich zur löslichen YFP-Kontrolle unter Tageslicht und UV-Licht (365 nm). YFP-IB- bzw. YFP-Kontrolle-produzierende Zellen wurden aufgeschossen und das erhaltene Zellextrakt (ZE) durch Zentrifugation in seine löslichen (L1) und unlöslichen (U1) Bestandteile aufgetrennt. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion mehrfach mit Puffer resuspendiert und zentrifugiert (L2, U2, L3, U3, L4), um die IBs zu waschen und zu überprüfen, ob die IBs in der unlöslichen Fraktion bleiben und somit zurückgewonnen werden können. Nach dem letzten Schritt wurden die isolierten YFP-IBs zur leichteren Handhabung in einer Spritze gelagert.

In dem Überstand der ersten Zentrifugation nach dem Zellaufschluss (L1) war auch bei den YFP-IBs Fluoreszenz zu erkennen. Diese war jedoch nicht gelb und rührte daher evtl. von in den Zellen enthaltenen Flavinen her und nicht von löslichem YFP. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass bei der löslichen YFP-Kontrolle in der ersten resuspendierten unlöslichen Fraktion (U1) YFP-Fluoreszenz zu beobachten war, woraus geschlossen werden kann, dass mit den unlöslichen Bestandteilen der Zelle ebenfalls lösliches Protein abzentrifugiert bzw. im Pellet mit eingeschlossen wird. Das YFP-Kontrollprotein konnte jedoch durch einen Waschschrift aus dem Pellet entfernt werden (L2, U2), was eindeutig zeigt, dass mehrmaliges Waschen der KatIBs notwendig ist, um möglichst viel Fremdprotein zu entfernen.

Als weitere Anwendung der YFP-Fluoreszenz sollte getestet werden, ob durch Entfernen des TDoT-tags mithilfe der im Linker eingebauten Faktor Xa Protease-schnittstelle lösliches Protein aus den KatIBs gewonnen werden kann. Gleichzeitig sollte das Experiment zeigen, wie zugänglich die einzelnen Proteinmoleküle innerhalb der KatIBs sind, da die Protease an einen spezifischen Teil der in den KatIBs enthaltenen Proteine binden muss.

Für das Experiment (2.10.10.1) wurden YFP-IBs in MilliQ Wasser mit einem entsprechenden Volumen 10x Spaltungspuffer resuspendiert und aufgeteilt, wobei die Hälfte der Ansätze mit Faktor Xa Protease versetzt und die andere Hälfte als

Kontrolle ohne Protease diente. Aus allen Ansätzen wurden während der Inkubation nach definierten Zeiten Proben entnommen, mittels Zentrifugation in die lösliche und unlösliche Proteinfraction getrennt und die YFP-spezifische Fluoreszenzemission, nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm, bei einer Wellenlänge von 527 nm gemessen (2.10.10). Außerdem wurden alle Proben mittels SDS-PAGE (2.10.5) analysiert.

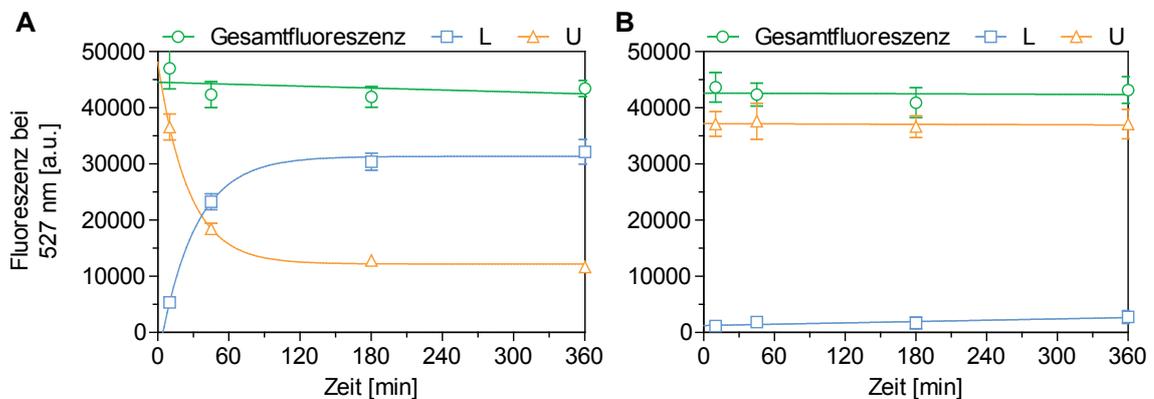


Abb. 33: Fluoreszenzmessungen der YFP-IBs A) mit Zusatz von Protease Faktor Xa und B) der Kontrolle ohne Protease. YFP-IBs wurden resuspendiert, die Proteinkonzentration der Suspension ermittelt (2.10.4.2) und Ansätze mit 1 mg ml^{-1} Protein erstellt. Die eine Hälfte der Ansätze wurde mit Protease Faktor Xa versetzt, während die andere Hälfte als Kontrolle ohne Protease diente. Alle Ansätze wurden bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1.000 UpM in einem Thermomixer inkubiert und zu definierten Zeiten Proben entnommen. Ein Teil der Proben wurde ohne weitere Behandlung für die Messung der Gesamtfluoreszenz verwendet. Der Rest wurde mittels Zentrifugation in die lösliche (L) und die unlösliche (U) Proteinfraction aufgetrennt und anschließend die YFP-spezifische Fluoreszenzemission in Mikrotiterplatten in einem TECAN M1000 PRO, nach einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm , bei einer Emissionswellenlänge von 527 nm gemessen (2.10.10). Die angegebenen Fehlerbalken sind die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

Anhand der Messdaten ließ sich erkennen, dass die in den Proben gemessene Gesamtfluoreszenz über den Zeitraum von 360 min konstant bleibt und zwischen den Proben mit und ohne Protease vergleichbar war (Abb. 33). Im Unterschied dazu war eine deutliche Zunahme an Fluoreszenz in der löslichen Fraktion der Probe mit Protease zu beobachten (Abb. 33, A). Die Werte stiegen auf 31.000 a.u. , während die Fluoreszenz der unlöslichen Probe um denselben Wert abnahm. Allerdings wurde bereits nach 180 min der in der löslichen Fraktion maximal gemessene Fluoreszenzwert erreicht, wobei fast 30% der Gesamtfluoreszenz in der unlöslichen Fraktion zurückblieben. In den Proben ohne die Protease änderte sich die Verteilung der Fluoreszenz auf die Fraktionen über den gesamten Zeitraum lediglich minimal bzw. innerhalb des Fehlers (Abb. 33, B).

Die entsprechenden SDS-PAGE Analysen (Abb. 34) lieferten ähnliche Ergebnisse. Dabei veränderte sich die Proteinverteilung in der Kontrolle ohne Protease über den gesamten Inkubationszeitraum nicht (Abb. 34, B), während durch Zugabe von Protease zusätzliche Banden in der löslichen sowie der unlöslichen Proteinfraction zu erkennen waren (Abb. 34, A). Übereinstimmend mit den Fluoreszenzmessungen stieg bis zu einem Zeitpunkt von 180 min die Intensität der Bande mit einer molekularen Masse von 28 kDa in der löslichen Fraktion an. Diese Bande repräsentierte das YFP-Fragment, welches während des proteolytischen Verdau von YFP-IBs aus den Partikeln freigesetzt wurde. Allerdings konnten im Vergleich zu den Fluoreszenzmessungen zusätzliche Informationen erhalten werden. Zum Beispiel wurde in allen Fraktionen eine Zunahme der Bande bei etwa 10 kDa beobachtet, was der Größe des entfernten TDoT-tags entsprach. Außerdem wurde festgestellt, dass nicht das gesamte geschnittene YFP in die lösliche Fraktion überging, sondern ein deutlich größerer Teil in der unlöslichen Fraktion verbleibt. Darüber hinaus konnten mit zunehmender Inkubationszeit im Bereich zwischen 15 und 25 kDa eine Vielzahl von zusätzlichen Banden beobachtet werden.

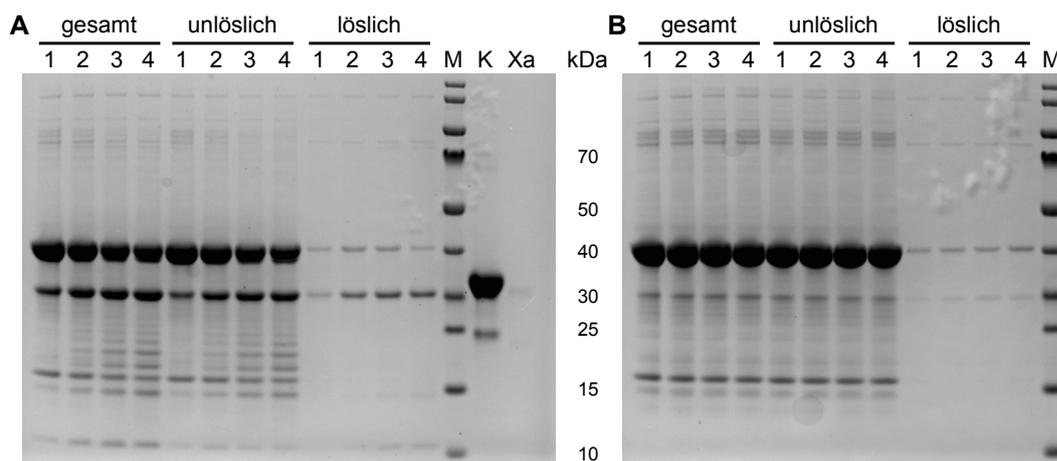


Abb. 34: SDS-PAGE Analyse der YFP-IBs A) mit Zusatz von Protease Faktor Xa und B) der Kontrolle ohne Protease. YFP-IBs wurden resuspendiert, die Proteinkonzentration der Suspension ermittelt (2.10.4.2) und Ansätze mit 1 mg ml^{-1} Protein erstellt. Die eine Hälfte der Ansätze wurde mit Protease Faktor Xa versetzt, während die andere Hälfte als Kontrolle ohne Protease diente. Alle Ansätze wurden bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1.000 UpM in einem Thermomixer inkubiert und zu definierten Zeiten Proben entnommen (1 = 10 min, 2 = 45 min, 3 = 180 min und 4 = 360 min). Ein Teil der Proben wurde ohne weitere Behandlung für die Analyse der Gesamtproteinmenge verwendet. Der Rest der Probe wurde mittels Zentrifugation in eine lösliche und eine unlösliche Proteinfraction aufgetrennt und anschließend für die SDS-PAGE (4 - 12 % Gradientengel, 2.10.5) vorbereitet. Auf das Gel wurden $10 \mu\text{l}$ der jeweiligen Probe aufgetragen. Zusätzlich wurden $8 \mu\text{g}$ gereinigte YFP-Kontrolle (K) analysiert, um die maximal mögliche Menge an löslichem YFP zu veranschaulichen. Als letztes wurde zur Identifizierung der durch die Protease verursachten Bande eine Probe mit der zu dem Verdau identischen Menge an Protease Faktor Xa als Referenz auf das Gel aufgetragen (Xa).

Aus den Daten der Fluoreszenzmessungen (Abb. 33) und den SDS-PAGE Analysen (Abb. 34) lässt sich schließen, dass der proteolytische Verdau der in den YFP-IBs enthaltenen Proteinmoleküle generell funktioniert. Allerdings konnte die eingesetzte Menge an IBs nicht vollständig verdaut werden, was sowohl an der Restfluoreszenz als auch an der Proteinzusammensetzung der unlöslichen Fraktion zu erkennen ist. Eine mögliche Begründung dafür könnte sein, dass die weiter im Inneren der IBs liegenden Proteinmoleküle entweder schlechter zugänglich sind oder starke Fehlfaltungen aufweisen, die den Zugang der verwendeten Protease verhindern. Somit würden lediglich die äußersten Schichten der IBs verdaut werden, während der Kern unberührt bleiben würde. Weiterhin ist interessant, dass nach einer Inkubation von 180 min 60 % der Gesamtfluoreszenz in die lösliche Fraktion übergegangen war. Allerdings konnte auf den SDS-Gelen deutlich erkannt werden, dass weniger als 60 % der eingesetzten Proteinmenge verdaut wurde. Aus diesem Ergebnis könnte abgeleitet werden, dass der Hauptteil der von den IBs ausgehenden Fluoreszenz aus den für die Protease zugänglichen äußeren Schichten stammt. Der Kern der IBs könnte daher aus einem größeren Anteil an fehlgefaltetem oder aufgrund von Sauerstoffmangel nicht maturiertem YFP bestehen. Allerdings scheint in den äußeren Schichten ebenfalls fehlgefaltetes YFP vorzuliegen, da während des proteolytischen Verdau das YFP-Fragment nicht nur in der löslichen sondern auch in der unlöslichen Fraktion angereichert wurde. Eine andere Begründung für diese Anreicherung des YFP-Fragments könnte sein, dass ein Teil des geschnittenen YFP über Interaktionen an den restlichen KatIBs anhaftet und auf diese Weise nicht in die lösliche Fraktion übergeht.

Weiterhin scheint die verwendete Faktor Xa Protease nicht spezifisch zu schneiden, was an den über den Inkubationszeitraum stärker auftretenden Banden im Bereich zwischen 15 und 25 kDa erkennbar ist. Dennoch könnten YFP-IBs für eine Anwendung als Substrat für die Identifizierung von Proteaseaktivität geeignet sein, da die Fluoreszenz in der löslichen Fraktion ausschließlich nach Zugabe der Protease ansteigt. Dies könnte für verschiedene Proteasen allerdings nur realisiert werden, wenn die Aminosäuresequenz der Proteaseschnittstelle bekannt ist. Die entsprechende kodierende Basensequenz der Schnittstelle könnte in wenigen Schritten durch Anpassung der Linkerregion in das YFP-Konstrukt eingebracht werden (3.2). Diese Anpassungen der Schnittstelle und der verwendeten Protease könnten darüber hinaus die Möglichkeit eröffnen, Proteine oder kurze Peptide als

Fusionsprotein in Form von IBs in großen Mengen zu produzieren und im Anschluss an einen proteolytischen Verdau zu isolieren. Geringe Mengen löslichen Fusionsproteins bzw. des abgespaltenen TDoT-tags könnten über eine IMAC entfernt werden, da das Zielprotein bzw. -peptid nicht mehr über den entsprechenden His-tag verfügt.

YFP-IBs ließen sich im Verlauf der IB-Isolierung mittels ihrer Fluoreszenz lokalisieren. Darüber hinaus konnte während eines proteolytischen Verdau die Freisetzung von löslichem Protein aus den IBs anhand der YFP-spezifischen Fluoreszenz beobachtet und somit die Aktivität der Protease verfolgt werden.

3.13 Die Substratspezifität von *EcMenD* verändert sich durch die Produktion in Form von KatIBs nicht

In den ersten Versuchen mit dem neuen *EcMenD* Fusionsprotein konnte bereits festgestellt werden, dass die *EcMenD* trotz ihrer höheren Komplexität in Form von KatIBs produziert werden konnte (3.9). Die wildtypische *EcMenD* katalysiert eine asymmetrische Carboligation, bei der für die Industrie interessante Bausteine in Form von funktionalisierten (*R*)- α -Hydroxyketonen [209] erzeugt werden können. Daher sollte als erste Anwendung der *EcMenD*-KatIBs deren Substratspezifität bestimmt und mit dem wildtypischen Enzym verglichen werden. Dazu wurden KatIBs in *EcMenD*-Puffer (2.10.1) resuspendiert und Reaktionen mit unterschiedlichen Benzaldehydderivaten und α -KG in fest verschließbaren Glasgefäßen gestartet (2.10.9). Die Reaktionen wurden für 24 h inkubiert und anschließend der Aldehydverbrauch mittels chiraler GC und der ee der produzierten 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoate durch chirale HPLC ermittelt (2.10.9.1).

Alle eingesetzten Substrate wurden von den *EcMenD*-KatIBs akzeptiert und zu den jeweiligen 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoaten umgesetzt, wobei lediglich mit 2-Brombenzaldehyd innerhalb der 24 h Reaktionszeit kein Vollumsatz erreicht werden konnte (Tab. 17). Dabei wurden für die Produkte 2a, 2b und 2e mit 97 % bis 99 % (*R*) ausgezeichnete und für 2c und 2d mit 91 % und 93 % sehr gute ee-Werte gemessen.

Tab. 17: Umsätze verschiedener Aldehyde zu den entsprechenden 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoaten katalysiert durch *EcMenD*-KatIBs.^[a]

Produkt	R ¹	Umsatz [%] ^[b]	ee [%] ^[c]
2a	H	>99	>99
2b	F	>99	97
2c	Cl	>99	91
2d	Br	87	93
2e	OCH ₃	98	99

^[a]Reaktionsbedingungen: 50 mM Triethanolamin-Puffer pH 8,0, mit enthaltenen 0,1 mM ThDP, 2 mM MgSO₄ und 5 % (v/v) MTBE; 18 mg ml⁻¹ *EcMenD*-KatIBs (Nassgewicht); 60 mM α-KG; 20 mM entsprechender Aldehyd. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C für 24 h bei 800 UpM in einem Thermomixer inkubiert (2.10.9). ^[b]Bestimmt mittels chiraler GC basierend auf Aldehydverbrauch. ^[c]Ermittelt durch chirale HPLC (2.10.9.1).

Diese Werte sind gut mit denen der wildtypischen *EcMenD* vergleichbar [170], wodurch gezeigt werden konnte, dass das aktive Zentrum der *EcMenD* in den KatIBs korrekt ausgebildet ist. Für die Messung des Substratspektrums wurde keine Optimierung der Reaktionsbedingungen vorgenommen, daher könnte es in den Fällen der weniger reinen Produkte möglich sein, den ee-Wert durch Anpassung der Reaktionsbedingungen für eine potentielle Anwendung der *EcMenD*-KatIBs zur Produktion von enantiomerenreinen 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoaten zu erhöhen.

Alle verwendeten Substrate wurden von den *EcMenD*-KatIBs akzeptiert und die entsprechenden Produkte mit sehr guten bis ausgezeichneten ee-Werten gebildet. Die Ergebnisse waren mit denen der wildtypischen *EcMenD* vergleichbar.

3.14 *EcMenD*-KatIBs lassen sich problemlos wiederverwenden

Als weitere Anwendung der *EcMenD*-KatIBs sollte überprüft werden, ob ein Recycling des Biokatalysators in einem wässrigen Reaktionssystem möglich ist. Dazu wurden Benzaldehyd und α-KG als Modellsysteme in einem gepufferten wässrigen Reaktionssystem verwendet. Im ersten Schritt des Experiments wurde ein zeitaufgelöster Umsatz aufgenommen, um einen optimalen Reaktionszeitraum für

das Recycling zu gewährleisten (2.10.9.2). Dabei sollte der Umsatz von Benzaldehyd möglichst vollständig sein, damit bei weiteren Reaktionen in einem Recycling nur die Endpunkte gemessen werden mussten, aber eine leichte Verringerung der Aktivität bzw. des Umsatzes in den Ergebnissen sichtbar werden konnte. Für die zeitaufgelöste Reaktion wurden für jeden Zeitpunkt drei Reaktionen mit *EcMenD*-KatIBs und drei Leerwerte ohne KatIBs angesetzt. Dies war notwendig, da das flüchtige Substrat Benzaldehyd für die Quantifizierung des Umsatzes benötigt wird und bei wiederholtem Öffnen und Schließen der Reaktionsgefäße sukzessiv aus der Reaktion verdunsten würde. Die ermittelten Leerwerte wurden nicht von den Reaktionen mit enthaltenen KatIBs abgezogen, sondern separat abgebildet, da sie lediglich den maximalen, nicht-enzymatisch bedingten Verlust an Benzaldehyd wiedergeben, aber nicht zwangsläufig in den Reaktionen mit KatIBs dieselbe Menge verdunstet. Die Reaktionen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen aus Plastik durchgeführt, um die *EcMenD*-KatIBs mittels Zentrifugation in einem einfachen Schritt von dem Reaktionsmedium abtrennen zu können. Nach den Reaktionen wurden die *EcMenD*-KatIBs abzentrifugiert, der Überstand mittels chiraler GC und HPLC analysiert (2.10.9.1), das Pellet mit *EcMenD*-Puffer (2.10.1) gewaschen und anschließend bis zur nächsten Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

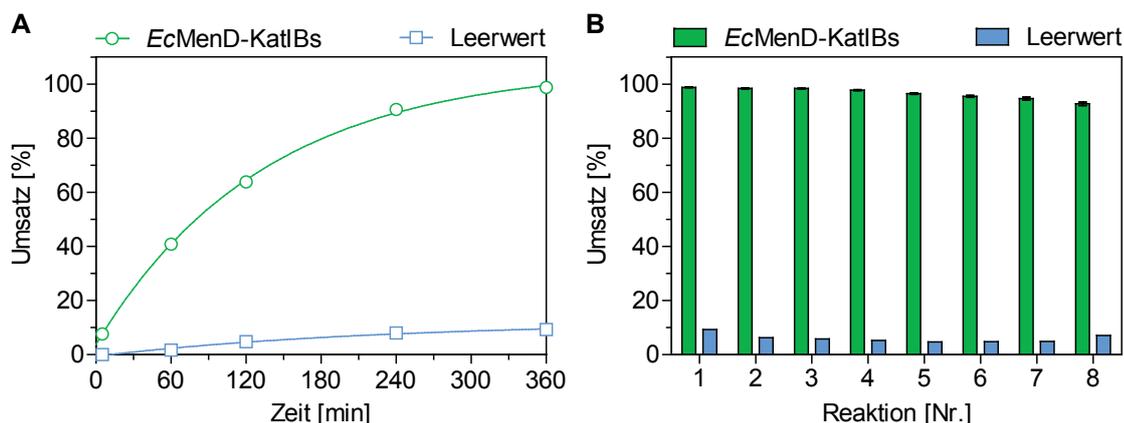


Abb. 35: Recycling von *EcMenD*-KatIBs in einem wässrigen Reaktionssystem. A) Zeitaufgelöste Produktion von (*R*)-5-Hydroxy-4-oxo-5-Phenylpentanoat zur Bestimmung des optimalen Reaktionszeitraums für Recyclingstudien (2.10.9, 2.10.9.2). B) In den folgenden sieben Reaktionen wurde jeweils der Verbrauch von Benzaldehyd nach einer Reaktionszeit von 6 h mittels chiraler GC und der *ee*-Wert des erhaltenen Produktes durch HPLC bestimmt (2.10.9.1). Nach den einzelnen Reaktionen wurden die *EcMenD*-KatIBs abzentrifugiert, gewaschen, erneut pelletiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur nächsten Verwendung gelagert. Die erhaltenen *ee*-Werte überstiegen in allen Fällen 99 % (*R*). Die Reaktionen setzten sich aus 18 mg ml^{-1} *EcMenD*-KatIBs (Nassgewicht), 50 mM TEA pH 8, 2 mM MgSO_4 , 0,1 mM ThDP, 60 mM α -KG und 20 mM Benzaldehyd zusammen und wurde bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 800 UpM in einem Thermomixer inkubiert (2.10.9.2). Alle Reaktionen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die angegebenen Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

In der zeitaufgelösten Reaktion wurden innerhalb von 6 h 99 % Benzaldehyd verbraucht (Abb. 35, A). Da dieser Wert als Startpunkt geeignet war, wurden mit dieser Reaktionszeit insgesamt acht aufeinanderfolgende Reaktionen durchgeführt. Nach acht Wiederverwendungen der *EcMenD*-KatIBs lag der Umsatz von Benzaldehyd im betrachteten Zeitraum immer noch bei 95 % (Abb. 35, B). Dieser sehr geringe Verlust von 4 % Aktivität im Vergleich zum ersten durchgeführten Umsatz ist nicht zwingend auf eine Inaktivierung des Enzyms zurückzuführen. Sehr viel wahrscheinlicher ist dagegen ein Verlust von *EcMenD*-KatIBs während der Behandlung zwischen den einzelnen Reaktionen. Dabei könnte eine geringe Menge an KatIBs zusammen mit dem Reaktionsüberstand abgenommen oder beim Waschen mit Puffer aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden. Als zusätzliches Indiz der Stabilität der *EcMenD*-KatIBs wurde von jeder Reaktion der *ee*-Wert des gebildeten Produktes überprüft. Dieser übertraf in allen Fällen einen Wert von 99 % (*R*). Da auch diesbezüglich keine Änderung festgestellt werden konnte, kann daraus geschlossen werden, dass *EcMenD*-KatIBs durch einfachste Mittel aus einem Reaktionssystem entfernt und für mehrere Reaktionen wiederverwendet werden können. Dies war bisher mit der gereinigten wildtypischen *EcMenD* nicht möglich [170]. Aus diesem Grund sind *EcMenD*-KatIBs für die Produktion von enantiomerenreinen 5-Hydroxy-4-oxo-5-Arylpentanoaten eine attraktive, kostengünstige Alternative zu löslichem Protein.

EcMenD-KatIBs ließen sich mittels einfachster Methoden mehrfach ohne Verlust an Aktivität oder einer Beeinflussung des *ee*-Werts des gebildeten Produktes wiederverwenden.

3.15 Der TDoT-tag als hervorragende Alternative zur Induktion von aktiven IBs

In dieser Arbeit konnte eindeutig belegt werden, dass in Form von IBs produzierte Enzyme über katalytische Aktivität verfügen. Dabei konnten *AfHNL*-KatIBs eingehend biochemisch charakterisiert und für die Produktion von enantiomerenreinen Cyanhydrinen verwendet werden. Darüber hinaus konnte das Konzept des KatIBs induzierenden TDoT-tags erfolgreich auf die Proteine *BsLA*, YFP und *EcMenD* übertragen werden. Dabei stellten selbst bei der im Vergleich zu den

anderen verwendeten Proteinen komplexeren *EcMenD* die Bindung der Kofaktoren ThDP und Mg^{2+} sowie die für die katalytische Aktivität notwendige Dimerisierung keine Probleme dar.

Allerdings sind die in dieser Arbeit charakterisierten KatIBs nicht die ersten beschriebenen IBs mit katalytischer Aktivität. Bereits 1989 wurde zum ersten Mal die Aktivität einer β -Galaktosidase in IBs nachgewiesen [179] und in einer weiteren unabhängigen Studie von 1991 die Aktivität der Endoglucanase D aus *Clostridium thermocellum* in IBs beschrieben [210]. Dennoch führten diese Beobachtungen nicht zu einem Überdenken der bisherigen Annahmen, dass Löslichkeit zwingend für die Funktionsfähigkeit von Enzymen notwendig ist und dass IBs aufgrund ihrer Unlöslichkeit aus komplett fehlgefalteten, inaktiven Proteinen bestehen, die ihre native Struktur nicht erreichen konnten. Obwohl aktive IBs bereits beschrieben waren, wurden erst 2005 [182] die ersten ausführlichen Studien mit IBs von mehreren Enzymen durchgeführt. Bis heute sind eine Reihe von Enzymen charakterisiert worden, die bei einer Überexpression der entsprechenden Gene in *E. coli* aktive IBs bilden (Tab. 18).

Tab. 18: Auswahl bisher in der Literatur beschriebener aktiver IBs.				
Enzymklasse		Biokatalysator	Ursprungsorganismus	Ref.
Oxidoreduktasen	1.2.3.3	Pyruvatoxidase	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	[211]
	1.5.1.3	Dihydrofolatreduktase	<i>Homo sapiens</i>	[182]
Transferasen	2.7.4.1	Polyphosphatkinase	<i>Escherichia coli</i>	[212]
	2.7.7.65	Diguanylatcyclase	<i>Thermotoga maritima</i>	[213]
Hydrolasen	3.1.1.3	Lipase A	<i>Serratia marcescens</i>	[214]
	3.2.1.23	β -Galaktosidase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	[180]
	3.2.1.23	β -Galaktosidase	<i>Escherichia coli</i>	[179]
	3.2.1.4	Endoglucanase D	<i>Clostridium thermocellum</i>	[210]

Dennoch ist unter Forschern die frühere Überzeugung, IBs enthielten inaktive Proteine, welche sich im besten Fall zur Denaturierung und Rückfaltung eignen, weit verbreitet [215]. Daher lässt sich die relativ geringe Anzahl an Publikationen über aktive IBs wahrscheinlich dadurch begründen, dass die meisten als IBs produzierten Proteine nicht auf Aktivität und weitere mögliche Anwendungen überprüft werden.

Neben den Proteinen, die eigenständig in Form von aktiven IBs produziert werden, existieren ebenfalls diverse *tags*, welche die Produktion von Protein in aktiven IBs induzieren (Tab. 19). Dabei wurden unterschiedlich komplexe Proteine, darunter

auch funktionelle Dimere [213, 216] oder Kofaktor-abhängige (z. B. FAD, ATP oder PLP) Enzyme [187, 211, 217] in Form von IBs produziert.

Tab. 19: Bereits beschriebene Bildung aktiver IBs durch Fusion mit einem tag.			
Verwendeter tag	Fusionspartner Enzymklasse	Ursprungsorganismus	Ref.
CBD aus <i>Clostridium cellulovorans</i> (CBD _{clos})	D-Aminosäureoxidase (TvDAO) 1.4.3.3 Oxidoreduktase	<i>Trigonopsis variabilis</i>	[217]
	N-Acetyl-D-Neuraminsäure-Aldolase 4.1.3.3 Lyase	<i>Escherichia coli</i>	[188]
	Maltodextrinphosphorylase (PfMD) 2.4.1.1 Transferase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	[187]
	Cytidylatkinase (CMK) 2.7.4.25 Transferase	<i>Escherichia coli</i>	[218]
	Polyphosphatkinase (PPK3) 2.7.4.1 Transferase	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	[218]
Peptid L ₆ KD	Amadoriase II (AMA) 1.5.3 Oxidoreduktase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	[219]
	Lipase A (BsLA) 3.1.1.3 Hydrolase	<i>Bacillus subtilis</i>	[219]
	β-Xylosidase (XynB) 3.2.1.37 Hydrolase	<i>Bacillus pumilus</i>	[219]
	GFP Fluoreszenzreporter	<i>Aequorea victoria</i>	[219]
Variationen des Peptids DWLKAFYDKVAEKL KEAF	Amadoriase II (AMA) 1.5.3 Oxidoreduktase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	[220]
	Lipase A (BsLA) 3.1.1.3 Hydrolase	<i>Bacillus subtilis</i>	[220]
	GFP Fluoreszenzreporter	<i>Aequorea victoria</i>	[220]
Peptid ELK16 (LELELKLK) ₂	Amadoriase II (AMA) 1.5.3 Oxidoreduktase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	[221]
	β-Xylosidase (XynB) 3.2.1.37 Hydrolase	<i>Bacillus pumilus</i>	[221]
	GFP Fluoreszenzreporter	<i>Aequorea victoria</i>	[221]
CBM aus <i>Cellulomonas fimi</i>	β-Glukuronidase (gusA) 3.2.1.31 Hydrolase	<i>Escherichia coli</i>	[222]
	β-Glykosidase (bglA) 3.2.1.21 Hydrolase	<i>Thermus caldophilus</i>	[222]
	DsRed Fluoreszenzreporter	<i>Discosoma striata</i>	[222]
VP1 Kapsidprotein (Maul- und Klauenseuche-Virus)	β-Galaktosidase (lacZ) 3.2.1.23 Hydrolase	<i>Escherichia coli</i>	[182]
	GFP Fluoreszenzreporter	<i>Aequorea victoria</i>	[182]
PoxB aus <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Amylase (AmyE) 3.2.1.1 Hydrolase	<i>Bacillus subtilis</i>	[211]
	GFP Fluoreszenzreporter	<i>Aequorea victoria</i>	[211]
MalE31	alkalische Phosphatase (PhoA) 3.1.3.1 Hydrolase	<i>Escherichia coli</i>	[216]
	β-Lactamase (Bla) 3.5.2.6 Hydrolase	<i>Escherichia coli</i>	[216]
Humanes Aβ-Amyloidpeptid (Aβ(F19D))	BFP (Derivat des GFP) Fluoreszenzreporter	<i>Aequorea victoria</i>	[182]

Bereits 2005 wurden in der ersten ausführlicheren Publikation über funktionale bzw. enzymatisch aktive IBs zwei solcher IB-induzierenden *tags* beschrieben [182]. Bei dem ersten *tag* handelte es sich um das humane Alzheimer A β -Amyloidpeptid mit dem Aminosäureaustausch F19D (A β (F19D)), welches in einer Fusion mit dem blau fluoreszierenden Protein (BFP, ein Derivat des GFP) fluoreszente IBs ergab. Mittels Fusion mit dem zweiten *tag*, dem VP1 Kapsidprotein des Maul- und Klauenseuche-Virus, wurden erfolgreich aktive β -Galaktosidase-IBs und fluoreszente GFP-IBs produziert. Allerdings wurden die erhaltenen IBs weder eingehender auf Anwendungen in der Biokatalyse noch auf – gegenüber den löslichen Varianten – verbesserte Eigenschaften untersucht.

Der an den meisten Enzymen verwendete *tag* ist die Cellulosebindedomäne des Cellulosebindepotein A aus *Clostridium cellulovorans* (CBD_{clos}) [187, 188, 217, 218]. Fünf verschiedene Enzyme wurden durch Fusion mit diesem *tag* als aktive IBs produziert und anschließend teilweise biochemisch charakterisiert sowie für die Synthese von biotechnologisch relevanten Stoffen verwendet. Dabei wurden sowohl Stabilitäten bestimmt als auch Recyclings mit den Biokatalysatoren durchgeführt. Aufgrund dieser eingehenden Charakterisierung des *tags* an verschiedenen Enzymen lässt sich dieser wahrscheinlich am besten mit dem in dieser Arbeit etablierten TDoT-*tag* vergleichen. Allerdings besteht CBD_{clos} aus 162 Aminosäuren, während TDoT lediglich 50 Aminosäuren umfasst und somit deutlich kleiner ist, wobei das Peptid ELK16 mit einer Größe von 16 Aminosäuren den kleinsten *tag* darstellt [221].

Besonders hervorzuheben sind die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit *At*HNL-KatIBs in reinen organischen Lösungsmitteln zur Synthese von enantiomerenreinen Cyanhydrinen. In diesem Zusammenhang ist lediglich die nicht mit einem *tag* versehene Lipase A aus *Serratia marcescens* (Tab. 18) erwähnenswert, da diese in bis zu 50 %igen wässrigen Lösungen verschiedener organischer Lösungsmittel verwendet wurde [214]. Daher stellen *At*HNL-KatIBs wahrscheinlich die erste Verwendung von aktiven IBs in reinen organischen Lösungsmitteln dar.

Der in dieser Arbeit etablierte TDoT-*tag* zur Produktion von Proteinen in Form von KatIBs stellt im Vergleich zu anderen bisher in der Literatur beschriebenen *tags* eine gut charakterisierte Alternative dar.

3.16 Die für diese Arbeit gesetzten Ziele konnten auf einem unerwarteten Weg erreicht werden

Als Kernaufgabe sollte in dieser Arbeit eine einfache, neue Methode zur Stabilisierung von Biokatalysatoren etabliert werden. Dazu wurde als Modellenzym, aufgrund ihres leicht zu beobachtenden Stabilitätsproblems im schwach sauren pH-Bereich, die *A*tHNL verwendet. Die Stabilisierung des Biokatalysators sollte durch eine gezielte Änderung seines oligomeren Zustands mittels einer simplen Fusion mit einem *coiled coil* erfolgen. Allerdings konnte diese Strategie nicht weiter verfolgt werden, da während der Überexpression der neu konstruierten Genfusionen kein lösliches Protein gebildet wurde. Stattdessen kam es zu einer verstärkten Produktion von IBs, die allerdings entgegen der Erwartung deutliche Aktivität besaßen (3.3.1). In weiteren Versuchen konnte darüber hinaus eine 190-fach erhöhte pH-Stabilität dieser KatIBs gegenüber schwach sauren Lösungen im Vergleich zur wildtypischen *A*tHNL festgestellt werden (3.5). Daher konnte zwar der ursprünglich gewünschte Effekt einer im Vergleich zum Wildtyp stabilisierten löslichen Variante durch eine erhöhte Oligomerisierung nicht erreicht werden, aber dennoch die angestrebte Stabilisierung der *A*tHNL auf einem neuen Weg umgesetzt werden.

Auch weitere der ursprünglich angedachten Ziele, wie die Synthese von enantiomerenreinen Cyanhydrinen in einem mikrowässrigen Reaktionssystem, gelangen mit den *A*tHNL-KatIBs (3.6). Aufgrund der natürlichen Immobilisierung des Biokatalysators konnte dieser besonders effizient in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionen wiederverwendet werden (3.6.4). Dabei waren für die Isolierung der KatIBs und deren Einsatz zur Synthese verschiedener Cyanhydrine keine aufwendigen Verfahren notwendig, da dies abgesehen vom Zellaufschluss ausschließlich durch Zentrifugations- und Waschschriffe erfolgte.

Weiterhin konnte das Konzept der KatIBs erfolgreich auf die Zielproteine YFP, *B*sLA und *E*cMenD ausgeweitet werden. So konnte beispielsweise anhand der YFP-Fluoreszenz die Bildung von IBs in lebenden Zellen verfolgt werden (3.11). Außerdem konnte mit dem komplexeren, Kofaktor-abhängigen Enzym *E*cMenD gezeigt werden, dass selbst Kofaktorbindung (ThDP, Mg^{2+}) und die Ausbildung der für die katalytische Aktivität notwendigen Quartärstruktur in KatIBs möglich ist (3.13). Auch eine Wiederverwendung der *E*cMenD-KatIBs in acht aufeinanderfolgenden Reaktionen konnte ermöglicht werden (3.14).

3.17 Ausblick

In anschließenden Arbeiten sollten mehrere Aspekte der KatIBs eingehender untersucht werden. Dabei wäre es zum Beispiel denkbar, dass durch eine weitere Optimierung der Expressionsbedingungen die Aktivität der KatIBs gesteigert werden kann. Um dies auch in Bezug auf die durch den TDoT-*tag* induzierte Bildung von KatIBs zu untersuchen, könnten zunächst Optimierungen mit den YFP-IBs durchgeführt werden. Deren Fluoreszenz würde es ermöglichen, die Größe der KatIBs mittels Fluoreszenzmikroskopie direkt in lebenden Zellen zu bestimmen. Zusätzlich könnte für die Optimierung der Expressionsbedingungen ein Mikrofermentations-System, z. B. ein Biolector der Firma M2P Labs, eingesetzt werden, um auf einfache Weise möglichst viele unterschiedliche Bedingungen testen zu können.

Des Weiteren wäre es sinnvoll, eine neue Strategie zur Wiederverwendung der lyophilisierten *AtHNL*-KatIBs für die Synthese von enantiomerenreinen (*R*)-Cyanhydrinen zu etablieren. Dabei müssten reaktionstechnische Probleme in Bezug auf das flüchtige Lösungsmittel MTBE und das darin enthaltene hochgiftige HCN überwunden werden, die eine einfache Abtrennung der KatIBs beispielsweise mittels Zentrifugation erschweren. Dazu wären entweder dichte, lösungsmittelresistente aber dennoch bei hohen Geschwindigkeiten zentrifugierbare Gefäße oder dichtere Membranen zur Zurückhaltung der KatIBs in „Teebeuteln“ erforderlich. Eine Membran mit geringerer Porengröße würde allerdings die Diffusionslimitierungen erhöhen, denen eventuell in einem größeren Reaktionsgefäß durch starkes Rühren entgegengewirkt werden könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Partikel der lyophilisierten *AtHNL*-KatIBs durch Kombination mit anderen Immobilisierungsstrategien, wie Quervernetzung der KatIBs mit Glutardialdehyd oder Einschluss in Alginate, zu vergrößern. Dies wurde bereits erfolgreich bei anderen Enzymimmobilisaten angewendet [187, 188].

Wenn diese Probleme gelöst sind, wäre auch eine weitere Skalierung des Reaktionssystems zur Herstellung chiraler Cyanhydrine möglich. Dabei könnte ein SpinChem Reaktor (Nordic ChemQuest, Schweden) zum Einsatz kommen, in dem das Immobilisat in einem Kompartiment des Rührers eingeschlossen ist, sodass laut Herstellerangaben Diffusionslimitierungen nahezu komplett vermieden werden können. Eine Anwendung im größeren Maßstab wäre ebenfalls für die *EcMenD*-KatIBs denkbar.

Weiterhin könnte die Anwendbarkeit der YFP-IBs als Proteasesubstrat evaluiert werden. Dazu müssten weitere Varianten mit neuen im Linker enthaltenen Proteaseschnittstellen erzeugt und der Verdau durch verschiedene Proteasen getestet werden. Auch die Gewinnung von sauberem, löslichem Protein ohne *tag* könnte durch Änderung der Schnittstelle und die Verwendung einer anderen, spezifischer schneidenden Protease, wie der *tobacco etch virus* (TEV) Protease, ermöglicht werden. Mithilfe des TDoT-*tags* könnten somit weitere industriell interessante Zielenzyme oder kurze Peptide (z. B. Peptidtherapeutika [223]) in Form von KatIBs produziert und deren Reinigung sowie Verwendung dadurch kostengünstiger und effizienter gestaltet werden.

Darüber hinaus könnten mehrstufige Kaskadenreaktionen mit verschiedenen Enzym-KatIBs durchgeführt werden, um industriell interessante Produkte zu gewinnen. Beispielsweise könnten die bereits etablierten *AtHNL*-KatIBs mit einer ebenfalls mit dem TDoT-*tag* versehenen und somit in Form von KatIBs produzierten Nitrilase kombiniert werden. Dadurch wäre eine direkte Produktion von (*R*)-Mandelsäurederivaten möglich, wodurch der erste Reaktionsschritt zu Mandelonitril beschleunigt und eventuell verbesserte *ee*-Werte, mit für die chemische Nebenreaktion anfälligeren Substraten, erzielt werden könnten [224].

4 Literatur

- [1] von Soden W, Schott A: **Das Gilgamesch-Epos**. Stuttgart: Reclam; 1987.
- [2] Ulber R, Soyez K: **5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin**. *Chem unserer Zeit* 2004, **38**:172-180.
- [3] Buchner E: **Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung)**. *Ber Dt chem Ges* 1897, **30**:117-124.
- [4] Rosenthaler L: **Enzyme effected asymmetrical synthesis**. *Biochem Z* 1908, **14**:238-253.
- [5] Hugenholtz P: **Exploring prokaryotic diversity in the genomic era**. *Genome Biol* 2002, **3**:reviews0003.0001–0003.
- [6] Rappe MS, Giovannoni SJ: **The uncultured microbial majority**. *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:369-394.
- [7] Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB: **Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973, **70**:3240-3244.
- [8] Morrow JF, Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Goodman HM, Helling RB: **Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974, **71**:1743-1747.
- [9] Smith HO, Wilcox KW: **A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae* I. Purification and general properties**. *J Mol Biol* 1970, **51**:379-391.
- [10] Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA: **Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach**. *Annu Rev Microbiol* 1986, **40**:337-365.
- [11] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO: **Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea**. *Science* 2004, **304**:66-74.
- [12] Diez B, Mellado E, Rodriguez M, Fouces R, Barredo JL: **Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics**. *Biotechnol Bioeng* 1997, **55**:216-226.
- [13] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: **Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **69**:1-8.
- [14] Adrio JL, Demain AL: **Recombinant organisms for production of industrial products**. *Bioeng Bugs* 2010, **1**:116-131.
- [15] Harding KG, Dennis JS, von Blottnitz H, Harrison STL: **A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel**. *J Clean Prod* 2008, **16**:1368-1378.
- [16] Fan X, Niehus X, Sandoval G: **Lipases as biocatalyst for biodiesel production**. *Methods Mol Biol* 2012, **861**:471-483.
- [17] Kim DY, Dordick JS: **Combinatorial array-based enzymatic polyester synthesis**. *Biotechnol Bioeng* 2001, **76**:200-206.
- [18] Nielsen PH, Skagerlind P: **Cost-neutral replacement of surfactants with enzymes**. *Househ and Person Care Today* 2007, **4**:3-7.

- [19] Goesaert H, Slade L, Levine H, Delcour JA: **Amylases and bread firming - An integrated view.** *J Cereal Sci* 2009, **50**:345-352.
- [20] Lindstrom B, Pettersson LJ: **A brief history of catalysis.** *Cattech* 2003, **7**:130-138.
- [21] Faber K: **Biotransformations in organic chemistry**, 6th edn. Berlin: Springer; 2011.
- [22] Patel R, Hanson R, Goswami A, Nanduri V, Banerjee A, Donovan MJ, Goldberg S, Johnston R, Brzozowski D, Tully T, Howell J, Cazzulino D, Ko R: **Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003, **30**:252-259.
- [23] Nestl BM, Nebel BA, Hauer B: **Recent progress in industrial biocatalysis.** *Curr Opin Chem Biol* 2011, **15**:187-193.
- [24] Desai AA: **Sitagliptin manufacture: A compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2011, **50**:1974-1976.
- [25] Sheldon RA: **Green solvents for sustainable organic synthesis: State of the art.** *Green Chem* 2005, **7**:267-278.
- [26] Wohlgemuth R: **Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells.** *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:283-292.
- [27] Sym EA: **Action of esterase in the presence of organic solvents.** *Biochem J* 1936, **30**:609-617.
- [28] Zaks A, Klibanov AM: **Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C.** *Science* 1984, **224**:1249-1251.
- [29] Zaks A, Klibanov AM: **Enzyme-catalyzed processes in organic solvents.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**:3192-3196.
- [30] Erbedinger M, Mesiano AJ, Russell AJ: **Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents.** *Biotechnol Prog* 2000, **16**:1129-1131.
- [31] Dijkstra ZJ, Merchant R, Keurentjes JTF: **Stability and activity of enzyme aggregates of CalB in supercritical CO₂.** *J Supercrit Fluid* 2007, **41**:102-108.
- [32] Nagayama K, Spiess AC, Büchs J: **Enhanced catalytic performance of immobilized *Parvibaculum lavamentivorans* alcohol dehydrogenase in a gas phase bioreactor using glycerol as an additive.** *Chem Eng J* 2012, **207**:342-348.
- [33] Cotterill IC, Sutherland AG, Roberts SM, Grobbauer R, Spreitz J, Faber K: **Enzymatic resolution of sterically demanding bicyclo[3.2.0]heptanes - Evidence for a novel hydrolase in crude porcine pancreatic lipase and the advantages of using organic media for some of the biotransformations.** *J Chem Soc Perkin 1* 1991:1365-1368.
- [34] Doukyu N, Ogino H: **Organic solvent-tolerant enzymes.** *Biochem Eng J* 2010, **48**:270-282.
- [35] Castro GR, Knubovets T: **Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures.** *Crit Rev Biotechnol* 2003, **23**:195-231.
- [36] Yamamoto Y, Yamamoto K, Nishioka T, Oda J: **Asymmetric synthesis of optically active lactones from cyclic acid anhydrides using lipase in organic solvents.** *Agric Biol Chem* 1988, **52**:3087-3092.
- [37] Liszka MJ, Clark ME, Schneider E, Clark DS: **Nature versus nurture: Developing enzymes that function under extreme conditions.** *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2012, **3**:77-102.

- [38] Ganske F, Bornscheuer UT: **Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and organic solvents.** *Biotechnol Lett* 2006, **28**:465-469.
- [39] Gerhards T, Mackfeld U, Bocola M, von Lieres E, Wiechert W, Pohl M, Rother D: **Influence of organic solvents on enzymatic asymmetric carboligations.** *Adv Synth Catal* 2012, **354**:2805-2820.
- [40] Oren A: **Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms.** *Environ Technol* 2010, **31**:825-834.
- [41] Kumar CG, Takagi H: **Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint.** *Biotechnol Adv* 1999, **17**:561-594.
- [42] Iyer PV, Ananthanarayan L: **Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment.** *Process Biochem* 2008, **43**:1019-1032.
- [43] George SP, Ahmad A, Rao MB: **A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora sp.*: Influence of additives on thermostability.** *Bioresour Technol* 2001, **78**:221-224.
- [44] Brougham MJ, Johnson DB: **Glycerol, α -glycerophosphate and other compounds as stabilizers of alcohol-dehydrogenase from yeast.** *Enzyme Microb Technol* 1981, **3**:225-228.
- [45] Tsitsanou KE, Oikonomakos NG, Zographos SE, Skamnaki VT, Gregoriou M, Watson KA, Johnson LN, Fleet GWJ: **Effects of commonly used cryoprotectants on glycogen phosphorylase activity and structure.** *Protein Sci* 1999, **8**:741-749.
- [46] Wingfield P: **Protein precipitation using ammonium sulfate.** *Curr Protoc Protein Sci* 2001, **Appendix 3**:Appendix 3F.
- [47] Han Y, Jin BS, Lee SB, Sohn Y, Joung JW, Lee JH: **Effects of sugar additives on protein stability of recombinant human serum albumin during lyophilization and storage.** *Arch Pharm Res* 2007, **30**:1124-1131.
- [48] Karaseva EI, Metelitsa DI: **Stabilization of glucoso-6-phosphate dehydrogenase by its substrate and cofactor in an ultrasonic field.** *Bioorg Khim* 2006, **32**:485-493.
- [49] Lejeune A, Vanhove M, Lamotte-Brasseur J, Pain RH, Frere JM, Matagne A: **Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 β -lactamase.** *Chem Biol* 2001, **8**:831-842.
- [50] Takagi H, Takahashi T, Momose H, Inouye M, Maeda Y, Matsuzawa H, Ohta T: **Enhancement of the thermostability of subtilisin-E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease.** *J Biol Chem* 1990, **265**:6874-6878.
- [51] Mansfeld J, Vriend G, Dijkstra BW, Veltman OR, Van den Burg B, Venema G, Ulbrich-Hofmann R, Eijsink VG: **Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond.** *J Biol Chem* 1997, **272**:11152-11156.
- [52] Fenel F, Leisola M, Janis J, Turunen O: **A *de novo* designed N-terminal disulfide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II.** *J Biotechnol* 2004, **108**:137-143.
- [53] Ben Mabrouk S, Aghajari N, Ben Ali M, Ben Messaoud E, Juy M, Haser R, Bejar S: **Enhancement of the thermostability of the maltogenic amylase MAUS149 by Gly312Ala and Lys436Arg substitutions.** *Bioresour Technol* 2011, **102**:1740-1746.
- [54] Fenel F, Zitting AJ, Kantelinen A: **Increased alkali stability in *Trichoderma reesei* endo-1, 4- β -xylanase II by site directed mutagenesis.** *J Biotechnol* 2006, **121**:102-107.

- [55] Anbar M, Gul O, Lamed R, Sezerman UO, Bayer EA: **Improved thermostability of *Clostridium thermocellum* endoglucanase Cel8A by using consensus-guided mutagenesis.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:3458-3464.
- [56] Zhang NY, Suen WC, Windsor W, Xiao L, Madison V, Zaks A: **Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution.** *Protein Eng* 2003, **16**:599-605.
- [57] Miyazaki K, Takenouchi M, Kondo H, Noro N, Suzuki M, Tsuda S: **Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution.** *J Biol Chem* 2006, **281**:10236-10242.
- [58] Arnold FH, Volkov AA: **Directed evolution of biocatalysts.** *Curr Opin Chem Biol* 1999, **3**:54-59.
- [59] Aharoni A, Thieme K, Chiu CP, Buchini S, Lairson LL, Chen H, Strynadka NC, Wakarchuk WW, Withers SG: **High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases.** *Nat Methods* 2006, **3**:609-614.
- [60] Heinzelman P, Snow CD, Wu I, Nguyen C, Villalobos A, Govindarajan S, Minshull J, Arnold FH: **A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:5610-5615.
- [61] Chen WT, Chen T, Cheng CS, Huang WY, Wang X, Yin HS: **Circular permutation of chicken interleukin-1 β enhances its thermostability.** *Chem Commun* 2014, **50**:4248-4250.
- [62] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R: **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** *Enzyme Microb Technol* 2007, **40**:1451-1463.
- [63] Cao L: **Carrier-bound immobilized enzymes: Principles, application and design.** Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009.
- [64] Sheldon RA: **Enzyme immobilization: The quest for optimum performance.** *Adv Synth Catal* 2007, **349**:1289-1307.
- [65] Gaisberger RP, Fechter MH, Griengl H: **The first hydroxynitrile lyase catalysed cyanohydrin formation in ionic liquids.** *Tetrahedron Asymmetry* 2004, **15**:2959-2963.
- [66] Kirk O, Christensen MW: **Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin.** *Org Process Res Dev* 2002, **6**:446-451.
- [67] Petkar M, Lali A, Caimi P, Daminati M: **Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis.** *J Mol Catal B Enzym* 2006, **39**:83-90.
- [68] Kery V, Haplova J, Tihlarik K, Schmidt S: **Factors influencing the activity and thermostability of immobilized porcine pancreatic lipase.** *J Chem Technol Biotechnol* 1990, **48**:201-207.
- [69] Datta S, Christena LR, Rajaram Y: **Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials.** *3 Biotech* 2013, **3**:1-9.
- [70] Basso A, Braiuca P, Cantone S, Ebert C, Linda P, Spizzo P, Caimi P, Hanefeld U, Degrassi G, Gardossi L: **In silico analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads.** *Adv Synth Catal* 2007, **349**:877-886.
- [71] Katchalski-Katzir E, Kraemer DM: **Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.** *J Mol Catal B Enzym* 2000, **10**:157-176.

- [72] Pedroche J, Yust MD, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Giron-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Guisan JM, Millan F: **Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability.** *Enzyme Microb Technol* 2007, **40**:1160-1166.
- [73] Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA: **Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase.** *Org Lett* 2000, **2**:1361-1364.
- [74] Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom AP, van Rantwijk F, van der Wielen LA, Sheldon RA: **Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs).** *Biotechnol Bioeng* 2004, **87**:754-762.
- [75] Chmura A, van der Kraan GM, Kielar F, van Langen LM, van Rantwijk F, Sheldon RA: **Cross-linked aggregates of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*: Highly active and robust biocatalysts.** *Adv Synth Catal* 2006, **348**:1655-1661.
- [76] Guiseppi-Elie A, Sheppard NF, Jr., Brahim S, Narinesingh D: **Enzyme microgels in packed-bed bioreactors with downstream amperometric detection using microfabricated interdigitated microsensor electrode arrays.** *Biotechnol Bioeng* 2001, **75**:475-484.
- [77] Bremond N, Santanach-Carreras E, Chu L-Y, Bibette J: **Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane: Liquid pearls.** *Soft Matter* 2010, **6**:2484-2488.
- [78] Ishige T, Honda K, Shimizu S: **Whole organism biocatalysis.** *Curr Opin Chem Biol* 2005, **9**:174-180.
- [79] Katz M, Frejd T, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF: **Efficient anaerobic whole cell stereoselective bioreduction with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnol Bioeng* 2003, **84**:573-582.
- [80] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B: **Industrial biocatalysis today and tomorrow.** *Nature* 2001, **409**:258-268.
- [81] Serralheiro ML, Empis JM, Cabral JMS: **Thermostability of α -chymotrypsin encapsulated in reversed micelles.** *Biotechnol Lett* 1990, **12**:167-172.
- [82] Braun S, Rappoport S, Zusman R, Avnir D, Ottolenghi M: **Biochemically active sol-gel glasses - The trapping of enzymes.** *Mater Lett* 1990, **10**:1-5.
- [83] Pierre AC: **The sol-gel encapsulation of enzymes.** *Biocatal Biotransformation* 2004, **22**:145-170.
- [84] Pierre AC, Pajonk GM: **Chemistry of aerogels and their applications.** *Chem Rev* 2002, **102**:4243-4265.
- [85] Veum L, Hanefeld U, Pierre A: **The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol-gel matrix.** *Tetrahedron* 2004, **60**:10419-10425.
- [86] Havens PL, Rase HF: **Reusable immobilized enzyme polyurethane sponge for removal and detoxification of localized organophosphate pesticide spills.** *Ind Eng Chem Res* 1993, **32**:2254-2258.
- [87] Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM: **Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes.** *Org Process Res Dev* 2011, **15**:266-274.
- [88] Liese A, Hilterhaus L: **Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications.** *Chem Soc Rev* 2013, **42**:6236-6249.
- [89] Bortone N, Fidaleo M, Moresi M: **Assessment of diffusion limitations on the performance of immobilised acid urease derivatives.** *Chem Eng Trans* 2013, **32**:1129-1134.

-
- [90] Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM: **Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters.** *Enzyme Microb Technol* 2002, **31**:775-783.
- [91] Karboune S, Archelas A, Furstoss R, Baratti J: **Immobilization of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* onto DEAE-cellulose: Enzymatic properties and application for the enantioselective resolution of a racemic epoxide.** *J Mol Catal B Enzym* 2005, **32**:175-183.
- [92] Dadashipour M, Asano Y: **Hydroxynitrile lyases: Insights into biochemistry, discovery, and engineering.** *ACS Catalysis* 2011, **1**:1121-1149.
- [93] Sharma M, Sharma NN, Bhalla TC: **Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry.** *Enzyme Microb Technol* 2005, **37**:279-294.
- [94] Hughes J, Decarvalho JPC, Hughes MA: **Purification, characterization, and cloning of α -hydroxynitrile lyase from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *Arch Biochem Biophys* 1994, **311**:496-502.
- [95] Poulton JE: **Cyanogenesis in plants.** *Plant Physiol* 1990, **94**:401-405.
- [96] Hickel A, Hasslacher M, Griengl H: **Hydroxynitrile lyases: Functions and properties.** *Physiol Plant* 1996, **98**:891-898.
- [97] McMahon JM, White WLB, Sayre RT: **Cyanogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *J Exp Bot* 1995, **46**:731-741.
- [98] Way JL: **Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1984, **24**:451-481.
- [99] Halter JG, Chen WD, Hild N, Mora CA, Stoessel PR, Koehler FM, Grass RN, Stark WJ: **Induced cyanogenesis from hydroxynitrile lyase and mandelonitrile on wheat with polylactic acid multilayer-coating produces self-defending seeds.** *J Mater Chem A Mater Energy Sustain* 2014, **2**:853-858.
- [100] Andexer JN, von Langermann J, Mell A, Bocola M, Kragl U, Eggert T, Pohl M: **An (*R*)-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -hydrolase fold.** *Angew Chem Int Edit* 2007, **46**:8679-8681.
- [101] Andexer JN, Staunig N, Eggert T, Kratky C, Pohl M, Gruber K: **Hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold: Two enzymes with almost identical 3D structures but opposite enantioselectivities and different reaction mechanisms.** *ChemBiochem* 2012, **13**:1932-1939.
- [102] Gruber K, Gartler G, Krammer B, Schwab H, Kratky C: **Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the α/β -hydrolase superfamily - The three-dimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of LYS236.** *J Biol Chem* 2004, **279**:20501-20510.
- [103] Dreveny I, Andryushkova AS, Glieder A, Gruber K, Kratky C: **Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity.** *Biochemistry* 2009, **48**:3370-3377.
- [104] Holt J, Hanefeld U: **Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins.** *Curr Org Synth* 2009, **6**:15-37.
- [105] Purkarthofer T, Skranc W, Schuster C, Griengl H: **Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **76**:309-320.
-

- [106] Soderlund DM: **Resmethrin, the first modern pyrethroid insecticide.** *Pest Manag Sci* 2014:Epub ahead of print.
- [107] von Langermann J, Guterl JK, Pohl M, Wajant H, Kragl U: **Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values.** *Bioprocess Biosyst Eng* 2008, **31**:155-161.
- [108] Andexer JN, von Langermann J, Kragl U, Pohl M: **How to overcome limitations in biotechnological processes - Examples from hydroxynitrile lyase applications.** *Trends Biotechnol* 2009, **27**:599-607.
- [109] Ueatrongchit T, Komeda H, Asano Y, H-Kittikun A: **Parameters influencing asymmetric synthesis of (R)-mandelonitrile by a novel (R)-hydroxynitrile lyase from *Eriobotrya japonica*.** *J Mol Catal B Enzym* 2009, **56**:208-214.
- [110] Gerrits PJ, Willeman WF, Straathof AJJ, Heijnen JJ, Brussee J, van der Gen A: **Mass transfer limitation as a tool to enhance the enantiomeric excess in the enzymatic synthesis of chiral cyanohydrins.** *J Mol Catal B Enzym* 2001, **15**:111-121.
- [111] Willeman WF, Straathof AJJ, Heijnen JJ: **Reaction temperature optimization procedure for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase using a process model approach.** *Enzyme Microb Technol* 2002, **30**:200-208.
- [112] Baldascini H, Janssen DB: **Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system.** *Enzyme Microb Technol* 2005, **36**:285-293.
- [113] Costes D, Wehtje E, Adlercreutz P: **Hydroxynitrile lyase-catalyzed synthesis of cyanohydrins in organic solvents - Parameters influencing activity and enantiospecificity.** *Enzyme Microb Technol* 1999, **25**:384-391.
- [114] Okrob D, Paravidino M, Orru RVA, Wiechert W, Hanefeld U, Pohl M: **Hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of reaction parameters for enantiopure cyanohydrin synthesis by pure and immobilized catalyst.** *Adv Synth Catal* 2011, **353**:2399-2408.
- [115] Guterl JK, Andexer JN, Sehl T, von Langermann J, Frindi-Wosch I, Rosenkranz T, Fitter J, Gruber K, Kragl U, Eggert T, Pohl M: **Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold.** *J Biotechnol* 2009, **141**:166-173.
- [116] Okrob D: **Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* für die enantioselektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen.** *Dissertation.* Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität; 2012.
- [117] Scholz KE, Okrob D, Kopka B, Grünberger A, Pohl M, Jaeger K-E, Krauss U: **Synthesis of chiral cyanohydrins by recombinant *Escherichia coli* cells in a micro-aqueous reaction system.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:5025-5027.
- [118] Scholz KE: **Fluoreszenzreporterproteine als Werkzeuge in der Biotechnologie.** *Dissertation.* Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität; 2012.
- [119] Chueskul S, Chulavatnatol M: **Properties of α -hydroxynitrile lyase from the petiole of cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *Arch Biochem Biophys* 1996, **334**:401-405.
- [120] Okrob D, Metzner J, Wiechert W, Gruber K, Pohl M: **Tailoring a stabilized variant of hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*.** *ChemBiochem* 2012, **13**:797-802.
- [121] Lauble H, Forster S, Miehlich B, Wajant H, Effenberger F: **Structure of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with substrates acetone and chloroacetone: Implications for the mechanism of cyanogenesis.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001, **57**:194-200.

- [122] Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krauss U, Guterl JK, Wendorff M, Losi A, Gärtner W, Jaeger K-E: **Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:443-445.
- [123] Scholz KE, Kopka B, Wirtz A, Pohl M, Jaeger K-E, Krauss U: **Fusion of a flavin-based fluorescent protein to hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* improves enzyme stability.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **79**:4727-4733.
- [124] Circolone F, Granzin J, Jentzsch K, Drepper T, Jaeger K-E, Willbold D, Krauss U, Batra-Safferling R: **Structural basis for the slow dark recovery of a full-length LOV protein from *Pseudomonas putida*.** *J Mol Biol* 2012, **417**:362-374.
- [125] Diensthuber RP, Bommer M, Gleichmann T, Moglich A: **Full-length structure of a sensor histidine kinase pinpoints coaxial coiled coils as signal transducers and modulators.** *Structure* 2013, **21**:1127-1136.
- [126] Gaidenko TA, Kim TJ, Weigel AL, Brody MS, Price CW: **The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2006, **188**:6387-6395.
- [127] Davis L, Abdi K, Machius M, Brautigam C, Tomchick DR, Bennett V, Michaely P: **Localization and structure of the ankyrin-binding site on β_2 -spectrin.** *J Biol Chem* 2009, **284**:6982-6987.
- [128] Heuston E, Bronner CE, Kull FJ, Endow SA: **A kinesin motor in a force-producing conformation.** *BMC Struct Biol* 2010, **10**:19.
- [129] Glover JNM, Harrison SC: **Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA.** *Nature* 1995, **373**:257-261.
- [130] Wolf E, Kim PS, Berger B: **MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled coils.** *Protein Sci* 1997, **6**:1179-1189.
- [131] Moutevelis E, Woolfson DN: **A periodic table of coiled-coil protein structures.** *J Mol Biol* 2009, **385**:726-732.
- [132] Rackham OJL, Madera M, Armstrong CT, Vincent TL, Woolfson DN, Gough J: **The evolution and structure prediction of coiled coils across all genomes.** *J Mol Biol* 2010, **403**:480-493.
- [133] Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV: **Coiled coils: A highly versatile protein folding motif.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:82-88.
- [134] Ausmees N, Kuhn JR, Jacobs-Wagner C: **The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function in cell shape.** *Cell* 2003, **115**:705-713.
- [135] Harborth J, Wang J, Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M: **Self assembly of NuMA: Multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice.** *EMBO J* 1999, **18**:1689-1700.
- [136] Fraser RD, Macrae TP, Miller A: **The coiled-coil model of α -keratin structure.** *J Mol Biol* 1964, **10**:147-156.
- [137] Nicolas A, Delalande O, Hubert JF, Le Rumeur E: **The spectrin family of proteins: A unique coiled-coil fold for various molecular surface properties.** *J Struct Biol* 2014, **186**:392-401.
- [138] De Matteis MA, Morrow JS: **Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway.** *J Cell Sci* 2000, **113**:2331-2343.
- [139] Kon T, Imamula K, Roberts AJ, Ohkura R, Knight PJ, Gibbons IR, Burgess SA, Sutoh K: **Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**:325-333.

- [140] Schwaiger I, Sattler C, Hostetter DR, Rief M: **The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure.** *Nat Mater* 2002, **1**:232-235.
- [141] Thormahlen M, Marx A, Sack S, Mandelkow E: **The coiled-coil helix in the neck of kinesin.** *J Struct Biol* 1998, **122**:30-41.
- [142] Burghardt TP, Hu JY, Ajtai K: **Myosin dynamics on the millisecond time scale.** *Biophys Chem* 2007, **131**:15-28.
- [143] Rose A, Meier I: **Scaffolds, levers, rods and springs: Diverse cellular functions of long coiled-coil proteins.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**:1996-2009.
- [144] Robson Marsden H, Kros A: **Self-assembly of coiled coils in synthetic biology: Inspiration and progress.** *Angew Chem Int Ed* 2010, **49**:2988-3005.
- [145] Miller M: **The importance of being flexible: The case of basic region leucine zipper transcriptional regulators.** *Curr Protein Pept Sci* 2009, **10**:244-269.
- [146] Lupas AN, Gruber M: **The structure of α -helical coiled coils.** *Adv Protein Chem* 2005, **70**:37-78.
- [147] Woolfson DN, Bartlett GJ, Bruning M, Thomson AR: **New currency for old rope: From coiled-coil assemblies to α -helical barrels.** *Curr Opin Struct Biol* 2012, **22**:432-441.
- [148] Crick FHC: **The packing of α -helices - Simple coiled-coils.** *Acta Crystallogr* 1953, **6**:689-697.
- [149] Mason JM, Arndt KM: **Coiled-coil domains: Stability, specificity, and biological implications.** *Chembiochem* 2004, **5**:170-176.
- [150] O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T: **X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil.** *Science* 1991, **254**:539-544.
- [151] Lee AY, Karplus PA, Ganem B, Clardy J: **Atomic structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase.** *J Am Chem Soc* 1995, **117**:3627-3628.
- [152] Mourey L, Da Re S, Pedelacq JD, Tolstykh T, Faurie C, Guillet V, Stock JB, Samama JP: **Crystal structure of the CheA histidine phosphotransfer domain that mediates response regulator phosphorylation in bacterial chemotaxis.** *J Biol Chem* 2001, **276**:31074-31082.
- [153] Ozbek S, Engel J, Stetefeld J: **Storage function of cartilage oligomeric matrix protein: the crystal structure of the coiled-coil domain in complex with vitamin D₃.** *EMBO J* 2002, **21**:5960-5968.
- [154] Burkhard P, Kammerer RA, Steinmetz MO, Bourenkov GP, Aebi U: **The coiled-coil trigger site of the rod domain of cortexillin I unveils a distinct network of interhelical and intrahelical salt bridges.** *Structure* 2000, **8**:223-230.
- [155] Oshaben KM, Salari R, McCaslin DR, Chong LT, Horne WS: **The native GCN4 leucine-zipper domain does not uniquely specify a dimeric oligomerization state.** *Biochemistry* 2012, **51**:9581-9591.
- [156] Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW: **Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**:3469-3478.
- [157] Studier FW, Moffatt BA: **Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.** *J mol biol* 1986, **189**:113-130.

- [158] Diener M: **Lichtsensitive Proteine zur Kontrolle der Genexpression.** *Masterarbeit.* Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität; 2010.
- [159] Westphal R: **Tailor-made thiamine diphosphate-dependent enzymes for (S)-selective carboligation.** *Dissertation.* Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität; 2013.
- [160] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular cloning: A laboratory manual.**, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [161] Studier FW: **Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.** *Protein Expr Purif* 2005, **41**:207-234.
- [162] Hanahan D: **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** *J Mol Biol* 1983, **166**:557-580.
- [163] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**:487-491.
- [164] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS: **'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:4008.
- [165] Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
- [166] Bonde M, Pontoppidan H, Pepper DS: **Direct dye binding - A quantitative assay for solid-phase immobilized protein.** *Anal Biochem* 1992, **200**:195-198.
- [167] Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
- [168] Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG: **Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.** *Electrophoresis* 2004, **25**:1327-1333.
- [169] Hanefeld U, Straathof AJ, Heijnen JJ: **Study of the (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: Mechanistic implications.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1432**:185-193.
- [170] Westphal R, Waltzer S, Mackfeld U, Widmann M, Pleiss J, Beigi M, Müller M, Rother D, Pohl M: **(S)-Selective MenD variants from *Escherichia coli* provide access to new functionalized chiral α -hydroxy ketones.** *Chem Commun* 2013, **49**:2061-2063.
- [171] Westphal R, Jansen S, Vogel C, Pleiss J, Müller M, Rother D, Pohl M: **MenD from *Bacillus subtilis*: A potent catalyst for the enantiocomplementary asymmetric synthesis of functionalized α -hydroxy ketones.** *Chemcatchem* 2014, **6**:1082-1088.
- [172] Tanaka Y, Tsumoto K, Yasutake Y, Umetsu M, Yao M, Fukada H, Tanaka I, Kumagai I: **How oligomerization contributes to the thermostability of an Archaeon protein - Protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodaii*.** *J Biol Chem* 2004, **279**:32957-32967.
- [173] Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J, Kammerer RA: **Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer.** *Nat Struct Biol* 2000, **7**:772-776.
- [174] Peters J, Baumeister W, Lupas A: **Hyperthermostable surface layer protein tetrabrachion from the archaeobacterium *Staphylothermus marinus*: Evidence for the presence of a right-handed coiled coil derived from the primary structure.** *J Mol Biol* 1996, **257**:1031-1041.

- [175] Peters J, Nitsch M, Kuhlorgen B, Golbik R, Lupas A, Kellermann J, Engelhardt H, Pfander JP, Müller S, Goldie K, Engel A, Stetter K-O, Baumeister W: **Tetrabrachion: A filamentous archaeobacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability.** *J Mol Biol* 1995, **245**:385-401.
- [176] Schmidt PM, Attwood RM, Mohr PG, Barrett SA, McKimm-Breschkin JL: **A generic system for the expression and purification of soluble and stable influenza neuraminidase.** *PLoS One* 2011, **6**:e16284.
- [177] Ventura S, Villaverde A: **Protein quality in bacterial inclusion bodies.** *Trends Biotechnol* 2006, **24**:179-185.
- [178] Baneyx F, Mujacic M: **Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:1399-1408.
- [179] Worrall DM, Goss NH: **The formation of biologically active β -galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*.** *Aust J Biotechnol* 1989, **3**:28-32.
- [180] Dong Q, Yan X, Zheng M, Yang Z: **Characterization of an extremely thermostable but cold-adaptive β -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for use as a recombinant aggregation for batch lactose degradation at high temperature.** *J Biosci Bioeng* 2014, **117**:706-710.
- [181] Roessl U, Nahalka J, Nidetzky B: **Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis.** *Biotechnol Lett* 2010, **32**:341-350.
- [182] Garcia-Fruitos E, Gonzalez-Montalban N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Aris A, Ventura S, Villaverde A: **Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins.** *Microb Cell Fact* 2005, **4**:27.
- [183] Kopka B: **Eine einfache Strategie zur Reinigung und Immobilisierung von Biokatalysatoren.** *Dissertation.* Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität; unveröffentlicht.
- [184] Garcia-Fruitos E, Rodriguez-Carmona E, Diez-Gil C, Ferraz RM, Vazquez E, Corchero JL, Cano-Sarabia M, Ratera I, Ventosa N, Veciana J, Villaverde A: **Surface cell growth engineering assisted by a novel bacterial nanomaterial.** *Adv Mater* 2009, **21**:4249-4253.
- [185] Carrio MM, Cubarsi R, Villaverde A: **Fine architecture of bacterial inclusion bodies.** *FEBS Lett* 2000, **471**:7-11.
- [186] Taylor G, Hoare M, Gray DR, Marston FAO: **Size and density of protein inclusion bodies.** *Nat Biotechnol* 1986, **4**:553-557.
- [187] Nahalka J: **Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus* and its application in a process of batch starch degradation to α -D-glucose-1-phosphate.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008, **35**:219-223.
- [188] Nahalka J, Vikartovska A, Hrabarova E: **A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis.** *J Biotechnol* 2008, **134**:146-153.
- [189] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.** *J Cell Comp Physiol* 1962, **59**:223-239.
- [190] Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW: **Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein.** *Biochemistry* 1993, **32**:1212-1218.
- [191] Wachter RM, Elsliger MA, Kallio K, Hanson GT, Remington SJ: **Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein.** *Structure* 1998, **6**:1267-1277.

- [192] Day RN, Davidson MW: **The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging.** *Chem Soc Rev* 2009, **38**:2887-2921.
- [193] Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY: **Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells.** *Science* 2002, **296**:913-916.
- [194] Kawasaki K, Kondo H, Suzuki M, Ohgiya S, Tsuda S: **Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, **58**:1168-1174.
- [195] Dartois V, Baulard A, Schanck K, Colson C: **Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168.** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1131**:253-260.
- [196] van Pouderooyen G, Eggert T, Jaeger K-E, Dijkstra BW: **The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal $\alpha\beta$ hydrolase fold enzyme.** *J Mol Biol* 2001, **309**:215-226.
- [197] Eggert T: **Die lipolytischen Enzyme LipA und LipB von *Bacillus subtilis*: Charakterisierung und Optimierung mit gerichteter Evolution** *Dissertation.* Bochum: Ruhr-Universität; 2001.
- [198] Dawson A, Fyfe PK, Hunter WN: **Specificity and reactivity in menaquinone biosynthesis: The structure of *Escherichia coli* MenD (2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase).** *J Mol Biol* 2008, **384**:1353-1368.
- [199] Jiang M, Cao Y, Guo ZF, Chen MJ, Chen XL, Guo ZH: **Menaquinone biosynthesis in *Escherichia coli*: Identification of 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate as a novel intermediate and re-evaluation of MenD activity.** *Biochemistry* 2007, **46**:10979-10989.
- [200] Bhasin M, Billinsky JL, Palmer DR: **Steady-state kinetics and molecular evolution of *Escherichia coli* MenD [(1R,6R)-2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase], an anomalous thiamin diphosphate-dependent decarboxylase-carboligase.** *Biochemistry* 2003, **42**:13496-13504.
- [201] Breslow R: **Rapid deuterium exchange in thiazolium salts.** *J Am Chem Soc* 1957, **79**:1762-1763.
- [202] Kern D, Kern G, Neef H, Tittmann K, KillenbergJabs M, Wikner C, Schneider G, Hubner G: **How thiamine diphosphate is activated in enzymes.** *Science* 1997, **275**:67-70.
- [203] Shaanan B, Chipman DM: **Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: New insights into the role of a conserved glutamate residue.** *FEBS J* 2009, **276**:2447-2453.
- [204] Kurutsch A, Richter M, Brecht V, Sprenger GA, Muller M: **MenD as a versatile catalyst for asymmetric synthesis.** *J Mol Catal B Enzym* 2009, **61**:56-66.
- [205] Yadav JS, Mandal SS: **First stereoselective total synthesis of pectinolide A.** *Tetrahedron Lett* 2011, **52**:5747-5749.
- [206] Kurutsch A: **Shikimatbiosyntheseweg: Mikrobielle Produktgewinnung der Metabolite Chorismat und SHCHC und Einsatz des Enzyms MenD als Biokatalysator für asymmetrische C-C-Bindungsknüpfung.** *Dissertation.* Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität; 2009.
- [207] Raghunathan G, Munussami G, Moon H, Paik HJ, An SS, Kim YS, Kang S, Lee SG: **A variant of green fluorescent protein exclusively deposited to active intracellular inclusion bodies.** *Microb Cell Fact* 2014, **13**:68.
- [208] Grünberger A, Wiechert W, Kohlheyer D: **Single-cell microfluidics: Opportunity for bioprocess development.** *Curr Opin Biotechnol* 2014, **29C**:15-23.

- [209] Hoyos P, Sinisterra JV, Molinari F, Alcantara AR, Dominguez de Maria P: **Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of α -hydroxy ketones.** *Acc Chem Res* 2010, **43**:288-299.
- [210] Tokatlidis K, Dhurjati P, Millet J, Beguin P, Aubert JP: **High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D.** *FEBS Lett* 1991, **282**:205-208.
- [211] Park SY, Park SH, Choi SK: **Active inclusion body formation using *Paenibacillus polymyxa* PoxB as a fusion partner in *Escherichia coli*.** *Anal Biochem* 2012, **426**:63-65.
- [212] Nahalka J, Gemeiner P, Bucko M, Wang PG: **Bioenergy beads: A tool for regeneration of ATP/NTP in biocatalytic synthesis.** *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006, **34**:515-521.
- [213] Korovashkina AS, Rymko AN, Kvach SV, Zinchenko AI: **Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase.** *J Biotechnol* 2012, **164**:276-280.
- [214] Li SX, Lin K, Pang HY, Wu YX, Xu JH: **Production, characterization, and application of an organic solvent-tolerant lipase present in active inclusion bodies.** *Appl Biochem Biotechnol* 2013, **169**:612-623.
- [215] Garcia-Fruitos E, Vazquez E, Diez-Gil C, Corchero JL, Seras-Franzoso J, Ratera I, Veciana J, Villaverde A: **Bacterial inclusion bodies: Making gold from waste.** *Trends Biotechnol* 2012, **30**:65-70.
- [216] Arie JP, Miot M, Sassoon N, Betton JM: **Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 2006, **62**:427-437.
- [217] Nahalka J, Nidetzky B: **Fusion to a pull-down domain: A novel approach of producing *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase as insoluble enzyme aggregates.** *Biotechnol Bioeng* 2007, **97**:454-461.
- [218] Nahalka J, Patoprsty V: **Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3).** *Org Biomol Chem* 2009, **7**:1778-1780.
- [219] Zhou BH, Xing L, Wu W, Zhang XE, Lin ZL: **Small surfactant-like peptides can drive soluble proteins into active aggregates.** *Microb Cell Fact* 2012, **11**:10.
- [220] Lin ZL, Zhou BH, Wu W, Xing L, Zhao Q: **Self-assembling amphipathic α -helical peptides induce the formation of active protein aggregates *in vivo*.** *Faraday Discuss* 2013, **166**:243-256.
- [221] Wu W, Xing L, Zhou BH, Lin ZL: **Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**:9.
- [222] Choi SL, Lee SJ, Ha JS, Song J, Rhee YH, Lee SG: **Generation of catalytic protein particles in *Escherichia coli* cells using the cellulose-binding domain from *Cellulomonas fimi* as a fusion partner.** *Biotechnol Bioprocess Eng* 2011, **16**:1173-1179.
- [223] Kaspar AA, Reichert JM: **Future directions for peptide therapeutics development.** *Drug Discov Today* 2013, **18**:807-817.
- [224] Mateo C, Chmura A, Rustler S, van Rantwijk F, Stolz A, Sheldon RA: **Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity.** *Tetrahedron Asymmetry* 2006, **17**:320-323.

5 Anhang

In dieser Arbeit erstellte Vektoren

Alle Vektoren basieren auf dem pET28a Vektor von Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland). Angegeben ist sowohl die Basensequenz der Gene und ihrer Umgebung als auch die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine. Die Aminosäure steht jeweils über der ersten Base des entsprechenden Kodons. **Start-** und **Stoppkodons** sind in der Basensequenz **fett** dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und mit dem Namen der entsprechenden Restriktionsendonuklease beschriftet. In der Aminosäuresequenz sind der **His-tag** blau, **TDoT** rot, **Faktor Xa** Proteaseschnittstelle grün, **3xGGGS-Linker** lila und das jeweilige **Zielprotein** orange dargestellt. Durch Restriktionsschnittstellen zusätzlich eingefügte Aminosäuren sind schwarz eingefärbt.

pTDoT-Linker

234 bp *NdeI/SalI* Restriktionsfragment aus pEX-A-TDoT-Linker in pET28a kloniert

```

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M I I N
ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGATCATTAAAC
His-tag NdeI TDoT
E T A D D I V Y R L T V I I D D R Y E S L K N L I
GAAACTGCCGATGACATCGTTTATCGCCTGACAGTCATTATCGATGATCGCTACGAATCGCTGAAAAACCTGATT
TDoT
T L R A D R L E M I I N D N V S T I L A S I T S I
ACCTTACGTGCAGATCGCTTGGAGATGATCATCAATGACAATGTGTCCACCATTCTCGCGAGCATTACTAGTATT
TDoT SpeI Xa
E G R A S G G G S G G G S G S *
GAAGGCCGTGCTAGCGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCTGGATCCTAAGCAGTCGCACAAGCTT
Xa NheI 3xGGGS-Linker BamHI SalI

GCGGCCGCACTCGAG
NotI XhoI

```

pTDoT-Linker-AthNL

791 bp *athnI* PCR-Produkt aus pET-nYFP-AthNL *BamHI/NotI* in pTDoT-Linker kloniert

```

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M I I N
ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGATCATTAAAC
His-tag NdeI TDoT
E T A D D I V Y R L T V I I D D R Y E S L K N L I
GAAACTGCCGATGACATCGTTTATCGCCTGACAGTCATTATCGATGATCGCTACGAATCGCTGAAAAACCTGATT
TDoT
T L R A D R L E M I I N D N V S T I L A S I T S I
ACCTTACGTGCAGATCGCTTGGAGATGATCATCAATGACAATGTGTCCACCATTCTCGCGAGCATTACTAGTATT

```

TDoT SpeI Xa

E G R A S G G G S G G G S G G G S G S M E R K H H
 GAAGGCCGTGCTAGCGGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCGGGATCCATGGAGAGGAAACATCAC
Xa NheI 3xGGGS-Linker BamHI AthNL

F V L V H N A Y H G A W I W Y K L K P L L E S A G
 TTCGTGTTAGTTCACAACGCTTATCATGGAGCCTGGATCTGGTACAAGCTCAAGCCCCTCCTTGAATCAGCCGGC
AthNL

H R V T A V E L A A S G I D P R P I Q A V E T V D
 CACCGCGTTACTGCTGTGCGAACTCGCCGCCTCCGGGATCGACCCACGACCAATCCAGGCCGTTGAAACCGTCGAC
AthNL

E Y S K P L I E T L K S L P E N E E V I L V G F S
 GAATACTCCAAACCGTTGATCGAAACCCTCAAATCTCTTCCAGAGAACGAAGAGGTAATTCTGGTTGGATTTCAGC
AthNL

F G G I N I A L A A D I F P A K I K V L V F L N A
 TTCGGAGGCATCAACATCGCTCTCGCCGCCGACATATTTCCGGCGAAGATTAAGGTTCTTGTGTTCTCAACGCC
AthNL

F L P D T T H V P S H V L D K Y M E M P G G L G D
 TTCTTGCCCCGACACAACCCACGTGCCTTCTCACGTTCTGGACAAGTATATGGAGATGCCTGGAGGTTTGGGAGAT
AthNL

C E F S S H E T R N G T M S L L K M G P K F M K A
 TGTGAGTTTTTCATCTCATGAAACAAGAAATGGGACGATGAGTTTATTGAAGATGGGACCAAATTCATGAAGGCA
AthNL

R L Y Q N C P I E D Y E L A K M L H R Q G S F F T
 CGTCTTTACCAAATGTCCCATAGAGGATTACGAGCTGGCAAAAATGTTGCATAGGCAAGGGTCATTTTTTCACA
AthNL

E D L S K K E K F S E E G Y G S V Q R V Y V M S S
 GAGGATCTATCAAAGAAAGAAAAGTTTAGCGAGGAAGGATATGGTTCCGGTGCAACGAGTTTACGTAATGAGTAGT
AthNL

E D K A I P C D F I R W M I D N F N V S K V Y E I
 GAAGACAAAGCCATCCCCTGCGATTTTCATTGCTTGGATGATTGATAATTTCAACGTCTCGAAAGTCTACGAGATC
AthNL

D G G D H M V M L S K P Q K L F D S L S A I A T D
 GATGGCGGAGATCACATGGTGATGCTCTCAAACCCCAAAACTCTTTGACTCTCTCTGCTATTGCCACCGAT
AthNL

Y M *

TATATGTAAGCGGCCGCACTCGAG
AthNL NotI XhoI

pLinker-AthNL

25 bp *NdeI/NheI* Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-AthNL kloniert

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M T S I
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACTAGTATT
His-tag NdeI SpeI Xa

E G R A S G G G S G G G S G G G S G S M E R K H H
 GAAGGCCGTGCTAGCGGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCGGGATCCATGGAGAGGAAACATCAC
Xa NheI 3xGGGS-Linker BamHI AthNL

F V L V H N A Y H G A W I W Y K L K P L L E S A G
 TTCGTGTTAGTTCACAACGCTTATCATGGAGCCTGGATCTGGTACAAGCTCAAGCCCCTCCTTGAATCAGCCGGC
AthNL

H R V T A V E L A A S G I D P R P I Q A V E T V D
 CACCGCGTTACTGCTGTGCGAACTCGCCGCCTCCGGGATCGACCCACGACCAATCCAGGCCGTTGAAACCGTCGAC
AthNL

E Y S K P L I E T L K S L P E N E E V I L V G F S
 GAATACTCCAAACCGTTGATCGAAACCCTCAAATCTCTTCCAGAGAACGAAGAGGTAATTCTGGTTGGATTTCAGC
AthNL

F G G I N I A L A A D I F P A K I K V L V F L N A
 TTCGGAGGCATCAACATCGCTCTCGCCGCCGACATATTTCCGGCGAAGATTAAGGTTCTTGTGTTCTCAACGCC
AthNL

F L P D T T H V P S H V L D K Y M E M P G G L G D
 TTCTTGCCCCGACACAACCCACGTGCCTTCTCACGTTCTGGACAAGTATATGGAGATGCCTGGAGGTTTGGGAGAT

AtHNL

C E F S S H E T R N G T M S L L K M G P K F M K A
TGTGAGTTTTTCATCTCATGAAACAAGAAATGGGACGATGAGTTTATTGAAGATGGGACCAAATTCATGAAGGCA

AtHNL

R L Y Q N C P I E D Y E L A K M L H R Q G S F F T
CGTCTTTACCAAATTTGTCCCATAGAGGATTACGAGCTGGCAAAAATGTTGCATAGGCAAGGGTCATTTTTTACA

AtHNL

E D L S K K E K F S E E G Y G S V Q R V Y V M S S
GAGGATCTATCAAAGAAAAGAAAAGTTTAGCGAGGAAGGATATGGTTCGGTGAACGAGTTTACGTAATGAGTAGT

AtHNL

E D K A I P C D F I R W M I D N F N V S K V Y E I
GAAGACAAAGCCATCCCCTGCGATTTTCATTCGTTGGATGATTGATAATTTCAACGCTCGAAAGTCTACGAGATC

AtHNL

D G G D H M V M L S K P Q K L F D S L S A I A T D
GATGGCGGAGATCACATGGTGATGCTCTCCAAACCCCAAAAACCTTTGACTCTCTCTGCTATTGCTACCGAT

AtHNL

Y M *

TATATG**TAA**CGGGCCGCACTCGAG
AtHNL NotI XhoI

pTDoT-Linker-BsLA

569 bp *bsla* PCR-Produkt aus pET-nYFP-BsLA *Bam*HI/*Not*I in pTDoT-Linker kloniert

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M I I N
ACC**ATG**GGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGATCATTAAAC
His-tag NdeI TDoT

E T A D D I V Y R L T V I I D D R Y E S L K N L I
GAAACTGCCGATGACATCGTTTATCGCCTGACAGTCAATTATCGATGATCGCTACGAATCGCTGAAAAACCTGATT
TDoT

T L R A D R L E M I I N D N V S T I L A S I T S I
ACCTTACGTGCAGATCGCTTGGAGATGATCATCAATGACAAATGTGTCCACCATTCTCGCGAGCATTACTAGTATT
TDoT SpeI Xa

E G R A S G G G S G G G S G G G S G S A E H N P V
GAAGGCCGTGCTAGCGGGCGGTGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGTTCGGGATCCGCTGAACACAATCCAGTC
Xa NheI 3xGGGS-Linker BamHI BsLA

V M V H G I G G A S F N F A G I K S Y L V S Q G W
GTTATGGTTACGGTATTGGAGGGGCATCAATTTTGGCGGAATTAAGAGCTATCTCGTATCTCAGGGCTGG
BsLA

S R D K L Y A V D F W D K T G T N Y N N G P V L S
TCGCGGGACAAGCTGTATGCAGTTGATTTTTGGGACAAGACAGGCACAAATTATAACAATGGACCGGTATTATCA
BsLA

R F V Q K V L D E T G A K K V D I V A H S M G G A
CGATTTGTGCAAAAGGTTTTAGATGAAACGGGTGCGAAAAAGTGGATATTGTGCTCACAGCATGGGGGGCGCG
BsLA

N T L Y Y I K N L D G G N K V A N V V T L G G A N
AACACACTTTACTACATAAAAAATCTGGACGGCGAAATAAAGTTGCAAACGTCGTGACGCTTGGCGGCGCGAAC
BsLA

R L T T G K A L P G T D P N Q K I L Y T S I Y S S
CGTTTACGACAGGCAAGGCGCTTCCGGGAACAGATCCAAATCAAAGATTTTATACACATCCATTTACAGCAGT
BsLA

A D M I V M N Y L S R L D G A R N V Q I H G V G H
GCCGATATGATTGTCATGAATTACTTATCAAGATTAGATGGTGTAGAAACGTTCAAATCCATGGCGTTGGACAC
BsLA

I G L L Y S S Q V N S L I K E G L N G G G Q N T *
ATCGGCCCTTCTGTACAGCAGCCAAGTCAACAGCCTGATTAAAGAAGGGCTGAACGGCGGGGGCCAGAATACGT**AG**
BsLA

GTCGACAAGCTTCGGGCCGCACTCGAG
SaII NotI XhoI

pLinker-BsLA

25 bp *NdeI/NheI* Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-BsLA kloniert

```

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M T S I
ACCATGGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACTAGTATT
His-tag NdeI SpeI Xa
E G R A S G G G S G G G S G G G S G S A E H N P V
GAAGCCCGTGCTAGCGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCGGGATCCGCTGAACACAATCCAGTC
Xa NheI 3xGGGS-Linker BamHI BsLA
V M V H G I G G A S F N F A G I K S Y L V S Q G W
GTTATGGTTCACGGTATTGGAGGGGCATCATTCAATTTTGCGGGAATTAAGAGCTATCTCGTATCTCAGGGCTGG
BsLA
S R D K L Y A V D F W D K T G T N Y N N G P V L S
TCGCGGGACAAGCTGTATGCAGTTGATTTTTGGGACAAGACAGGCACAAATTATAACAATGGACCGGTATTATCA
BsLA
R F V Q K V L D E T G A K K V D I V A H S M G G A
CGATTTGTGCAAAAGGTTTTTAGATGAAACGGGTGCGAAAAAGTGGATATTGTGCTCACAGCATGGGGGGCGCG
BsLA
N T L Y Y I K N L D G G N K V A N V V T L G G A N
AACACACTTTACTACATAAAAAATCTGGACGGCGGAAATAAAGTTGCAAACGTCGTGACGCTTGGCGGCGCGAAC
BsLA
R L T T G K A L P G T D P N Q K I L Y T S I Y S S
CGTTTGACGACAGGCAAGGCGCTCCGGGAACAGATCCAAATCAAAGATTTTATACACATCCATTTACAGCAGT
BsLA
A D M I V M N Y L S R L D G A R N V Q I H G V G H
GCCGATATGATTGTGCATGAATTACTTATCAAGATTAGATGGTGTAGAAACGTTCAAATCCATGGCGTTGGACAC
BsLA
I G L L Y S S Q V N S L I K E G L N G G G Q N T *
ATCGGCCTTCTGTACAGCAGCCAAGTCAACAGCCTGATTAAGAAGGGCTGAACGGCGGGGGCCAGAATACGTAG

```

GTCGACAAGCTTGGCGCCGCACTCGAG
SalI *NotI* *XhoI*

pTDoT-Linker-YFP

732 bp *yfp* PCR-Produkt aus pET22b_mYFP *BamHI/SalI* in pTDoT-Linker kloniert

```

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M I I N
ACCATGGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATCATTAAC
His-tag NdeI TDoT
E T A D D I V Y R L T V I I D D R Y E S L K N L I
GAAACTGCCGATGACATCGTTTATCGCCTGACAGTCATTATCGATGATCGCTACGAATCGCTGAAAAACCTGATT
TDoT
T L R A D R L E M I I N D N V S T I L A S I T S I
ACCTTACGTGCAGATCGCTTGGAGATGATCATCAATGACAATGTGTCCACCATTCTCGCGAGCATTACTAGTATT
TDoT SpeI Xa
E G R A S G G G S G G G S G G G S G S M V S K G E
GAAGCCCGTGCTAGCGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCGGGATCCCATGGTGAGCAAGGGCGAG
Xa NheI 3xGGGS-Linker BamHI YFP
E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S
GAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
YFP
G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V
GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTG
YFP
P W P T L V T T F G Y G L Q C F A R Y P D H M K Q
CCCTGGCCACCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAG
YFP
H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N

```

CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC
 YFP
 Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F
 TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
 YFP
 K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D
 AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGAC
 YFP
 K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D
 AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 YFP
 H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S
 CACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCC
 YFP
 K L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
 AAAGTGGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACT
 YFP
 L G M D E L Y K *
 CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGTCGACAAGCTTGCGGGCCGCACTCGAG
 YFP *SalI* *NotI* *XhoI*

pLinker-YFP

25 bp *NdeI/NheI* Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-YFP kloniert

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M T S I
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGACTAGTATT
 His-tag *NdeI* *SpeI* *Xa*
 E G R A S G G G S G G G S G G G S G S M V S K G E
 GAAGGCCGTGCTAGCGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCGGGATCCATGGTGAAGGGCGAG
Xa *NheI* 3xGGGS-Linker *BamHI* YFP
 E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S
 GAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
 YFP
 G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V
 GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTG
 YFP
 P W P T L V T T F G Y G L Q C F A R Y P D H M K Q
 CCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCTGCAGTGTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG
 YFP
 H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N
 CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC
 YFP
 Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F
 TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
 YFP
 K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D
 AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGAC
 YFP
 K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D
 AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 YFP
 H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S
 CACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCC
 YFP
 K L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
 AAAGTGGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACT
 YFP
 L G M D E L Y K *
 CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGTCGACAAGCTTGCGGGCCGCACTCGAG
 YFP *SalI* *NotI* *XhoI*

pTDoT-Linker-*EcMenD*1683 bp *ecmend* PCR-Produkt aus pET19_MenD_NHis *Bam*HI/*Sal*I in pTDoT-Linker kloniert

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M I I N
 ACC**ATG**GGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATCATTAAC
E T A D D I V Y R L T V I I D D R Y E S L K N L I
 GAAACTGCCGATGACATCGTTTATCGCCTGACAGTCATTATCGATGATCGCTACGAATCGCTGAAAAACCTGATT
T L R A D R L E M I I N D N V S T I L A S I T S I
 ACCTTACGTGCAGATCGCTTGGAGATGATCATCAATGACAATGTGTCCACCATTCTCGCGAGCATTACTAGTATT
E G R A S G G G S G G G S G S M S V S A F
 GAAGGCCGTGCTAGCGGCGGTGGGTCTGGAGCGGTCAGGTGGTGGTGGGATCCATGTTCAGTAAGCGCATT
N R R W A A V I L E A L T R H G V R H I C I A P G
 AACCGACGCTGGGCGGCGTCACTTCTGGAAGCATTAAACGCGTCACGGCGTCAGACACATCTGTATCGCCCCAGGC
S R S T P L T L A A A E N S A F I H H T H F D E R
 TCGCGTTCACACCGTTAACGTTAGCGGCGGCGGAGAATTCCGCATTCACTACCACACCCATTTTCGATGAGCGT
G L G H L A L G L A K V S K Q P V A V I V T S G T
 GGGTTGGGCATCTGGCGCTGGGGCTGGCGAAGTCAGCAAGCAGCCGGTGGCGGTGATTGTGACCTCCGGCAGC
A V A N L Y P A L I E A G L T G E K L I L L T A D
 GCGGTGGCAAATCTCTATCCGGCACTGATTGAAGCCGGGTTAACCGGAGAAAAACTGATTCTCTTAACCGCCGAT
R P P E L I D C G A N Q A I R Q P G M F A S H P T
 CGCCCGCCGGAGCTAATTGACTGCGGCGCAATCAGGCAATTCGCCAGCCGGGAATGTTTCGCTCTCACCCACG
H S I S L P R P T Q D I P A R W L V S T I D H A L
 CACAGTATTTTCATTGCCGCGCCCGACCCAGGATATCCCCGCACGTTGGCTGGTTTCTACCATCGACCACGCTCTC
G T L H A G G V H I N C P F A E P L Y G E M D D T
 GGTACGCTTCATGCGGGGGAGTCCATATCAACTGCCCGTTTGGTGAACCGCTGTATGGCGAAATGGACGATACC
G L S W Q Q R L G D W W Q D D K P W L R E A P R L
 GGGCTTAGCTGGCAACAGCGTCTGGGTGACTGGTGGCAGGACGACAAACCGTGGCTGCGTGAAGCGCCTCGTCTG
E S E K Q R D W F F W R Q K R G V V V A G R M S A
 GAAAGTAAAAACAGCGCGACTGGTTCTTCTGGCGACAAAAGCGCGGCGTGGTGGTTGCCGGGCGCATGAGTGCG
E E G K K V A L W A Q T L G W P L I G D V L S Q T
 GAAGAGGGCAAAAAAGTTGCCCTGTGGGCGCAAACCTTGGCTGGCCGCTGATTGGCGATGTGCTGTCAAAAAC
G Q P L P C A D L W L G N A K A T S E L Q Q A Q I
 GGGCAGCCGCTGCCGTGTGCCGATCTTTGGTTAGGCAATGCCAAAGCGACCAGCGAGCTGCAGCAGGCGCAAATT
V V Q L G S S L T G K R L L Q W Q A S C E P E E Y
 GTGGTGCAACTGGGAAGCAGCCTGACGGGGAAACGGCTCCTGCAATGGCAGGCAAGCTGTGAACCAGAAGAGTAC
W I V D D I E G R L D P A H H R G R R L I A N I A
 TGGATTGTTGATGACATTGAAGGGCGACTTGATCCGGCACACCATCGCGGACGTGCTTAATTGCCAATATTGCC
D W L E L H P A E K R Q P W C V E I P R L A E Q A
 GACTGGCTGGAGCTGCATCCGGCAGAAAAACGCCAGCCCTGGTGCCTTGAATCCCCGCGCCTGGCGGAACAGGCA
M Q A V I A R R D A F G E A Q L A H R I C D Y L P
 ATGCAGGCGGTTATTGCCCGCCGTGATGCGTTTGGCGAAGCGCAACTGGCGCATCGCATCTGCGACTATCTGCCT
E Q G Q L F V G N S L V V R L I D A L S Q L P A G
 GAACAGGGGCAATTGTTTGTGGTAACAGCCTGGTGGTACGTCTGATTGATGCGCTTTTCGCAACTTCCGGCAGGT
Y P V Y S N R G A S G I D G L L S T A A G V Q R A

TACCCGGTGTACAGCAACCGTGGGGCCAGCGGTATCGACGGGCTGCTTTCGACCGCCGCGGCGTTCAGCGGGCA
EcMenD
S G K P T L A I V G D L S A L Y D L N A L A L L R
 AGCGGCAAACCGACGCTGGCGATTGTGGGCGATCTCTCCGACTTTACGATCTCAACGCGTGGCGTTATTGCGT
EcMenD
Q V S A P L V L I V V N N N G G Q I F S L L P T P
 CAGGTTTCTGCGCCGCTGGTATTAATTGTGGTGAACAACAACGGCGGGCAAATTTTCTCGCTGTTGCCAACGCC
EcMenD
Q S E R E R F Y L M P Q N V H F E H A A A M F E L
 CAAAGCGAGCGTGAGCGTTTCTATCTGATGCCGCAAACGTCCATTTTGTAGCAGCCGCGCGATGTTTCGAGCTG
EcMenD
K Y H R P Q N W Q E L E T A F A D A W R T P T T T
 AAATATCATCGTCCGCAAACCTGGCAGGAACCTGAAACGGCATTGTCGACGCTGGCGCACGCCAACACCACG
EcMenD
V I E M V V N D T D G A Q T L Q Q L L A Q V S H L
 GTGATTGAAATGGTGGTTAACGACACCGATGGTGCGCAAACGCTCCAGCAACTTCTGGCGCAGGTAAGCCATTTA
EcMenD
 *

TGAGTCGACAAGCTTGGCGCCGCACTCGAG
SaI *NotI* *XhoI*

pLinker-EcMenD

25 bp *NdeI/NheI* Fragment (erstellt durch Zusammenlagerung von zwei Oligonukleotiden 2.6.3) in pTDoT-Linker-*EcMenD* kloniert

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M T S I
 ACC**ATG**GGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACTAGTATT
His-tag *NdeI* *SpeI* *Xa*
E G R A S G G G S G G G S G G G S G S M S V S A F
 GAAGGCCGT**GCTAG**CGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGCTCAGGTGGTGGGTCGGGATCCATGT**CAGTAAGCGCATT**
Xa *NheI* *3xGGGS-Linker* *BamHI* *EcMenD*
N R R W A A V I L E A L T R H G V R H I C I A P G
 AACCGACGCTGGGCGGCGGT**CATTCTGGAAGCATT**AACGCGTCACGGCGTCAGACACATCTGTATCGCCCCAGGC
EcMenD
S R S T P L T L A A A E N S A F I H H T H F D E R
 TCGCGTTCTACACCGTTAACGTTAGCGGCGCGGAGAATTCCGCATTCATTCACCACACCCATTTTCGATGAGCGT
EcMenD
G L G H L A L G L A K V S K Q P V A V I V T S G T
 GGGTTGGGCATCTGGCGCTGGGGCTGGCGAAAAGTCAGCAAGCAGCCGGTGGCGGTGATTGTGACCTCCGGCAGC
EcMenD
A V A N L Y P A L I E A G L T G E K L I L L T A D
 GCGGTGGCAAATCTCTATCCGGCACTGATTGAAGCCGGGTTAACCGGAGAAAACTGATTCTCTTAACCGCCGAT
EcMenD
R P P E L I D C G A N Q A I R Q P G M F A S H P T
 CGCCCGCGGAGCTAATTGACTGCGGCGGAATCAGGCAATTCGCCAGCCGGGAATGTTGCGCTCTCACCCCAGC
EcMenD
H S I S L P R P T Q D I P A R W L V S T I D H A L
 CACAGTATTTTCATTGCCGCGCCCGACCCAGGATATCCCCGCACGTTGGCTGGTTTCTACCATCGACCACGCTCTC
EcMenD
G T L H A G G V H I N C P F A E P L Y G E M D D T
 GGTACGCTTCATGCGGGGGAGTCCATATCAACTGCCCGTTTGGCTGAACCGCTGTATGGCGAAATGGACGATACC
EcMenD
G L S W Q Q R L G D W W Q D D K P W L R E A P R L
 GGGCTTAGCTGGCAACAGCGTCTGGGTGACTGGTGGCAGGACGACAAACCGTGGCTGCGTGAAGCGCCTCGTCTG
EcMenD
E S E K Q R D W F F W R Q K R G V V V A G R M S A
 GAAAGTGAAAAACAGCGGACTGGTTCTTCTGGCGACAAAAGCGCGGCTGGTGGTTGCCGGGCGCATGAGTGCG
EcMenD
E E G K K V A L W A Q T L G W P L I G D V L S Q T
 GAAGAGGGCAAAAAAGTTGCCCTGTGGGCGCAAACCTTGGCTGGCCGCTGATTGGCGATGTGCTGTCAAAACC
EcMenD
G Q P L P C A D L W L G N A K A T S E L Q Q A Q I
 GGGCAGCCGCTGCCGTGTGCCGATCTTGGTTAGGCAATGCCAAAGCGACCAGCGAGCTGCAGCAGGCGCAAAT

EcMenD

V V Q L G S S L T G K R L L Q W Q A S C E P E E Y
GTGGTGCAACTGGGAAGCAGCCTGACGGGGAAACGGCTCCTGCAATGGCAGGCAAGCTGTGAACCAGAAGAGTAC

EcMenD

W I V D D I E G R L D P A H H R G R R L I A N I A
TGGATTGTTGATGACATTGAAGGGCGACTTGATCCGGCACACCATCGCGGACGTGCGTTAATTGCCAATATTGCC

EcMenD

D W L E L H P A E K R Q P W C V E I P R L A E Q A
GACTGGCTGGAGCTGCATCCGGCAGAAAAACGCCAGCCCTGGTGC GTTGAATCCCGCGCCTGGCGGAACAGGCA

EcMenD

M Q A V I A R R D A F G E A Q L A H R I C D Y L P
ATGCAGGCGTTATTGCCCGCCGTGATGCGTTTGGCGAAGCGCAACTGGCGCATCGCATCTGCGACTATCTGCCT

EcMenD

E Q G Q L F V G N S L V V R L I D A L S Q L P A G
GAACAGGGGCAATTGTTTGTGGTAACAGCCTGGTGGTACGTCTGATTGATGCGCTTTCGCAACTTCCGGCAGGT

EcMenD

Y P V Y S N R G A S G I D G L L S T A A G V Q R A
TACCCGGTGTACAGCAACCGTGGGGCCAGCGGTATCGACGGGCTGCTTTCGACCGCCGCCGGCGTTTACAGCGGGCA

EcMenD

S G K P T L A I V G D L S A L Y D L N A L A L L R
AGCGGCAAACCGACGCTGGCGATTGTGGGCGATCTCTCCGCACTTTACGATCTCAACGCGCTGGCGTTATTGCGT

EcMenD

Q V S A P L V L I V V N N N G G Q I F S L L P T P
CAGTTTCTGCGCCGCTGGTATTAATTGTGGTGAACAACAACGGCGGGCAAATTTCTCGCTGTTGCCAACGCCG

EcMenD

Q S E R E R F Y L M P Q N V H F E H A A A M F E L
CAAAGCGAGCGTGAGCGTTTCTATCTGATGCCGCAAACGTCCATTTTGAGCACGCCGCCGCGATGTTTCGAGCTG

EcMenD

K Y H R P Q N W Q E L E T A F A D A W R T P T T T
AAATATCATCGTCCGCAAACCTGGCAGGAACCTGAAACGGCATTGCGGACGCCTGGCGCACGCCAACACCACG

EcMenD

V I E M V V N D T D G A Q T L Q Q L L A Q V S H L
GTGATTGAAATGGTGGTTAACGACACCGATGGTGC GCAAACGCTCCAGCAACTTCTGGCGCAGGTAAGCCATTTA

EcMenD

*
TGAGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAG
 SalI *NotI* *XhoI*

6 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist.

Die vorgelegte Dissertation wurde in dieser oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift