

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

## **Asymmetrische Synthesen mit neuen Oxidoreduktasen aus Cyanobakterien**

**Kathrin G. Hölsch**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Harald Klein

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. rer. nat. habil. Johannes  
Buchner

Die Dissertation wurde am 07.09.2009 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 27.11.2009  
angenommen.



## Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken möchte:

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung und sein großes Engagement für dieses Projekt. Ich habe mich stets im höchsten Maße unterstützt und im positivsten Sinne gefordert gefühlt. Mit seinem Ideenreichtum, seinen motivierenden Worten und konstruktiven Kritiken sowie der vertrauensvollen Einräumung von Freiheiten hat er viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Beim Coreferenten Herrn Prof. Dr. rer. nat. Johannes Buchner (Lehrstuhl Biotechnologie, Technische Universität München) und beim Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr.-Ing. Harald Klein (Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik, Technische Universität München) für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei Frau Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz (Veterinärmedizinische Universität Wien) für den Stamm *Anabaena variabilis*.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Rögner (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr Universität Bochum) für den Stamm *Thermosynechococcus* BP-1.

Bei Herrn Dr. Hann-Jörg Eckert (Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie, Technische Universität Berlin) für den Stamm *Acaryochloris marina*.

Bei Frau Dr. Stephanie Bringer-Meyer (Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich) für die Bereitstellung des Plasmids pBtac-adh<sub>L.brevis</sub>.

Bei Frau Dr.-Ing. Maya Tiemeyer (Octagene GmbH, Martinsried) für die Bereitstellung des Plasmids pETM-41.

Bei Herrn Florian Steinbacher (Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Technische Universität München) für die Leihgabe der Quantumsensoren.

Bei Herrn Dr. Martin Haslbeck (Lehrstuhl Biotechnologie, Technische Universität München) für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Blauen Nativgelelektrophorese.

Bei Dr. Jan Havel für die hervorragende Einarbeitung in das Thema.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für das großartige Arbeitsklima.

Bei Danielle Dennewald und Gabi Gebhardt für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei meinen Studenten Adelheid Stopfer, Corinna Wagner, Christoph Zimmermann, Nicolas Jäger, Steven Broadley, Fei Lu, Boqiao Sun, Carine Pennese, Michael Schmidt, Harald Kri-spin, Steven Reißer und Christoph Loderer für die fleißige Mitarbeit.

Bei meiner Familie und meinem Lebensgefährten für ihren Rückhalt und ihre vollste Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>7</b>
3.1	Enzyme in der organischen Synthese . . . . .	7
3.1.1	Vorteile enzymkatalysierter Reaktionen . . . . .	7
3.1.2	Nachteile enzymkatalysierter Reaktionen und Möglichkeiten zu ihrer Überwindung . . . . .	9
3.1.3	Identifizierung neuer Enzyme für den industriellen Einsatz . . . . .	11
3.1.4	Enzymklassifizierung . . . . .	13
3.1.5	Asymmetrische Synthese chiraler Alkohole . . . . .	14
3.1.6	Enzymatische Umsetzung schlecht wasserlöslicher oder instabiler Edukte	17
3.1.7	Verwendung isolierter Enzyme oder ganzer Zellen . . . . .	21
3.2	Cyanobakterien . . . . .	22
3.2.1	Merkmale von Cyanobakterien . . . . .	22
3.2.2	Taxonomie . . . . .	24
3.2.3	Morphologie und Wachstum . . . . .	26
3.2.4	Industrieller Einsatz von Cyanobakterien . . . . .	29
3.3	Die 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase . . . . .	32
3.3.1	Natürliche Funktion . . . . .	32
3.3.2	Struktur . . . . .	35
3.3.3	Enzymmechanismus . . . . .	38
3.4	Cofaktorregenerierung . . . . .	45
3.4.1	Substrat-gekoppelter Ansatz . . . . .	46
3.4.2	Herkömmlicher Enzym-gekoppelter Ansatz . . . . .	47
3.4.3	Innovativer Enzym-gekoppelter Ansatz: bifunktionelle Proteine . . . . .	50
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>52</b>
4.1	Allgemeines Material . . . . .	52

4.2	Spezielles Material . . . . .	52
4.2.1	Plasmide . . . . .	52
4.2.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme . . . . .	53
4.2.3	Cyanobakterienstämme . . . . .	54
4.2.4	Computerprogramme . . . . .	59
4.3	Mikrobiologische Methoden . . . . .	61
4.3.1	Messung der optischen Dichte . . . . .	61
4.3.2	Bestimmung der Biotrockenmasse . . . . .	62
4.3.3	Stammhaltung von Cyanobakterien . . . . .	62
4.3.4	Kultivierung von Cyanobakterien . . . . .	63
4.3.5	Besonderheiten der Kultivierung mariner Cyanobakterien des Roscoff-Instituts . . . . .	67
4.3.6	Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	69
4.3.7	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	69
4.4	Molekularbiologische Methoden . . . . .	69
4.4.1	Isolation von genomischer DNA aus Cyanobakterien . . . . .	70
4.4.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> . . . . .	71
4.4.3	Polymerasekettenreaktion . . . . .	71
4.4.4	Reinigung von DNA . . . . .	71
4.4.5	Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .	72
4.4.6	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	72
4.4.7	Restriktion und Ligation von DNA . . . . .	72
4.4.8	Herstellung von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen . . . . .	72
4.4.9	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen . . . . .	73
4.4.10	Kolonie-Polymerasekettenreaktion . . . . .	73
4.4.11	Ortsgerichtete Mutagenese . . . . .	74
4.4.12	Sequenzierung von DNA . . . . .	74
4.5	Proteinchemische Methoden . . . . .	74
4.5.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	74
4.5.2	Coomassie-Färbung . . . . .	75
4.5.3	Silberfärbung . . . . .	75
4.5.4	Blaue Nativgelelektrophorese . . . . .	76
4.5.5	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	77
4.6	Proteinreinigungsmethoden . . . . .	77
4.6.1	Größenausschlusschromatographie . . . . .	77

4.6.2	Anionenaustauschchromatographie . . . . .	78
4.6.3	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie . . . . .	78
4.6.4	Affinitätschromatographische Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen . . . . .	79
4.7	Präparative Methoden . . . . .	80
4.7.1	Dialyse . . . . .	80
4.7.2	Adsorptive Entfernung von Triton X-100 aus Proteingemischen . . . . .	80
4.7.3	Herstellung der Tabakätzvirus-Protease . . . . .	81
4.7.4	Herstellung von cyanobakteriellen Kettoreduktasen in Fusion mit Maltosebindendem Protein . . . . .	82
4.7.5	Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern . . . . .	83
4.8	Gaschromatographische Analytik . . . . .	84
4.8.1	Acetophenon und 1-Phenylethanol . . . . .	85
4.8.2	$\alpha$ -Chloracetophenon und $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol . . . . .	85
4.8.3	4'-Chloracetophenon und 1-(4'-Chlorphenyl)ethanol . . . . .	85
4.8.4	3'-Fluoracetophenon und 1-(3'-Fluorphenyl)ethanol . . . . .	86
4.8.5	4'-Fluoracetophenon und 1-(4'-Fluorphenyl)ethanol . . . . .	86
4.8.6	2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und 1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol . . . . .	86
4.8.7	Propiophenon und 1-Phenyl-1-propanol . . . . .	87
4.8.8	Ethylacetoacetat und Ethyl-3-hydroxybutyrat . . . . .	87
4.8.9	Ethylbenzoylacetat und Ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropionat . . . . .	87
4.8.10	Ethyl-4-chloracetoacetat und Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrat . . . . .	88
4.8.11	Ethyl-4,4,4-trichloracetoacetat und Ethyl-4,4,4-trichlor-3-hydroxybutyrat . . . . .	88
4.8.12	Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat und Ethyl-4,4,4-trifluor-3-hydroxybutyrat . . . . .	88
4.8.13	5-Chlor-2-pentanon und 5-Chlor-2-pentanol . . . . .	89
4.8.14	2-Heptanon und 2-Heptanol . . . . .	89
4.8.15	2-Oktanon und 2-Oktanol . . . . .	89
4.8.16	1,1,1-Trifluor-2-propanol . . . . .	90
4.9	Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien . . . . .	90
4.9.1	Bestimmung der Reaktionskinetik . . . . .	91
4.9.2	Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse . . . . .	91
4.10	Bestimmung von Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten . . . . .	91
4.10.1	Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen in Puffer . . . . .	91

4.10.2	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen zwischen ionischer Flüssigkeit und <i>n</i> -Hexan sowie ionischer Flüssigkeit und Puffer ( $\log D$ ) . . . . .	92
4.11	Enzymcharakterisierung . . . . .	93
4.11.1	Photometrische Messung von Enzymaktivitäten . . . . .	93
4.11.2	Bestimmung von Enzymkinetiken . . . . .	95
4.11.3	Bestimmung des Enzymmechanismus . . . . .	97
4.11.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante von NADPH mittels Fluoreszenzverstärkung . . . . .	98
4.11.5	Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums und Identifikation von Aktivatoren und Inhibitoren . . . . .	99
4.11.6	Bestimmung der Enzymstabilität . . . . .	100
4.11.7	Ganzzellbiotransformationen im 1,4 mL-Maßstab . . . . .	101
4.12	Statistik . . . . .	101
<b>5</b>	<b>Charakterisierung der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942</b>	<b>102</b>
5.1	Bereitstellung der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase . . . . .	102
5.1.1	Expression und Reinigung ohne Affinitätsanker . . . . .	102
5.1.2	Expression und Reinigung in Fusion mit Maltose-bindendem Protein . . . . .	105
5.1.3	Rückfaltung aus Einschlusskörpern . . . . .	106
5.1.4	Vergleich der Herstellungsverfahren . . . . .	108
5.1.5	Diskussion . . . . .	109
5.2	Struktur . . . . .	110
5.2.1	Sekundärstruktur . . . . .	110
5.2.2	Tertiärstruktur . . . . .	112
5.2.3	Quartärstruktur . . . . .	113
5.2.4	Diskussion . . . . .	116
5.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen . . . . .	118
5.3.1	Temperaturoptimum . . . . .	118
5.3.2	pH-Optimum . . . . .	119
5.3.3	Identifikation von Aktivatoren und Inhibitoren . . . . .	120
5.3.4	Diskussion . . . . .	121
5.4	Enzymstabilität . . . . .	122
5.4.1	Temperaturstabilität . . . . .	122
5.4.2	Lagerstabilität . . . . .	123

5.4.3	pH-Stabilität . . . . .	123
5.4.4	Stabilität in Gegenwart organischer Lösemittel . . . . .	124
5.4.5	Stabilität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten . . . . .	125
5.4.6	Diskussion . . . . .	126
5.5	Substratspektrum . . . . .	128
5.5.1	Acetophenon und Acetophenonderivate . . . . .	129
5.5.2	$\beta$ -Ketoester . . . . .	132
5.5.3	Alkanone und Alkanonderivate . . . . .	134
5.5.4	Diskussion . . . . .	136
5.6	Enzymmechanismus . . . . .	138
5.6.1	Produktinhibitionsstudie . . . . .	139
5.6.2	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter . . . . .	142
5.6.3	NADPH-Dissoziationskonstante . . . . .	143
5.6.4	Diskussion . . . . .	144
<b>6</b>	<b>Eignung der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen aus anderen Cyano-</b>	
	<b>bakterien für asymmetrische Synthesen</b>	<b>145</b>
6.1	Anzucht von Cyanobakterien . . . . .	147
6.1.1	Limnische, euryhaline und terrestrische Cyanobakterien . . . . .	147
6.1.2	Marine Cyanobakterien . . . . .	149
6.1.3	Diskussion . . . . .	150
6.2	Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien . . . . .	152
6.2.1	Geschwindigkeit der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon	152
6.2.2	Enantiomerenüberschüsse . . . . .	157
6.2.3	Diskussion . . . . .	160
6.3	Vergleichende Charakterisierung von 15 cyanobakteriellen Ketoreduktasen . .	161
6.3.1	Klonierung und Expression cyanobakterieller Ketoreduktasen . . . . .	162
6.3.2	Bestimmung der Halbsättigungskonzentration von NADPH . . . . .	163
6.3.3	Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon . . . . .	165
6.3.4	Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat . . . . .	166
6.3.5	Reduktion von Ethylbenzoylacetat . . . . .	167
6.3.6	Reduktion von 4'-Chloracetophenon . . . . .	169
6.3.7	Gegenüberstellung der besten Enzyme . . . . .	170
6.3.8	Identifikation von Aktivitäts-bestimmenden Aminosäuren . . . . .	172
6.3.9	Identifikation von Selektivitäts-bestimmenden Aminosäuren . . . . .	174
6.4	Diskussion . . . . .	176

<b>7 Cofaktorregenerierung</b>	<b>179</b>
7.1 Cofaktorregenerierung mit Cosubstraten . . . . .	179
7.2 Änderung der Cofaktorspezifität . . . . .	179
7.3 Fusion mit der D221G-Mutante der Formiatdehydrogenase aus <i>Mycobacterium vaccae</i> . . . . .	180
7.3.1 Aktivität der bifunktionellen Enzyme . . . . .	180
7.3.2 Oligomerisierungsgrad . . . . .	181
7.3.3 Insertion verschiedener Verbindungssequenzen . . . . .	182
7.3.4 Vergleich zwischen dem Fusionsprotein und getrennt exprimierten Enzymen . . . . .	185
7.4 Fusion mit der Glukose-6-phosphat-dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . . . . .	189
7.5 Diskussion . . . . .	190
<b>8 Zusammenfassung</b>	<b>193</b>
<b>9 Ausblick</b>	<b>198</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>199</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>220</b>
<b>Anhang</b>	<b>223</b>
<b>A Allgemeines Material</b>	<b>223</b>
A.1 Geräte . . . . .	223
A.2 Chemikalien . . . . .	226
A.3 Enzyme . . . . .	231
A.4 Standards und Kits . . . . .	232
A.5 Oligonukleotide . . . . .	233
A.6 Puffer . . . . .	235
A.7 Medien . . . . .	239
<b>B Kinetische Parameter</b>	<b>241</b>
B.1 Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien . . . . .	241
B.2 Enzymkinetiken mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat . . . . .	242
B.3 Enzymkinetiken mit Ethyl-4-chloracetoacetat als Substrat . . . . .	242
B.4 Enzymkinetiken mit Ethylbenzoylacetat als Substrat . . . . .	243

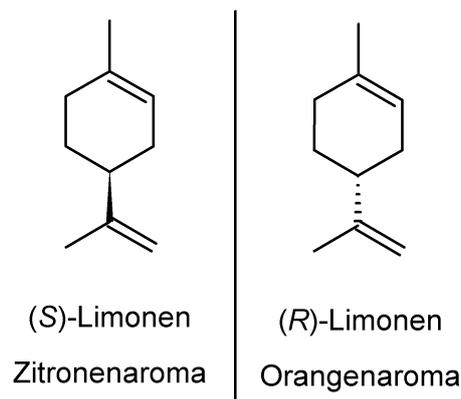
B.5	Enzymkinetiken mit 4'-Chloracetophenon als Substrat . . . . .	244
<b>C</b>	<b>Sonstiges</b>	<b>245</b>
C.1	Löslichkeiten . . . . .	245
C.2	Zugriffsschlüssel für DNA- und Proteinsequenzen . . . . .	245
C.3	Sequenzvergleich der cyanobakteriellen Ketoreduktasen . . . . .	246



# 1 Einleitung

Vor etwa 150 Jahren entdeckte der französische Chemiker Louis Pasteur an kristallinen Salzen der Weinsäure, dass es Moleküle gibt, die sich wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten und nicht durch einfache Drehung zur Deckung gebracht werden können. Diese besonderen Stereoisomere werden als Enantiomere und das zugrunde liegende Phänomen als Chiralität bezeichnet.

Enantiomere drehen linear polarisiertes Licht in entgegengesetzte Richtungen, unterscheiden sich ansonsten aber nicht in ihren physikalischen Eigenschaften. Auch ihre chemischen Eigenschaften und ihre Reaktivität gegenüber achiralen Verbindungen sind identisch. Ist der Reaktionspartner des Moleküls seinerseits chiral, kommen die Unterschiede der Enantiomere zum Tragen. Da die meisten Bausteine biologischer Makromoleküle - Aminosäuren, Zucker und Nukleinsäuren - „optisch aktiv“ sind, besitzen biologische Systeme die Fähigkeit zur stereoselektiven Unterscheidung zwischen chiralen Molekülen. Ein gutes Beispiel hierfür ist der Geruch von Limonen. Das (*S*)-Enantiomer vermittelt bei der Interaktion mit den humanen Geruchsrezeptoren ein Zitronenaroma, während das (*R*)-Enantiomer nach Orange riecht. In Abbildung 1.1 sind die Strukturen der Moleküle dargestellt.



**Abbildung 1.1:** Chemische Strukturformeln von (*S*)- und (*R*)-Limonen.

Das Prinzip der molekularen Differenzierung zwischen Enantiomeren gilt für viele biologische Wechselwirkungen und betrifft auch Medikamente, die auf optisch aktiven Verbindungen basieren. Meist entfaltet nur eines der beiden Enantiomere die gewünschte Wirkung, während

das andere Enantiomer weniger wirksam ist oder gar unerwünschte Effekte hat, die bis zur Toxizität reichen können. Beispiele hierfür sind das Schmerzmittel Ibuprofen, bei dem das (S)-Enantiomer mehr als 100fach wirksamer ist als das (R)-Enantiomer, und das Schlafmittel Contergan<sup>®</sup>, dessen Wirkstoff (R)-Thalidomid beruhigend wirkt, während das (S)-Enantiomer teratogen ist und zu Missbildungen führt (Nguyen *et al.*, 2006).

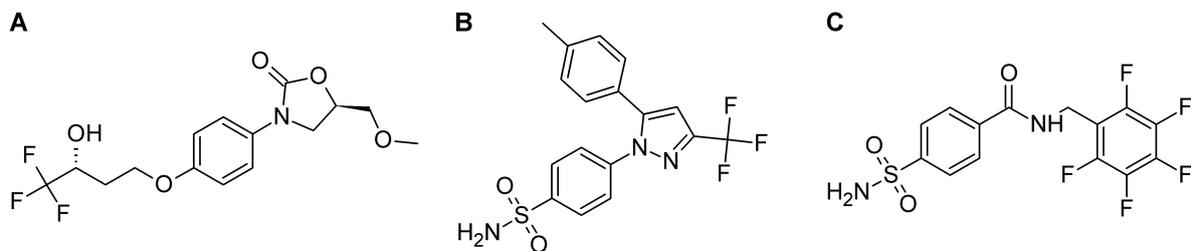
Das Wissen um die Wirkungsunterschiede von Enantiomeren führte im Jahr 1992 zu einer Grundsatzklärung der amerikanischen „Food and Drug Administration“ (FDA), wodurch die Zulassungsvorschriften von Wirkstoffen, die als Isomergemisch vorliegen, verschärft wurden (Food and Drug Administration, 1992). Seitdem muss jedes Enantiomer vor der Zulassung einer eingehenden physiologischen Untersuchung unterzogen werden. Diese Entwicklung veranlasst die pharmazeutische Industrie in zunehmendem Maße dazu, chirale Wirkstoffe enantiomerenrein zu gewinnen (Breuer *et al.*, 2004). Auch Vitamine, Agrochemikalien, Geschmacks- und Geruchsstoffe werden vermehrt enantiomerenrein produziert (Blaser *et al.*, 2001).

Enzyme sind aufgrund ihrer Enantioselektivität geeignet für die Katalyse asymmetrischer Synthesen, bei denen eines der beiden Enantiomere in angereicherter oder reiner Form produziert wird (Hellwich, 2007). Die biokatalytische Produktion chiraler Verbindungen fällt in das Gebiet der industriellen „weißen“ Biotechnologie, die definiert ist als „die industrielle Produktion von organischen Grund- und Feinchemikalien sowie Wirkstoffen mit Hilfe optimierter Enzyme, Zellen oder Mikroorganismen“ (Fraunhofer-Gesellschaft, 2005). Ein Ziel der weißen Biotechnologie ist es, konventionelle chemische Prozesse durch nachhaltige biologische Prozesse zu ersetzen, die den Verbrauch von fossilen Rohstoffen und die Erzeugung von toxischen Substanzen vermindern oder vermeiden und daher ressourcenschonend und ökologisch verträglich sind (Horváth und Anastas, 2007).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Chirale Alkohole stellen wichtige Bausteine für die Synthese bioaktiver Substanzen wie beispielsweise Agrochemikalien und Pharmazeutika dar. Durch die biokatalytische Reduktion von prochiralen Ketonen können diese Verbindungen unter milden Reaktionsbedingungen mit hoher Reinheit erzeugt werden.

Die Synthese chiraler fluorierter Verbindungen besitzt große Bedeutung für medizinische Anwendungen. Die Einführung von Fluorsubstituenten in organische Moleküle bewirkt eine Änderung der physikochemischen Eigenschaften und ihrer Reaktivität im Vergleich zu dem nicht-halogenierten Analogon. Beispiele für fluoriierte Arzneimittel sind das Antidepressivum Befloxaton und der Cyclooxygenase-2-Inhibitor Celecoxib, der zur Behandlung rheumatoider Arthritis eingesetzt wird (Penning *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 2006). Darüber hinaus gibt es eine Reihe fluorierter Carboanhydraseinhibitoren, die unter anderem wirksam gegen grauen Star sind (Doyon und Jain, 1999). Abbildung 2.1 gibt eine Übersicht über die Strukturen dieser Verbindungen.



**Abbildung 2.1:** Strukturen fluorierter Medikamente. **A)** Befloxaton. **B)** Celecoxib. **C)** Beispiel für einen fluorierten Carboanhydraseinhibitor.

Ein Problem bei der biotechnologischen Produktion fluorierter Alkohole ist, dass Biokatalysatoren häufig eine eingeschränkte Enantioselektivität oder verminderte Aktivität gegenüber fluorierten Verbindungen zeigen. Davon betroffen sind beispielsweise Alkoholdehydrogenasen aus *Thermoanaerobacter*- und *Lactobacillus*-Spezies sowie Lipasen aus *Pseudomonas*-Stämmen, die zur Herstellung chiraler Alkohole durch asymmetrische Synthesen be-

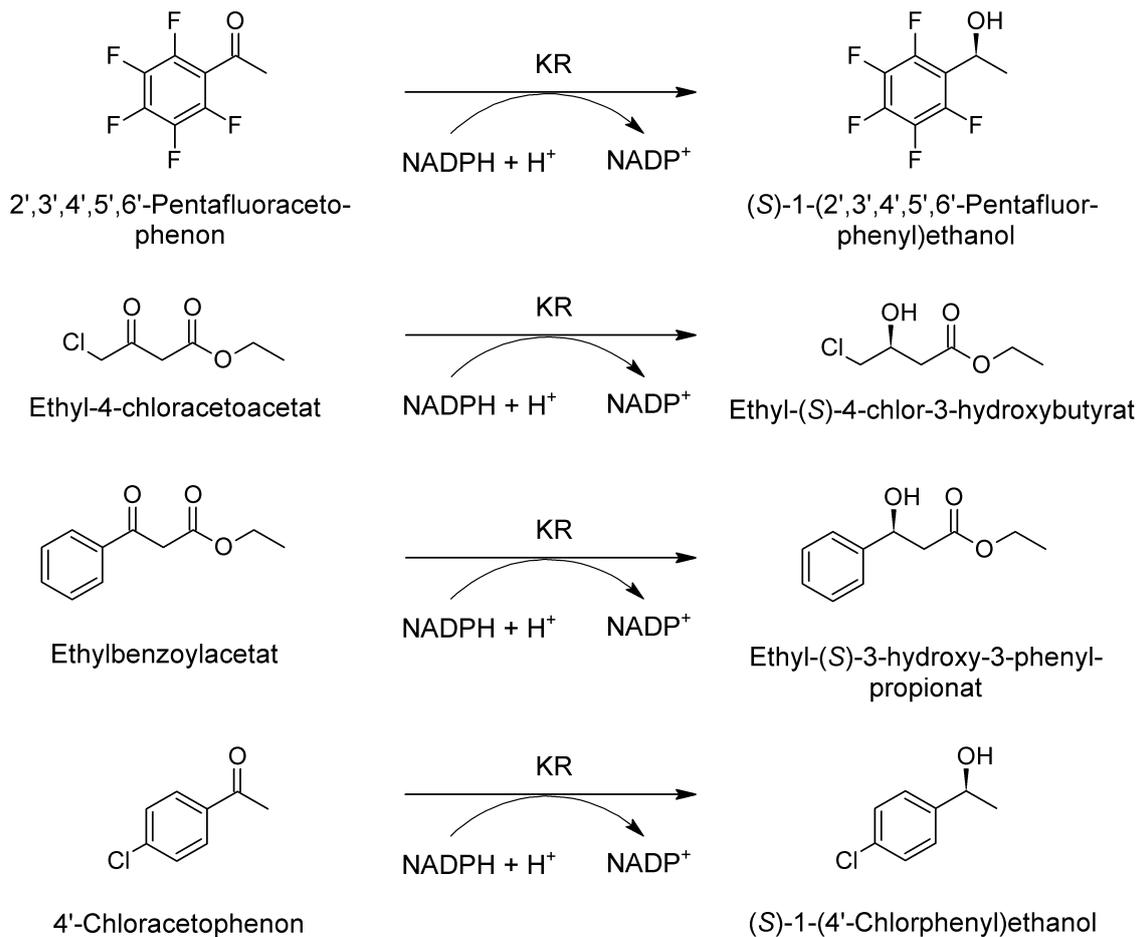
ziehungsweise enantioselektive Hydrolysen eingesetzt werden (Sakai *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 2006; Havel und Weuster-Botz, 2006).

Bei verschiedenen Cyanobakterien konnte hingegen gezeigt werden, dass sie bei der Reduktion halogenerter und auch mehrfach fluorierter Ketone sehr hohe Enantioselektivitäten aufweisen (Nakamura *et al.*, 2000; Havel und Weuster-Botz, 2006). Das Süßwasser-Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7942 reduziert beispielsweise das perfluorierte Keton 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon mit einem Enantiomerenüberschuss über 99,8 % zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol (Havel und Weuster-Botz, 2006).

Da die industrielle Verfügbarkeit von phototrophen Mikroorganismen aufgrund der benötigten Photobioreaktoren heute und auch in absehbarer Zukunft begrenzt ist, wurde die Oxidoreduktase, die für die Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon verantwortlich ist, von Havel (2006) identifiziert. Die katalytische Aktivität konnte der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (KR) zugewiesen werden, die zur Proteinfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) gehört und den ersten reduktiven Schritt in der bakteriellen Fettsäuresynthese katalysiert (Wright, 2004).

Ziel dieser Arbeit ist die heterologe Expression dieser neuen Oxidoreduktase in dem industriellen Plattformorganismus *Escherichia coli* und die Untersuchung ihrer Eignung für die Produktion chiraler Alkohole, die vorzugsweise halogeniert sind. Wichtige Aspekte sind dabei das Substratspektrum, die Enantioselektivität und die Stabilität des Enzyms. Da noch keine KR aus Cyanobakterien charakterisiert wurde, sollen auch grundlegende biochemische Eigenschaften wie der Oligomerisierungsgrad und der Enzymmechanismus bestimmt werden. Um die erhaltenen Ergebnisse einzuordnen, wird die KR im Verlauf der Arbeit mit der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) verglichen. Dieses Enzym wurde gewählt, da es industrielle Anwendung findet und sehr gut charakterisiert ist.

Da Cyanobakterien eine der größten Gruppierungen der gramnegativen Bakterien darstellen (Rippka *et al.*, 1979), gibt es eine Vielzahl von natürlichen Varianten der KR. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher die Suche nach homologen Enzymen in anderen Cyanobakterienstämmen und deren Charakterisierung für asymmetrische Synthesen. Da industriell relevante Oxidoreduktasen ein breites Substratspektrum akzeptieren sollten, um möglichst vielseitig einsetzbar zu sein, wurden die cyanobakteriellen Enzyme hinsichtlich der Reduktion von vier Modellsubstraten untersucht, die von ökonomischem Interesse sind. Die ausgewählten Substrate gehören den Substanzklassen der Acetophenonderivate sowie der  $\beta$ -Ketoester an und unterscheiden sich im sterischen Anspruch und im Grad der Halogenierung. Die betrachteten Reaktionen sind in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Reduktion der prochiralen Ketone, die als Modellssubstrate für die Charakterisierung cyanobakterieller Ketoreduktasen ausgewählt wurden.

2',3',4',5',6'-Pentafluoroacetophenon wurde als Beispiel für die enzymatisch schwer umzusetzenden perfluorierten Ketone gewählt. Der  $\beta$ -Ketoester Ethyl-4-chloroacetoacetat ähnelt den natürlichen Substraten der KR. Der korrespondierende (S)-Alkohol Ethyl-(S)-4-chloro-3-hydroxybutyrat findet als Intermediat bei der Synthese des Cholesterin senkenden Medikaments Atorvastatin Anwendung (Pereira, 1998). Ethylbenzoylacetat ist ein sterisch anspruchsvolles Substrat, das zu Ethyl-(S)-3-hydroxy-3-phenylpropionat reduziert wird und bei der Synthese des Antidepressivums Fluoxetin eingesetzt wird (Chênevert *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde 4'-Chloroacetophenon als Vertreter der monohalogenierten Acetophenonderivate ausgewählt. Die Halogenderivate des 1-Phenylethanol stellen interessante Bausteine für chirale Verbindungen dar, da die Alkoholgruppe leicht in andere funktionelle Gruppen umgewandelt werden kann (Kurbanoglu *et al.*, 2007).

Für die Reduktion von Carbonylverbindungen benötigt die KR den Cofaktor Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), der als Transportmetabolit zur Elektronenübertragung dient (Stapleton und Jaworski, 1984). In Anbetracht der hohen Kosten von NADPH würde ein Prozess bei einem stöchiometrischen Einsatz unwirtschaftlich werden. Aus diesem Grund soll als weitere Zielsetzung auch untersucht werden, welche *in situ*-Cofaktorregenerierungsmethoden für die KR geeignet sind. Hierbei wird üblicherweise zwischen Substrat- und Enzym-gekoppelten Methoden unterschieden, je nachdem, ob das Syntheseezym selbst die Regenerierung mit Hilfe eines Cosubstrates katalysiert oder ob ein zweites Enzym dafür eingesetzt wird.

Zur Erreichung dieser Zielsetzungen waren folgende Arbeitsschritte geplant:

- Rekombinante Expression der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase aus *Synechococcus* PCC 7942 in *Escherichia coli* und Entwicklung eines effizienten Herstellungsverfahrens
- Biochemische Charakterisierung der Oxidoreduktase hinsichtlich:
  - Struktur
  - Optimalen Reaktionsbedingungen und Stabilität
  - Substratspektrum und Enantioselektivität
  - Enzymmechanismus
- Vergleichende Charakterisierung homologer Enzyme aus 15 weiteren Cyanobakterien aus verschiedenen taxonomischen Ordnungen und Habitaten auf der Basis der Reduktion von vier Modellsubstraten
- Untersuchung verschiedener Methoden zur Cofaktorregenerierung:
  - Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung
  - Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung

## 3 Theoretische Grundlagen

Nachfolgend werden die für diese Arbeit bedeutsamen theoretischen Grundlagen näher erläutert. Hierbei wird zunächst ein Überblick über den Stand der Technik bei der Verwendung von Enzymen in der organischen Synthese gegeben. Anschließend werden die Eigenschaften von Cyanobakterien und der in dieser Arbeit untersuchten cyanobakteriellen Oxidoreduktasen dargestellt. Den Abschluss dieses Kapitels bildet eine Übersicht über die möglichen Verfahren zur Cofaktorregenerierung.

### 3.1 Enzyme in der organischen Synthese

Die ersten Anwendungen von Enzymen auf dem Gebiet der organischen Synthese liegen mehr als ein Jahrhundert zurück (Buchholz *et al.*, 2005). Die Darstellung von (*R*)-Mandelonitril aus Blausäure und Benzaldehyd mit Hilfe einer Hydroxynitril-Lyase wurde von Rosenthaler (1908) beschrieben. Durch die stetige Identifikation und Charakterisierung von neuen Enzymen wurde auch ihre Verwendung in organischen Synthesen vorangetrieben. Einen erheblichen Entwicklungsschub erfuhr dieser Bereich durch die Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie sowie auf dem Gebiet des „*Protein Engineering*“ innerhalb der letzten 20 Jahre (Bommarius *et al.*, 1998; Alberghina, 2000). Heutzutage gehört die Anwendung von Enzymen zu den Gebieten der organischen Chemie, die dem größten Wachstum unterworfen sind (Holland, 1992; Buchholz *et al.*, 2005). Diese Entwicklung wurde unter anderem durch eine breitere Akzeptanz biokatalytischer Prozesse bei organischen Chemikern sowie durch die Betrachtung der Biokatalyse als sichere und umweltfreundliche Technologie gefördert (Buchholz *et al.*, 2005).

#### 3.1.1 Vorteile enzymkatalysierter Reaktionen

Einer der Hauptgründe für den zunehmenden Einsatz von Biokatalysatoren in industriellen Prozessen liegt in der Fähigkeit vieler Enzyme, Reaktionen äußerst chemo-, regio- und stereoselektiv zu katalysieren (Liese *et al.*, 2000; Buchholz *et al.*, 2005). Hierbei sind Enzyme häufig nicht an ihr natürliches Substratspektrum gebunden, sondern katalysieren auch die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate mit hoher Selektivität (Faber, 2004).

Eine mögliche Folge der hohen Selektivität ist die Reduktion der Anzahl an Syntheseschritten im Vergleich zur korrespondierenden chemischen Katalyse, wodurch ein Prozess effizienter und aufgrund verminderter Mengen an Abfallstoffen umweltfreundlicher werden kann (Petersen und Kiener, 1999). So erreichen Enzyme eine hohe Regioselektivität ohne mit den Nachteilen der aufwändigen Schutzgruppenchemie konfrontiert zu sein (Bertau, 2002; Nakamura *et al.*, 2003a). Die Biokatalyse ermöglicht darüber hinaus Zugang zu Reaktionen, die schwierig mit den Methoden der klassischen organischen Chemie zu realisieren sind (Petersen und Kiener, 1999). Hierzu zählt die Einführung funktioneller Gruppen an Positionen, die nicht aktiviert sind, wie es unter anderem bei der Hydroxylierung aliphatischer Moleküle der Fall ist (Faber, 2004).

Enzyme sind ferner sehr effiziente Katalysatoren. Häufig beschleunigen Enzyme Reaktionen um den Faktor  $10^8$ - $10^{10}$  stärker als die korrespondierenden chemischen Katalysatoren. Darüber hinaus ist der molare Anteil der chemischen Katalysatoren, der in der Regel im Bereich von 0,1 - 1 % liegt, typischerweise um mehrere Größenordnungen höher als derjenige von Enzymen, der meist im Bereich von  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  % anzusiedeln ist (Faber, 2004).

Enzymatisch katalysierte Reaktionen unterscheiden sich von der klassischen chemischen Katalyse auch dahingehend, dass Enzyme ihre Aktivität meist unter milden Bedingungen entfalten: in einem wässrigen Medium bei Atmosphärendruck, Temperaturen zwischen 20 und 40 °C und einem neutralen pH (Liese *et al.*, 2000; Faber, 2004). Hierdurch werden unerwünschte Nebenreaktionen - wie Isomerisierungen oder Razemisierungen - verhindert, sowie Einsparungen im Bereich der Energiekosten erzielt (Faber, 2004; Jeromin und Bertau, 2005). Reaktionen hingegen, die durch Zugabe von üblichen chemischen Katalysatoren beschleunigt werden, laufen meist bei hohem Druck in Kombination mit einer deutlich erhöhten Temperatur im nicht pH-neutralen Bereich ab. Ferner erfordern chemische Katalysen oftmals den Einsatz von umweltunverträglichen Stoffen, wie z.B. Schwermetallkatalysatoren (Liese *et al.*, 2000; Jeromin und Bertau, 2005). Die Synthese chiraler Verbindungen unter Verwendung des Diphosphinliganden 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) basiert beispielsweise auf Ruthenium- oder Rhodiumkomplexen (Fan *et al.*, 2000).

Da die meisten Enzyme unter ähnlichen Bedingungen arbeiten, was im Gegensatz zur großen Bandbreite der Reaktionsbedingungen von chemischen Katalysatoren steht, sind Multienzymreaktionen im Eintopfverfahren leichter zu realisieren als kombinierte chemische Katalyseschritte. Sequentielle enzymkatalysierte Reaktionen in einem Ansatz ermöglichen den Verzicht der Aufreinigung von Intermediaten sowie die Verschiebung eines ungünstigen Reaktionsgleichgewichts in Richtung des gewünschten Produktes (Liese *et al.*, 2000; Faber, 2004).

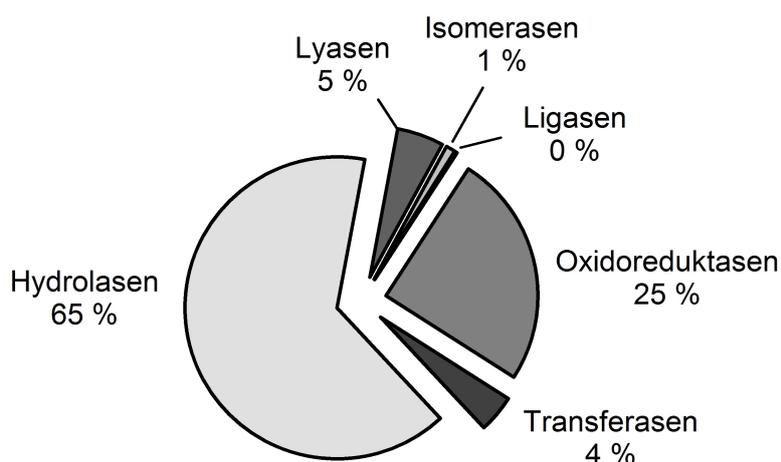
### 3.1.2 Nachteile enzymkatalysierter Reaktionen und Möglichkeiten zu ihrer Überwindung

Ein häufig angeführter Nachteil von Biokatalysatoren ist ihre eingeschränkte Stabilität. Enzyme können unter anderem bei hohen Temperaturen und extremem pH sowie durch die Zugabe von organischen Lösemitteln deaktiviert werden (Bommarius und Riebel, 2004). Bei konsequenter Vermeidung denaturierender Bedingungen können Enzyme jedoch eine bemerkenswert hohe Stabilität aufweisen (Faber, 2004). Einzelne Enzyme tolerieren sogar Temperaturen über 100 °C sowie beträchtliche Konzentrationen an organischen Lösemitteln (Adams, 1993; Filho *et al.*, 2003; Gupta und Khare, 2009).

Neben destabilisierenden Effekten sind Enzyme häufig auch inhibierenden Einflüssen unterworfen, die beispielsweise durch Schwermetallionen oder verschiedenste Chemikalien verursacht werden. Hierzu zählt auch eine etwaige Produkt- oder Eduktinhibierung. Während das Phänomen der Eduktinhibierung durch ein geeignetes Zudosierungsprofil umgangen werden kann, ist die Produktinhibierung in der Regel ein komplizierteres Problem, das eine sukzessive Entfernung des Produktes aus dem Reaktionsgemisch erfordert. Lösbar ist dies beispielsweise durch die Verwendung eines Zweiphasensystems, wobei die zweite Phase als Eduktreservoir und *in situ*-Produktextraktionsmittel dient (Faber, 2004).

Skeptiker enzymatischer Prozesse führen ferner häufig an, dass Enzyme teuer sind. Je nach dem Aufreinigungsgrad der Enzyme und der Größenordnung des Produktionsprozesses, können die Katalysatorkosten stark variieren. Für viele Reaktionen sind Ganzzellansätze oder wenig aufgereinigte Enzympräparate ausreichend, was sich in moderaten Preisen für den Biokatalysator niederschlägt. In Anbetracht der hohen katalytischen Effizienz vieler Enzyme im Vergleich zu klassischen chemischen Katalysatoren kann mitunter auch der Einsatz von teuren Biokatalysatoren ökonomisch sinnvoll sein (Faber, 2004).

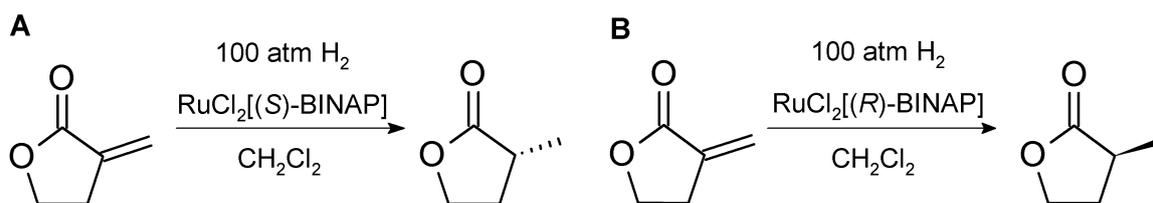
Ein weiterer Nachteil enzymkatalysierter Reaktionen ist die limitierte Verfügbarkeit geeigneter Biokatalysatoren. Obwohl die Anzahl der kommerziell erhältlichen Enzyme stetig steigt und auch die Breite der möglichen enzymkatalysierten Reaktionen zunimmt, gibt es nicht für jede gewünschte Umwandlung eines Substrates in ein bestimmtes Produkt einen passenden Biokatalysator (Bommarius und Riebel, 2004). In diesem Zusammenhang ist vor allem die Erschließung von Enzymen, die andere als hydrolytische Reaktionen katalysieren, von Interesse (Nusser *et al.*, 2007). Abbildung 3.1 stellt die Anwendung verschiedener Enzymklassen in der organischen Synthese dar, wobei die Übermacht der Prozesse deutlich wird, die auf Reaktionen mit Hydrolasen basieren (Jeromin und Bertau, 2005).



**Abbildung 3.1:** Anwendung verschiedener Enzymklassen in der organischen Synthese (nach Jeromin und Bertau (2005)).

Bei den Bemühungen, geeignete Biokatalysatoren für eine steigende Zahl an Umsetzungen zu finden, sollte auch besonderes Augenmerk auf solche Enzyme gelegt werden, die Reaktionen katalysieren, die mit konventioneller Synthesechemie schwierig auszuführen sind. Hierzu zählen beispielsweise die Bildung von Kohlenstoffverknüpfungen durch Ligasen sowie die Erschaffung neuer Chiralitätszentren durch Oxidoreduktasen (Nusser *et al.*, 2007).

Ein weiterer Faktor, der dazu beiträgt, dass nicht für jede gewünschte Reaktion ein passender Biokatalysator zur Verfügung steht, ist die Tatsache, dass es keine Enzympaare gibt, die sich wie Spiegelbilder zueinander verhalten (Faber, 2004). Fast alle Enzyme bestehen aus L-Aminosäuren. Ausnahmen hiervon bilden beispielsweise katalytisch aktive Ribonukleinsäure (RNA)-Moleküle, die auch als Ribozyme bezeichnet werden (Lorsch und Szostak, 1994). Da Chiralität folglich eine intrinsische Eigenschaft von Enzymen ist, kommt es in der Regel bei der Umsetzung eines prochiralen Edukts zur Bildung eines optisch aktiven Produkts. Ist das Edukt hingegen selbst chiral, so werden beide Enantiomere häufig mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt, was eine kinetische Racematspaltung zur Folge hat (Faber, 2004). Im Falle der chemischen Katalyse gelingt die Herstellung des jeweils anderen Enantiomers durch die Verwendung der enantiomeren Form des Katalysators. So kann beispielsweise durch den Einsatz von (*R*)- oder (*S*)-BINAP gezielt eines der beiden Enantiomere des gewünschten Produktes hergestellt werden (Wyatt und Warren, 2007). Dies ist in Abbildung 3.2 exemplarisch für die Reduktion von  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton gezeigt. Da es jedoch keine generelle Methode zur Herstellung von Enzymen gibt, die aus D-Aminosäuren bestehen, muss in diesem Fall ein völlig anderes Enzym identifiziert werden, das die gewünschte Reaktion katalysieren kann (Faber, 2004).



**Abbildung 3.2:** Reduktion von  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton zu **A**) (*S*)- $\alpha$ -Methyl- $\gamma$ -butyrolacton und **B**) (*R*)- $\alpha$ -Methyl- $\gamma$ -butyrolacton unter Verwendung verschiedener Enantiomere von BINAP (nach Wyatt und Warren (2007)).

Ein weiterer Nachteil enzymkatalysierter Reaktionen ist die lange Entwicklungszeit, die ein biokatalytischer Prozess in Anspruch nimmt. Beispielsweise benötigte der Konzern Lonza für die Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses zur Herstellung des Nahrungsergänzungsmittels L-Carnitin einen Zeitraum von 15 Jahren (Bommarius und Riebel, 2004). In Anbetracht der durchschnittlichen Patentlaufzeit von 20 Jahren ist hierbei der zeitliche Rahmen für eine wirtschaftliche Verwertung stark eingeschränkt. Jedoch wird erwartet, dass die Entwicklungszyklen für biokatalytische Prozesse aufgrund wissenschaftlicher und technischer Fortschritte kürzer werden (Bommarius und Riebel, 2004).

### 3.1.3 Identifizierung neuer Enzyme für den industriellen Einsatz

Trotz der wachsenden Bedeutung der Enzymkatalyse in industriellen Prozessen scheitert die technische Umsetzung oft an dem Fehlen geeigneter Biokatalysatoren (Schmid *et al.*, 2001; Bommarius und Riebel, 2004). Bereits charakterisierte Enzyme, die sich mitunter in kommerziellen Enzymbibliotheken befinden, können mit Hilfe moderner Methoden der Molekularbiologie und des „*Protein Engineering*“ gezielt verändert werden, um beispielsweise eine Ausweitung der Substratspezifität oder eine Erhöhung der Enantioselektivität zu erreichen (Demirjian *et al.*, 1999; Arnold, 2001; Bornscheuer und Pohl, 2001). Trotz der beträchtlichen Erfolge auf den Gebieten des rationalen und evolutiven Proteindesigns (Robertson und Steer, 2004) besteht ein stetiger Bedarf an neuen Enzymen, die das Repertoire an verfügbaren Biokatalysatoren erweitern.

Die biologische Vielfalt von Mikroorganismen wird als Hauptquelle für neue biotechnologische Produkte und Prozesse angesehen (Bull *et al.*, 1992). Eine gängige Methode zur Identifizierung neuer Enzyme für eine spezielle Anwendung ist die Durchmusterung von Stammsammlungen nach gewünschten Enzymaktivitäten (Demirjian *et al.*, 1999). Unter Berücksichtigung der taxonomischen Zugehörigkeit der Bakterien, in denen ein interessantes Enzym identifiziert wurde, lässt sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen, ein verwandtes Enzym mit besonderen Eigenschaften zu finden (Clausen, 1997). So wurde die Alkoholdehydrogenase aus

*Lactobacillus brevis* (LB-ADH) bei der systematischen Suche nach Alkoholdehydrogenase-Aktivitäten in verschiedenen *Lactobacillus*-Spezies entdeckt. Anstoß zu dieser Suche gaben die vielversprechenden Enzymeigenschaften der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (LK-ADH) (Hummel und Riebel, 2000). Die Ergebnisse der Durchmusterung von *Lactobacillus*-Kulturen sind auszugsweise in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tabelle 3.1:** Relative Aktivität verschiedener Stämme der Gattung *Lactobacillus* bei der Reduktion von Acetophenon (Hummel und Riebel, 2000).

Stamm	Relative Aktivität <sup>a</sup> , %
<i>Lactobacillus kefir</i>	100,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	106,9
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	1,0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,2
<i>Lactobacillus viridescens</i>	0,2
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0,9

<sup>a</sup> in Bezug auf die Aktivität von *Lactobacillus kefir*

Die Durchmusterung von Stammsammlungen birgt jedoch auch wesentliche Nachteile in sich. Zum einen sind primär nur solche Bakterien zugänglich, die in Reinkulturen vorliegen. In Anbetracht der Tatsache, dass durchschnittlich weniger als ein Prozent der Mikroorganismen eines bestimmten Lebensraumes unter Laborbedingungen kultivierbar sind, stellt dieser Aspekt eine bedeutende Einschränkung dar (Amann *et al.*, 1995). Ferner gestaltet sich eine systematische Suche aufgrund unterschiedlicher Medienansprüche und Kultivierungsbedingungen oftmals schwierig, da beide Parameter einen wesentlichen Einfluss auf das Expressionslevel verschiedener Proteine besitzen können (Demirjian *et al.*, 1999).

Die Verfügbarmachung eines größeren Anteils an der biologischen Diversität ist der Ansatzpunkt von Metagenombanken. Hierbei wird die genetische Vielfalt der mikrobiellen Population eines Habitates durch die Gesamtheit ihrer Genome repräsentiert (Handelsmann *et al.*, 1998). Jedoch ist auch diese Methode mit Nachteilen verbunden. Um das vollständige Genom eines einzelnen Organismus abzubilden, sind mehrere Tausend Klone nötig (Demirjian *et al.*, 1999). Bei der Erfassung des gesamten Metagenoms eines Habitates sind demnach optimierte Hochdurchsatzmethoden unerlässlich. Henne *et al.* (2000) untersuchten beispielsweise über eine Million *Escherichia coli*-Klone einer Boden-Metagenombank, um vier Klone mit der gewünschten lipolytischen Aktivität zu identifizieren.

Enzyme, nach deren phänotypischer Aktivität in einer Klonbibliothek gesucht wird, können auch aufgrund verschiedenster Ursachen unentdeckt bleiben. Mögliche Gründe hierfür sind eine schlechte Expression infolge einer unterschiedlichen Codonverwendung des Ursprungsorganismus im Vergleich zum Expressionsorganismus sowie die Inaktivität eines Enzyms aufgrund fehlender postranslationaler Modifikationen. Daher sollten idealerweise mehrere parallele Genbibliotheken etabliert werden, die auf verschiedenen industriellen Plattformorganismen beruhen. Ideal wäre eine parallele Expression in *Escherichia coli*-, *Bacillus*- und Hefe-Stämmen (Demirjian *et al.*, 1999). Dieses Vorgehen erhöht jedoch den experimentellen Aufwand enorm.

Neben dem direkten Nachweis der gewünschten Enzymaktivität können Metagenombanken auch auf der Grundlage sequenzbasierter Methoden durchmustert werden. Diese Methoden nutzen konservierte Sequenzbereiche bereits charakterisierter Enzyme als Vorlage für den Entwurf von Oligonukleotiden, die als Sonden für eine DNA-DNA-Hybridisierung zur Identifikation der Zielgene verwendet werden (Richardson *et al.*, 2002). Ferner können aus konservierten Sequenzbereichen auch degenerierte Oligonukleotide für Polymerasekettenreaktionen (*polymerase chain reaction*, PCR) abgeleitet werden. Durch PCR-Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte können diejenigen Klone identifiziert werden, die das Gen für ein verwandtes Enzym enthalten (Courtois *et al.*, 2003).

### 3.1.4 Enzymklassifizierung

Nach der Nomenklatur der *International Union of Biochemistry* (IUB) werden Enzyme je nach der von ihnen katalysierten Reaktion in sechs Hauptklassen eingeteilt, die in Tabelle 3.2 dargestellt sind.

Innerhalb dieser sechs Hauptklassen gibt es noch weitere Untergliederungen, die sich in der vierstelligen *Enzyme Commission* (EC)-Nummer niederschlagen. Während die zweite und dritte Stelle der EC-Nummer die katalysierte Reaktion genauer definieren, entspricht die letzte Ziffer einer fortlaufenden Nummerierung (IUB, 1992). Der Aufbau der EC-Nummern wird nachfolgend am Beispiel der Alkoholdehydrogenasen dargestellt, denen die Nummer EC 1.1.1.1 zugewiesen wurde:

EC 1	Oxidoreduktasen
EC 1.1	Angriffspunkt der Reaktion ist die CH-OH-Gruppe des Donors
EC 1.1.1	mit NAD <sup>+</sup> oder NADP <sup>+</sup> als Akzeptor
EC 1.1.1.1	Alkoholdehydrogenasen

**Tabelle 3.2:** Einteilung von Enzymen in verschiedene Enzymklassen (IUB, 1992).

Klasse	Bezeichnung	Aufgabe
1	Oxidoreduktasen	Oxidations- und Reduktionsreaktionen: Oxygenierung von C-H-, C-C- oder C=C-Bindungen oder Entfernung bzw. Addition von Wasserstoffatomäquivalenten
2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen: Aldehyd-, Keto-, Acyl-, Zucker-, Phosphoryl- oder Methylgruppen
3	Hydrolasen	Hydrolyse oder Bildung von Estern, Amidien, Laktonen, Laktamen, Epoxiden, Nitrilen, Anhydriden oder Glykosiden
4	Lyasen	Addition oder Eliminierung kleiner Moleküle an C=C-, C=N- oder C=O-Bindungen
5	Isomerasen	Katalyse von Isomerisierungen wie beispielsweise Razemisierungen oder Epimerisierungen
6	Ligasen	Bildung oder Spaltung von kovalenten C-O-, C-S-, C-N- oder C-C-Bindungen gekoppelt an die Spaltung von Triphosphaten

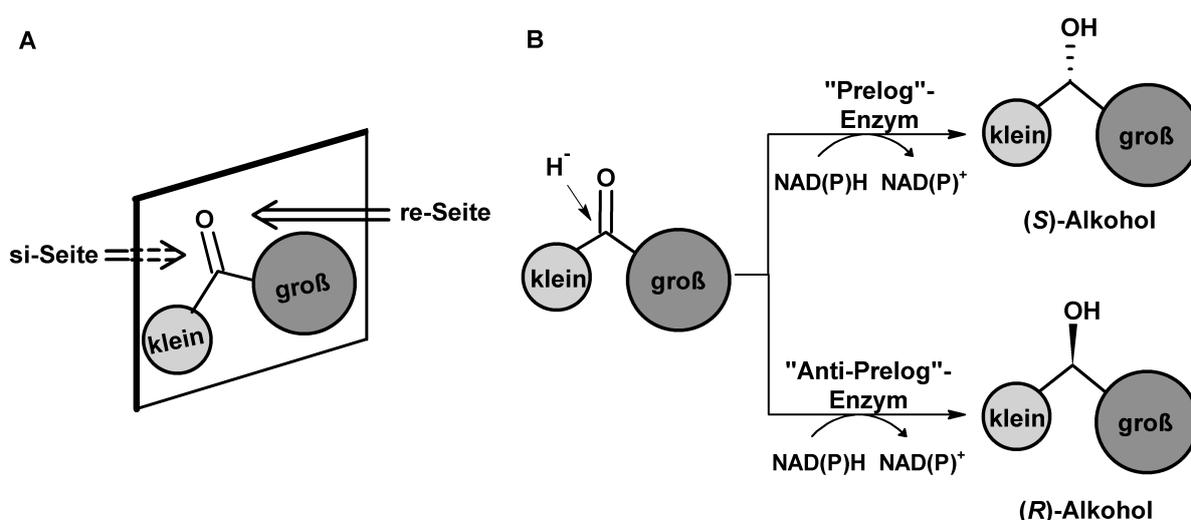
#### 3.1.5 Asymmetrische Synthese chiraler Alkohole

Der Begriff „asymmetrische Synthese“ bezieht sich auf „eine Reaktion oder eine Reaktionsfolge, bei der aus einer achiralen - zumeist prochiralen - Verbindung die enantiomeren Produkte in ungleichen Mengen entstehen“ (Hellwich, 2007). Somit ist das Ergebnis einer asymmetrischen Synthese ein enantiomerenreines oder zumindest enantiomerenangereichertes Produkt (Hellwich, 2007).

Chirale Alkohole stellen wichtige Bausteine für die Synthese bioaktiver Substanzen dar. Hierzu zählen beispielsweise Pharmazeutika, Agrochemikalien sowie Duft- und Aromastoffe (Ohkuma *et al.*, 2000). Da die Herstellung chiraler Alkohole mit den Mitteln der klassischen chemischen Synthese problematisch ist, hat sich der Einsatz von Enzymen für ihre Produktion aus prochiralen Ketonen etabliert (Stewart, 2001). Die Enzyme aus der Klasse der Oxidoreduktasen mit den EC-Nummern 1.1.1.x katalysieren die Reduktion von Carbonylverbindungen unter stöchiometrischem Verbrauch von Cofaktoren (Nakamura *et al.*, 2003a). Diese Transportmetabolite dienen der Übertragung eines Wasserstoffatoms mit Elektronenpaar („Hydridion“) auf das Carbonylkohlenstoffatom.

Der Großteil der Oxidoreduktasen benötigt NADH oder NADPH als Cofaktor, während Flavine, wie z.B. Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavinadenindinukleotid (FAD), sowie Pyrrolochinolinchinon (*pyrroloquinolin quinone*, PQQ) seltener vorkommen (Faber, 2004).

Neben den Unterschieden in der Cofaktor-Präferenz differieren die Enzyme auch in der Stereochemie des Hydridtransfers auf die Carbonylfunktion des Substrates. In den meisten Fällen kann die Stereochemie der Reaktion anhand eines einfachen Modells beschrieben werden, das als „Prelog-Regel“ bekannt und in Abbildung 3.3 dargestellt ist (Prelog, 1964).



**Abbildung 3.3:** Asymmetrische Reduktion von prochiralen Ketonen durch Oxidoreduktasen nach der Prelog-Regel. **A)** Hydrid-Transfer von der *re*- oder der *si*-Seite (nach Nakamura *et al.* (2003a)). **B)** Reduktion mit Enzymen, die der Prelog- oder der Anti-Prelog-Regel folgen (nach Faber (2004)).

Die Prelog-Regel beschreibt den Angriff des Nucleophils in Abhängigkeit von dem sterischen Anspruch der Substituenten an der Carbonylfunktion. Die meisten Enzyme folgen der Prelog-Regel und katalysieren den Hydridtransfer von der *re*-Seite des prochiralen Ketons, wodurch es zur Bildung von (*S*)-Alkoholen kommt, insofern die Cahn-Ingold-Prelog-Nomenklatur nicht durch die Einführung von Substituenten mit höherer Priorität umgedreht wird. Erfolgt der Angriff jedoch von *si*-Seite, so entstehen Produkte mit einer Anti-Prelog-Konfiguration, die wesentlich seltener anzutreffen ist und bei einfachen Substraten dem (*R*)-Alkohol entspricht (Prelog, 1964; Faber, 2004).

Bei der Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *Thermoanaerobacter brockii* wechselt die Stereospezifität des Enzyms, wenn die Substituenten an der Carbonylfunktion eine gewisse Größe überschreiten. Die Kristallstruktur dieses Enzyms zeigt, dass zwei hydrophobe Bindetaschen vorliegen, von denen eine größer ist als die andere (Li *et al.*, 1999). Im Falle von kleinen Substraten wie 2-Butanon passen die Methyl- und Ethyl-Substituenten in der Anti-

Prelog-Orientierung in die Bindetaschen. Bei der Umsetzung von 2-Heptanon hingegen wurde der Ethyl-Substituent durch eine deutlich größere Pentyl-Gruppe ersetzt, die eine Prelog-Orientierung erfordert (Keinan *et al.*, 1986). Für das verwandte Enzym aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* konnte durch eine Vergrößerung der kleineren Bindetasche mittels ortsgerichteter Mutagenese eine Anti-Prelog-Spezifität für sterisch anspruchsvollere Substrate wie beispielsweise Acetophenon erzielt werden (Musa *et al.*, 2009).

Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die Stereospezifität, die Cofaktor-Präferenz sowie die spezifische Enzymaktivität einiger kommerziell erhältlicher Alkoholdehydrogenasen. Die spezifische Enzymaktivität wird üblicherweise in der Einheit Units (U) pro Milligramm Enzym angegeben. Ein Unit ist dabei definiert als diejenige Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute umsetzt. Die eigentliche SI-Einheit der Enzymaktivität, die sich jedoch nicht durchgesetzt hat, ist Katal ( $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol s}^{-1}$ ). Häufig wird auch die Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$  eines Enzyms angegeben, die beschreibt, wie viele Substratmoleküle pro Sekunde von einem aktiven Zentrum umgesetzt werden (Voet *et al.*, 2002).

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die Stereospezifität, Cofaktor-Präferenz und spezifische (spez.) Enzymaktivität verschiedener kommerziell erhältlicher Alkoholdehydrogenasen (Hummel, 1997; Faber, 2004).

Alkoholdehydrogenase (ADH)	Spezifität	Cofaktor	spez. Aktivität
Hefe-ADH	Prelog	NADH	300 U $\text{mg}^{-1}$ <sup>a</sup>
Pferdeleber-ADH	Prelog	NADH	1-2 U $\text{mg}^{-1}$ <sup>a</sup>
<i>Thermoanaerobacter brockii</i> -ADH	Prelog/Anti-Prelog	NADPH	30-90 U $\text{mg}^{-1}$ <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus kefir</i> -ADH	Anti-Prelog	NADPH	760 U $\text{mg}^{-1}$ <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i> -ADH	Anti-Prelog	NADPH	490 U $\text{mg}^{-1}$ <sup>c</sup>

Referenzsubstrate: <sup>a</sup> Ethanol (Oxidation), <sup>b</sup> Isopropanol (Oxidation), <sup>c</sup> Acetophenon (Reduktion)

Eine Betrachtung der spezifischen Enzymaktivitäten in Tabelle 3.3 macht deutlich, dass sie in der Regel im zwei- bis dreistelligen Bereich liegen. Ein wesentlicher Vorteil der Pferdeleber-ADH, die eine relativ geringe Enzymaktivität aufweist, ist ihr breites Substratspektrum, das auch polyzyklische und heterozyklische Ketone umfasst (Cohen *et al.*, 1976; Lam *et al.*, 1988).

Bei der Charakterisierung von Enzymen für die Herstellung chiraler Alkohole ist neben der spezifischen Aktivität und der Stereochemie der katalysierten Reaktion auch der erzielte Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, ee) eine wichtige Größe (Gleichung 3.1).

$$ee = \frac{|n_{(R)} - n_{(S)}|}{n_{(R)} + n_{(S)}} \cdot 100 \% \quad (3.1)$$

$n_{(R)}$  Menge an (*R*)-Enantiomer, mol

$n_{(S)}$  Menge an (*S*)-Enantiomer, mol

Der prozentuale Enantiomerenüberschuss beschreibt das Produktverhältnis der Enantiomere bei einer asymmetrischen Synthese. Wird nur eines der Enantiomere gebildet, liegt der Enantiomerenüberschuss bei 100 %. Entstehen beide Produkte in äquimolaren Mengen, liegt ein Racemat vor und der Enantiomerenüberschuss entspricht 0 %. Aufreinigungsschritte zur Erhöhung des Anteils eines der beiden Enantiomere sind aufgrund der identischen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Moleküle aufwändig. Somit hat der Enantiomerenüberschuss einen maßgeblichen Einfluss auf die Prozesskosten.

Eine weitere wichtige Prozessgröße ist der erzielte Umsatz  $X_E$ , der sich wie folgt berechnen lässt:

$$X_E = \frac{n_{E,0} - n_E}{n_{E,0}} \cdot 100 \% \quad (3.2)$$

$n_{E,0}$  Menge an eingesetztem Edukt, mol

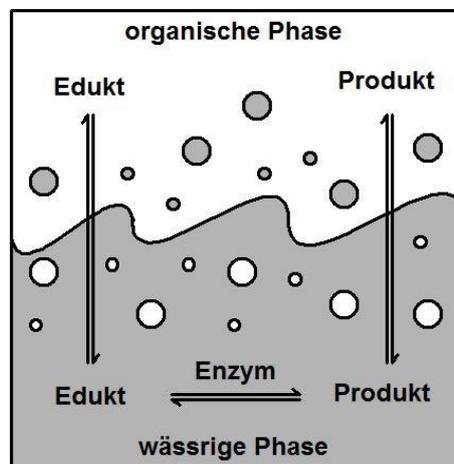
$n_E$  Menge an verbliebenem Edukt, mol

### 3.1.6 Enzymatische Umsetzung schlecht wasserlöslicher oder instabiler Edukte

Ein häufiges Problem bei der Synthese chiraler Alkohole ist die schlechte Wasserlöslichkeit der prochiralen Ketone (León *et al.*, 1998). Aus einer niedrigen Eduktlöslichkeit resultiert eine limitierte Verfügbarkeit des Edukts für den Biokatalysator, was zu einer verminderten Umsetzungsgeschwindigkeit führt. Darüber hinaus sind viele Edukte und Produkte der Biokatalyse instabil in wässrigen Medien. Ein Beispiel hierfür ist der  $\beta$ -Ketoester Ethyl-4-chloracetoacetat, der biokatalytisch zu Ethyl-(*S*)-4-chlor-3-hydroxybutyrat reduziert werden kann (Nakamura *et al.*, 2003a). Da diese Verbindung als Intermediat bei der Synthese des Cholesterin senkenden Medikaments Atorvastatin Anwendung findet (Pereira, 1998), ist die hohe Instabilität von Ethyl-4-chloracetoacetat in wässrigem Milieu auch von industrieller Bedeutung (Shimizu *et al.*, 1990).

Zur Lösung dieser Probleme wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, die vom Einsatz von Löslichkeitsvermittlern wie Cyclodextrinen über verschiedene Formen von Zweiphasensystemen bis hin zur Verwendung überkritischer Fluide reichen (Randolph *et al.*, 1985; Zelin-ski und Kula, 1997; Amidjojo, 2004). Nachfolgend wird detaillierter auf die beiden Methoden näher eingegangen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden: Zweiphasensysteme aus Wasser und organischem Lösemittel beziehungsweise Wasser und ionischer Flüssigkeit.

In einem Zweiphasensystem wird eine nicht mit Wasser mischbare Phase, in der sich eine hohe Eduktkonzentration befindet, mit der wässrigen Phase, die den Biokatalysator enthält, in Kontakt gebracht. Hierbei ist ein ausreichender Stoffübergang an der Phasengrenzfläche wichtig, was beispielsweise durch die Erzeugung einer feindispersen Lösemittelphase infolge eines hohen Leistungseintrags realisiert werden kann. Entsprechend dem Verteilungskoeffizienten stellt sich im Gleichgewicht das Verhältnis zwischen den Konzentrationen in beiden Phasen ein. Die nicht mit Wasser mischbare Phase dient dabei nicht nur als Eduktreservoir, das instabile Substrate vor dem degradierenden Einfluss des wässrigen Milieus schützt, sondern auch als *in situ*-Extraktionsmittel, wodurch beispielsweise eine Produktinhibierung des Enzyms gemildert oder sogar gänzlich vermieden werden kann. Abbildung 3.4 stellt schematisch das Prinzip von Zweiphasensystemen dar.



**Abbildung 3.4:** Prinzip eines Zweiphasensystems dargestellt am Beispiel eines Systems aus Wasser und organischem Lösemittel.

#### Zweiphasensystem aus Wasser und organischer Phase

Ein wichtiges Entscheidungskriterium bei der Wahl des organischen Lösemittels ist die Stabilität des Biokatalysators im resultierenden Zweiphasensystem. Bei der deaktivierenden Wirkung von Lösemitteln auf Enzyme und Zellen wird zwischen molekularer Toxizität und Pha-

sentoxizität unterschieden (Bar, 1986; Vermuë *et al.*, 1993). Die molekulare Toxizität wird durch Moleküle des organischen Lösemittels verursacht, die in der wässrigen Phase gelöst sind. Der negative Effekt auf Enzyme beruht dabei hauptsächlich auf der Interferenz mit der Hydrathülle, von der Proteine umgeben sind (Vermuë *et al.*, 1993). Die Phasentoxizität hingegen wird durch die Interaktion von Proteinen mit der Phasengrenzfläche hervorgerufen, welche die Entfaltung von Proteinen aufgrund ihres amphiphilen Charakters fördert (Andersson und Hahn-Hägerdal, 1990). Während es keine Möglichkeit gibt, den Effekt der molekularen Toxizität zu umgehen, kann das Auftreten der Phasentoxizität beispielsweise durch die Verwendung von Membranreaktoren oder Verkapselung unterbunden werden (Westgate *et al.*, 1998; Wiemann *et al.*, 2009).

Laane *et al.* (1985) setzten sich mit der Frage auseinander, ob es einen Parameter gibt, anhand dessen Vorhersagen über die Eignung verschiedener Lösemittel für die Verwendung in Multiphasensystemen möglich sind. Vorgeschlagen wurde der dekadisch logarithmierte Verteilungskoeffizient zwischen 1-Oktanol und Wasser ( $\log P$ ), der ein Maß für die Polarität eines Lösemittels darstellt. Nach Laane *et al.* (1987) wirken sich Lösemittel mit einem  $\log P$  unter 2 sehr negativ auf Biokatalysatoren aus, während Lösemittel mit einem  $\log P$  zwischen 2 und 4 zu moderaten Enzymaktivitäten führen. Die besten Ergebnisse bei biokatalytischen Umsetzungen in Zweiphasensystemen wurden für Lösemittel mit einem  $\log P$  über 4 vorhergesagt. Diese Korrelation wurde der Tatsache zugeschrieben, dass die Lösemittelkonzentration in der wässrigen Phase mit zunehmender Hydrophobizität der organischen Phase abnimmt (Khmelnitsky *et al.*, 1991).

Da in der Literatur einige Beispiele dokumentiert sind, in der die Anwendung des  $\log P$ -Konzeptes nicht erfolgreich war, wurden alternative Ansätze zur Vorhersage des toxischen Effekts von Lösemitteln auf Enzyme entwickelt (Vermuë und Tramper, 1995). Bei Oxidoreduktasen existiert die Annahme, dass die Funktionalität des Lösemittels einen größeren Einfluss besitzt als dessen Polarität (Filho *et al.*, 2003).

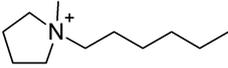
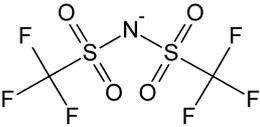
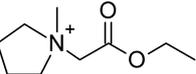
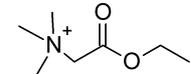
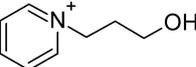
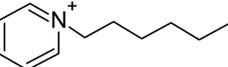
#### Zweiphasensystem aus Wasser und ionischer Flüssigkeit

Nicht mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten stellen eine interessante Alternative zu den klassischen organischen Lösemitteln dar und besitzen erhebliches Potential für technische Anwendungen (Cull *et al.*, 2000; Rogers und Seddon, 2003; Pfruender *et al.*, 2004; Bräutigam *et al.*, 2007). Der Begriff ionische Flüssigkeit bezeichnet synthetisch hergestellte Salze mit einem Schmelzpunkt unter 100 °C. Für biokatalytische Prozesse sind jedoch nur solche ionischen Flüssigkeiten relevant, die bei Raumtemperatur im flüssigen Aggregatzustand

vorliegen. Ionische Flüssigkeiten besitzen einen sehr geringen Dampfdruck, sind schwer entzündlich und haben gute Lösemittleigenschaften (Wasserscheid und Welton, 2003). Sie setzen sich aus organischen Kationen und meist anorganischen Anionen zusammen. Durch Variation der kationischen Grundstrukturen, der Alkyl-Reste der Kationen sowie der verwendeten Anionen ergibt sich eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten. Da die physikalischen Eigenschaften der ionischen Flüssigkeiten durch strukturelle Modifikationen beinahe beliebig verändert werden können, werden sie auch als Designer-Lösemittel bezeichnet (Earle und Seddon, 2000; Rogers und Seddon, 2003).

Das Konzentrationsverhältnis eines Stoffes zwischen ionischer Flüssigkeit und wässriger Phase im Gleichgewicht wird durch den für ein gegebenes Stoffsystem charakteristischen Verteilungskoeffizient  $D$  beschrieben. Im Folgenden wird der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten  $\log D$  verwendet.

In Abbildung 3.5 sind die Strukturen der Ionen dargestellt, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Da sich Bis(trisfluormethansulfon)imid-Anionen als vorteilhaft in biokatalytischen Anwendungen erwiesen haben (Bräutigam, 2008), wurde nur das Kation der ionischen Flüssigkeiten variiert.

<u>Kationen</u>			<u>Anion</u>
	1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium	[HMPL] <sup>+</sup>	 Bis(trifluormethansulfon)imid [NTF] <sup>-</sup>
	1-(Ethoxycarbonyl)methyl-1-methylpyrrolidinium	[(EO2E)MPL] <sup>+</sup>	
	Ethyl-dimethyl-(ethoxycarbonyl)methyl-ammonium	[NEMM(EO2E)] <sup>+</sup>	
	N-(3-Hydroxypropyl)pyridinium	[(P3OH)PYR] <sup>+</sup>	
	N-Hexylpyridinium	[HPYR] <sup>+</sup>	

**Abbildung 3.5:** Strukturen der Kationen und des Bis(trisfluormethansulfon)imid-Anions der in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten.

### 3.1.7 Verwendung isolierter Enzyme oder ganzer Zellen

Die Entscheidung über den Einsatz von isolierten Enzymen oder ganzen Zellen in einem Prozess wird maßgeblich von den erforderlichen Reaktionsbedingungen und dem herzustellenden Produkt bestimmt (Jeromin und Bertau, 2005). Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Entscheidungsfindung besitzen.

**Tabelle 3.4:** Vor- und Nachteile der Verwendung von isolierten Enzymen und ganzen Zellen zur Produktion chiraler Alkohole (Jeromin und Bertau, 2005; Peters, 1998)

Kriterium	Ganze Zellen	Isolierte Enzyme
Verfügbarkeit	gut	häufig eingeschränkt
Katalysatorpreis	gering	mittel bis hoch (Reinigung)
Reaktionsbedingungen	mild	mild
Konkurrierende Enzyme	ja	nein
Stereoselektivität	mittel bis hoch	hoch
Nebenproduktbildung	häufig	weniger oder keine
Reproduzierbarkeit	variabel	hoch
Stofftransport	limitiert durch Zellmembran	keine Limitation
Cofaktorregenerierung	zellintern	erforderlich
Kompatibilität mit organischen Lösemitteln	eventuell cytotoxisch	eventuell denaturierend
Raum-Zeit-Ausbeute	gering bis hoch	mittel bis hoch
Aufarbeitung	erhöhter Aufwand	einfach

Die bedeutendsten Vorteile der Ganzzellbiokatalyse gegenüber dem Einsatz isolierter Enzyme liegen in der einfachen Katalysatorherstellung ohne die Notwendigkeit einer kostenintensiven Aufreinigung und in der Nutzung der intrazellulären Cofaktorregenerierung.

Wesentliche Vorteile von isolierten Enzymen hingegen sind die hohe Selektivität sowie die einfache Kontrollierbarkeit der katalysierten Reaktion. Nebenreaktionen, die durch eines oder mehrere der zahlreichen Enzyme in der ganzen Zelle vermittelt werden können, werden hierdurch vermieden. Isolierte Enzyme unterliegen zudem keiner Stofftransportlimitation durch die Zellmembran. Die Aufarbeitung ist in der Regel beim Einsatz isolierter Enzyme einfacher als bei Umsetzungen mit ganzen Zellen, bei denen eine Vielzahl der im Reaktionsansatz vorhandenen Komponenten mit der Reinigungsstrategie interferieren können.

## 3.2 Cyanobakterien

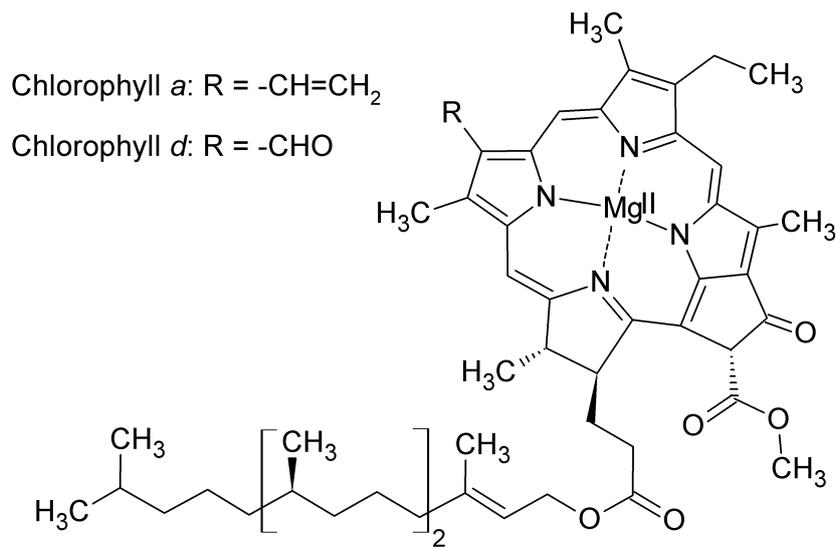
Cyanobakterien repräsentieren eine der größten Gruppierungen der gramnegativen Bakterien (Rippka *et al.*, 1979). Sie sind ubiquitär in terrestrischen, marinen, Brack- und Süßwasser-Habitaten zu finden (Cox *et al.*, 2005) und werden auch als Cyanophyceen oder Blaualgen bezeichnet (Nultsch, 1996).

### 3.2.1 Merkmale von Cyanobakterien

Cyanobakterien sind Prokaryonten, die oxygene Photosynthese betreiben, das heißt, sie nutzen Wasser als Elektronendonator und setzen Sauerstoff in Gegenwart von Licht frei (Nultsch, 1996). Sie leisten einen großen Beitrag zur photosynthetisch aktiven Biomasse in den Ozeanen und gelten aufgrund ihrer Fähigkeit Kohlendioxid über den Calvin-Zyklus zu fixieren als wichtige Primärproduzenten von Biomasse (Waterbury *et al.*, 1979).

Die Energiegewinnung der meisten Cyanobakterien erfolgt photoautotroph. Hierfür wird ein Photosyntheseapparat genutzt, der demjenigen der Pflanzen ähnelt und auf den beiden Photosystemen PS I und PS II basiert. Dadurch grenzen sich Cyanobakterien von den Anoxyphotobakterien ab, zu denen die roten und grünen Schwefelbakterien zählen. Anoxyphotobakterien können aufgrund eines fehlenden Photosystems II Wasser nicht als Elektronendonator verwenden und produzieren als Konsequenz keinen Sauerstoff (Fischer, 1989).

Während der Photosynthese nutzen phototrophe Organismen Energie im Bereich des elektromagnetischen Spektrums von 400 bis 700 nm. Die Strahlung in diesem Bereich wird als „photosynthetisch aktive Strahlung“ (*Photosynthetically Active Radiation*, PAR) bezeichnet. In Analogie zu den Pflanzen besitzen Cyanobakterien Chlorophyll *a* als photosynthetisches Hauptpigment, das ein Absorptionsmaximum bei 680 nm hat (Waterbury, 2006). Carotinoide und Phycobiliproteine dienen bei der cyanobakteriellen Photosynthese als akzessorische Pigmente. Eine Ausnahme stellt das im Jahre 1996 entdeckte Cyanobakterium *Acaryochloris marina* dar. Es ist der einzige charakterisierte phototrophe Organismus mit Chlorophyll *d* als primärem photosynthetischen Pigment (Miyashita *et al.*, 2003). Durch den Gebrauch von Chlorophyll *d*, das intrazellulär ein Absorptionsmaximum von 715 nm aufweist, erhält die Absorption der Zellen eine Rotverschiebung. Dies erlaubt *Acaryochloris marina* elektromagnetische Strahlung bis 740 nm zu nutzen (Miyashita *et al.*, 1997). Abbildung 3.6 zeigt den strukturellen Unterschied zwischen den beiden Chlorophyll-Spezies.



**Abbildung 3.6:** Struktureller Unterschied zwischen Chlorophyll *a* und *d*.

Die Photosynthese ist in den Thylakoidmembranen der Cyanobakterien lokalisiert. Eine Ausnahme bildet hierbei das Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus*. Dieser Stamm hat sich früh in der Evolution von den anderen Cyanobakterien abgespalten (Nelissen *et al.*, 1995). Es ist das einzige Cyanobakterium, das keine Thylakoide besitzt, sondern den gesamten Photosyntheseapparat in die Plasmamembran eingelagert hat (Rippka *et al.*, 1979).

Die Anforderungen an die Lichtintensität sind bei verschiedenen Cyanobakterien sehr unterschiedlich. Während manche Arten schwach beleuchtete Höhlen besiedeln, bilden andere mikrobielle Matten, die dem vollen Sonnenlicht ausgesetzt sind (Waterbury, 2006). Darüber hinaus besitzen Cyanobakterien die Fähigkeit, sich innerhalb bestimmter Grenzen an gegebene Lichtverhältnisse anzupassen. Dieser als Photoadaptation bezeichnete Prozess wird unter anderem über die Regulierung der Konzentration an Photosynthesepigmenten gesteuert (Rubio *et al.*, 2003). Jeder phototrophe Organismus besitzt jedoch eine spezifische Lichtintensitätsgrenze, bei deren Überschreitung es zu einer Schädigung des Photosyntheseapparates kommt (Barber und Andersson, 1992). Um eine mögliche Lichtlimitierung oder -inhibierung zu vermeiden, sollte eine Cyanobakterienkultur idealerweise mit einer Lichtintensität bestrahlt werden, die ihre spezifische Sättigungsgrenze weder über- noch unterschreitet (Pulz, 2001).

Auch wenn die meisten Cyanobakterien obligat photoautotroph sind, gibt es einige Arten, die auch zu heterotrophen Wachstum fähig sind. Nur bei wenigen Stämmen wurde eine chemoheterotrophe Nutzung von organischen Verbindungen als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle im Dunkeln beobachtet. Weiter verbreitet ist photoheterotrophes Wachstum, das die Nutzung einfacher organischer Verbindungen als Kohlenstoffquellen bei einer gleich-

zeitigen Energiegewinnung durch Photosynthese beschreibt (Rippka *et al.*, 1979). Es gibt auch Berichte über mixotrophe Ernährungsweisen bei Cyanobakterien. Unter Mixotrophie versteht man die Aufnahme von organischen Verbindungen, wie beispielsweise Aminosäuren, die nicht als alleinige Kohlenstoffquellen dienen können und demnach zusätzlich eine autotrophe CO<sub>2</sub>-Fixierung erfordern (Waterbury, 2006).

Cyanobakterien besitzen eine hohe Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen. Die Befähigung vieler Stämme zur Fixierung elementaren Stickstoffs ermöglicht ihnen beispielsweise die Besiedelung von Habitaten mit einem niedrigen Gehalt an Stickstoffverbindungen. Das Enzymsystem, das in der Lage ist, elementaren Stickstoff zu reduzieren und damit bioverfügbar zu machen, wird als Nitrogenase bezeichnet. Die Nitrogenase wird in Anwesenheit von Sauerstoff inaktiviert. Dies ist bei Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben, problematisch und führte zur Entwicklung verschiedener Lösungsstrategien. In einigen filamentösen Cyanobakterien kommt es durch die Ausbildung spezialisierter stickstofffixierender Zellen, den sogenannten Heterocysten, zu einer räumlichen Trennung von den photosynthetischen Reaktionen, die Sauerstoff produzieren. Einzellige stickstofffixierende Cyanobakterien sowie andere filamentöse Arten trennen diese Prozesse nicht räumlich, sondern zeitlich. Die Assimilation des Stickstoffs erfolgt hierbei nur nachts unter Verbrauch von Glykogen, das tagsüber über oxygene Photosynthese aufgebaut wird (Waterbury, 2006).

In den von Cyanobakterien bewohnten Habitaten herrschen sehr unterschiedliche Temperaturbedingungen. Während die meisten Cyanobakterien mesophil sind und Wachstumsoptima zwischen 20 und 30 °C besitzen, gibt es auch psychrophile Stämme, die Seen in der Antarktis bewohnen und nur Temperaturen bis 20 °C tolerieren (Waterbury, 2006; Seaburg *et al.*, 1981). Andererseits existieren auch thermophile Stämme in heißen Quellen mit Wachstumsoptima oberhalb von 45 °C (Waterbury, 2006; Yamaoka *et al.*, 1978).

#### 3.2.2 Taxonomie

Aufgrund der Tatsache, dass Cyanobakterien früher fälschlicherweise den Algen zugeordnet wurden, fand der „Internationale Code der Botanischen Nomenklatur“ Anwendung, der Einteilungen auf der Basis morphologischer, entwicklungsbiologischer sowie ökologischer Gesichtspunkte vornahm. Problematisch war dieses Vorgehen vor allem hinsichtlich der morphologischen Variabilität, die Cyanobakterien unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen zeigen (Waterbury, 2006). Neuere Klassifizierungen von Cyanobakterien unter der Aegis des „Internationalen Codes der Nomenklatur der Bakterien“ stützen sich daher neben phänotypischen auch auf genotypische Eigenschaften wie beispielsweise die Sequenz der 16S ribosomalen Ribonukleinsäuren (16S-rRNA) (Nelissen *et al.*, 1996; Steindler *et al.*, 2005).

Heutzutage existieren verschiedene Ansätze zur Klärung der taxonomischen Zugehörigkeit von Cyanobakterien nebeneinander. Die Grundlage von vielen modernen taxonomischen Einteilungen bildet die Arbeit von Rippka *et al.* (1979). Hierbei wurde eine Untergliederung der Cyanobakterien in die fünf Ordnungen *Chroococcales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales* und *Stigonematales* vorgenommen.

Die aktuellste Taxonomie, der auch im Verlauf dieser Arbeit gefolgt wurde, stammt vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sie ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

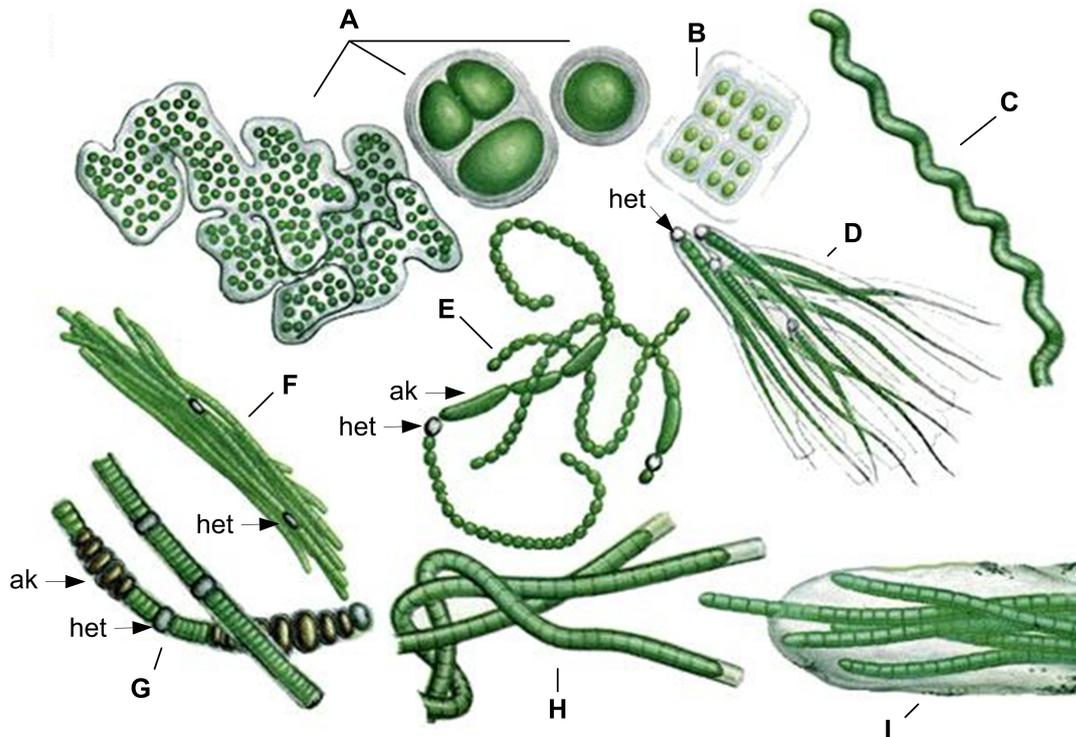
**Tabelle 3.5:** Taxonomie der Cyanobakterien (NCBI, 2009)

Ordnung	Gattungen	Beispiele
<i>Chroococcales</i>	27	<i>Cyanothece</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i>
<i>Gloeobacterales</i>	1	<i>Gloeobacter</i>
<i>Nostocales</i>	25	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Nostoc</i>
<i>Oscillatoriales</i>	27	<i>Arthrospira</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Oscillatoria</i>
<i>Pleurocapsales</i>	7	<i>Dermocarpa</i> , <i>Pleurocapsa</i>
<i>Prochlorales</i>	3	<i>Prochloron</i> , <i>Prochlorococcus</i> , <i>Prochlorotrix</i>
<i>Stigonematales</i>	12	<i>Fischerella</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Stigonema</i>
uneingeordnet	-	<i>Acaryochloris</i>

In der NCBI-Taxonomie wurde die von Rippka *et al.* (1979) eingeführte Einteilung um die Ordnungen *Prochlorales* und *Gloeobacterales* erweitert. Die *Prochlorales* wurden früher nicht zu den Cyanobakterien gezählt, da sie unterschiedliche photosynthetische Pigmente nutzen. Während die Phycobiliproteine bei diesen Bakterien fehlen, besitzen sie zusätzlich Chlorophyll *b* (Chisholm *et al.*, 1992). Analysen der 16S-rRNA ergaben jedoch, dass die *Prochlorales* zu den Cyanobakterien gehören (Litvaitis, 2002). Ferner wurde aufgrund der außergewöhnlichen Eigenschaften von *Gloeobacter* eine zusätzliche Ordnung geschaffen. Neben der Abwesenheit von Thylakoiden ist auch die violette Pigmentierung von *Gloeobacter violaceus*-Zellen, die diesem Cyanobakterium seinen Namen verliehen hat, ungewöhnlich (Rippka *et al.*, 1979; Bryant *et al.*, 1981). *Gloeobacter* besitzt ein deutlich niedrigeres Verhältnis von Chlorophyll *a* zu Phycobiliproteinen als andere Cyanobakterien (Nakamura *et al.*, 2003b). Aus ähnlichen Überlegungen heraus wird aktuell diskutiert für *Acaryochloris* eine neue Ordnung einzurichten, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass es der einzige bekannte Organismus mit Chlorophyll *d* als primärem Photosynthesepigment ist (Miyashita *et al.*, 2003).

### 3.2.3 Morphologie und Wachstum

Morphologisch betrachtet sind die Cyanobakterien eine der vielseitigsten Gruppierungen im Reich der Prokaryonten (Waterbury, 2006). Abbildung 3.7 stellt beispielhaft Morphologien verschiedener Cyanobakterien dar.

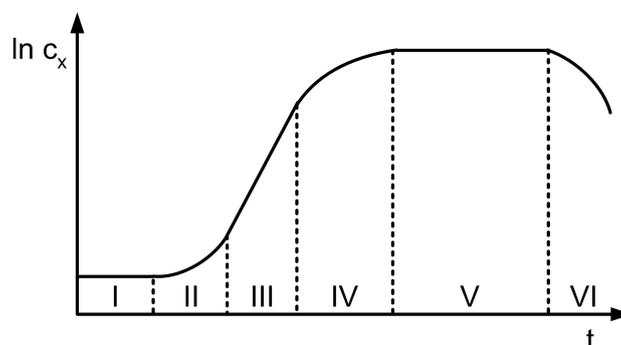


**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung möglicher Morphologien von Cyanobakterien. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgetreu. **A)** Verschiedene Morphologien innerhalb der Ordnung *Chroococcales*. **B)** Plattenähnliche Kolonie von *Merismopedia*. **C)** Wendelförmiges Filament von *Arthrospira*. **D)** *Chalotrix*-Kolonie mit Heterocysten (het) an der Filamentbasis. **E)** *Anabaena* mit ausgebildeten Heterocysten (het) und Akineten (ak). **F)** Büschelartige Zusammenlagerung von *Aphanizomenon*-Filamenten. **G)** *Nodularia*-Filament mit Heterocysten (het) und Akineten (ak). **H)** *Lyngbya*-Trichom mit umgebender Scheide. **I)** Schleimscheide mit vielen *Microcoleus*-Filamenten. (modifizierte Abbildung nach Smith (2009)).

Bei einzelligen Cyanobakterien, die als Stäbchen oder Kokken vorliegen und sich durch binäre Zellteilung vermehren, kommt es häufig zur Bildung von Kolonien oder tafelförmigen Platten, die zum Teil mit bloßem Auge sichtbar sind (Fuchs und Schlegel, 2006; Waterbury, 2006). Zusammengehalten werden sie durch Kapseln oder Schleimsubstanzen, die allgemein als „Gallerte“ bezeichnet werden (Fuchs und Schlegel, 2006). Abbildungen 3.7 A und B zeigen Beispiele für mögliche Kolonieförmigkeiten.

Neben einzelligen Spezies gibt es auch filamentöse Cyanobakterien (Abbildungen 3.7 C - I). Cyanobakterielle Filamente werden auch als Trichome bezeichnet und können durch Differenzierung verschiedene spezialisierte Zelltypen ausbilden. Hierzu zählen die zur Stickstofffixierung fähigen Heterocysten, die entweder innerhalb eines Filaments oder terminal angeordnet sein können (Rippka *et al.*, 1979). Darüber hinaus bilden einige Arten sogenannte Akineten aus. Diese dickwandigen, nährstoffreichen Zellen fungieren als Überdauerungsstadien bei Trockenheit, Kälte oder Nährstoffmangel (Rippka *et al.*, 1979; Waterbury, 2006). Abbildungen 3.7 E und G zeigen Cyanobakterien der Gattungen *Anabaena* und *Nodularia*, bei denen sowohl Heterocysten als auch Akineten ausgebildet sind. Hauptunterscheidungsmerkmal dieser Gattungen ist die scheibenartige Form der vegetativen Zellen von *Nodularia*-Spezies (Rippka *et al.*, 1979). Filamentöse Cyanobakterien können auch von Scheiden umgeben sein, wie Abbildungen 3.7 H und I zeigen. Während *Lyngbya*-Arten eine feste, ausdauernde Scheide um ihr Trichom bilden, zeichnen sich Cyanobakterien der Gattung *Microcoleus* durch ihre viele Filamente enthaltenden Schleimscheiden aus (Rippka *et al.*, 1979).

Cyanobakterien vermehren sich durch binäre oder multiple Zellteilung, Sprossung, Fragmentierung der Trichome oder Ausbildung von Hormogonien. Als Hormogonien werden differenzierte, kleinzellige Filamente bezeichnet, die manche Cyanobakterien - vor allem der Ordnungen *Nostocales* und *Stigonematales* - unter Stressbedingungen abschnüren. Cyanobakterien der Ordnung *Stigonematales* sind unter Umständen auch zur Ausbildung echter Verzweigungen fähig (Rippka *et al.*, 1979; Waterbury, 2006). Die Wachstumskurve von Cyanobakterien, die in einer Umgebung mit einem begrenzten Nährstoffangebot wachsen, wobei keine sonstigen Limitierungen oder Inhibierungen vorliegen, gleicht derjenigen nicht-phototropher Mikroorganismen im Satzverfahren, die in Abbildung 3.8 dargestellt ist.



**Abbildung 3.8:** Idealisierte Wachstumskurve einer Bakterienkultur im Satzverfahren. I: Anpassungsphase, II: Übergangsphase I, III: exponentielle Phase, IV: Übergangsphase II, V: stationäre Phase, VI: Absterbephase.

Nach einer Anpassungsphase, in der sich die Zellen an die Kultivierungsbedingungen adaptieren, folgt die Übergangsphase I, in der erste Zellteilungen stattfinden. In der anschließenden exponentiellen Phase wachsen die Zellen mit einer konstanten Wachstumsrate  $\mu_{max}$ . Die spezifische Wachstumsrate ist wie folgt definiert:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (3.3)$$

- $\mu$  Wachstumsrate,  $h^{-1}$
- $c_x$  Konzentration der Biotrockenmasse,  $g_{BTM} L^{-1}$
- $t$  Zeit, h

In der darauffolgenden Übergangsphase II, die auch als Substratlimitierungsphase bezeichnet wird, liegen ein oder mehrere Substrate in limitierender Konzentration vor. Mit einem von Monod (1942) entwickelten Modell kann die Wachstumsrate  $\mu$  in der exponentiellen Phase und der Übergangsphase II als Funktion der Konzentration des limitierenden Substrats S beschrieben werden (Gleichung 3.4). Dieser vereinfachende formalkinetische Ansatz setzt voraus, dass die Wachstumsrate ausschließlich von einer limitierenden Substratkonzentration abhängt und alle anderen Prozessvariablen - wie Temperatur, Druck, pH und andere Substrate - als konstant betrachtet werden können.

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad (3.4)$$

- $\mu_{max}$  Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen,  $h^{-1}$
- $c_S$  Konzentration des limitierenden Substrates,  $mol L^{-1}$
- $K_S$  Sättigungskonstante,  $mol L^{-1}$

In cyanobakteriellen Kulturen ist die exponentielle Phase in der Regel vergleichsweise kurz, da mit einer ansteigenden Dichte der Bakteriensuspension die Lichtausbeute pro Zelle aufgrund einer zunehmenden gegenseitigen Verschattung stetig abnimmt. Der Lichteintrag, der meist als Photonenflussdichte mit der Einheit  $\mu E m^{-2} s^{-1}$  gemessen wird, ist somit das limitierende Substrat in Kulturen phototropher Organismen. Die Einheit Einstein (E) ist definiert als ein Mol Photonen, wobei die jeweilige Wellenlänge unbetrachtet bleibt. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Effektes der Photoinhibierung bei hohen Lichtintensitäten gestaltet sich das empirische Wachstumsmodell für Cyanobakterien wie in Gleichung 3.5 dargestellt (Aiba, 1982).

$$\mu = \mu_{max} \frac{I}{K_S + I + \frac{I^2}{K_I}} \quad (3.5)$$

- $I$  Lichtintensität,  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $K_S$  Sättigungskonstante,  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $K_I$  Inhibitionskonstante,  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

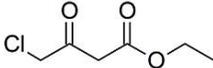
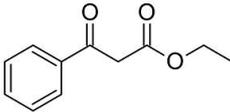
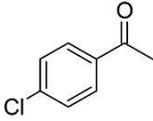
Da die Lichtintensität innerhalb eines Photobioreaktors aufgrund von Absorptions- und Abschattungseffekten der Zellsuspension nicht homogen verteilt ist, wird häufig eine integrale Lichtintensität ( $I^*$ ) für die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate herangezogen (Molina Grima *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2003). Ein alternativer Ansatz basiert auf der Verwendung einer integralen Wachstumsrate. Hierbei wird angenommen, dass die Wachstumsraten einzelner Zellen zwar von der lokalen Lichtintensität abhängen, die Kultur als Ganzes betrachtet jedoch eine Wachstumsrate zeigt, die dem Mittel der individuellen Raten entspricht (Cornet *et al.*, 1995; Tredici, 1999; Franco-Lara *et al.*, 2006).

### 3.2.4 Industrieller Einsatz von Cyanobakterien

Die biotechnologische Nutzung von phototrophen Mikroorganismen hat in den letzten Jahren stark zugenommen (Pulz und Gross, 2004). Hierbei richtete sich das Augenmerk häufig auf die bioaktiven Sekundärmetabolite von Cyanobakterien. Die Palette an Naturstoffen, die durch eine industrielle Massenproduktion von Cyanobakterien zugänglich ist, reicht von Polysacchariden, Carotinoiden und Antioxidantien bis hin zu antibakteriellen, antiviralen und pharmazeutisch aktiven Substanzen (Pulz und Gross, 2004; Cohen und Gurevitz, 2006). Weitere Forschungsprojekte untersuchen die cyanobakterielle Produktion von molekularem Wasserstoff als Energieträger (Kentemich *et al.*, 1990) sowie Anwendungen im Bereich der „grauen“ Umweltbiotechnologie. Beispiele hierfür sind die Bioremediation von Schadstoffen und die Fixierung von Kohlendioxid in Industrieabgasen (Barton *et al.*, 2004; Pulz und Gross, 2004).

Auch auf dem Gebiet der weißen Biotechnologie haben Cyanobakterien ein gesteigertes Maß an Aufmerksamkeit erfahren, da die zellinterne Cofaktorregenerierung über Photosynthese einen eleganten Ansatz für Ganzzellbiotransformationen darstellt (Nakamura *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2004; Havel und Weuster-Botz, 2006). Vor allem bei der Produktion chiraler Alkohole aus prochiralen Ketonen wurden in Biotransformationen mit Cyanobakterien sehr hohe Enantiomerenüberschüsse erzielt, wie Tabelle 3.6 zeigt.

**Tabelle 3.6:** Enantiomerenüberschüsse (ee) bei der Reduktion prochiraler Ketone in Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien (Havel und Weuster-Botz, 2006)

Prochirales Keton	Organismus	Bedingung	ee, %
	Ethyl-4-chlor- acetoacetat	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Licht 96,8 (S) Dunkel 96,2 (S)
		Ethylbenzoyl- acetat	<i>Anabaena</i> <i>variabilis</i>
		4'-Chloraceto- phenon	<i>Nostoc</i> <i>muscorum</i>
		2',3',4',5',6'- Pentafluor- acetophenon	<i>Anabaena</i> <i>variabilis</i>

Alle untersuchten prochiralen Ketone konnten in Biotransformationen mit unterschiedlichen Cyanobakterienstämmen mit hohen Enantiomerenüberschüssen zu den korrespondierenden (S)-Alkoholen reduziert werden. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Umsetzung von 2',3',4',5',6'-Pentafluoroacetophenon mit einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von  $\geq 99,8\%$ . Dieses Ergebnis ist insofern außergewöhnlich, da gängige Enzyme, die asymmetrische Synthesen oder enantioselektive Hydrolysen katalysieren - wie Dehydrogenasen aus *Thermoanaerobacter*- und *Lactobacillus*-Spezies und Lipasen aus *Pseudomonas*-Stämmen, häufig geringere Enantiomerenüberschüsse mit fluorierten Verbindungen erzielen (Havel und Weuster-Botz, 2006; Sakai *et al.*, 1998).

Großtechnische Anwendungen von Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien sind jedoch momentan und in absehbarer Zukunft nicht durchführbar, da enorme Photobioreaktoren benötigt würden, die in industriellen Prozessen nicht üblich sind. Obwohl die Produktion chiraler Alkohole mit Cyanobakterien auch im Dunkeln und somit völlig entkoppelt von der Photosynthese ablaufen kann, ist für die Generierung der Biomasse Licht erforderlich (Havel und Weuster-Botz, 2007).

Ein weiteres Problem bei der industriellen Nutzung von Cyanobakterien ist die geringe Zelldichte, die in Photobioreaktoren erreicht wird. Limitierend ist hierbei vor allem der Lichteintrag in dichte Kulturen. Bei der Verwendung von Reaktortypen, die ein günstiges Oberflächen- zu

Volumenverhältnis besitzen, wie Platten- oder Rohrreaktoren, liegen typische Biomassekonzentrationen zwischen 2-8 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (Pulz, 2001). Verglichen mit Hochzelldichte-Kultivierungen von *Escherichia coli*, bei denen Biomassekonzentrationen über 100 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> erzielt werden, sind diese Werte dennoch sehr gering (Riesenberg und Guthke, 1999).

Aus diesen Gründen stellen Oxidoreduktasen aus Cyanobakterien interessante Enzyme für die heterologe Expression in einem industriellen Plattformorganismus wie *Escherichia coli* dar.

### 3.3 Die 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase

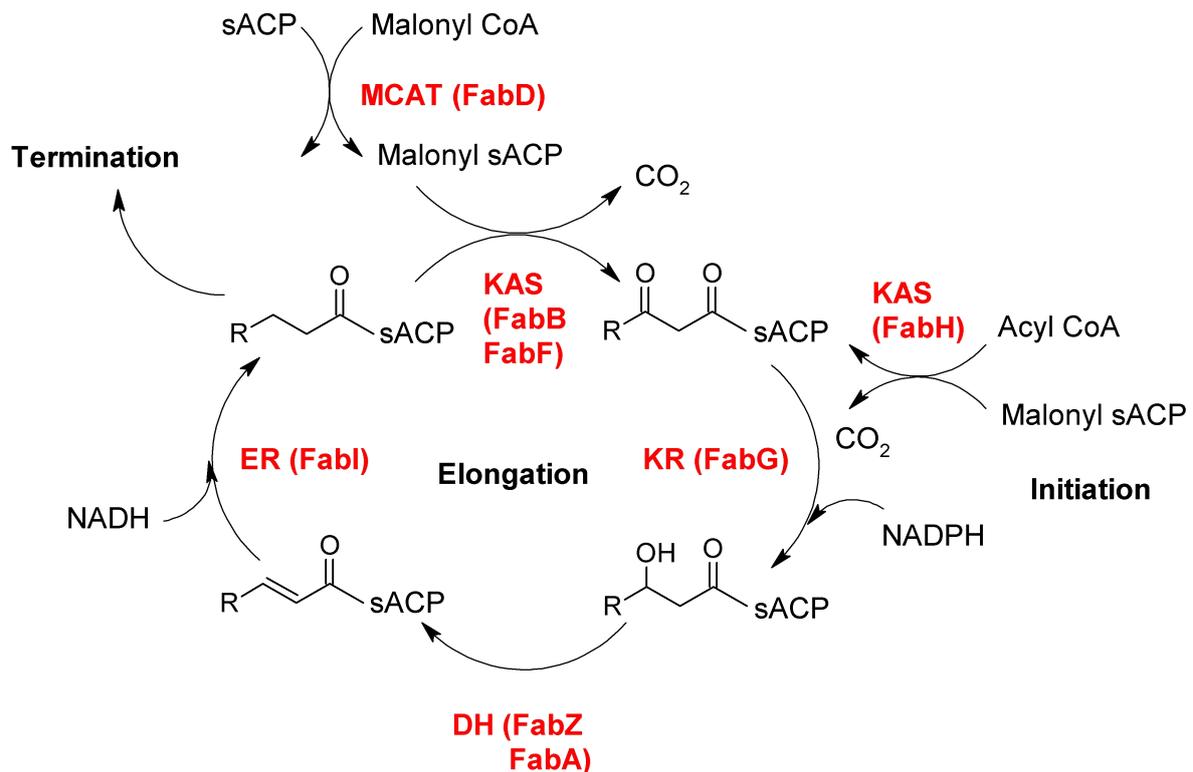
Die von Havel (2006) identifizierte Oxidoreduktase, die in Zellen von *Synechococcus* PCC 7942 für die asymmetrische Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zum korrespondierenden (S)-Alkohol verantwortlich ist, trägt die EC-Nummer 1.1.1.100 und wird als 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (KR) bezeichnet.

#### 3.3.1 Natürliche Funktion

Die natürliche Funktion der KR liegt in der bakteriellen Fettsäuresynthese. Bei Tieren, Pilzen und einigen Mycobakterien sind die verschiedenen enzymatischen Funktionen der Fettsäuresynthese in einem oder zwei Multidomänenproteinen integriert, die als Typ-I-Fettsäuresynthase (FAS I) bezeichnet werden (Leibundgut *et al.*, 2008). Bei Pflanzen und den meisten Bakterien, darunter auch bei den Cyanobakterien, wird der Fettsäureelongationszyklus durch eine Reihe von einzelnen Enzymen katalysiert, die in ihrer Gesamtheit unter dem Begriff Typ-II-Fettsäuresynthase (FAS II) zusammengefasst werden (Rock und Cronan, 1996; Rawsthorne, 2002).

Die genetische Information für die KR liegt in vielen Bakterien, wie in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, in einem Bereich, in dem die Gene für mehrere an der Fettsäurebiosynthese beteiligte Enzyme in räumlicher Nähe zusammengefasst sind (Rawlings und Cronan, 1992; Morbidoni *et al.*, 1996). Dieser Bereich wird auch als *fatty acid biosynthesis (fab)*-Cluster und das darin lokalisierte Gen für die KR als *fabG* bezeichnet (Rawlings und Cronan, 1992).

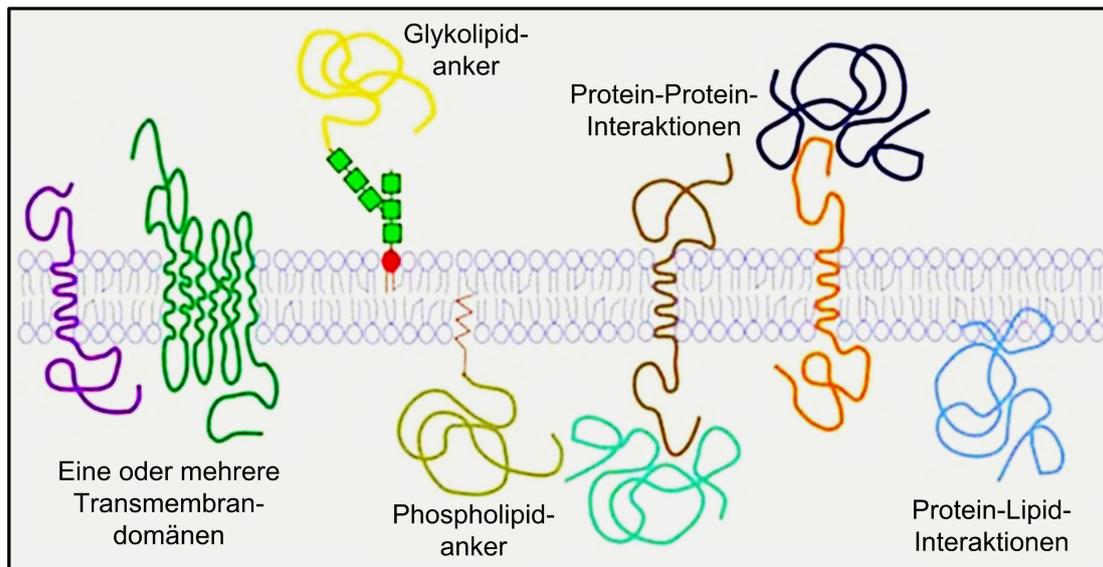
Abbildung 3.9 gibt eine Übersicht über die Reaktionen der bakteriellen Fettsäuresynthese. Jedes Enzym im Elongationszyklus interagiert mit dem Acyl-Carrier-Protein (ACP). Dadurch werden die Reaktionsintermediate, die an die prosthetische Gruppe Phosphopantethein gebunden sind, von einem aktiven Zentrum zum nächsten transportiert. ACP ist jedoch nicht essentiell für die enzymatische Aktivität der KR (Zhang *et al.*, 2003). Die Malonsäure, die zur Kettenverlängerung benötigt wird, ist bei ihrem Eintritt in den Elongationszyklus an Coenzym A (CoA) gebunden, das aktivierend auf Fettsäuren wirkt. Im Einzelnen werden in jedem Zyklus folgende Reaktionsschritte durchlaufen: Nach der Übertragung von Malonsäure auf die Malonyl-CoA-ACP-Transacylase (MCAT) katalysiert die 3-Ketoacyl-ACP-Synthase (KAS) die Kondensation mit einem dort angelagerten Acyl-Rest. Die Reduktion des gebildeten  $\beta$ -Ketoesters zum (*R*)-3-Hydroxyacyl-ACP erfolgt durch die KR unter NADPH-Verbrauch. Hieran schließt sich die Dehydratisierung durch die 3-Hydroxyacyl-ACP-Reduktase (DH) und die Reduktion der 2,3-ungesättigten zur gesättigten Fettsäure mit Hilfe der Enoyl-ACP-Reduktase (ER) an (Wright, 2004; Ren *et al.*, 2000).



**Abbildung 3.9:** Bakterielle Fettsäuresynthese. Das Acyl-Carrier-Protein (ACP) reicht das Substrat, das als aktiviertes Malonyl-Coenzym A (CoA) in die Synthese eingeführt wird, von Enzym zu Enzym weiter. Folgende Enzyme sind involviert: MCAT (FabD) - Malonyl-CoA-ACP-Transacylase; KAS (FabH, FabB, FabF) - 3-Ketoacyl-ACP-Synthase; KR (FabG) - 3-Ketoacyl-ACP-Reduktase; DH (FabA) - 3-Hydroxyacyl-ACP-Reduktase; ER (FabI) - Enoyl-ACP-Reduktase (nach Wright (2004)).

Die genaue Organisation der FAS II in Pflanzen, die in den Chloroplasten lokalisiert ist (Harwood, 1996), und in Cyanobakterien ist noch ungeklärt (Brown *et al.*, 2006). Es gibt jedoch biochemische Anzeichen für die Bildung von Enzymkomplexen, an denen zumindest einige Proteine der FAS II beteiligt sind, sowie für eine Assoziation mit der Thylakoidmembran (Roughan und Ohlrogge, 1996; Slabas und Smith, 1988; Thelen und Ohlrogge, 2002). Slabas und Smith (1988) konnten beispielsweise zeigen, dass 80 % des ACP-Gehalts von Pflanzen in der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Darüber hinaus ist die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), die die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA katalysiert, das anschließend in den Fettsäureelongationszyklus eingespeist wird, über nicht-ionische Wechselwirkungen an die Thylakoidmembran gebunden (Thelen und Ohlrogge, 2002).

Auch von Havel (2006) wurde eine Assoziation der cyanobakteriellen KR mit der Membranfraktion festgestellt, wobei sich das Enzym wie ein peripheres Membranprotein verhielt. Der Grund für die beobachtete Membranbindung ist jedoch ungeklärt. Abbildung 3.10 gibt eine Übersicht über die häufigsten Assoziationsformen von Proteinen mit einer Lipiddoppelschicht.



**Abbildung 3.10:** Mögliche Assoziationsformen von Proteinen mit einer Lipiddoppelschicht (nach O'Day (2005)).

Integrale Membranproteine sind in der Lipiddoppelschicht fest verankert. Häufig geschieht dies durch Einlagerung einer oder mehrerer membran-durchspannender Domänen. Alternativ wird die Membranbindung auch durch Glykolipid- oder Phospholipidanker vermittelt. Während die meisten integralen Membranproteine bioinformatisch anhand der charakteristischen Transmembrandomänen leicht identifizierbar sind, unterscheiden sich periphere Membranproteine häufig in ihrer Zusammensetzung kaum von löslichen Proteinen (Bhardwaj *et al.*, 2006). Periphere Membranproteine sind nur locker mit der Membran verbunden, beispielsweise über Protein-Protein-Interaktionen, ionische oder hydrophobe Bindungskräfte. Ein Maß für die Hydrophobizität eines Proteins ist der *Grand Average of Hydropathicity* (GRAVY)-Index (Kyte und Doolittle, 1982). Ein negativer Wert kennzeichnet ein hydrophiles Protein, während ein positiver GRAVY-Index auf einen hydrophoben Proteincharakter schließen lässt. Proteine mit einem GRAVY-Index über 0,3 werden als stark hydrophob betrachtet (Millar, 2007).

### 3.3.2 Struktur

Mehrere Kristallstrukturen von pflanzlichen und bakteriellen 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen sind verfügbar. Unter anderem wurden die 3D-Strukturen der Enzyme aus *Escherichia coli*, Raps (*Brassica napus*) und *Bacillus anthracis* aufgeklärt (Price *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2000; Zaccai *et al.*, 2008). Bei diesen Enzymen zeigte das KR-Monomer jeweils die für Dinukleotid-bindende Enzyme typische Rossmann-Faltung, die aus einem Paar aus  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiven besteht (Rossmann *et al.*, 1975). Jedes der beiden alternierenden  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motive bindet dabei eine Hälfte des Dinukleotids. Allen Kristallstrukturen war darüber hinaus gemeinsam, dass die KR als Tetramer mit einer 222-Symmetrie vorlag und zwei verschiedene Dimerisierungsebenen aufwies. Damit kann das Enzym auch als Dimer aus Dimeren betrachtet werden (Lai und Cronan, 2004).

Die KR gehört zur Proteinfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs). Die SDRs umfassen Enzyme mit einer großen funktionellen Diversität, die trotz einer meist geringen Sequenzidentität (15 - 30 %) gemeinsame Faltungsmuster aufweisen (Kallberg *et al.*, 2002; Persson *et al.*, 2003). Die von SDRs umgesetzten Substrate reichen von Alkoholen und Ketonen, Zuckern, Steroiden und aromatischen Verbindungen bis hin zu Xenobiotika (Persson *et al.*, 2003). Während sich die Faltung des N-terminalen Bereiches der Enzyme, der für die Bindung der Cofaktoren NADP(H) oder NAD(H) zuständig ist, aufgrund der zugrunde liegenden Rossmann-Faltung stark ähnelt, ist die 3D-Struktur des C-terminalen Teils, der an der Substratbindung beteiligt ist, deutlich diverser (Kallberg *et al.*, 2002).

Die heterogene Familie der SDRs lässt sich auf der Grundlage von Sequenzähnlichkeiten weiter untergliedern. Die größten Gruppierungen bilden die „klassischen“ und „erweiterten“ SDRs, die sich im Wesentlichen in der Anzahl an Aminosäuren (250 bzw. 350) und im Bereich der Cofaktorbindestelle unterscheiden (Jörnvall *et al.*, 1995). Die KR gehört zu den klassischen SDRs.

Die katalytische Aktivität der klassischen SDRs wird durch eine Aminosäuretriade aus Serin (S), Tyrosin (Y) und Lysin (K) vermittelt, die im Bereich des  $\beta 5$ -Stranges und der  $\alpha 5$ -Helix lokalisiert ist (Ghosh *et al.*, 1994a; Oppermann *et al.*, 1997). Abbildung 3.11 zeigt den katalytischen Mechanismus der KR.

Da in den meisten SDR-Enzymen zusätzlich ein konserviertes Asparagin (N) in der  $\alpha 4$ -Helix vorliegt, das an der Reaktion beteiligt ist, wird häufig auch von einer katalytischen Tetrade gesprochen (Filling *et al.*, 2002; Oppermann *et al.*, 2003). In Tabelle 3.7 sind die konservierten Sequenzmotive der klassischen SDRs angegeben, die auch die katalytische Tetrade umfassen.

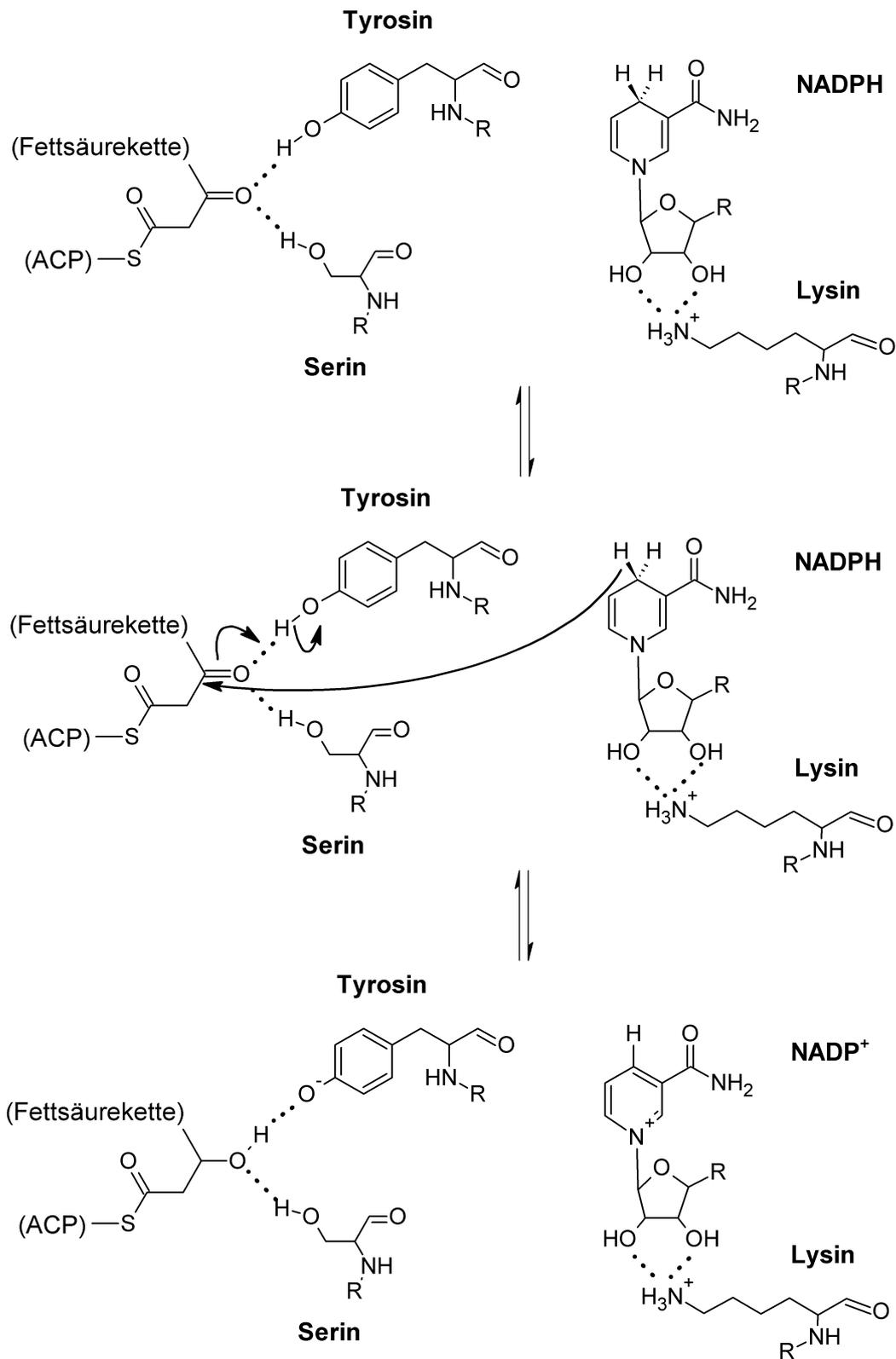


Abbildung 3.11: Katalytischer Mechanismus der KR (nach Zaccai *et al.* (2008)).

**Tabelle 3.7:** Konservierte Sequenzmotive in der Familie der klassischen SDRs. Die Sequenzen sind im Einbuchstabencode (Tabelle 9.2) dargestellt. Kleinbuchstaben repräsentieren folgende Aminosäuregruppen: a = aromatische, g = geladene, h = hydrophobe, p = polare, x = beliebige Aminosäure. Alternative Aminosäuren an einer Position sind in Klammern angegeben, während die katalytische Tetrade fett gedruckt ist (Kallberg *et al.*, 2002; Persson *et al.*, 2003).

Sekundärstrukturelement	Sequenzmotiv	Postulierte Funktion
$\beta 1 + \alpha 1$	TGxxxGhG	Beteiligung an der Cofaktorbindung
$\beta 3 + \alpha 3$	Dhx[gp]	Bindung des Adeninrings des Cofaktors
$\beta 4$	GxDhHHNNAGh	Stabilisierung des zentralen $\beta$ -Faltblatts
$\alpha 4$	hNhxG	Teil des aktiven Zentrums
$\beta 5$	GxhhxSSh	Teil des aktiven Zentrums
$\alpha 5$	<b>Yx[AS][ST]K</b>	Teil des aktiven Zentrums
$\beta 6$	h[KR]h[NS]xhxPGxxxT	Strukturelle Funktion

Die Familie der klassischen SDRs kann anhand der Cofaktorspezifität weiter in Subfamilien untergliedert werden. Die Einteilung wird anhand weniger Schlüsselpositionen vorgenommen, die in Tabelle 3.8 dargestellt sind.

**Tabelle 3.8:** Einteilung der klassischen SDRs in Subfamilien und ihre Häufigkeit in der Proteindatenbank Swiss-Prot (Kallberg *et al.*, 2002; Persson *et al.*, 2003). Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode (Tabelle 9.2) angegeben.

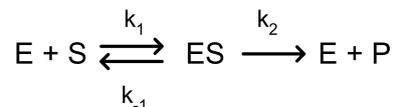
Subfamilie	Cofaktor	Schlüsselposition <sup>a</sup>				Häufigkeit
		15	36	37	38	
cD1d	NAD(H)		D			25 %
cD1e	NAD(H)		E			1 %
cD2	NAD(H)			D/E		1 %
cD3	NAD(H)				D/E	3 %
cP1	NADP(H)	K/R				10 %
cP2	NADP(H)			K/R		16 %
cP3	NADP(H)	K/R		K/R		30 %
Unklassifiziert						14 %

<sup>a</sup> Die Zahlen beziehen sich auf das Modellenzym  $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase.

In NAD(H)-bindenden Enzymen befindet sich häufig eine saure Aminosäure, Aspartat (D) oder Glutamat (E), am C-terminalen Ende des  $\beta 2$ -Stranges oder auch ein bis zwei Aminosäurepositionen dahinter. In der  $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, die von Kallberg *et al.* (2002) und Persson *et al.* (2003) als Modellenzym für die klassischen SDRs verwendet wurde, entsprechen diese Aminosäuren den Positionen 36 bis 38 (Ghosh *et al.*, 1994b). NADP(H)-bindende Enzyme weisen in der Regel ein oder zwei basische Aminosäuren, Arginin (R) oder Lysin (K), auf. In den meisten Enzymen befindet sich eine basische Aminosäure kurz hinter dem  $\beta 2$ -Strang, was in der  $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase mit Position 37 korrespondiert. Die zweite basische Aminosäure, die mitunter auch alleine für die NADP(H)-Spezifität verantwortlich ist, liegt innerhalb des TGxxxGhG-Motivs, das an der Co-faktorbindung beteiligt ist. In der  $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase entspricht das der Aminosäureposition 15 (Ghosh *et al.*, 1994b).

#### 3.3.3 Enzymmechanismus

Bei der kinetischen Beschreibung einer enzymkatalysierten Reaktion wird im einfachsten Fall von einer irreversiblen Ein-Substrat-Ein-Produkt-Reaktion ausgegangen:



**Abbildung 3.12:** Reaktionsschema einer irreversiblen Ein-Substrat-Ein-Produkt-Reaktion. Das Enzym (E) reagiert mit dem Substrat (S) unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES), der in freies Enzym und unverändertes Substrat dissoziieren kann oder in freies Enzym und Produkt (P). Die Konstanten  $k_i$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen.

Leonor Michaelis und Maud Menten (1913) entwickelten ein kinetisches Modell zur Beschreibung dieses Reaktionsmechanismus, das auf folgenden, grundlegenden Annahmen basiert:

- Jeweils ein Enzym- und ein Substratmolekül bilden einen aktivierten Enzym-Substrat-Komplex (ES).
- Der aktivierte ES-Komplex befindet sich im Fließgleichgewicht der Gesamtreaktion, d.h. seine Konzentration ist konstant:  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ .
- Die Reaktion verläuft weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht, so dass eine mögliche Rückreaktion im letzten Reaktionsschritt vernachlässigbar ist. Dies ist bei der Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Fall:  $[P] \cong 0$ .
- Geschwindigkeitsbestimmend ist die Desorption des Produktes ( $k_2$ ).

Unter Berücksichtigung dieser Annahmen lässt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  die in Gleichung 3.6 dargestellte klassische Michaelis-Menten-Kinetik herleiten:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3.6)$$

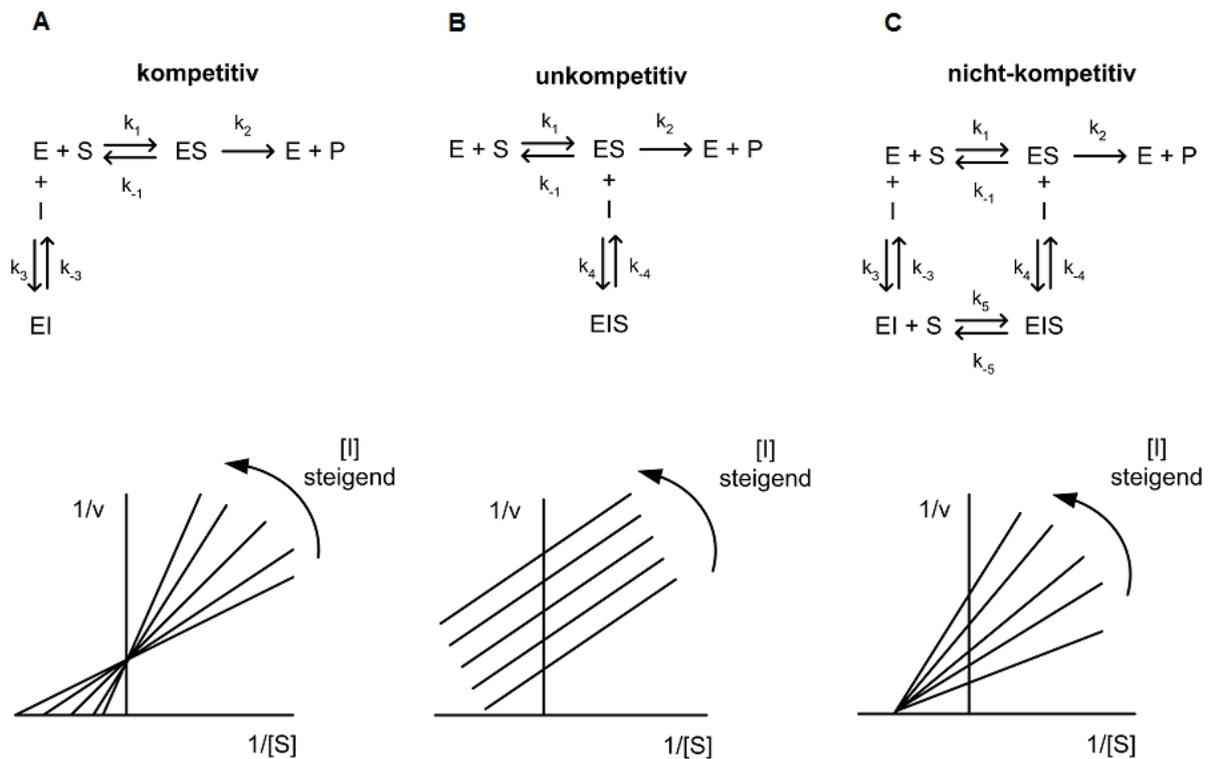
$v$	Reaktionsgeschwindigkeit, mol s <sup>-1</sup>
$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, mol s <sup>-1</sup>
$[S]$	Substratkonzentration, mol L <sup>-1</sup>
$K_m$	Halbsättigungskonzentration, mol L <sup>-1</sup>

Die Halbsättigungskonzentration  $K_m$  ergibt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte und kennzeichnet die Substratkonzentration, bei der die Reaktion mit halb-maximaler Geschwindigkeit abläuft:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3.7)$$

Die bisherigen Überlegungen besitzen Gültigkeit für Reaktionen, bei denen ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt wird. In der Realität entspricht dies jedoch eher einem Sonderfall, da die meisten Enzyme Reaktionen katalysieren, an denen zwei oder mehrere Substrate teilnehmen. Auch an der Enzymreaktion der KR sind zwei Substrate beteiligt: das Substrat mit der zu reduzierenden Carbonylfunktion sowie der Cofaktor NADPH. Somit unterliegt die Enzymkinetik der KR einem Zweisubstratmechanismus. In der Literatur sind zwei verschiedene Enzymmechanismen für 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen beschrieben worden. Für das Enzym aus *Streptococcus pneumoniae* wurde ein „random Bi-Bi-Mechanismus“ gezeigt, bei dem keine Reihenfolge der Substratbindung vorgegeben ist (Patel *et al.*, 2005). Im Gegensatz hierzu wurde für das Enzym aus *Plasmodium falciparum* ein geordneter Bi-Bi-Mechanismus mit NADPH als zuerst bindendem Substrat postuliert (Wickramasinghe *et al.*, 2006). Eine Unterscheidung dieser beiden Mechanismen ist über eine Untersuchung der Produktinhibierung möglich, da die Art der Enzymhemmung eines Produktes in Abhängigkeit zum vorliegenden Mechanismus steht (Bisswanger, 2000).

Die Enzyminhibierung beschreibt den negativen Effekt auf die Enzymaktivität, der durch die Bindung von Liganden an katalytische oder regulatorische Zentren des Proteins hervorgerufen wird. Bei der Produktinhibierung handelt es sich um eine reversible Hemmung des Biokatalysators, die sich in eine kompetitive, unkompetitive und nicht-kompetitive Hemmung unterteilen lässt.



**Abbildung 3.13:** Formen der Enzyminhibierung und das zugehörige Muster in der doppelt-reziproken Auftragung. **A)** Kompetitive Hemmung. **B)** Unkompetitive Hemmung **C)** Nicht-kompetitive Hemmung.

Abbildung 3.13 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Hemmtypen und ihr Erscheinungsbild in der doppelt-reziproken Darstellung. Bei der Auftragung der reziproken Werte von Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit entsteht eine Gerade, die die Abszisse bei  $-1/K_m$  und die Ordinate bei  $1/v_{max}$  schneidet. Die Gleichungen zur Beschreibung der Enzymkinetik in Anwesenheit von Inhibitoren sind von der einfachen Michaelis-Menten-Gleichung abgeleitet und basieren demnach auf denselben vereinfachenden Annahmen (Bisswanger, 2000).

Bei der kompetitiven Hemmung, die durch Gleichung 3.8 beschrieben wird, konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindungsstelle am aktiven Zentrum. Die apparente Halbsättigungskonzentration wird in Gegenwart des Inhibitors erhöht, während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unverändert bleibt, da der reversibel gebundene Inhibitor durch die Zugabe von Substrat verdrängt werden kann. Die kompetitive Hemmung führt daher in der doppelt-reziproken Darstellung zu einer Schar von Geraden, die sich auf der y-Achse schneiden, wie Abbildung 3.13 A zeigt.

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ik}}\right) + [S]} \quad (3.8)$$

$[I]$  Inhibitorkonzentration, mol L<sup>-1</sup>  
 $K_{ik} = \frac{k_{-3}}{k_3}$  Gleichgewichtskonstante der Inhibitorbindung an das freie Enzym, mol L<sup>-1</sup>

Im Falle der unkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an den Enzym-Substrat-Komplex, nicht jedoch an das freie Enzym. In der doppelt reziproken Darstellung erscheint dieser Hemmtyp als Schar paralleler Geraden (Abbildung 3.13 B). Durch den Inhibitor wird sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Halbsättigungskonzentration verändert. Gleichung 3.9 gibt den Einfluss eines unkompetitiven Inhibitors auf die enzymatische Umsetzung wieder:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \quad (3.9)$$

$K_{iu} = \frac{k_{-4}}{k_4}$  Gleichgewichtskonstante der Inhibitorbindung an den Enzym-Substrat-Komplex, mol L<sup>-1</sup>

Eine Substratinhibierung ist eine spezielle Form der unkompetitiven Hemmung, die sich durch folgende Gleichung beschreiben lässt ( $I \equiv S$ ):

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{iu}}} \quad (3.10)$$

Eine nicht-kompetitive Hemmung liegt vor, wenn der Hemmstoff sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex bindet. Während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird, zeigt die Inhibitorbindung keinen Effekt auf die Halbsättigungskonzentration und die Geraden schneiden sich auf der x-Achse, wie Abbildung 3.13 C zeigt. Gleichung 3.11 beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit eines nicht-kompetitiven Inhibitors:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ik}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \quad (3.11)$$

Jedoch entspricht die reine nicht-kompetitive Hemmung in der Praxis der Ausnahme. Meist liegt eine sogenannte „gemischte Hemmung“ vor, bei der auch ein Einfluss auf die apparente Halbsättigungskonzentration beobachtet wird. Die gemischte Hemmung führt in der doppelt-reziproken Auftragung ebenfalls zu einer Schar von Geraden mit gemeinsamen Schnittpunkt links von der y-Achse. Im Gegensatz zur reinen nicht-kompetitiven Hemmung, bei der  $K_{iu}$  gleich  $K_{ik}$  ist, schneiden sich die Geraden jedoch nicht auf der Abszisse. Ist  $K_{iu}$  größer als  $K_{ik}$ , liegt der Schnittpunkt über der x-Achse, während er im umgekehrten Fall unter der x-Achse lokalisiert ist (Gilbert, 2000; Bisswanger, 2000).

Produktinhibitionsexperimente können ein detailliertes Bild über den Enzymmechanismus von Zweisubstratreaktionen liefern. Im Verlauf einer Zweisubstratreaktion werden die Substrate A und B durch das Enzym zu den Produkten P und Q umgesetzt:

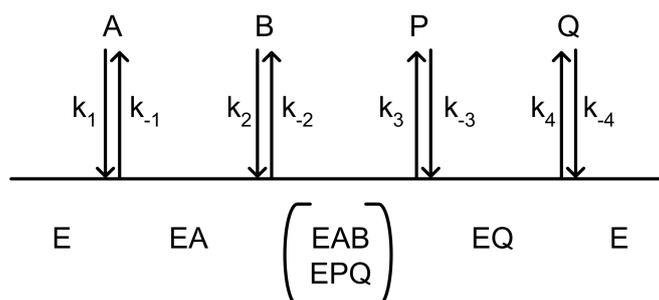


Tabelle 3.9 gibt eine Übersicht über die möglichen Inhibitionsmuster, die aus der Zugabe der Produkte P und Q zu der Enzymreaktion resultieren, wenn die Konzentrationen der Substrate A und B im nicht-gesättigten Bereich gehalten werden und eines der beiden Substrate variiert wird.

**Tabelle 3.9:** Inhibitionsmuster bei einer Produktinhibitionsstudie im nicht-gesättigten Bereich für verschiedene Zweisubstratmechanismen (Bisswanger, 2000).

<b>Mechanismus</b>	<b>Produkt als Inhibitor</b>	<b>variables Substrat A konstantes Substrat B</b>	<b>konstantes Substrat A variables Substrat B</b>
<b>Geordnet Bi-Bi</b>	P	nicht-kompetitiv	nicht-kompetitiv
	Q	kompetitiv	nicht-kompetitiv
<b>Theorell Chance</b>	P	nicht-kompetitiv	kompetitiv
	Q	kompetitiv	nicht-kompetitiv
<b>Random Bi-Bi (Rapid Equilibrium)</b>	P	kompetitiv	kompetitiv
	Q	kompetitiv	kompetitiv
<b>Ping-Pong Bi-Bi</b>	P	nicht-kompetitiv	kompetitiv
	Q	kompetitiv	nicht-kompetitiv
<b>Iso Ping-Pong Bi-Bi (Isomerisierung)</b>	P	nicht-kompetitiv	kompetitiv
	Q	nicht-kompetitiv	nicht-kompetitiv

Die kinetische Beschreibung eines Zweisubstratmechanismus wird nachfolgend am Beispiel des geordneten Bi-Bi-Mechanismus dargestellt. Dies ist der am häufigsten vorliegende Enzymmechanismus von NAD(P)H-bindenden Oxidoreduktasen (Murray *et al.*, 2006). Im Fall eines geordneten Ablaufs ist die Bindung des ersten Substrats A notwendig, bevor die Bindung des zweiten Substrats B erfolgen kann. Analog findet die Freisetzung des Produkts P statt, bevor das Produkt Q und das Enzymmolekül dissoziieren können. Dies wird in der schematischen Darstellung nach Cleland (1963a,b,c) wie folgt visualisiert:



**Abbildung 3.14:** Reaktionsschema des geordneten Bi-Bi-Mechanismus nach Cleland (1963a,b,c).

Unter Berücksichtigung des in Abbildung 3.14 dargestellten Reaktionsschemas ergibt sich für die Gesamtreaktion die komplexe Geschwindigkeitsgleichung 3.13 (Bisswanger, 2000). Die Definitionen der kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.10 aufgelistet.

$$v = \frac{V_1 V_2 ([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_g})}{K_{iA} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{K_{mQ} V_1 [P]}{K_g} + \frac{K_{mP} V_1 [Q]}{K_g} + V_2 [A][B]}{+ \frac{K_{mQ} V_1 [A][P]}{K_{iA} K_g} + \frac{K_{mA} V_2 [B][Q]}{K_{iQ}} + \frac{V_1 [P][Q]}{K_g} + \frac{V_2 [A][B][P]}{K_{iP}} + \frac{V_1 [B][P][Q]}{K_{iB} K_g}} \quad (3.13)$$

Werden Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gemessen, so gilt für die Konzentration der Produkte  $[P] = [Q] \cong 0$  und die Geschwindigkeitsgleichung vereinfacht sich für die Hinreaktion zu:

$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_{iA} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \quad (3.14)$$

Analog gilt für die Rückreaktion unter den Bedingungen  $[A] = [B] \cong 0$ :

$$v = \frac{V_2 [P][Q]}{K_{iA} K_{mB} + K_{mQ} [P] + K_{mP} [Q] + [P][Q]} \quad (3.15)$$

**Tabelle 3.10:** Kinetische Parameter des geordneten Bi-Bi-Mechanismus (Bisswanger, 2000).  $E_0$  entspricht der Gesamtkonzentration an Enzym.

Parameter	Bedeutung	Definition
$V_1$	Maximalgeschwindigkeit der Hinreaktion	$\frac{k_3 k_4 [E]_0}{k_3 + k_4}$
$V_2$	Maximalgeschwindigkeit der Rückreaktion	$\frac{k_{-1} k_{-2} [E]_0}{k_{-1} + k_{-2}}$
$K_{mA}$	Halbsättigungskonzentration des Substrats A	$\frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)}$
$K_{mB}$	Halbsättigungskonzentration des Substrats B	$\frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_3 + k_4)}$
$K_{mP}$	Halbsättigungskonzentration des Produkts P	$\frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} (k_{-1} + k_{-2})}$
$K_{mQ}$	Halbsättigungskonzentration des Produkts Q	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-4} (k_{-1} + k_{-2})}$
$K_{iA}$	Dissoziationskonstante des Substrats A	$\frac{k_{-1}}{k_1}$
$K_{iB}$	Dissoziationskonstante des Substrats B	$\frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_2}$
$K_{iP}$	Dissoziationskonstante des Produkts P	$\frac{k_3 + k_4}{k_{-3}}$
$K_{iQ}$	Dissoziationskonstante des Produkts Q	$\frac{k_4}{k_{-4}}$
$K_g$	Gleichgewichtskonstante der Reaktion	$\frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4}}$

### 3.4 Cofaktorregenerierung

Bei der Reduktion von Carbonylverbindungen durch NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen werden die Nikotinamid-Cofaktoren im Verlauf der Reaktion oxidiert, indem ein Wasserstoffatom mit Elektronenpaar („Hydrid-Ion“) auf das Carbonylkohlenstoffatom des Substrats übertragen wird. In Anbetracht der hohen Kosten von Cofaktoren würde ein industrieller Einsatz von Oxidoreduktasen bei einer stöchiometrischen Zugabe von NADH oder NADPH unwirtschaftlich werden. Aus diesem Grund wurden verschiedenste Methoden entwickelt, um Cofaktoren *in situ* zu regenerieren (Weuster-Botz, 1999; van der Donk und Zhao, 2003; Faber, 2004).

Die Effizienz eines Regenerierungsprozesses wird anhand der Anzahl der Zyklen bewertet, die durchlaufen werden, bevor das Cofaktormolekül inaktiviert wird (Faber, 2004). Die maximale Zykluszahl wird in der Regel als „*total turnover number*“ (TTN) angegeben, die definiert ist als die Anzahl der gebildeten Mol an Produkt pro Mol verbrauchtem Cofaktor (Chenault und Whitesides, 1987). Um einen ökonomischen Prozess zu gewährleisten, sollte ein Cofaktor je nach Wert des hergestellten Produkts mindestens  $10^3$  -  $10^5$  Zyklen durchlaufen (van der Donk und Zhao, 2003). Neben einer hohen maximalen Zykluszahl sind folgende Entscheidungskriterien bei der Wahl eines geeigneten Regenerierungssystems von Bedeutung (Chenault und Whitesides, 1987; Weuster-Botz, 1999):

- Keine Interferenz mit der Synthesereaktion oder der Produktaufarbeitung
- Geringer Kostenaufwand und kommerzielle Verfügbarkeit der benötigten Agenzien
- Keine inhibierenden oder deaktivierenden Effekte der Substrate oder Produkte der Regenerierung
- Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts auf die Seite des Zielprodukts

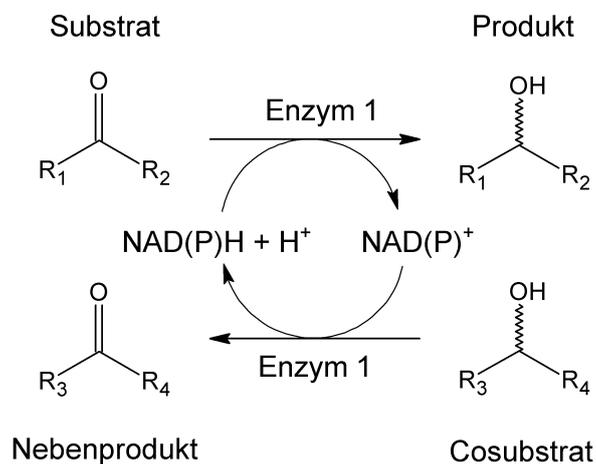
Neben der chemischen Reduktion der oxidierten Cofaktormoleküle durch Zugabe eines reduzierenden Agens wie Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Jones *et al.*, 1972) existieren auch elektro- und photochemische Methoden für die Cofaktorregenerierung (Jensen und Elving, 1984; Wienkamp und Steckhan, 1982; Mandler und Willner, 1986; Julliard *et al.*, 1986). Wesentliche Nachteile all dieser Methoden sind das Auftreten unerwünschter Nebenreaktionen, die geringe Regioselektivität und die niedrigen maximalen Zykluszahlen ( $\text{TTN} \leq 10^3$ ). Da enzymatische Regenerierungsmethoden vergleichsweise effizient sind, haben sie eine breite Anwendung gefunden (Faber, 2004).

In Ganzzellbiotransformationen kann die Cofaktorregenerierung prinzipiell durch den mikrobiellen Stoffwechsel erfolgen. Eine Abschätzung der NADH-Regenerierung durch wachsende Zellen, die Glukose als Kohlenstoff- und Ammonium als Stickstoffquelle verwenden, ergab einen Wert von  $720 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  (Duetz *et al.*, 2001). Folglich kann die intrazelluläre Cofaktorregenerierung ab Oxidoreduktaseaktivitäten von mehreren  $100 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  zur limitierenden Größe werden (Duetz *et al.*, 2001). In diesen Fällen sowie bei der Verwendung von ruhenden Zellen kann die Einbindung von enzymatischen Regenerierungsmethoden auch in Ganzzellansätzen zu einer erheblichen Steigerung der Effizienz eines Prozesses beitragen (Duetz *et al.*, 2001; van der Donk und Zhao, 2003).

Bei den enzymatischen Regenerierungsmethoden werden Substrat- und Enzym-gekoppelte Ansätze unterschieden, die nachfolgend näher dargestellt werden.

### 3.4.1 Substrat-gekoppelter Ansatz

Beim Substrat-gekoppelten Ansatz erfolgt die Cofaktorregenerierung durch das gleiche Enzym, das auch die gewünschte Reduktion der Carbonylverbindung katalysiert. Durch die Zugabe eines möglichst kostengünstigen Cosubstrates, wie beispielsweise Isopropanol, wird die Reduktionsreaktion des Ketons mit der Oxidationsreaktion des Alkohols gekoppelt, wie in Abbildung 3.15 dargestellt ist.



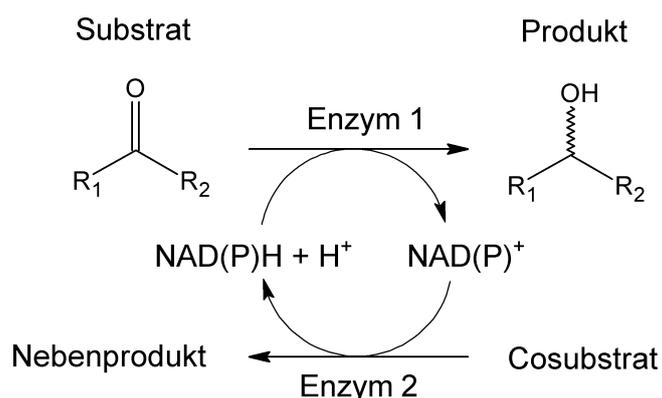
**Abbildung 3.15:** Substrat-gekoppelter Ansatz der Cofaktorregenerierung.

Dieser Ansatz, der unter anderem sehr erfolgreich mit den Alkoholdehydrogenasen aus Pferdeleber und *Lactobacillus brevis* durchgeführt wurde (Schubert *et al.*, 2002), birgt jedoch auch mögliche Nachteile. Vor allem in Dehydrogenase-katalysierten Reaktionen liegt das

Reaktionsgleichgewicht häufig auf der Seite der Reduktionsreaktion (Faber, 2004). Aus diesem Grund werden zur Überwindung thermodynamischer Limitierungen üblicherweise hohe Konzentrationen an Cosubstrat zugegeben, wodurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des gewünschten Produktes verschoben wird (van der Donk und Zhao, 2003; Faber, 2004). Der im Überschuss eingesetzte Alkohol und das daraus gebildete Keton führen jedoch häufig zu einer Inhibierung oder Deaktivierung des eingesetzten Enzyms oder erhöhen den Aufwand bei der Produktisolierung. Aus diesen Gründen wird in den meisten Prozessen auf einen Enzym-gekoppelten Ansatz zurückgegriffen (Faber, 2004).

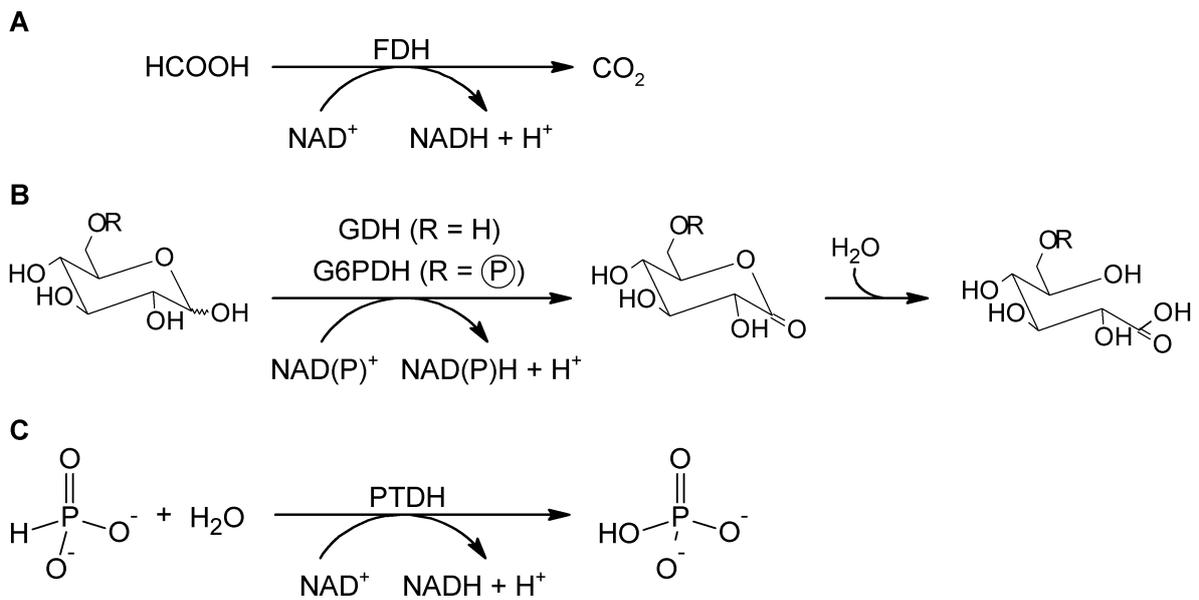
### 3.4.2 Herkömmlicher Enzym-gekoppelter Ansatz

Beim Enzym-gekoppelten Ansatz, der schematisch in Abbildung 3.16 dargestellt ist, werden die Reduktion der Carbonylverbindung und die Regenerierung der Cofaktoren durch zwei unterschiedliche Enzyme katalysiert.



**Abbildung 3.16:** Enzym-gekoppelter Ansatz der Cofaktorregenerierung.

Enzyme, die im Rahmen einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung Anwendung finden, gehören beispielsweise zu den Formiatdehydrogenasen (FDH, EC 1.2.1.2), den Glukosedehydrogenasen (GDH, EC 1.1.1.47), den Glukose-6-phosphat-dehydrogenasen (G6PDH, EC 1.1.1.49) oder den Phosphitdehydrogenasen (PTDH, EC 1.20.1.1) (van der Donk und Zhao, 2003; Faber, 2004). Abbildung 3.17 zeigt die von den verschiedenen Regenerierungsenzymen katalysierten Reaktionen, während typische Beispiele für diese Enzyme und ihre Eigenschaften in Tabelle 3.11 aufgelistet sind.



**Abbildung 3.17:** Beispiele für katalysierte Reaktionen bei der Regenerierung von Cofaktoren durch **A**) Formiatdehydrogenasen (FDH), **B**) Glukosedehydrogenasen (GDH) und Glukose-6-phosphat-dehydrogenasen (G6PDH) oder **C**) Phosphitdehydrogenasen (PTDH) (Costas *et al.*, 2001; Faber, 2004).

**Tabelle 3.11:** Beispielhafte Auswahl von Enzymen für die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung und ihre Eigenschaften.

Enzym	Organismus	Molekulargewicht, kDa	spezifische Aktivität, U mg <sup>-1</sup>	Bedingungen
FDH	<i>Candida boidinii</i>	2 x 36 <sup>a</sup>	NAD <sup>+</sup> : 6,0 <sup>b</sup>	30 °C, pH 7,5
FDH	<i>Mycobacterium vaccae</i> N10	2 x 44 <sup>a</sup>	NAD <sup>+</sup> : 10,0 <sup>c</sup>	30 °C, pH 7,0-7,5
GDH	<i>Bacillus subtilis</i>	4 x 31,5 <sup>d</sup>	NAD <sup>+</sup> : 368 <sup>e</sup> NADP <sup>+</sup> : 525 <sup>d</sup>	23 °C, pH 7,8 22-25 °C, pH 6,5
G6PDH	<i>Leuconostoc mestenteroides</i>	2 x 52 <sup>f</sup>	NAD <sup>+</sup> : 1542 <sup>g</sup> NADP <sup>+</sup> : 715 <sup>g</sup>	25 °C, pH 7,6 25 °C, pH 7,6
PTDH	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2 x 34,5 <sup>h</sup>	NAD <sup>+</sup> : 12,2 <sup>h</sup>	30 °C, pH 7,3

<sup>a</sup> Popov und Lamzin (1994); <sup>b</sup> Slusarczyk *et al.* (2000); <sup>c</sup> Tishkov und Popov (2004); <sup>d</sup> Lampel *et al.* (1986);

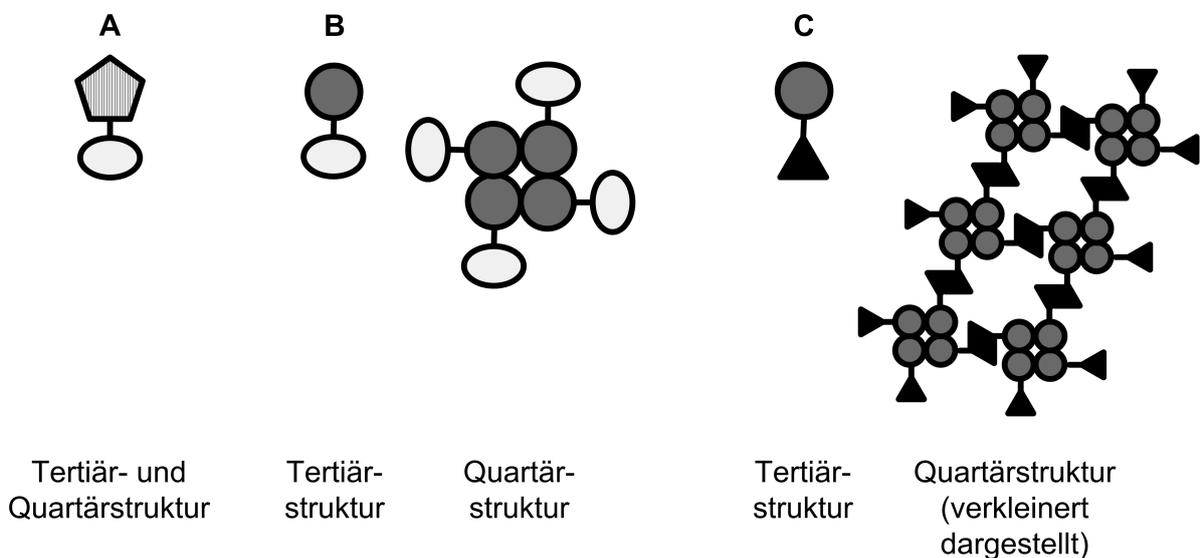
<sup>e</sup> Ramaley und Vasantha (1983); <sup>f</sup> Olive und Levy (1971); <sup>g</sup> Lee und Levy (1992); <sup>h</sup> Costas *et al.* (2001).

Die Verwendung einer Formiatdehydrogenase als Hilfsenzym wird als Goldstandard auf dem Gebiet der Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung betrachtet, da hierbei alle Kriterien einer effizienten Cofaktorregenerierung erfüllt werden (Weuster-Botz, 1999; van der Donk und Zhao, 2003). Formiatdehydrogenasen katalysieren die Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid, woraus sich wesentliche Vorteile ergeben: Sowohl das kostengünstige Cosubstrat als auch das gebildete Nebenprodukt haben keinen schädigenden Einfluss auf Enzyme und können leicht aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Ferner macht die Bildung von Kohlendioxid die Reaktion praktisch irreversibel, woraus eine hohe Triebkraft für die Cofaktorregenerierung resultiert (Weuster-Botz, 1999; van der Donk und Zhao, 2003; Faber, 2004). Das Formiat/FDH-System ist aus diesen Gründen sehr effizient, weswegen die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* großtechnisch in der Produktion von L-*tert*-Leucin bei Evonik Industries (ehemalige Degussa AG) eingesetzt wird (Bommarius *et al.*, 1998). Nachteile der bekannten Formiatdehydrogenasen sind ihre geringe spezifische Enzymaktivität und ihre strikte Spezifität für NAD<sup>+</sup> als Cofaktor. Um die Vorteile der Formiatdehydrogenasen auch bei der Regenerierung von NADPH nutzen zu können, wurden beispielsweise für die Enzyme aus *Pseudomonas* sp. 101, *Saccharomyces cerevisiae* und *Mycobacterium vaccae* N10 Mutanten generiert, die in eingeschränktem Maße auch NADP<sup>+</sup> akzeptieren (Seelbach *et al.*, 1996; Serov *et al.*, 2002; Gebhardt, 2006). Die D221G-Mutante der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10 oxidiert NADP<sup>+</sup> mit einer spezifischen Aktivität, die im Bereich von 10 % der Wildtyp-Aktivität gegenüber NAD<sup>+</sup> liegt (Gebhardt, 2006).

Beim Einsatz von Glukosedehydrogenasen oder Glukose-6-phosphat-dehydrogenasen wird das Reaktionsgleichgewicht auch in Richtung der Synthesereaktion verschoben, da das gebildete Glukonolakton spontan zum Glukonat hydrolysiert, wie Abbildung 3.17 zeigt. Problematisch ist bei diesen Ansätzen, dass das Nebenprodukt häufig die Produktisolierung erschwert und dass Glukose-6-phosphat teuer ist (Faber, 2004). Glukosedehydrogenasen sind nicht für Ganzzellansätze geeignet, da Glukose bei der Aufnahme in die Zelle phosphoryliert wird und somit nicht mehr als Substrat zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu ist bei der Verwendung einer Glukose-6-phosphat-dehydrogenase in Ganzzellbiotransformationen mit Glukose als billigem Cosubstrat die Glukosetransportrate in die Zellen limitierend (Bräutigam, 2008). In jüngster Zeit haben Phosphitdehydrogenasen viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da das thermodynamische Gleichgewicht der katalysierten Reaktion günstig liegt, Cosubstrat und Nebenprodukt nicht schädlich auf Enzyme wirken und nicht mit der Produktisolierung interferieren (Vrtis *et al.*, 2002; Johannes *et al.*, 2005; McLachlan *et al.*, 2008). Diese Enzyme, die in geringem Maße auch NADPH regenerieren, sind jedoch noch nicht im Prozessmaßstab bewertet worden (Costas *et al.*, 2001; van der Donk und Zhao, 2003).

### 3.4.3 Innovativer Enzym-gekoppelter Ansatz: bifunktionelle Proteine

Ein relativ junges Forschungsgebiet im Bereich der Enzymtechnologie beschäftigt sich mit der Herstellung artifizierlicher bi- oder multifunktionaler Enzyme durch Genfusion (Bülow und Mosbach, 1991; Conrado *et al.*, 2008). Hierbei werden Proteinchimären aus zwei oder mehreren Enzymen mit unterschiedlicher Funktion erstellt, die durch kurze Verbindungssequenzen miteinander verknüpft sind, wie in Abbildung 3.18 A schematisch dargestellt ist. Die dadurch bewirkte Colokalisierung lehnt sich an den natürlichen Organisationsstrategien metabolischer Enzyme an, die durch Komplexbildung oder Generierung multifunktionaler Polypeptidketten ihre Produktivität erhöhen (Jørgensen *et al.*, 2005; Conrado *et al.*, 2008).



**Abbildung 3.18:** Oligomerisierung von Fusionsproteinen **A)** Fusion zweier Monomere. **B)** Fusion eines Tetramers an ein Monomer **C)** Fusion eines Tetramers an ein Dimer (nach Conrado *et al.* (2008) und Bülow und Mosbach (1991)).

Ist ein oligomeres Protein Bestandteil des Fusionsproteins, so kommt es in der Regel auch zur Multimerisierung der Proteinchimären. Abbildung 3.18 C zeigt, dass dies im Falle von mehreren oligomeren Proteinen auch zur Ausbildung eines großen Proteinnetzwerkes führen kann. Da die meisten oligomeren Enzyme ohne eine Assemblierung der Untereinheiten nicht aktiv sind, ist dieser Prozess durchaus gewünscht (Conrado *et al.*, 2008). Hierbei kann es jedoch zu Faltungsproblemen und zur Bildung von unlöslichen Aggregaten kommen (Kourtz *et al.*, 2005).

Die Konstruktion von Fusionsproteinen ist auch im Hinblick auf Ganzzellbiotransformationen interessant. Im Vergleich zu den verdünnten Puffersystemen, die üblicherweise in enzymatischen Umsetzungen Verwendung finden, herrschen im Innenraum von Bakterien gänzlich andere physikochemische Bedingungen. Beispielsweise nehmen Makromoleküle 20-30 % des cytoplasmatischen Volumens in *Escherichia coli*-Zellen ein (Ellis, 2001a,b). Eine Folge dieses als „*Macromolecular Crowding*“ bekannten Phänomens ist eine um den Faktor 3-4 verlangsamte Diffusion kleiner Moleküle in Zellen im Vergleich zu reinem Wasser (Kao *et al.*, 1993). Aus diesen intrazellulären Gegebenheiten resultiert ein evolutiver Druck in Richtung der Bildung von Enzymkomplexen und multifunktionellen Enzymen, um von den Vorteilen sogenannter „metabolischer Kanäle“ zu profitieren (Jørgensen *et al.*, 2005; Salles *et al.*, 2007). Eine unmittelbare Konsequenz von Enzymkomplexen und multifunktionellen Proteinen ist die räumliche Nähe der Reaktionszentren für aufeinanderfolgende Reaktionsschritte, wodurch die Diffusionswege reduziert werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein metabolisches Intermediat weiter umgesetzt wird bevor es fort diffundiert (Jørgensen *et al.*, 2005; Conrado *et al.*, 2008). Darüber hinaus besteht die Annahme, dass es hierbei zur Ausbildung eines Mikromilieus kommt, in dem die Konzentration an Reaktionsintermediaten lokal erhöht ist (Conrado *et al.*, 2008).

Bei der Konstruktion von Fusionsproteinen zwischen zwei Oxidoreduktasen, von denen die eine die Reduktion der Carbonylverbindung und die andere die Cofaktorregenerierung katalysiert, könnte durch den Proximitätseffekt ein effizienter Austausch der benötigten Cofaktoren bewirkt werden. Bislang gibt es nur eine Veröffentlichung, die ein derartiges System beschreibt. Prachayasittikul *et al.* (2006) berichten von der erfolgreichen Konstruktion einer Proteinchimäre aus der Galaktosedehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens*, die für die Regenerierung von NADH eingesetzt wurde, und der Laktatdehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus*. In einem System, in dem die intrazelluläre Diffusionslimitierung durch Zugabe von 20 % Polyethylenglykol 20.000 nachgeahmt wurde, zeigte das Fusionsprotein eine um den Faktor 5 gesteigerte Laktatproduktion im Vergleich zu den getrennt vorliegenden Enzymen (Prachayasittikul *et al.*, 2006).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Allgemeines Material

Alle Materialien, die üblicherweise in biotechnologischen Arbeiten Verwendung finden, sind in Anhang A aufgelistet. Hierzu zählen die verwendeten Geräte (Anhang A.1), Chemikalien (Anhang A.2), Enzyme (Anhang A.3), Standards und Kits (Anhang A.4), Oligonukleotide (Anhang A.5), Puffer (Anhang A.6) und Medien (Anhang A.7). Spezielle Materialien, die einer besonderen Erwähnung bedürfen, sind in Kapitel 4.2 zusammengefasst.

### 4.2 Spezielles Material

#### 4.2.1 Plasmide

##### pET21-a(+)

Größe:	5443 Basenpaare (bp)
Promotor:	T7
Resistenz:	Ampicillin
Mögliche Affinitätsanker:	N-terminal: T7, C-terminal: Hexahistidin (His <sub>6</sub> )
Bezugsquelle:	Novagen, Madison, USA

##### pET21-a(+) MV-FDH D221G

Größe:	6607 bp
Promotor:	T7
Resistenz:	Ampicillin
Affinitätsanker:	C-terminal: His <sub>6</sub>
Insert:	Gen für die Formiatdehydrogenase aus <i>Mycobacterium vaccae</i> (MV-FDH), D221G-Mutante, 1206 bp
Bezugsquelle:	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (BioVT), Technische Universität München
Literatur:	Gebhardt (2006)

pETM-41

Größe:	5389 bp
Promotor:	T7
Resistenz:	Kanamycin
Mögliche Affinitätsanker:	N-terminal: His <sub>6</sub> -Maltose-bindendes Protein (His <sub>6</sub> -MBP)
Proteaseschnittstelle:	Tabakäzvirus ( <i>tobacco etch virus</i> , TEV)-Protease
Bezugsquelle:	European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg

pGEX-4T-1

Größe:	5969 bp
Promotor:	<i>tac</i>
Resistenz:	Ampicillin
Mögliche Affinitätsanker:	N-terminal: Glutathion-S-Transferase (GST)
Proteaseschnittstelle:	Thrombin
Bezugsquelle:	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

**4.2.2 Escherichia coli-Stämme****Tabelle 4.1:** Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL pRK793	B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam</i> <sup>r</sup> ] Amp <sup>r</sup> pRK793	Addgene
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pBtac-adh <sub>L.brevis</sub>	B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> Amp <sup>r</sup> pBtac-adh <sub>L.brevis</sub>	TUM
<i>E. coli</i> Tuner(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>r</sup> )	Novagen
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>relA1 supE44</i> λ- Δ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ] IDE3	Promega
<i>E. coli</i> XL-10 Gold	Tet <sup>r</sup> <i>D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene

Der Stamm *Escherichia coli* BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL pRK793 wurde von der gemeinnützigen Organisation Addgene (Cambridge, USA) als Aktivkultur bezogen. Im Plasmid pRK793 (*tac*-Promotor, Ampicillin-Resistenz) ist das 750 bp große Gen für die S219V-Mutante der Tabakäzvirus (*tobacco etch virus*, TEV)-Protease inseriert (Kapust *et al.*, 2001).

Der Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) pBtac-adh<sub>L.brevis</sub> wurde von Dr. Stefan Bräutigam (Technische Universität München, TUM) als Aktivkultur bereit gestellt (Bräutigam, 2008). Das zugehörige Plasmid pBtac-adh<sub>L.brevis</sub> (*tac*-Promotor, Ampicillin-Resistenz) stammt vom Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich und besitzt das 750 bp große Gen für die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) (Hummel, 1997).

Während ultrakompetente Zellen von *Escherichia coli* XL-10 Gold zur Subklonierung und Plasmidvermehrung genutzt wurden, wurden die Stämme Tuner(DE3), Rosetta 2(DE3) und JM109(DE3) für Proteinexpressionen verwendet. Der Stamm *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) besitzt zusätzlich das Plasmid pRARE2, das für sieben Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNA) codiert, die selten in *Escherichia coli* vorkommen (Novagen, 2003). Damit werden Expressionslimitierungen überwunden, die aus einer anderen Codonverwendung im Spenderorganismus der heterolog zu exprimierenden DNA resultieren.

#### 4.2.3 Cyanobakterienstämme

Im Folgenden sind alle verwendeten Cyanobakterienstämme näher beschrieben. Alle Bakterien wurden als Aktivkulturen bezogen. Es werden nur Eigenschaften und Besonderheiten erwähnt, die unmittelbar für diese Arbeit von Bedeutung waren. Soweit nicht anders angegeben, stammen die Informationen von den Herkunftsstammsammlungen *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria* (PCC) (<http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/>), *Roscoff Culture of Cyanobacteria* (RCC) (<http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/>) oder der Genomprojektdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Für die meisten Cyanobakterien existieren eine Reihe alternativer Stammbezeichnungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur in der Literatur gebräuchliche Synonyme aufgelistet. Insofern eine Kurzbezeichnung für einen Stamm vorhanden ist, wird diese im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet. Ferner wird nachfolgend zwischen limnischen (aus Süßwasser stammenden), terrestrischen, euryhalinen (aus Küstennähe oder Brackwasser stammenden) und marinen Cyanobakterien unterschieden. Bei Stämmen, die multiple Lebensräume besiedeln, wird das prädominante Habitat angegeben. Einige Angehörige der Gattung *Nostoc* können beispielsweise sowohl in Süßwasser als auch in terrestrischen Habitaten vorkommen (Dodds *et al.*, 1995).

*Acaryochloris marina*

Bezugsquelle:	Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie, Technische Universität Berlin
Ordnung:	nicht eingeordnet
Morphologie:	einzellig, coccoid bis ellipsoid, Ø 1-1,5 µm (Miyashita <i>et al.</i> , 2003)
Habitat:	marin
Medium:	ASN-III
Besonderheiten:	<i>Acaryochloris marina</i> besitzt Chlorophyll <i>d</i> als Hauptpigment (Miyashita <i>et al.</i> , 2003). Der Stamm ist nicht näher klassifiziert, besitzt jedoch ein <i>fabG</i> -Gen, das zu 100 % dem aus <i>Acaryochloris marina</i> MBIC 11017 entspricht.

*Anabaena variabilis*

Bezugsquelle:	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Weihenstephan, Technische Universität München
Ordnung:	<i>Nostocales</i>
Morphologie:	filamentös, Ø 3-4 µm
Habitat:	limnisch
Medium:	BG-11
Besonderheiten:	Der Stamm ist ein Wildfang und nicht näher klassifiziert, besitzt jedoch ein <i>fabG</i> -Gen, das zu 100 % dem aus <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 entspricht.

*Cyanothece* sp. PCC 8801

Bezugsquelle:	PCC, Paris, Frankreich
Ordnung:	<i>Chroococcales</i>
Synonyme:	<i>Synechococcus</i> sp. RF-1, <i>Synechococcus</i> sp. 8801
Kurzbezeichnung:	<i>Cyanothece</i> PCC 8801
Morphologie:	einzellige Kokken, Ø 3 µm, makroskopische Kolonien
Habitat:	limnisch
Medium:	BG-11

##### *Gloeobacter violaceus* PCC 7421

Bezugsquelle:	PCC, Paris, Frankreich
Ordnung:	<i>Gloeobacterales</i>
Synonyme:	<i>Gloeotheca coerulea</i> , <i>Gloeobacter</i> ATCC 29082, <i>Gloeobacter</i> SAG 7.82
Kurzbezeichnung:	<i>Gloeobacter</i> PCC 7421
Morphologie:	einzellige Stäbchen, Ø 1-1,2 µm, makroskopische Kolonien
Habitat:	terrestrisch
Medium:	BG-11
Besonderheiten:	<i>Gloeobacter</i> PCC 7421 besitzt keine Thylakoide und ist sensitiv gegenüber Licht und Bewegung (Rippka <i>et al.</i> , 1974; Ananyev <i>et al.</i> , 2004).

##### *Lyngbya* sp. PCC 8106

Bezugsquelle:	PCC, Paris, Frankreich
Ordnung:	<i>Oscillatoriales</i>
Synonyme:	<i>Lyngbya aestuarii</i> CCY9616
Kurzbezeichnung:	<i>Lyngbya</i> PCC 8106
Morphologie:	filamentös, Ø 9-11 µm, Mattenbildung
Habitat:	euryhalin
Medium:	50 % ASN-III + 50 % BG-11

##### *Nostoc* sp. PCC 7120

Bezugsquelle:	PCC, Paris, Frankreich
Ordnung:	<i>Nostocales</i>
Synonyme:	<i>Nostoc muscorum</i> , <i>Anabaena</i> PCC 7120
Kurzbezeichnung:	<i>Nostoc</i> PCC 7120
Morphologie:	filamentös, Ø 3-3,5 µm
Habitat:	limnisch
Medium:	BG-11

##### *Nostoc punctiforme* PCC 73102

Bezugsquelle:	PCC, Paris, Frankreich
Ordnung:	<i>Nostocales</i>
Synonyme:	<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133

Kurzbezeichnung: *Nostoc* PCC 73102  
Morphologie: filamentös, Ø 5-6 µm, makroskopische Kolonien  
Habitat: limnisch  
Medium: BG-11

*Prochlorococcus marinus* NATL1

Bezugsquelle: RCC, Roscoff, Frankreich  
Ordnung: *Prochlorales*  
Synonyme: *Prochlorochoccus* RCC 158, FP12  
Kurzbezeichnung : *Prochlorococcus* NATL1  
Morphologie einzellige Kokken, Ø 0,6 µm  
Habitat: marin  
Medium: PCR-Tu<sub>2</sub>  
Besonderheiten: hohe Kupfersensitivität (Mann *et al.*, 2002)

*Prochlorococcus marinus* NATL2

Bezugsquelle: RCC, Roscoff, Frankreich  
Ordnung: *Prochlorales*  
Synonyme: *Prochlorochoccus* RCC 314  
Kurzbezeichnung : *Prochlorococcus* NATL2  
Morphologie: einzellige Kokken, Ø 0,6 µm  
Habitat: marin  
Medium: PCR-Tu<sub>2</sub>  
Besonderheiten: hohe Kupfersensitivität (Mann *et al.*, 2002)

*Synechococcus* sp. PCC 7002

Bezugsquelle: PCC, Paris, Frankreich  
Ordnung: *Chroococcales*  
Synonyme: *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6, ATCC 2716  
Kurzbezeichnung: *Synechococcus* PCC 7002  
Morphologie: einzellige Kokken, Ø 1,2 - 1,5 µm  
Habitat: euryhalin  
Medium: 50 % ASN-III + 50 % BG-11 + Vitamin B<sub>12</sub>

##### *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Bezugsquelle: PCC, Paris, Frankreich  
Ordnung: *Chroococcales*  
Synonyme: *Anacystis nidulans* R2, *Synechococcus leopoliensis*  
Kurzbezeichnung: *Synechococcus* PCC 7942  
Morphologie: einzellige Stäbchen, Ø 1-1,2 µm  
Habitat: limnisch  
Medium: BG-11

##### *Synechococcus* sp. RCC 307

Bezugsquelle: RCC, Roscoff, Frankreich  
Ordnung: *Chroococcales*  
Synonyme: *Synechococcus* sp. MINSyn016-15m-01  
Kurzbezeichnung: *Synechococcus* RCC 307  
Morphologie: einzellige Kokken, Ø 1 µm  
Habitat: marin  
Medium: PCR-Tu<sub>2</sub>

##### *Synechococcus* sp. RCC 555

Bezugsquelle: RCC, Roscoff, Frankreich  
Ordnung: *Chroococcales*  
Synonyme: *Synechococcus* sp. RS9916  
Kurzbezeichnung: *Synechococcus* RCC 555  
Morphologie: einzellige Kokken, Ø 1-1,5 µm  
Habitat: marin  
Medium: PCR-Tu<sub>2</sub>

##### *Synechococcus* sp. RCC 556

Bezugsquelle: RCC, Roscoff, Frankreich  
Ordnung: *Chroococcales*  
Synonyme: *Synechococcus* sp. RS9917  
Kurzbezeichnung: *Synechococcus* RCC 556  
Morphologie: einzellige Kokken, Ø 1-1,5 µm  
Habitat: marin  
Medium: PCR-Tu<sub>2</sub>

*Synechocystis* sp. PCC 6803

Bezugsquelle:	PCC, Paris, Frankreich
Ordnung:	<i>Chroococcales</i>
Synonyme:	<i>Synechocystis</i> ATCC 27184
Kurzbezeichnung:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803
Morphologie:	einzellige Kokken, Ø 2,3-2,5 µm
Habitat:	limnisch
Medium:	BG-11

*Thermosynechococcus elongatus* BP-1

Bezugsquelle:	Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr Universität Bochum
Ordnung:	<i>Chroococcales</i>
Kurzbezeichnung:	<i>Thermosynechococcus</i> BP-1
Morphologie:	einzellige Stäbchen, Ø 10 µm (Hsueh <i>et al.</i> , 2007)
Habitat:	limnisch
Medium:	BG-11
Besonderheiten:	Der Stamm <i>Thermosynechococcus</i> BP-1 ist thermophil und besitzt im Medium nach Dyer und Gafford (1961) ein Temperaturoptimum von 57 °C (Yamaoka <i>et al.</i> , 1978).

**4.2.4 Computerprogramme**

- **Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server 2 (APSSP2):** Server für die Vorhersage von Sekundärstrukturelementen ( $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt) in Proteinen (<http://imtech.res.in/raghava/apssp/>)
- **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST):** Programm für den Vergleich von Gen- und Proteinsequenzen mit anderen Sequenzen in öffentlichen Datenbanken (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- **EBI PDBePisa:** Server für die Analyse der Interaktionsebenen und Assemblierung von multimeren Proteinen ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html))
- **GENtle:** Programm zur Verwaltung und Bearbeitung von Gen- und Proteinsequenzen und für die Durchführung von Sequenzvergleichen (<http://gentle.magnusmanske.de/>)

- **Graphical Codon Usage Analyser (GCUA):** Programm zur Auswertung der Codonverwendung in Spender- und Empfängerorganismus für die heterologe Expression von Genen (<http://gcua.schoedl.de/>)
- **ImageJ 1.41:** Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm für die wissenschaftliche Bildanalyse, z.B. von Densitometriegelen (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)
- **LabView 6.0:** Grafische Programmiersprache für Mess-, Prüf-, Steuer- und Regelanwendungen; verwendet für die Aufzeichnung der Messdaten der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Anlage
- **MATLAB R2006b:** Vielseitiges Programm zur Lösung mathematischer Aufgaben; verwendet zur Analyse enzymkinetischer Daten
- **PredictProtein:** Server für die Analyse von Proteinsequenzen, Struktur- und Funktionsvorhersage. Das implementierte Programm Profile Network Prediction Heidelberg (PROF) wurde zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen benutzt (<http://www.predictprotein.org/>).
- **ProtParam:** Programm für die Berechnung verschiedener physikalischer und chemischer Proteinparameter, z.B. Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Extinktionskoeffizient (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)
- **QuikChange® Primer Design Program:** Programm zur Erstellung von Oligonukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner/>)
- **SigmaPlot 8.0:** Programm für die Analyse enzymkinetischer Daten, statistische Tests sowie für die Präsentation der Messergebnisse
- **Swiss-Model:** Server für die Erstellung von Homologie-Modellen von Proteinstrukturen (<http://swissmodel.expasy.org/>)
- **Yet Another Scientific Artificial Reality Application (YASARA):** Programm für die Modellierung und Simulation von Molekularstrukturen (<http://www.yasara.org/>)

## 4.3 Mikrobiologische Methoden

### 4.3.1 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von Zellsuspensionen wurde mit einem Einstrahlphotometer in Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm bestimmt. Kulturdichten von *Escherichia coli* wurden bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Das Wachstum von Cyanobakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei 730 nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption der cyanobakteriellen Pigmente vernachlässigbar (Stomp *et al.*, 2007). Eine Ausnahme bildet hierbei *Acaryochloris marina*, dessen Hauptpigment Chlorophyll *d* bei 730 nm eine starke Absorption zeigt (Larkum und Kühl, 2005). Daher wurde die optische Dichte in diesem Fall bei 760 nm bestimmt.

Tabelle 4.2 bietet eine Übersicht über die verwendeten Wellenlängen sowie die experimentell bestimmten Korrelationsfaktoren zur Ermittlung der Biotrockenmasse (BTM) aus der optischen Dichte. Bei dem Matten-bildenden Cyanobakterium *Lyngbya* PCC 8106 sowie bei Stämmen, die makroskopische Kolonien bildeten, wurde keine optische Dichte, sondern stets unmittelbar die Biotrockenmasse bestimmt.

**Tabelle 4.2:** Wellenlängen zur Messung der optischen Dichte und Korrelationsfaktoren zur Bestimmung der Biotrockenmasse aus der optischen Dichte (Schichtdicke 10 mm)

Mikroorganismus	Wellenlänge,	Korrelationsfaktor $f_x$ ,
	nm	$g_{BTM} L^{-1}$
<i>Acaryochloris marina</i>	760	0,496
<i>Anabaena variabilis</i>	730	0,786
<i>Escherichia coli</i> Tuner MBP-KR	600	0,332
<i>Nostoc</i> PCC 7120	730	0,857
<i>Prochlorococcus</i> RCC 158	730	0,560
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	730	0,554
<i>Synechococcus</i> RCC 307	730	0,571
<i>Synechococcus</i> RCC 555	730	0,483
<i>Synechococcus</i> RCC 556	730	0,423
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	730	0,433
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	730	0,270
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	730	0,415

Die Umrechnung der gemessenen optischen Dichte in die Konzentration der Biotrockenmasse erfolgte anhand Gleichung 4.1.

$$c_x = OD \cdot f_x \quad (4.1)$$

- $c_x$  Konzentration der Biotrockenmasse, g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>  
 $OD$  Optische Dichte bei einer Wellenlänge nach Tabelle 4.2, -  
 $f_x$  Korrelationsfaktor, g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>

### 4.3.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die direkte Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch. Zur Sedimentation von *Escherichia coli*-Zellen (Tischzentrifuge, 13.000 min<sup>-1</sup>, Raumtemperatur (RT), 5 min) wurden bei 80 °C getrocknete und gewogene 1,5 mL-Eppendorfreaktionsgefäße verwendet. Die Zellen wurden einmal mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS, pH 7,3, Tabelle A.17) gewaschen und erneut pelletiert. Cyanobakterien wurden entweder in 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäßen oder 10 mL-Reagenzgläsern aus Kunststoff zentrifugiert. Zellen von limnischen Cyanobakterien wurden einmal, Zellen mariner Cyanobakterien zweimal mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Nachfolgend wurde das Sediment bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen. Die Konzentration der Biotrockenmasse wurde anschließend nach Gleichung 4.2 berechnet.

$$c_x = \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \quad (4.2)$$

- $c_x$  Konzentration der Biotrockenmasse, g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>  
 $m_{\text{voll}}$  Masse des Probengefäßes mit Zellen nach der Trocknung, g  
 $m_{\text{leer}}$  Masse des leeren Probengefäßes, g  
 $V$  Volumen der Zellsuspension vor der Sedimentation, L

### 4.3.3 Stammhaltung von Cyanobakterien

Cyanobakterien wurden zur Stammhaltung je nach Empfehlung der Stammsammlung entweder auf 1,5 %igem Schrägagar oder in Flüssigkulturen bei Raumtemperatur und Laborlicht kultiviert. Das verwendete Medium richtete sich nach den stammabhängigen Erfordernissen der Cyanobakterien (Kapitel 4.2.3).

Für Cryokulturen wurden Zellen der späten exponentiellen Phase in sterilen Zentrifugenbechern sedimentiert (4528 x g, RT, 5-30 min je nach Stamm). Beim Resuspendieren des Zellpellets in mit 50 % VE-H<sub>2</sub>O verdünntem Medium wurde eine optische Dichte von 6 eingestellt,

die bei den in Tabelle 4.2 angegebenen Wellenlängen gemessen wurde. Anschließend wurden die Zellen in Cryoröhrchen überführt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln gelagert wurden. Zur Reaktivierung der Cryokultur wurde das Cryoröhrchen schnell auf Raumtemperatur gebracht und zentrifugiert ( $4528 \times g$ , RT, 5-30 min je nach Stamm). Anschließend wurde das halbstarke Medium gegen 1 mL frisches Medium ersetzt, in dem die Zellen resuspendiert wurden. Die Suspension wurde daraufhin 1-2 Tage in völliger Dunkelheit bei der jeweiligen Kultivierungstemperatur der Cyanobakterien (Kapitel 4.3.4) mit leicht angedrehter Schraubkappe gelagert, um Gasaustausch zu gewährleisten. Anschließend konnte die reaktivierte Cryokultur zum Animpfen von Flüssigkulturen oder auch zum Ausstrich auf einem Schrägagar verwendet werden.

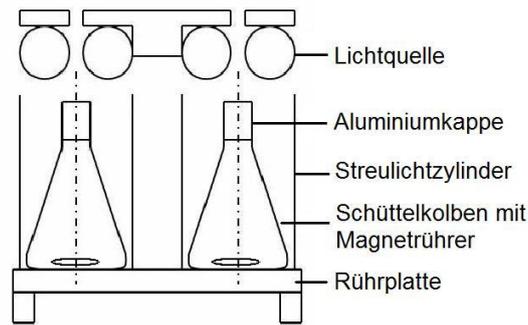
#### 4.3.4 Kultivierung von Cyanobakterien

Die Anzucht von Cyanobakterien richtete sich nach dem von Franco-Lara *et al.* (2006) entwickelten, dreistufigen Kultivierungsprozess. Die Kultivierung erfolgte zunächst in gerührten Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL, worauf die Anzucht in 250 mL-Blasensäulen folgte. Den Abschluss bildete die Kultivierung im 20 L-Rührkesselreaktor. Besonderheiten ergaben sich bei den Cyanobakterien, die von der *Roscoff Culture Collection* bezogen worden waren.

Alle Cyanobakterien wurden unter photoautotrophen, nicht-stickstofffixierenden Bedingungen gezüchtet. Die Beleuchtung erfolgte bei jeder Kultivierungsstufe durch paarweise angeordnete Leuchtstoffröhren der Typen Fluora L 77 und SunGlo, die in Kombination das gewünschte Tageslichtspektrum sehr gut abbildeten (Havel, 2006). Die Lichtintensität wurde mit einem Quantummeter Li-250 A in Kombination mit einem Quantumsensor Li-190 SZ gemessen. Limnische, terrestrische und euryhaline Cyanobakterien wurden bei  $25^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Bei marinen Stämmen betrug die Kultivierungstemperatur  $20^{\circ}\text{C}$ , während *Thermosynechococcus* BP-1 bei  $45^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurde (Folea *et al.*, 2008).

##### Gerührter 100 mL-Erlenmeyerkolben

Zu Beginn wurden die Cyanobakterien in Erlenmeyerkolben mit einem Nominalvolumen von 250 mL kultiviert, die mit 100 mL Medium befüllt waren. Als Inokulum diente ein Impfösenabstrich eines Schrägagarröhrchens oder 1 mL einer Flüssigkultur. Die Zellsuspensionen wurden mit einem Magnetrührer bei  $200 \text{ min}^{-1}$  durchmischt und in einem Kühlbrutschrank inkubiert. Die Verwendung von Streulichtzylindern ( $\varnothing 0,1 \text{ m}$ ) ermöglichte eine reproduzierbare und gleichmäßige Beleuchtung, wie in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Kultivierung in gerührten Kolben.

Mit Hilfe von Lochblenden, die eine verschiedene Anzahl von Bohrungen mit unterschiedlichen Durchmessern besaßen und auf den Zylindern befestigt wurden, konnten Lichtintensitäten zwischen 15 und 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eingestellt werden. Die Beleuchtungsstärke berechnete sich hierbei über die optische Porosität  $\kappa$ , die das Verhältnis zwischen der Lochfläche und der gesamten Blendenfläche wiedergibt:

$$A_{\text{Blende}} = \frac{\pi \cdot D^2}{4} \quad (4.3)$$

$$A_{\text{Loch}} = \sum \frac{\pi \cdot d^2}{4} \quad (4.4)$$

$$\kappa = \frac{A_{\text{Loch}}}{A_{\text{Blende}}} \quad (4.5)$$

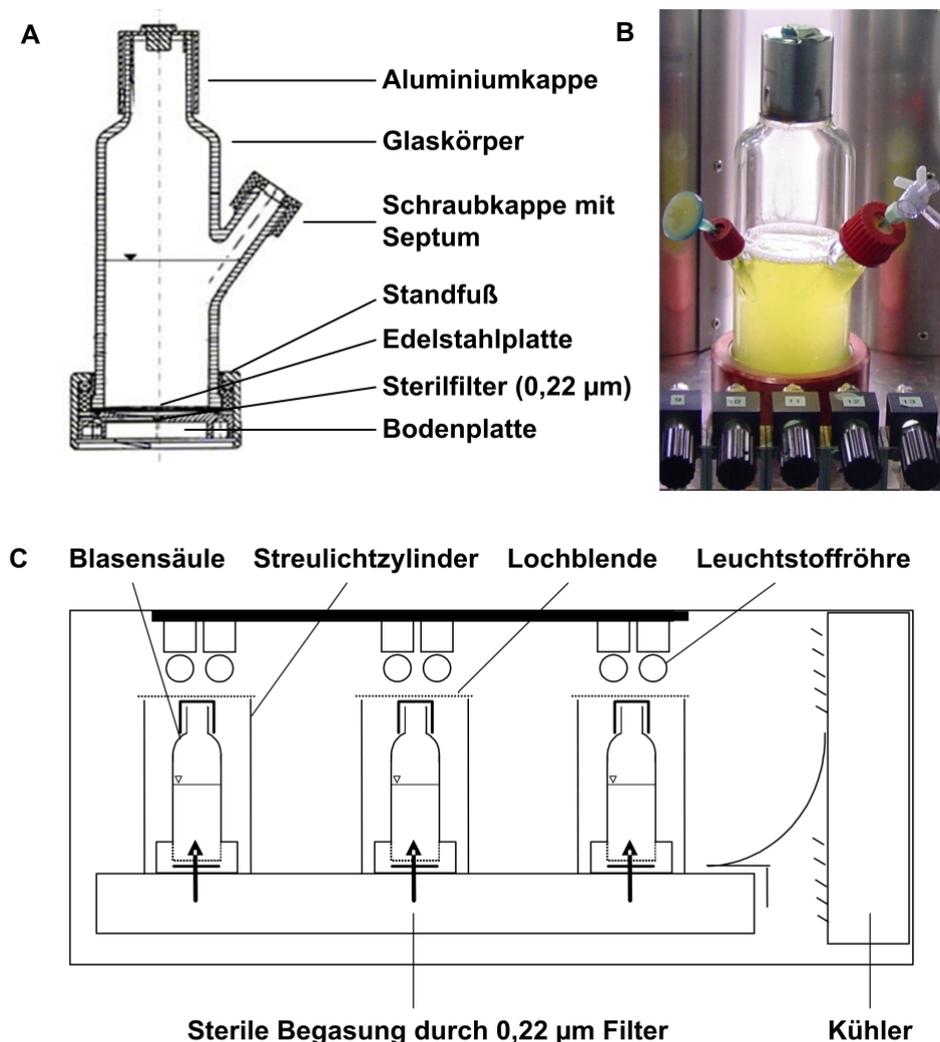
$$I = \kappa \cdot I_0 \quad (4.6)$$

$A_{\text{Blende}}$	Fläche der Blende, $\text{m}^2$
$D$	Durchmesser des Streulichtzylinders, m
$A_{\text{Loch}}$	Summe der Lochflächen in der Blende, $\text{m}^2$
$d$	Durchmesser der Bohrungen, m
$\kappa$	optische Porosität, -
$I$	Lichtintensität, $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$I_0$	maximale Lichtintensität, $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Der Einfluss der Beleuchtungsintensität auf das Wachstum wurde durch Variation zwischen 15 und 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestimmt. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Anzuchtbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Stämme idealerweise bei 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert. Hatte die Kultivierung unter diesen Bedingungen aufgrund einer auftretenden Photoinhibition eine signifikant reduzierte Wachstumsrate zur Folge, so wurden die Wachstumsbedingungen angepasst.

## 250 mL-Blasensäule

Für die zweite Stufe des Kultivierungsprozesses wurden Blasensäulen mit einem Nominalvolumen von 400 mL und einem Arbeitsvolumen von 250 mL verwendet, die in Abbildung 4.2 A und B dargestellt sind. Der zugehörige Profors-Inkubator war von Havel *et al.* (2008) modifiziert worden, um eine Kultivierung von phototrophen Mikroorganismen in bis zu 16 parallelen Blasensäulen zu ermöglichen. Abbildung 4.2 C zeigt eine schematische Darstellung des modifizierten parallelen Blasensäulensystems.



**Abbildung 4.2:** Kultivierung in 250 mL-Blasensäulen. **A)** Schematische Darstellung der 250 mL-Blasensäule. **B)** Blasensäule mit einer Kultur von *Synechococcus* RCC 556. **C)** Seitlicher Querschnitt durch das parallele Blasensäulensystem (nach Havel *et al.* (2008)).

Als Inokulum für die Blasensäulen dienten  $1,35 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  Zellen aus gerührten Kolben. Die Reaktoren wurden über einen Sterilfilter ( $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ ) mit  $\text{CO}_2$ -angereicherter Reinluft (5,0 %) begast. Der feuchtigkeitsgesättigte Zuluftstrom betrug  $6\text{-}10 \text{ L h}^{-1}$ . Die Verwendung von lasergebohrten Edelstahlplatten (Porendurchmesser  $60 \text{ } \mu\text{m}$ ) im Anschluss an den Sterilfilter ermöglichte die Erzeugung von definierten Gasblasen (Altenbach-Rehm *et al.*, 1999). Durch Septen in den Schraubkappen wurden sterile Kanülen eingeführt, die in Kombination mit einem Dreiwegehahn eine Probenentnahme innerhalb des Inkubators ermöglichten. Über einen Sterilfilter konnte ferner  $\text{VE-H}_2\text{O}$  zugegeben werden, um Verdunstungseffekte auszugleichen.

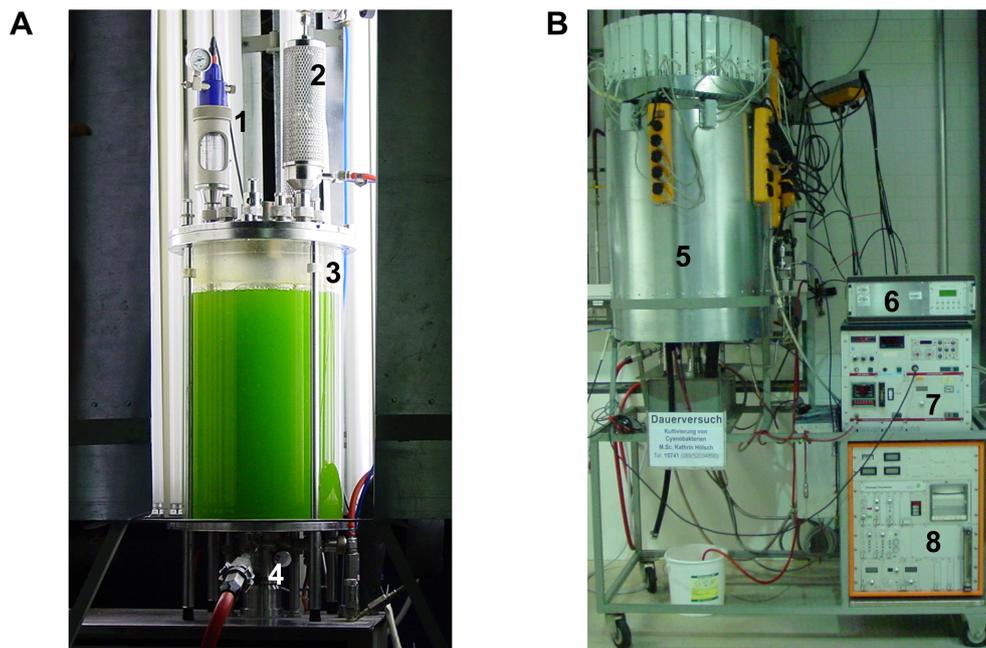
Analog zur Kultivierung in den gerührten Kolben wurden mit Streulichtzylindern ( $\text{Ø } 0,132 \text{ m}$ ) und Lochblenden reproduzierbare Lichtintensitäten in den Reaktoren eingestellt. Die Wachstumsbedingungen in den Blasensäulen entsprachen jeweils denen aus den gerührten Kolben.

#### 20 L-Rührkesselreaktor

Für den abschließenden Kultivierungsschritt im 20 L-Rührkesselreaktor, der in Abbildung 4.3 dargestellt ist, wurde dieser mit 20 L des geeigneten Mediums befüllt und *in situ* sterilisiert. Der Wasserverlust im Verlauf der Sterilisation betrug in etwa 0,25 L (Havel, 2006), was im Rahmen der Inokulation wieder ausgeglichen wurde. Nach dem Abkühlen des Mediums auf die Kultivierungstemperatur des jeweiligen Cyanobakteriums wurde bei Bedarf  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  Vitamin  $\text{B}_{12}$  steril durch eine Anstechvorrichtung ergänzt. Anschließend wurde mit  $1,35 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  Zellen aus den Blasensäulen angeimpft.

Die Kultivierung im Reaktor erfolgte bei einer Begasungsrate von  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  (Borodin *et al.*, 2002) mit Reinluft bei einer Rührerdrehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$ , um die Sedimentation der Zellen zu verhindern. Durch eine Verknüpfung der pH-Einheit des Reaktors mit der Gasmischstation wurde der pH während der Kultivierung über den  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Zuluft geregelt.

Über einen Beleuchtungsmantel mit 18 paarweise angeordneten Leuchtstoffröhren, die einzeln zuschaltbar waren, konnte eine symmetrische Beleuchtung mit einer Intensität zwischen  $36$  und  $528 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  erzielt werden. Die Photonenflussdichte wurde nach dem von Franco-Lara *et al.* (2006) optimierten Profil variiert: nach einer Anpassungsphase von 96 h bei  $36 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , folgten im 24 h-Takt Intensitätssteigerungen auf 300, 436 und  $528 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Nach einer Inkubation bei  $528 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  für weitere fünf Tage war der Kultivierungsprozess abgeschlossen.



**Abbildung 4.3:** 20 L-Rührkesselreaktor. **A)** Frontansicht. 1: pH-Sonde, 2: Abluftfilter, 3: Rührkessel, 4: Ernteventil. **B)** Seitenansicht mit Steuereinheiten. 5: Lichtanlage, 6: Gasmischstation, 6: Sterilisationsmodul, 7: Prozesssteuerungsmodul.

#### 4.3.5 Besonderheiten der Kultivierung mariner Cyanobakterien des Roscoff-Instituts

Viele marine Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* reagieren bereits im picomolaren Bereich überaus sensitiv auf die Anwesenheit Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Mann *et al.*, 2002). Das Wachstum der marinen Vertreter der Gattung *Synechococcus* hingegen wird tendenziell erst bei 10-fach höheren Kupferkonzentrationen inhibiert. Die Sensitivität ist jedoch stark stammabhängig und es gibt auch sehr kupferempfindliche *Synechococcus*-Stämme (Mann *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 1986). Aus diesem Grund wurden alle Cyanobakterien, die von der *Roscoff Culture Collection* bezogen wurden, zunächst in den von der Stammsammlung empfohlenen T-25 Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (Anhang A.1, Tabelle A.7) kultiviert. Hierbei waren keine Verunreinigungen der Medien durch Kupferionen zu erwarten, die an dem Material anderer Kultivierungsgefäße wie Erlenmeyerkolben adsorbiert sein könnten. Somit wurde das dreistufige Kultivierungsprotokoll von Franco-Lara *et al.* (2006) bei diesen Stämmen um eine Vorstufe erweitert.

Für die Herstellung von Medien sowie für die Kultivierung in Glasgefäßen mussten die verwendeten Glaswaren zunächst vorbehandelt werden, um das an den Oberflächen adsorbierte Kupfer zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden die Glasgefäße über Nacht in 1 M Salzsäure

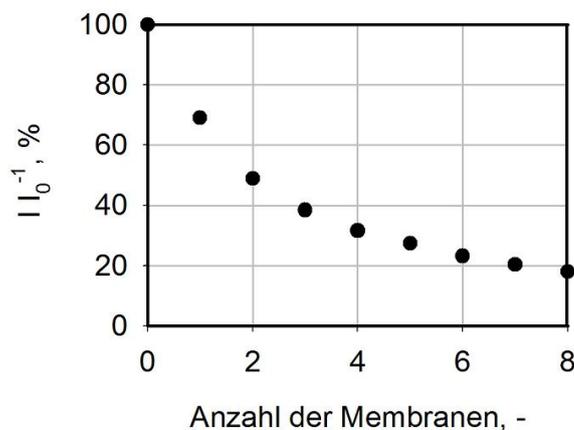
eingelegt und anschließend sechsmal mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) ausgespült (Zinser *et al.*, 2006).

Die Gewebekulturflaschen wurden stets mit 40 mL Medium befüllt und das Überimpfen in eine andere Flasche erfolgte höchstens im Verhältnis 1:8 (v:v). Die Kultivierungsparameter wurden von der Stammsammlung vorgegeben und sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

**Tabelle 4.3:** Wachstumsbedingungen der marinen Cyanobakterien aus der *Roscoff Culture Collection* (RCC)

Cyanobakterium	Wachstumstemperatur °C	Lichtintensität, μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	20	20
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	20	20
<i>Synechococcus</i> RCC 307	20	40
<i>Synechococcus</i> RCC 555	20	100
<i>Synechococcus</i> RCC 556	20	100

Da die in Kapitel 4.3.4 beschriebenen Lochblenden nur bei gerührten Systemen nutzbar sind, wurde die Lichtintensität in den unbewegten Gewebekulturflaschen durch die Verwendung verschiedener Lagen von Polypropylen-Membranen (Anhang A.1, Tabelle A.7) eingestellt. Abbildung 4.4 gibt die Abhängigkeit der Lichtintensität von der Anzahl der Stoffschichten wieder, die auf den Streulichtzylindern fixiert wurden.



**Abbildung 4.4:** Abhängigkeit der Lichtintensität von der Anzahl der verwendeten Polypropylen-Membranschichten.

### 4.3.6 Stammhaltung von *Escherichia coli*

Die kurz- bis mittelfristige Stammhaltung von *Escherichia coli*-Zellen erfolgte auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Selektionsmarkern, die in der Regel acht Wochen im Kühlschrank bei 4°C lagerbar waren. Anschließend wurde eine neue Platte durch eine frische Transformation mit dem jeweiligen Plasmid hergestellt. Von viel verwendeten Stämmen wurde für die langfristige Konservierung eine Zellbank angelegt. Zu diesem Zweck wurden eine *Escherichia coli*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,8$ ) mit 15 % (v/v) Glycerin versetzt, in sterile 1,5 mL-Eppendorfreaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 4.3.7 Zellaufschluss von *Escherichia coli*

#### Zellaufschluss mit Glasperlen

*Escherichia coli*-Zellen wurden mit 50 % (v/v) Glasperlen in der Schwingarmmühle für 3 min bei  $1800 \text{ min}^{-1}$  aufgeschlossen. Die Biomassekonzentration der Zellsuspension war abhängig vom durchgeführten Experiment und wird bei den präparativen Methoden angegeben.

#### Enzymatischer Zellaufschluss

Die enzymatische Lyse von *Escherichia coli*-Zellen wurde nach einem Protokoll des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) durchgeführt ([http://www.pepcore.embl.de/protein\\_purification/extraction\\_clarification/enzymaticlysis\\_ecoli.html](http://www.pepcore.embl.de/protein_purification/extraction_clarification/enzymaticlysis_ecoli.html)).

Das bakterielle Zellpellet wurde in Lysepuffer (Anhang A.6, Tabelle A.17) in einem Verhältnis von 1 g Feuchtmasse zu 5 mL Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), ein Proteaseinhibitor zur Verhinderung von Proteindegradation, und Lysozym mit einer Endkonzentration von  $300 \text{ mg L}^{-1}$  hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde bei 4°C für 4 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  DNase I, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 min, 4°C).

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

Alle Pufferlösungen, die in den nachfolgend beschriebenen molekulargenetischen Methoden Verwendung fanden, sind in Tabelle A.17 (Anhang A.6) zusammengefasst.

### 4.4.1 Isolation von genomischer DNA aus Cyanobakterien

#### Protokoll nach Wu *et al.* (2000)

Die Isolation genomischer DNA aus Cyanobakterien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Wu *et al.* (2000). Zu diesem Zweck wurden 50 mL Zellen einer Cyanobakterienkultur in der späten exponentiellen Phase sedimentiert (4528 x g, 4°C, 5-30 min je nach Stamm). Die Zellen wurden in 10 mL DNA-Isolationspuffer I resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 100 µL 10 % (w/v) N-Laurylsarcosin versetzt und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4528 x g, 4°C, 5-30 min je nach Stamm) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 20 mL DNA-Isolationspuffer II gewaschen und in 2,5 mL DNA-Isolationspuffer II resuspendiert. Nach der Zugabe von 125 µL einer frisch angesetzten Lysozymlösung (12,5 g L<sup>-1</sup>) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C im Thermomixer bei 450 min<sup>-1</sup> geschüttelt und nachfolgend mit 30 µL 10 % SDS (w/v) versetzt. Nach einer Lagerung für 10 min bei Raumtemperatur wurde Proteinase K mit einer Endkonzentration von 50 µg mL<sup>-1</sup> hinzugegeben. Die Kombination aus SDS und Proteinase K ist ein wichtiger Faktor für eine effektive Zellyse. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min sollte die Lösung viskos wirken. Es folgte eine 1:1 Phenol-Chloroform-Extraktion, wonach der Ansatz zur Klärung über Nacht bei 4°C gelagert wurde. Der klare Überstand wurde abgenommen, in ein 15 mL-Probenröhrchen überführt, zunächst mit einem 2/3 Volumen 5 M NaCl-Lösung und anschließend mit einem Volumen Isopropanol gemischt. Die in sichtbaren Klumpen ausgefallene DNA wurde mit einer abgeschnittenen sterilen Pipettenspitze in ein 1,5 mL-Eppendorfreaktionsgefäß mit 70 % Ethanol überführt, anschließend sedimentiert (Tischzentrifuge, 13.000 min<sup>-1</sup>, RT, 5 min) und unter der Sterilbank getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 50 µL VE-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C gelagert. Der Erfolg der DNA-Isolation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### Protokoll nach Saha *et al.* (2005)

Bei den Cyanobakterien *Lyngbya* PCC 8106 und *Cyanothece* PCC 8801 war die Isolation nach dem Protokoll von Wu *et al.* (2000) nicht erfolgreich, weswegen auf ein Protokoll von Saha *et al.* (2005) zurückgegriffen wurde. Hierfür wurden Cyanobakterien in der späten exponentiellen Phase geerntet (4528 x g, 4°C, 5-30 min je nach Stamm) und zweimal mit DNA-Isolationspuffer III gewaschen. Ein Zellpellet, das einem Volumen zwischen 30 und 40 µL entsprach, wurde in 200 µL DNA-Isolationspuffer IV aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µL frisch angesetzter Lysozymlösung (25 g L<sup>-1</sup>) wurden die Zellen für 60 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden 50  $\mu\text{L}$  10 % SDS (w/v) hinzugegeben und der Ansatz wurde gemischt. Nach 10 Minuten wurden 3  $\mu\text{L}$  Proteinase-K-Lösung (20 g  $\text{L}^{-1}$ ) hinzugefügt. Der Ansatz wurde nach 60 min bei 60°C mit 300  $\mu\text{L}$  eiskalter 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,5) durch mehrmaliges, sanftes Invertieren neutralisiert und auf Eis gelagert. Das Zellysate wurde anschließend zentrifugiert (10.000  $\times$  g, 4°C, 10 min) und der klare Überstand wurde in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach einer 1:1 Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der Überstand sowie die entstandene DNA-haltige Mittelschicht vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Nach einer sequentiellen Rückextraktion mit 300  $\mu\text{L}$  1:1-Phenol-Chloroform und anschließend 300  $\mu\text{L}$  reinem Chloroform, wurden wiederum Überstand und mittlere Phase in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit -20°C kaltem Ethanol gefällt, pelletiert (15.000  $\times$  g, 4°C, 15 min) und mit 70 % Ethanol über Nacht bei 4°C gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde unter der Sterilbank getrocknet und in 50  $\mu\text{L}$  sterilem VE- $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

#### 4.4.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* erfolgte bei Mengen bis zu 20  $\mu\text{g}$  mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits und bei Mengen bis 500  $\mu\text{g}$  mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach den Herstellerangaben.

#### 4.4.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) in einem Volumen von 50  $\mu\text{L}$  mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: 2  $\mu\text{L}$  genomische oder 50 ng Plasmid-DNA, 20 pmol pro Oligonukleotid, je 0,2 mM der Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs), 1 U Phusion<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase bzw. 2,5 U Cloned *Pfu*- bzw. *Taq*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Enzyms. Das Temperaturprogramm richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotiden (Anhang A.5) und den Herstellerangaben der Polymerasen.

#### 4.4.4 Reinigung von DNA

DNA-Fragmente mit mehr als 100 Basenpaaren (bp) wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben gereinigt. Für kleinere Fragmente wurde der QIAquick Nucleotide Removal Kit verwendet. Zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit eingesetzt.

### 4.4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde anhand der Absorption bei 260 nm im UV-Spektrometer in einer Quarzküvette bestimmt. Eine Absorption  $A_{260}=1$  entspricht hierbei einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Zur Beurteilung der Reinheit der DNA wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm herangezogen, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 für eine hohe Reinheit sprach (Sambrook *et al.*, 1989).

### 4.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte in 1 %igen Agarosegelen, die  $0,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Ethidiumbromid enthielten und für einen Trennbereich von 0,3-10 Kilobasenpaaren (kb) geeignet waren. Die Elektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für 20-45 min durchgeführt.

### 4.4.7 Restriktion und Ligation von DNA

Für die analytische und die präparative Spaltung von DNA wurden in der Regel  $0,5 \text{ } \mu\text{g}$  DNA und 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte unter den vorgeschriebenen Reaktionsbedingungen für das verwendete Restriktionsenzym bzw. die Restriktionsenzymkombination. Für den Verdau von Plasmiden mit NotI wurde entsprechend der Herstellerempfehlung die 5-fache Menge an Restriktionsenzym verwendet. Um die Religation eines geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dieser im Anschluss an die Restriktion in zwei Durchgängen mit 5 U Antarctic Phosphatase für jeweils 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei  $65^\circ\text{C}$  deaktiviert und das dephosphorylierte Plasmid gereinigt. Zuvor geschnittene und gereinigte DNA-Fragmente wurden unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase mit dem Plasmid ligiert. Für die Ligation wurde ein dreifacher molarer Überschuss der zu inserierenden Ziel-DNA eingesetzt. Bei der Klonierung von Fragmenten unter 100 bp wurde ein 20facher Überschuss gewählt. Je 200 ng der Vektor-DNA wurden mit der entsprechenden Menge an Ziel-DNA und 10 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei  $16^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 4.4.8 Herstellung von kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Für die Transformation von *Escherichia coli* JM 109(DE3) wurden kompetente Zellen nach einem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Dazu wurde eine 100 mL-Flüssigkultur mit einer optischen Dichte  $\text{OD}_{600}=0,5$  mit 4 mL 1 M  $\text{MgCl}_2$  versetzt und 10 min weiter im

Schüttler (37°C, 250 min<sup>-1</sup>, 5 cm Exzentrizität) inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 1 h auf Eis gekühlt und 5 min bei 4°C und 4528 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 mL CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und wiederum 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (4525 x g, 4°C, 5 min) wurde das Sediment in 4 mL einer Mischung aus der CaCl<sub>2</sub>-Lösung (85 % (v/v)) und Glycerin (15 % (v/v)) aufgenommen und in 200 µL Portionen aufgeteilt. Die Zellen wurden entweder direkt im Anschluss mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die *Escherichia coli*-Stämme XL-10 Gold, Tuner(DE3) und Rosetta 2(DE3) wurden in Form von kompetenten Zellen erworben.

#### 4.4.9 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation der kommerziell erhältlichen kompetenten Zellen erfolgte nach dem jeweiligen Herstellerprotokoll. Für die Transformation von *Escherichia coli* JM 109(DE3) wurden je 200 µL kompetente Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschritt für 1 min bei 42°C wurde der Ansatz wieder auf Eis abgekühlt. Nach 2 min auf Eis wurden 800 µL SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz wurde für 60 min bei 37°C und 300 min<sup>-1</sup> im Thermomixer inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge, 1000 min<sup>-1</sup>, RT, 10 min) wurde das Bakterienpellet in 150 µL SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Agarplatte wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 4.4.10 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Die Kolonie-Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR) ist eine schnelle Methode zur Evaluierung, ob die gewünschte Ziel-DNA nach Ligation und Transformation im Vektor vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden Abstriche von Einzelkolonien auf Agarplatten in 10 µL VE-H<sub>2</sub>O suspendiert, 5 min bei 95°C inkubiert und dann direkt in der PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen wurden für die Amplifizierung Oligonukleotide verwendet, die auf dem Vektor banden und nicht in dem einzufügenden DNA-Fragment. Da die Ligation mit einem Überschuss an Ziel-DNA durchgeführt wurde, hätten ansonsten auch Abstriche vom Agar alleine positive PCR-Ergebnisse ergeben können (Dallas-Yang *et al.*, 1998). Bei der Verwendung von Vektor-Oligonukleotiden gab die Größe des PCR-Produkts Aufschluss über den Erfolg der Insertion der Ziel-DNA. Falls kein Einbau stattgefunden hatte, diente das PCR-Produkt, dessen Größe dem Abstand der Bindestellen der Oligonukleotide

auf dem Plasmid entsprach, als interne Positivkontrolle für die PCR. Befand sich die Ziel-DNA im Vektor, so war das PCR-Produkt dementsprechend größer.

### 4.4.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Der QuikChange<sup>®</sup> Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit diente zur ortsgerechten Mutagenese einzelner Aminosäuren und wurde nach den Herstellerangaben angewendet. Die benötigten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des QuikChange<sup>®</sup> Primer Design Programms erstellt.

### 4.4.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt. Für Sequenzierungen wurden pro 100 bp Länge des zu sequenzierenden Konstruktes 25 ng DNA mit 20 pmol Primer in einem 200 µL-PCR-Gefäß mit flachem Deckel gemischt. Bei Plasmiden wurden generell 600 ng DNA eingesetzt. Nach Möglichkeit sollte ein Gesamtvolumen von 7 µL eingestellt werden.

## 4.5 Proteinchemische Methoden

### 4.5.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Trenn- und Sammelgel benutzt (Laemmli, 1970; Fling und Gregerson, 1986). Alle hierfür benötigten Pufferlösungen sind in Tabelle A.18 (Anhang A.6) zusammengefasst. Es wurden 10 bis 15 %ige Trenngele in Kombination mit einem 3 %igen Sammelgel verwendet. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.4 angegeben.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5x Laemmlipuffer versetzt. Unlösliche Fraktionen wurden in 1x Laemmlipuffer aufgenommen. Für eine vollständige Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 min bei 95°C inkubiert.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde der Roti<sup>®</sup>-Mark Standard (14-212 kDa) eingesetzt, während für densitometrische Analysen der für diesen Zweck geeignete Perfect Protein Marker (10-225 kDa) verwendet wurde. Proteinkonzentrationen konnten durch das Auftragen verschiedener Volumina des definierten Standards quantifiziert werden. Im Falle der 50 kDa-Bande entsprach der Auftrag von 1 µL exakt 0,2 µg Protein, im Falle aller anderen Banden 0,1 µg. Die Gele wurden nach der Coomassie-Färbung digitalisiert und mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet.

**Tabelle 4.4:** Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen der SDS-PAGE

	Sammelgel		Trenngel	
	5,0 %	10,0 %	12,5 %	15,0 %
Acrylamid, 40 %	5,0 mL	10,0 mL	12,5 mL	15,0 mL
2x Sammelgelpuffer	20,0 mL	-	-	-
4x Trenngelpuffer	-	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL
ddH <sub>2</sub> O	15,0 mL	20,0 mL	17,5 mL	15,0 mL
Gesamtvolumen	40,0 mL	40,0 mL	40,0 mL	40,0 mL
Polymerisation:				
Volumen pro Gel	2,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL
APS, 10 %	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

### 4.5.2 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurde ein modifiziertes Protokoll von Fairbanks *et al.* (1971) verwendet, dessen Nachweisgrenze bei 50-100 ng Protein liegt. Die Zusammensetzungen der benötigten Lösungen sind in Tabelle A.20 (Anhang A.6) aufgelistet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele nacheinander in die drei Fairbanks-Lösungen A, B und C gelegt, kurz darin aufgekocht und anschließend für 5 min geschwenkt. Um den Entfärbeprozess durch Lösung C zu beschleunigen, wurde nach dem Kochen ein Stück handelsüblicher Küchenrolle in die Färbeschale gelegt, wodurch überschüssiges Coomassie Brilliant Blau R250 aufgenommen wurde.

### 4.5.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988) ist sensitiver als die Färbung nach Fairbanks und kann bei richtiger Handhabung Proteinmengen nachweisen, die im Bereich von 10 ng liegen. Tabelle A.20 (Anhang A.6) gibt eine Übersicht über die benötigten Lösungen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 20 min in Silberfixierlösung I und daraufhin mindestens 30 min in Silberfixierlösung II geschwenkt. Im Anschluss an drei 10minütige Waschschriffe mit ddH<sub>2</sub>O wurden die Gele für 30 min in Silberfärbelösung eingelegt. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von Entwicklungslösung gestartet und bei ausreichender Färbung mit Stopplösung beendet.

#### 4.5.4 Blaue Nativgelelektrophorese

Die Blaue Nativgelelektrophorese wurde von Hermann Schägger ursprünglich zur Isolierung von mitochondrialen Membranproteinkomplexen entwickelt (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994). Heutzutage wird die Blaue Nativgelelektrophorese generell zur Auftrennung und Untersuchung von Proteinkomplexen in ihrer nativen Form verwendet. Der im Kathodenpuffer enthaltene anionische Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 bindet an hydrophobe Proteinoberflächen und bewirkt damit eine negative Ladung, die eine Auftrennung im elektrischen Feld erlaubt. Es wurden 13 %ige und 20 %ige konstante Gele angefertigt, die jeweils mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet wurden. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Gele sind in den Tabellen A.19 (Anhang A.6) und 4.5 aufgelistet.

**Tabelle 4.5:** Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen der Blauen Nativgelelektrophorese

	Sammelgel		Trenngel	
	4,0 %	13,0 %	20,0 %	
Acrylamid, 40 %	0,6 mL	4,875 mL	7,5 mL	
3x BN-Gelpuffer	2,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	
Glycerin	-	2,4 mL	2,4 mL	
ddH <sub>2</sub> O	3,4 mL	2,725 mL	0,1 mL	
Gesamtvolumen	6,0 mL	15,0 mL	15,0 mL	
Polymerisation:				
Volumen pro Gel	2,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	
APS, 10 %	50 µL	75 µL	75 µL	
TEMED	5 µL	7,5 µL	7,5 µL	

Der BN-Kathodenpuffer musste vor Gebrauch mehrere Stunden gerührt und bei Raumtemperatur gelagert werden, da der Coomassie-Farbstoff bei niedrigen Temperaturen zur Aggregatbildung neigt (Wittig *et al.*, 2006). Die Blaue Nativgelelektrophorese wurde bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Die Probe sowie geeignete Markerproteine wurden im Verhältnis 1:2 mit 2x BN-Probenpuffer verdünnt und aufgetragen. Bis die Proben das Trenngel erreichten, wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurde die Trennung bei 300 V und 15 mA fortgesetzt. Nachdem die Lauffront etwa bei der Hälfte des Gels angekommen war, wurde der blaue BN-Kathodenpuffer gegen farbstofffreien BN-Kathodenpuffer ausgetauscht und die Auftrennung bis zum Gelende weitergeführt.

### 4.5.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

#### BCA-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit, der für Proteinkonzentrationen zwischen 20 und 2000 mg L<sup>-1</sup> geeignet ist und nach den Herstellerangaben angewendet wurde. Der BCA-Assay wurde von Smith *et al.* (1985) entwickelt und beruht auf einer Kombination aus Biuret-Assay und Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA). Proteine reduzieren im Alkalischen Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>, woraufhin Bicinchoninsäure mit dem einwertigen Cu<sup>+</sup> einen intensiv lilafarbenen Komplex bildet. Dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann photometrisch bei Wellenlängen zwischen 540 und 590 nm detektiert werden.

#### UV-Absorption bei 280 nm

Um eine grobe Einschätzung der Proteinkonzentration zu treffen, wurde die UV-Absorption bei 280 nm gemessen, die hauptsächlich auf der Absorption der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan basiert (Lottspeich und Zorbas, 1998). Somit ist der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  proteinspezifisch. Die Absorption einer 1 %igen Lösung (w/v) ( $A^{1\%}$ ) liegt bei den meisten Proteinen im Bereich zwischen  $A_{280} = 0,4$  und 1,5 (Lottspeich und Zorbas, 1998). Das Programm ProtParam wurde für die Berechnung von  $A^{1\%}$  für die zu vermessenden Proteine herangezogen.

## 4.6 Proteinreinigungsmethoden

Zur präparativen Trennung von Proteinen stand eine automatisierte *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Anlage zur Verfügung. Die Signale des Fraktionskollektors sowie des UV-Spektrophotometers, das die Absorption bei 280 nm verfolgte, wurden mit Hilfe eines LabView-Programms aufgezeichnet und ausgewertet. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle A.16 (Anhang A.6) zusammengefasst.

### 4.6.1 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde zur Proteinreinigung und für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen eingesetzt. Für diese Zwecke wurde eine Hi-Load 26/60 Superdex 200 Säule mit einem Trennbereich zwischen 10 – 600 kDa verwendet. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert und mit maximal

12 mL des Proteingemisches beladen, das mit einer Flussrate von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  aufgetrennt wurde. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Markerproteinen im relevanten Größenbereich bei einer Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Die erhaltenen Daten wurden anhand Gleichung 4.7 in Partitionskoeffizienten  $K_{av}$  umgerechnet.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (4.7)$$

$K_{av}$	Partitionskoeffizient, -
$V_e$	Elutionsvolumen, mL
$V_0$	Ausschlussvolumen, mL (hier: 117 mL)
$V_t$	Bettvolumen, mL (hier: 320 mL)

#### 4.6.2 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine mit dem schwachen Anionentauschermaterial DEAE52 gepackte Säule mit einem Volumen von 65 mL verwendet, die während der gesamten Reinigung mit einer Flussrate von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  betrieben wurde. Nach der Äquilibrium mit 5 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer und dem Probenauftrag wurde die Säule mit weiteren 5 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer gespült. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 0 - 3 M NaCl, der durch die Änderung des Mischungsverhältnisses von Niedrigsalz zu Hochsalzpuffer realisiert wurde: 0 - 20 % Hochsalzpuffer über 260 min, anschließend 20 - 100 % Hochsalzpuffer über 130 min.

#### 4.6.3 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Wechselwirkung eines Zielmoleküls mit einem individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Sie gilt als Trennmethode mit der größten Selektivität bei der Reinigung von Biomolekülen (Lottspeich, 1998).

Bei Proteinen, die am C- oder N-Terminus einen exponierten Polyhistidin-Affinitätsanker aufweisen, ist eine Reinigung über Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) möglich. Die rekombinant exprimierten Ketoreduktasen erhielten durch die Klonierung in den Expressionsvektor pETM-41 neben Maltose-bindendem Protein (MBP) auch einen Hexahistidin ( $\text{His}_6$ )-Anhang am N-Terminus. Die Tabakäzavirus (*tobacco etch virus*, TEV)-Protease wurde ebenfalls mit  $\text{His}_6$ -Affinitätsanker exprimiert, der eine Reinigung über Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie ermöglichte. Die Unterschiede in der affinitätschromatogra-

phischen Isolation der Ketoreduktasen und der TEV-Protease lagen nur in der Verwendung unterschiedlicher Puffer: HisTrap-Binde- und Elutionspuffer bzw. TEV-Binde- und Elutionspuffer.

Für die Reinigung wurden HisTrap-Säulen mit einem Säulenvolumen von 1 oder 5 mL verwendet, deren Matrix aus mit Nickelionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ) beladener hochvernetzter Agarose besteht. Nach der Äquilibration der Säule mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer wurde die Probe mit einer Flussrate von einem Säulenvolumen pro Minute auf die Säule aufgetragen. Der Verlauf der Proteinkonzentration wurde durch das UV-Signal bei 280 nm verfolgt. Durch das Waschen mit Bindepuffer wurden nicht gebundene Proteine entfernt bis die Basislinie des UV-Signals wieder erreicht wurde. Das Vorhandensein von geringen Imidazol-Konzentrationen im Puffer verhinderte die unerwünschte Bindung bakterieller Proteine, die aufgrund von Histidin-Resten eine gewisse Affinität zur Säulenmatrix besitzen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten zwischen 0 % und 100 % Elutionspuffer über 20 Säulenvolumina. Anschließend wurde zusätzlich mit 10 Säulenvolumina 100 % Elutionspuffer nachgewaschen. Während der Elution wurden Fraktionen gesammelt, die je zwei Säulenvolumina entsprachen. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden anhand des UV-Signals ermittelt. War keine eindeutige Identifizierung anhand des UV-Signals möglich, wurden die Proben mit einer SDS-PAGE analysiert. Die Reinheit der eluierten Proteine wurde ebenfalls durch eine SDS-PAGE untersucht, die mit Silber gefärbt wurde.

#### **4.6.4 Affinitätschromatographische Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen**

Für die Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie wurden 1 mL GSTrap-Säulen verwendet, die mit 5 Säulenvolumina GSTrap-Bindepuffer bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  äquilibriert wurden. Nach dem Probenauftrag, der bei einer Flussrate von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  erfolgte, wurde mit  $1 \text{ mL min}^{-1}$  Bindepuffer bis zum Erreichen der Basislinie des UV-Signals gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 Säulenvolumina GSTrap-Elutionspuffer bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Die GST-Aktivität konnte im Verlauf der Reinigung mit Hilfe des GST · Tag™ Assay Kit verfolgt werden, der nach den Herstellerangaben verwendet wurde.

Nach der proteolytischen Spaltung der Fusionsproteine durch  $20 \text{ U mL}^{-1}$  Thrombin bei Raumtemperatur über Nacht wurde die Protease mit Hilfe von 1 mL HiTrap Benzamidin-Säulen aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Die Benzamidinsäulen wurden unter Verwendung des Benzamidin-Binde- und Elutionspuffers mit den gleichen Betriebsparametern wie die GSTrap-Säulen äquilibriert, beladen und eluiert.

## 4.7 Präparative Methoden

### 4.7.1 Dialyse

Zur Umpufferung sowie zur Rückfaltung solubilisierter Einschlusskörper wurde eine Dialyse durchgeführt. Die Größenausschlussgrenze der Membran entsprach dabei höchstens dem halben Molekulargewicht der zurückzuhaltenden Substanz.

Vor dem Gebrauch der Dialyseschläuche wurden diese in 10 mM EDTA-Lösung für 30 Minuten auf 80 °C erhitzt, um Verunreinigungen durch Schwermetallionen zu beseitigen. Daraufhin wurden die Dialyseschläuche über Nacht bei Raumtemperatur in frischer EDTA-Lösung inkubiert, woran sich ein 30minütiger Waschschrift in 95 % Ethanol anschloss. Die gereinigten Membranen wurden in einer Lösung von 5 mM EDTA in 47 % Ethanol bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Durchführung einer Dialyse wurde der Dialyseschlauch gründlich mit VE-Wasser gewaschen, um den Lagerpuffer zu entfernen. Nach dem Befüllen des Dialyseschlauches wurden beide Öffnungen mit Schlauchklemmen verschlossen und es wurde gegen ein Puffervolumen von mindestens dem 100fachen Probevolumen dialysiert. Der Pufferaustausch wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren auf einer Rührplatte vorgenommen.

### 4.7.2 Adsorptive Entfernung von Triton X-100 aus Proteingemischen

Da Triton X-100 eine kritische Micellarkonzentration von 0,3 mM besitzt (Lasch, 1995) und Micellen in der Größenordnung von 10 nM bildet (Helenius und Simons, 1975), ist es nicht dialysierbar und wurde durch Bio-Beads SM-2 nach einem Protokoll von Holloway (1973) adsorptiv aus Proteinlösungen entfernt.

Vor dem Gebrauch mussten die Bio-Beads erst durch ein Waschprotokoll aktiviert werden. Hierbei wurden 25 g Bio-Beads SM-2 mit 0,2 L Methanol für 15 min unter Rühren ( $200 \text{ min}^{-1}$ , RT) gewaschen. Das Methanol wurde durch Filtration entfernt und es wurde mit weiteren 0,5 L Methanol und 1 L ddH<sub>2</sub>O nachgewaschen. Die Bio-Beads wurden bis zu ihrem Gebrauch mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet gelagert. Ihre Bindekapazität lag bei 0,05 g Triton X-100 pro g Feuchtgewicht.

Für die Entfernung von Triton X-100 aus Proteingemischen wurde eine der Detergenzmenge angepasste Menge an Bio-Beads zusammen mit der Probe bei 4 °C für 2 h bei  $200 \text{ min}^{-1}$  gerührt und anschließend durch Zentrifugation ( $4528 \times g$ , 4 °C, 10 min) entfernt.

### 4.7.3 Herstellung der Tabakätzvirus-Protease

Die 27 kDa große Tabakätzvirus (*tobacco etch virus*, TEV)-Protease besitzt gegenüber anderen gebräuchlichen Proteasen, wie beispielsweise Faktor Xa und Thrombin, drei wesentliche Vorteile. Zum einen ist die Sequenzspezifität der TEV-Protease viel stringenter. Sie erkennt ausschließlich Epitope der Form ExxYxQ[GS], wobei die Spaltschnittstelle zwischen den letzten beiden Aminosäuren liegt. Das effizienteste Substrat hat die Sequenz ENLYFQS (Parks *et al.*, 1994). Thrombin und Faktor Xa hingegen sind dafür bekannt, dass sie auch zu unspezifischer Proteolyse an unerwünschten Positionen führen können (Jenny *et al.*, 2003). Ferner ist die TEV-Protease keine Serinprotease, sondern besitzt ein Cystein im katalytischen Zentrum (Gorbalenya *et al.*, 1989). Daher können gängige Proteaseinhibitoren, wie beispielsweise PMSF, während der Proteinreinigung verwendet werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die Tatsache, dass die TEV-Protease bei 4 °C ein Drittel ihrer Aktivität bei Raumtemperatur zeigt. Das macht eine schonende Spaltung der Fusionsproteine bei 4 °C über Nacht möglich (Nallamsetty und Waugh, 2007).

Ein wesentlicher Nachteil der TEV-Protease hingegen ist die Instabilität des Enzyms durch Selbstverdau aufgrund einer internen Spaltstelle (Parks *et al.*, 1995). Diese Autoinaktivierung konnte jedoch in der Mutante S219V um den Faktor 100 reduziert werden, wobei zugleich die spezifische Aktivität des Enzyms leicht gesteigert wurde (Kapust *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde nicht die Wildtyp-TEV-Protease eingesetzt, sondern die S219V-Mutante, die nachfolgend aus Gründen der Übersichtlichkeit als TEV-Protease bezeichnet wird.

Für die Herstellung der TEV-Protease wurden zwei 1 L-Schüttelkolben ohne Schikanen mit 200 mL TB-Medium befüllt, mit 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin und 34 mg L<sup>-1</sup> Chloramphenicol supplementiert und mit 0,25 % (v/v) Zellsuspension aus der *Escherichia coli* BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL pRK793 Zellbank angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C, 250 min<sup>-1</sup> und 5 cm Exzentrizität über Nacht inkubiert. Für die anschließende Kultivierung im 4 L-Maßstab wurde ein 7,5 L-Labor-Rührkesselreaktor vom Typ Labfors mit 3,6 L TB-Medium befüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums auf die Kultivierungstemperatur von 37 °C wurden 10 g L<sup>-1</sup> Glukose, 0,05 % (v/v) Antischaummittel Clerol FBA 265, 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin und 34 mg L<sup>-1</sup> Chloramphenicol über eine sterile Anstechvorrichtung ergänzt. Der Reaktor wurde auf eine optische Dichte OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft. Der pH wurde während der Kultivierung durch 12,5 % Ammoniak und 28,3 % Phosphorsäure auf 6,8 geregelt. Über die Rührerdrehzahl (Start bei 600 min<sup>-1</sup>) und die Begasungsrate (4-8 NL min<sup>-1</sup>) wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) zwischen 30 und 40 % geregelt. Während des Prozesses wurden Proben entnommen und die optische Dichte sowie der Glukosegehalt bestimmt. Die Ermittlung der Glukosekonzentration erfolgte mit Hilfe des Blutzuckermessge-

räts Accu-Chek (Messbereich 0,1-6,0 g L<sup>-1</sup>). Bei einer Glukosekonzentration von 0,2 g L<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> ~16-17) wurde die Kultivierungstemperatur auf die optimale Expressionstemperatur der TEV-Protease von 30°C gesenkt. Sobald keine Glukose im Medium mehr nachweisbar war (OD<sub>600</sub> ~19), wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert und die Rührerdrehzahl auf 200 min<sup>-1</sup> gesenkt, da der pO<sub>2</sub> einen negativen Einfluss auf die Proteinexpression der TEV-Protease besitzt (M. Tiemeyer, 2007, persönliche Kommunikation). Die Zellen wurden nach 4 h Expression durch Zentrifugation (4528 x g, 10 min, 4°C) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Reinigung der TEV-Protease wurden die sedimentierten Zellen aufgetaut und in TEV-Bindepuffer (Anhang A.6, Tabelle A.16) im Verhältnis von 1 g Feuchtmasse zu 5 mL Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 mM PMSF wurden die Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen. Das Homogenat wurde anschließend zentrifugiert (47.808 x g, 30 min, 4°C). Falls der Überstand sehr viskos war, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt (1 mg L<sup>-1</sup> DNase I, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 min, RT). Die Reinigung des Zielproteins erfolgte über den His<sub>6</sub>-Anhang mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie. Die Fraktionen mit TEV-Protease wurden vereinigt und zum Pufferaustausch gegen TEV-Dialysepuffer dialysiert. Von der umgepufferten TEV-Protease wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Anschließend wurden 10 % (v/v) Glycerin hinzugefügt, woraufhin die Proteinlösung in 1 mL Portionen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde.

### 4.7.4 Herstellung von cyanobakteriellen Ketoreduktasen in Fusion mit Maltose-bindendem Protein

Für die lösliche Produktion cyanobakterieller 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen in *Escherichia coli* wurde das codierende Gen *fabG* in den Vektor pETM-41 kloniert, um die Expression als Fusionprotein mit einem 44 kDa großen, N-terminalen Anhang aus Hexahistidin und Maltose-bindendem Protein (His<sub>6</sub>-MBP) zu erreichen. Alle untersuchten Cyanobakterien waren sequenziert. Die Zugriffsschlüssel für die DNA- und Proteinsequenzen befinden sich in Anhang C.2. Je nach Condonverwendung im *fabG*-Gen aus den verschiedenen Spenderorganismen wurden für die Expression *Escherichia coli* Tuner(DE3) oder Rosetta 2(DE3) Zellen eingesetzt. Wurden bei der Analyse mit Hilfe des Programmes *Graphical Codon Usage Analyser* die in *Escherichia coli* selten vorkommenden Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA oder CGG häufig oder in räumlicher Nähe zueinander gefunden, wurde *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) gewählt. Dieser Stamm kann die Expressionslimitierungen durch das Plasmid pRARE2 ausgleichen (Novagen, 2003).

Für die Herstellung von cyanobakteriellen Ketoreduktasen wurde eine 4 mL-Vorkultur im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 30 °C, 250 min<sup>-1</sup> und 16 mm Exzentrizität über Nacht inkubiert. Für die Selektion von Zellen, die den pETM-41-Vektor mit dem inserierten *fabG*-Gen trugen, wurde mit 34 mg L<sup>-1</sup> Kanamycin supplementiertes TB-Medium eingesetzt. Fand die Expression in *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) Zellen statt, wurde zusätzlich mit 34 mg L<sup>-1</sup> Chloramphenicol ein Selektionsdruck ausgeübt, der den Verlust des pRARE2-Plasmid verhinderte. Für die Expressionskultur wurden Schüttelkolben ohne Schikanen zu 20 % des Nominalvolumens mit TB-Medium sowie den geeigneten Antibiotika befüllt und im Verhältnis 1:200 mit der Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C, 250 min<sup>-1</sup> und 3,5 cm Exzentrizität inkubiert und bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 20 °C über Nacht. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (4528 x g, 10 min, 4 °C) geerntet. Für die Isolation der Ketoreduktasen wurden die Zellen in HisTrap-Bindepuffer (Anhang A.6, Tabelle A.16) im Verhältnis von 1 g Feuchtmasse zu 5 mL Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 mM PMSF wurden die Zellen unter Verwendung von Glasperlen aufgeschlossen. Das Homogenat wurde anschließend zentrifugiert (47.808 x g, 30 min, 4 °C). Falls der Überstand sehr viskos war, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (1 mg L<sup>-1</sup> DNase I, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 min, RT). Die Reinigung des Zielproteins erfolgte über den His<sub>6</sub>-Anhang mit Hilfe von Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie. Die Fraktionen, die das Fusionsprotein enthielten, wurden zusammengeführt und in Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten (Größenausschlussgrenze 5 kDa) mindestens um Faktor 10 konzentriert. Der His<sub>6</sub>-MBP-Teil wurde nachfolgend durch das Hinzufügen von einem Teil (A<sub>280</sub>) TEV-Protease pro 30 Teile (A<sub>280</sub>) Fusionsprotein bei 4 °C über Nacht abgespalten. Nach der Spaltung wurden die Enzyme von dem His<sub>6</sub>-MBP-Teil und der TEV-Protease, die auch einen His<sub>6</sub>-Affinitätsanker besitzt, gereinigt. Hierfür wurde der Verdau mit HisTrap-Bindepuffer auf eine Imidazol-Konzentration unter 40 mM verdünnt und erneut mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie gereinigt. Die Reinheit der Proteine wurde durch eine 15-%ige SDS-PAGE beurteilt, die mit Silber gefärbt wurde.

#### 4.7.5 Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern

Unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-4T-1 wurden die 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen aus *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechococcus* RCC 556 als Fusionsproteine mit der 26 kDa Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert (Smith und Johnson, 1988). Die Fusionsproteine wurden in Form von Einschlusskörpern gereinigt (Rudolph und Lilie, 1996). Alle hierfür benötigten Pufferlösungen sind in

Tabelle A.21 (Anhang A.6) zusammengefasst.

Für die Produktion der Einschlusskörper wurde eine 4 mL-Vorkultur (TB-Medium, 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin) im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 37°C, 250 min<sup>-1</sup> und 16 mm Exzentrizität über Nacht inkubiert. Für die Expressionskultur wurden Schüttelkolben ohne Schikanen zu 20 % des Nominalvolumens mit TB-Medium befüllt, mit 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin supplementiert und mit 0,5 % (v/v) der Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C, 250 min<sup>-1</sup> und 5 cm Exzentrizität inkubiert und bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 37°C für 3 h. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (4528 x g, 10 min, 4°C) und enzymatisch aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde daraufhin mit dem Dispergiergerät UltraTurrax® homogenisiert. Um eine Erhitzung der Probe zu verhindern, folgte stets nach 30 s Homogenisierung eine Inkubation für 30 s auf Eis. Nach Zugabe von einem halben Volumen 4x Membranextraktionspuffer wurde die Suspension für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (47.808 x g, 30 min, 4°C). Nach jeweils zwei Waschschritten mit Waschpuffer I und II konnten die isolierten Einschlusskörper entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiterverwendet werden.

Die Einschlusskörper wurden in Solubilisierungspuffer gelöst, wobei eine Proteinkonzentration von 1 g L<sup>-1</sup> eingestellt wurde. Nach der Zugabe von 1 mM PMSF wurde die Lösung für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Reduktion der Proteinkonzentration durch Zugabe von Solubilisierungspuffer auf eine finale Konzentration von 0,1 g L<sup>-1</sup> wurden die Proteine entweder durch eine schnelle Verdünnung in gerührtem Waschpuffer II (1:200, 15°C, 600 min<sup>-1</sup>) oder durch Dialyse gegen Waschpuffer II rückgefaltet. Die Proteinlösung wurde anschließend zentrifugiert (47.808 x g, 30 min, 4°C) und gegebenenfalls mit Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten (Größenausschlussgrenze 5 kDa) konzentriert.

## 4.8 Gaschromatographische Analytik

Zur Analytik von Edukten und Produkten der asymmetrischen Synthese chiraler Alkohole wurde der Gaschromatograph CP-3800 mit unterschiedlichen Trennsäulen eingesetzt (Tabelle A.3). Injektor- sowie Detektortemperatur betragen stets 250°C. Der Split wurde vor 0,01 und nach 0,5 min auf 10 reduziert. Die Quantifizierung erfolgte über Kalibrierstandards zwischen 0 und 10 mM und einen methodenabhängigen internen Standard (7,2 mM Acetophenon oder 2-Oktanon) in jeder Probe. Da auf keine der verwendeten chiralen Trennsäulen Wasser aufgebracht werden durfte, wurden die Edukte und Produkte mit Ethylacetat aus den wässrigen Proben extrahiert. Die Methode der Extraktion und der anschließenden Phasentrennung war

abhängig von der Art des Experiments und wird in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

#### 4.8.1 Acetophenon und 1-Phenylethanol

Acetophenon und 1-Phenylethanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM 2-Oktanon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	7,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	80 °C, Haltezeit 0 min; mit 1,5 °C min <sup>-1</sup> auf 110 °C, Haltezeit 1 min; mit 20 °C min <sup>-1</sup> auf 150 °C, Haltezeit 2 min
Retentionszeiten:	2-Oktanon: 6,4 min; Acetophenon: 9,4 min; ( <i>R</i> )-1-Phenylethanol: 15,3 min; ( <i>S</i> )-1-Phenylethanol: 16,2 min

#### 4.8.2 $\alpha$ -Chloracetophenon und $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol

$\alpha$ -Chloracetophenon und  $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	9,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75 °C, Haltezeit 0 min; mit 2,5 °C min <sup>-1</sup> auf 140 °C, Haltezeit 1 min; mit 15 °C min <sup>-1</sup> auf 150 °C, Haltezeit 2 min
Retentionszeiten	Acetophenon: 8,4 min; $\alpha$ -Chloracetophenon: 22,5 min; ( <i>R</i> )- $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol: 22,9 min; ( <i>S</i> )- $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol: 23,4 min

#### 4.8.3 4'-Chloracetophenon und 1-(4'-Chlorphenyl)ethanol

4'-Chloracetophenon und 1-(4'-Chlorphenyl)ethanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	7,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75 °C, Haltezeit 0 min; mit 2,5 °C min <sup>-1</sup> auf 150 °C, Haltezeit 1 min
Retentionszeiten	Acetophenon: 9,2 min; 4'-Chloracetophenon: 19,4 min; ( <i>R</i> )-1-(4'-Chlorphenyl)ethanol: 25,1 min; ( <i>S</i> )-1-(4'-Chlorphenyl)ethanol: 25,5 min

#### 4.8.4 3'-Fluoracetophenon und 1-(3'-Fluorphenyl)ethanol

3'-Fluoracetophenon und 1-(3'-Fluorphenyl)ethanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM 2-Oktanon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	7,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C, Haltezeit 0 min; mit 2,5°C min <sup>-1</sup> auf 130°C, Haltezeit 1 min
Retentionszeiten	2-Oktanon: 6,8 min; 3'-Fluoracetophenon: 9,3 min; ( <i>R</i> )-1-(3'-Fluorphenyl)ethanol: 16,7 min; ( <i>S</i> )-1-(3'-Fluorphenyl)ethanol: 17,2 min

#### 4.8.5 4'-Fluoracetophenon und 1-(4'-Fluorphenyl)ethanol

4'-Fluoracetophenon und 1-(4'-Fluorphenyl)ethanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	7,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C, Haltezeit 0 min; mit 2,5°C min <sup>-1</sup> auf 130°C, Haltezeit 1 min
Retentionszeiten	Acetophenon: 9,2 min; 4'-Fluoracetophenon: 12,4 min; ( <i>R</i> )-1-(4'-Fluorphenyl)ethanol: 16,6 min; ( <i>S</i> )-1-(4'-Fluorphenyl)ethanol: 17,0 min

#### 4.8.6 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und 1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol

2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und 1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	5,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	80°C, Haltezeit 0 min; mit 1°C min <sup>-1</sup> auf 100°C, Haltezeit 2 min; mit 15°C min <sup>-1</sup> auf 150°C, Haltezeit 2 min
Retentionszeiten:	2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon: 10,6 min; Acetophenon: 11,9 min; ( <i>R</i> )-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol: 20,2 min; ( <i>S</i> )-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol: 21,0 min

#### 4.8.7 Propiophenon und 1-Phenyl-1-propanol

Propiophenon und 1-Phenyl-1-propanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 40
Säulenströmung:	7,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	80 °C, Haltezeit 0 min; mit 1,5 °C min <sup>-1</sup> auf 112 °C, Haltezeit 1 min; mit 20 °C min <sup>-1</sup> auf 150 °C, Haltezeit 2 min
Retentionszeiten:	Acetophenon: 9,2 min; Propiophenon: 13,1 min; ( <i>R</i> )-1-Phenyl-1-propanol: 16,9 min; ( <i>S</i> )-1-Phenyl-1-propanol: 17,6 min

#### 4.8.8 Ethylacetoacetat und Ethyl-3-hydroxybutyrat

Die Enantiomere des Ethyl-3-hydroxybutyrats ließen sich nur nach Derivatisierung mit dem Acylierungsreagenz N-Methyl-bis(trifluoroacetamid) (MBTFA) trennen. Für die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse wurden die extrahierten Proben mit MBTFA im Verhältnis 10:1 für 15 min bei 60 °C und 600 min<sup>-1</sup> derivatisiert und mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 50
Säulenströmung:	4,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	80 °C, Haltezeit 13,5 min
Retentionszeiten	Ethyl-( <i>R</i> )-3-hydroxybutyrat (derivatisiert): 2,0 min; Ethyl-( <i>S</i> )-3-hydroxybutyrat (derivatisiert): 2,9 min; Ethyl-( <i>R,S</i> )-3-hydroxybutyrat (underivatisiert): 3,7 min; MBTFA: 5,4 min; Ethylacetoacetat: 6,2 min; Acetophenon: 6,8 min

#### 4.8.9 Ethylbenzoylacetat und Ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropionat

Ethylbenzoylacetat und Ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropionat wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Interner Standard:	7,2 mM Acetophenon
Probeninjektion:	5 $\mu$ L, Split 50
Säulenströmung:	3,0 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	110 °C, Haltezeit 30 min; mit 15 °C min <sup>-1</sup> auf 200 °C, Haltezeit 15 min; mit 15 °C min <sup>-1</sup> auf 110 °C, Haltezeit 0 min

Retentionszeiten Acetophenon: 1,9 min; Ethylbenzoylacetat: 20,0 min; Ethyl-(*R*)-3-hydroxy-3-phenylpropionat: 23,2 min; Ethyl-(*S*)-3-hydroxy-3-phenylpropionat: 25,8 min

#### 4.8.10 Ethyl-4-chloracetoacetat und Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrat

Ethyl-4-chloracetoacetat und Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrat wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: Lipodex E  
Interner Standard: 7,2 mM Acetophenon  
Probeninjektion: 5  $\mu$ L, Split 50  
Säulenströmung: 4,0 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 105 °C, Haltezeit 8 min  
Retentionszeiten Acetophenon: 1,9 min; Ethyl-4-chloracetoacetat: 3,5 min; Ethyl-(*R*)-4-chlor-3-hydroxybutyrat: 4,8 min; Ethyl-(*S*)-4-chlor-3-hydroxybutyrat: 5,1 min

#### 4.8.11 Ethyl-4,4,4-trichloracetoacetat und Ethyl-4,4,4-trichlor-3-hydroxybutyrat

Ethyl-4,4,4-trichloracetoacetat und Ethyl-4,4,4-trichlor-3-hydroxybutyrat wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: Lipodex E  
Interner Standard: 7,2 mM Acetophenon  
Probeninjektion: 5  $\mu$ L, Split 50  
Säulenströmung: 4,0 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 105 °C, Haltezeit 5 min; mit 1 °C min<sup>-1</sup> auf 117 °C, Haltezeit 1 min  
Retentionszeiten Acetophenon: 1,9 min; Ethyl-4,4,4-trichloracetoacetat: 4,3 min; Ethyl-(*S*)-4,4,4-trichlor-3-hydroxybutyrat: 14,3 min; Ethyl-(*R*)-4,4,4-trichlor-3-hydroxybutyrat: 14,9 min

#### 4.8.12 Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat und Ethyl-4,4,4-trifluor-3-hydroxybutyrat

Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat und Ethyl-4,4,4-trifluor-3-hydroxybutyrat wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: Lipodex E  
Interner Standard: 7,2 mM Acetophenon  
Probeninjektion: 5  $\mu$ L, Split 50

Säulenströmung: 4,0 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 90 °C, Haltezeit 7 min  
Retentionszeiten Ethyl-4,4,4-fluoracetoacetat: 0,6 min; Ethyl-(*R*)-4,4,4-trifluor-3-hydroxybutyrat: 2,5 min; Ethyl-(*S*)-4,4,4-trifluor-3-hydroxybutyrat: 2,6 min; Acetophenon: 3,8 min

#### 4.8.13 5-Chlor-2-pentanon und 5-Chlor-2-pentanol

Die Enantiomere des 5-Chlor-2-pentanol ließen sich nur nach Derivatisierung mit MBTFA trennen. Für die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse wurden die extrahierten Proben mit MBTFA im Verhältnis 10:1 für 15 min bei 60 °C und 600 min<sup>-1</sup> derivatisiert und mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: BGB-175  
Interner Standard: 7,2 mM 2-Oktanon  
Probeninjektion: 5 µL, Split 50  
Säulenströmung: 5,0 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 50 °C, Haltezeit 0 min; mit 2 °C min<sup>-1</sup> auf 130 °C, Haltezeit 1 min  
Retentionszeiten MBTFA: 5,5 min; 2-Oktanon: 11,1 min; (*R*)-5-Chlor-2-pentanol (derivatisiert): 15,2 min; 5-Chlor-2-pentanon: 18,0 min; (*R,S*)-5-Chlor-2-pentanol (underivatisiert): 18,9 min; (*S*)-5-Chlor-2-pentanol (derivatisiert): 20,5 min

#### 4.8.14 2-Heptanon und 2-Heptanol

2-Heptanon und 2-Heptanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: Lipodex E  
Interner Standard: 7,2 mM 2-Oktanon  
Probeninjektion: 5 µL, Split 50  
Säulenströmung: 4,0 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 36 °C, Haltezeit 3 min; mit 4,5 °C min<sup>-1</sup> auf 75 °C, Haltezeit 0,5 min  
Retentionszeiten 2-Heptanon: 7,4 min; (*S*)-2-Heptanol: 8,3 min; (*R*)-2-Heptanol: 8,6 min; 2-Oktanon: 9,2 min

#### 4.8.15 2-Oktanon und 2-Oktanol

2-Oktanon und 2-Oktanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: BGB-175

Interner Standard: 7,2 mM Acetophenon  
Probeninjektion: 5  $\mu$ L, Split 40  
Säulenströmung: 2,5 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 50°C, Haltezeit 44 min; mit 6°C auf 150°C, Haltezeit 1 min  
Retentionszeiten 2-Oktanon: 30,5 min; (*S*)-2-Oktanol: 34,0 min; (*R*)-2-Oktanol: 34,8 min; Acetophenon: 52,6 min

#### 4.8.16 1,1,1-Trifluor-2-propanol

Das Keton 1,1,1-Trifluoracetone war auf der Säule Lipodex E nicht detektierbar, da es sehr früh eluierte und daher im Lösemittelsignal verschwand. Der zugehörige Alkohol 1,1,1-Trifluor-2-propanol wurde mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule: Lipodex E  
Interner Standard: 7,2 mM Acetophenon  
Probeninjektion: 5  $\mu$ L, Split 40  
Säulenströmung: 5,0 mL min<sup>-1</sup> Helium 5.0  
Ofentemperatur: 80°C, Haltezeit 0 min; mit 1°C min<sup>-1</sup> auf 100°C, Haltezeit 2 min  
Retentionszeiten (*R*)-1,1,1-Trifluor-2-propanol: 3,9 min; (*S*)-1,1,1-Trifluor-2-propanol: 4,2 min; Acetophenon: 12,2 min

### 4.9 Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien

Die Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien wurden nach der Methode von Havel (2006) im 1 mL-Maßstab in gasdicht verschlossenen 1,6 mL-Kurzgewindefläschchen bei Biomassekonzentrationen von 0,3-1,0 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Substrate wurden durch ein Septum in den Schraubkappen injiziert. Die Inkubation erfolgte auf einem Mikrotiterplatten-schüttler bei 600 min<sup>-1</sup> und einer Exzentrizität von 3 mm bei der jeweiligen Wachstumstemperatur der Cyanobakterien. Der Reaktionsabbruch wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ L 36 mM Acetophenon (in Ethylacetat, -20°C) erwirkt. Die Extraktion der Edukte und Produkte erfolgte für 10 min bei einer Schüttelfrequenz von 1800 min<sup>-1</sup> in der Schwingarmmühle. Eine gute Phasentrennung konnte erreicht werden, indem die Proben eingefroren und während des Auftauens sedimentiert (4528 x g, 20°C, 30 min) wurden. Für die Vermessung der Proben mit dem Gaschromatographen wurden 100  $\mu$ L der Extrakte im Verhältnis 1:5 mit Kaliumcarbonat getrocknetem Ethylacetat verdünnt. Die Proben konnten bis zur Messung bei -20°C in gasdicht verschlossenen 1,6 mL-Kurzgewindeflaschen gelagert werden.

### 4.9.1 Bestimmung der Reaktionskinetik

Bei allen Cyanobakterienstämmen wurde die Reaktionskinetik der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon untersucht. Die kinetischen Untersuchungen fanden bei  $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  statt (Havel, 2006). Für die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei Substratkonzentrationen zwischen 0 und 20 mM wurde bei jeder Umsetzung zunächst der lineare Bereich der Reaktion bestimmt. Für jede Konzentration wurden mindestens drei Messpunkte innerhalb des Linearitätsbereichs genommen. Die Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  und die Halbsättigungskonzentration  $K_m$  wurden im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik (Gleichung 3.6) durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Programme SigmaPlot 8.0 oder MATLAB R2006b ermittelt. Lag eine Substratinhibierungskinetik (Gleichung 3.10) vor, wurde zusätzlich die Inhibierungskonstante  $K_{iu}$  bestimmt.

### 4.9.2 Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse

Die Bestimmungen der Enantiomerenüberschüsse für die Substrate 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon, 4'-Chloracetophenon, Ethyl-4-chloracetoacetat und Ethylbenzoylacetat erfolgten mit jeweils 5 mM Edukt sowohl bei  $42 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ohne Glukose als auch bei  $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  mit 20 mM Glukose (Havel, 2006). Alle Umsetzungen dauerten 48 h.

## 4.10 Bestimmung von Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten

### 4.10.1 Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen in Puffer

Die Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen in Puffer (0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0) bei Raumtemperatur war wichtig, da hierdurch die Einstellung der Eduktkonzentration in enzymatischen Umsetzungen leichter gelang. Zu diesem Zweck wurden die hochkonzentrierten, reinen Ketone bis knapp unter ihre Löslichkeitsgrenze in Puffer vorgelöst.

Zur Bestimmung der maximalen Löslichkeit von Ketonen in Puffer wurde das Keton in großem Überschuss zugegeben, so dass sich ein zweiphasiges System ergab. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 min bei  $1800 \text{ min}^{-1}$  in der Schwingarmmühle geschüttelt, um die Phasen miteinander in Kontakt zu bringen. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation ( $4528 \times g$ , RT, 10 min) wurden  $100 \mu\text{L}$  der wässrigen Phase mit  $400 \mu\text{L}$  Ethylacetat extrahiert (Schwingarmmühle,  $1800 \text{ min}^{-1}$ , RT, 10 min), worin 36 mM interner Standard der jeweiligen GC-Methode gelöst war. Für die Analyse mit dem Gaschromatographen wurden  $100 \mu\text{L}$  der Extrakte im Verhältnis 1:5 mit Kaliumcarbonat getrocknetem Ethylacetat verdünnt.

Wurde die Löslichkeit eines Ketons unter den Bedingungen der enzymatischen Umsetzungen untersucht, erfolgte die Inkubation nicht in der Schwingarmmühle sondern im Thermomixer bei 30°C und 600 min<sup>-1</sup>. Nach einem Zentrifugationsschritt (4528 x g, 30°C, 10 min) wurden sofort 100 µL der wässrigen Phase abgenommen, damit sich die Löslichkeit nicht aufgrund eines Abkühlungseffektes änderte. Die nachfolgende Aufarbeitung erfolgte analog zu der Bestimmung der Ketonlöslichkeit in Puffer.

#### 4.10.2 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen zwischen ionischer Flüssigkeit und *n*-Hexan sowie ionischer Flüssigkeit und Puffer ( $\log D$ )

Für die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten zwischen ionischer Flüssigkeit (*ionic liquid*, IL) und *n*-Hexan, die nach einem modifizierten Protokoll von Bräutigam (2008) erfolgte, wurden Ketone und Alkohole jeweils in einer Konzentration von 100 mM in *n*-Hexan vorgelegt und anschließend im Verhältnis 4:1 mit der ionischen Flüssigkeit in der Schwingarmmühle (1800 min<sup>-1</sup>, RT, 1 h) extrahiert. Nach der Phasentrennung in der Standzentrifuge (4528 x g, RT, 15 min) erfolgte eine gaschromatographische Analyse der abgereicherten *n*-Hexan-Phase. Aus der Differenz der Konzentrationen vor und nach der Extraktion ergibt sich nach Gleichung 4.8 die Konzentration des Ketons bzw. Alkohols in der ionischen Flüssigkeit.

$$c_{IL} = (\phi_{IL}^{-1} - 1) \cdot (c_{Hexan,0} - c_{Hexan}) \quad (4.8)$$

$c_{IL}$	Konzentration in der ionischen Flüssigkeit nach der Extraktion mit <i>n</i> -Hexan, mol L <sup>-1</sup>
$c_{Hexan,0}$	Anfangskonzentration in der <i>n</i> -Hexan-Phase, mol L <sup>-1</sup>
$c_{Hexan}$	Gleichgewichtskonzentration in der <i>n</i> -Hexan-Phase nach der Extraktion, mol L <sup>-1</sup>
$\phi_{IL}$	Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit, -

Für die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten zwischen ionischer Flüssigkeit und Puffer wurde die ionische Flüssigkeit, die wie oben beschrieben mit Keton und Alkohol beladen worden war, im Verhältnis 1:4 mit Puffer versetzt und ebenfalls in der Schwingarmmühle (1800 min<sup>-1</sup>, RT, 1 h) extrahiert. Nach erneuter Phasentrennung in der Standzentrifuge (4528 x g, RT, 15 min), wurde die wässrige Phase im Verhältnis 1:1 mit Ethylacetat (mit 36 mM internem Standard der GC-Methode) extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Auf der Grundlage der Ergebnisse kann der dekadische Logarithmus der Verteilungskoeffizienten  $\log D$  nach Gleichung 4.9 berechnet werden.

$$\log D_{IL/Puffer} = \log_{10} \frac{c_{IL} - (\phi_{IL}^{-1} - 1) \cdot c_{Puffer}}{c_{Puffer}} \quad (4.9)$$

$\log D_{IL/Puffer}$  dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen ionischer Flüssigkeit und Puffer, -  
 $c_{Puffer}$  Gleichgewichtskonzentration im Puffer nach der Extraktion, mol L<sup>-1</sup>

In einem weiteren Extraktionsschritt wurde die ionische Flüssigkeit wie oben beschrieben im Verhältnis 1:4 mit reinem *n*-Hexan extrahiert. Nach Analyse der durch die Extraktion der ionischen Flüssigkeit mit Keton und Alkohol angereicherten *n*-Hexan-Phase kann der logarithmierte Verteilungskoeffizient zwischen der mit Puffer gesättigten ionischen Flüssigkeit und *n*-Hexan nach Gleichung 4.10 ermittelt werden. Die Bestimmung dieses Verteilungskoeffizienten ist wichtig, da er sich deutlich von dem Verteilungskoeffizienten zwischen reiner ionischer Flüssigkeit und *n*-Hexan unterscheidet (Bräutigam, 2008).

$$\log D_{IL/Hexan} = \log_{10} \frac{(c_{IL} - (\phi_{IL}^{-1} - 1) \cdot c_{Puffer}) - (\phi_{IL}^{-1} - 1) \cdot c_{Hexan}}{c_{Hexan}} \quad (4.10)$$

$\log D_{IL/Hexan}$  dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen ionischer Flüssigkeit und *n*-Hexan, -

## 4.11 Enzymcharakterisierung

### 4.11.1 Photometrische Messung von Enzymaktivitäten

Bei der Reduktion von Ketonen durch cyanobakterielle Ketoreduktasen wird der Cofaktor NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert, während durch die eingesetzten Cofaktorregenerierungsenzyme NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert wird. Zur Cofaktorregenerierung wurden die D221G-Mutante der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* und die Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH) aus *Leuconostoc mesenteroides* verwendet.

Die Änderung der NADPH-Konzentration kann als Zu- bzw. Abnahme der Absorption bei 340 nm in einem Photometer verfolgt werden. Die Bestimmung der Enzymaktivität von gereinigten Enzymen und Zellextrakten erfolgte bei Raumtemperatur in einer Flachboden-Mikrotiterplatte.

Tabelle 4.6 gibt eine Übersicht über die Reagenzien, die bei den verschiedenen enzymatischen Umsetzungen verwendet wurden. Die Volumina an gereinigtem Enzym beziehungsweise Zellextrakt und die eingesetzten Substrat- und Cofaktorkonzentrationen waren vom jeweiligen Experiment abhängig und sind in den nachfolgenden Kapiteln 4.11.2 und 4.11.3 näher beschrieben.

**Tabelle 4.6:** Reagenzien für photometrische Aktivitätstests von Kettoreduktasen (KRs), der D221G-Mutante der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* und der Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH) aus *Leuconostoc mesenteroides*.

Reagenz	KRs	FDH	G6PDH
Cofaktor	NADPH	NADP <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
Substrat	diverse Ketone	Na-Formiat	Glukose-6-phosphat
Puffer	0,1 M Na-Phosphat (pH 7,0)	0,1 M Na-Phosphat (pH 7,0)	0,1 M Na-Phosphat (pH 7,0)

Jede Reaktion wurde nach einer Äquilibrierung für 5 min durch die Zugabe des Substrates gestartet. Die spezifische Aktivität wurde aus den Photometerdaten auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen-Gesetzes ermittelt (Gleichung 4.11).

$$EA_x = \frac{\Delta c_{NADPH} \cdot V_R}{\Delta t \cdot V_x \cdot c_P} = \frac{\Delta A_{340} \cdot V_R \cdot 10^6}{\Delta t \cdot \epsilon_{NADPH} \cdot d \cdot V_x \cdot c_P} \quad (4.11)$$

$EA_x$	spezifische Enzymaktivität, U mg <sup>-1</sup>
$\frac{\Delta c_{NADPH}}{\Delta t}$	Änderung der NADPH-Konzentration über die Zeit, μM min <sup>-1</sup>
$V_R$	Reaktionsvolumen, μL (hier: 200 μL)
$V_x$	Probenvolumen, μL
$c_P$	Proteinkonzentration, mg L <sup>-1</sup>
$\frac{\Delta A_{340}}{\Delta t}$	Änderung der Absorption bei 340 nm über die Zeit, min <sup>-1</sup>
$\epsilon_{NADPH}$	molarer Extinktionskoeffizient von NADPH, 6300 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
$d$	Schichtdicke, cm (hier: 0,64 cm)

Wird die spezifische Enzymaktivität von Ganzzellbiokatalysatoren angegeben, wurde zur Berechnung die Proteinkonzentration in Gleichung 4.11 durch die Biotrockenmassekonzentration ersetzt.

### 4.11.2 Bestimmung von Enzymkinetiken

Die Bestimmung von Enzymkinetiken erfolgte durch die Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten. Da es sich bei den Enzymmechanismen von allen untersuchten Enzymen um Zweisubstratmechanismen handelte, wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Ansätzen gemessen, bei denen entweder das Substrat oder der Cofaktor im Überschuss vorlag. Somit konnte die Enzymgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der jeweils anderen Verbindung mit der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik nach Gleichung 3.6 beschrieben werden (Bisswanger, 2000). Die Parameterbestimmung erfolgte über nicht-lineare Regression mit Hilfe der Programme SigmaPlot 8.0 oder MATLAB R2006b.

Bei der Bestimmung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ist es wichtig, in Proteinkonzentrationsbereichen zu messen, in denen die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration ist. Im Gegensatz zu klassischen Bindungsstudien wird bei enzymkinetischen Messungen nicht die Konzentration an freiem Liganden sondern die Gesamtkonzentration an zugegebenem Substrat  $[S]_0$  berücksichtigt, die sich auf freies Substrat  $[S]$  und enzymgebundenes Substrat  $[ES]$  aufteilt:  $[S]_0 = [S] + [ES]$ . Damit die Menge an enzymgebundenem Substrat vernachlässigt werden kann, muss die Vorbedingung  $[E]_0 \ll [S]_0$  zutreffen, wobei  $[E]_0$  die Gesamtkonzentration an Enzym bezeichnet (Bisswanger, 2000). Die Proportionalität der Reaktionsgeschwindigkeit zur eingesetzten Enzymkonzentration ist ein impliziter Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Ketoreduktasen war bei Proteinkonzentrationen bis  $125 \text{ mg L}^{-1}$  proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration. Bei der Bestimmung von Enzymkinetiken in nicht aufgereinigten Zellaufschlüssen wurde der Linearitätsbereich für jede Zellcharge neu bestimmt.

Ideale Bedingungen für die Aufnahme einer Enzymkinetik sind Substrat- bzw. Cofaktorkonzentrationen im Bereich zwischen  $0,2$  und  $5 \cdot K_m$ , wobei mehrere Messpunkte ober- und unterhalb der Halbsättigungskonzentration liegen sollten (Segel, 1993). In der Regel wurden 10 verschiedene Substrat- bzw. Cofaktorkonzentrationen zur Bestimmung einer Enzymkinetik verwendet. Die Konzentration der Verbindung, die im Überschuss zugegeben wurde, entsprach mindestens der 10-fachen Halbsättigungskonzentration.

Tabelle 4.7 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung von Ansätzen für enzymkinetische Messungen, bei denen entweder das Substrat oder der Cofaktor im Überschuss vorlagen. Alle Konzentrationen wurden dabei in einem Volumen von  $200 \mu\text{L}$  eingestellt.

**Tabelle 4.7:** Übersicht über die Zusammensetzung der Proben für Enzymkinetiken

Konzentration von	Substrat: Variabel Cofaktor: im Überschuss	Cofaktor: Variabel Substrat: im Überschuss
Enzym	linearer Bereich	linearer Bereich
Substrat	$0,2 - 5 \cdot K_M$	$\geq 10 \cdot K_M$
NADPH	$\geq 10 \cdot K_M$	$0,2 - 5 \cdot K_M$
Puffer	0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0	0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0
Gesamtvolumen	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

Da die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Überschuss des Substrates oder Cofaktors im Bereich von  $10 \cdot K_m$  noch eine Abweichung von der Reaktionsgeschwindigkeit bei einem theoretischen unendlichen Überschuss in der Größenordnung von 10 % zeigt (Bisswanger, 2000), wurde hierfür ein Korrekturfaktor bestimmt. Dieser Korrekturfaktor gab das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer unendlichen im Vergleich zur eingesetzten Konzentration wieder und wurde mit der experimentell bei einem Überschuss von  $\geq 10 \cdot K_m$  bestimmten Reaktionsgeschwindigkeit multipliziert. Der Korrekturfaktor konnte den Ergebnissen der nicht-linearen Regression der Kinetik entnommen werden, die mit dem anderen Reaktionspartner im Überschuss bestimmt wurde. Dieses Vorgehen ermöglichte eine unmittelbare Vergleichbarkeit von Messdaten, die bei unterschiedlichen Überschüssen an Substrat bzw. Cofaktor (z.B. 10 und  $15 \cdot K_m$ ) aufgenommen wurden.

Bei den Cofaktorregenerierungsenzymen wurden die Daten von photometrischen Aktivitätstests für die Bestimmung der Enzymkinetiken herangezogen. Bei den Umsetzungen der Keto-reduktasen hingegen wurde auf GC-Messungen zurückgegriffen, die zudem auch Aufschluss über die Enantiomerenüberschüsse der gebildeten Produkte gaben. Ferner ist die Absorption einer NADPH-Lösung im verwendeten Mikrotiterplatten-Photometer nur bis zu einer NADPH-Konzentration bis 0,5 mM linear. GC-Messungen ermöglichten hingegen den Einsatz beliebiger NADPH-Konzentrationen, da nicht die Cofaktoren, sondern direkt der Umsatz von den Ketonen zu den korrespondierenden Alkoholen gemessen wurde. Der lineare Bereich der Enzymaktivität wurde zuvor in einem photometrischen Aktivitätstest bei den maximal einsetzbaren 0,5 mM NADPH bestimmt. Für höhere NADPH-Konzentrationen wurde ein entsprechend kürzerer linearer Bereich angenommen. Zeigten die GC-Messungen anschließend, dass nicht mehr im linearen Bereich gemessen wurde oder die Signalintensität nicht hoch genug war, wurde die Reaktionszeit angepasst. Die Ermittlung optimaler Reaktionszeiten für jedes Enzym war folglich ein iterativer Prozess.

Die Proben für die GC-Messungen wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen (1,5 mL, Safe-Lock) vorbereitet und für 5 min bei 30 °C und 600 min<sup>-1</sup> im Thermomixer äquili­briert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substrates gestartet und bei 30 °C und 600 min<sup>-1</sup> inkubiert. Die Dauer der Umsetzung wurde entsprechend des zuvor ermittelten Linearitätsbereiches gewählt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 200 µL -20 °C kaltem Ethylacetat (mit internem Standard der GC-Methode), woraufhin die Probe durchmischt und sofort in Eis versenkt wurde. Die Proben wurden daraufhin entweder eingefroren und bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverwendet. Bei der Aufarbeitung für die GC-Messung wurden die gefrorenen Proben auf Eis aufgetaut. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden für 10 min bei 1800 min<sup>-1</sup> in der Schwingarmmühle geschüttelt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 min<sup>-1</sup>, RT, 1 min) wurden 100 µL der Extrakte im Verhältnis 1:5 mit Kaliumcarbonat getrocknetem Ethylacetat verdünnt und mittels GC analysiert. Die Enzymkinetik der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) mit dem Substrat 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon wurde in der löslichen Proteinfraction von *Escherichia coli* BL21(DE3) pBtac-adh<sub>L.brevis</sub>-Zellen bestimmt. Nach einem Zellaufschluss mit Glasperlen wurde das Homogenat zentrifugiert (47.808 x g, 4 °C, 30 min). Die Enzymaktivität des Überstandes wurde in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) bei 30 °C unter Zugabe von 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und verschiedenen NADPH-Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1,6 mM gemessen, da die Halbsättigungskonzentration von NADPH bei der LB-ADH 0,16 mM entspricht (Hummel, 1997).

### 4.11.3 Bestimmung des Enzymmechanismus

Für die Bestimmung des Enzymmechanismus der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 wurde eine Produktinhibitionsstudie im nicht-gesättigten Bereich durchgeführt. Hierbei wurde die Umsetzung von Ethyl-4-chloracetoacetat zu Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat betrachtet, da sowohl Edukt als auch Produkt sehr hohe Löslichkeiten von 205 mM bzw. 759 mM im wässrigen System aufwiesen. Die Substrate NADPH oder Ethyl-4-chloracetoacetat wurden bei einer konstanten Konzentration eines der Produkte (NADP<sup>+</sup> oder Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat) variiert. Das andere Substrat wurde dabei bei einer nicht-sättigenden Konzentration im Bereich des K<sub>m</sub> konstant gehalten. Dieselbe Messreihe wurde jeweils mit 5 verschiedenen Produktkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 50 mM Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat bzw. 0 und 16 mM NADP<sup>+</sup> wiederholt. Die Daten wurden in der doppelt-reziproken Auftragung analysiert und anhand der Position des Geradenschnittpunkts im kartesischen Koordinatensystem den verschiedenen Inhibitionstypen (kompetitiv, nicht-kompetitiv bzw. gemischt oder unkompetitiv) zugewiesen.

#### 4.11.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante von NADPH mittels Fluoreszenzverstärkung

Die Bindung von NADPH an die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 wurde mit Hilfe von Fluoreszenzverstärkung gemessen. Die Fluoreszenzverstärkung basiert auf einem Energie-transfer von Tryptophanresten auf an die KR gebundene NADPH-Moleküle. Wird Tryptophan bei 280 nm angeregt, hat das von der Aminosäure emittierte Licht im Bereich von 340 nm seinerseits einen anregenden Effekt auf gebundenes NADPH. Diese Anregung kann durch eine verstärkte Emission bei 450 nm detektiert werden (Sharma *et al.*, 2003; Lackowicz, 2006). Die Messungen wurden bei 30°C in Fluoreszenzmikrotiterplatten durchgeführt. Hierfür wurden NADPH-Lösungen (5 oder 20 mM) in 1 µL Aliquots zu 200 µL 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gegeben, wobei die Verdünnung ≤ 5 % gehalten wurde. Die Proben wurden jeweils mit einer Excitationswellenlänge von 280 nm angeregt, woraufhin die Emission bei 450 nm gemessen wurde. Dieser Vorgang wurde mit einer Proteinlösung bei einer KR-Konzentration von 1,29 µM wiederholt. Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden um den inneren Filtereffekt nach einer Formel von Lackowicz (2006) korrigiert:

$$F_C = F \cdot 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (4.12)$$

- $F_C$  korrigierte Fluoreszenz, -
- $F$  gemessene Fluoreszenz, -
- $A_{ex}$  Absorption bei der Excitationswellenlänge (hier: 280 nm)
- $A_{em}$  Absorption bei der Emissionswellenlänge (hier: 450 nm)

Die Fluoreszenzverstärkung konnte mit Gleichung 4.13 beschrieben werden, aus der sich die Dissoziationskonstante  $K_d$  für NADPH ableiten ließ.

$$\Delta F_C = \Delta F_{Cmax} \frac{[NADPH]}{K_d + [NADPH]} \quad (4.13)$$

- $\Delta F_C$  Fluoreszenzdifferenz zwischen den Proben mit und ohne Protein, -
- $\Delta F_{Cmax}$  Maximale Fluoreszenzdifferenz zwischen den Proben mit und ohne Protein, -
- $K_d$  Dissoziationskonstante von NADPH, mM
- $[NADPH]$  NADPH-Konzentration, mM

### 4.11.5 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums und Identifikation von Aktivatoren und Inhibitoren

Die Untersuchung des Einflusses von pH, Temperatur und potenziellen Inhibitoren auf Ketoreduktasen erfolgte mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon im Überschuss (150 mM) bei einer NADPH-Konzentration von 0,5 mM über einen Zeitraum von 30 min. Alle Proben wurden mit dem Gaschromatographen analysiert. Das Abstoppen der Reaktion wurde durch Extraktion mit -20 °C kaltem Ethylacetat (mit 36 mM Acetophenon) im Verhältnis 1:1 bewirkt. Die Proben wurden für 10 min bei 1800 min<sup>-1</sup> in der Schwingarmmühle geschüttelt. Nach der Phasentrennung (Tischzentrifuge, 13.000 min<sup>-1</sup>, RT, 1 min) wurden 100 µL der Extrakte im Verhältnis 1:5 mit Kaliumcarbonat getrocknetem Ethylacetat verdünnt.

#### Bestimmung des pH-Optimums

Der Einfluss des pH auf die Enzymaktivität wurde in den folgenden Systemen bei einer Pufferkonzentration von 50 mM untersucht: Na-Citrat (pH 4 bis 6), MES (pH 5,5 bis 6,5), Na-Phosphat (pH 6,5 bis 8), MOPS (pH 6,5 bis 8), Tricin (pH 7,5 bis 9) und Tris-HCl (pH 8,5 bis 10). Die Proben wurden bei 30 °C und 600<sup>-1</sup> im Thermomixer inkubiert.

#### Bestimmung des Temperaturoptimums

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde ein 50 mM Na-Phosphatpuffer verwendet, da er einen sehr niedrigen Temperaturkoeffizienten aufweist. Die Änderung des negativen dekadischen Logarithmus der Säuredissoziationskonstante ( $pK_a$ ) mit der Temperatur ist bei Phosphatpuffern sehr gering:  $\Delta pK_a/\Delta T = -0,0028$  (Perrin und Dempsey, 1974). Die Inkubation der Proben erfolgte aufgrund der guten Wärmeübertragung in 0,5 mL PCR-Gefäßen im PCR-Gradientencycler. Ein zusätzliches Datenset an Negativkontrollen stellte sicher, dass bei erhöhten Temperaturen keine spontane Zersetzung des Substrates auftrat. Die Verwendung des PCR-Gerätes schränkte das mögliche Probenvolumen auf 100 µL ein.

Die Aktivierungsenergie wurde mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung berechnet, welche die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (4.14)$$

$k$	Geschwindigkeitskonstante, s <sup>-1</sup>
$A$	Arrhenius-Faktor, s <sup>-1</sup>
$E_A$	Aktivierungsenergie, J mol <sup>-1</sup>
$R$	allgemeine Gaskonstante, 8,314472 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
$T$	absolute Temperatur, K

Aus den temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten wird die Aktivierungsenergie durch Auftragen von  $\ln k$  gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur ermittelt:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4.15)$$

Aus den Steigungen der Geraden durch die linearen Bereiche der Kurve lassen sich die Aktivierungsenergien der enzymatischen Reaktion und der Enzyminaktivierung berechnen.

#### 4.11.6 Bestimmung der Enzymstabilität

Die Experimente zur Bestimmung der pH- und Temperaturstabilität der KR erfolgten analog zu den Untersuchungen des pH- bzw. Temperaturoptimums.

Die Bestimmung der Stabilität in Gegenwart von organischen Lösemitteln und ionischen Flüssigkeiten wurde in Rotilabo<sup>®</sup>-Probenröhrchen mit einem Durchmesser von 15 mm in einem Gesamtvolumen von 4 mL durchgeführt. Der Volumenanteil der Lösungsmittelphase wurde auf 25, 50 und 75 % eingestellt. Ionische Flüssigkeiten wurden nur bei einem Volumenanteil von 75 % des Gesamtansatzes untersucht. Die Reaktionsgefäße wurden bei Raumtemperatur ohne Vermischen der Phasen inkubiert, um die molekulare Toxizität der zweiten Phase zu untersuchen. In regelmäßigen Abständen wurde die Restaktivität der KR in der wässrigen Phase bestimmt.

Die Halbwertszeit des Enzyms lässt sich über die Inaktivierungskonstante bestimmen, die sich aus Gleichung 4.16 ergibt.

$$A = A_0 \cdot e^{-k_i t} \quad (4.16)$$

- $A$  Enzymaktivität zum Zeitpunkt  $t$ , U  $\text{mg}^{-1}$
- $A_0$  Enzymaktivität zum Zeitpunkt  $t=0$ , U  $\text{mg}^{-1}$
- $k_i$  Inaktivierungskonstante,  $\text{h}^{-1}$
- $t$  Zeit, h

Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der Aktivität gegen die Zeit erhält man die Inaktivierungskonstante  $k_i$  als Steigung. Die Halbwertszeit wird nach Gleichung 4.17 berechnet.

$$\tau = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (4.17)$$

- $\tau$  Halbwertszeit, h

### 4.11.7 Ganzzellbiotransformationen im 1,4 mL-Maßstab

Als Reaktionsgefäße für Ganzzellbiotransformationen im 1,4 mL-Maßstab dienten Rotilabo®-Probenröhrchen mit einem Durchmesser von 15 mm und einem Nominalvolumen von 4 mL. Die Ansätze wurden von Kreuzmagnetrührern, die von einer Mehrfachrührplatte angetrieben wurden, mit  $350 \text{ min}^{-1}$  durchmischt. Ionische Flüssigkeiten wurden gegebenenfalls mit einem Phasenanteil von 20 % eingesetzt. Alle Biotransformationen wurden im Lösemittelabzug bei Raumtemperatur durchgeführt. Um Verluste durch Verdampfung zu vermeiden, wurden die Reaktionsgefäße mit Deckeln verschlossen.

## 4.12 Statistik

Der t-Test für verbundene Stichproben wurde verwendet, um zu bewerten, ob die unterschiedliche Behandlung einer Probe einen signifikanten Effekt bewirkte. Hierbei wurde stets ein Signifikanzniveau  $P < 0,05$  gewählt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 8.0.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen (Ludwig-Mayerhofer, 2006). Bei einer vollständigen positiven oder negativen Korrelation nimmt der Pearson-Koeffizient  $r$  Werte von +1 beziehungsweise -1 an. Er wird wie folgt berechnet:

$$r = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (4.18)$$

$x_i, y_i$  Werte der Variablen

$\bar{x}, \bar{y}$  Mittelwerte der Variablen

Der Pearson-Koeffizient  $r$  ist folglich die Kovarianz der beiden Variablen, dividiert durch das Produkt der Standardabweichungen der beiden Variablen (Ludwig-Mayerhofer, 2006). Die Berechnung erfolgte mit Excel.

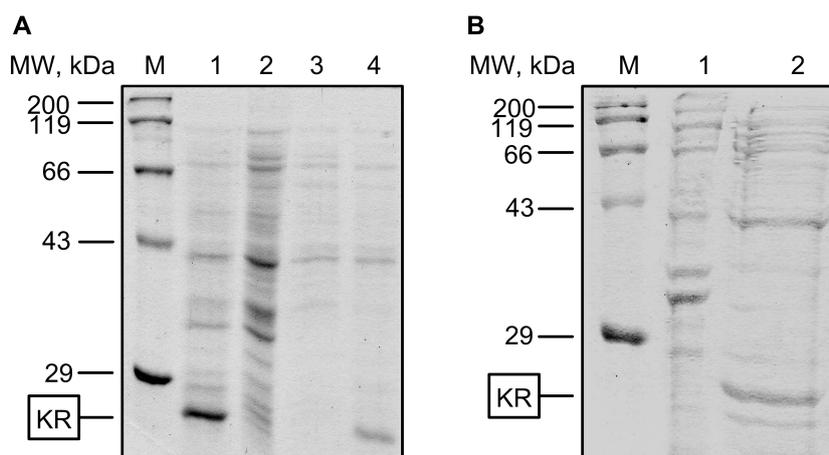
## 5 Charakterisierung der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase aus *Synechococcus* PCC 7942

### 5.1 Bereitstellung der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase

Die heterologe Expression der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (KR) aus *Synechococcus* PCC 7942 in *Escherichia coli* wurde in mehreren Expressionssystemen untersucht, die im Wesentlichen auf verschiedenen Vektoren beruhten und unterschiedliche Proteinreinigungsmethoden erforderten. Das Ziel hierbei war die Entwicklung eines effizienten Herstellungsverfahrens für das Enzym, um es für eine biochemische Charakterisierung in einer hohen Reinheit und in ausreichender Menge verfügbar zu machen. Da nachfolgend auch homologe Ketoreduktasen aus anderen Cyanobakterienstämmen exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden sollten, waren ein geringer methodischer Aufwand sowie eine leichte Übertragbarkeit auf andere Proteine weitere Gütekriterien für ein geeignetes Herstellungsverfahren.

#### 5.1.1 Expression und Reinigung ohne Affinitätsanker

Die Produktion der KR ohne Zuhilfenahme eines Affinitätsankers wurde durch die Klonierung des 750 bp langen *fabG*-Gens in den Vektor pET21-a(+) und die Expression in *Escherichia coli* JM 109(DE3) realisiert. Da das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 sequenziert ist, war die genetische Information einfach zugänglich. Der Datenbank-Zugriffsschlüssel befindet sich in Tabelle C.2 (Anhang C). Das exprimierte Protein besaß 249 Aminosäuren und ein berechnetes Molekulargewicht (*molecular weight*, MW) für das KR-Monomer von 25,5 kDa, was gut mit dem experimentell durch SDS-PAGE ermittelten Wert von 26 kDa übereinstimmte. Abbildung 5.1 A zeigt das Ergebnis einer Expression über 6 h bei 37 °C, die mit 2 mM IPTG induziert wurde, im Vergleich zu einer nicht induzierten Kontrolle. Die densitometrische Analyse der Banden ergab, dass 17 % des Enzyms löslich exprimiert wurden, während sich 83 % der KR nach dem Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion befanden. Die löslich exprimierte Menge entsprach einem Anteil von 1,5 % am löslichen Gesamtproteingehalt der Zellen.

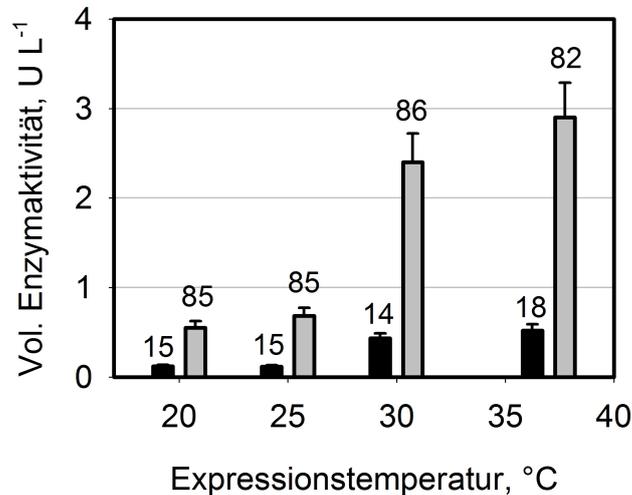


**Abbildung 5.1:** **A)** SDS-PAGE (10 % Trenngel, Coomassie-Färbung) nach Expression der KR (6 h, 37 °C, 2 mM IPTG) und Zellaufschluss. Bahnen: M: Roti<sup>®</sup>-Mark Standard; 1: unlösliche Fraktion, induziert; 2: unlösliche Fraktion, nicht induzierte Kontrolle; 3: lösliche Fraktion, nicht induzierte Kontrolle; 4: lösliche Fraktion, induziert. **B)** SDS-PAGE (15 %-Trenngel) zur Analyse der Membranextraktion. Bahnen: M: Roti<sup>®</sup>-Mark Standard; 1: unlösliche Fraktion nach der Membranextraktion; 2: lösliche Fraktion nach der Membranextraktion.

Eine mögliche Ursache für den hohen Anteil an unlöslichem Protein konnte in der Bildung von Aggregaten aus fehlerhaft oder unvollständig gefalteten Proteinen liegen, die als Einschlusskörper bezeichnet werden. Das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 wird üblicherweise in Konzentrationen bis zu 2 % während der Isolation von Einschlusskörpern eingesetzt, um Membranbestandteile und membrangebundene Proteine zu entfernen (Middelberg, 2002). Eine Behandlung der unlöslichen Fraktion der induzierten Zellen mit 1,5 % Triton X-100, deren Ergebnis in Abbildung 5.1 B dargestellt ist, solubilisierete die KR nahezu vollständig aus der Membran. Dieses Resultat zeigt, dass die Unlöslichkeit der KR nicht an der Bildung von Einschlusskörpern, sondern an einer Membranassoziation des Proteins lag. Folglich interagiert die KR, bei der eine Membranbindung in den Zellen von *Synechococcus* PCC 7942 nachgewiesen werden konnte (Havel, 2006), auch mit *Escherichia coli*-Membranen.

Im Rahmen einer Expressionsoptimierung wurde die Temperatur zwischen 20 und 37 °C, die IPTG-Konzentration im Bereich von 0,25 bis 2 mM sowie die Expressionsdauer zwischen 2 und 16 h variiert. Als optimal erwies sich eine Expression bei 37 °C und 1 mM IPTG über einen Zeitraum von 6 h (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Variation der Parameter hatte nur einen Einfluss auf die absolut gebildete Enzymmenge, nicht aber auf das Verhältnis zwischen löslich und membrangebunden exprimiertem Protein, das laut der densitometrischen Analyse stets im Bereich von 15 % zu 85 % lag. Da das membrangebundene Enzym die gleiche Aktivität wie das lösliche Protein zeigte, spiegelte die volumetrische Enzymaktivität das zugrunde

liegende Expressionsverhältnis in den Fraktionen wider. Abbildung 5.2 verdeutlicht diesen Zusammenhang exemplarisch für verschiedene Expressionstemperaturen.



**Abbildung 5.2:** Abhängigkeit der volumetrischen (vol.) Enzymaktivität der löslichen (■) und unlöslichen (▒) Zellaufschlussfraktion von der Expressionstemperatur. Bei allen Zellsuspensionen wurde vor dem Aufschluss auf eine optische Dichte  $OD_{600} = 1$  eingestellt. Die Zahlenwerte im Diagramm geben die prozentuale Verteilung der Gesamtzymaktivität an.

Für die Isolierung der KR aus Zellen von *Synechococcus* PCC 7942 hatte Havel (2006) eine Reinigungsstrategie entwickelt, die auf den Methoden der Größenausschluss- und Anionenaustauschchromatographie basierte. Dieses Reinigungsverfahren ließ sich prinzipiell auch bei *Escherichia coli*-Zellen anwenden. Die Freisetzung der KR von der Membran, die bei dem ursprünglichen Protokoll durch Ultraschall erfolgte, wurde durch Zugabe von Triton X-100 bewirkt. Das Detergenz wurde anschließend adsorptiv mit SM-2 Bio-Beads aus dem Proteingemisch entfernt. Durch die Solubilisierung des membrangebundenen Proteins konnte der Anteil der KR am löslichen Gesamtproteingehalt von 1,5 auf 9 % gesteigert werden. Der Reinigungsverlust bei der Freisetzung von der Membran betrug ca. 12 %.

Am Ende der Proteinreinigung lag die KR-Ausbeute bei  $0,1 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ , wobei die Reinheit des Zielproteins unterhalb von 50 % anzusiedeln war. Diese Werte verdeutlichen, dass die Reinigungsstrategie, die von Havel (2006) für analytische Zwecke genutzt wurde, nicht für den präparativen Einsatz geeignet war. Das Hauptproblem bei der Übertragung in den präparativen Maßstab war die Verwendung der Größenausschlusschromatographie zu Beginn der Reinigung. Diese Trennmethode findet normalerweise in der Feinreinigung von Proteinen Anwendung, da nur geringe Volumina auf die Säule aufgebracht werden können. Darüber hinaus erfolgt keine Konzentrierung, sondern eine Verdünnung des Zielproteins, da es sich

um eine nicht-adsorptive, isokratische Trennmethode handelt, bei der die Zusammensetzung des Laufpuffers keinen Einfluss auf die Retention des Zielproteins hat. Aus diesen Gründen sind chromatographische Methoden, die auf einer spezifischen Wechselwirkung des Zielmoleküls mit der Säulenmatrix beruhen und eine Gradientenelution ermöglichen, für die primäre Reinigung von Proteinen besser geeignet.

Da bei der Freisetzung der KR aus der *Escherichia coli*-Membran gleich zu Beginn der Reinigung relativ hohe Verluste auftraten, war es bei der Entwicklung einer alternativen Reinigungsstrategie auch wünschenswert, die Anlagerung an die Membran von vornherein zu unterbinden. Durch die Konstruktion von Fusionsproteinen zwischen einem löslichen und einem membrangebundenen Protein kann die Membranassoziation durch den löslichen Fusionspartner verhindert werden (Gilardi *et al.*, 2002; Shimoji *et al.*, 1998).

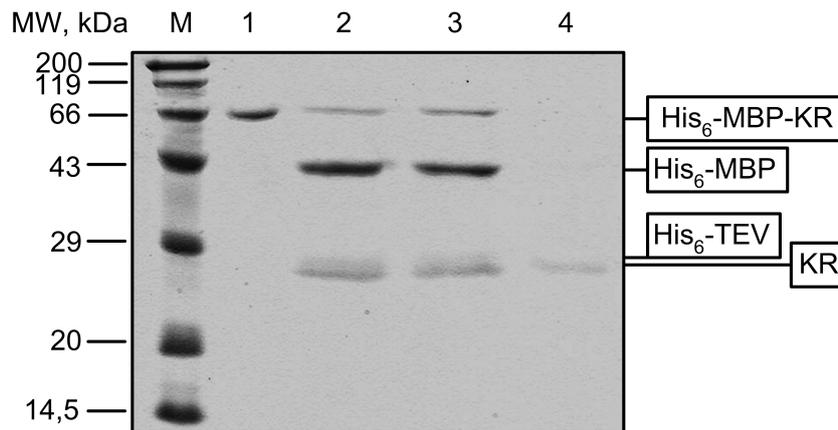
Vor diesem Hintergrund bestand die Erwartung, durch die Wahl eines Fusionspartners, der gleichzeitig eine affinitätschromatographische Reinigung ermöglichte, die Vorteile einer löslichen Expression und einer leistungsstarken Trennmethode miteinander verbinden zu können.

### 5.1.2 Expression und Reinigung in Fusion mit Maltose-bindendem Protein

Das Maltose-bindende Protein (MBP) gehört mit einem Molekulargewicht von 44 kDa zu den größten gebräuchlichen Fusionspartnern (Arnau *et al.*, 2006). Durch die Klonierung der KR in den Vektor pETM-41 erhielt das Enzym einen His<sub>6</sub>-MBP-Anhang am N-Terminus, der die Membranassoziation der KR wie geplant verhinderte. Das exprimierte Fusionsprotein hatte einen Anteil von 20 % am löslichen Gesamtprotein der Zelle. Das Temperaturoptimum der Expression befand sich bei 20°C. Hierbei lagen 77 % des Proteins löslich und 23 % als Einschlusskörper vor, die sich auch als solche isolieren ließen (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei einer Expression bei 37°C hingegen formten 54 % des gebildeten Proteins unlösliche Aggregate.

Die Reinigung über das am Maltose-bindenden Protein verankerte Hexahistidin und die nachfolgende Spaltung des Fusionsproteins mit der TEV-Protease, die ebenfalls mit einem His<sub>6</sub>-Anhang versehen war, führte zu einer Proteinpräparation der KR, die homogen in der Silberfärbung erschien. Unter Berücksichtigung der Detektionsgrenze der Silberfärbung von 10 ng entsprach dieses Ergebnis einer Reinheit über 99,8 %.

Abbildung 5.3 stellt einen typischen Reinigungsverlauf der KR dar. Die Spaltung durch die TEV-Protease muss für jedes Protein optimiert werden und war in diesem Ansatz bei einem 60:1 Verhältnis von Fusionsprotein zu TEV-Protease noch unvollständig. Eine vollständige Abspaltung des His<sub>6</sub>-MBP-Ankers wurde bei einem Verhältnis von 30:1 erzielt. Unter optimierten Bedingungen lag die Ausbeute der KR im Bereich von 3,9-6,0 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>.



**Abbildung 5.3:** SDS-PAGE (12,5 % Trenngel, Coomassie-Färbung) zur Analyse der His<sub>6</sub>-MBP-KR-Reinigung. Bahnen: M: Roti<sup>®</sup>-Mark Standard; 1: gereinigtes His<sub>6</sub>-MBP-KR-Fusionsprotein; 2: nach TEV-Verdau; 3: nach Umpufferung; 4: nach Entfernung des His<sub>6</sub>-MBP-Anteils und der His<sub>6</sub>-TEV-Protease.

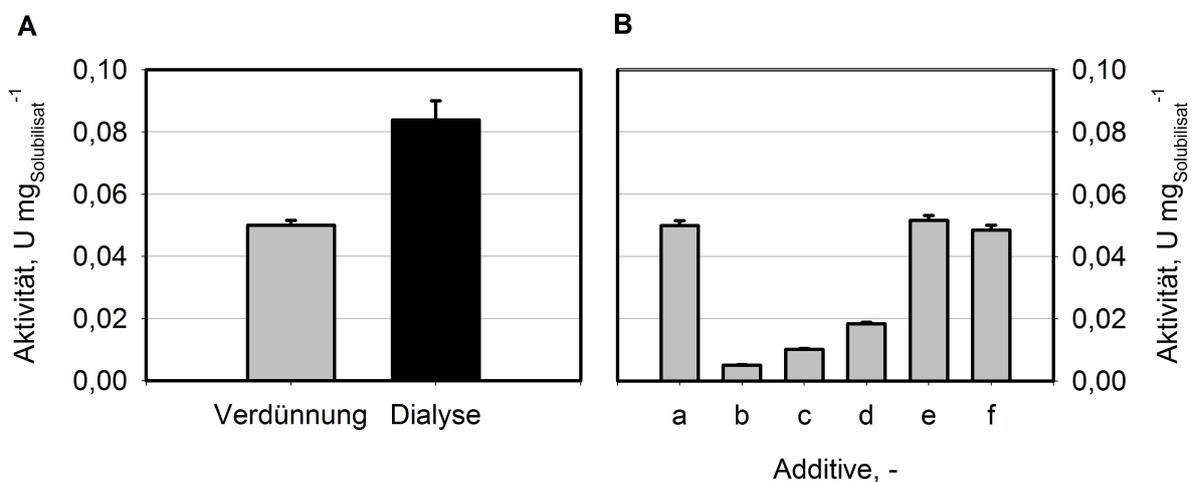
Eine Übertragung dieses Herstellungsverfahrens auf homologe Ketoreduktasen ist durch die Verwendung des gleichen Affinitätsankers einfach. Jedoch hat das zugrunde liegende Expressionssystem zwei Limitierungen: Zum einen darf das zu klonierende Gen keine interne Schnittstelle für das Restriktionsenzym NcoI besitzen. Die Verwendung von NcoI ist unumgänglich bei der Insertion des Gens in den pETM-41-Vektor, da ansonsten eine multiple Stopp-Codon-Kassette aktiviert bliebe, welche die Proteinexpression nach dem MBP-Teil beenden würde. Zum anderen sollte die Aminosäuresequenz des zu reinigenden Enzyms keine Schnittstelle für die TEV-Protease aufweisen. Aus diesen Gründen wurde noch eine alternative Reinigungsstrategie entwickelt.

### 5.1.3 Rückfaltung aus Einschlusskörpern

Unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-4T-1 wurde die KR als Fusionsprotein mit der 26 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* am N-Terminus exprimiert (Smith und Johnson, 1988). Die Membranbindung der KR wurde auch durch diesen Affinitätsanker aufgehoben. Obwohl beide Fusionspartner enzymatisch aktiv waren, band das Fusionsprotein während der affinitätschromatographischen Reinigung nicht an das auf der Säulenmatrix immobilisierte Glutathion (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieses Verhalten deutete auf eine sterische Hinderung der Glutathion-S-Transferase hin.

Da GST-Fusionsproteine stark zur Bildung von Einschlusskörpern neigen (Hartman *et al.*, 1992), konnte die Reinigung auch auf Basis der Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern durchgeführt werden.

Bei einer Expressionstemperatur von 37 °C bildeten 75 % des GST-KR-Fusionsproteins unlösliche Aggregate. Die Solubilisierung der Einschlusskörper wurde durch die Zugabe des starken Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid (GdmCl) erreicht. Die Rückfaltung, die durch die Entfernung der chaotropen Substanzen zustande kommt, wird gewöhnlich durch Dialyse oder schnelle Verdünnung bewirkt. Im Rahmen einer Optimierung der Rückfaltungsbedingungen wurde die langsame Entfernung der chaotropen Agenzien durch Dialyse mit der Methode der schnellen Verdünnung verglichen. Darüber hinaus wurde die Auswirkung verschiedener niedermolekularer Additive auf den Erfolg der Renaturierung untersucht. Die Auswahl der Additive erfolgte anhand einer Publikation von Rudolph und Lilie (1996).



**Abbildung 5.4: A)** Vergleich der Enzymaktivität des GST-KR-Fusionsproteins mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat nach der Rückfaltung durch schnelle Verdünnung (□) und Dialyse (■). Beide Datensätze wurden auf eine äquivalente Menge an eingesetztem Einschlusskörper-Solubilisat bezogen. **B)** Abhängigkeit der Rückfaltung von der Anwesenheit niedermolekularer Additive. a: ohne Additive; b: 0,5 M L-Arginin; c: 1 M Tris; d: 0,5 M GdmCl; e: 20 % Glycerin; f: 1 mM NADPH. Dieses Experiment wurde mit der Methode der schnellen Verdünnung durchgeführt.

Abbildung 5.4 A zeigt, dass die Dialyse ein besseres Ergebnis erzielte als die schnelle Verdünnung. Das löslich exprimierte GST-KR-Fusionsprotein besaß eine Ketonreduktionsaktivität gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon von 0,18 U mg<sup>-1</sup>. Nach der Dialyse wurde eine Aktivität von 0,08 U mg<sub>Solubilisat</sub><sup>-1</sup> gemessen, was einer Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein von 44 % entsprach. Aus Abbildung 5.4 B wird ersichtlich, dass kein Additiv einen signifikant positiven Effekt auf die Rückfaltung hatte (t-Test für verbundene Stichproben). Während der natürliche Ligand NADPH und Glycerin keinerlei Einfluss auf die Renaturierung der KR besaßen, behinderten Arginin, Guanidiniumchlorid und Tris den Faltungsprozess.

Nach der Rückfaltung und der Spaltung des Fusionsproteins durch Thrombin konnten das freie GST-Protein und die verwendete Protease problemlos durch Affinitätschromatographie entfernt werden. Die Reinheit der KR lag nach einer abschließenden Größenausschlusschromatographie zur Feinreinigung bei ca. 97,0 %, wobei eine Ausbeute von 0,5 - 0,7 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> erzielt wurde. Da die Reinigung nicht mit Hilfe des Affinitätsankers, sondern auf der Basis der Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern durchgeführt wurde, müssten die Faltungsbedingungen bei einer Reinigung homologer Proteine unter Umständen angepasst werden.

#### 5.1.4 Vergleich der Herstellungsverfahren

In Tabelle 5.1 werden die verschiedenen Verfahren zur Produktion der KR verglichen.

**Tabelle 5.1:** Vergleich der untersuchten Herstellungsverfahren für die KR.

<b>Expression</b>	<b>Ausbeute, mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup></b>	<b>Reinheit, %</b>	<b>zeitlicher Aufwand</b>	<b>Übertrag- barkeit</b>
Ohne Affinitätsanker	0,1	≤ 50,0	hoch	mittel
Als MBP-Fusionsprotein	3,9 - 6,0	≥ 99,8	gering	hoch
Als GST-Fusionsprotein	0,5 - 0,7	~ 97,0	mittel	mittel

Die Expression und Reinigung der KR in Fusion mit Maltose-bindendem Protein erfüllte alle Kriterien für ein effizientes Herstellungsverfahren. Das Protein lag in hoher Reinheit vor, wobei gleichzeitig eine sehr gute Ausbeute erzielt wurde. Darüber hinaus ist die Affinitätschromatographie nicht zeitaufwändig und lässt sich bei Verwendung des gleichen Affinitätsankers einfach auf andere Proteine übertragen. Im Gegensatz hierzu war die Expression und Reinigung ohne Affinitätsanker am wenigsten für die Produktion der KR geeignet. Neben den Aspekten der geringen Reinheit und Ausbeute ist die präparative Größenausschlusschromatographie aufgrund großer Säulenvolumina und niedriger Flussraten langwierig und die Anionenaustauschchromatographie müsste für jedes Protein angepasst werden, da der isoelektrische Punkt einen wichtigen Einfluss bei dieser Methode besitzt. Die Reinigung der KR in Form von Einschlusskörpern aus GST-Fusionsproteinen nahm eine Mittelstellung ein. Da hierbei alle Kriterien schlechter erfüllt wurden als bei der Verwendung des MBP-Fusionsproteins, wurde dieses Herstellungsverfahren nur als Rückfallposition für Gene bzw. Proteine betrachtet, die eine NcoI- oder TEV-Schnittstelle aufweisen.

### 5.1.5 Diskussion

Die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 war bei ihrer heterologen Expression in *Escherichia coli* größtenteils membrangebunden. Bei Cyanobakterien und Pflanzen wird zwar eine Assoziation der Fettsäuresynthase II mit der Thylakoidmembran vermutet (Slabas und Smith, 1988; Roughan und Ohlrogge, 1996; Thelen und Ohlrogge, 2002). *Escherichia coli*-Zellen besitzen jedoch keine Thylakoide und die Proteine der Fettsäuresynthase II sind im Cytoplasma lokalisiert (Vagelos, 1971; Jackowski *et al.*, 1985), was eine Membranbindung aufgrund einer Protein-Protein-Interaktion unwahrscheinlich macht. Eine Assoziationsform peripherer Membranproteine, die sowohl mit der cyanobakteriellen Thylakoidmembran als auch mit Membranen aus *Escherichia coli* möglich wäre, ist die Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen. Die KR hat einen außergewöhnlich hohen GRAVY-Index von + 0,457 und folglich einen stark hydrophoben Charakter. Barrios-Llerena *et al.* (2006) fanden bei einer Untersuchung des Proteoms des verwandten Stammes *Synechocystis* PCC 6803 als höchsten GRAVY-Index + 0,474. Die KR aus *Escherichia coli* hingegen besitzt einen GRAVY-Index von + 0,100 und ist demnach weit weniger hydrophob, was die Unterschiede in der Lokalisation der beiden Proteine erklären könnte.

Sowohl die Fusion der KR an das Maltose-bindende Protein als auch an die Glutathion-S-Transferase konnten die beobachtete Membranbindung aufheben. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Veröffentlichung von Klein *et al.* (1992) überein, in der die Reinigung der KR aus dem lanzettblättrigen Köcherblümchen (*Cuphea lanceolata*) beschrieben ist. Hierbei war das Enzym ebenfalls als GST-Fusionsprotein gereinigt worden, ohne dass eine Membranassoziation erwähnt wurde.

Bei der Expression und Reinigung der KR mit His<sub>6</sub>-MPB-Anker wurde eine Ausbeute von 3,9 - 6,0 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> erzielt. Bezogen auf das eingesetzte Kulturvolumen von *Escherichia coli* entsprach dies einer volumetrischen Ausbeute von 10 - 15 mg L<sup>-1</sup>. Dieser Wert war deutlich höher als die von Wickramasinghe *et al.* (2006) beschriebene Ausbeute der ebenfalls in *Escherichia coli* exprimierten homologen KR aus *Plasmodium falciparum*. Dieses Protein war auch affinitätschromatographisch über einen His<sub>10</sub>-Anker gereinigt worden, wobei eine volumetrische Ausbeute von 0,5 mg L<sup>-1</sup> erzielt wurde.

Die KR konnte auch durch die Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern aus GST-KR-Fusionsproteinen gewonnen werden. Bei der Renaturierung von Einschlusskörpern konkurrieren die Prozesse der Fehlfaltung und Aggregation mit der korrekten Faltung des Zielproteins (Buchner und Rudolph, 1991; Rudolph und Lilie, 1996). Bei der Rückfaltung durch Dialyse werden die Proteine über längere Zeiträume mittleren Konzentrationen an chaotropen Agenzien ausgesetzt, was die Bildung von Faltungsintermediaten fördert. Neigen die-

se Intermediate zur Aggregation, so ist die Methode der schnellen Verdünnung, bei der die Konzentration der denaturierenden Substanzen schlagartig reduziert wird, die bessere Wahl (Rudolph und Lilie, 1996). Im Falle des GST-KR-Fusionsproteins scheinen die ungefalteten Proteine stärker zu aggregieren als die Faltungsintermediate, da die Dialyse deutlich bessere Ergebnisse erzielte. Die Rückfaltungsausbeute von 44 % ist vergleichbar mit der Ausbeute von 51 % bei einem Fusionprotein zwischen der Glutathion-S-Transferase und einem Penicillin-bindenden Protein aus *Streptococcus pneumoniae* (Zhao *et al.*, 1999). Hierbei war das Fusionsprotein ebenfalls durch Dialyse ohne Zugabe von Additiven rückgefaltet worden.

## 5.2 Struktur

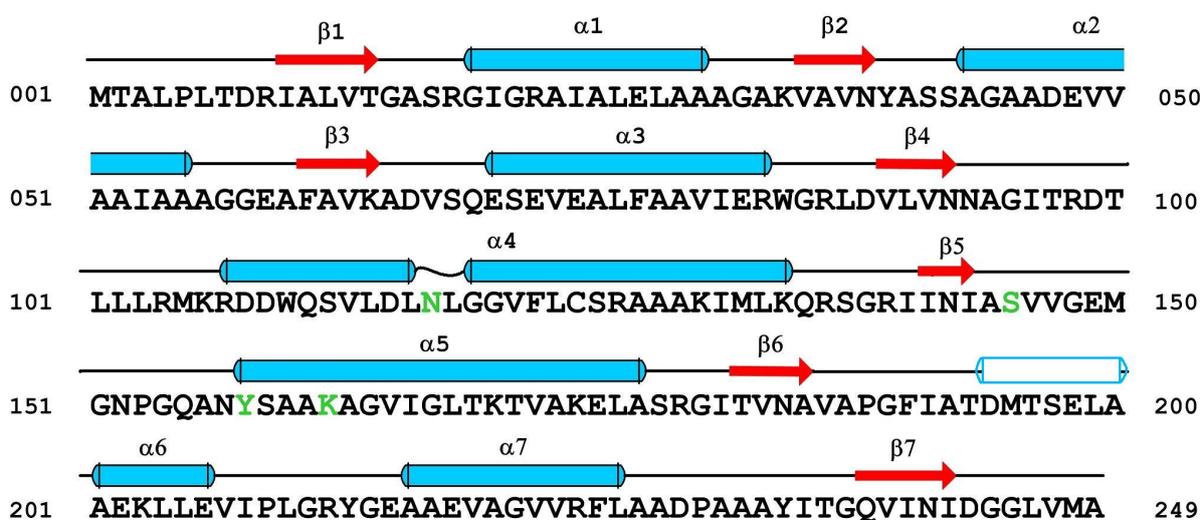
Die räumliche Struktur bedingt die Wirkungsweise eines Proteins. Eines der Schlüsselprobleme der heutigen Proteintechnologie ist der Brückenschlag zwischen einer Proteinsequenz und der zugehörigen Funktion. Die Struktur der KR wurde daher mit verschiedenen Methoden untersucht, um Informationen über die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Enzyms zu erhalten.

### 5.2.1 Sekundärstruktur

Die Identifizierung von Sekundärstrukturelementen erfolgte mit den Programmen APSSP2 und Predict Protein (PROF), die beide auf neuronalen Netzwerken basieren (Raghava, 2002; Rost und Sander, 1993). Da die Zuweisung von Aminosäuren an den Rändern von Sekundärstrukturelementen häufig nicht eindeutig ist, wurden nur diejenigen Elemente übernommen, die eine mittlere Vorhersagewahrscheinlichkeit  $P = 0,7$  ( $1 = \text{hoch}$ ,  $0 = \text{niedrig}$ ) besaßen. Die Positionen dieser Sekundärstrukturelemente sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

Die beiden verwendeten Programme stimmten in ihrer Vorhersage gut überein und ermittelten 7  $\alpha$ -Helices und 7  $\beta$ -Stränge, wobei die  $\alpha$ 4-Helix durch einen kurzen, weniger geordneten Bereich unterbrochen ist. Große Unterschiede ergaben sich nur in der Region zwischen Aspartat (D) 194 und Alanin (A) 200. Das Programm APSSP2 erkannte hier eine weitere  $\alpha$ -Helix, während Predict Protein (PROF) eine flexible Schleife vorhersagte.

Durch die Lokalisierung der Sekundärstrukturelemente konnten die konservierten Sequenzmotive der klassischen Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) nach Kallberg *et al.* (2002) und Persson *et al.* (2003) zugewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 dargestellt. Dadurch gelang auch die Identifizierung der katalytischen Tetrade, die sich aus den Aminosäuren Asparagin (N) 117, Serin (S) 145, Tyrosin (Y) 158 und Lysin (K) 162 zusammensetzt.



**Abbildung 5.5:** Sekundärstrukturelemente der KR. Die Proteinsequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt (Tabelle 9.2). Die roten Pfeile markieren  $\beta$ -Stränge, die blauen Röhren  $\alpha$ -Helices, die eine mittlere Vorhersagewahrscheinlichkeit  $P = 0,7$  in den Programmen APSSP2 und Predict Protein (PROF) besaßen. Die Helix, die nicht eindeutig von beiden Programmen vorhergesagt wurde, wird durch eine nicht ausgefüllte Röhre dargestellt. Die katalytische Tetrade ist grün markiert.

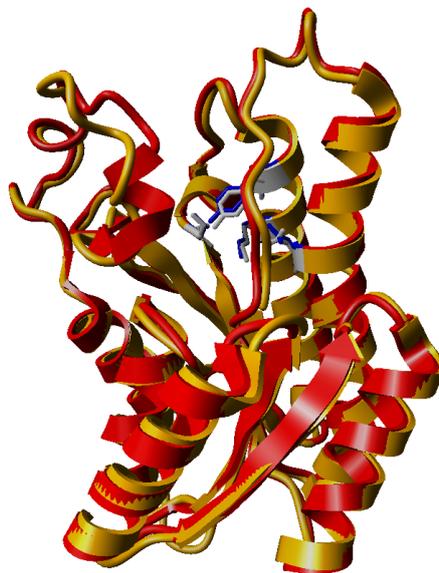
**Tabelle 5.2:** Ausprägungen der konservierten Sequenzmotive der klassischen Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) in der Aminosäuresequenz der KR. Die Motive sind im Einbuchstabencode dargestellt (Tabelle 9.2). Aminosäuren der katalytischen Tetrade sind fett gedruckt. Von den Motiven abweichende Aminosäuren sind unterstrichen.

Sekundärstrukturelement	Sequenzmotiv	Ausprägung in der KR
$\beta 1 + \alpha 1$	TGxxxGhG	TGASRGIG
$\beta 3 + \alpha 3$	Dhx[gp]	DVSQ
$\beta 4$	GxDhHHNNAGh	GRLDVLVNNAGI
$\alpha 4$	hNhxG	LNLGG
$\beta 5$	GxhxxhSSh	GRIINI <u>AS</u> V
$\alpha 5$	Yx[AS][ST]K	<b>Y</b> SAA <u>K</u>
$\beta 6$	h[KR]h[NS]xhxPGxxxT	<u>I</u> TVNAVAPGFIAT

Während die Sequenzmotive der klassischen SDRs im N-terminalen Bereich des Proteins zu 100 % mit der Aminosäuresequenz der KR übereinstimmten, ergaben sich bei den Motiven in der Region zwischen dem  $\beta 5$ - und  $\beta 6$ -Strang einzelne Abweichungen. Eine Betrachtung der Schlüsselpositionen der Subfamilien der klassischen SDRs zeigte, dass die KR weder eine saure noch eine basische Aminosäure am Ende des  $\beta 2$ -Stranges hat. Im TGxxxGhG-Motiv hingegen befindet sich ein basisches Arginin (R). Aus diesem Grund konnte die KR der Subfamilie cP1 zugewiesen werden, die NADPH-bindende Enzyme umfasst.

### 5.2.2 Tertiärstruktur

Die Erstellung eines Homologiemodells gab Aufschluss über die Tertiärstruktur der KR. Das Ziel der Homologiemodellierung ist der Aufbau eines dreidimensionalen Modells für ein Protein mit unbekannter Struktur aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu Proteinen, von denen eine Röntgenkristall- oder Kernmagnetresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR)-Struktur bestimmt wurde. Für die Identifizierung von geeigneten Strukturvorlagen wurde das BLAST-Programm des Swiss-Model-Servers verwendet. Hierbei wurden die Röntgenkristallstrukturen 1edoA (Auflösung 2,3 Å) und 2uvdG (Auflösung 2,4 Å), die zu den homologen Proteinen der KR aus Raps (*Brassica napus*) und *Bacillus anthracis* gehören, als ideale Matrizen ermittelt. Die Proteine zeigten Sequenzidentitäten mit der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 von 62 % bzw. 57 %.

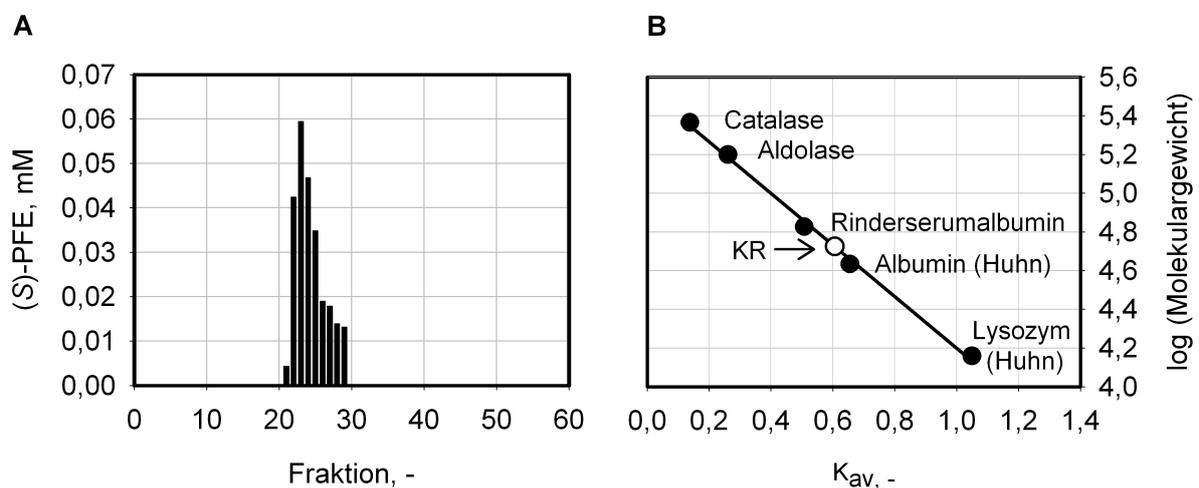


**Abbildung 5.6:** Übereinandergelegte Homologiemodelle der KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Das Modell mit 1edoA als Matritze ist in Rot mit blauer katalytischer Tetrade, das Modell mit 2uvdG als Matritze in Orange mit grauer katalytischer Tetrade dargestellt.

Die erhaltenen Homologiemodelle sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Der mittlere Abstand der Atomkoordinaten von den Koordinaten der Referenzstruktur (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) ist ein Maß für die Güte eines Homologiemodells. Beide Modelle hatten eine globale RMSD von 0,79 Å und zeigten die für Nukleotid-bindende Enzyme typische Rossmann-Faltung mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt, das auf zwei Seiten von  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Untereinander unterschieden sich die Homologiemodelle hauptsächlich im Bereich zwischen Aspartat 194 und Glutamat 202, der in Abbildung 5.6 in der linken oberen Ecke zu sehen ist. Analog zu den Vorhersagediskrepanzen, die es bei der Sekundärstrukturanalyse für diesen Bereich gab, wurde von dem Homologiemodell an die Struktur von 1edoA eine  $\alpha$ -Helix postuliert, während das Modell mit 2uvdG als Matritze eine flexible Schleife annahm. Das aktive Zentrum kam in beiden Modellen annähernd zur Deckung. Für die weiteren Betrachtungen der Proteinstruktur wurde aufgrund der höheren Sequenzidentität das Modell mit 1edoA als Matritze verwendet.

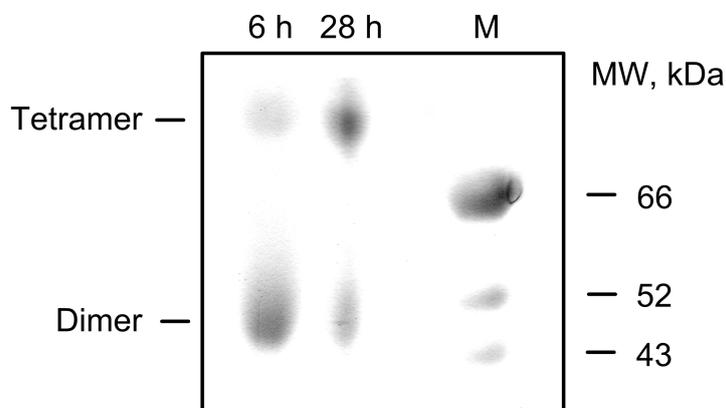
### 5.2.3 Quartärstruktur

Der Oligomerisierungsgrad des Enzyms wurde mit den Methoden der Größenausschlusschromatographie und der Blauen Nativgelelektrophorese untersucht. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie sind in Abbildung 5.7 dargestellt.



**Abbildung 5.7:** Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie. **A)** KR-Aktivität in den Proteinfractionen nach der Trennung. Dargestellt ist die Konzentration an gebildetem (S)-2',3',4',5',6'-Pentafluorphenylethanol ((S)-PFE). **B)** Kalibration der Säule. Die Partitionskoeffizienten  $K_{av}$  von Standardproteinen (●) und der KR (○) sind gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen. Standardproteine: Catalase, 232 kDa; Aldolase, 158 kDa; Rinderserumalbumin, 66 kDa; Albumin (Huhn), 43 kDa und Lysozym (Huhn) 14 kDa.

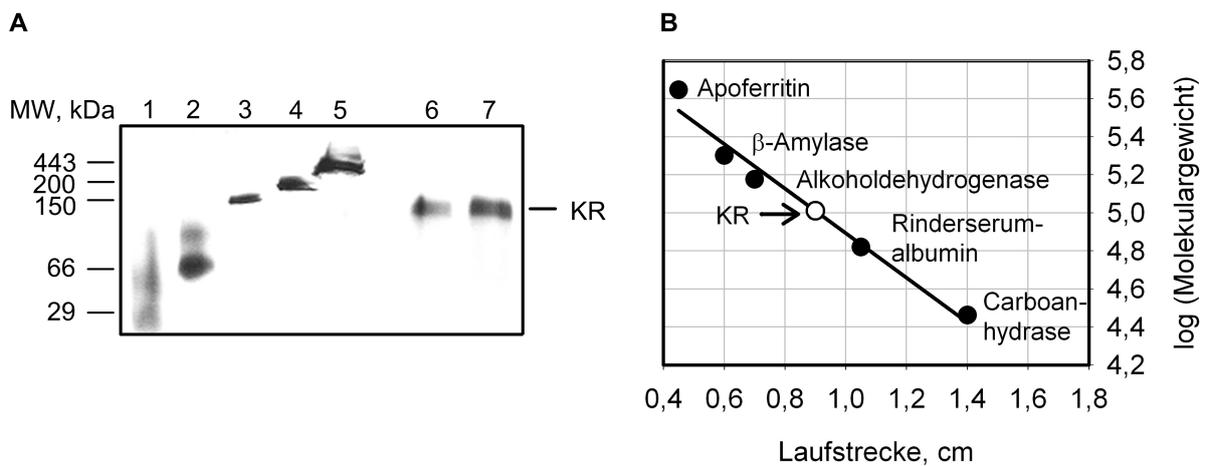
Abbildung 5.7 A zeigt die Verteilung der Enzymaktivität in den aufgetrennten Proteinproben. Die gebildete Menge an (S)-Alkohol konstatierte ein singuläres Aktivitätsmaximum bei Fraktion 23, was einem Elutionsvolumen  $V_e$  von 240 mL und einem Partitionskoeffizienten  $K_{av}$  von 0,61 entsprach. Das apparente Molekulargewicht wurde anhand von Standardproteinen ermittelt und lag bei 53 kDa, was gut mit dem Molekulargewicht eines Homodimers von 51 kDa übereinstimmte. Da die Größenausschlusschromatographie den Oligomerisierungsgrad von Proteinen nicht unter Gleichgewichtsbedingungen analysiert und alle bekannten homologen Enzyme als Tetramer vorliegen (Chang *et al.*, 2009), wurde die KR weiter mit Hilfe der Blauen Nativgelelektrophorese untersucht. Hierbei wurde Fraktion 23 der Größenausschlusschromatographie nach einer Lagerung von 6 h und 28 h bei 4 °C aufgetragen.



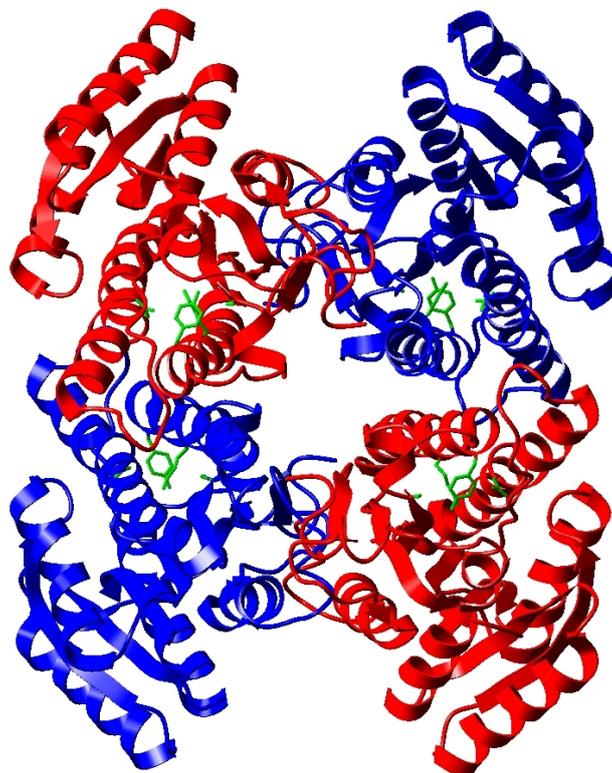
**Abbildung 5.8:** Blaue Nativgelelektrophorese (13 % Trenngel) von Proteinfraction 23 nach einer Lagerung von 6 h und 28 h bei 4 °C. Als Markerproteine dienen Rinderserumalbumin (66 kDa),  $\alpha$ -Amylase (52 kDa) und Albumin (43 kDa).

Abbildung 5.8 zeigt, dass die KR 6 h nach der Größenausschlusschromatographie zu 85 % als Dimer und zu 15 % als Tetramer vorlag. Weitere 22 h später stieg der Anteil des Tetramers auf 73 %, was auf eine langsame Assoziation von Dimeren zu Tetrameren in Lösung hindeutet.

Um das Oligomer unter Gleichgewichtsbedingungen zu betrachten, wurde das Molekulargewicht der KR in einer Blauen Nativgelelektrophorese untersucht, ohne vorher eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt zu haben. In diesem Experiment wurde eindeutig ein Homotetramer detektiert - wie Abbildung 5.9 zeigt. Das berechnete Molekulargewicht des Homotetramers von 102 kDa korrespondierte fast exakt mit der Größe der einzigen sichtbaren Bande in den KR-Proben von 103 kDa. Darüber hinaus zeigte sich das Tetramer um den Faktor 1,26 aktiver als das Dimer, das von der Gelfiltrationssäule eluierte (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 5.9:** **A)** Blaue Nativgelelektrophorese (20 % Trenngel) ohne vorangegangene Größenausschlusschromatographie. Als Molekulargewichtsmarker dienten folgende Proteine: Apoferritin, 443 kDa;  $\beta$ -Amylase, 200 kDa; Alkoholdehydrogenase (Hefe), 150 kDa, Rinderserumalbumin, 66 kDa; Carboanhydrase 29 kDa. In den Bahnen 6 und 7 wurden 5 bzw. 10  $\mu$ g KR aufgetragen. **B)** Ermittlung des Molekulargewichts der KR ( $\circ$ ) anhand der Laufweite der Standardproteine ( $\bullet$ ).



**Abbildung 5.10:** Modellierter Quartärstruktur der KR. Die Homologiemodelle des KR-Monomers wurden mit Hilfe des Programms YASARA in die Kristallstruktur des homologen Proteins aus Raps (1edoA), die vom EBI PDBePisa-Server ausgegeben wurde, eingepasst. Die einzelnen Monomere sind in Rot bzw. Blau dargestellt, während die aktiven Zentren grün markiert sind.

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass die KR unter Gleichgewichtsbedingungen als Homotetramer vorliegt. Während der Größenausschlusschromatographie dissoziierte das Tetramer in zwei aktive Dimere, die anschließend langsam wieder zum Tetramer assemblieren. Die modellierte Quartärstruktur der KR ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

#### 5.2.4 Diskussion

Die Positionen der identifizierten Sekundärstrukturelemente entsprachen sehr gut der Verteilung der Sekundärstrukturen in den homologen Proteinen aus *Plasmodium falciparum*, Raps und *Escherichia coli*, die ebenfalls ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt aus 7  $\beta$ -Strängen besitzen (Wickramasinghe *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2001). In den Röntgenstrukturen der drei homologen Proteine wurden jedoch 8 statt 7  $\alpha$ -Helices identifiziert. Die achte Helix lag dabei im Bereich zwischen Aspartat 194 und Alanin 200, für den sich die Vorhersagen der in dieser Arbeit verwendeten Programme unterschieden. Beim Protein aus *Plasmodium falciparum* wurde diese  $\alpha$ -Helix, die eine gewisse Flexibilität aufwies, als „ungeordnet“ bezeichnet (Wickramasinghe *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass dieser Bereich als beweglicher Deckel fungiert, der das aktive Zentrum aufgrund einer konformationellen Änderung nach der Bindung des Substrates abdeckt (White *et al.*, 2005). Da die Homologiemodellierung gerade in flexiblen Bereichen schwierig ist, differierten auch die beiden erstellten Homologiemodelle an dieser Stelle am stärksten (Martí-Renom *et al.*, 2000).

Die Analyse der konservierten Sequenzmotive der klassischen SDRs ergab, dass bei der KR abweichende Aminosäuren in den drei C-terminalen Motiven vorliegen. Ein Vergleich mit den Sequenzen der homologen Proteine aus *Escherichia coli* und Raps zeigte jedoch, dass sich hier an allen drei Positionen ebenfalls Aminosäuren befinden, die von den Sequenzmotiven abweichen (Price *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2000). Daher scheinen die von Kallberg *et al.* (2002) und Persson *et al.* (2003) identifizierten Sequenzmotive an manchen Stellen zu eng spezifiziert zu sein.

Bei der Homologiemodellierung wurden Röntgenkristallstrukturen von Proteinen verwendet, die Sequenzidentitäten von 62 und 57 % mit der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 aufweisen. Die mittlere Genauigkeit von Homologiemodellen, die auf Sequenzidentitäten von über 50 % basieren, ist mit derjenigen von Röntgenkristallstrukturen mit niedriger Auflösung (3 Å) vergleichbar. Derartige Homologiemodelle sind auch für die Konstruktion ortsgerichteter Mutanten sowie für die Visualisierung der Anlagerung von kleinen Liganden geeignet (Martí-Renom *et al.*, 2000).

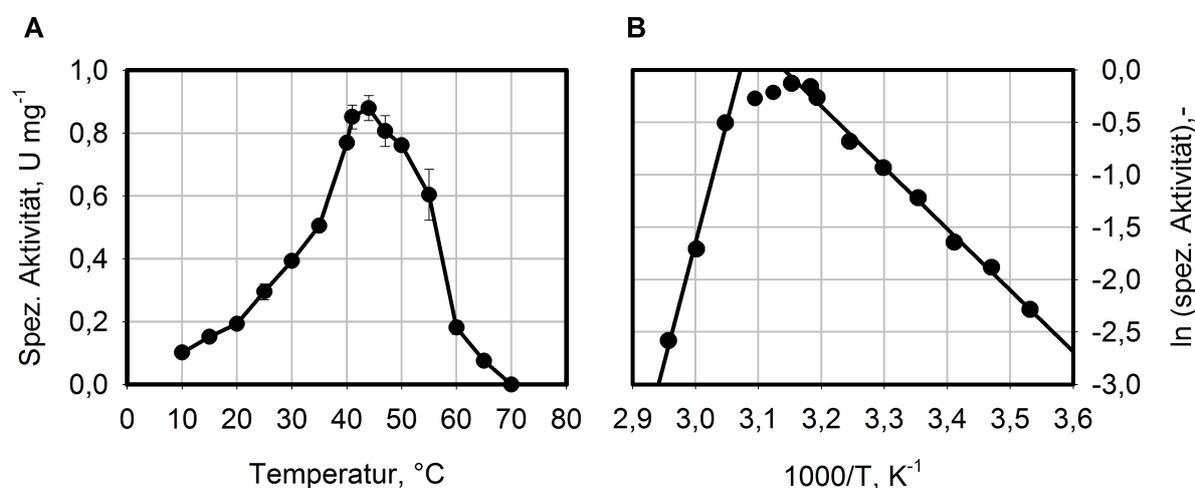
Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der KR zeigte, dass das Enzym als Homotetramer vorlag, das während der Größenausschlusschromatographie in zwei aktive Dimere dissoziierte. Das Tetramer war um den Faktor 1,26 aktiver als das Dimer. Strukturelle Studien des homologen Proteins aus *Plasmodium falciparum* kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Wickramasinghe *et al.*, 2006): Die Größenausschlusschromatographie bestimmte den Proteinkomplex ebenfalls zu klein. Das ermittelte Molekulargewicht lag hierbei leicht über dem des Dimers. Eine analytische Ultrazentrifugation, bei der das Oligomer unter Gleichgewichtsbedingungen betrachtet wurde, zeigte in Analogie zur Blauen Nativgelelektrophorese eindeutig ein Homotetramer.

## 5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der Optimierung der Reaktionsbedingungen der KR dargestellt. Als Substrat wurde hierbei 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon verwendet.

### 5.3.1 Temperaturoptimum

Die Temperaturabhängigkeit der KR-Aktivität wurde im Bereich zwischen 10°C und 70°C untersucht.

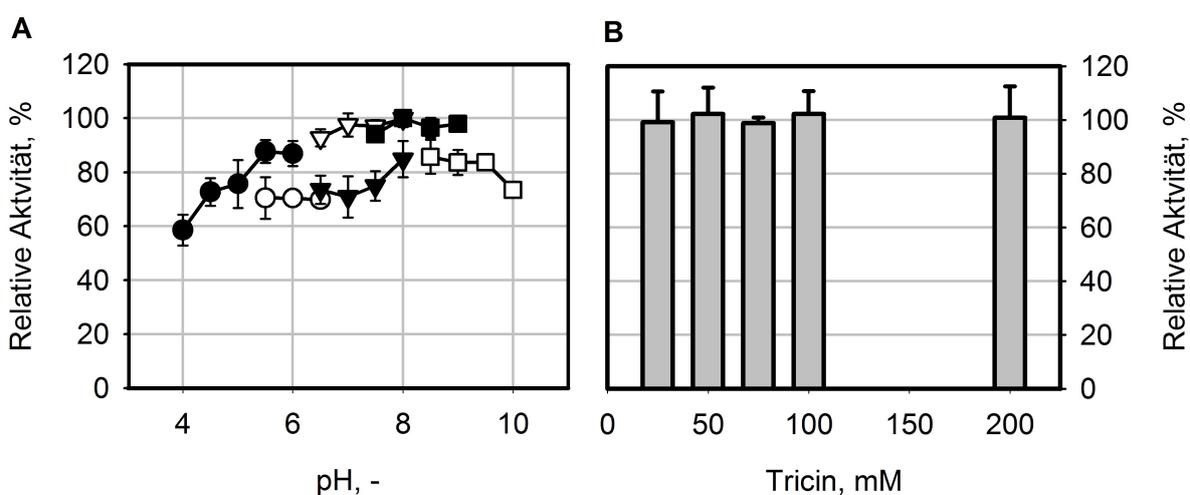


**Abbildung 5.11:** Bestimmung des Temperaturoptimums und der Aktivierungsenergien. **A)** Abhängigkeit der spezifischen (spez.) Enzymaktivität von der Reaktionstemperatur. Die Verbindungslinie dient nur als visuelle Hilfe. **B)** Arrhenius-Darstellung für die Bestimmung der Aktivierungsenergien der Reduktionsreaktion und der Enzyminaktivierung, die aus den Steigungen der Regressionsgeraden ermittelt wurden. Reduktion:  $\ln(\text{spez. Aktivität}) = 18,69 - 5943,27/T$  ( $r^2=0,9951$ ); Inaktivierung:  $\ln(\text{spez. Aktivität}) = 23071,41/T - 70,86$  ( $r^2=0,9933$ ).

Abbildung 5.11 zeigt die Bestimmung des Temperaturoptimums und der Aktivierungsenergien für die Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und die temperaturabhängige Enzyminaktivierung. Das Enzym war zwischen 10°C und 65°C aktiv mit einem Optimum bei 44°C. Die Aktivierungsenergien der Reduktionsreaktion und der Enzyminaktivierung wurden über die Arrheniusgleichung (Gleichung 4.14 bzw. 4.15) berechnet. Sie betragen  $E_A$  (Reduktion) = 49,42 kJ mol<sup>-1</sup> und  $E_A$  (Inaktivierung) = 191,83 kJ mol<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 pH-Optimum

Die Aktivität der KR als Funktion des pH wurde im Bereich zwischen pH 4 und pH 10 untersucht. Da neben dem pH auch die verwendete Puffersubstanz von Bedeutung ist, wurden nach Möglichkeit mehrere Puffersysteme mit einer hinreichenden Pufferkapazität bei einem gegebenen pH verwendet.

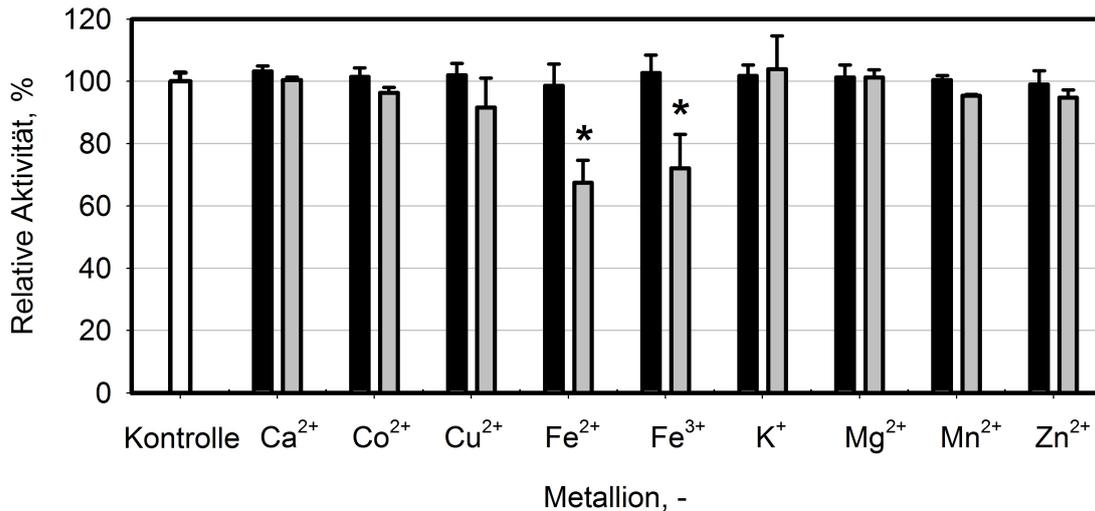


**Abbildung 5.12: A)** pH-Abhängigkeit der KR-Aktivität. Verwendete Puffersysteme: Na-Citrat (●), MES (○), Na-Phosphat (▼), MOPS (▽), Tricin (■), Tris-HCl (□). Alle Aktivitäten sind prozentual zum Maximum angegeben. Die Verbindungslinien dienen nur als visuelle Hilfe. **B)** Einfluss der Molarität des Tricin-Puffers (pH 8) auf die Enzymaktivität.

Aus Abbildung 5.12 A wird ersichtlich, dass die Aktivität der KR zwischen pH 4 und pH 10 nicht unter 50 % sank. Es zeigte sich ein breites pH-Optimum im Bereich zwischen pH 7 und pH 9 bei Verwendung der zwitterionischen Puffer MOPS und Tricin. Das Aktivitätsmaximum wurde bei pH 8 in Tricinpuffer detektiert. Abbildung 5.12 B zeigt, dass die Variation der Puffermolarität des optimalen Tricinpuffers (pH 8) zwischen 25 mM und 200 mM keinen signifikanten Effekt auf die Ketonreduktion hatte (t-Test für verbundene Stichproben). Die Zugabe von NaCl bis zu einer Konzentration von 500 mM wirkte sich ebenfalls nicht auf die Enzymaktivität der KR aus (Ergebnisse nicht gezeigt).

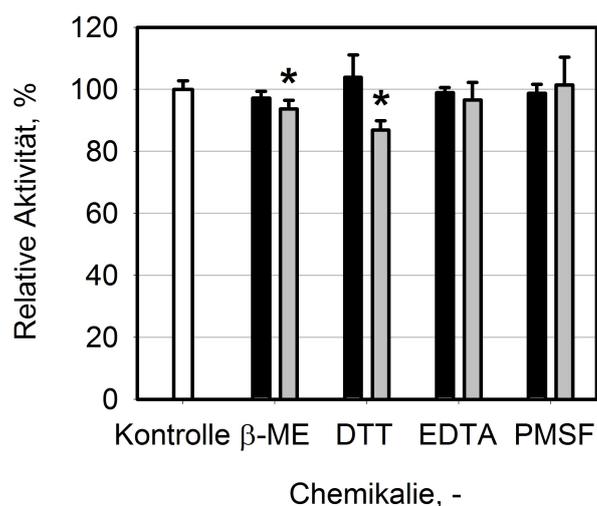
### 5.3.3 Identifikation von Aktivatoren und Inhibitoren

Abbildung 5.13 zeigt den Einfluss verschiedener Metallionen auf die KR-Aktivität. Die Zugabe der Metallionen in einer Konzentration von 1 mM hatte in keinem Fall einen Effekt, während sowohl zwei- als auch dreiwertige Eisenionen bei einer Konzentration von 10 mM einen stark inhibierenden Einfluss hatten. Die KR wurde von keinem Ion aktiviert.



**Abbildung 5.13:** Einfluss verschiedener Metallionen in Konzentrationen von 1 mM (■) und 10 mM (▒) auf die KR-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle (□). \*: statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $P < 0,05$ , t-Test für verbundene Stichproben).

Aus Abbildung 5.14 wird ersichtlich, welchen Einfluss verschiedene Chemikalien, die im Umgang mit Proteinen von Bedeutung sind, auf die KR haben. Die beiden reduzierenden Agenzien Dithiothreitol und  $\beta$ -Mercaptoethanol wirkten sich negativ auf die KR-Aktivität aus. Reduktionsmittel werden häufig in Aufschlusspuffern eingesetzt, um die Thiolgruppen der freigesetzten Proteine vor Oxidation zu schützen (Cleland, 1964). Da die KR nur einen Cysteinrest besitzt, der laut des Homologiemodells in das Innere des KR-Monomers ragt (Ergebnisse nicht gezeigt), war die Bildung von unerwünschten intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken nicht zu erwarten. Dieses Ergebnis ist für die Verwendung der KR in Kombination mit anderen Enzymen wichtig, falls diese ein reduzierendes Milieu für die Erhaltung ihrer Enzymaktivität benötigen. Die Zugabe des Metallchelatbildners EDTA hatte keinen Einfluss. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit der Beobachtung, dass die KR keine Aktivitätssteigerung in Gegenwart von Metallionen zeigte, da EDTA durch das Enzym komplexierte Metallionen entfernt hätte. Auch der Proteaseinhibitor PMSF verminderte die Enzymaktivität nicht.



**Abbildung 5.14:** Einfluss verschiedener Chemikalien in Konzentrationen von 1 mM (■) und 10 mM (▒) auf die KR-Aktivität ( $\beta$ -ME:  $\beta$ -Mercaptoethanol, DTT: Dithiothreitol). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle (□). \*: statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $P < 0,05$ , t-Test für verbundene Stichproben).

### 5.3.4 Diskussion

Die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 zeigte hinsichtlich des Temperatur- und pH-Optimums ähnliche Eigenschaften wie das homologe Enzym aus *Escherichia coli*, für das ebenfalls Reaktionsbedingungen von 45 °C und pH 8 optimal waren (Sun *et al.*, 2008).

Die berechnete Aktivierungsenergie  $E_A$  von 49,42 kJ mol<sup>-1</sup> für die Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon lag in dem für enzymkatalysierte Reaktionen erwarteten Bereich zwischen 10 und 60 kJ mol<sup>-1</sup> (Belitz *et al.*, 2007). Auch die Aktivierungsenergie der thermischen Inaktivierung lag mit 191,83 kJ mol<sup>-1</sup> erwartungsgemäß zwischen 150 und 800 kJ mol<sup>-1</sup> (Lee und Zocher, 1996).

Die KR zeigte die höchsten Enzymaktivitäten in zwitterionischen Puffern, die sich häufig positiv auf Proteine auswirken (Lottspeich und Zorbas, 1998). Da die Zugabe von 500 mM NaCl keinen negativen Effekt auf die Aktivität der KR hatte, kann das Enzym als salztolerant bezeichnet werden (Boucaud und Billard, 1985; Priebe und Jäger, 1978). Die TEV-Protease ist beispielsweise bei dieser Salzkonzentration nur noch halb so aktiv wie in einem Puffer ohne NaCl (Waugh, 2009).

Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und Aktivität in einem breiten pH-Bereich sind wichtige Eigenschaften von Enzymen für industrielle Anwendungen. Für die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH), die im technischen Maßstab eingesetzt wird, wurde ein Temperaturoptimum von 55 °C publiziert (Hummel, 1997). Da die Lage des Temperaturoptimums

timums stark von der Dauer der betrachteten Reaktion abhängt und bei längerer Inkubation eine Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen erfährt, ist die Temperaturstabilität besser zum Vergleich von Enzymen geeignet als das Temperaturoptimum (Cousins, 1976).

Die LB-ADH hat eine geringere pH-Toleranz als die KR. Die LB-ADH ist im sauren und neutralen pH-Bereich sehr aktiv mit einem Optimum zwischen pH 6,0 und 6,5, wenn NADPH als Cofaktor und Acetophenon als Substrat verwendet wird. Für die Reduktion mit NADH als Cofaktor liegt das Optimum bei pH 5,5. Im Alkalischen fällt die Enzymaktivität der LB-ADH dramatisch ab. Bei pH 8 beträgt die Restaktivität der LB-ADH mit NADPH als Cofaktor weniger als 20 %, während mit NADH gar keine Umsetzung mehr erfolgt (Machielsen *et al.*, 2009). Im Vergleich dazu sank die Aktivität der KR zwischen pH 4 und 10 nicht unter 50 %. Im Gegensatz zur LB-ADH, die zweiwertige Magnesium- oder Manganionen zur Entfaltung der Enzymaktivität benötigt (Hummel, 1997), zeigte die KR keine Abhängigkeit von Metallionen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Literatur (Chang *et al.*, 2009). Es wurde ein inhibierender Effekt von zwei- und dreiwertigem Eisen bei Konzentrationen von 10 mM festgestellt. Dies könnte daran liegen, dass Eisenionen an Tyrosinreste binden und ein Tyrosin an der katalytischen Tetrade der KR beteiligt ist (Miura *et al.*, 2001; Follmann, 2004).

## 5.4 Enzymstabilität

Die Enzymstabilität ist für eine spätere Prozessentwicklung ein wichtiger Parameter. Insbesondere unter ökonomischen Gesichtspunkten ist der Katalysatorverbrauch häufig limitierend. Da das von der KR umgesetzte 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon ein sehr hydrophobes Substrat ist, wurde neben der Temperatur-, pH- und Lagerstabilität auch die Stabilität in verschiedenen Zweiphasensystemen untersucht.

### 5.4.1 Temperaturstabilität

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führt nicht nur zu einer Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit, die sich durch die Arrhenius-Gleichung (Gleichung 4.14) beschreiben lässt, sondern auch zu einer Verringerung der Stabilität. Tabelle 5.3 zeigt die Halbwertszeiten der KR bei verschiedenen Temperaturen.

**Tabelle 5.3:** Halbwertszeit  $\tau$  der KR bei verschiedenen Temperaturen (pH 7,0  $\pm$  0,1).

Temperatur:	4 °C	20 °C	25 °C	30 °C	40 °C	44 °C	50 °C
Halbwertszeit $\tau$ :	> 3000 h	39,8 h	30,9 h	26,5 h	17,3 h	8,5 h	7,0 h

Eine Überlagerung von Temperatur- und pH-Effekten wurde durch die Verwendung eines 50 mM Phosphatpuffers, dessen pH bei 25 °C auf 7,0 eingestellt wurde, weitestgehend vermieden. Die temperaturabhängige pH-Änderung des Puffers betrug im untersuchten Temperaturbereich maximal 0,1.

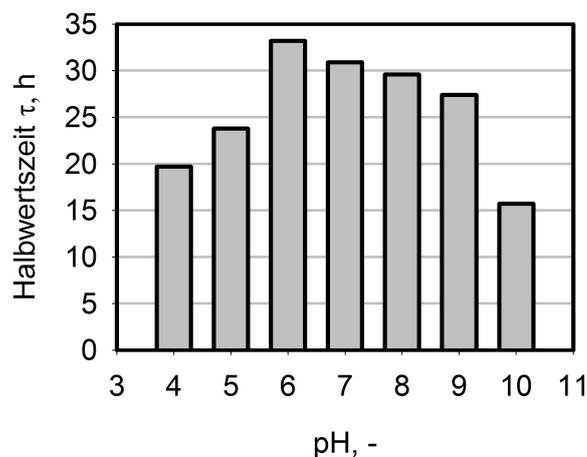
Die KR wies eine sehr hohe Stabilität bei 4 °C auf. Bei der Standardtemperatur von 30 °C war die Halbwertszeit dreimal länger als bei einer Temperatur von 44 °C, die sich als optimal für die Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon erwiesen hatte.

### 5.4.2 Lagerstabilität

Obwohl die KR eine hohe Stabilität bei 4 °C aufwies, war es wünschenswert, eine langfristige Lagermöglichkeit für das Protein zu finden. Das Enzym zeigte einen Aktivitätsverlust von 59 % nach einmaligem Einfrieren bei -20 °C. Durch das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff reduzierte sich die Enzymaktivität um 14 %, wenn kein Glycerin hinzugefügt wurde, und um 8 % bei einer Glycerinkonzentration von 40 % (v/v). Das eingefrorene Enzym war bei -80 °C mindestens für 3 Monate lagerbar ohne einen zusätzlichen Aktivitätsverlust durch die Lagerung zu erleiden (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 5.4.3 pH-Stabilität

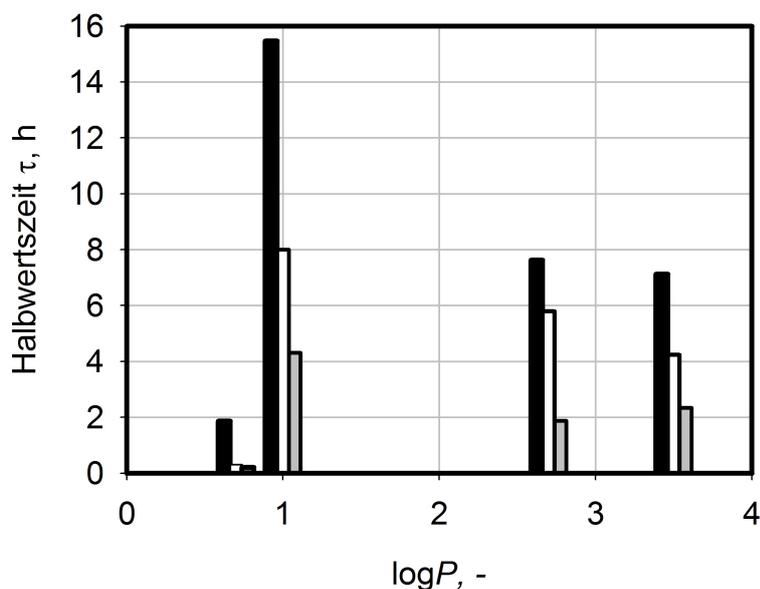
Die Stabilität der KR wurde zwischen pH 4 und pH 10 bei 25 °C in 50 mM Phosphatpuffer untersucht. Das Enzym zeigte sich über den gesamten pH-Bereich stabil mit einem Optimum bei pH 6. Aus Abbildung 5.15 wird darüber hinaus ersichtlich, dass die Halbwertszeit selbst bei pH 10 noch 47 % der Halbwertszeit bei pH 6 betrug.



**Abbildung 5.15:** pH-Stabilität der KR. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Halbwertszeit  $\tau$  vom pH bei 25 °C.

#### 5.4.4 Stabilität in Gegenwart organischer Lösemittel

Zur Untersuchung, ob die Funktionalität oder die Polarität von organischen Lösemitteln einen deutlicheren Einfluss auf die Stabilität der KR besitzt, wurden Lösemittel mit unterschiedlichem  $\log P$  verwendet, die zudem verschiedenen Substanzklassen angehörten. Ethylacetat wurde als repräsentatives Beispiel für Ester, Methyl-*tert*-butylether (MTBE) für Ether sowie Hexan und Cyclohexan für unverzweigte und zyklische Alkane eingesetzt. Gemessen wurde die molekulare Toxizität der Lösemittel bei unvermischten Phasen.

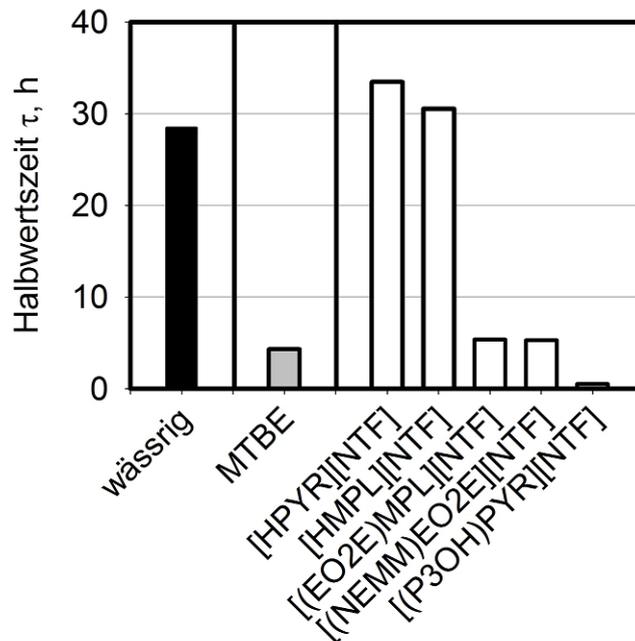


**Abbildung 5.16:** Stabilität der KR in biphasischen Systemen mit unterschiedlichem  $\log P$  des organischen Lösemittels: Ethylacetat ( $\log P = 0,7$ ); MTBE ( $\log P = 1,0$ ); Cyclohexan ( $\log P = 2,7$ ); Hexan ( $\log P = 3,5$ ). Dargestellt ist die Halbwertszeit  $\tau$  bei Raumtemperatur. Das Verhältnis von organischer zu wässriger Phase wurde variiert: 25:75 (■), 50:50 (□) oder 75:25 (◐)

In Abbildung 5.16 ist deutlich erkennbar, dass der  $\log P$  im Falle der KR kein gutes Kriterium für die Wahl eines organischen Lösemittels darstellt. Obwohl das  $\log P$ -Konzept davon ausgeht, dass die Toxizität von Lösemitteln mit der Konzentration in der wässrigen Phase korreliert, die mit zunehmender Hydrophobizität der organischen Phase abnimmt (Khmelnitsky *et al.*, 1991), war der relativ gut mit Wasser mischbare Ether MTBE das beste Lösemittel in Verwendung mit der KR. Folglich besitzt die Funktionalität des Lösemittels einen größeren Einfluss als die Polarität.

### 5.4.5 Stabilität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten wurden als Alternative zu den klassischen organischen Lösemitteln untersucht, wobei ebenfalls die molekulare Toxizität ohne Vermischen der Phasen betrachtet wurde.



**Abbildung 5.17:** Stabilität der KR im wässrigen System (■) im Vergleich zu den biphasischen Systemen mit dem besten organischen Lösemittel MTBE (organisches Lösemittel : wässrige Phase = 72:25, ■) bzw. fünf verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (ionische Flüssigkeit:wässrige Phase = 75:25, □). Dargestellt ist die Halbwertszeit  $\tau$  bei Raumtemperatur.

Auch das verträglichste Lösemittel MTBE wirkte sich bei einem Verhältnis von 75 % organischer zu 25 % wässriger Phase sehr negativ auf die Stabilität der KR im Vergleich zum rein wässrigen System aus, wie Abbildung 5.17 zeigt. Bei einem gleichen Phasenverhältnis war die KR in Anwesenheit von vier der fünf untersuchten ionischen Flüssigkeiten stabiler als in Gegenwart des besten organischen Lösemittels MTBE. Darüber hinaus hatten [HPYR][NTF] und [HMPL][NTF] keinen negativen Effekt auf die Enzymstabilität im Vergleich zum rein wässrigen System.

### 5.4.6 Diskussion

Tabelle 5.4 zeigt einen Vergleich zwischen der Temperaturstabilität der KR und der LB-ADH.

**Tabelle 5.4:** Temperaturstabilität der KR im Vergleich zur LB-ADH. Angegeben sind die Halbwertszeiten  $\tau$ , die jeweils bei pH 7,0 in Phosphatpuffer gemessen wurden (Filho, 2007).

Temperatur, °C	Halbwertszeit $\tau$ , h	
	KR	LB-ADH
4	> 3000	> 5000
20	39,8	167,0
25	30,9	23,0
30	26,5	7,6
40	17,3	0,4
50	7,0	-

Während die LB-ADH bei niedrigen Temperaturen längere Halbwertszeiten aufweist, ist die KR bei Temperaturen ab 25°C das wesentlich stabilere Enzym. Für die LB-ADH wurde ein Temperaturoptimum von 55°C für die Reduktion von Acetophenon angegeben (Hummel, 1997). Die Stabilitätsdaten zeigen jedoch, dass diese Bestimmung auf einer sehr kurzen Messzeit beruhen muss, da die LB-ADH oberhalb von 50°C nicht stabil ist. Die langsamere Umsetzung von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon durch die KR wurde hingegen über einen Zeitraum von 30 min betrachtet, wobei ein Temperaturoptimum von 44°C bestimmt wurde. Bei dieser Temperatur hatte die KR eine Halbwertszeit von 8,4 h.

Auch von den Alkoholdehydrogenasen aus Hefe und Pferdeleber ist bekannt, dass sie ebenso wie die LB-ADH instabil bei Temperaturen über 30°C sind (Keinan *et al.*, 1986). Eine Ausnahme bildet die Alkoholdehydrogenase aus dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobium brockii*, die stabil bis zu einer Temperatur von 85°C ist (Lamed *et al.*, 1981).

Die hohe Temperaturstabilität der KR erscheint ungewöhnlich für ein Enzym aus einem mesophilen Bakterium, das bei Temperaturen im Bereich von 25°C kultiviert wird. Die heutige Wissenschaft geht allerdings davon aus, dass alle mesophilen Bakterien von thermophilen Vorgängern abstammen. Aus diesem Grund wird Thermostabilität mehr als ein primitives als ein durch Adaption erworbenes Charakteristikum betrachtet (Völkl *et al.*, 1994; Daniel, 1996). Auch im Hinblick auf die pH-Stabilität zeigte die KR bessere Eigenschaften als die LB-ADH, die nur in einem sehr engen pH-Bereich um pH 7,0 stabil ist. Bereits bei pH 6,0 und pH 8,5

beträgt die Halbwertszeit der LB-ADH jeweils weniger als 10 % der Halbwertszeit bei pH 7,0 (Filho, 2007). Die Stabilität der KR hingegen sank im gleichen pH-Bereich nicht unter 80 % der maximalen Enzymstabilität bei pH 6,0.

Die Sensibilität gegenüber organischen Lösemitteln ist verbreitet unter Oxidoreduktasen. Die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* und die Alkoholdehydrogenase aus Hefe weisen beispielsweise eine geringe Stabilität in Anwesenheit von organischen Lösemitteln auf (Hummel, 1997; Gröger *et al.*, 2003). Die LB-ADH und die Pferdeleber-ADH sind hingegen vergleichsweise stabil in Zweiphasensystemen aus Wasser und verschiedenen organischen Lösemitteln (Filho *et al.*, 2003). Auch für diese beiden Enzyme wurde MTBE als ideales Lösemittel identifiziert. Hildebrand und Lütz (2007) konnten zeigen, dass die Halbwertszeit der LB-ADH in einem Zweiphasensystem aus 50 % MTBE und 50 % Puffer doppelt so lang ist wie in Puffer allein.

Ionische Flüssigkeiten waren für Zweiphasensysteme in Verwendung mit der KR besser geeignet als organische Lösemittel. In vier der fünf untersuchten ionischen Flüssigkeiten zeigte sich die KR stabiler als in Gegenwart des besten organischen Lösemittels MTBE. Besonders hervorzuheben haben sich dabei [HPYR][NTF] und [HMPL][NTF], die keinen negativen Effekt auf die Enzymstabilität hatten. Die ionische Flüssigkeit [(P3OH)PYR][NTF], die sich in Untersuchungen von Bräutigam (2008) als wenig geeignet für Ganzzellbiotransformationen gezeigt hatte, destabilisierte die KR am stärksten. Auch die Ergebnisse der anderen ionischen Flüssigkeiten stimmten qualitativ mit den Beobachtungen bei den Ganzzellbiotransformationen überein (Bräutigam, 2008): [HMPL][NTF] war besser geeignet als [(EO2E)MPL][NTF] und [(NEMM)EO2E][NTF], die ähnliche Ergebnisse erzielten. In der Studie von Bräutigam (2008) war [HPYR][NTF] nicht untersucht worden. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die schädigende Wirkung von ionischen Flüssigkeiten auf Ganzzellbiokatalysatoren mit der denaturierenden Wirkung auf Proteine korreliert.

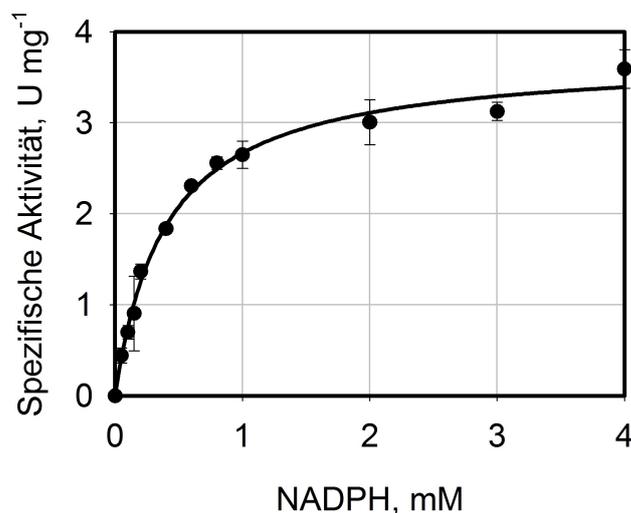
## 5.5 Substratspektrum

Bei der Untersuchung des Substratspektrums der KR wurde die Enzymaktivität unter Standardbedingungen (30 °C, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7) mit frisch gereinigten Proteinpräparationen gemessen.

Zu den untersuchten Substraten zählen Acetophenon und Acetophenonderivate, verschiedene  $\beta$ -Ketoester sowie Alkanone und Alkanonderivate. Der erzielte Enantiomerenüberschuss wurde mittels chiraler GC-Analytik bestimmt. Konnte einer der beiden Alkohole nicht detektiert werden, wurde die Detektionsgrenze der jeweiligen GC-Methode benutzt, um den Mindest-Enantiomerenüberschuss zu ermitteln.

Die angegebenen Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  und die Halbsättigungskonzentration  $K_m$  der einzelnen Substrate sind die Ergebnisse von Enzymkinetiken, bei denen NADPH im Überschuss ( $\geq 10 \cdot K_M$ ) zugegeben wurde. Zusätzlich wurden die relativen Aktivitäten der KR bezogen auf Acetophenon berechnet, da dieses Keton in der Literatur als Standard-Referenzsubstrat für Oxidoreduktasen gilt (Niefind *et al.*, 2000).

Die Halbsättigungskonzentration von NADPH wurde mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon im Überschuss bestimmt. Der  $K_m$  (NADPH) betrug  $0,40 \pm 0,03$  mM. Die zugehörige Kinetik ist in Abbildung 5.18 dargestellt. NADH wurde von der KR nicht als Cofaktor akzeptiert.



**Abbildung 5.18:** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der KR von der NADPH-Konzentration. Die Linie ist das Ergebnis einer nicht-linearen Regression nach einer Michaelis-Menten-Kinetik (Gleichung 3.6).

### 5.5.1 Acetophenon und Acetophenonderivate

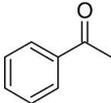
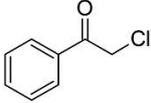
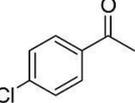
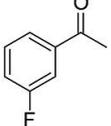
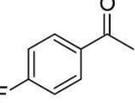
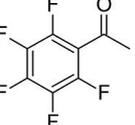
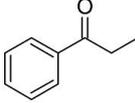
Bei der Reduktion von Acetophenon und dessen Derivaten folgte das Enzym der Prelog-Regel, wonach die Hydrid-Übertragung von der *re*-Seite her erfolgte und es zur Bildung von (*S*)-Alkoholen kam (Prelog, 1964). Im Fall des  $\alpha$ -Chloracetophenons verändert das Halogenatom die Priorität der Substituenten. Daher ist das Prelog-Produkt hierbei der (*R*)-Alkohol. Tabelle 5.5 gibt eine Übersicht über die kinetischen Parameter und die erzielten Enantiomerenüberschüsse.

Das Referenzsubstrat Acetophenon wurde mit einer spezifischen Aktivität von  $0,13 \text{ U mg}^{-1}$  nur langsam umgesetzt. Die Einführung eines einzelnen Halogenatoms am Benzolring hatte nur im Falle eines Chloratoms in *para*-Position einen leicht positiven Effekt auf die Enzymaktivität. Das *para*-Monofluor-Derivat hingegen wurde mit  $0,08 \text{ U mg}^{-1}$  am langsamsten reduziert, während das perfluorierte Acetophenon das beste Substrat für die KR war. Die hohe Anzahl an Halogenatomen am Benzolring steigerte die relative Enzymaktivität um Faktor 30. Der Austausch des Methylsubstituenten an der  $\alpha$ -Position der Ketogruppe durch den größeren Ethylrest im Propiophenon hatte nur eine moderate Aktivitätssteigerung zur Folge. Das  $\alpha$ -Chloracetophenon hingegen, das an dieser Stelle ein zusätzliches Chloratom aufweist, wurde mit  $2,45 \text{ U mg}^{-1}$  bedeutend schneller umgesetzt als das Referenzsubstrat.

Während mit den nicht halogenierten Substraten und 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon exzellente Enantiomerenüberschüsse ( $\geq 99,0 \%$ ) erzielt wurden, reduzierte die KR jedes Monohalogen-Derivat mit relativ niedriger Enantioselektivität (77,8 % - 87,6 %).

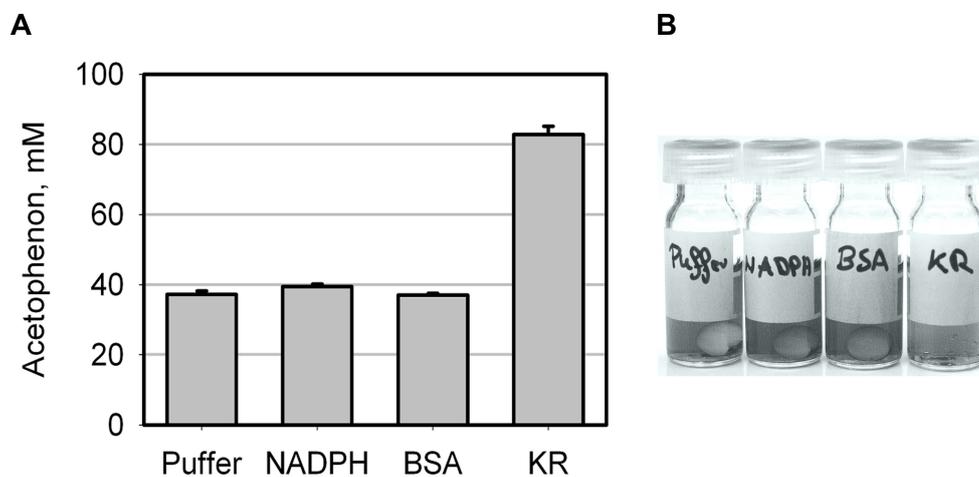
Für jedes Substrat kann durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen noch eine deutliche Aktivitätssteigerung erreicht werden. Im Falle des 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon war die spezifische Enzymaktivität unter optimalen Bedingungen (44 °C, Tricin-Puffer, pH 8,0) mit  $8,57 \pm 0,49 \text{ U mg}^{-1}$  mehr als doppelt so hoch wie die Aktivität unter Standardreaktionsbedingungen. Basierend auf der Ausbeute der heterolog in *Escherichia coli* Tuner(DE3) exprimierten und gereinigten KR entspricht dieser Wert einer Aktivität des Ganzzellbiokatalysators von 34 - 51  $\text{U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ , wenn mögliche Einflüsse des His<sub>6</sub>-MBP-Affinitätsankers unberücksichtigt bleiben.

**Tabelle 5.5:** Kinetische Parameter und Enantioselektivität der KR bei der Reduktion von Acetophenon und dessen Derivaten.

Substrat	$v_{\max}$ (U mg <sup>-1</sup> )	rel. Aktivität <sup>a</sup> (%)	$K_m$ (mM)	ee (%)
Acetophenon 	0,13 ± 0,01	100	46,9 ± 7,6	> 99,0 (S) <sup>b</sup>
$\alpha$ -Chloracetophenon 	2,45 ± 0,09	1885	2,7 ± 0,4	87,6 ± 0,5 (R)
4'-Chloracetophenon 	0,15 ± 0,00	115	14,3 ± 1,5	79,5 ± 2,5 (S)
3'-Fluoracetophenon 	0,13 ± 0,00	100	7,4 ± 1,2	79,9 ± 0,8 (S)
4'-Fluoracetophenon 	0,08 ± 0,00	62	12,3 ± 0,2	77,8 ± 1,4 (S)
2',3',4',5',6'- Pentafluoracetophenon 	3,93 ± 0,14	3023	5,7 ± 0,9	> 99,8 (S) <sup>b</sup>
Propiophenon 	0,16 ± 0,01	123	6,0 ± 1,2	> 99,4(S) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>relative Aktivität in Bezug auf die spezifische Aktivität gegenüber Acetophenon<sup>b</sup>(R)-Enantiomer nicht detektierbar

Bei einer Betrachtung der Halbsättigungskonzentrationen der Ketone fällt auf, dass manche Werte im Bereich oder sogar über der Löslichkeitsgrenze der Substrate in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7) lagen (Anhang C, Tabelle C.1). Beispielsweise ist Acetophenon bis zu 36,8 mM in 0,1 M Phosphatpuffer löslich, während die ermittelte Halbsättigungskonzentration  $46,9 \pm 7,6$  mM betrug. Da die Löslichkeiten bei Raumtemperatur und nicht bei 30 °C bestimmt wurden, könnte die Ursache in der Temperaturerhöhung liegen. Da die Raumtemperatur des Labors im Bereich von 28 °C lag, war ein alleiniger Temperatureffekt jedoch unwahrscheinlich. Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss weiterer Komponenten der enzymatischen Umsetzung auf die Ketonlöslichkeit untersucht. Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) wurde zusätzlich als Vergleichsprotein für die KR verwendet.



**Abbildung 5.19:** Einfluss verschiedener Komponenten des Aktivitätsassays auf die Löslichkeit von Acetophenon. **A)** Löslichkeit von Acetophenon in 0,1 M Phosphatpuffer bei 30 °C in Gegenwart verschiedener Zusätze. BSA: Rinderserumalbumin. **B)** Emulgierende Wirkung der KR.

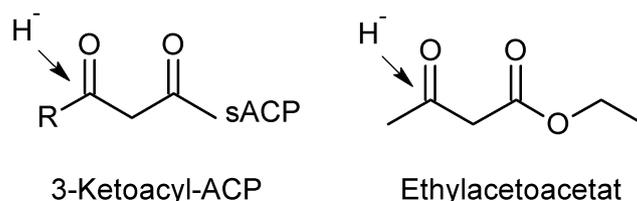
Abbildung 5.19 A zeigt, dass die Löslichkeit von Acetophenon bei 30 °C ebenfalls knapp unter 40 mM lag und sich somit kaum von der Löslichkeit bei Raumtemperatur unterschied. Der Zusatz von  $60 \text{ mg L}^{-1}$  KR erhöhte die Löslichkeit von Acetophenon um Faktor 2, während  $4 \text{ mM}$  NADPH nur einen geringen und  $60 \text{ mg L}^{-1}$  Rinderserumalbumin keinen Einfluss zeigten.

Aus Abbildung 5.19 B wird ersichtlich, dass die Zugabe der KR nicht nur eine Erhöhung der Löslichkeit zur Folge hatte, sondern auch emulgierend wirkte. Als Emulgatoren werden grenzflächenaktive Substanzen bezeichnet, die zwei oder mehr nicht miteinander mischbare Flüssigkeiten zu einem fein verteilten Gemisch vermengen und über einen gewissen Zeitraum stabilisieren können (Tahajodi *et al.*, 2008). Acetophenon, das eine höhere Dichte als Wasser besitzt, lagerte sich nach 30-minütigem Vermischen der Phasen im Thermomixer

bei  $600 \text{ min}^{-1}$  und anschließender Zentrifugation in den Ansätzen als sphärische Lösemitelphase am Boden des Probenfläschchens ab. Im Ansatz mit der KR hingegen war auch nach der Zentrifugation eine feine Verteilung des Acetophenons in der wässrigen Phase zu beobachten. Der Vergleich mit dem Rinderserumalbumin zeigte, dass die emulgierende Wirkung keine generelle Eigenschaft von Proteinen ist. Voraussetzung hierfür ist die Präsenz von hydrophoben Bereichen in Proteinen (Toren *et al.*, 2002). Während Rinderserumalbumin hydrophil ist und einen GRAVY-Index von  $-0,433$  besitzt, zeigt die KR mit dem GRAVY-Index von  $+0,457$  einen deutlich hydrophoberen Charakter.

### 5.5.2 $\beta$ -Ketoester

Das natürliche Substrat der KR, 3-Ketoacyl-ACP, gehört zur Substanzklasse der  $\beta$ -Ketoester. Abbildung 5.20 zeigt einen Vergleich zwischen 3-Ketoacyl-ACP und Ethylacetoacetat als Beispiel für einen in dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -Ketoester.

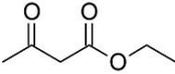
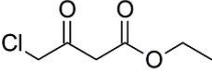
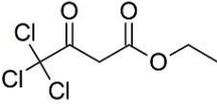
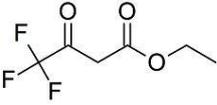
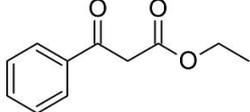


**Abbildung 5.20:** Vergleich der Strukturen von 3-Ketoacyl-ACP und Ethylacetoacetat. Der Pfeil markiert, welche Ketogruppe vom Hydrid-Ion angegriffen wird.

Die untersuchten  $\beta$ -Ketoester wurden im Durchschnitt schneller umgesetzt als das Acetophenon und dessen Derivate. Reduziert wurde jeweils nur die Ketogruppe in  $\beta$ -Stellung zur Esterbindung. Tabelle 5.4 gibt eine Übersicht über die enzymkinetischen Parameter und die erzielten Enantiomerenüberschüsse.

Die KR zeigte vor allem hohe Aktivitäten gegenüber den halogenierten Varianten des Ethylacetoacetats. Das Substrat Ethyl-4-chloracetoacetat wurde mit einer spezifischen Aktivität von  $38,29 \text{ U mg}^{-1}$  am schnellsten reduziert. Basierend auf der Ausbeute der gereinigten KR entspricht dies einer Aktivität des Ganzzellbiokatalysators von  $153 - 230 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Das Enzym tolerierte auch die Einführung mehrerer Halogensubstituenten an dieser Position, wobei die Trichlor-Verbindung besser akzeptiert wurde als das korrespondierende Trifluor-Molekül. Auch das sterisch anspruchsvolle Substrat Ethylbenzoylacetat wurde von der KR umgesetzt. Alle untersuchten  $\beta$ -Ketoester wurden von der KR mit guten bis exzellenten Enantiomerenüberschüssen über  $94,0 \%$  reduziert.

**Tabelle 5.6:** Kinetische Parameter und Enantioselektivität der KR bei der Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern.

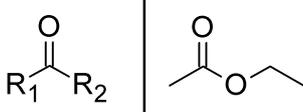
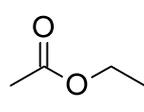
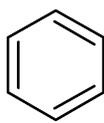
Substrat	$v_{\max}$ (U mg <sup>-1</sup> )	rel. Aktivität <sup>a</sup> (%)	$K_m$ (mM)	ee (%)
Ethylacetoacetat 	0,25 ± 0,06	192	11,9 ± 4,7	> 99,7 ( <i>R</i> ) <sup>c</sup>
Ethyl-4-chloracetoacetat 	38,29 ± 2,15	29454	8,3 ± 1,2	99,8 ± 0,4 ( <i>S</i> )
Ethyl-4,4,4-trichlor- acetoacetat 	19,25 ± 1,57	14808	50,6 ± 10,4	94,0 ± 0,8 ( <i>S</i> )
Ethyl-4,4,4-trifluor- acetoacetat 	1,44 ± 0,26	1108	262,8 ± 82,4	99,3 ± 0,2 ( <i>S</i> )
Ethylbenzoylacetat 	1,16 ± 0,04	892	1,9 ± 0,2	> 99,7 ( <i>S</i> ) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>relative Aktivität in Bezug auf die spezifische Aktivität gegenüber Acetophenon<sup>b</sup>(*R*)-Enantiomer nicht detektierbar; <sup>c</sup>(*S*)-Enantiomer nicht detektierbar

Bei der Betrachtung der gebildeten Produkte wird deutlich, dass sich die Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern durch die KR nicht anhand der Prelog-Regel beschreiben lässt. Würde die Prelog-Regel zur Anwendung kommen, hätten die Produkte, die bei der Reduktion des Ethylacetoacetats und dessen Halogenderivaten gebildet wurden, jeweils im anderen Enantiomer vorliegen müssen, da die Ethoxycarbonylgruppe ein größerer Rest ist als die einzelne Methylgruppe mit oder ohne Halogensubstituenten. Es lag jedoch auch nicht immer das Anti-Prelog-Produkt vor, da vom Ethylbenzoylacetat das (*S*)-Enantiomer gebildet wurde.

Es scheint vielmehr, dass die  $\beta$ -Ketoester im aktiven Zentrum des Enzyms wie das natürliche Substrat anhand der Esterbindung koordiniert wurden. Die natürliche Funktion der KR liegt

im Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese. Hierbei kommt die Esterbindung der an ACP veresterten Fettsäure stets im aktiven Zentrum des Enzyms zu liegen, während die wachsende Fettsäurekette nach außen ragt (Wright, 2004). Daher überlagerte die Präsenz einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, die vom Enzym erkannt wurde, den rein sterischen Effekt, der von der Prelog-Regel betrachtet wird. Bei dem Substrat Ethylbenzoylacetat ist der Benzolring sterisch anspruchsvoller als die Ethoxycarbonylgruppe, weswegen hier die Koordination anhand der Esterbindung und die Prelog-Regel zusammentreffen. Abbildung 5.21 verdeutlicht diesen Zusammenhang.

R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>
CH <sub>3</sub>		
CH <sub>2</sub> Cl		
CCl <sub>3</sub>		
CF <sub>3</sub>		
		

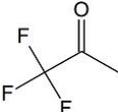
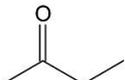
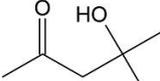
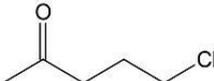
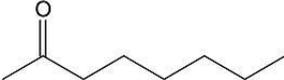
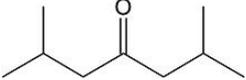
**Abbildung 5.21:** Substituenten an der zu reduzierenden Ketogruppe der verschiedenen  $\beta$ -Ketoester.

### 5.5.3 Alkanone und Alkanonderivate

Tabelle 5.7 gibt eine Übersicht über die enzymkinetischen Parameter und die erzielten Enantiomerenüberschüsse bei der Reduktion von Alkanonen und Alkanonderivaten.

Bei der Umsetzung der dargebotenen Alkanone nahm die Enzymaktivität der KR mit einem steigenden sterischen Anspruch der Substrate zu. Während bei den kurzkettigen Alkanonen Aceton und 2-Butanon gar kein Umsatz messbar war, wurden 2-Heptanon und 2-Oktanon langsam zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Aufgrund der niedrigen Enzymaktivitäten von  $0,02 \text{ U mg}^{-1}$  gelang die Bestimmung der Halbsättigungskonzentrationen für diese beiden Substrate nicht. Das sterisch anspruchsvolle Diisobutylketon, das aufgrund der Molekülsymmetrie zu einem achiralen Alkohol reduziert wurde, war das beste Substrat in der Gruppe der unhalogenierten Alkanone. Obwohl es nur ein C-Atom mehr besitzt als das 2-Oktanon, wurde es 43 mal schneller umgesetzt. In Analogie zu den  $\beta$ -Ketoestern erhöhte die Einführung von Halogensubstituenten die Aktivität der KR deutlich. Das  $\beta$ -Hydroxyketon 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon wurde von der KR nicht als Substrat akzeptiert.

**Tabelle 5.7:** Kinetische Parameter und Enantioselektivität der KR bei der Reduktion von Alkanonen und Alkanonderivaten.

Substrat	$v_{\max}$ (U mg <sup>-1</sup> )	rel. Aktivität <sup>a</sup> (%)	$K_m$ (mM)	ee (%)
Aceton 	0,00	0	-	achiral
1,1,1-Trifluoracetone 	1,03 ± 0,10	792	89,2 ± 17,8	47,7 ± 1,7 (S)
2-Butanone 	0,00	0	-	-
4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanone 	0,00	0	-	-
5-Chlor-2-Pentanone 	0,27 ± 0,04	208	5,6 ± 1,7	97,1 ± 0,8 (S)
2-Heptanone 	0,02 ± 0,00	15	n.b. <sup>b</sup>	(≥ 33,0 (S)) <sup>c</sup>
2-Octanone 	0,02 ± 0,00	15	n.b. <sup>b</sup>	28,1 ± 5,9 (S)
Diisobutylketone 	0,86 ± 0,08	662	27,5 ± 4,3	achiral

<sup>a</sup>relative Aktivität in Bezug auf die spezifische Aktivität gegenüber Acetophenon<sup>b</sup>n.b. = nicht bestimmt<sup>c</sup>aufgrund niedriger Umsätze nicht genauer bestimmbar

Bei der Reduktion der Alkanone folgte die KR wiederum der Prelog-Regel, weshalb es zur Bildung von (*S*)-Alkoholen kam. Der Überschuss des (*S*)-Alkohols bei der Reduktion von 1,1,1-Trifluoraceton und 5-Chlor-2-Pentanon bestätigt, dass die Änderung der Enantioselektivität der KR bei der Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern nicht an einem sterischen Effekt lag. Sowohl der Trifluormethyl- als auch der Chlorpropylsubstituent ist kleiner als die Ethoxycarbonylgruppe des Ethylacetoacetats. Wäre die Größe der Substituenten ausschlaggebend für die Stereochemie des gebildeten Produkts, wie es bei der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* der Fall ist (Keinan *et al.*, 1986), hätten 1,1,1-Trifluoraceton und 5-Chlor-2-Pentanon zum Anti-Prelog-Produkt und somit zum (*R*)-Alkohol reduziert werden müssen.

#### 5.5.4 Diskussion

Die Analyse des Substratspektrums ergab, dass die KR eine Vielzahl von prochiralen Verbindungen reduzieren kann. Vor allem halogenierte und sterisch anspruchsvolle Ketone wurden gut akzeptiert, wobei Enzymaktivitäten bis zu 38,29 U mg<sup>-1</sup> (153 - 230 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>) erreicht wurden. Damit lag die KR im Aktivitätsbereich der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* mit 30 - 90 U mg<sup>-1</sup> (Hummel, 1997).

Die Ergebnisse, die bei der Reduktion von halogenierten Acetophenonderivaten erhalten wurden, sind konsistent mit den Daten, die für Ganzzellbiotransformationen mit Zellen von *Synechococcus* PCC 7942 publiziert worden sind (Nakamura *et al.*, 2000; Nakamura und Yamanaka, 2002a): Die Aktivität gegenüber dem perfluorierten Acetophenon war wesentlich höher als die gegenüber den *para*- und *meta*-substituierten Monofluor-Derivaten. Darüber hinaus wurde das an der *para*-Position chlorierte Molekül schneller umgesetzt als das fluorierte Pendant. Die Einführung eines Halogenatoms an der  $\alpha$ -Position erhöhte die Aktivität, reduzierte jedoch die Enantioselektivität.

Die Stereochemie der katalysierten Reaktionen ließ sich zwar bei Ketonen anhand der Prelog-Regel vorhersagen, nicht jedoch im Falle von  $\beta$ -Ketoestern. Die bestimmten Enantioselektivitäten stehen in Übereinstimmung mit der Literatur:

Sun *et al.* (2008) zeigten, dass das homologe Enzym aus *Escherichia coli* Ethylacetoacetat mit einer Wechselzahl  $k_{\text{kät}} = 0,075 \text{ s}^{-1}$  und einer Halbsättigungskonzentration  $K_m = 127 \text{ mM}$  zum (*R*)-Alkohol umsetzt. Die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 setzte Ethylacetoacetat mit einer Wechselzahl  $k_{\text{kät}} = 0,11 \text{ s}^{-1}$  ebenfalls zum (*R*)-Alkohol um. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der deutlich geringeren Halbsättigungskonzentration  $K_m = 11,9 \text{ mM}$  war die cyanobakterielle KR der effizientere Katalysator bei dieser Reaktion.

Die KR reduzierte Ethyl-4-chloracetoacetat ebenso wie die homologen Enzyme aus *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* zum (*S*)-Alkohol (Yamamoto *et al.*, 2003). Hierbei waren die

erzielten Enantiomerenüberschüsse, die bei 98,0 bzw. 93,1 % (*S*) lagen, geringer als der Enantiomerenüberschuss der KR, der einen Wert von 99,8 % (*S*) hatte.

In Tabelle 5.8 wird das Substratspektrum der KR mit dem der LB-ADH verglichen, insofern Aktivitätsdaten für beide Enzyme vorlagen. Die Aktivität der LB-ADH gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon wurde zusätzlich bestimmt.

**Tabelle 5.8:** Auszugsweiser Vergleich der Substratspektren der KR und der LB-ADH (Hummel und Riebel, 2000).

Substrat	rel. Aktivität <sup>a</sup> , %	
	KR	LB-ADH
Acetophenon	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>
Propiophenon	123	17
2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon	3023	0,11
4'-Chloracetophenon	115	203
Ethylacetoacetat	192	109
Ethyl-4-chloracetoacetat	29454	93
Ethyl-444-trifluoracetoacetat	1108	15
Ethylbenzoylacetat	892	35
4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon	0	0

<sup>a</sup>relative Aktivität in Bezug auf die spezifische Aktivität gegenüber Acetophenon

<sup>b</sup>entspricht 0,13 U mg<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>entspricht 490 U mg<sup>-1</sup> (Hummel, 1997)

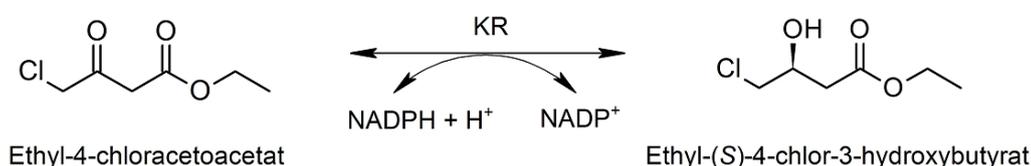
Nimmt man die Aktivität beider Enzyme gegenüber Acetophenon als Referenz, so verhielten sich die LB-ADH und die KR sehr unterschiedlich. Im Vergleich zu Acetophenon wurden aromatische Verbindungen mit größeren Seitenketten wie Propiophenon und Ethylbenzoylacetat langsamer durch die LB-ADH umgesetzt. Im Gegensatz dazu zeigte die KR eine gesteigerte Aktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen Substraten. Die KR reduzierte die untersuchten  $\beta$ -Ketoester mit deutlich höherer Geschwindigkeit als Acetophenon, während die LB-ADH gleiche oder geringere Aktivitäten aufwies. Vergleicht man die Enzymaktivitäten beider Oxidoreduktasen gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon, so setzte die KR dieses Substrat unter Standardbedingungen siebenmal schneller um als die LB-ADH ( $3,93 \pm 0,14$  U mg<sup>-1</sup> versus  $0,56 \pm 0,08$  U mg<sup>-1</sup>), wobei ein signifikant höherer Enantiomerenüberschuss erreicht wurde ( $> 99,8$  (*S*) versus 43,3 % (*S*)). 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon wurde von beiden Enzymen nicht umgesetzt.

Diese Daten zeigen, dass die KR für die Reduktion von Carbonylverbindungen geeignet ist, die von gebräuchlichen Oxidoreduktasen wie der LB-ADH nur schlecht akzeptiert werden. Somit könnte die KR dazu beitragen, die Lücken in der Landschaft der biokatalytischen Herstellung chiraler Alkohole zu füllen, die es bislang aufgrund des Fehlens geeigneter Biokatalysatoren gibt.

Die Fähigkeit mancher Proteine als hochmolekulare Bioemulgatoren und Löslichkeitsvermittler zu agieren, zog bislang vor allem das Interesse der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie auf sich (Toren *et al.*, 2002). Milchproteine werden beispielsweise im Rahmen der Lebensmittelproduktion als Emulgatoren eingesetzt (Tahajodi *et al.*, 2008), aber auch bei anderen Proteinen wurden emulgierende und löslichkeitsvermittelnde Eigenschaften nachgewiesen. Der löslichkeitsvermittelnde Effekt von  $60 \text{ mg L}^{-1}$  KR, durch den sich die Acetophenonkonzentration in der wässrigen Phase verdoppelte, war vergleichsweise gering. Das Protein AlnA aus *Acinetobacter radioresistens* erhöhte bei einem Einsatz von  $40 \text{ mg L}^{-1}$  die Löslichkeit des polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffs Phenanthren um den Faktor 28,5 (Toren *et al.*, 2002).

## 5.6 Enzymmechanismus

Bei der Untersuchung des Enzymmechanismus der KR wurde die Umsetzung von Ethyl-4-chloracetoacetat zu Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat betrachtet, da sowohl Edukt als auch Produkt sehr hohe Löslichkeiten von 205 bzw. 759 mM im wässrigen System aufwiesen. Darüber hinaus wurde das kommerziell erhältliche Ethylacetoacetat von Sun *et al.* (2008) als Ersatz für 3-Ketoacyl-ACP, das schwer zugängliche natürliche Substrat der KR, vorgeschlagen, um damit enzymkinetische Messungen durchzuführen. Das Halogenderivat Ethyl-4-chloracetoacetat wurde in dieser Arbeit verwendet, da es von der KR aus *Synechococcus PCC 7942* schneller umgesetzt wurde. Die Reaktion ist in Abbildung 5.22 dargestellt.

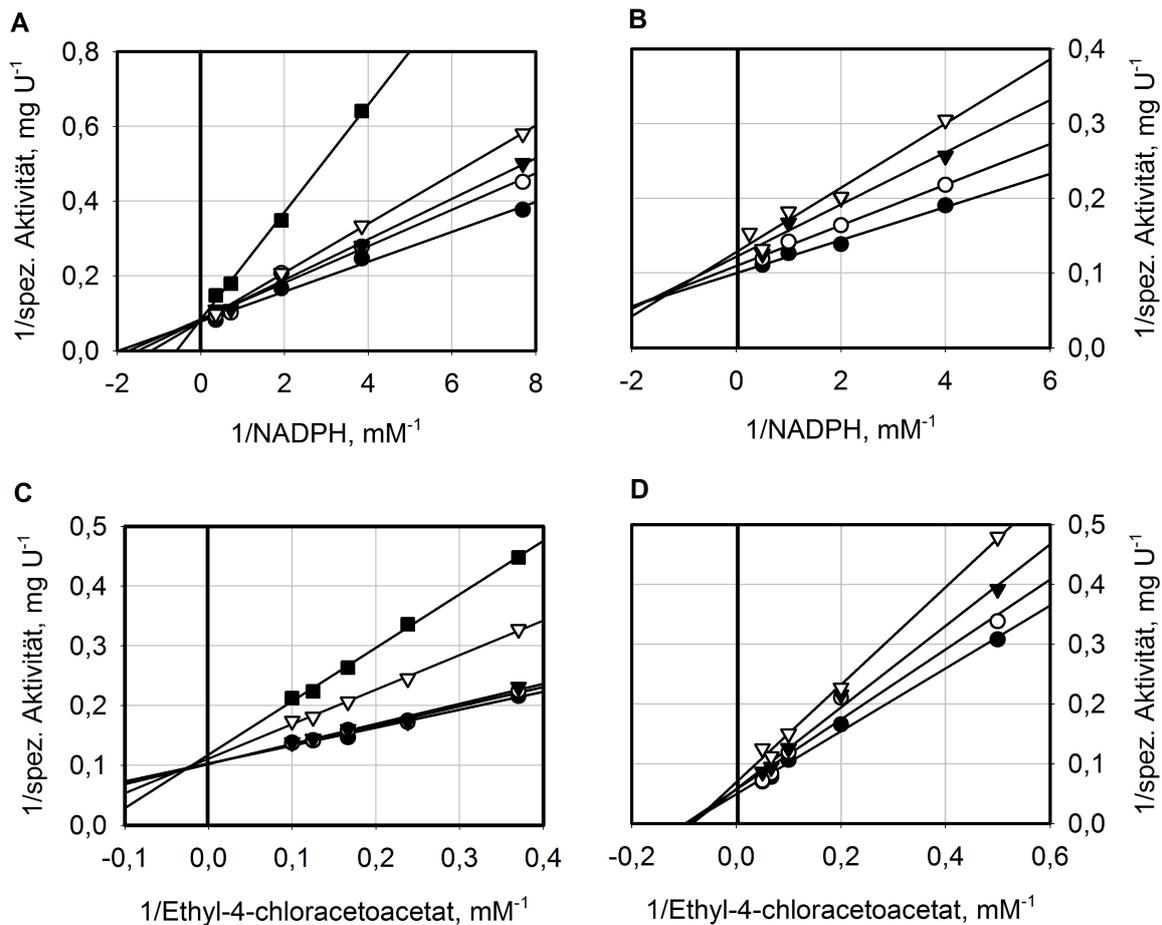


**Abbildung 5.22:** Betrachtetes Reaktionssystem bei der Aufklärung des Enzymmechanismus der KR.

Alle Inhibitionskonstanten und kinetischen Parameter, die nachfolgend angegeben sind, wurden jeweils gleichzeitig anhand eines Datensatzes bestimmt.

### 5.6.1 Produktinhibitionsstudie

Eine Produktinhibitionsstudie im nicht-gesättigten Bereich sollte Aufschluss über den vorliegenden Zweisubstratmechanismus geben. Die KR-Aktivität wurde in Anwesenheit der Produkte NADP<sup>+</sup> und Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat gemessen. Die Konzentration von Ethyl-4-chloracetoacetat oder NADPH wurde variiert, während das jeweils andere Substrat im Bereich der Halbsättigungskonzentration konstant gehalten wurde.



**Abbildung 5.23:** Ergebnisse der Produktinhibitionsstudie. Die Geraden basieren auf linearen Regressionsanalysen. **A)** NADPH variiert in Anwesenheit von NADP<sup>+</sup> (● 0 mM, ○ 2 mM, ▼ 4 mM, ▽ 8 mM, ■ 16 mM). Ethyl-4-chloracetoacetat war konstant bei 3,6 mM. **B)** NADPH variiert in Anwesenheit von Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat (● 0 mM, ○ 12,5 mM, ▼ 25 mM, ▽ 50 mM). Ethyl-4-chloracetoacetat war konstant bei 4 mM. **C)** Ethyl-4-chloracetoacetat variiert in Anwesenheit von NADP<sup>+</sup> (● 0 mM, ○ 2 mM, ▼ 4 mM, ▽ 8 mM, ■ 16 mM). NADPH war konstant bei 0,5 mM. **D)** Ethyl-4-chloracetoacetat variiert in Anwesenheit von Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat (● 0 mM, ○ 12,5 mM, ▼ 25 mM, ▽ 50 mM). NADPH war konstant bei 0,4 mM.

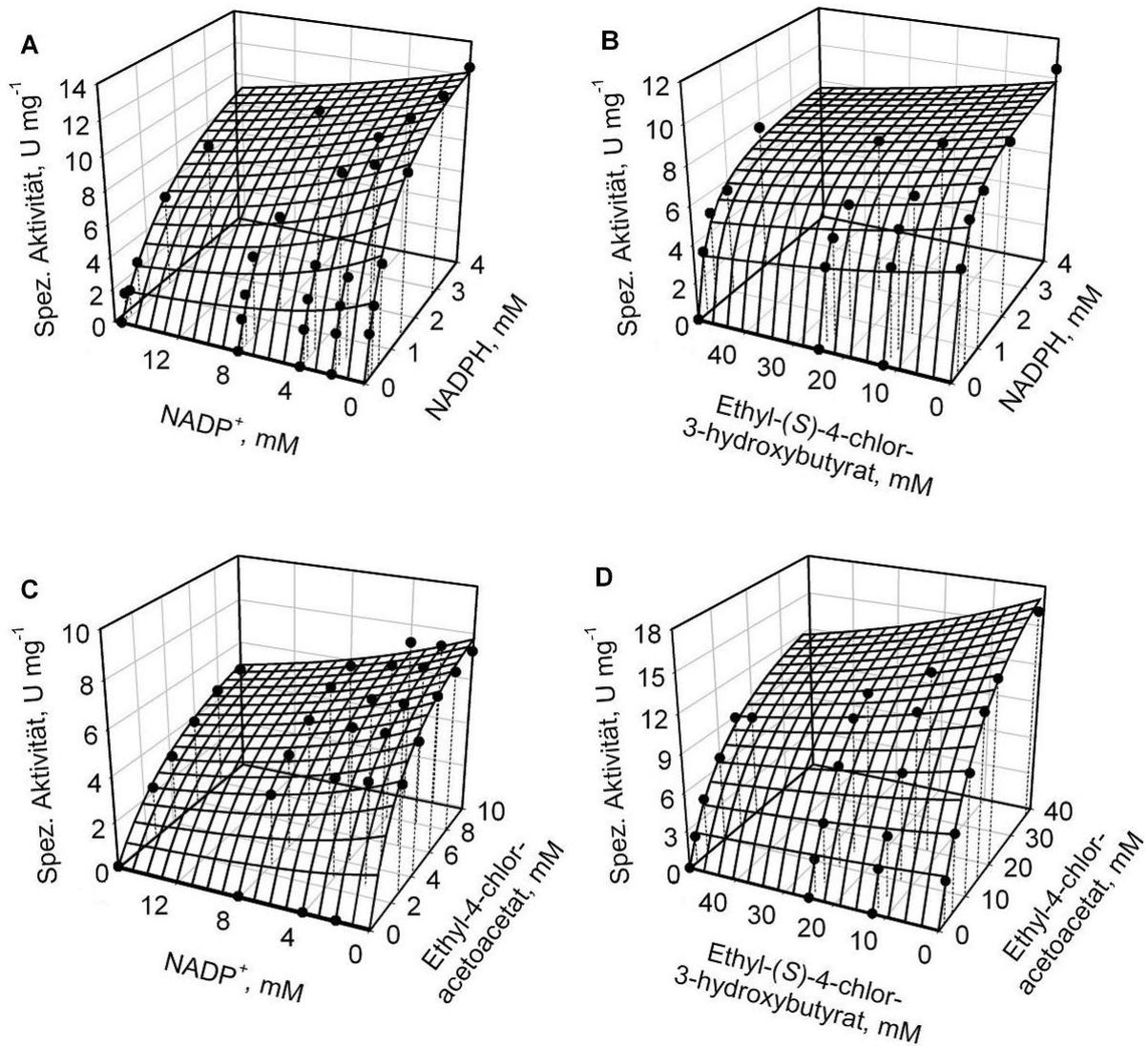
Abbildung 5.23 A zeigt, dass NADP<sup>+</sup> ein kompetitiver Inhibitor für NADPH war, da sich die Geraden auf der Y-Achse schnitten. Alle anderen Paarungen wiesen einen Geradenschnittpunkt im zweiten Quadranten des kartesischen Koordinatensystems auf (Abbildung 5.23 B-D), was für ein gemischtes (nicht-kompetitives) Inhibitionsverhalten stand. Dieses Inhibitionsmuster ist charakteristisch für einen geordneten Bi-Bi-Mechanismus mit NADPH als erstem bindenden Substrat (Bisswanger, 2000).

Die Daten der Produktinhibitionsstudie wurden zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten nach Gleichungen 3.8 und 3.11 für die kompetitive bzw. gemischte Hemmung verwendet. Die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionen zur Parameteranpassung sind in Abbildung 5.24 dargestellt. Tabelle 5.9 gibt eine Übersicht über die Inhibitionskonstanten.

**Tabelle 5.9:** Ermittelte Inhibitionskonstanten der Produkthemmung.

Variables Substrat	Produkt	Hemmtyp	K <sub>ik</sub> , mM	K <sub>iu</sub> , mM
NADPH	NADP <sup>+</sup>	kompetitiv	6,00 ± 1,18	-
NADPH	Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat	gemischt	46,57 ± 19,89	210,36 ± 98,09
Ethyl-4-chloracetoacetat	NADP <sup>+</sup>	gemischt	8,30 ± 2,96	68,32 ± 59,17
Ethyl-4-chloracetoacetat	Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat	gemischt	94,05 ± 53,91	114,54 ± 70,57

Während die Bestimmung der Inhibitionskonstante der kompetitiven Hemmung K<sub>ik</sub> sehr gut gelang, war die Auswertung der gemischten Inhibitionen, bei denen auch der unkompetitive Anteil K<sub>iu</sub> betrachtet wurde, aufgrund des zusätzlichen Parameters bei der gleichen Datenmenge weniger genau. Bei den gemischten Hemmtypen war der Wert von K<sub>ik</sub> stets kleiner als der von K<sub>iu</sub>, was mit dem Geradenschnittpunkt im 2. Quadranten übereinstimmt.



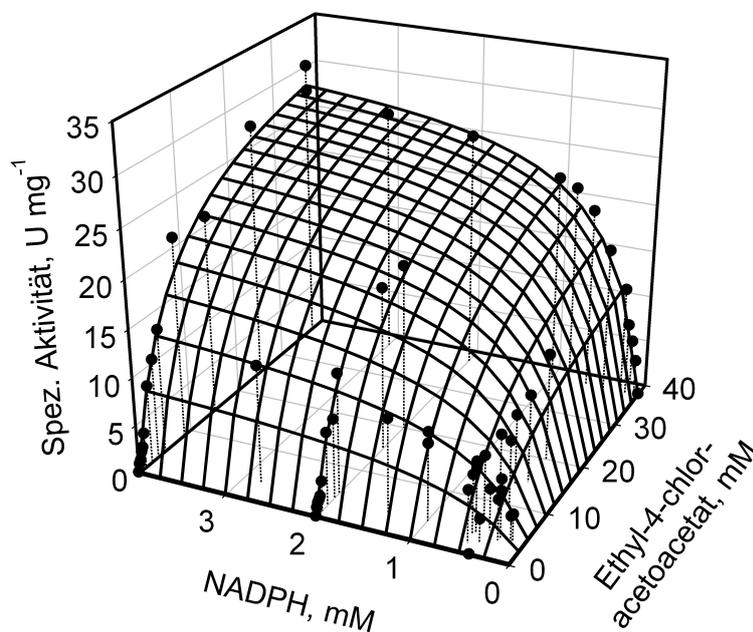
**Abbildung 5.24:** Bestimmung der Inhibitionskonstanten der Produkthemmung. Dargestellt ist die Abhängigkeit der spezifischen (spez.) Aktivität der KR von der Konzentration eines Substrats in Gegenwart verschiedener Produktkonzentrationen. Die Flächen sind das Ergebnis nicht-linearer Regressionsanalysen nach Gleichungen 3.8 (**A**) und 3.11 (**B - D**) **A**) Inhibitor NADP<sup>+</sup> mit NADPH als variablem Substrat. **B**) Inhibitor Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat mit NADPH als variablem Substrat. **C**) Inhibitor NADP<sup>+</sup> mit Ethyl-4-chloracetoacetat als variablem Substrat. **D**) Inhibitor Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat mit Ethyl-4-chloracetoacetat als variablem Substrat.

### 5.6.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter

Da die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter für den geordneten Bi-Bi-Mechanismus auf der Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten basierte, konnten die Gleichungen 3.14 und 3.15 zur Beschreibung der Hin- bzw. Rückreaktion verwendet werden.

Die Maximalgeschwindigkeit der Rückreaktion betrug mit  $0,15 \text{ U mg}^{-1}$  nur 0,4 % der Maximalgeschwindigkeit der Hinreaktion. Daher war beispielsweise bei Konzentrationen von 1 mM NADP<sup>+</sup> und 10 mM Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat eine Inkubationszeit von 200 min erforderlich, um mittels Gaschromatographie messbare Signale zu erhalten. Dies war insofern problematisch, da weder NADPH noch Ethyl-4-chloracetoacetat stabil bei pH 7,0 in wässriger Lösung sind (Wu *et al.*, 1986; Shimizu *et al.*, 1990). Aufgrund der daraus resultierenden hohen Messgenauigkeit wurde die Rückreaktion nicht betrachtet.

Insgesamt wurden 59 Reaktionsgeschwindigkeiten, die bei verschiedenen Substrat- und Cofaktorkonzentrationen ohne Anwesenheit von Inhibitoren bestimmt worden waren, für die Parameterbestimmung der Hinreaktion (Gleichung 3.14) verwendet. NADPH wurde in Konzentrationen bis 4 mM ( $12,5 \cdot K_{mA}$ ), Ethyl-4-chloracetoacetat bis 37,5 mM ( $5,4 \cdot K_{mB}$ ) eingesetzt. Das Ergebnis der nicht-linearen Regression ist in Abbildung 5.25 dargestellt. Die erhaltenen kinetischen Parameter sind in Tabelle 5.10 zusammengefasst.



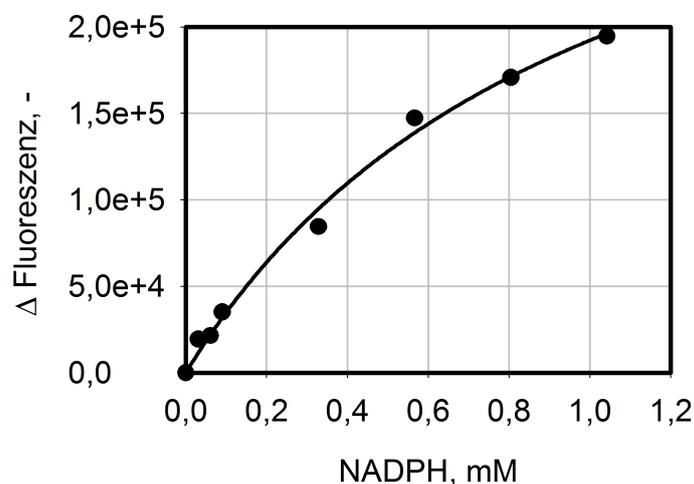
**Abbildung 5.25:** Abhängigkeit der spezifischen (spez.) Aktivität der KR von den Konzentrationen an Ethyl-4-chloracetoacetat und NADPH. Die Fläche ist das Ergebnis einer nicht-linearen Regressionsanalyse nach Gleichung 3.14.

**Tabelle 5.10:** Ermittelte kinetische Parameter des geordneten Bi-Bi-Mechanismus der KR.

Parameter	
$v_{\max}$	$36,79 \pm 2,11$ mM
$K_{mA}$ (NADPH)	$0,33 \pm 0,09$ mM
$K_{mB}$ (Ethyl-4-chloracetoacetat)	$6,94 \pm 1,34$ mM
$K_{iA}$ (NADPH)	$1,04 \pm 0,35$ mM

### 5.6.3 NADPH-Dissoziationskonstante

Der Parameter  $K_{iA}$  des geordneten Bi-Bi-Mechanismus entspricht der Dissoziationskonstante  $K_d$  von NADPH. Zur Überprüfung des Modells wurde diese Konstante zusätzlich in einem Fluoreszenzverstärkungsexperiment bestimmt. Hierbei wurde der Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) von Tryptophan auf gebundenes NADPH gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.26 dargestellt.



**Abbildung 5.26:** Bestimmung der Dissoziationskonstante von NADPH durch Fluoreszenzverstärkung. Die Line ist das Ergebnis einer nicht-linearen Regression nach Gleichung 4.13.

Die aus der nicht-linearen Regression abgeleitete Dissoziationskonstante von NADPH hatte einen Wert von  $K_d = 1,01 \pm 0,23$  mM. Diese Konstante stimmte sehr gut mit dem durch das enzymkinetische Modell vorhergesagten Wert für  $K_{iA} = 1,04 \pm 0,35$  mM überein.

#### 5.6.4 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 einem geordneten Bi-Bi-Mechanismus mit NADPH als zuerst bindendem Substrat folgt. Alle enzymkinetischen Parameter waren mit einem maximalen relativen Fehler von 34 % gut bestimmbar. Dieser Zweisubstratmechanismus wurde auch für das homologe Enzym aus *Plasmodium falciparum* beschrieben (Wickramasinghe *et al.*, 2006) und ist der am häufigsten vorliegende Mechanismus von NAD(P)H-bindenden Oxidoreduktasen (Murray *et al.*, 2006).

Bei einer Betrachtung der bestimmten Konstanten der Produktinhibition wird deutlich, dass sowohl NADP<sup>+</sup> als auch Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat nur eine schwache Hemmwirkung hatten. Die Inhibitionskonstanten lagen eine Zehnerpotenz über den Halbsättigungskonzentrationen der korrespondierenden Edukte. Der relative Fehler der Inhibitionskonstanten betrug bis zu 87 %. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigt jedoch, dass die Genauigkeit in der gleichen Größenordnung liegt wie die von Parametern, die aus vergleichbaren Datensätzen für andere Enzyme ermittelt wurden (z.B. Velasco-García *et al.* (2000)).

Die enzymkinetischen Daten können ferner dazu genutzt werden, optimale Reaktionsbedingungen für den Einsatz der KR im technischen Maßstab zu identifizieren. Das Ziel hierbei ist das Erreichen hoher Produktkonzentrationen mit hohem Enantiomerenüberschuss in einer kurzen Reaktionszeit. Eine Betrachtung des kinetischen Modells zeigt, dass bei einer Verwendung des isolierten Enzyms für asymmetrische Synthesen eine NADPH-Konzentration über 1 mM aufrecht erhalten werden sollte, um eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu gewährleisten. Dies sollte durch eine Cofaktorregenerierungsmethode realisiert werden, die zum einen kompatibel mit der Synthesereaktion ist und zum anderen ein günstiges thermodynamisches Gleichgewicht besitzt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zum Produkt zu ermöglichen. Ideal wäre beispielsweise der Einsatz einer NADPH-akzeptierenden Mutante einer Formiatdehydrogenase. Obwohl die Produktinhibition der KR vergleichsweise schwach ausgeprägt ist, wäre der Einsatz einer zweiten Phase als *in situ*-Extraktionsmittel denkbar, um die Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit, die bei einer Konzentration an Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat von 50 mM im Bereich von 30 % liegt, zu verhindern. Die zweite Phase würde zudem das instabile Edukt Ethyl-4-chloracetoacetat vor der Degradierung durch das wässrige Milieu schützen (Shimizu *et al.*, 1990).

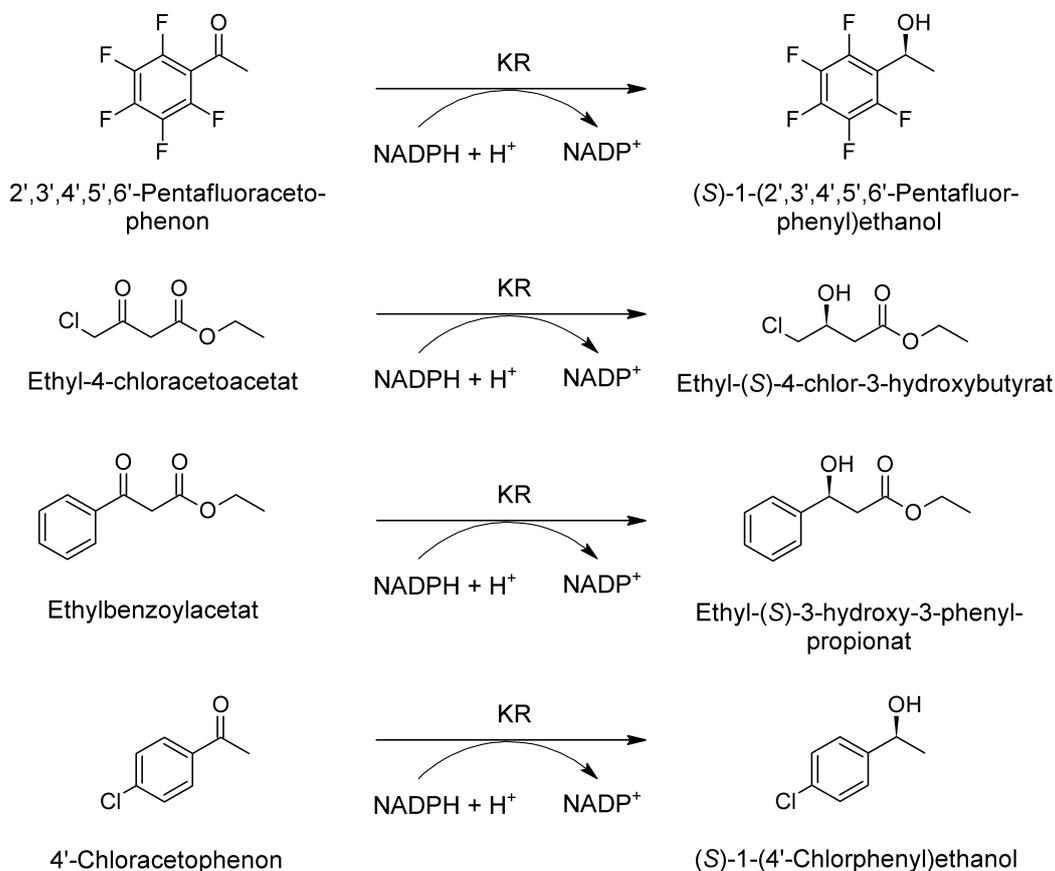
## 6 Eignung der 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen aus anderen Cyanobakterien für asymmetrische Synthesen

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Untersuchung der Eignung von 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen aus anderen Cyanobakterienstämmen als *Synechococcus* PCC 7942 für asymmetrische Synthesen chiraler Alkohole.

Die Auswahl der Cyanobakterien richtete sich nach verschiedenen Gesichtspunkten. Zunächst sollte das Genom des Cyanobakteriums sequenziert sein, um mit einfachen Methoden an die genetische Information für die zugehörige KR zu gelangen. Da es mehr als 50 sequenzierte Cyanobakterienstämmen gibt, deren KR eine Sequenzähnlichkeit von über 70 % zu der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 aufweist (BLAST-Search, Stand Juli 2009), konnten toxinbildende Stämme aufgrund der schwierigen Handhabung in dieser Arbeit ausgeklammert werden. Ein weiteres Auswahlkriterium war eine möglichst hohe biologische Diversität unter den Stämmen. Es ist gelungen, Cyanobakterien aus fünf der sieben taxonomischen Ordnungen (*Chroococcales*, *Gloeobacterales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales* und *Prochlorales*) und zusätzlich den unklassifizierten Stamm *Acaryochloris marina* in dieser Studie zu vereinen. Von Vertretern der fehlenden Ordnungen *Pleurocapsales* und *Stigonematales* gab es noch keine abgeschlossenen Genomprojekte. Während die Genome von *Chroococciopsis thermalis* PCC 7203 und *Dermocarpa* sp. 0006, die zu den *Pleurocapsales* gehören, in Bearbeitung sind, wurde noch bei keinem Vertreter der *Stigonematales* mit der Sequenzierung des Genoms begonnen (NCBI Genomprojekt Datenbank, Stand Juli 2009). Unter den ausgewählten Cyanobakterien befanden sich ferner Stämme aus limnischen, terrestrischen, euryhalinen und marinen Habitaten. Alle Cyanobakterien waren mesophil bis auf den thermophilen Organismus *Thermosynechococcus* BP-1.

Bei der Suche nach KR-Varianten, die für asymmetrische Synthesen geeignet sind, waren vor allem Enzyme mit höherer spezifischer Aktivität bei gleicher oder höherer Enantioselektivität im Vergleich zum Ausgangsenzym aus *Synechococcus* PCC 7942 interessant. Da industriell relevante Oxidoreduktasen darüber hinaus ein breites Substratspektrum akzeptieren sollten, um möglichst vielseitig einsetzbar zu sein, wurden die KRs hinsichtlich der Reduktion von

vier Modellsubstraten untersucht, die von ökonomischem Interesse sind (Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung der Reduktion der Ketone, die als Modellsubstrate für die Charakterisierung cyanobakterieller KRs ausgewählt wurden.

Die verwendeten Modellsubstrate entstammten dem zu diesem Zeitpunkt bekannten Substratspektrum der KR und wurden aus verschiedenen Gründen ausgesucht: 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon wurde als Beispiel für die enzymatisch schwer umzusetzenden perfluorierten Ketone gewählt. Die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 hob sich durch den schnellen und enantioselektiven Umsatz dieses Ketons positiv von anderen Enzymen wie der LB-ADH ab. Daher wurden weitere cyanobakterielle KRs auch maßgeblich anhand dieser Umsetzung bewertet. Ethyl-4-chloracetoacetat ähnelt den natürlichen Substraten der KR, weswegen zu erwarten war, dass dieses Substrat von allen untersuchten Enzymen akzeptiert wird. Damit konnte das Substrat gleichzeitig als experimentelle Positivkontrolle für ein funktionell exprimiertes und gereinigtes Protein dienen. Der korrespondierende (S)-Alkohol Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat findet als Intermediat bei der Synthese des Cholesterin senkenden Medikaments Atorvastatin Anwendung (Pereira, 1998). Ethylbenzoylacetat repräsentiert das sterisch anspruchsvollste Substrat der KR, das bekannt war. Das Produkt Ethyl-(S)-3-

hydroxy-3-phenylpropionat wird bei der Synthese des Antidepressivums Fluoxetin eingesetzt (Chênevert *et al.*, 1992). Ferner wurde 4'-Chloracetophenon als Vertreter der monohalogenierten Acetophenone ausgewählt, die im Vergleich zum perfluorierten Acetophenonderivat von der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 langsamer und mit einem niedrigen Enantiomerenüberschuss im Bereich von 80 % umgesetzt worden waren. Die Halogenderivate des 1-Phenylethanol stellen interessante Synthesebausteine dar, da die Alkoholgruppe leicht in andere funktionelle Gruppen umgewandelt werden kann (Kurbanoglu *et al.*, 2007).

Bei der Suche nach KR-Varianten mit hoher Enzymaktivität und Enantioselektivität waren zwei Vorgehensweisen denkbar. Ein möglicher Weg führte über die direkte Isolierung der genetischen Information für die KR aus den Cyanobakterien, um die Gene heterolog in *Escherichia coli* zu exprimieren und die gereinigten Enzyme miteinander zu vergleichen. Die Alternative war die phänotypische Durchmusterung der Cyanobakterien nach hohen Umsetzungsgeschwindigkeiten und Enantiomerenüberschüssen auf der Grundlage von Ganzzellbiotransformationen, die mit den Cyanobakterienzellen selbst durchgeführt werden. Um von diesen Werten auf die zugrunde liegenden Enzymaktivitäten schließen zu können, musste jedoch eine Grundannahme der Durchmusterung von Stammsammlungen zutreffen: die Präsenz eines vergleichbaren Expressionslevels des Zielproteins in den betrachteten Organismen.

Ein bedeutender Vorteil der zweiten Vorgehensweise im Vergleich zur Klonierung, Expression und Reinigung jedes einzelnen Enzyms ist, dass in der gleichen Zeit wesentlich mehr Cyanobakterien untersucht werden können. Daher wurde zunächst evaluiert, ob Ganzzellbiotransformationen Rückschlüsse auf die Enzymeigenschaften der KR zulassen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde entschieden, ob alle oder nur ausgewählte Kettoreduktasen heterolog in *Escherichia coli* exprimiert werden sollten.

## 6.1 Anzucht von Cyanobakterien

Für die vergleichende Untersuchung der Cyanobakterien anhand von Ganzzellbiotransformationen und die Isolierung der DNA musste Biomasse generiert werden. Die angegebenen Lichtintensitäten beziehen sich stets auf alle Kultivierungsstufen bis auf den 20 L-Rührkesselreaktor, bei dem das von Franco-Lara *et al.* (2006) optimierte Lichtprofil verwendet wurde.

### 6.1.1 Limnische, euryhaline und terrestrische Cyanobakterien

Die limnischen und euryhalinen Cyanobakterien wurden bei 25°C und einer Lichtintensität von 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert. Eine Ausnahme stellte der thermophile Stamm *Thermosynechococcus* BP-1 dar, der bei 45°C inkubiert wurde.

Bei dem terrestrischen Cyanobakterium *Gloeobacter* PCC 7421 trat ab einer Beleuchtungsstärke von  $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eine Photoinhibition auf. Bei einer Lichtintensität von  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurde jegliches Wachstum eingestellt, was sich auch durch das vollständige Ausbleichen der Kulturen aufgrund der Schädigung der Photosynthesezentren zeigte (Ergebnisse nicht gezeigt). Da mit den verwendeten Lichtsystemen keine geringere Intensität als  $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  einstellbar war, wurde dieser Stamm bei Raumtemperatur und Laborlicht ( $\sim 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mit einem Tag-Nacht-Zyklus kultiviert. Da die Blasensäulen nicht unter Laborlicht betrieben werden konnten, wurde hierbei die minimale Lichtintensität von  $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verwendet.

Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die maximalen Wachstumsraten der Cyanobakterien in den verschiedenen Kultivierungsstufen. Da die Kultivierungssysteme aufeinander aufbauten, wurde in dem Fall, dass ein Cyanobakterium in einem System nicht kultiviert werden konnte, der größere Maßstab nicht untersucht.

**Tabelle 6.1:** Maximale Wachstumsraten  $\mu_{\text{max}}$  limnischer, euryhaliner und terrestrischer Cyanobakterien in den verschiedenen Kultivierungsstufen. k.W.: kein Wachstum.

Cyanobakterium	$\mu_{\text{max}}, \text{h}^{-1}$		
	100 mL Erlenmeyerkolben	250 mL Blasensäule	20 L Rührkesselreaktor
<i>Anabaena variabilis</i>	0,06	0,08	0,08
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	0,02 <sup>a</sup>	k.W.	
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	0,01 <sup>a</sup>	k.W.	
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	0,01 <sup>a</sup>	k.W.	
<i>Nostoc</i> PCC 7120	0,04	0,06	0,06
<i>Nostoc</i> PCC 73102	0,06	0,07	0,07
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,05	0,09	0,09
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	0,03	0,04	0,04
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	0,03	0,04	0,04
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	0,07	k.W.	

<sup>a</sup> Die Kultur wurde nicht mit einem Magnetrührer durchmischt.

Neben dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7942, für dessen Anzucht das verwendete Kultivierungsverfahren von Franco-Lara *et al.* (2006) optimiert worden war, konnten fünf weitere Stämme im 20 L-Maßstab kultiviert werden. Dabei waren die maximalen Wachstumsraten in den Blasensäulen und im Rührkesselreaktor höher als in den gerührten Erlenmeyerkolben. Dies ist vor allem auf den höheren  $\text{CO}_2$ -Eintrag durch die Begasung zurückzuführen.

Die Stämme *Cyanothece* PCC 8801, *Gloeobacter* PCC 7421 und *Lyngbya* PCC 8106 zeigten die niedrigsten Wachstumsraten. Sie wurden in Erlenmeyerkolben kultiviert, in denen das Medium nicht mit einem Rührfisch durchmischt werden konnte. Die ersten beiden Stämme bildeten makroskopische Kolonien, die in gerührten Erlenmeyerkolben durch den Magnetrührer zerrieben wurden. Der dadurch bewirkte Zellstress reduzierte die Wachstumsraten um mehr als 50 % (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Kultivierung des Matten-bildenden Cyanobakteriums *Lyngbya* PCC 8106 war in gerührten Systemen nicht durchführbar, da der Rührer die gebildeten Matten zerriss. Dies führte zu einer vollständigen Einstellung des Wachstums.

*Thermosynechococcus* BP-1 zeigte ebenso wie die drei Stämme, die in nicht-gerührten Erlenmeyerkolben kultiviert wurden, kein Wachstum in Blasensäulen.

### 6.1.2 Marine Cyanobakterien

Alle marinen Cyanobakterien wurden bei 20°C kultiviert. Die Beleuchtungsstärken für die Stämme aus der *Roscoff Culture Collection* wurden von der Stammsammlung vorgegeben (Tabelle 4.3). Für den Stamm *Acaryochloris marina*, der nicht vom Roscoff-Institut bezogen wurde, wurde eine optimale Lichtintensität von 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestimmt.

In Tabelle 6.2 sind die maximalen Wachstumsraten der marinen Cyanobakterien zusammengestellt. Bei den Stämmen aus der *Roscoff Culture Collection* wurde zusätzlich die Wachstumsrate in Gewebekulturflaschen aus Polystyrol gemessen, da marine Stämme oft sensitiv auf Kupferionen reagieren, die an Glasoberflächen adsorbiert sein können (Mann *et al.*, 2002).

**Tabelle 6.2:** Maximale Wachstumsraten  $\mu_{\text{max}}$  mariner Cyanobakterien in den verschiedenen Kultivierungsstufen. k.W.: kein Wachstum.

Cyanobakterium	$\mu_{\text{max}}, \text{h}^{-1}$			
	40 mL Gewebekultur- flasche	100 mL Erlenmeyer- kolben	250 mL Blasen- säule	20 L Rührkessel- reaktor
<i>Acaryochloris marina</i>		0,02	k.W.	
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	0,02	0,02	k.W.	
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	0,02	k.W.		
<i>Synechococcus</i> RCC 307	0,04	0,03	k.W.	
<i>Synechococcus</i> RCC 555	0,05	0,04	k.W.	
<i>Synechococcus</i> RCC 556	0,03	0,04	0,04	0,02 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kultivierungstemperatur 25°C

Von den marinen Cyanobakterien konnte nur *Synechococcus* RCC 556 in Blasensäulen und im 20 L-Rührkesselreaktor nach dem von Franco-Lara *et al.* (2006) entwickelten Protokoll kultiviert werden. Im 20 L-Reaktor war aufgrund der eingeschränkten Kühlleistung des Systems nur eine Kultivierung bei 25°C anstelle von 20°C möglich. Die Temperaturänderung schlug sich in einer um 50 % reduzierten Wachstumsrate im Vergleich zur Blasensäule nieder. Bei den anderen beiden marinen *Synechococcus*-Stämmen RCC 307 und RCC 555 war die maximale Wachstumsrate in den gerührten Erlenmeyerkolben geringer als in den Gewebekulturflaschen, während bei *Prochlorococcus* NATL2 kein Wachstum zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse deuteten daraufhin, dass durch das Waschprotokoll nach Zinser *et al.* (2006) nicht alle Kupferionen aus den Erlenmeyerkolben entfernt wurden.

Da die Bauteile der Blasensäulen bis auf den Glaskörper nicht in 1 M Salzsäure eingelegt werden konnten, ist die Kupfersensitivität der Stämme auch der wahrscheinlichste Grund dafür, dass alle marinen Cyanobakterien bis auf *Synechococcus* RCC 556 kein Wachstum in den Blasensäulen zeigten. *Synechococcus* RCC 556 scheint demnach eine größere Toleranz gegenüber freien Kupferionen zu besitzen als die anderen untersuchten Stämme.

### 6.1.3 Diskussion

Das in dieser Arbeit verwendete Kultivierungsverfahren war von Franco-Lara *et al.* (2006) für die Anzucht von *Synechococcus* PCC 7942 optimiert worden. Es konnte in vollem Umfang auf insgesamt sechs weitere Cyanobakterienstämme aus den Ordnungen *Chroococcales* und *Nostocales* übertragen werden. Abstriche mussten vor allem bei Kolonie- und Mattenbildenden Cyanobakterien sowie den kupfersensitiven marinen Stämmen gemacht werden. Kalkhaltige Felsen sind das natürliche Habitat des terrestrischen Cyanobakteriums *Gloeobacter* PCC 7421 (Rippka *et al.*, 1974). Dieser Stamm wird üblicherweise bei einer Lichtstärke zwischen 5 und 10  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert und dabei weder geschüttelt noch begast, da die Zellen extrem empfindlich auf Licht und Bewegung reagieren (Rippka *et al.*, 1974; Belkin *et al.*, 1987; Ananyev *et al.*, 2004). Die Kultivierungsbedingungen, die in dieser Arbeit als optimal identifiziert wurden, stimmten mit diesen Erkenntnissen überein.

Cyanobakterien der Gattung *Lyngbya* bilden in der Natur Biofilme am Boden von Gewässern und werden in der Regel in gänzlich unbewegten oder nur begasteten Systemen kultiviert, damit die gebildeten Matten nicht zerstört werden (Burja *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 1997). Bei *Lyngbya*-Kulturen wirkt sich nur eine Oberflächenbegasung positiv auf die Wachstumsrate aus, nicht aber eine Begasung durch das Kulturmedium (Burja *et al.*, 2002). Dies könnte der Grund dafür sein, dass *Lyngbya* PCC 8106 kein Wachstum in Blasensäulen zeigte.

Die Cyanobakterien *Cyanothece* PCC 8801 und *Thermosynechococcus* BP-1 wuchsen eben-

falls nicht in Blasensäulen. Für *Cyanothece* PCC 8801 wurde in der Literatur bislang keine Kultivierung in Blasensäulen beschrieben. Im Falle von *Thermosynechococcus* BP-1 gibt es Berichte über Kultivierungen, bei denen CO<sub>2</sub>-angereicherte Luft durch das Medium geleitet wurde (Iwai *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007). Da in den Veröffentlichungen keine Aussagen über das Kultivierungssystem und den Gasdurchsatz getroffen wurden, ist kein Vergleich möglich.

**Tabelle 6.3:** Vergleich der maximalen Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  mit Literaturwerten. Angegeben wurde jeweils die höchste bestimmte Wachstumsrate - unabhängig davon, in welcher Kultivierungsstufe sie erreicht wurde. Wurden die Literaturwerte unter anderen Kultivierungsbedingungen (Medium, Lichtintensität oder Temperatur) bestimmt, sind die Unterschiede zu dieser Arbeit aufgelistet.

Cyanobakterium	$\mu_{\max}, \text{h}^{-1}$		Referenz	Unterschiede
	diese Arbeit	Literatur		
<i>Anabaena variabilis</i>	0,08	0,08	Havel (2006)	-
<i>Acaryochloris marina</i>	0,02	0,02	Swingley <i>et al.</i> (2005)	30 °C, Medium
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	0,02	0,02	Rojek <i>et al.</i> (1994)	28 °C, Medium, 35 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	0,01	0,01	Ananyev <i>et al.</i> (2004)	-
<i>Nostoc</i> PCC 7120	0,06	0,05	Zhao <i>et al.</i> (2007)	28 °C, 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>Nostoc</i> PCC 73102	0,07	0,05	Summers <i>et al.</i> (1995)	28 °C, Medium, 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	0,02	0,01	Partensky <i>et al.</i> (1993)	18 °C, Medium
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	0,02	0,02	Moore <i>et al.</i> (2007)	23 °C, Medium
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,09	0,05	Inoue <i>et al.</i> (2001)	60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	0,04	0,04	Havel (2006)	-
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	0,04	0,07	Sakamoto <i>et al.</i> (1998)	22 °C, Medium, 250 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	0,07	0,06	Iwai <i>et al.</i> (2004)	30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

In Tabelle 6.3 wird ein Vergleich zwischen den in dieser Arbeit bestimmten Wachstumsraten und Werten aus der Literatur gezogen. Über die Stämme *Synechococcus* RCC 307, 555 und 556 sowie *Lyngbya* PCC 8106 gibt es kaum Literatur und auch keine publizierten Vergleichswerte für Reinkulturen. In allen anderen Fällen wurden jeweils die Wachstumsraten herangezogen, die unter den ähnlichsten Bedingungen bestimmt worden waren. Vor allem bei den marinen Stämmen gab es große Unterschiede in den verwendeten Medien, die im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten artifiziellen Meerwassermedium häufig auf echtem Meerwasser basierten. Daher können die angegebenen Wachstumsraten nur als Richtwerte dienen.

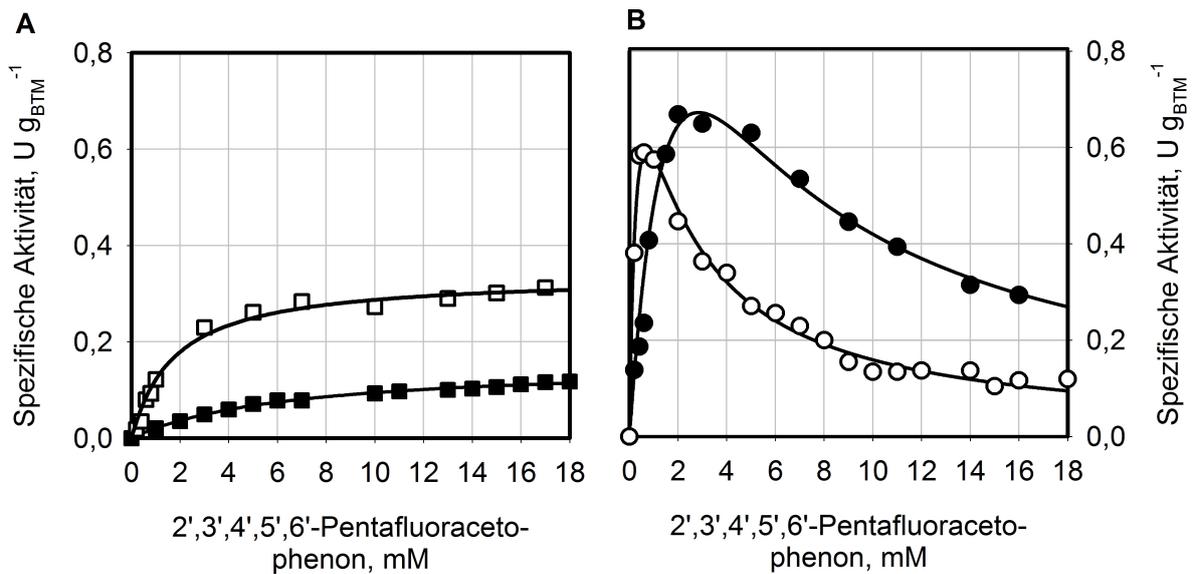
Aus Tabelle 6.3 wird ersichtlich, dass alle Cyanobakterienstämme mit vergleichbaren oder höheren Wachstumsraten kultiviert werden konnten als sie in der Literatur beschrieben sind. Die höheren Wachstumsraten sind in der Regel auf die höhere Beleuchtungsstärke in dieser Arbeit zurückzuführen. Eine Ausnahme stellt das extrem lichttolerante Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7002 dar (Nomura *et al.*, 2006), das bei  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $22^\circ\text{C}$  fast doppelt so schnell wächst wie bei  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$ . Die Wachstumsraten, die von Havel (2006) bei der Kultivierung von *Synechococcus* PCC 7942 und *Anabaena variabilis* im gleichen 20 L-Rührkesselreaktor gemessen worden waren, konnten reproduziert werden.

## 6.2 Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien

Im Rahmen von Ganzzellbiotransformationen mit den verschiedenen Cyanobakterienstämmen wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und der Enantiomerenüberschuss für jedes der vier Modellsubstrate (Ethyl-4-chloracetoacetat, Ethylbenzoylacetat, 4'-Chloracetophenon und 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon) bestimmt.

### 6.2.1 Geschwindigkeit der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon

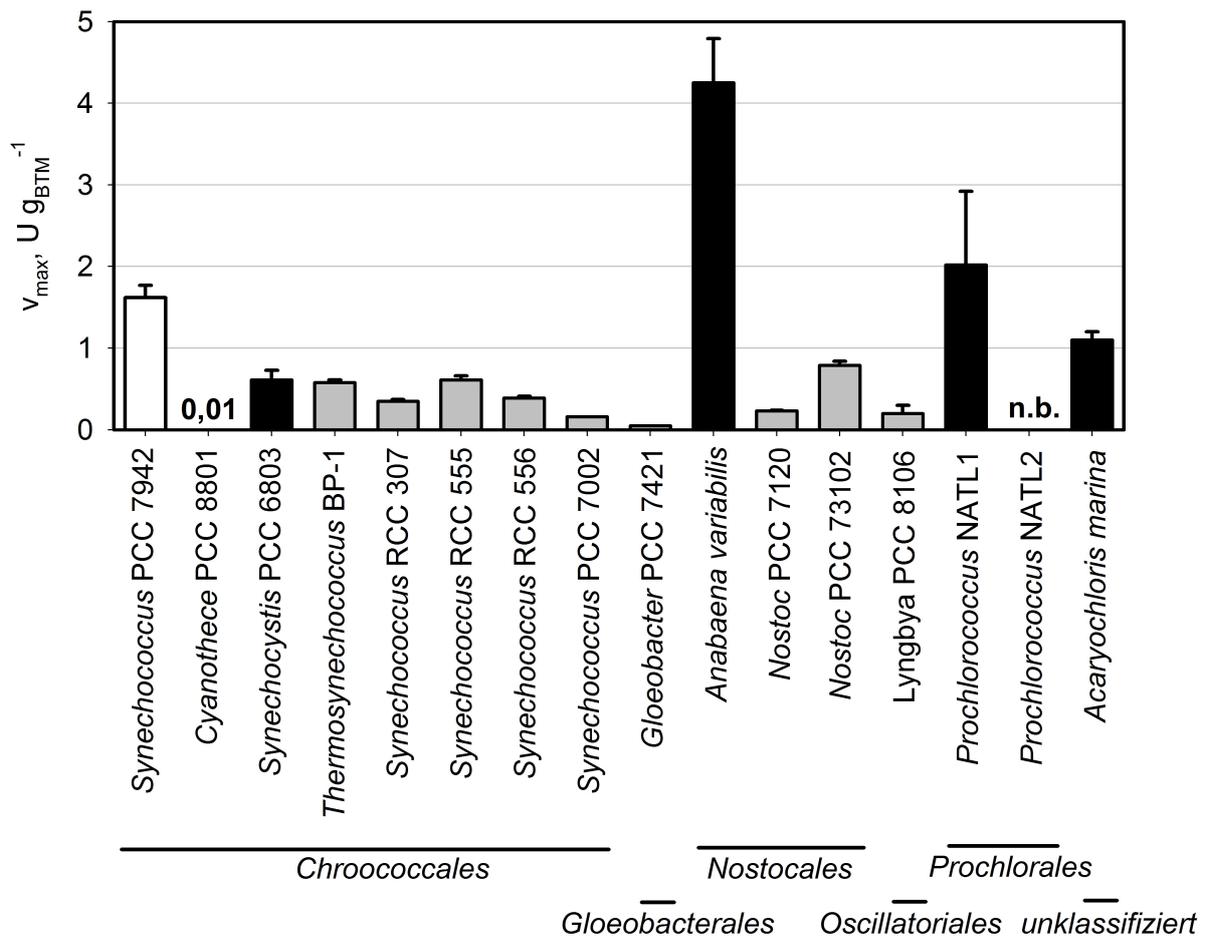
Zur Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit, mit der ein Cyanobakterium 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon umsetzt, wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen. Die Reaktionen fanden aufgrund der besseren Vergleichbarkeit im Dunkeln ( $0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) statt. Die Biomasse stammte jeweils aus dem größten Maßstab, der in der Kultivierung erreicht wurde, den 20 L-Rührkesselreaktor ausgenommen. Abbildung 6.2 zeigt exemplarisch die erhaltenen Verläufe von vier der 16 untersuchten Stämme.



**Abbildung 6.2:** Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat. Dargestellt ist die spezifische Aktivität bezogen auf die Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. **A)** Michaelis-Menten-Kinetiken der Umsetzungen durch *Synechococcus* PCC 7002 (■) und RCC 307 (□). Die Linien sind die Ergebnisse von nicht-linearen Regressionen nach Gleichung 3.6. **B)** Substratinhibierungskinetiken der Umsetzungen durch *Prochlorococcus* NATL2 (●) und *Acaryochloris marina* (○). Die Linien sind die Ergebnisse von nicht-linearen Regressionen nach Gleichung 3.10.

Während sich die Reaktionen der meisten Cyanobakterien mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben ließen, zeigten die Stämme *Prochlorococcus* NATL1, *Acaryochloris marina*, *Anabaena variabilis* und *Synechocystis* PCC 6803 eine Substratinhibierungskinetik. Die Ergebnisse der Ganzzellbiotransformationen waren mit verschiedenen Zellchargen reproduzierbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Der extrem empfindliche Stamm *Prochlorococcus* NATL2 konnte aus Cryokulturen nicht wieder reaktiviert werden, so dass dieser Versuch nicht durchgeführt werden konnte. Für dieses Cyanobakterium müsste demnach das Einfrierprotokoll modifiziert werden. Alle kinetischen Parameter der Ganzzellbiotransformationen sind in Tabelle B.1 (Anhang B) zusammengefasst.

Abbildung 6.3 gibt eine Übersicht über die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten. Die Cyanobakterien werden im Folgenden stets nach ihren taxonomischen Ordnungen sortiert, damit die Ergebnisse nah verwandter Stämme und Enzyme besser verglichen werden können. Innerhalb der Ordnung *Chroococcales* sind zuerst die limnischen Cyanobakterien aufgetragen, worauf die marinen und euryhalinen *Synechococcus*-Stämme folgen.

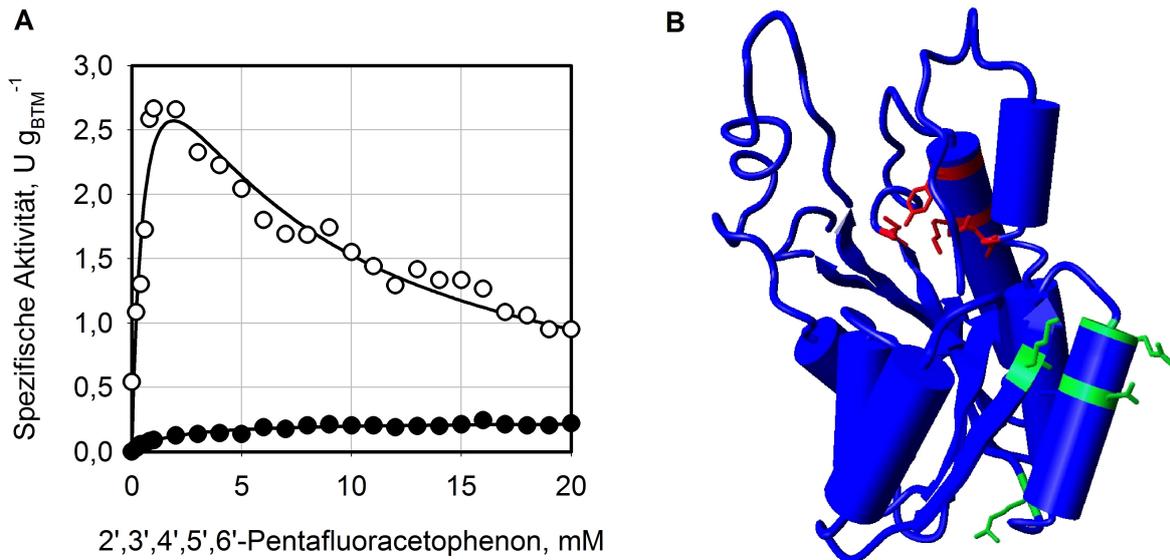


**Abbildung 6.3:** Maximale Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v_{\max}$ ) bei der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoroacetophenon in Ganzzellbiotransformationen mit verschiedenen Cyanobakterien im Vergleich zu *Synechococcus* PCC 7942 (□). Die Umsetzungen folgten entweder die einer Michaelis-Menten- (□) oder einer Substratinhibierungskinetik (■). *Synechococcus* PCC 7942 zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik. n.b.: nicht bestimmt. Die taxonomische Ordnung der einzelnen Cyanobakterien ist angegeben.

Von den untersuchten Cyanobakterien zeigte nur *Anabaena variabilis* eine höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit als *Synechococcus* PCC 7942 ( $v_{\max} = 4,25 \pm 0,54 \text{ U mg}^{-1}$  versus  $1,62 \pm 0,15 \text{ U mg}^{-1}$ ). Das Ergebnis von *Prochlorococcus* NATL1 war mit  $v_{\max} = 2,02 \pm 0,90 \text{ U mg}^{-1}$  nicht signifikant unterschiedlich. Bemerkenswert war, dass die Umsetzungen der Cyanobakterien, die abgesehen von *Synechococcus* PCC 7942 die höchsten Geschwindigkeiten zeigten, alle einer Substratinhibierungskinetik folgten.

Die Frage, ob das Expressionslevel der KR in Cyanobakterien gleich oder zumindest ähnlich ist, wurde am Beispiel der Enzyme aus *Anabaena variabilis* und *Nostoc* PCC 7120 untersucht. Dieses Paar war für eine Bewertung der Aussagekraft der Ganzzellbiotransformatio-

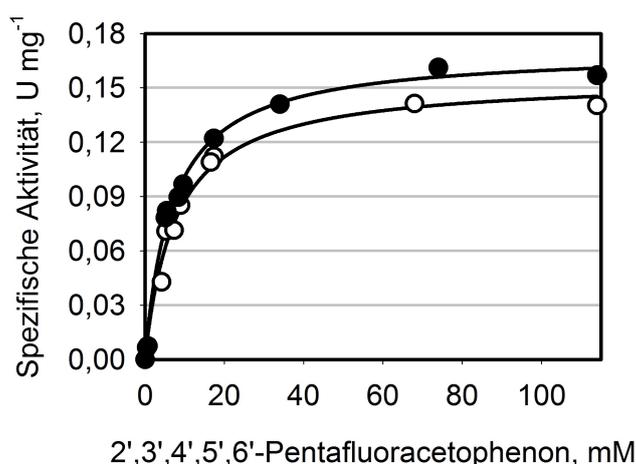
nen aus zwei Gründen besonders interessant. Zum einen waren die Stämme unter exakt gleichen Bedingungen kultiviert worden und gehören zur gleichen taxonomischen Ordnung. Zum anderen zeigten die Ganzzellbiotransformationen mit diesen Cyanobakterien sehr unterschiedliche Ergebnisse (Abbildung 6.4 A), obwohl beide Stämme nah miteinander verwandt sind und die Enzyme nur in vier Aminosäuren differieren. Abbildung 6.4 B veranschaulicht die Lage der unterschiedlichen Aminosäuren im Homologiemodell.



**Abbildung 6.4:** **A)** Vergleich der Kinetiken von Ganzzellbiotransformationen mit *Anabaena variabilis* (○) und *Nostoc PCC 7120* (●). Dargestellt ist die spezifische Aktivität bezogen auf die Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Linien sind die Ergebnisse von nicht-linearen Regressionen nach Gleichung 3.6 bzw. 3.10. **B)** Homologiemodell der KR aus *Nostoc PCC 7120*. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in Rot dargestellt. Die Unterschiede zur KR aus *Anabaena variabilis* sind grün markiert.

Die vier abweichenden Aminosäuren befinden sich auf der Oberfläche des KR-Monomers und sind dem aktiven Zentrum abgewandt. Alle Aminosäureaustausche sind darüber hinaus konservativ, das heißt der jeweilige Austausch erfolgte durch eine biochemisch ähnliche Seitengruppe. Aus der Enzymstruktur erschließt sich demnach nicht, warum diese Aminosäuren einen Aktivitätsunterschied um den Faktor 18 bedingen sollten, der in den Ganzzellbiotransformationen festgestellt wurde.

Aus diesem Grund wurden die *fabG*-Gene aus *Anabaena variabilis* und *Nostoc PCC 7120* in den Vektor pETM-41 kloniert und in *Escherichia coli* als MBP-Fusionsproteine überexprimiert. Die Enzymkinetiken der gereinigten Proteine mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat sind in Abbildung 6.5 dargestellt. NADPH wurde im Überschuss zugegeben.



**Abbildung 6.5:** Vergleich der Enzymkinetiken der KRs aus *Anabaena variabilis* (○) und *Nostoc PCC 7120* (●) mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat. Die NADPH-Konzentration betrug 4 mM. Die Linien sind die Ergebnisse von nicht-linearen Regressionen nach Gleichung 3.6.

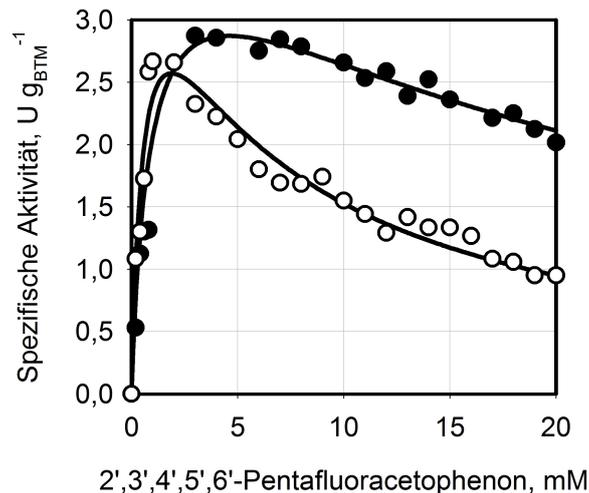
Tabelle 6.4 zeigt, dass sich die kinetischen Parameter der KR aus *Anabaena variabilis* nicht maßgeblich von denen der KR aus *Nostoc PCC 7120* unterscheiden. Somit erlaubten die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Ganzzellbiotransformationen keinerlei Rückschlüsse auf die spezifische Aktivität der zugehörigen Enzyme.

**Tabelle 6.4:** Kinetische Parameter der KRs aus *Anabaena variabilis* und *Nostoc PCC 7120* bei der Umsetzung von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon (PFAP)

KR aus	$v_{\max}$ , U mg <sup>-1</sup>	$K_m$ (PFAP), mM	$K_m$ (NADPH), mM
<i>Anabaena variabilis</i>	0,16 ± 0,01	7,76 ± 0,90	0,19 ± 0,04
<i>Nostoc PCC 7120</i>	0,17 ± 0,00	6,89 ± 0,59	0,24 ± 0,05

In Abbildung 6.5 ist darüber hinaus zu erkennen, dass die KR aus *Anabaena variabilis* auch bei weit höheren Substratkonzentrationen als 20 mM 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon, was der Maximalkonzentration in den Ganzzellbiotransformationen entsprach, keinerlei Substratinhibierung zeigte. Eine mögliche Erklärung hierfür war, dass der Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit in den Ganzzellbiotransformationen nicht an einer Substratinhibierung der KR lag, sondern an einer verminderten Verfügbarkeit von NADPH, das aus den Zellen austreten konnte, nachdem die Zellmembran durch das hydrophobe Substrat zerstört wurde. Somit wäre die Inhibierung ein Anzeichen für eine höhere Sensitivität der Zellen gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurden weitere Ganzzellbiotransformationen mit Zellen von *Anabaena variabilis* durchgeführt, wobei allen Ansätzen 0,25 mM NADPH zugesetzt wurde. Da NADPH die äußere Hülle gramnegativer Bakterien nicht überwinden kann (Hassan und Fridovich, 1979), konnte der Cofaktor nur in Zellen gelangen, deren Membran geschädigt ist.



**Abbildung 6.6:** Kinetiken von Ganzzellbiotransformationen mit *Anabaena variabilis* mit (●) und ohne (○) Zugabe von 0,25 mM NADPH. Dargestellt ist die spezifische Aktivität bezogen auf die Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Linien sind die Ergebnisse von nicht-linearen Regressionen nach Gleichung 3.10.

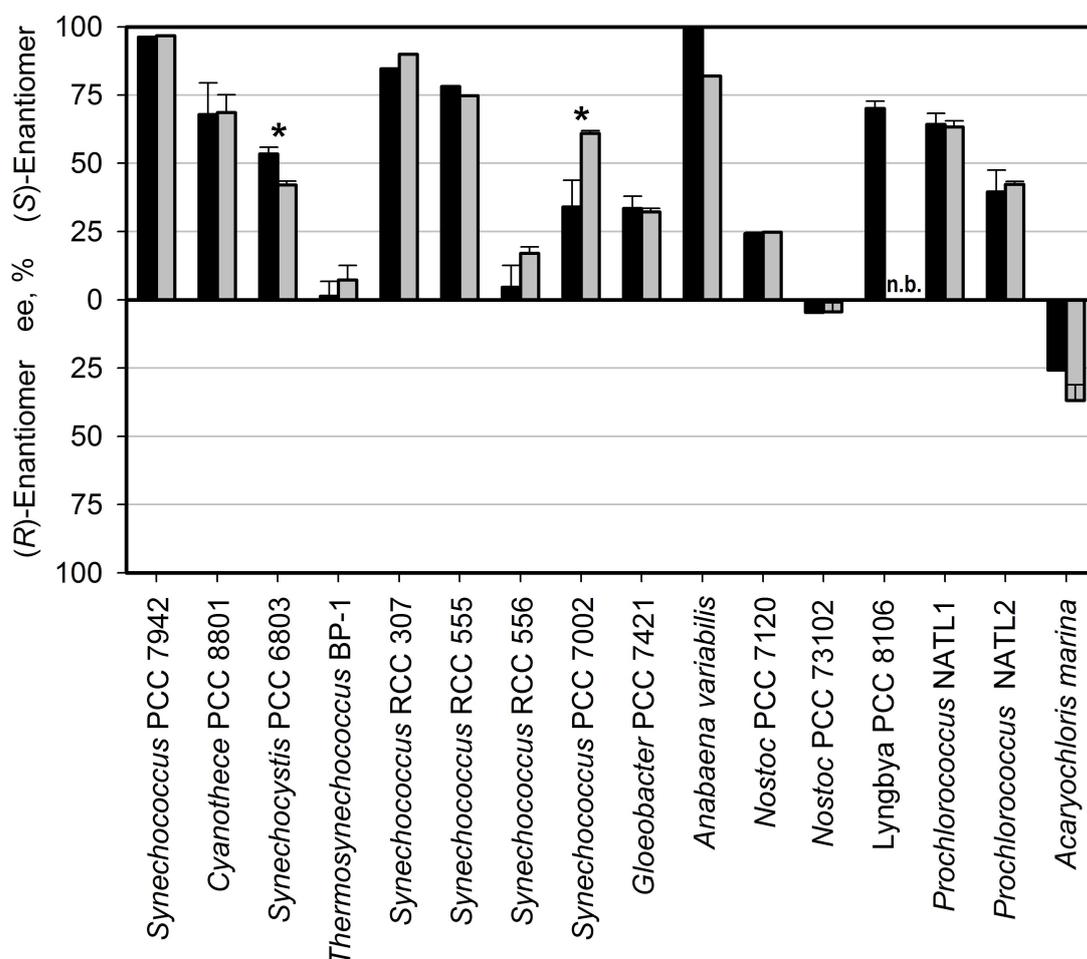
Aus Abbildung 6.6 wird ersichtlich, dass NADPH bei beginnender Inhibierung in die permeabilisierten Zellen gelangte und die Reaktion beschleunigte. Durch die Zugabe von NADPH wurde die beobachtete Inhibierung abgeschwächt. Die Inhibitionskonstante  $K_{iu}$  von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon erhöhte sich dabei von  $5,81 \pm 1,27$  mM auf  $23,6 \pm 8,6$  mM.

### 6.2.2 Enantiomerenüberschüsse

Neben der spezifischen Aktivität ist auch die Enantioselektivität ein wesentlicher Faktor bei der Bewertung einer Oxidoreduktase. Würde der in Ganzzellbiotransformationen gemessene Enantiomerenüberschuss mit dem der KR des Cyanobakteriums korrelieren, ließe sich die Anzahl an interessanten Enzymvarianten relativ einfach eingrenzen.

Das Substrat 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon war für eine Klassifizierung der Ketoreduktasen auf der Grundlage der Enantioselektivität nicht geeignet, da kein Cyanobakterium eine messbare Menge an (*R*)-Alkohol produzierte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei den Substraten 4'-Chloracetophenon, Ethylbenzoylacetat und Ethyl-4-chloracetoacetat unterschieden sich die Cyanobakterien hingegen stark in den erzielten Enantiomerenüberschüssen. In Abbildung 6.7 sind exemplarisch die Ergebnisse für Ethyl-4-chloracetoacetat bei Umsetzungen im Dunkeln ( $0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und im Hellen ( $42 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) dargestellt.



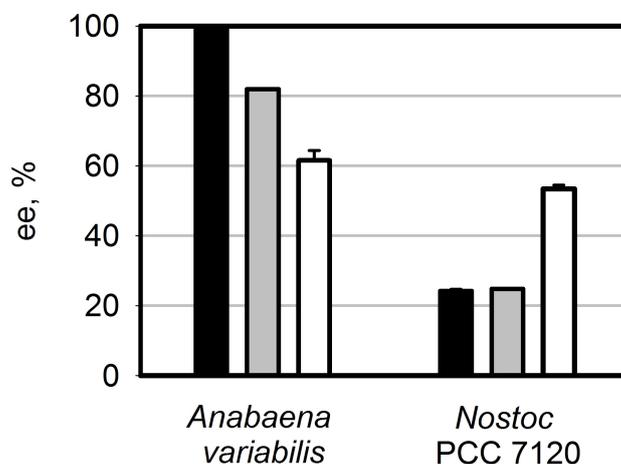
**Abbildung 6.7:** Enantiomerenüberschüsse (ee) bei Ganzzellbiotransformationen im Dunkeln ( $0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ■) und im Hellen ( $42 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , □) mit 5 mM Ethyl-4-chloracetoacetat als Substrat. Die Ergebnisse für *Synechococcus* PCC 7942 und *Anabaena variabilis* entstammen der Arbeit von Havel (2006) und waren bei  $26 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Einfachbestimmungen gemessen worden. \*: statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Enantiomerenüberschüssen im Hellen und im Dunkeln ( $P < 0,05$ , t-Test für verbundene Stichproben). n.b.: nicht bestimmt.

Während die Beleuchtung der Kulturen bei den meisten Cyanobakterien keinen Effekt zeigte, wirkte sich das Licht bei *Synechocystis* PCC 6803 und *Synechococcus* PCC 7002 signifikant auf den Enantiomerenüberschuss der Zellen aus. Licht ist keine physikalische Größe, die den Enantiomerenüberschuss eines Enzyms beeinflusst, es kann jedoch zur Änderung des Expressionslevels von Proteinen führen. Daher deutete dieses Ergebnis daraufhin, dass es zumindest in manchen Cyanobakterien konkurrierende Enzyme gibt, die Ethyl-4-chloracetoacetat zum (*R*)-Enantiomer reduzieren können.

Bei den Stämmen *Nostoc* PCC 73102 und *Acaryochloris marina* wurde phänotypisch ein Überschuss des (*R*)-Alkohols festgestellt. Da homologe Enzyme üblicherweise die gleiche Stereospezifität besitzen, legte auch dieses Ergebnis den Schluss nahe, dass Konkurrenzenzyme vorhanden sind.

Bei *Lyngbya* PCC 8106 fand im Hellen fast gar keine Umsetzung von Ethyl-4-chloracetoacetat statt, weshalb kein Enantiomerenüberschuss bestimmt werden konnte.

Ein Gegenüberstellung der Enantiomerenüberschüsse, die von *Anabaena variabilis* und *Nostoc* PCC 7120 in den Ganzzellbiotransformationen gebildet wurden, zeigt, dass auch diese Ergebnisse trotz der nahen Verwandtschaft der Stämme und der hohen Ähnlichkeit der zugehörigen KRs sehr unterschiedlich waren. Daher wurde die Enantioselektivität der heterolog exprimierten und gereinigten Enzyme gegenüber Ethyl-4-chloracetoacetat untersucht.



**Abbildung 6.8:** Vergleich der Enantiomerenüberschüsse (ee), die bei Ganzzellbiotransformationen mit *Anabaena variabilis* und *Nostoc* PCC 7120 im Dunkeln ( $0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ■) und im Hellen ( $42 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ▒) bestimmt worden waren, mit den Enantiomerenüberschüssen der gereinigten Enzyme (□). Das Substrat war jeweils Ethyl-4-chloracetoacetat.

Abbildung 6.8 zeigt, dass die Ergebnisse der gereinigten Enzyme ähnlich waren und nicht mit den Werten korrelierten, die in Ganzzellbiotransformationen bestimmt worden waren. Bei *Anabaena variabilis* lag der tatsächliche Wert mehr als 20 % unter und bei *Nostoc* PCC 7120 mehr als 25 % über den Enantiomerenüberschüssen, die in den Ganzzellbiotransformationen im Hellen und im Dunkeln vorhergesagt worden waren.

Die Ergebnisse, die mit den Substraten 4'-Chloracetophenon und Ethylbenzoylacetat in Ganzzellbiotransformationen erzielt wurden, ließen ebenfalls keinen Rückschluss auf die Enzymei-genschaften der KR zu und deuteten auch auf die Präsenz von konkurrierenden Enzymen hin (Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich konnte keines der vier Modellsubstrate in Ganzzellbiotransformationen als Indikator für die Enantioselektivität der KR dienen.

### 6.2.3 Diskussion

Lipide und Fettsäuren spielen eine bedeutende Rolle in der Stresstoleranz von Cyanobakterien, die auf eine Vielzahl von Umwelteinflüssen mit einer Modulation ihrer Membranzusammensetzung reagieren (Singh *et al.*, 2002). Zu diesen Stressfaktoren zählen beispielsweise Austrocknung (Singh *et al.*, 2002), Kälte (Los und Murata, 1999), Licht (Huang *et al.*, 2002) und osmotischer Stress (Kanesaki *et al.*, 2002). Die Akklimatisierung an umweltbedingte Stressfaktoren geht auch immer mit einer Regulation von zahlreichen induzierbaren Genen einher (Kanesaki *et al.*, 2002). Da die KR eine wichtige Rolle bei der *de novo*-Synthese von Lipiden spielt, ist auch das zugrunde liegende Gen *fabG* bei unterschiedlichen Umwelteinflüssen unterschiedlich stark exprimiert. Für *Synechocystis* PCC 6803 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Induktion von hyperosmotischem Stress durch Zugabe von 0,5 M Sorbitol das Transkriptionslevel von *fabG* um den Faktor 32,7 erhöhte (Paithoonrangarid *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde von Huang *et al.* (2002) gezeigt, dass eine Erhöhung der Lichtintensität von 25  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  die Transkription von *fabG* um den Faktor 5,2 erhöhte.

Aus diesen Daten ergibt sich, dass gerade gestresste Zellen ein höheres Expressionslevel der KR besitzen und demnach in Ganzzellbiotransformationen besser abschneiden sollten als Kulturen, die weniger Zellstress empfinden. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Membranen der Zellen, die eine Substratinhibierungskinetik zeigten, wurden durch das hydrophobe 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon stärker angegriffen. Da die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Zellen mit einer Substratinhibierungskinetik im Durchschnitt deutlich über denen mit einer Michaelis-Menten-Kinetik lagen, scheint der Angriff auf die Membran eine Erhöhung des Expressionslevels der KR zu bewirken.

Ein möglicher Grund für die Sensitivitätsunterschiede der Zellen gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon könnte darin liegen, dass sich die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die von Cyanobakterienzellen gebildet werden, auch bei nah verwandten Arten stark in Menge und Zusammensetzung unterscheiden und somit unterschiedlichen Schutz für die Zellen bieten (Nicolaus *et al.*, 1999).

Auch Havel und Weuster-Botz (2006) und Nakamura und Yamanaka (2002b) zeigten, dass der erzielte Enantiomerenüberschuss in Ganzzellbiotransformationen bei manchen Cyanobakterien von Licht beeinflusst werden kann. *Synechococcus* PCC 7942 reduzierte das Substrat  $\alpha, \alpha$ -Difluoracetophenon bei einer schwachen Beleuchtung von  $13,4 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mit einem Enantiomerenüberschuss von 70 % zum korrespondierenden *R*-Alkohol, während die Reaktion im Dunkeln nur einen Enantiomerenüberschuss von unter 30 % (*R*) aufwies (Nakamura und Yamanaka, 2002b). Diese Ergebnisse deuteten ebenfalls auf die Anwesenheit konkurrierender Enzyme mit entgegengesetzter Enantioselektivität hin.

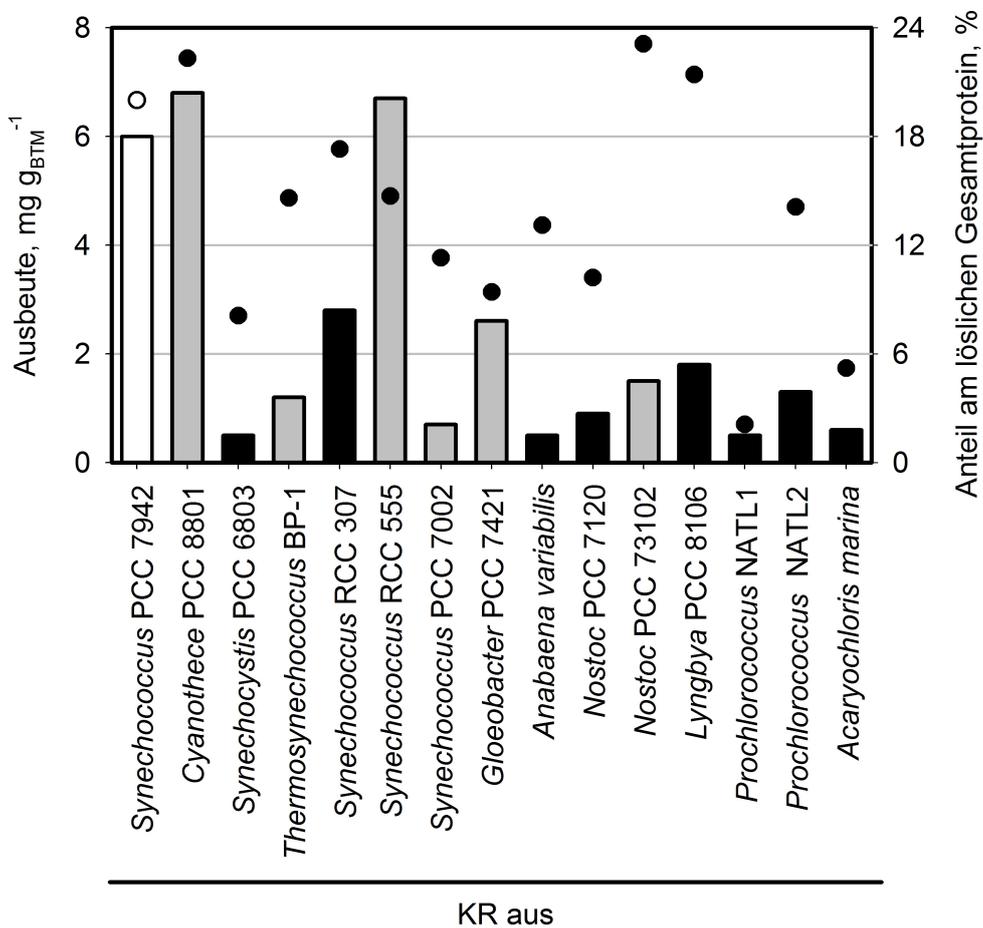
Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Ganzzellbiotransformationen, dass die Durchmusterung von Cyanobakterien nach einer hohen KR-Aktivität nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt, da das zugrunde liegende Gen *fabG* von einer Vielzahl an Umwelteinflüssen reguliert wird. Da auch die Enantiomerenüberschüsse von Ganzzellbiotransformationen keine Rückschlüsse auf die Enzymeigenschaften der KR zulassen, wurde jedes *fabG*-Gen der untersuchten Cyanobakterienstämme kloniert, um einen direkten Vergleich der heterolog in *Escherichia coli* exprimierten und gereinigten Enzyme zu ermöglichen.

### 6.3 Vergleichende Charakterisierung von 15 cyanobakteriellen Ketoreduktasen

Im Folgenden werden die Ketoreduktasen aus den 15 untersuchten Cyanobakterienstämmen näher charakterisiert und mit dem Ausgangsenzym aus *Synechococcus* PCC 7942 verglichen. Ein globaler Sequenzvergleich aller Proteine befindet sich in Anhang C.3. Alle kinetischen Parameter sind das Ergebnis von Enzymkinetiken, die unter Standardbedingungen (30 °C, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0) aufgenommen und mittels nicht-linearer Regression nach Gleichung 3.6 ausgewertet wurden.

### 6.3.1 Klonierung und Expression cyanobakterieller Ketoreduktasen

Bis auf das Enzym aus *Synechococcus* RCC 556 wurden alle cyanobakteriellen Ketoreduktasen als His<sub>6</sub>-MBP-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt. Eine interne NcoI-Schnittstelle im *fabG*-Gen von *Synechococcus* RCC 556 verhinderte dessen Einbau in den pETM-41-Vektor, da diese Schnittstelle unumgänglich für die Expression mit His<sub>6</sub>-MBP-Affinitätsanker ist. Dieses Enzym wurde daher als GST-Fusionsprotein exprimiert und auf der Grundlage der Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern gereinigt. Das Enzym fiel nach der Abspaltung des GST-Teils aus und konnte nach einer erneuten Denaturierung und Rückfaltung löslich und aktiv mit einer Ausbeute von 0,4 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> erhalten werden.



**Abbildung 6.9:** Vergleich der Expression und Reinigung der 14 Ketoreduktasen, die als His<sub>6</sub>-MBP-Fusionsprotein exprimiert wurden, mit den Ergebnissen der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 (□, ○). Dargestellt ist der Anteil am löslichen Gesamtproteingehalt (●) und die Ausbeute der KR, die in *Escherichia coli* Tuner(DE3) (□) oder Rosetta 2(DE3)(■) exprimiert wurde. Die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 war in *Escherichia coli* Tuner(DE3) exprimiert worden.

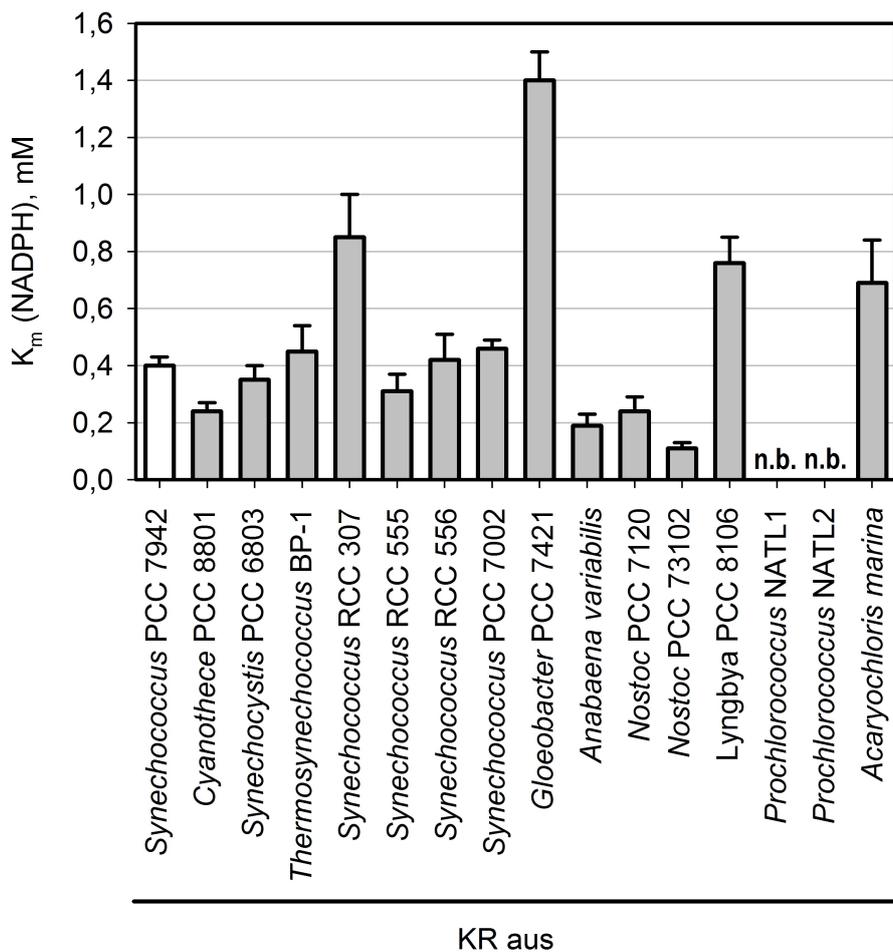
Die Expressions- und Reinigungsbedingungen der His<sub>6</sub>-MBP-Fusionsproteine richteten sich bei allen Enzymen nach den Konditionen, die für die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 optimal waren. In Abbildung 6.9 ist zu erkennen, dass der Anteil am löslichen Gesamtprotein der Zellen zwischen 2,1 % und 23,1 % variierte, während die erzielten Ausbeuten an gereinigter KR nach Abspaltung und Entfernung des Affinitätsankers zwischen 0,5 und 7,4 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> lagen. Die Hälfte der Enzyme musste in *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) exprimiert werden, um Limitierungen aufgrund einer unterschiedlichen Codonverwendung in den *fabG*-Genen zu vermeiden.

Die Proteine erschienen nach der ersten Affinitätschromatographie homogen in einer mit Coomassie gefärbten SDS-PAGE, was einer Reinheit über 97 % entsprach. Verunreinigungen, die unter Umständen bei der Spaltung durch eine nicht ganz homogene Präparation der TEV-Protease eingebracht wurden, wurden nach der zweiten Affinitätschromatographie in einer mit Silber gefärbten SDS-PAGE bestimmt und in die Berechnung der Proteinkonzentration mit einbezogen. Die gereinigte TEV-Protease zeigte keinerlei Oxidoreduktase-Aktivität.

Die Ausbeute der KR wurde wesentlich von der Menge an löslich exprimiertem Protein bestimmt und davon, wie gut das jeweilige His<sub>6</sub>-MBP-Fusionsprotein von der TEV-Protease geschnitten wurde. Je nach Protein kann das optimale Verhältnis zwischen Protease und Fusionsprotein zwischen 1:100 und 1:5 variieren (Waugh, 2009). Das Verhältnis von 1:30, das für die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 optimal war, spaltete nicht jeden His<sub>6</sub>-MBP-Affinitätsanker vollständig ab. Der unprozessierte Proteinanteil wurde dann bei der zweiten Affinitätschromatographie zusammen mit der TEV-Protease und den abgespaltenen His<sub>6</sub>-MBP-Affinitätsankern aus dem Proteingemisch entfernt. Da jedes Enzym in einer ausreichenden Menge für eine biochemische Charakterisierung produziert werden konnte, war eine Optimierung des Produktionsverfahrens nicht zwingend erforderlich. Durch eine Optimierung der Expressions- und Reinigungsbedingungen könnten jedoch die Ausbeuten einzelner Enzyme deutlich erhöht werden.

#### 6.3.2 Bestimmung der Halbsättigungskonzentration von NADPH

Für einen Vergleich der Reduktion der vier Modellsubstrate durch die cyanobakteriellen Ketoreduktasen musste zunächst für jedes Enzym die Halbsättigungskonzentration für NADPH bestimmt werden. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Umsetzung der verschiedenen Substrate in Anwesenheit einer sättigenden Konzentration von NADPH erfolgen konnte. Abbildung 6.10 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Halbsättigungskonzentrationen.

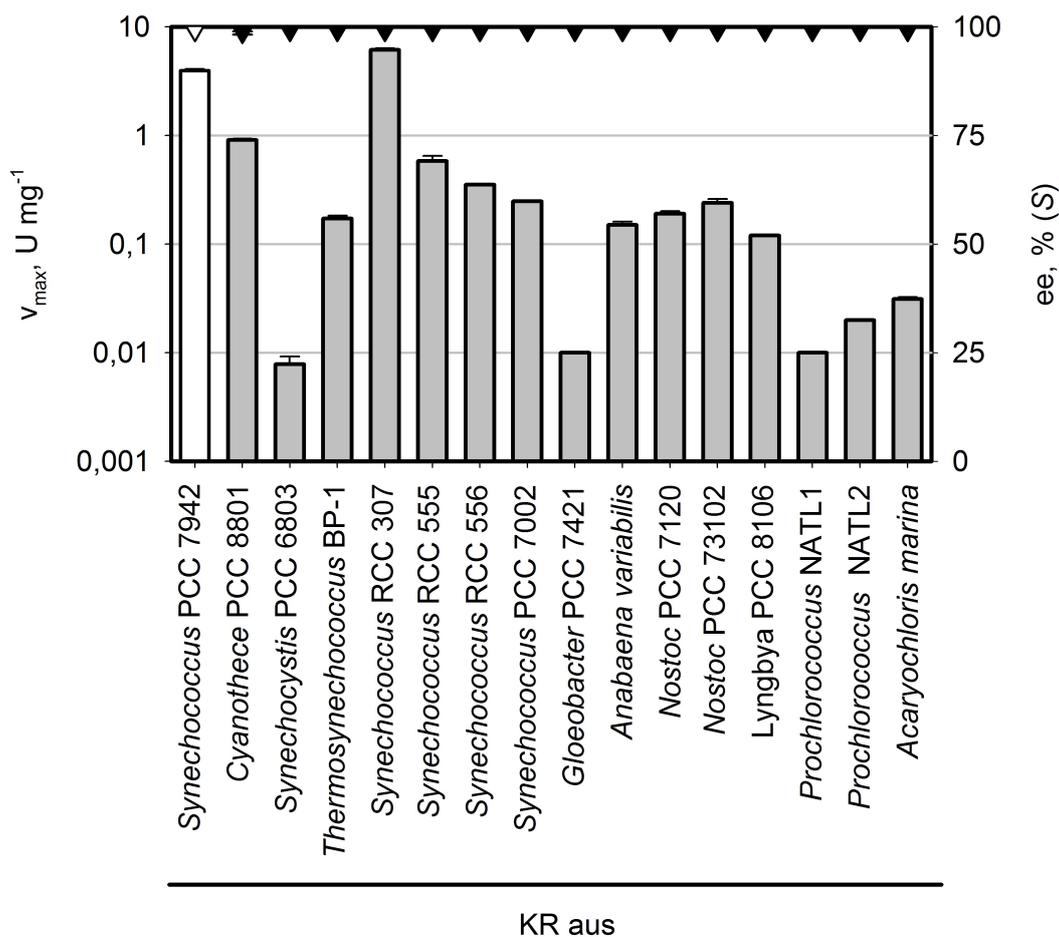


**Abbildung 6.10:** Bestimmte Halbsättigungskonzentrationen  $K_m$  (NADPH) für die cyanobakteriellen Ketoreduktasen (■) im Vergleich zu dem Enzym aus *Synechococcus* PCC 7942 (□). n.b.: nicht bestimmt.

Die niedrigsten Halbsättigungskonzentrationen zeigten die Enzyme aus Cyanobakterien der Ordnung *Nostocales*. Die KR aus *Gloeobacter* PCC 7421 wies mit  $1,40 \pm 0,10$  mM den höchsten  $K_m$  für NADPH auf. Dieses Enzym hat eine einzigartige Mutation im TGxxxGhG-Motiv der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen, das an der Cofaktor-Bindung beteiligt ist (Kallberg *et al.*, 2002). Während alle anderen untersuchten Ketoreduktasen die Sequenz TGASRGIG aufweisen, zeigt die KR aus *Gloeobacter* PCC 7421 das Motiv TGAGRGIG. Aufgrund von niedrigen Enzymaktivitäten der Ketoreduktasen aus beiden *Prochlorococcus*-Stämmen und der hohen Instabilität von NADPH gelang die Bestimmung von  $K_m$  (NADPH) nicht. Da die Halbsättigungskonzentrationen aller anderen Ketoreduktasen einen Mittelwert von 0,42 mM und einen Median von 0,40 mM besaßen, wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten dieser beiden Enzyme bei 4 mM NADPH gemessen. Die Halbsättigungskonzentration der KR aus *Gloeobacter* wurde aufgrund der Mutation nicht in die Berechnung einbezogen.

### 6.3.3 Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon

Die cyanobakteriellen Ketoreduktasen wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon untersucht. In Abbildung 6.11 sind die maximalen spezifischen Enzymaktivitäten sowie die erzielten Enantiomerenüberschüsse dargestellt. Die Halbsättigungskonzentrationen sind in Anhang B.2 aufgelistet.



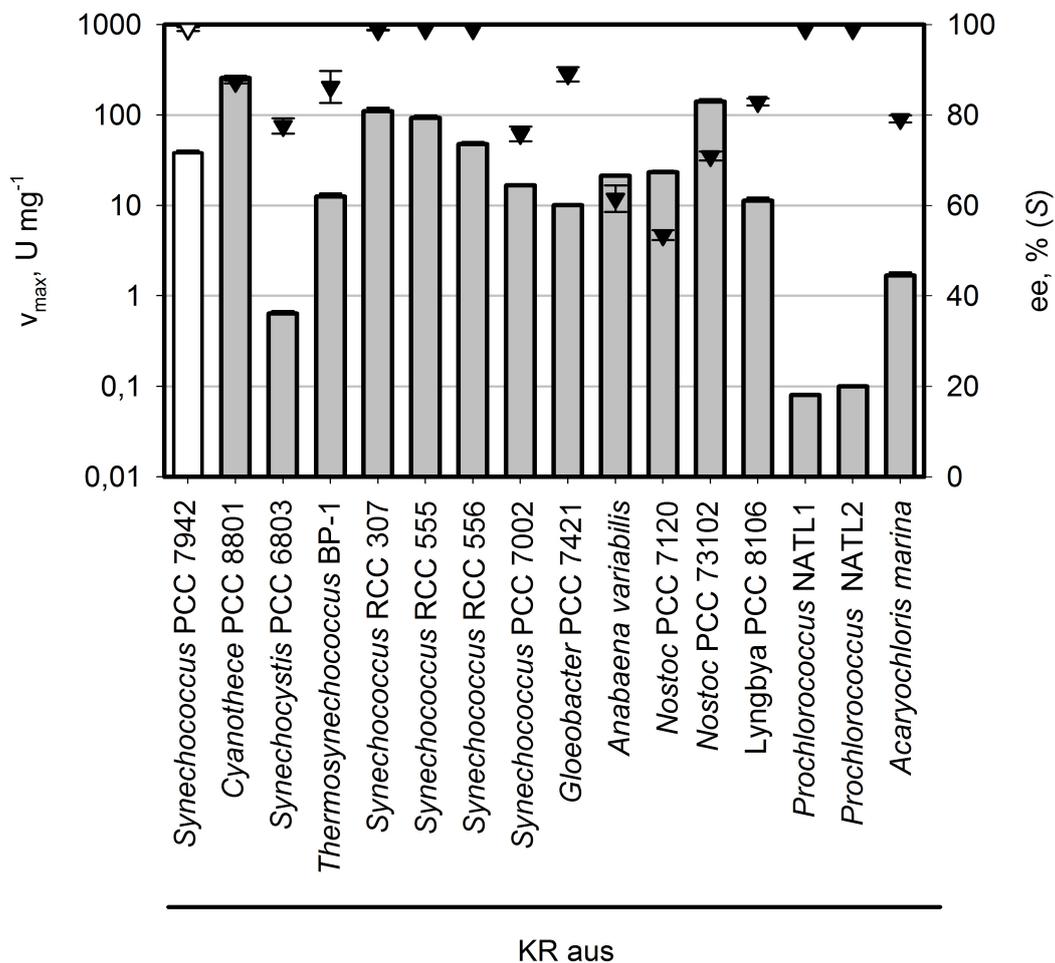
**Abbildung 6.11:** Maximale spezifische Enzymaktivitäten ( $v_{max}$ , ■) und Enantiomerenüberschüsse (ee, ▼) der untersuchten Ketoreduktasen mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat im Vergleich zur Enzymaktivität (□) und dem Enantiomerenüberschuss (▽) der KR aus *Synechococcus* PCC 7942.

Jede untersuchte KR konnte 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zum korrespondierenden (S)-Alkohol reduzieren. Während sich die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten um mehrere Größenordnungen unterschieden, differierten die Enzyme nicht in den erzielten Enantiomerenüberschüssen (ee > 99 % (S)). Nur bei der KR aus *Cyanothece* PCC 8801 konnte eine sehr geringe Konzentration an gebildetem (R)-Alkohol gemessen werden, woraus ein Enan-

tiomerenüberschuss von  $98,56 \pm 0,34 \%$  (S) resultierte. Lediglich eines der untersuchten Enzyme katalysierte die Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon schneller als das Ausgangsenzym. Die KR aus *Synechococcus* RCC 307 setzte das Substrat mit einer spezifischen Aktivität von  $6,13 \pm 0,19 \text{ U mg}^{-1}$  um, was einer Steigerung um 60,0 % gegenüber den  $3,93 \pm 0,14 \text{ U mg}^{-1}$  der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 entsprach.

### 6.3.4 Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat

Abbildung 6.12 gibt eine Übersicht über die maximalen spezifischen Enzymaktivitäten sowie die erzielten Enantiomerenüberschüsse der Ketoreduktasen bei der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat. Die Halbsättigungskonzentrationen sind in Anhang B.3 zusammengestellt.



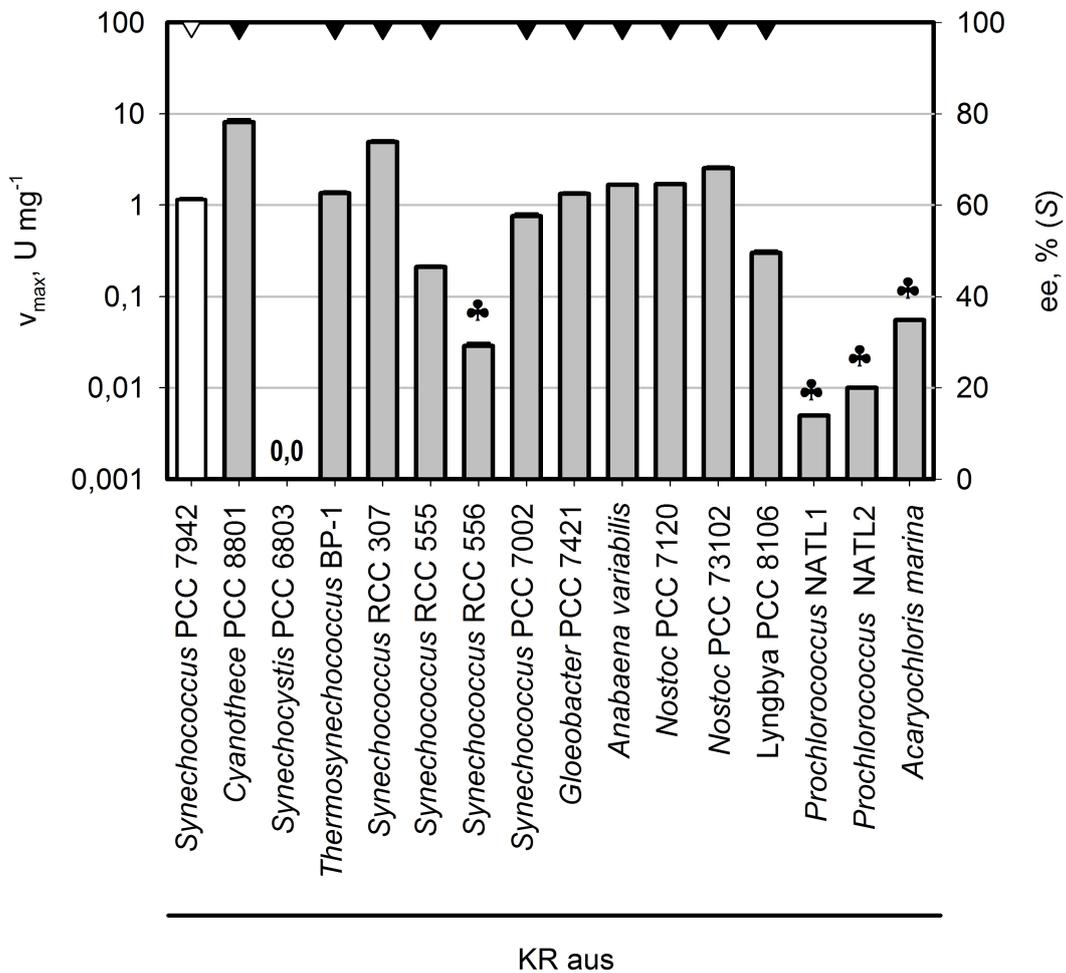
**Abbildung 6.12:** Maximale spezifische Enzymaktivitäten ( $v_{\max}$ ,  $\square$ ) und Enantiomerenüberschüsse (ee,  $\blacktriangledown$ ) der untersuchten Ketoreduktasen mit Ethyl-4-chloracetoacetat als Substrat im Vergleich zur Enzymaktivität ( $\square$ ) und dem Enantiomerenüberschuss ( $\blacktriangledown$ ) der KR aus *Synechococcus* PCC 7942.

Ebenso wie 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon wurde Ethyl-4-chloracetoacetat von jedem Enzym als Substrat akzeptiert. Im Gegensatz zum Acetophenonderivat wurde der  $\beta$ -Ketoester jedoch mit unterschiedlichen Enantiomerenüberschüssen des (*S*)-Alkohols umgesetzt. Fünf der 15 untersuchten KR-Varianten zeigten eine schnellere Umsetzung als die KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten besaßen die Enzyme aus *Cyanothece* PCC 8801 ( $v_{\max} = 256,10 \pm 15,49 \text{ U mg}^{-1}$ ) und *Nostoc* PCC 73102 ( $v_{\max} = 140,88 \pm 9,03 \text{ U mg}^{-1}$ ), wobei relativ niedrige Enantiomerenüberschüsse von 87,3 % (*S*) beziehungsweise 70,9 % (*S*) erzielt wurden. Generell korrelierten Enzymaktivität und Enantioselektivität jedoch nicht miteinander. Der Korrelations-Koeffizient nach Pearson für die Annahme eines linearen Zusammenhangs beider Merkmale lag bei  $r = -0,0027$ .

Die Ketoreduktasen aus den marinen *Synechococcus*-Stämmen RCC 307, 555 und 556 setzten Ethyl-4-chloracetoacetat sehr schnell und mit exzellenter Enantioselektivität um. Bei dem Enzym aus *Synechococcus* RCC 307 konnte mit einer spezifischen Enzymaktivität von  $110,07 \pm 9,83 \text{ U mg}^{-1}$  eine um 188 % gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur KR aus *Synechococcus* PCC 7942 bei ähnlicher Enantioselektivität ( $99,8 \pm 0,4 \%$  (*S*) versus  $98,8 \pm 0,1 \%$  (*S*)) gemessen werden.

#### 6.3.5 Reduktion von Ethylbenzoylacetat

In Abbildung 6.13 ist zu erkennen, dass sich die untersuchten Ketoreduktasen bei der Reduktion des sterisch anspruchsvollen  $\beta$ -Ketoesters Ethylbenzoylacetat nicht in den erzielten Enantiomerenüberschüssen unterschieden ( $ee > 99 \%$  (*S*)). In keinem Fall konnte der (*R*)-Alkohol detektiert werden. Das Enzym aus *Synechocystis* PCC 6803 setzte dieses Substrat nicht um, während die Ketoreduktasen aus *Synechococcus* RCC 556, *Prochlorococcus* NATL1 und NATL2 sowie *Acaryochloris marina* die Reduktion so langsam katalysierten, dass die Enantiomerenüberschüsse nicht hinreichend genau bestimmbar waren. Nach 16 h Umsetzung war die Menge an gebildetem (*S*)-Alkohol so gering, dass sich unter Berücksichtigung der Detektionsgrenze der GC-Messung nur Enantiomerenüberschüsse von mindestens 70 % (*S*) berechnen ließen. Auch eine Konzentrierung der Proteine brachte kaum Verbesserung, was darauf hindeuten könnte, dass diese Enzyme bei 30 °C weniger stabil sind als die KR aus *Synechococcus* PCC 7942, die eine Halbwertszeit von 26,5 h hatte. Neben der Temperatur könnte auch das Substrat selbst destabilisierend auf die Proteine gewirkt haben.

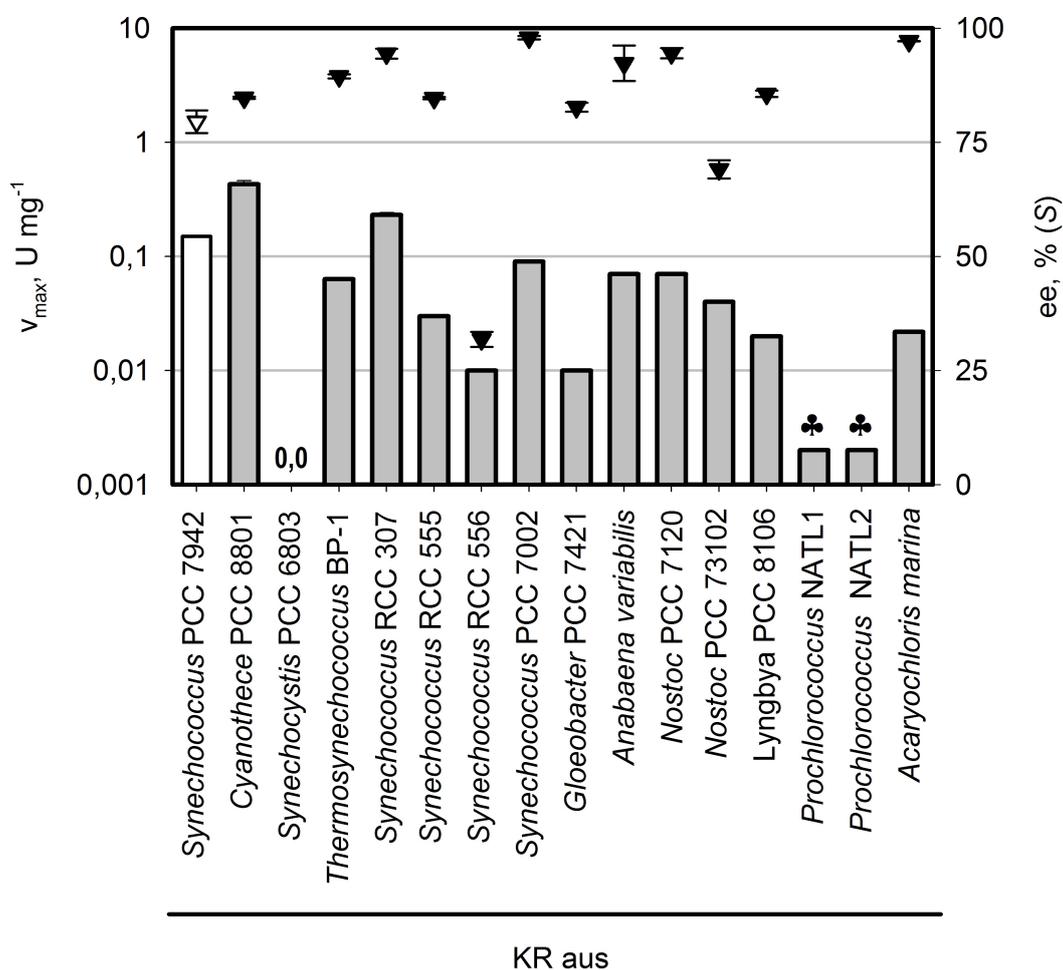


**Abbildung 6.13:** Maximale spezifische Enzymaktivitäten ( $v_{max}$ ,  $\square$ ) und Enantiomerenüberschüsse (ee,  $\blacktriangledown$ ) der untersuchten Ketoreduktasen mit Ethylbenzoylacetat als Substrat im Vergleich zur Enzymaktivität ( $\square$ ) und dem Enantiomerenüberschuss ( $\blacktriangledown$ ) der KR aus *Synechococcus* PCC 7942.  $\clubsuit$  = Enantiomerenüberschuss aufgrund niedriger Aktivität nicht hinreichend gut bestimmbar.

Es konnten sieben Enzyme identifiziert werden, die Ethylbenzoylacetat schneller reduzierten als die KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Hierzu zählten alle drei Enzyme aus der Ordnung *Nostocales* sowie *Cyanothece* PCC 8801, *Synechococcus* RCC 307 und *Gloeobacter* PCC 7421. Bei den beiden schnellsten Enzymen aus *Cyanothece* PCC 8801 und *Synechococcus* RCC 307 konnten mit spezifischen Enzymaktivitäten von  $8,12 \pm 0,70$  U mg<sup>-1</sup> beziehungsweise  $4,91 \pm 0,27$  U mg<sup>-1</sup> Aktivitätssteigerungen um 600 % und 323 % im Vergleich zum Ausgangsenzym festgestellt werden. Die zugehörigen Halbsättigungskonzentrationen sind in Anhang B.4 aufgelistet.

## 6.3.6 Reduktion von 4'-Chloracetophenon

Ähnlich wie bei der Umsetzung von Ethyl-4-chloracetoacetat unterschieden sich die cyanobakteriellen Ketoreduktasen bei der Reduktion von 4'-Chloracetophenon deutlich in den Enantiomerenüberschüssen. Abbildung 6.12 zeigt, dass keine KR einen Enantiomerenüberschuss über 99,0 % erzielte. Das enantioselektivste Enzym war das aus *Synechococcus* PCC 7002 mit einem Enantiomerenüberschuss von  $97,9 \pm 0,4$  % (S). Die KR aus *Synechocystis* PCC 6803 setzte das Substrat nicht um, während die Aktivität bei den Enzymen aus den *Prochlorococcus*-Stämmen erneut am niedrigsten war.

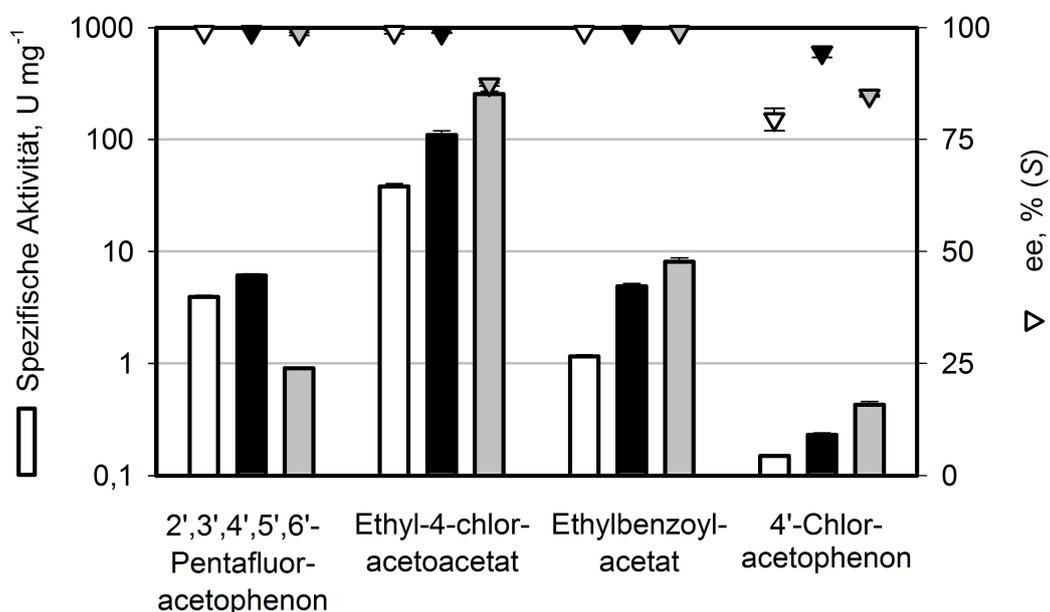


**Abbildung 6.14:** Maximale spezifische Enzymaktivitäten ( $v_{max}$ ,  $\square$ ) und Enantiomerenüberschüsse (ee,  $\blacktriangledown$ ) der untersuchten Ketoreduktasen mit 4'-Chloracetophenon als Substrat im Vergleich zur Enzymaktivität ( $\square$ ) und dem Enantiomerenüberschuss ( $\blacktriangledown$ ) der KR aus *Synechococcus* PCC 7942. ♣ = Enantiomerenüberschuss aufgrund niedriger Aktivität nicht hinreichend gut bestimmbar.

4'-Chloracetophenon wurde von den Enzymen aus *Cyanothece* PCC 8801 und *Synechococcus* RCC 307 um 187 % beziehungsweise 53 % schneller umgesetzt als durch die KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Während das Enzym aus *Synechococcus* RCC 307 mit  $0,23 \pm 0,00 \text{ U mg}^{-1}$  eine geringere spezifische Enzymaktivität aufwies als die KR aus *Cyanothece* PCC 8801, die das Keton mit  $0,43 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$  reduzierte, war die Enantioselektivität des *Synechococcus*-Enzyms deutlich höher (94,4 % (S) versus 84,8 % (S)). Beide Enzyme waren enantioselektiver als die KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Generell gab es eine leicht positive Korrelation zwischen Aktivität und Enantioselektivität (Pearson-Koeffizient  $r = 0,1975$ ). Die Halbsättigungskonzentrationen sind in Anhang B.3 zusammengestellt.

### 6.3.7 Gegenüberstellung der besten Enzyme

Abbildung 6.15 zeigt einen Vergleich der Ketoreduktasen, die bei Reduktion der vier Modellsubstrate besonders gute Ergebnisse gezeigt hatten. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme aus *Synechococcus* RCC 307 und *Cyanothece* PCC 8801 lagen bei allen Substraten unter den höchsten drei Werten.



**Abbildung 6.15:** Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten und erzielten Enantiomerenüberschüsse (ee) der Enzyme aus *Synechococcus* PCC 7942 (□), *Synechococcus* RCC 307 (■) und *Cyanothece* PCC 8801 (▣).

Die KR aus *Synechococcus* RCC 307 zeigte gegenüber allen vier Modellsubstraten eine höhere Aktivität als das Ausgangsenzym bei gleicher oder besserer Enantioselektivität. Lediglich der Enantiomerenüberschuss des Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrats war mit  $98,8 \pm 0,1 \%$  (S) niedriger als der Enantiomerenüberschuss von  $99,8 \pm 0,4 \%$  (S), der von der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 produziert wurde. Das Expressionslevel der KR aus dem marinen *Synechococcus*-Stamm RCC 307 war mit einem Anteil von 17,3 % am löslichen Gesamtproteingehalt der *Escherichia coli*-Zellen geringer als das der KR aus dem limnischen *Synechococcus* PCC 7942, das bei 20,0 % lag. Bezogen auf den Ganzzellbiokatalysator ergibt sich aus diesen Werten eine Erhöhung der maximalen Enzymaktivität von 153 - 230 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> für die Umsetzung von Ethyl-4-chloracetoacetat durch die KR aus *Synechococcus* PCC 7942 auf 381 - 572 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> für Zellen, in denen die KR aus *Synechococcus* RCC 307 vorliegt.

Die KR aus *Cyanothece* PCC 8801 zeigte mit Abstand die höchste Aktivität gegenüber den  $\beta$ -Ketoestern Ethyl-4-chloracetoacetat und Ethylbenzoylacetat. Auch 4'-Chloracetophenon wurde von dieser KR-Variante am schnellsten reduziert, während die Aktivität mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat niedriger war als die der Enzyme aus beiden *Synechococcus*-Stämmen. Unter Berücksichtigung des Expressionslevels der KR, das mit 22,3 % über dem des Ausgangsenzyms aus *Synechococcus* PCC 7942 lag, ergibt sich eine maximale Aktivität bezogen auf die Biotrockenmasse von 1141 - 1716 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> für die Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat. Die Enantioselektivität der KR aus *Cyanothece* PCC 8801 war insgesamt geringer als die der anderen beiden Enzyme. Nur bei der Reduktion des Ethylbenzoylacetats wurde kein (R)-Alkohol detektiert.

Im Vergleich zu den Enzymen aus *Cyanothece* PCC 8801 und *Synechococcus* RCC 307 zeigte die KR aus *Thermosynechococcus* BP-1 bei der Standardtemperatur von 30°C niedrigere Enzymaktivitäten, die jeweils im Mittelfeld der 15 KRs lagen. Jedoch gilt, dass die Aktivität von Enzymen aus thermophilen Organismen häufig vergleichbar ist mit der Aktivität homologer Enzyme aus mesophilen Organismen bei ihren jeweiligen Temperaturoptima (Danson *et al.*, 1996). Infolge der Arrhenius-Beziehung sind die thermoaktiven Enzyme bei moderaten Temperaturen demnach oft weniger aktiv als ihre mesophilen Pendanten. Um kein gutes Enzym zu übersehen, wurde das Temperaturoptimum der KR aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus* BP-1 bestimmt. Das Enzym zeigte ein Optimum von 50°C bei der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat (Ergebnisse nicht gezeigt). Dabei erhöhte sich die spezifische Aktivität von  $12,54 \pm 1,03$  U mg<sup>-1</sup> auf  $38,12 \pm 3,02$  U mg<sup>-1</sup>. Unter der Annahme, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei den anderen Modellsubstraten auch um Faktor 3 erhöht, wäre die Aktivität der KR aus *Thermosynechococcus* BP-1 bei 50°C dennoch bei jedem Substrat geringer als die der KR aus *Synechococcus* RCC 307 bei 30°C.

### 6.3.8 Identifikation von Aktivitäts-bestimmenden Aminosäuren

Da die spezifischen Enzymaktivitäten der cyanobakteriellen KRs bei allen vier Modellsubstraten um mehrere Größenordnungen differierten, wurde versucht, anhand von Sequenzvergleichen Aminosäuren oder Proteinbereiche zu identifizieren, die für die Aktivitätsunterschiede verantwortlich sind. Hierbei wurde in den 150 Aminosäuren des C-terminalen Bereiches, in dem die Substratbindung stattfindet, zwischen der  $\alpha$ 4-Helix und dem  $\beta$ 7-Strang nach Positionen gesucht, in denen sich besonders aktive Enzyme von den weniger aktiven Enzymen unterscheiden. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich nachfolgend stets auf die KR aus *Synechococcus* PCC 7942.

Bei einer Betrachtung der spezifischen Enzymaktivitäten fiel auf, dass die Aktivität der Enzyme gegenüber den Substraten Ethyl-4-chloracetoacetat, Ethylbenzoylacetat und 4'-Chloracetophenon in hohem Maße korrelierte, während das für das Substrat 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon nicht zutraf. Tabelle 6.5 gibt eine Übersicht über die Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die Aktivitäten aller 16 Enzyme gegenüber den vier Modellsubstraten.

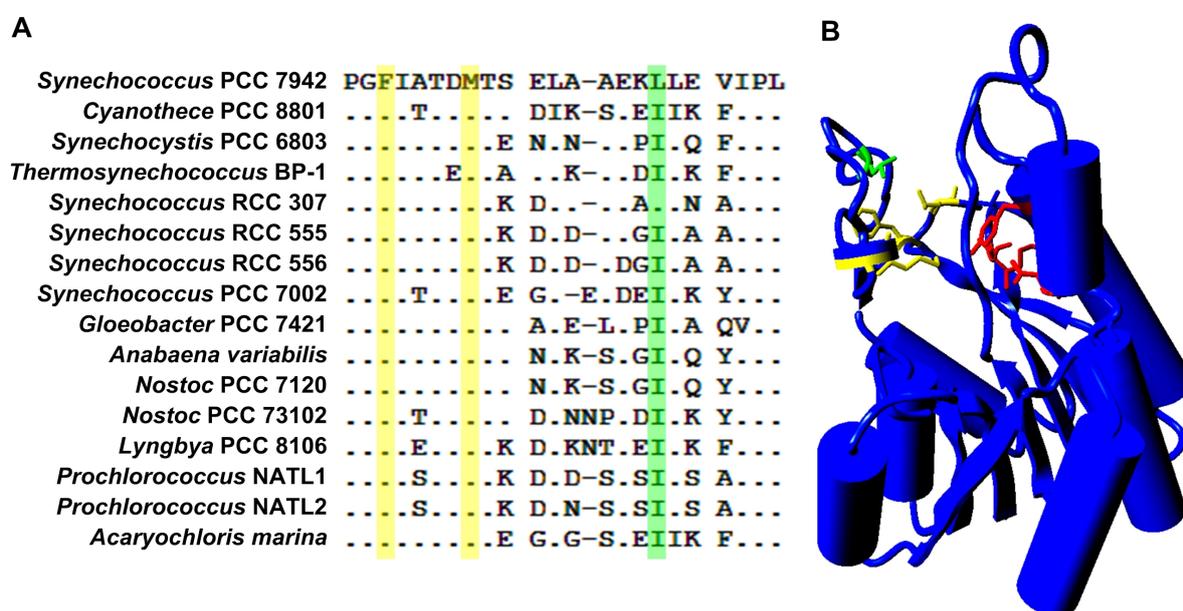
**Tabelle 6.5:** Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die Enzymaktivitäten aller Ketoreduktasen gegenüber den Modellsubstraten

	2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon	Ethyl-4-chloracetoacetat	Ethylbenzoylacetat	4'-Chloracetophenon
2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon	1,00			
Ethyl-4-chloracetoacetat	0,30	1,00		
Ethylbenzoylacetat	0,43	0,87	1,00	
4'-Chloracetophenon	0,51	0,81	0,93	1,00

Während kein Sequenzmotiv identifiziert werden konnte, das für eine hohe Enzymaktivität gegenüber Ethyl-4-chloracetoacetat, Ethylbenzoylacetat und 4'-Chloracetophenon verantwortlich ist, konnte ein Bereich lokalisiert werden, in dem sich die Enzyme, die 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon gut umsetzen können, von den anderen abheben.

Die KR<sub>s</sub> aus *Synechococcus* RCC 307 und PCC 7924 reduzierten 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon mit spezifischen Aktivitäten von 6,13 U mg<sup>-1</sup> und 3,93 U mg<sup>-1</sup> am schnellsten, während beispielsweise die Aktivität des ansonsten sehr aktiven Enzyms aus *Cyanothece* PCC 8801 mit diesem Substrat abfiel (0,91 U mg<sup>-1</sup>).

Die KR<sub>s</sub> aus *Synechococcus* RCC 307 und PCC 7924 unterscheiden sich am meisten von allen anderen Enzymen in dem Bereich, der schon bei der Sekundärstrukturvorhersage und der Homologiemodellierung als flexibel erkannt wurde und das aktive Zentrum bei der Substratbindung wie ein Deckel verschließt (White *et al.*, 2005). Abbildung 6.16 A zeigt einen Sequenzvergleich aller Ketoreduktasen in diesem Bereich.



**Abbildung 6.16:** **A)** Sequenzvergleich aller KR<sub>s</sub> zwischen den Aminosäuren 188 und 210 im Einbuchstabencode (Tabelle 9.2). Sequenzunterschiede sind im Einbuchstabencode eingetragen, während Sequenzidentitäten als Punkte markiert sind. Die Aminosäurepositionen, die in Interaktion mit der wachsenden Fettsäurekette treten, sind farbig hinterlegt. Leucin 246 befindet sich außerhalb des Sequenzabschnittes. **B)** Homologiemodell der KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Das aktive Zentrum ist in Rot dargestellt, während die Aminosäuren, die in Interaktion mit der wachsenden Fettsäurekette treten, gelb markiert sind. Das Leucin an Position 204 ist grün dargestellt.

Price *et al.* (2001) konnten für die homologe KR aus Raps zeigen, von welchen Aminosäuren die wachsende Fettsäurekette bei der nativen Reaktion der KR koordiniert wird. Die korrespondierenden Aminosäuren in der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 sind unter anderem Phenylalanin (F) 190, Methionin (M) 195, Leucin (L) 204 und Leucin 246. Abbildung 6.16 B stellt die Lage der Aminosäuren im Homologiemodell dar. Der Kanal, der ausgehend vom ak-

tiven Zentrum gebildet wird, ist zu erkennen. Durch eine Konformationsänderung infolge der Substratbindung klappt der flexible Deckel über den Kanal, in dem sich das Substrat befindet (Fisher *et al.*, 2000), woraus sich der Einfluss dieser Region auf die Enzymaktivität ergibt.

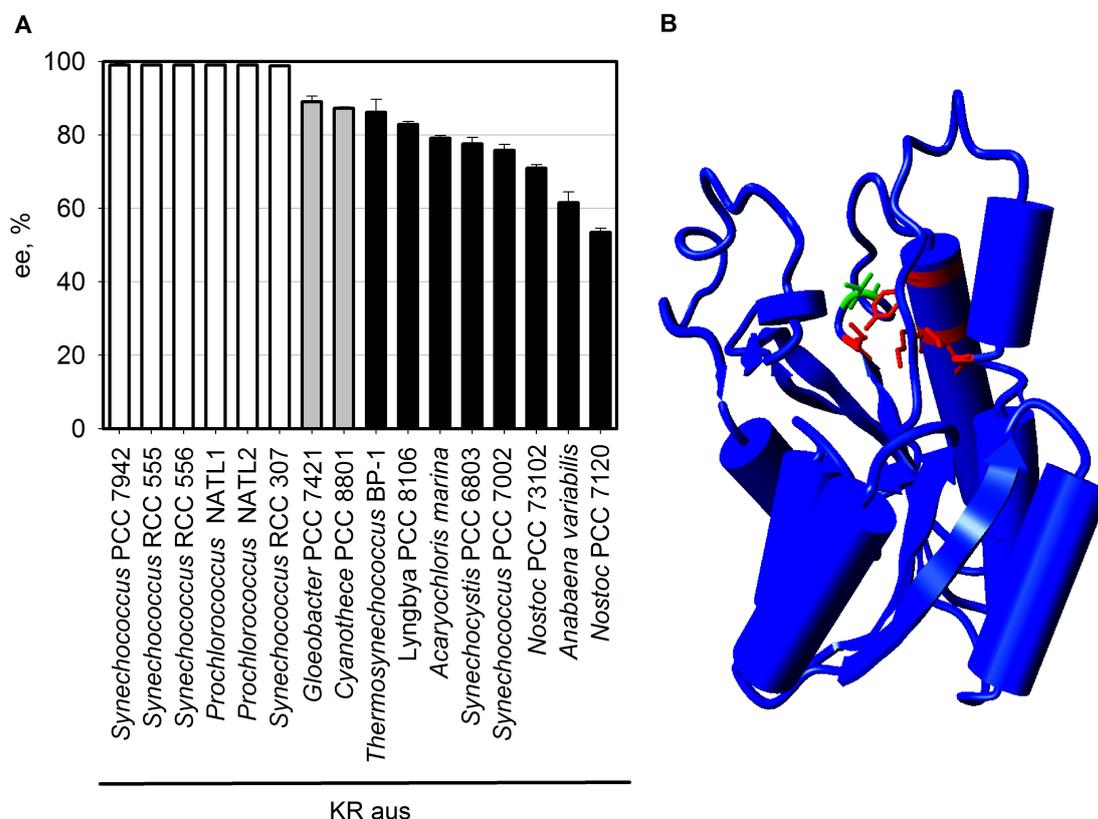
Neben der höchsten Sequenzähnlichkeit zwischen den Enzymen aus *Synechococcus* RCC 307 und *Synechococcus* PCC 7942 in diesem flexiblen Bereich besitzen auch nur diese beiden Enzyme ein Leucin an Position 204 anstelle des Isoleucins, das alle anderen Ketoreduktasen aufweisen (Abbildung 6.16 A). Da Leucin einen ähnlichen sterischen Anspruch hat wie Isoleucin, jedoch eine deutlich höhere Neigung zur Ausbildung von  $\alpha$ -Helices aufweist (Lyu *et al.*, 1991), liegt der Aktivitätseinfluss wahrscheinlich an der gesamten Konformation des Deckels und nicht nur an der einzelnen Aminosäure.

Bei dem homologen Enzym aus *Escherichia coli* konnte in Zellen des Stammes JM 109 nach 24 h Umsetzung bei einer Biomassekonzentration von  $2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  und einer Substratkonzentration von 150 mM kein Umsatz von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon gemessen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die KR aus *Escherichia coli* besitzt ebenfalls ein Isoleucin an Position 204, wobei direkt vor dem Isoleucin drei weitere Aminosäuren inseriert sind, die in jeder cyanobakteriellen KR fehlen (Fisher *et al.*, 2000). Diese Unterschiede könnten dafür verantwortlich sein, dass die KR aus *Escherichia coli* 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon nicht umsetzt.

### 6.3.9 Identifikation von Selektivitäts-bestimmenden Aminosäuren

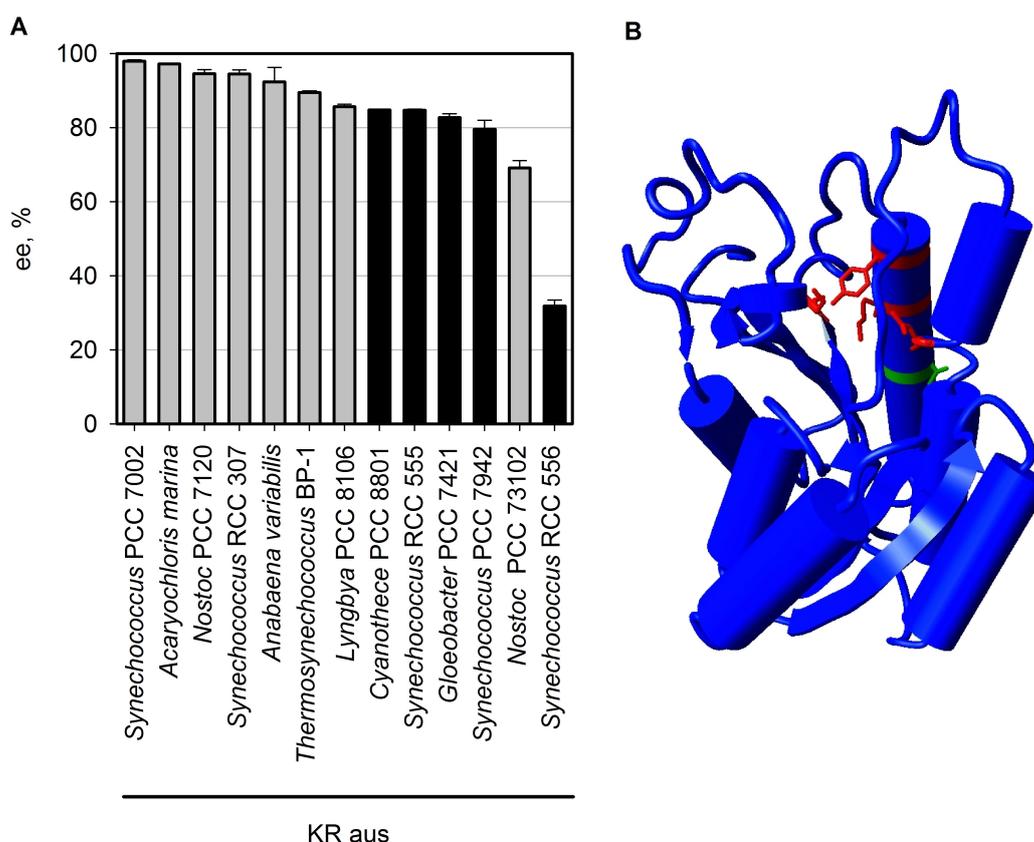
Während alle cyanobakteriellen Ketoreduktasen bei der Reduktion der Substrate 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und Ethylbenzoylacetat exzellente Enantiomerenüberschüsse zeigten, differierte die Enantioselektivität bei Ethyl-4-chloracetoacetat und 4'-Chloracetophenon stark. Daher wurde ebenfalls anhand von Sequenzvergleichen versucht, Aminosäuren zu identifizieren, die die Selektivität der KR bestimmen.

Bei der Umsetzung von Ethyl-4-chloracetoacetat besaß die Aminosäureposition 147 einen großen Einfluss auf die Enantioselektivität. In Abbildung 6.17 A ist der Enantiomerenüberschuss der Enzyme mit Ethyl-4-chloracetoacetat als Substrat in absteigender Reihenfolge aufgetragen. Während alle Enzyme mit hohem Enantiomerenüberschuss ein Valin an Position 147 besitzen, nehmen die Proteine mit einem polaren Serinrest eine Mittelstellung ein. Bei allen wenig selektiven Enzymen findet sich ein Alanin, das einen viel geringeren Platzbedarf hat als das bedeutend größere Valin. Die Heterogenität der Enantioselektivität bei den Enzymen mit Alanin an Position 147 zeigt jedoch, dass es noch weitere Aminosäurepositionen geben muss, die einen Einfluss besitzen. Abbildung 6.17 B verdeutlicht, dass die Lage der Aminosäure 147 einen Selektivitätseinfluss plausibel macht.



**Abbildung 6.17: A)** Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses (ee) bei der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat von der Aminosäure an Position 147. Die Enzyme sind nach absteigendem Enantiomerenüberschuss geordnet. □: Valin, ◻: Serin, ◼: Alanin. **B)** Lage der Aminosäureposition 147 im Homologiemodell. Das aktive Zentrum ist in Rot dargestellt, während Position 147 grün markiert ist.

Bei der Reduktion von 4'-Chloracetophenon konnte ein Einfluss der Aminosäureposition 168 auf die Enantioselektivität festgestellt werden, der jedoch weniger deutlich war als derjenige der Aminosäureposition 147 bei Ethyl-4-chloracetoacetat. Abbildung 6.18 zeigt, dass sich das sterisch große Phenylalanin an Position 168 vorteilhaft auf die Enantioselektivität auswirkte im Vergleich zum kleineren Leucin. Das Phenylalanin an Position 168 ist in zahlreichen homologen Proteinen konserviert (Fisher *et al.*, 2000). Hierzu zählen auch die Enzyme aus *Escherichia coli* und Raps. Die Konservierung dieser Aminosäureposition unterstreicht ihre strukturelle Bedeutung.



**Abbildung 6.18:** **A)** Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses bei der Reduktion von 4'-Chloracetophenon von der Aminosäure an Position 168. Die Enzyme sind nach absteigendem Enantiomerenüberschuss geordnet. □: Phenylalanin, ■: Leucin. **B)** Lage der Aminosäureposition 168 im Homologiemodell. Das aktive Zentrum ist in Rot dargestellt. Position ist 168 grün markiert.

## 6.4 Diskussion

Bei der Suche nach cyanobakteriellen KR-Varianten, die für die asymmetrische Synthese chiraler Alkohole geeignet sind, konnten zwei Enzyme identifiziert werden, die bei der Umsetzung der vier Modellsubstrate 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon, Ethyl-4-chloracetoacetat, Ethylbenzoylacetat und 4'-Chloracetophenon durchschnittlich höhere Aktivitäten erzielten als die KR aus *Synechococcus* PCC 7942. Die beiden besten KRs stammen aus dem marinen Cyanobakterium *Synechococcus* RCC 307 und dem limnischen Cyanobakterium *Cyanothece* PCC 8801, die ebenso wie *Synechococcus* PCC 7942 zur Ordnung *Chroococcales* gehören.

Während die Enzyme aus Cyanobakterien der Ordnung *Nostocales* bei der Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern ebenfalls gute Ergebnisse erzielten, waren sie für die Umsetzung der Acetophenonderivate 4'-Chloracetophenon und 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon nicht geeignet. Die KRs aus den *Prochlorococcus*-Stämmen sowie aus *Synechocystis* PCC 6803 waren insgesamt am wenigsten brauchbar für die Produktion chiraler Alkohole.

Durch Sequenzvergleiche ist es gelungen, Aminosäuren zu identifizieren, die für Unterschiede in der Aktivität gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und der Enantioselektivität gegenüber Ethyl-4-chloracetoacetat und 4'-Chloracetophenon verantwortlich sein könnten. Diese Ergebnisse bilden eine mögliche Grundlage für ein rationales Proteindesign. So könnte die Enantioselektivität des Enzyms aus *Cyanothece* PCC 8801 bei der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat durch die Mutation des Serins an Position 147 in ein Valin erhöht werden. Am gleichen Enzym könnte untersucht werden, ob ein Austausch des Isoleucins an Position 204 gegen ein Leucin einen Aktivitäts-steigernden Effekt gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zur Folge hat. Hat die einzelne Mutation keine Auswirkung, könnte der gesamte Bereich zwischen Aminosäure 197 und 207 nach dem Vorbild der KR aus *Synechococcus* PCC 307 gestaltet werden, die von den untersuchten Enzymen die schnellste Umsetzung von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon katalysierte.

Methodische Alternativen zu dem in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich natürlicher KR-Varianten zur Identifizierung interessanter Enzyme für die asymmetrische Synthese chiraler Alkohole wären die Veränderung des Ausgangsenzyms aus *Synechococcus* PCC 7942 durch ungerichtete Mutagenese oder die Suche nach homologen Enzymen in Metagenombanken gewesen.

Der Vorteil des Vergleichs natürlicher Enzymvarianten gegenüber der Veränderung der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 durch ungerichtete Mutagenese liegt darin, dass alle natürlichen KRs funktionell aktiv sind, auch wenn sie eine beträchtliche Anzahl an Aminosäureaustauschen aufweisen. Die Aminosäuresequenz der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 zeigt beispielsweise Übereinstimmungen mit den Sequenzen der Enzyme aus *Cyanothece* PCC 8801 und *Synechococcus* RCC 307 von 70 bzw. 76 %. Die zufallsbasierte Mutagenese hingegen, die unter anderem durch eine fehlerbehaftete PCR (*error prone PCR*) bewirkt werden kann, generiert häufig eine hohe Anzahl inaktiver Mutanten (You und Arnold, 1996). Übliche Mutationsraten der fehlerbehafteten PCR liegen bei 1-5 Mutationen pro Gen, wodurch alle generierten Sequenzvarianten ferner sehr nah an der Proteinsequenz des Ausgangsenzyms liegen und daher eine vergleichsweise geringe Diversität abdecken (Kourist *et al.*, 2009).

Bei der Nutzung von Metagenombanken zur Identifizierung neuer Enzyme ist neben der phänotypischen Durchmusterung nach der gewünschten Enzymaktivität auch die DNA-basierte Suche nach homologen Enzymen auf der Grundlage konservierter Sequenzbereiche möglich. Da jede cyanobakterielle KR die Fähigkeit zur Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon besaß, das homologe Enzym aus *Escherichia coli* mit einer Sequenzidentität von 50 % zur KR aus *Synechococcus* PCC 7942 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon jedoch nicht umsetzen konnte, ist die Umsetzung des perfluorierten Acetophenonderivats vermutlich ein Merkmal, in dem sich cyanobakterielle KRs von anderen KRs abheben. Daher erscheint die Suche nach entfernt verwandten Enzymen in Metagenombanken in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll. Eine Ausnahme könnten hierbei die Metagenome aus Gewässerproben darstellen, die auch die genetische Information bislang unkultivierter oder nicht sequenzierter Cyanobakterien abbilden.

## 7 Cofaktorregenerierung

Das folgende Kapitel widmet sich der Entwicklung einer geeigneten Methode zur Cofaktorregenerierung für KRs aus Cyanobakterien am Beispiel der KR aus *Synechococcus* PCC 7942.

### 7.1 Cofaktorregenerierung mit Cosubstraten

Zunächst wurde die Realisierbarkeit einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung mit der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 untersucht. Hierfür wurden Isopropanol sowie alle 2-Alkanole mit Kettenlängen von C4 bis C8 als Cosubstrate eingesetzt. Bei keinem der Alkohole konnte eine Oxidationsreaktion zum korrespondierenden Keton gemessen werden. Da sich die Alkanone ihrerseits als schlechte Substrate für die KR erwiesen haben, wurde ferner untersucht, inwieweit das Enzym Alkohole oxidieren kann, deren zugehörige Ketone gut von der KR umgesetzt wurden. Jedoch zeigte die KR auch gegenüber den beispielhaft ausgewählten Alkoholen (*R,S*)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol und Ethyl-(*R,S*)-4-chlor-3-hydroxybutyrat nur Aktivitäten von 0,07 U mg<sup>-1</sup> beziehungsweise 0,15 U mg<sup>-1</sup>. Somit lagen die Geschwindigkeiten der Oxidationsreaktionen im Bereich von 1-2 % der Reduktionsreaktionen, wodurch sich die KR als ungeeignet für eine Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung erwies.

### 7.2 Änderung der Cofaktorspezifität

Die Analyse des Substratspektrums hatte gezeigt, dass die KR nur in Gegenwart von NADPH aktiv ist. Der Cofaktor NADH, der beträchtlich stabiler und günstiger ist als das phosphorylierte Molekül, wurde nicht akzeptiert. Da es ferner viermal mehr Regenerierungsenzyme für NADH als für NADPH gibt (Faber, 2004), war eine Änderung der Cofaktorspezifität für einen Einsatz in Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierungssystemen erstrebenswert.

Persson *et al.* (2003) beschreiben, dass die Cofaktorpräferenz innerhalb der Enzymfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) hauptsächlich von der Aminosäureposition am Ende des  $\beta$ 2-Stranges determiniert wird, die bei NADH-bindenden Enzymen von einem Aspartat oder Glutamat besetzt ist. Diese Schlüsselposition entspricht in dem

Modellenzym für die klassischen SDRs  $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase der Aminosäure 36 (Tabelle 3.8) (Persson *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 1994b).

Persson *et al.* (2003) postulierten für alle klassischen SDRs, dass die Einführung einer sauren Aminosäure an dieser Position alleine eine Änderung der Cofaktorspezifität von NADPH zu NADH bewirken sollte - unabhängig davon, ob sich eine basische Aminosäure (Arginin (R) oder Lysin (K)) im TGxxxGhG-Motiv befindet. Das Arginin im Motiv TGASRGIG der KR ist unter anderem an der NADPH-Bindung beteiligt.

Die analoge Aminosäure zur Position 36 der  $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase ist das Tyrosin an Position 39 in der KR, das mittels ortsgerichteter Mutagenese gegen Aspartat ausgetauscht wurde. Diese KR-Mutante zeigte zwar keine Enzymaktivität mit NADPH als Cofaktor, aber auch NADH wurde nicht akzeptiert. Folglich sind noch andere Aminosäuren wesentlich an der Diskriminierung zwischen NADH und NADPH beteiligt.

### 7.3 Fusion mit der D221G-Mutante der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae*

Die Fusion der KR an ein Enzym, das zur Reduktion von  $\text{NADP}^+$  geeignet ist, stellt eine Alternative zu den klassischen Methoden der Cofaktorregenerierung dar. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Fusion an die 44 kDa große D221G-Mutante der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* dargestellt. Alle Fusionsproteine wurden in *Escherichia coli* Tuner(DE3)-Zellen exprimiert. Soweit nicht anders angegeben wurde die KR-Aktivität mit Ethyl-4-chloracetoacetat als Substrat bestimmt.

#### 7.3.1 Aktivität der bifunktionellen Enzyme

Die Fusionierung der KR an das Regenerierungsenzym kann sowohl N- als auch C-terminal erfolgen. Es wurden beide möglichen Proteinchimären erstellt, wobei sich zwischen den Enzymen jeweils eine Verbindungssequenz von drei Aminosäuren befand. Da die von Gebhardt (2006) erstellte D221G-Mutante eine Leserahmenverschiebung im Bereich des Stopp-Codons aufwies, die den in 3'-Richtung liegenden  $\text{His}_6$ -Affinitätsanker zur Expression brachte, musste das Stopp-Codon hierbei nicht mutagenisiert, sondern die KR nur im richtigen Leserahmen angehängt werden. Bei dem Konstrukt mit der KR am N-Terminus wurde das Stopp-Codon durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt.

Während die Variante mit der KR am N- und der FDH am C-Terminus (KR-FDH) keinerlei FDH-Aktivität und nur sehr geringe Ketonreduktionsaktivität zeigte, waren bei dem Konstrukt

mit der anderen Orientierung (FDH-KR) beide Teile enzymatisch aktiv. Es konnte ein deutlicher Einfluss der Expressionstemperatur auf die Aktivität des FDH-KR-Fusionsproteins festgestellt werden. Bei einer Temperatur von 37 °C konnte nur bei dem KR-Anteil enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, während bei 20 °C beide Domänen der Chimäre funktionell aktiv waren. Jedoch aggregierten 83 % des exprimierten Proteins zu Einschlusskörpern. Bezogen auf die Biotrockenmasse bedingte das löslich exprimierte Fusionsprotein eine FDH-Aktivität von  $1,43 \pm 0,31 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und eine KR-Aktivität von  $101,30 \pm 20,33 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Von der Aktivität der D221G-Mutante ist bekannt, dass sie im Bereich von 10 % der Aktivität der Wildtyp-FDH liegt (Gebhardt, 2006). Für das Wildtypenzym aus *Mycobacterium vaccae* wurde eine Aktivität von  $10,0 \text{ U mg}^{-1}$  bei 30 °C publiziert (Tishkov und Popov, 2004). Im Folgenden wird daher von einer Aktivität von  $1 \text{ U mg}^{-1}$  für die D221G-Mutante ausgegangen.

**Tabelle 7.1:** Katalytische Eigenschaften des FDH-KR-Fusionsproteins

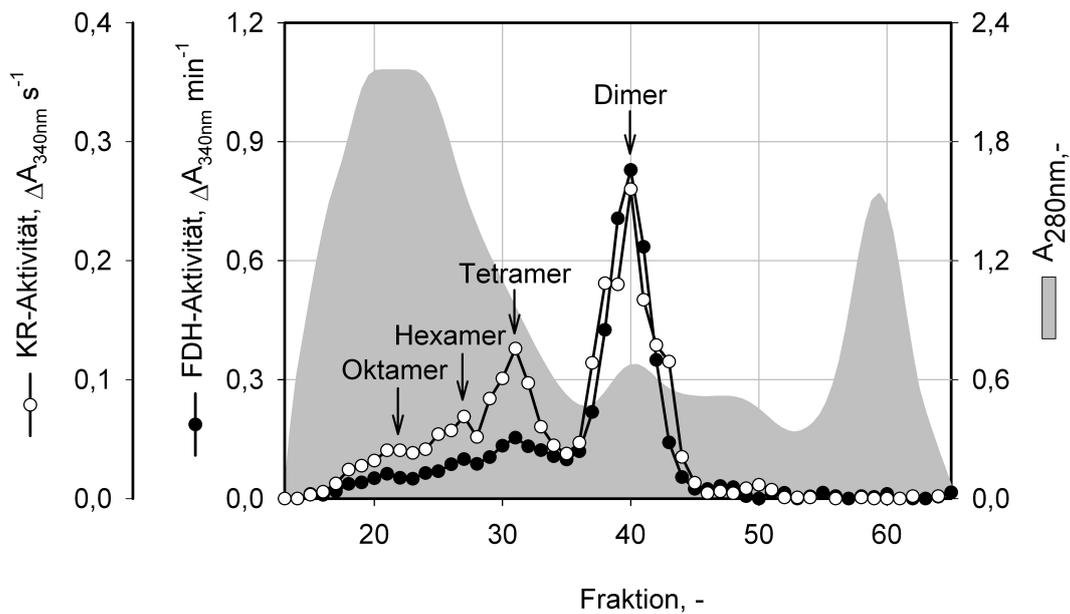
Proteinteil	Spez. Aktivität ( $\text{U mg}^{-1}$ )	Rel. Aktivität <sup>a</sup> (%)	$K_m$ (Substrat) (mM)	$K_m$ (Cofaktor) (mM)
FDH	$0,32 \pm 0,07$	32	$35,04 \pm 3,16$ (Formiat)	$0,15 \pm 0,02$ (NADP <sup>+</sup> )
KR	$39,00 \pm 2,29$	100	$19,23 \pm 2,88$ (Ethyl-4-chloracetoacetat)	$0,12 \pm 0,02$ (NADPH)

<sup>a</sup> Relative Aktivität im Vergleich zum unfusionierten Enzym. FDH:  $1 \text{ U mg}^{-1}$ , KR:  $38,29 \text{ U mg}^{-1}$

Tabelle 7.1 gibt eine Übersicht über die katalytischen Eigenschaften der FDH-KR-Proteinchimäre. Die kinetischen Parameter zeigen, dass die KR im Fusionsprotein 100 % der Aktivität des unfusionierten Enzyms entwickeln konnte. Die FDH hingegen erlitt einen deutlichen Aktivitätsverlust. Die spezifische Aktivität des FDH-Teils betrug nur 32 % der Aktivität des freien Enzyms, was auf Faltungsprobleme der FDH innerhalb des Fusionsproteins hindeutete.

### 7.3.2 Oligomerisierungsgrad

Da die FDH natürlicherweise als Dimer (Popov und Lamzin, 1994) und die KR als Tetramer vorliegt, könnte sich durch die Oligomerisierung beider Proteindomänen ein multimerer Proteinkomplex bilden. Inwieweit es zur Komplexbildung kommt, wurde mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie untersucht. Hierfür wurde der Aufschluss von FDH-KR exprimierenden *Escherichia coli* Tuner(DE3)-Zellen verwendet.



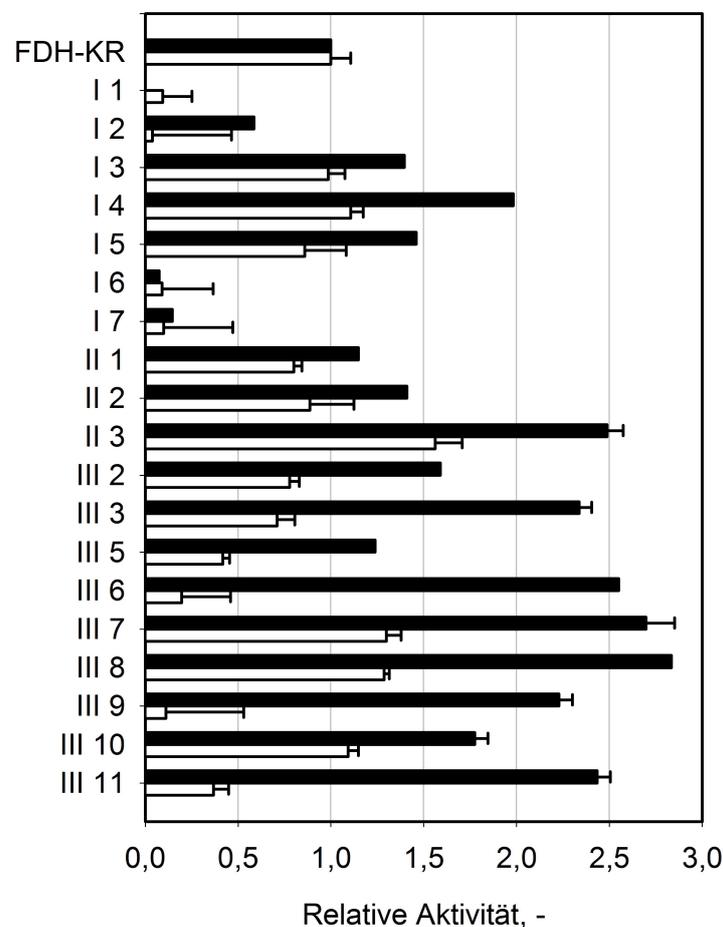
**Abbildung 7.1:** Oligomerisierungsgrad des Fusionsproteins. Dargestellt ist die Aktivität des KR-Anteils (●) sowie des FDH-Anteils (○) in Abhängigkeit von der Elutionsfraktion der Größenausschlusschromatographie. Darüber hinaus ist der Verlauf der UV-Absorption ( $A_{280}$ , ■) eingetragen. Die Kalibration der Säule erfolgte anhand von Standardproteinen: Thyroglobulin, 669 kDa; Ferritin, 440 kDa; Catalase, 232 kDa; Aldolase, 158 kDa; Rinderserumalbumin; 66 kDa.

Abbildung 7.1 zeigt, dass das Fusionsprotein bis zum Oktamer nachgewiesen werden konnte, was bei dem 70 kDa großen Monomer einem Molekulargewicht von 560 kDa entspricht. Da die Größenausschlusschromatographie die Proteine nicht unter Gleichgewichtsbedingungen analysiert und die KR die Tendenz besitzt, im Verlauf der Chromatographie vom Tetramer in Dimere zu dissoziieren, könnte es auch noch höhere Oligomere geben. Folglich kann aus den Daten auch kein Rückschluss auf den relativen Anteil der Oligomere gezogen werden.

### 7.3.3 Insertion verschiedener Verbindungssequenzen

Da der FDH-Teil des bifunktionellen Proteins FDH-KR nicht die volle Aktivität des unfusionierten Enzyms zeigte, wurde versucht, die beiden Proteine durch die Insertion verschiedener Verbindungssequenzen räumlich voneinander zu trennen. Hierfür wurden drei verschiedene Oligonukleotidpaare über die zwischen den Genen liegende EcoRI-Schnittstelle in das Plasmid inseriert. Durch die Verwendung einer einzelnen Restriktionsschnittstelle wurde eine Bibliothek an Proteinvarianten erstellt, da die Verbindungssequenzen in beiden möglichen Richtungen und auch in mehrfacher Anzahl in den Vektor ligiert werden konnten.

Die Verbindungssequenz I führte je nach Richtung ihres Einbaus zu alternierenden Alaninen und Glycinen oder zu Prolinen und Argininen, während die Verbindungssequenz III den Einbau einer starren Helix aus elf Prolinen oder einer flexiblen Verbindung aus elf Glycinen nach sich zog. Die Verbindungssequenz II entsprach von ihrer Zusammensetzung her der Sequenz I, wobei statt 15 nur 7 zusätzliche Aminosäuren pro eingebautem Oligonukleotid eingeführt wurden. In Abbildung 7.2 sind die Ergebnisse der Insertion der verschiedenen Oligonukleotidpaare in das FDH-KR-Konstrukt dargestellt. Alle Daten wurden auf die Aktivitäten der ursprünglichen FDH-KR-Variante normiert.



**Abbildung 7.2:** Ergebnisse der Insertion verschiedener Verbindungssequenzen in das FDH-KR-Fusionsprotein. Die KR- (□) und FDH-Aktivität (■) in *Escherichia coli* Tuner(DE3)-Zellen ist im Verhältnis zur Aktivität der Zellen dargestellt, in denen die unmodifizierte FDH-KR-Proteinchimäre exprimiert wurde. Die Aktivitäten wurden in Aufschlüssen von Zellsuspensionen mit der gleichen optischen Dichte ( $OD_{600} = 5$ ) gemessen.

Abbildung 7.2 zeigt, dass die Insertion von verschiedenen Verbindungssequenzen zu einigen Klonen geführt hat, die vor allem eine deutlich erhöhte FDH-Aktivität aufwiesen. Die Klone III 1 und III 4 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. In beiden Klonen war eine Kombination aus zwei Polyglycinsequenzen in das Fusionsprotein inseriert worden. Aufgrund der hohen Anzahl an hintereinander liegenden Glycinen gab es Probleme bei der Expression, wodurch die Proteinsynthese im Bereich der Linkersequenzen abbrach. Dies zeigte sich in deutlich sichtbaren Abbruchbanden in der SDS-PAGE, deren Molekulargewicht in etwa den 44 kDa des FDH-Teils entsprach (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Resultat wurde der vor der Verbindungssequenz liegende FDH-Teil unverhältnismäßig stark exprimiert, was zu einer sehr hohen FDH-Aktivität bei geringer KR-Aktivität führte.

Zur näheren Charakterisierung wurden die Klone ausgewählt, die sowohl eine erhöhte FDH- als auch eine verbesserte KR-Aktivität zeigten. Die Ergebnisse der Sequenzierung der isolierten Plasmide sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

**Tabelle 7.2:** Sequenzierungsergebnisse der Plasmide der besten Klone.

Klon	Sequenz	Variante
I 4	NSAGAGAGAGAGAGA	Verbindungssequenz I Alanin Glycin
II 3	NSRPRPRNSAGAGA	Verbindungssequenz II Prolin Arginin + Verbindungssequenz II Alanin Glycin
III 7	NSAGGGGGGGGGGGA	Verbindungssequenz III Glycin
III 8	NSAGGGGGGGGGGGA	Verbindungssequenz III Glycin
III 10	NSRPPPPPPPPPPR	Verbindungssequenz III Prolin

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass sehr unterschiedliche Verbindungssequenzen zu guten Varianten des Fusionsproteins geführt haben. Generell gilt jedoch, dass das kurze Oligonukleotidpaar II nur nach zweifachem Einbau mit den längeren Verbindungssequenzen I und III vergleichbar war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Länge der Verbindungssequenz einen wesentlichen Einfluss besaß. Dies wird von der Tatsache unterstützt, dass sowohl flexible Glycinsequenzen als auch starre Prolinhelices sehr gut zur Trennung der Proteindomänen geeignet waren.

Die Ergebnisse der Klone I 4, II 3, III 8 und III 10 wurden in einem unabhängigen Experiment reproduziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die FDH aufgrund der relativ niedrigen Enzymaktivität im Vergleich zur KR im Gesamtkonstrukt limitierend ist, wurde der Klon III 8, der die höchste FDH-Aktivität zeigte, als Variante für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die KR-Aktivität der Zellen des Klons III 8 war um 29 % höher als die Aktivität von Zellen mit der ursprünglichen FDH-KR-Proteinchimäre. Eine Analyse des Expressionslevels des Fusionsproteins III 8 ergab eine um 30 % höhere Konzentration an löslichem Protein im Vergleich zum ursprünglichen FDH-KR-Fusionsprotein. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die KR im ursprünglichen Fusionsprotein ohne Aktivitätsverlust an die FDH fusioniert wurde. Aufgrund des gesteigerten Anteils an löslich exprimiertem Enzym lag die KR-Aktivität des Klons III 8 bei  $130,68 \pm 26,23 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

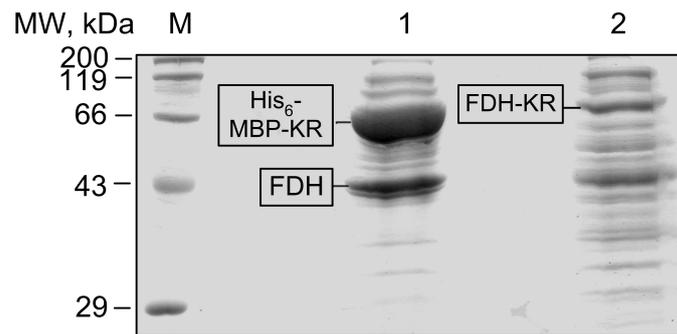
Bei der erhöhten FDH-Aktivität in Klon III 8 waren ebenfalls 30 % der beobachteten Steigerung auf den höheren Anteil an löslichem Fusionsprotein zurückzuführen. Die übrigen 153 % der Aktivitätssteigerung wurden durch eine katalytisch aktivere FDH-Domäne bedingt, die mit einer Enzymaktivität von  $0,81 \text{ U mg}^{-1}$  nur noch 19 % unterhalb der Enzymaktivität der unfusionierten D221G-Mutante von  $1 \text{ U mg}^{-1}$  lag. Bezogen auf die Biotrockenmasse lag die FDH-Aktivität des Klons III 8 bei  $4,05 \pm 0,87 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

Die Insertion von Linkersequenzen in die andere Variante des Fusionsproteins, das KR-FDH-Konstrukt, wurde ebenfalls untersucht. Hierbei führte der Einbau der Oligonukleotide I und III in einigen Fällen zu einem aktiven FDH-Teil. Die Enzymaktivität beider Proteindomänen blieb jedoch ausnahmslos unterhalb von 50 % der Aktivität des ursprünglichen FDH-KR-Klons ohne Insertion zusätzlicher Linkersequenzen (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### 7.3.4 Vergleich zwischen dem Fusionsprotein und getrennt exprimierten Enzymen

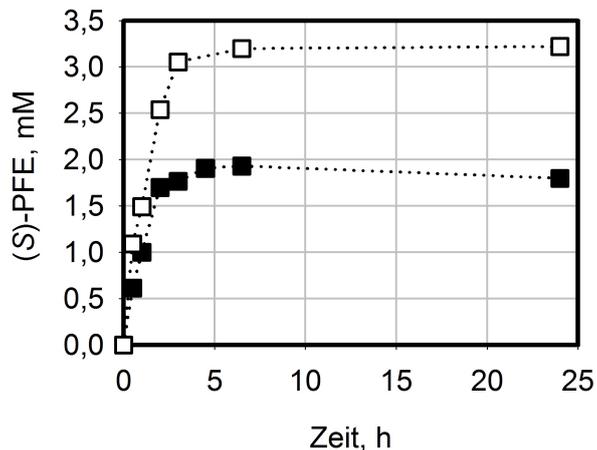
Das Fusionsprotein FDH-KR III 8 wurde mit den getrennt exprimierten Enzymen verglichen. Hierzu wurden *Escherichia coli* Tuner(DE3)-Zellen zum einen mit dem Plasmid des Klons FDH-KR III 8 und zum anderen mit den getrennten Plasmiden für die FDH und die KR transformiert. Damit die KR nicht membrangebunden in den Zellen vorlag, wurde das Enzym als His<sub>6</sub>-MBP-Fusionsprotein exprimiert. Die KR zeigt mit dem His<sub>6</sub>-MBP-Anker keinen Aktivitätsverlust bei der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat (Ergebnisse nicht gezeigt).

In Abbildung 7.3 ist das Ergebnis der Expression des Fusionsproteins sowie der getrennten Proteine zu sehen. Es wird sehr deutlich, dass das Fusionsprotein nur in geringen Mengen löslich exprimiert wurde, während die Expression der unabhängigen Enzyme erheblich stärker ausfiel. Die Proteinmenge des Fusionsprotein entsprach 31 % der Menge der getrennt exprimierten Enzyme, wenn der MBP-Teil unberücksichtigt bleibt.



**Abbildung 7.3:** SDS-PAGE (10 % Trenngel, Coomassie-Färbung) zum Vergleich der Expressionsstärken des Fusionsproteins und der getrennt exprimierten Enzyme. Bahnen: M: Roti<sup>®</sup>-Mark Standard; 1: Löslicher Überstand des Zellaufschlusses bei getrennt exprimierten Enzymen; 2: Löslicher Überstand des Zellaufschlusses bei Expression des Fusionsproteins FDH-KR III 8.

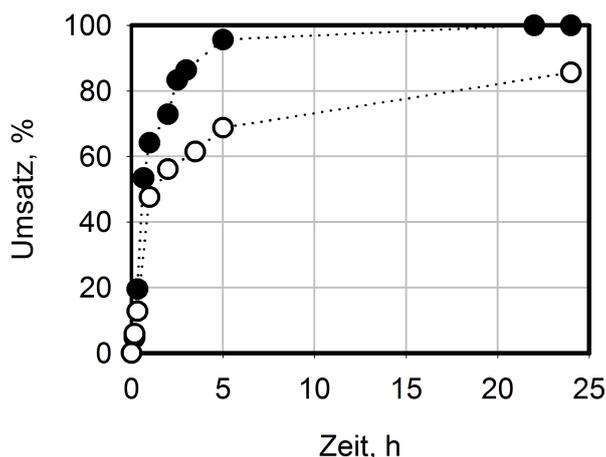
Obwohl die *Escherichia coli*-Zellen mit den getrennt exprimierten Enzymen einen wesentlich höheren Anteil an löslich exprimierten Zielproteinen besaßen, reduzierten die Zellen mit dem Fusionsprotein im Ganzzellansatz deutlich mehr 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zum korrespondierenden (S)-Alkohol in vergleichbarer Zeit. Die maximale Ketonreduktionsaktivität der *Escherichia coli*-Zellen mit dem Fusionsprotein war mit  $36 \text{ U}_{\text{gBTM}^{-1}}$  fast doppelt so hoch wie die Aktivität der Zellen, in denen die Enzyme getrennt vorlagen ( $20 \text{ U}_{\text{gBTM}^{-1}}$ ). Abbildung 7.4 zeigt die Verläufe der Umsetzungen über einen Zeitraum von 24 h.



**Abbildung 7.4:** Verlauf der Konzentration an (S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol ((S)-PFE) bei der Umsetzung von 150 mM 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon bei 30 °C mit ganzen Zellen, die das Fusionsprotein (□) oder getrennte Enzyme (■) exprimierten. Das Edukt lag aufgrund der niedrigen Löslichkeit (ca. 4 mM) als zweite Phase vor. Die Zellsuspensionen wurden auf eine optische Dichte  $\text{OD}_{600} = 3$  eingestellt. Für die Cofaktorregenerierung wurde 400 mM Formiat hinzugegeben. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

Es wurde 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat verwendet, da die FDH aus *Mycobacterium vaccae* durch Ethyl-4-chloracetoacetat inaktiviert wird. Der Grund hierfür liegt in der Interaktion des Substrats mit Cysteinresten im FDH-Molekül (Yamamoto *et al.*, 2005).

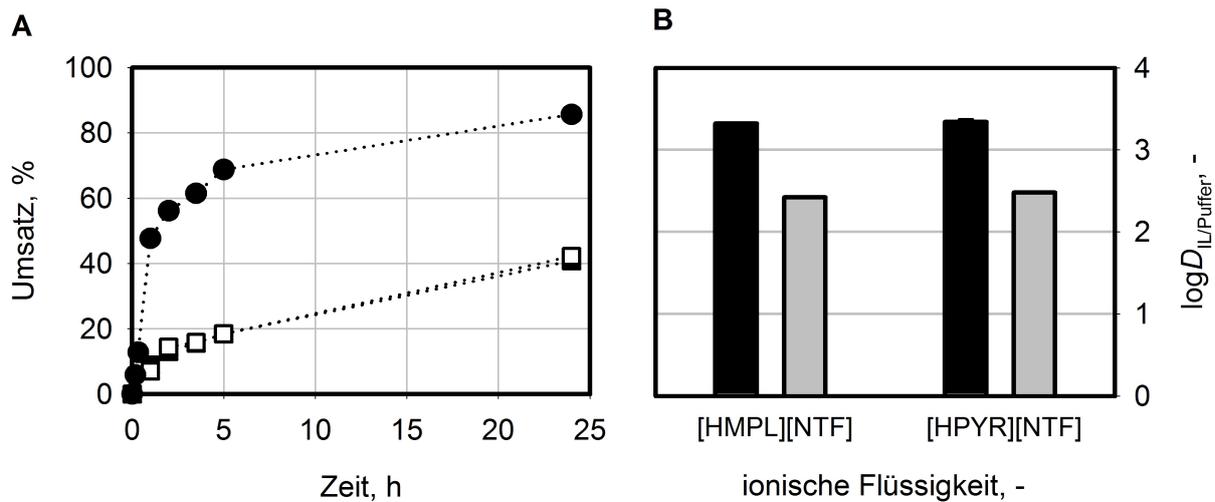
Da die in Abbildung 7.4 dargestellte Umsetzung bei einer geringen Biomassekonzentration von  $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  durchgeführt wurde, wurde das Fusionsprotein zusätzlich unter Prozessbedingungen bei Biomassekonzentrationen von 50 und  $100 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  im Ganzzellansatz untersucht.



**Abbildung 7.5:** Umsatz von  $150 \text{ mM}$  2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zu (S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol im Verlauf eines  $1,4 \text{ mL}$ -Satzverfahrens mit *Escherichia coli*-Zellen des Klons III 8 bei Biomassekonzentrationen von  $50$  (○) und  $100$  (●)  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Die Reaktion fand in  $500 \text{ mM}$  Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) bei Raumtemperatur statt. Für die Cofaktoregenerierung wurde  $1 \text{ M}$  Formiat hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei  $350 \text{ min}^{-1}$  durchmischt. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

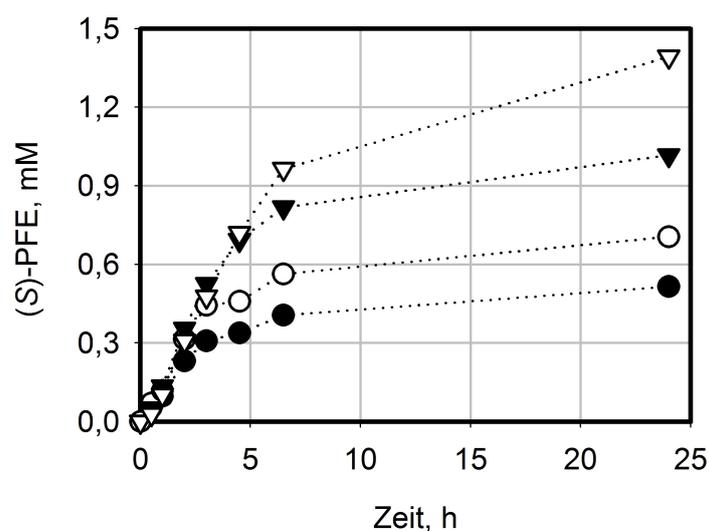
Abbildung 7.5 zeigt, dass die Zellen mit dem Fusionsprotein III 8 bei einer Biomassekonzentration von  $100 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  nach 5 h einen Umsatz von  $95,61 \%$  und nach 24 h einen Umsatz von  $99,97 \%$  erzielten. Der Enantiomerenüberschuss des (S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanols lag bei  $99,9 \%$ .

Die Verwendung eines Zweiphasensystems aus wässriger Phase und ionischer Flüssigkeit brachte bei der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon keine Verbesserung, wie Abbildung 7.6 A zeigt. Hierbei wurden die ionischen Flüssigkeiten [HPYR][NTF] und [HMPL][NTF] eingesetzt, die sich als geeignet für eine Verwendung mit der KR gezeigt hatten, da sie die Enzymstabilität nicht herabsetzten. Da der Verteilungskoeffizient  $\log D$  des Ketons bei beiden ionischen Flüssigkeiten im Bereich von  $3,3$  lag (Abbildung 7.6 B), war zu Beginn der Reaktion nur eine Eduktkonzentration von  $0,3\text{-}0,4 \text{ mM}$  2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon in der wässrigen Phase. Da die Halbsättigungskonzentration der KR bei  $5,7 \pm 0,9 \text{ mM}$  liegt, wirkte die Eduktkonzentration limitierend auf die Reaktionsgeschwindigkeit.



**Abbildung 7.6: A)** Umsatz von 150 mM 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zu (S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol im Verlauf eines 1,4 mL-Satzverfahrens mit *Escherichia coli*-Zellen des Klons III 8 bei Biomassekonzentrationen von 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> mit 20 % ionischer Flüssigkeit [HPYR][NTF] (□) oder [HMPL][NTF] (■) im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz (●). Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen. Die Reaktion fand in 500 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) bei Raumtemperatur statt. Für die Cofaktorregenerierung wurden 1 M Formiat hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei 350 min<sup>-1</sup> durchmischt. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe. **B)** Verteilungskoeffizienten logD von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon (■) und 1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol (□) zwischen den ionischen Flüssigkeiten und dem Umsetzungspuffer.

Neben dem Ganzzellansatz wurde das Fusionsprotein auch im zellfreien Ansatz mit den getrennt exprimierten Enzymen verglichen. Hierbei wurde der Zellaufschluss im Verhältnis 1:2,5 mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) verdünnt. In einem parallelen Ansatz wurde Polyethylenglykol 20.000 mit einer Endkonzentration von 4 % zu der Pufferlösung gegeben, um eine Diffusionslimitierung zu simulieren. Abbildung 7.7 zeigt, dass sich das Fusionsprotein im Ansatz ohne Polyethylenglykol ähnlich wie die getrennt exprimierten Enzyme verhielt, obwohl diese in größerer Menge vorlagen. Ab einer Reaktionszeit von 6 h war die durch das Fusionsprotein gebildete Konzentration an (S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol höher, was darauf hindeutet, dass das Fusionsprotein stabiler ist als zumindest eines der getrennt exprimierten Enzyme. Die Menge an (S)-Alkohol, die in Anwesenheit von 4 % Polyethylenglykol 20.000 gebildet wurde, war in beiden Fällen geringer als in der reinen Pufferlösung. Ähnlich wie beim Ganzzellansatz hob sich das Fusionsprotein hierbei schon zu einem früheren Zeitpunkt von den getrennt exprimierten Enzymen ab, da der Proximitätseffekt der Proteine bei einer stärkeren Diffusionslimitierung deutlicher zum Tragen kommt.



**Abbildung 7.7:** Verlauf der Konzentration an (S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol ((S)-PFE) bei der Umsetzung von 150 mM 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon bei 30°C mit Aufschlüssen von Zellen, die das Fusionsprotein (▽) oder getrennte Enzyme (▼) exprimierten. In einem zweiten Ansatz wurde zu dem Fusionsprotein (○) und den getrennten Enzymen (●) 4 % Polyethylenglykol 20.000 gegeben. Für die Cofaktorregenerierung wurden 400 mM Formiat und 1 mM NADP<sup>+</sup> zugegeben. Die Zellsuspensionen waren vor dem Aufschluss auf die gleiche optische Dichte (OD<sub>600</sub> = 3) eingestellt worden. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

## 7.4 Fusion mit der Glukose-6-phosphat-dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*

Um zu zeigen, dass die Konstruktion von Proteinchimären zwischen der KR und einem Regenerierungsenzym auch mit anderen Enzymen als der FDH aus *Mycobacterium vaccae* möglich ist, wurden Fusionsproteine mit der 52 kDa großen Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH) aus *Leuconostoc mesenteroides* am C- beziehungsweise N-Terminus erstellt. Hierfür wurde jeweils das Stopp-Codon des N-terminalen Enzyms durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt. Die G6PDH bildet natürlicherweise ebenfalls ein Dimer.

Während die KR im Konstrukt mit der G6PDH am C-Terminus (KR-G6PDH) keine Aktivität zeigte, waren im Fusionsprotein mit der G6PDH am N-Terminus (G6PDH-KR) beide Domänen enzymatisch aktiv. Die Proteine wurden dabei durch eine 8 Aminosäuren lange Verbindungssequenz voneinander getrennt, die sich durch die Klonierung ergab. Die G6PDH-KR-Proteinchimäre zeigte ebenfalls eine starke Tendenz zur Bildung von Einschlusskörpern. Nur 29 % des exprimierten Proteins lagen in löslicher Form vor.

Tabelle 7.3 gibt eine Übersicht über die katalytischen Eigenschaften des G6PDH-KR-Fusionsproteins. Für die G6PDH aus *Leuconostoc mesenteroides* wurde eine Aktivität von 715 U mg<sup>-1</sup> bei 25°C und NADP<sup>+</sup> als Cofaktor publiziert (Lee und Levy, 1992). Da es keine Vergleichswerte für 30°C gibt, wird im Folgenden von einer Mindestaktivität von 715 U mg<sup>-1</sup> ausgegangen.

**Tabelle 7.3:** Katalytische Eigenschaften des G6PDH-KR-Fusionsproteins

Proteinteil	Spez. Aktivität (U mg <sup>-1</sup> )	Rel. Aktivität <sup>a</sup> (%)	K <sub>m</sub> (Substrat) (mM)	K <sub>m</sub> (Cofaktor) (mM)
G6PDH	36,25	5	0,81 ± 0,09 (Glukose-6-phosphat)	0,47 ± 0,13 (NADP <sup>+</sup> )
KR	45,11 ± 4,60	100	38,14 ± 11,22 (Ethyl-4-chloracetoacetat)	0,84 ± 0,42 (NADPH)

<sup>a</sup> Relative Aktivität im Vergleich zum unfusionierten Enzym. G6PDH: 715 U mg<sup>-1</sup>, KR: 38,29 U mg<sup>-1</sup>

Die kinetischen Parameter des Fusionsproteins zeigen, dass die KR auch an die G6PDH ohne Aktivitätsverlust fusioniert werden konnte. Die G6PDH hingegen zeigte im bifunktionellen Protein nur 5 % der Aktivität des freien Enzyms. Da die G6PDH aus *Leuconostoc mesenteroides* mit 52 kDa noch größer ist als die 44 kDa große FDH aus *Mycobacterium vaccae*, könnte sich hier ebenfalls ein größerer Abstand zwischen den Proteindomänen positiv auf die Enzymaktivität auswirken.

## 7.5 Diskussion

Die KR erwies sich als ungeeignet für eine Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung, da die untersuchten Alkohole entweder nicht oder nur sehr langsam umgesetzt wurden. Yamamoto *et al.* (2003) zeigten für die homologen Proteine aus *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* ebenfalls, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidationsreaktion von Ethyl-(*R,S*)-4-chlor-3-hydroxybutyrat zu Ethyl-4-chloracetoacetat nur im Bereich von 1 % der korrespondierenden Reduktionsreaktion liegt.

Persson *et al.* (2003) postulierten, dass die Einführung einer sauren Aminosäure an Position 39 der KR alleine eine Änderung der Cofaktorspezifität von NADPH zu NADH bewirken sollte. Die KR war jedoch nach der Mutation des Tyrosins, das sich an dieser Position befindet, in ein Aspartat weder mit NADH noch mit NADPH als Cofaktor aktiv. Leblanc *et al.*

(1998) zeigten, dass die gleiche Mutation im Enzym PTR1, das auch zu den Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktasen zählt, ebenfalls zum völligen Aktivitätsverlust führte und bestätigten somit die Annahme, dass noch weitere Aminosäurepositionen an der Diskriminierung zwischen NADH und NADPH beteiligt sind.

Die KR konnte ohne jeglichen Aktivitätsverlust C-terminal an die FDH aus *Mycobacterium vaccae* und die G6PDH aus *Leuconostoc mesenteroides* fusioniert werden. Die Regenerierungsenzyme erlitten jedoch durch die Fusionierung einen Aktivitätsverlust von 68 % (FDH) beziehungsweise 95 % (G6PDH), der im Falle der FDH durch die Einführung einer längeren Verbindungssequenz zwischen den Proteindomänen auf 19 % abgemildert werden konnte. In beiden Konstrukten mit der KR am N-Terminus zeigte eines der beiden Enzyme keine Aktivität. Dieses Ergebnisse verdeutlichen, dass die Orientierung der Enzyme innerhalb des Fusionsproteins von großer Bedeutung ist.

Verglichen mit den freien Enzymen waren die Halbsättigungskonzentrationen der Fusionsproteine um Faktor 2 bis 10 erhöht (Olive *et al.*, 1971; Galkin *et al.*, 1995). Eine Ausnahme stellte der  $K_m$  für NADPH der KR im FDH-KR-Konstrukt dar. Die Halbsättigungskonzentration lag mit  $0,12 \pm 0,02$  mM unter derjenigen des freien Enzyms von  $0,40 \pm 0,03$  mM. Da cyanobakterielle KRs das Acyl Carrier Protein aus *Escherichia coli* binden können (Stapleton und Jaworski, 1984), das sich positiv auf die Affinität der KR zu NADPH auswirkt (Karmodiya und Surolia, 2006), kann die Halbsättigungskonzentration der KR im Ganzzellbiokatalysator geringer sein als die des isolierten Enzyms.

Bei der Umsetzung von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon durch das Fusionsprotein im Vergleich zu den getrennt exprimierten Enzymen hatte sich gezeigt, dass der Vorteil des Fusionsproteins mit einer steigenden Diffusionslimitierung im Reaktionssystem zunahm und im Ganzzellansatz am größten war. Die spezifische Aktivität von *Escherichia coli*-Zellen, die das Fusionsprotein FDH-KR III 8 exprimierten, war mit  $36 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  fast doppelt so hoch wie die Aktivität der Zellen, in denen die Enzyme getrennt vorlagen ( $20 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ). Dieser Zusammenhang wurde auch von Prachayasittikul *et al.* (2006) für eine Proteinchimäre aus der Galaktosedehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens*, die für die Regenerierung von NADH eingesetzt wurde, und der Laktatdehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* beobachtet. Die Einführung einer Diffusionslimitierung durch Zugabe von 20 % Polyethylenglykol 20.000 führte zu einer fünffach höheren Produktion von Laktat im Vergleich zu den getrennt vorliegenden Enzymen, während die Enzyme im reinen Puffersystem annähernd gleiche Aktivitäten zeigten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Fusionsproteine eine elegante Methode darstellen, die Effekte des intrazellulären „*Macromolecular Crowdings*“ zu umgehen. Bei der Untersuchung des Fusionsproteins FDH-KR III 8 im Ganzzellansatz unter Prozessbe-

dingungen (150 mM 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon) konnte gezeigt werden, dass *Escherichia coli*-Zellen in einer Biomassekonzentration von 100 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> innerhalb von 24 h einen Umsatz von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol von 99,97 % erzielten. Der Enantiomerenüberschuss des (*S*)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)-ethanols lag bei 99,9 %. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Fusionsprotein im Rahmen einer technischen Anwendung für die asymmetrische Synthese chiraler Alkohole geeignet ist.

## 8 Zusammenfassung

Chirale Alkohole können durch den Einsatz von Enzymen unter milden Reaktionsbedingungen in effizienter Weise erzeugt werden. Die Entdeckung einer neuen Oxidoreduktase in Cyanobakterien, die halogenierte und auch mehrfach fluorierte Ketone mit hoher Enantioselektivität zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert, eröffnet einen neuen Zugang zu wichtigen chiralen Synthesebausteinen. Da die industrielle Verfügbarkeit von phototrophen Mikroorganismen aufgrund der benötigten Photobioreaktoren heute und auch in absehbarer Zukunft begrenzt ist, stellen Oxidoreduktasen aus Cyanobakterien interessante Enzyme für den rekombinanten Einsatz in einem industriellen Plattformorganismus wie *Escherichia coli* dar. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die 3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (KR) aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7942 für die asymmetrische Synthese chiraler Alkohole rekombinant verfügbar zu machen und kinetisch zu charakterisieren. Ausgehend davon sollte in anderen Cyanobakterien nach natürlichen Varianten des Enzyms mit veränderten katalytischen Eigenschaften gesucht werden. Abschließend sollten auch Möglichkeiten zur *in situ*-Cofaktorregenerierung für den Einsatz in Kombination mit der KR identifiziert werden.

Die KR konnte sehr effizient durch heterologe Expression in *Escherichia coli* Tuner(DE3) in Fusion mit einem doppelten Affinitätsanker aus Hexahistidin ( $\text{His}_6$ ) und Maltose-bindendem Protein (MBP) hergestellt werden. Nach einer affinitätschromatographischen Reinigung, in deren Verlauf der  $\text{His}_6$ -MBP-Teil proteolytisch abgespalten wurde, konnte das Enzym mit einer Reinheit über 99,8 % und einer Ausbeute von 3,9 - 6,0 mg  $\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erhalten werden.

Eine Analyse der Proteinsequenz, die 249 Aminosäuren umfasst, ergab, dass die KR die Sequenzmotive der klassischen Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen aufweist. Dadurch gelang die Identifizierung der katalytischen Tetrade, die sich aus Asparagin 117, Serin 145, Tyrosin 158 und Lysin 162 zusammensetzt. Durch eine Homologiemodellierung anhand der Kristallstrukturen der Proteine aus *Brassica napus* (Raps) und *Bacillus anthracis* konnte gezeigt werden, dass die KR die für Dinukleotid-bindende Enzyme typische Rossmann-Faltung mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt aus 7  $\beta$ -Strängen besitzt. Die Untersuchung der Quartärstruktur der KR ergab, dass es sich wie bei allen bekannten homologen Enzymen um ein Homotetramer handelt.

Die KR zeigte bei der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon ein Temperaturoptimum von 44 °C und ein breites pH-Optimum zwischen pH 7 und 9. Unter den bestmöglichen Bedingungen (44 °C, pH 8,0, Tricin-Puffer) wurde das Keton mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von  $8,57 \pm 0,49 \text{ U mg}^{-1}$  ( $34 - 51 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) und einem Enantiomerenüberschuss von  $> 99,8 \%$  zum korrespondierenden (S)-Alkohol umgesetzt.

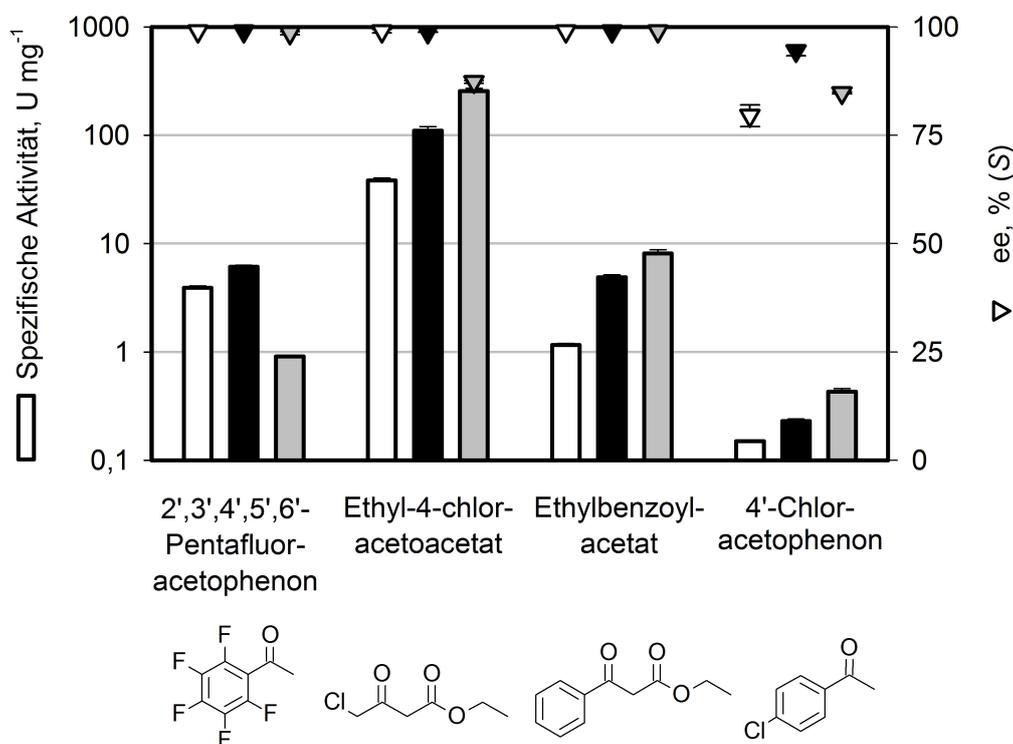
Im Vergleich zur Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH), die ein Beispiel für eine industriell angewendete Oxidoreduktase darstellt, besaß die KR eine wesentlich höhere Temperatur- und pH-Stabilität. Bei einer Temperatur von 40 °C betrug die Halbwertszeit der KR beispielsweise 17,3 h, während die LB-ADH bereits nach 0,4 h nur noch die Hälfte der enzymatischen Aktivität zeigte.

Bei der Analyse des Substratspektrums der KR wurden insgesamt 20 verschiedene Ketone unter Standardbedingungen (30 °C, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0) untersucht. Darunter befanden sich Acetophenon und Acetophenonderivate, verschiedene  $\beta$ -Ketoester sowie Alkanone und Alkanonderivate. Die KR war vor allem für die Reduktion halogenierter und sterisch anspruchsvoller Substrate geeignet, während unhalogenierte Alkanone schlecht umgesetzt wurden. Die höchste bestimmte Enzymaktivität betrug  $38,29 \text{ U mg}^{-1}$  ( $153 - 230 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) mit dem  $\beta$ -Ketoester Ethyl-4-chloracetoacetat, der mit einem Enantiomerenüberschuss von  $99,8 \pm 0,4 \%$  zum (S)-Alkohol reduziert wurde. Insgesamt erzielte die KR bei der Umsetzung von sieben Ketonen einen exzellenten Enantiomerenüberschuss von  $\geq 99,0 \%$ .

Ein Vergleich der Substratspektren der KR und der LB-ADH zeigt, dass die KR gerade bei den Substraten gesteigerte Enzymaktivitäten aufwies, die von der LB-ADH bedeutend schlechter umgesetzt werden als das Referenzsubstrat Acetophenon. Obwohl die LB-ADH mit einer spezifischen Aktivität von  $490 \text{ U mg}^{-1}$ , die mit Acetophenon erreicht wird, eine wesentlich höhere Grundaktivität als die KR hat, die Acetophenon mit  $0,13 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$  reduziert, setzte die KR das perfluorierte Substrat 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon unter Standardbedingungen siebenmal schneller um ( $3,93 \pm 0,14 \text{ U mg}^{-1}$  versus  $0,56 \pm 0,08 \text{ U mg}^{-1}$ ). Dabei wurde zudem ein signifikant höherer Enantiomerenüberschuss erzielt ( $> 99,8 \%$  (S) versus  $43,3 \%$  (S)). Diese Daten zeigen, dass die KR für die Reduktion von Carbonylverbindungen geeignet ist, die von gebräuchlichen Oxidoreduktasen wie der LB-ADH nicht oder nur schlecht akzeptiert werden. Somit könnte die KR dazu beitragen, die Lücken in der Landschaft der biokatalytischen Herstellung chiraler Alkohole zu füllen, die es aufgrund des Fehlens geeigneter Biokatalysatoren gibt.

Bei der Suche nach natürlichen Varianten der KR, die andere katalytische Eigenschaften als das Enzym aus *Synechococcus* PCC 7942 aufweisen, wurden 15 weitere Cyanobakterien kultiviert, ihre DNA isoliert und das für die KR codierende Gen kloniert. Die heterolog in

*Escherichia coli* exprimierten und gereinigten Enzyme wurden unter Standardbedingungen (30 °C, pH 7,0, 0,1 M Phosphatpuffer) hinsichtlich der Reduktion von vier Modellsubstraten verglichen. Um eine möglichst hohe biologische Diversität abzudecken, wurden dabei Cyanobakterien aus verschiedenen taxonomischen Ordnungen und Habitaten ausgewählt. Neben Süßwasser-Cyanobakterien wurden auch Salz- und Brackwasser-Stämme, sowie ein terrestrisches und ein thermophiles Cyanobakterium untersucht. Bei der KR aus dem thermophilen Stamm wurde neben der Enzymaktivität bei 30 °C auch die Reaktionsgeschwindigkeit beim Temperaturoptimum des Enzyms von 50 °C bestimmt. Abbildung 8.1 zeigt einen Vergleich der KR, die bei Reduktion der vier Modellsubstrate besonders gute Ergebnisse gezeigt hatten. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme aus *Synechococcus* RCC 307 und *Cyanothece* PCC 8801 lagen bei allen Substraten unter den höchsten drei Werten.



**Abbildung 8.1:** Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten und erzielten Enantiomerenüberschüsse (ee) der Enzyme aus *Synechococcus* PCC 7942 (□), *Synechococcus* RCC 307 (■) und *Cyanothece* PCC 8801 (▣).

Die KR aus *Synechococcus* RCC 307 zeigte gegenüber allen vier Modellsubstraten eine höhere Aktivität als das Ausgangsenzym bei gleicher oder besserer Enantioselektivität. Das Substrat Ethyl-4-chloracetoacetat wurde am schnellsten umgesetzt. Hierbei konnte mit einer spezifischen Enzymaktivität von  $110,07 \pm 9,83 \text{ U mg}^{-1}$  eine um 188 % gesteigerte Re-

aktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur KR aus *Synechococcus* PCC 7942 bei ähnlicher Enantioselektivität ( $99,8 \pm 0,4 \% (S)$  versus  $98,8 \pm 0,1 \% (S)$ ) gemessen werden. Unter Berücksichtigung des intrazellulären Expressionslevels beider Enzyme in *Escherichia coli* entspricht dies einer Steigerung der auf die Biotrockenmasse bezogenen Enzymaktivität von  $153 - 230 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf  $381 - 572 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Die KR aus *Cyanothece* PCC 8801 besaß mit Abstand die höchste Aktivität gegenüber Ethyl-4-chloracetoacetat ( $256,10 \pm 15,49 \text{ U mg}^{-1}$ ), Ethylbenzoylacetat ( $8,12 \pm 0,70 \text{ U mg}^{-1}$ ) und 4'-Chloracetophenon ( $0,43 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$ ), jedoch war die Aktivität gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon und die Enantioselektivität bei drei der vier Substrate geringer als bei dem Enzym aus *Synechococcus* RCC 307. Durch Sequenzvergleiche ist es gelungen, Aminosäuren zu identifizieren, die für Unterschiede in der Enantioselektivität und der Aktivität gegenüber 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon verantwortlich sein könnten.

Bei der Untersuchung verschiedener Cofaktorregenerierungsmethoden für die KR konnte gezeigt werden, dass eine Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit diesem Enzym nicht durchführbar ist, da Oxidationsreaktionen nur mit sehr geringer Aktivität katalysiert werden.

Die Fusion der KR an ein Enzym, das zur Reduktion von  $\text{NADP}^+$  geeignet ist, stellt eine neue Form der Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung dar. Die KR konnte ohne jeglichen Aktivitätsverlust C-terminal an eine  $\text{NADP}^+$ -akzeptierende Mutante der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* und an die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH) aus *Leuconostoc mesenteroides* fusioniert werden. Beide Regenerierungsenzyme erlitten durch die Fusionierung einen deutlichen Aktivitätsverlust, der im Falle der FDH durch die Einführung einer längeren Verbindungssequenz zwischen den Proteindomänen von 68 % auf 19 % abgemildert werden konnte. In beiden Konstrukten mit der KR am N-Terminus zeigte eines der beiden Enzyme im Fusionskonstrukt keine Aktivität.

Bei der Umsetzung von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon durch das bifunktionelle Protein FDH-KR im Vergleich zu den getrennt exprimierten Enzymen hatte sich gezeigt, dass der Vorteil, der durch die Proximität der aktiven Zentren im Fusionsprotein bewirkt wurde, mit einer steigenden Diffusionslimitierung im Reaktionssystem zunahm und im Ganzzellansatz am größten war. Die spezifische Aktivität von *Escherichia coli*-Zellen, die das FDH-KR-Fusionsprotein exprimierten, war mit  $36 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  fast doppelt so hoch wie die Aktivität der Zellen, in denen die Enzyme getrennt exprimiert wurden ( $20 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ), obwohl darin 69 % mehr löslich exprimiertes Protein (FDH + KR) vorlag.

Bei der Untersuchung des Fusionsproteins FDH-KR im Ganzzellansatz unter Prozessbedingungen konnte gezeigt werden, dass die *Escherichia coli*-Zellen bei einer Biomassekonzentration von  $100 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  in einem Zeitraum von 24 h einen Umsatz von 99,97 % von 150 mM

---

2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol erzielten. Der Enantiomerenüberschuss des (*S*)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanols lag bei 99,9 %. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Fusionsprotein im Rahmen einer technischen Anwendung für die asymmetrische Synthese chiraler Alkohole geeignet ist.

## 9 Ausblick

Die Analyse des Substratspektrums der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 hatte gezeigt, dass vor allem halogenierte und sterisch anspruchsvolle Ketone schnell und enantioselektiv umgesetzt werden. Eine weitergehende Spezifizierung der akzeptierten Substrate wäre von Interesse. Ausgehend von dem größten untersuchten Substrat Ethylbenzoylacetat könnte beispielsweise bestimmt werden, bis zu welchem sterischen Anspruch Ketone von der KR als Substrat akzeptiert werden.

Da die in dieser Arbeit untersuchten cyanobakteriellen Koreduktasen unter Standardbedingungen miteinander verglichen wurden, wäre eine Gegenüberstellung der besten Enzyme unter optimierten Bedingungen sinnvoll. Vor allem in Anbetracht der hohen Temperatur- und pH-Stabilität des Ausgangsenzyms aus *Synechococcus* PCC 7942, wären auch Stabilitätsdaten für die Enzyme aus *Cyanothece* PCC 8801 und *Synechococcus* RCC 307 wichtig für die Entscheidung, welches Enzym besser für einen industriellen Einsatz geeignet ist.

Die Aminosäurepositionen, die als Aktivitäts- oder Selektivitäts-bestimmend identifiziert wurden, könnten die Basis für ein rationales Proteindesign darstellen, wodurch beispielsweise die geringere Enantioselektivität des Enzyms aus *Cyanothece* PCC 8801 verbessert werden könnte. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann die Suche nach natürlichen Enzymvarianten der KR mit guten katalytischen Eigenschaften effizienter gestaltet werden. Da es bereits heute mehr als 50 sequenzierte Cyanobakterienstämme gibt, deren KR eine Sequenzähnlichkeit von über 70 % zu der KR aus *Synechococcus* PCC 7942 aufweist (BLAST-Search, Stand Juli 2009), ist das Potential der Cyanobakterien noch lange nicht ausgeschöpft.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Erstellung bifunktioneller Enzyme, die aus einem Synthese- und einem Cofaktorregenerierungsenzym bestehen, sehr vorteilhaft für die Cofaktorregenerierung im Ganzzellansatz sein kann. Ein wesentliches Problem hierbei ist die Bildung von Einschlusskörpern, die den funktionellen Anteil der Fusionsproteine einschränken. Durch eine Verbesserung der löslichen Expression der Fusionsproteine, könnte der Vorteil gegenüber getrennt exprimierten Enzymen um ein Vielfaches erhöht werden.

## Literaturverzeichnis

- Adams, M. W. (1993). Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees C. *Annu Rev Microbiol*, 47:627–658.
- Aiba, S. (1982). Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv. Biochem. Eng.*, 23:85–156.
- Alberghina, L. (2000). *Protein Engineering in Industrial Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton.
- Allen, M. (1968). Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol*, 4:1–4.
- Altenbach-Rehm, J., Nell, C., Arnold, M., Weuster-Botz, D. (1999). Parallel bubble columns with fed-batch technique for microbial process development on a small scale. *Chem. Eng. Technol.*, 22:1051–1058.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59(1):143–169.
- Amidjojo, M. (2004). Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Synthese von chiralen Alkoholen mit *Lactobacillus kefir*. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Ananyev, G., Nguyen, T., Kagawa, M., Dasgupta, J., Wydrzynski, T., Dismukes, G. (2004). Extreme oxygenic phototrophs from volcanic lakes and limestone rocks: A role for carbonate in PS II function. Internetpublikation, <http://www.princeton.edu/~catalase/Research>.
- Andersson, E., Hahn-Hägerdal, B. (1990). Bioconversions in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb Technol*, 12(4):242–254.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 48(1):1–13.
- Arnold, F. H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409(6817):253–257.
- Bar, R. (1986). Phase toxicity in multiphase biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 4(7):167–167.
- Barber, J., Andersson, B. (1992). Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci*, 17(2):61–66.
- Barrios-Llerena, M. E., Chong, P. K., Gan, C. S., Snijders, A. P. L., Reardon, K. F., Wright, P. C. (2006). Shotgun proteomics of cyanobacteria - applications of experimental and data-mining techniques. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(2):121–132.

- Barton, J. W., Kuritz, T., O'Connor, L., Ma, C., Maskarinec, M., Davison, B. (2004). Reductive transformation of methyl parathion by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65:330–335.
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2007). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag.
- Belkin, S., Mehlhorn, R. J., Packer, L. (1987). Proton gradients in intact cyanobacteria. *Plant Physiol*, 84:25–30.
- Bertau, M. (2002). Novel developments in biocatalytic organic chemistry. *Current Organic Chemistry*, 6:987–1014.
- Bhardwaj, N., Stahelin, R. V., Langlois, R. E., Cho, W., Lu, H. (2006). Structural bioinformatics prediction of membrane-binding proteins. *J Mol Biol*, 359(2):486–495.
- Bisswanger, H. (2000). *Enzymkinetik*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Blaser, H., Spindler, F., Studer, M. (2001). Enantioselective catalysis in fine chemicals production. *Applied Catalysis A: General*, 221:119–143.
- Bommarius, A., Riebel, B. (2004). *Biocatalysis*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bommarius, A., Schwarm, M., Drauz, K. (1998). Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals - examples and perspectives. *J Mol Catal B Enzym*, 5:1–11.
- Bornscheuer, U. T., Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol*, 5(2):137–143.
- Borodin, V., Rao, K., Hall, D. (2002). Manifestation of behavioural and physiological functions of *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 in a photobioreactor. *Mar Biol*, 140:455–463.
- Boucaud, J., Billard, J. (1985). Nitrogen nutrition in the estuarine zone: the case of *Suaeda maritima* var. *macrocarpa*. *Vegetatio*, 62:303–308.
- Brand, L., Sunda, W., Guillard, R. (1986). Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96:225–250.
- Bräutigam, S. (2008). Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten mit rekombinanten *Escherichia coli*. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Bräutigam, S., Bringer-Meyer, S., Weuster-Botz, D. (2007). Asymmetric whole cell biotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant *Escherichia coli* with intracellular cofactor regeneration. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18:1883–1887.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Stürmer, R., Zelinski, T. (2004). Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43(7):788–824.
- Brown, A. P., Affleck, V., Fawcett, T., Slabas, A. R. (2006). Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 57(7):1563–1571.

- Bryant, D., Cohen-Bazire, G., Glazer, A. (1981). Characterization of the biliproteins of *Gloeobacter violaceus* chromophore content of a cyanobacterial phycoerythrin carrying phycourobilin chromophore. *Archives of Microbiology*, 129:190–198.
- Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. (2005). *Biocatalysts and enzyme technology*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Buchner, J., Rudolph, R. (1991). Routes to active proteins from transformed microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2(4):532–538.
- Bull, A. T., Goodfellow, M., Slater, J. H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol*, 46:219–252.
- Bülow, L., Mosbach, K. (1991). Multienzyme systems obtained by gene fusion. *Trends Biotechnol*, 9(7):226–231.
- Burja, A. M., Abou-Mansour, E., Banaigs, B., Payri, C., Burgess, J. G., Wright, P. C. (2002). Culture of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (*Oscillatoriaceae*), for bioprocess intensified production of cyclic and linear lipopeptides. *J Microbiol Methods*, 48(2-3):207–219.
- Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I., Schomburg, D. (2009). BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue):D588–D592.
- Chenault, H. K., Whitesides, G. M. (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol*, 14(2):147–197.
- Chênevert, R., Fortier, G., Rhlid., R. (1992). Asymmetric synthesis of both enantiomers of fluoxetine via microbial reduction of ethyl benzoylacetate. *Tetrahedron*, 48:6769–6776.
- Chisholm, S., Frankel, S., Goericke, R., Olson, R., Palenik, B., Waterbury, J., West-Johnsrud, L., Zettler., E. (1992). *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Archives of Microbiology*, 157:297–300.
- Clausen, I. (1997). Aspects in lipase screening. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3:139–146.
- Cleland, W. (1963a). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim Biophys Acta*, 67:104–137.
- Cleland, W. (1963b). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory. *Biochim Biophys Acta*, 67:173–187.
- Cleland, W. (1963c). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim Biophys Acta*, 67:188–196.
- Cleland, W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3:480–482.

- Cohen, N., Eichel, W. F., Lopresti, R. J., Neukom, C., Saucy, G. (1976). Synthetic studies on (2R,4'R,8'R)-alpha-tocopherol. an approach utilizing side chain synthons of microbiological origin. *J Org Chem*, 41(22):3505–3511.
- Cohen, Y., Gurevitz, M. (2006). *The Cyanobacteria - Ecology, Physiology and Molecular Genetics. In: The Prokaryotes, Vol. 4, Bacteria Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer-Verlag, Berlin.
- Conrado, R. J., Varner, J. D., DeLisa, M. P. (2008). Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy. *Curr Opin Biotechnol*, 19(5):492–499.
- Cornet, J., Dussap, C., Gros, J., Binois, C., Lasseur, C. (1995). A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chem Eng Sci*, 50:1489–1500.
- Costas, A. M., White, A. K., Metcalf, W. W. (2001). Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J Biol Chem*, 276(20):17429–17436.
- Courtois, S., Cappellano, C. M., Ball, M., Francou, F.-X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S. J., Hopke, J., Osburne, M. S., August, P. R., Nalin, R., Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., Pernodet, J.-L. (2003). Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol*, 69(1):49–55.
- Cousins, C. L. (1976). Principles of enzymology. *Clin Biochem*, 9(3):160–164.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14):5074–5078.
- Cull, S. G., Holbrey, J. D., Vargas-Mora, V., Seddon, K. R., Lye, G. J. (2000). Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol Bioeng*, 69(2):227–233.
- Dallas-Yang, Q., Jiang, G., Sladek., F. (1998). Avoiding false positives in colony PCR. *Bio-Techniques*, 24:580–582.
- Daniel, R. (1996). The upper limits of enzyme thermal stability. *Enzyme Microb Technol*, 19:74–79.
- Danson, M. J., Hough, D. W., Russell, R. J., Taylor, G. L., Pearl, L. (1996). Enzyme thermostability and thermoactivity. *Protein Eng*, 9(8):629–630.
- Demirjian, D., Shah, P., Moris-Varas, F. (1999). Screening for novel enzymes. *Top. Curr. Chem.*, 200:1–29.
- Dodds, W., Gudder, D., Mollenhauer, D. (1995). The ecology of *Nostoc*. *J Phycol*, 31:2–18.
- Doyon, J., Jain, A. (1999). The pattern of fluorine substitution affects binding affinity in a small library of fluoroaromatic inhibitors for carbonic anhydrase. *Org. Lett.*, 1(2):183–185.

- Duetz, W. A., van Beilen, J. B., Witholt, B. (2001). Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 12(4):419–425.
- Dyer, D. L., Gafford, R. D. (1961). Some characteristics of a thermophilic blue-green alga. *Science*, 134:616–617.
- Earle, M., Seddon, K. (2000). Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.*, 72:1391–1398.
- Ellis, R. J. (2001a). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, 11(1):114–119.
- Ellis, R. J. (2001b). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, 26(10):597–604.
- Engelking, H. (2004). Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern mit rekombinanten Hefen. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Faber, K. (2004). *Biotransformations in Organic Chemistry, 5. Auflage*. Springer Verlag, Berlin.
- Fairbanks, G., Steck, T., Wallach, D. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10:2606–2617.
- Fan, Q., Chen, Y., Chen, X., Jiang, D., Xia, F., Chan, A. (2000). Highly effective and recyclable dendritic BINAP ligands for asymmetric hydrogenation. *Chem Commun*, 2000:789–790.
- Filho, M. V. (2007). Enantioselective reduction of hydrophobic keto compounds in multiphase bioreactor. *Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften / Life Sciences*, 34.
- Filho, M. V., Stillger, T., Müller, M., Liese, A., Wandrey, C. (2003). Is log  $P$  a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions? *Angewandte Chemie International Edition*, 42:2993–2996.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, 277(28):25677–25684.
- Fischer, U. (1989). *Enzymatic steps and dissimilatory sulfur metabolism by whole cells of anoxyphotobacteria*. In E. S. Sazman, and W. J. Cooper: *Biogenic sulfur in the environment*. American Chemical Society, Washington.
- Fisher, M., Kroon, J. T., Martindale, W., Stuitje, A. R., Slabas, A. R., Rafferty, J. B. (2000). The X-ray structure of *Brassica napus*  $\beta$ -keto acyl carrier protein reductase and its implications for substrate binding and catalysis. *Structure*, 8(4):339–347.
- Fling, S. P., Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, 155(1):83–88.

- Folea, I. M., Zhang, P., Nowaczyk, M. M., Ogawa, T., Aro, E.-M., Boekema, E. J. (2008). Single particle analysis of thylakoid proteins from *Thermosynechococcus elongatus* and *Synechocystis* 6803: localization of the CupA subunit of NDH-1. *FEBS Lett*, 582(2):249–254.
- Follmann, H. (2004). Deoxyribonucleotides: the unusual chemistry and biochemistry of DNA precursors. *Chem Soc Rev*, 33(4):225–233.
- Food and Drug Administration (1992). FDA policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*, 4:338–340.
- Franco-Lara, E., Havel, J., Peterat, F., Weuster-Botz, D. (2006). Model-supported optimization of phototrophic growth in a stirred-tank photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 95(6):1177–1187.
- Fraunhofer-Gesellschaft (2005). Perspektiven für Zukunftsmärkte, Internetpublikation [http://www.hannover.ihk.de/fileadmin/pdf/ihk/themen/forschung\\_innovation/051101\\_perspektiven\\_zukunftsmarkte2005.pdf](http://www.hannover.ihk.de/fileadmin/pdf/ihk/themen/forschung_innovation/051101_perspektiven_zukunftsmarkte2005.pdf).
- Fuchs, G., Schlegel, H. (2006). *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Galkin, A., Kulakova, L., Tishkov, V., Esaki, N., Soda, K. (1995). Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44:479–483.
- Gebhardt, G. (2006). Charakterisierung und Optimierung der Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* durch ein automatisiertes Screeningverfahren. *Masterarbeit an der Technischen Universität München*.
- Ghosh, D., Erman, M., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W. (1994a). Mechanism of inhibition of  $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure*, 2(10):973–980.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C. M., Duax, W. L., Erman, M. (1994b). The refined three-dimensional structure of  $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure*, 2(7):629–640.
- Gilardi, G., Meharena, Y. T., Tsotsou, G. E., Sadeghi, S. J., Fairhead, M., Giannini, S. (2002). Molecular lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology. *Biosens Bioelectron*, 17(1-2):133–145.
- Gilbert, H. (2000). *Basic concepts in biochemistry: A Student's Survival Guide, 2. Auflage*. McGraw-Hill Medical-Verlag, Maidenhead.
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Blinov, V. M., Koonin, E. V. (1989). Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett*, 243(2):103–114.
- Gröger, H., Hummel, W., Buchholz, S., Drauz, K., Nguyen, T. V., Rollmann, C., Hüsken, H., Abokitse, K. (2003). Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Org Lett*, 5(2):173–176.

- Gupta, A., Khare, S. K. (2009). Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit Rev Biotechnol*, 29(1):44–54.
- Handelsmann, J., Rondon, M., Brady, S., Clardy, J., Goodman, R. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 5:R245–249.
- Hartman, J., Daram, P., Frizzell, R. A., Rado, T., Benos, D. J., Sorscher, E. J. (1992). Affinity purification of insoluble recombinant fusion proteins containing glutathione-S-transferase. *Biotechnol Bioeng*, 39(8):828–832.
- Harwood, J. L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1301(1-2):7–56.
- Hassan, H. M., Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem*, 254(21):10846–10852.
- Havel, J. (2006). Asymmetrische Synthesen mit phototrophen Mikroorganismen. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Havel, J., Franco-Lara, E., Weuster-Botz, D. (2008). A parallel bubble column system for the cultivation of phototrophic microorganisms. *Biotechnol Lett*, 30(7):1197–1200.
- Havel, J., Weuster-Botz, D. (2006). Comparative study of cyanobacteria as biocatalysts for the asymmetric synthesis of chiral building blocks. *Eng Life Sci*, 6:175–179.
- Havel, J., Weuster-Botz, D. (2007). Cofactor regeneration in phototrophic cyanobacteria applied for asymmetric reduction of ketones. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(5):1031–1037.
- Helenius, A., Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*, 415(1):29–79.
- Hellwich, K. (2007). *Stereochemie. Grundbegriffe*. Springer Verlag, Berlin.
- Henne, A., Schmitz, R. A., Bömeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 66(7):3113–3116.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in *PhastSystem Development Unit*. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Elektrophoresis*, 9:28–32.
- Hildebrand, F., Lütz, S. (2007). Electroenzymatic synthesis of chiral alcohols in an aqueous-organic two-phase system. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18:1187–1193.
- Holland, H. (1992). *Organic synthesis with oxidative enzymes*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Holloway, P. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem*, 53:304–308.
- Holtzhauer, M. (1997). *Biochemische Labormethoden*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Horváth, I. T., Anastas, P. T. (2007). Innovations and green chemistry. *Chem Rev*, 107(6):2169–2173.
- Hsueh, H., Chu, H., Chang, C. (2007). Identification and characteristics of a cyanobacterium isolated from a hot spring with dissolved inorganic carbon. *Environ. Sci. Technol.*, 41:1909–1914.
- Huang, L., McCluskey, M. P., Ni, H., LaRossa, R. A. (2002). Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J Bacteriol*, 184(24):6845–6858.
- Hummel, W. (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 58:145–184.
- Hummel, W., Riebel, B. (2000). Alcohol dehydrogenase and its use for the enzymatic production of chiral hydroxy compounds. Patent US6037158.
- Inoue, N., Taira, Y., Emi, T., Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K. (2001). Acclimation to the growth temperature and the high-temperature effects on photosystem II and plasma membranes in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol*, 42(10):1140–1148.
- IUB (1992). *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, San Diego.
- Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M., Ikeuchi, M. (2004). Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Plant Cell Physiol*, 45(2):171–175.
- Jackowski, S., Edwards, H. H., Davis, D., Rock, C. O. (1985). Localization of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 162(1):5–8.
- Jenny, R. J., Mann, K. G., Lundblad, R. L. (2003). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr Purif*, 31(1):1–11.
- Jensen, M. A., Elving, P. J. (1984). Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>). Formal potential of the NA<sup>+</sup>/NAD couple and NAD dimerization rate. *Biochim Biophys Acta*, 764(3):310–315.
- Jeromin, G., Bertau, M. (2005). *Bioorganikum*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Johannes, T. W., Woodyer, R. D., Zhao, H. (2005). Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration. *Appl Environ Microbiol*, 71(10):5728–5734.
- Jones, J., Sneddon, D., Higgins, W., Lewis, A. (1972). Preparative-scale reductions of cyclic ketones and aldehyde substrates of horse liver alcohol dehydrogenase with in situ sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, pages 856–857.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34(18):6003–6013.

- Jørgensen, K., Rasmussen, A. V., Morant, M., Nielsen, A. H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., Møller, B. L. (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol*, 8(3):280–291.
- Julliard, M., Petit, J. L., Ritz, P. (1986). Regeneration of NAD<sup>+</sup> cofactor by photosensitized electron transfer in an immobilized alcohol dehydrogenase system. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:1774–1779.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem*, 269(18):4409–4417.
- Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K., Murata, N. (2002). Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1):339–348.
- Kao, H. P., Abney, J. R., Verkman, A. S. (1993). Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm. *J Cell Biol*, 120(1):175–184.
- Kapust, R. B., Tözsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D., Waugh, D. S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng*, 14(12):993–1000.
- Karmodiya, K., Surolia, N. (2006). Analyses of co-operative transitions in *Plasmodium falciparum*  $\beta$ -ketoacyl acyl carrier protein reductase upon co-factor and acyl carrier protein binding. *FEBS J*, 273(17):4093–4103.
- Keinan, E., Hafeli, E., Seth, K., Lamed, R. (1986). Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *J. Am. Chem. Soc.*, 108:162–169.
- Kentemich, T., Haverkamp, G., Bothe, H. (1990). Die Gewinnung von molekularem Wasserstoff durch Cyanobakterien. *Naturwissenschaften*, 77:12–18.
- Khmelnitsky, Y. L., Mozhaev, V. V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V., Martinek, K. (1991). Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *Eur J Biochem*, 198(1):31–41.
- Klein, B., Pawlowski, K., Hörlicke-Grandpierre, C., Schell, J., Töpfer, R. (1992). Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase. *Mol Gen Genet*. 1992, 233(1-2):122–8.
- Kourist, R., Höhne, M., Bornscheuer, U. (2009). Maßgeschneiderte Enzyme: Gerichtete Evolution und rationales Design. *Chemie in unserer Zeit*, 43:132–142.
- Kourtz, L., Dillon, K., Daughtry, S., Madison, L. L., Peoples, O., Snell, K. D. (2005). A novel thiolase-reductase gene fusion promotes the production of polyhydroxybutyrate in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*, 3(4):435–447.
- Kurbanoglu, E., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N., Kilic, H. (2007). Asymmetric reduction of acetophenone analogues by *Alternaria alternata* using ram horn peptone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18:2332–2335.

- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1):105–132.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. (1985). On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 3:251–252.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng*, 30(1):81–87.
- Lackowicz, J. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Verlag, Berlin.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lai, C.-Y., Cronan, J. E. (2004). Isolation and characterization of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (*fabG*) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *J Bacteriol*, 186(6):1869–1878.
- Lam, L., Gair, I., Jones, J. (1988). Enzymes in organic synthesis. 42. Stereoselective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed reductions of heterocyclic bicyclic ketones. *J Org Chem*, 53:1611–1615.
- Lamed, R., Keinan, E., Zeikus, J. (1981). *Enzyme Microbial Technology*, 3:144–148.
- Lampel, K. A., Uratani, B., Chaudhry, G. R., Ramaley, R. F., Rudikoff, S. (1986). Characterization of the developmentally regulated *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase gene. *J Bacteriol*, 166(1):238–243.
- Larkum, A. W., Kühl, M. (2005). Chlorophyll *d*: the puzzle resolved. *TRENDS in Plant Science*, 10:355–357.
- Lasch, J. (1995). Interaction of detergents with lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1241(2):269–292.
- Leblanc, E., Papadopoulou, B., Bernatchez, C., Ouellette, M. (1998). Residues involved in co-factor and substrate binding of the short-chain dehydrogenase/reductase PTR1 producing methotrexate resistance in *Leishmania*. *Eur J Biochem*, 251:768–774.
- Lee, C., Zocher, R. (1996). The biochemical characterization of D-hydroxyisovalerate dehydrogenase, a key enzyme in the biosynthesis of enniatins. *J Biochem Mol Biol*, 29:493–499.
- Lee, W. T., Levy, H. R. (1992). Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase participates in substrate binding through charge-charge interaction. *Protein Sci*, 1(3):329–334.
- Leibundgut, M., Maier, T., Jenni, S., Ban, N. (2008). The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Curr Opin Struct Biol*, 18(6):714–725.
- León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H., Cabral, J. (1998). Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol*, 23:483–500.
- Li, C., Heatwole, J., Soelaiman, S., Shoham, M. (1999). Crystal structure of a thermophilic alcohol dehydrogenase substrate complex suggests determinants of substrate specificity and thermostability. *Proteins*, 37(4):619–627.

- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2000). *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Litvaitis, M. (2002). A molecular test of cyanobacterial phylogeny: interferences from constraint analyses. *Hydrobiologia*, 468:135–145.
- Lorsch, J. R., Szostak, J. W. (1994). In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature*, 371(6492):31–36.
- Los, D. A., Murata, N. (1999). Responses to cold shock in cyanobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1(2):221–230.
- Lottspeich, F., Zorbach, H., editors (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Ludwig-Mayerhofer, W. (2006). ILMES - Internet-Lexikon der Methoden der empirischen Sozialforschung, Internetpublikation, <http://www.lrz-muenchen.de/~wlm/ilmes.htm>.
- Lyu, P. C., Sherman, J. C., Chen, A., Kallenbach, N. R. (1991). Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12):5317–5320.
- Machielsen, R., Looger, L., Raedts, J., Dijkhuizen, S., Hummel, W., Hennemann, H., Dausmann, T., van der Oost, J. (2009). Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design. *Eng. Life Sci.*, 9:38–44.
- Mandler, D., Willner, I. (1986). Photosensitized NAD(P)H regeneration systems; Application in the reduction of butan-2-one, pyruvic, and acetoacetic acids and in the reductive amination of pyruvic and oxoglutaric acid to amino acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, pages 805–811.
- Mann, E., Ahlgreen, N., Moffett, J., Chisholm, S. (2002). Copper toxicity and cyanobacteria ecology in the Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography*, 47:976–988.
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:291–325.
- McLachlan, M. J., Johannes, T. W., Zhao, H. (2008). Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis. *Biotechnol Bioeng*, 99(2):268–274.
- Middelberg, A. P. J. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol*, 20(10):437–443.
- Millar, A. (2007). *The Plant Mitochondrial Proteome*. In: *Plant Proteomics, J Šamaj und JJ Thelen*. Springer-Verlag, Berlin.
- Miura, T., Suzuki, K., Takeuchi, H. (2001). Binding of iron(III) to the single tyrosine residue of amyloid  $\beta$ -peptide probed by raman spectroscopy. *J Mol Struct*, 598:79–84.
- Miyashita, H., Adachi, K., Kurano, N., Ikemoto, H., Chihara, M., Miyachi, M. (1997). Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll. *Plant Cell Physiol*, 38:274–281.

- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Miyachi, S., Chihara, M. (2003). *Acaryochloris marina* gen. et sp. nov. (cyanobacteria), an oxygenic photosynthetic prokaryote containing chl *d* as a major pigment. *Journal of Phycology*, 39:1247–1253.
- Molina Grima, E., Fernández, F. A., Camacho, F. G., Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotech*, 70:231–247.
- Moore, L., Coe, A., Zinser, E., Saito, M., Sullivan, M., Lindell, D., Frois-Moniz, K., Waterbury, J., Chisholm, S. (2007). Culturing the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Limnol. Oceanography: Methods*, 5:353–362.
- Morbidoni, H. R., de Mendoza, D., Cronan, J. E. (1996). *Bacillus subtilis* acyl carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, 178(16):4794–4800.
- Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell., V. (2006). *Harper's illustrated biochemistry*. McGraw-Hill Professional.
- Musa, M., Lott, N., Laivenieks, M., Watanabe, L., Vieille, C., Phillips, R. (2009). A single point mutation reverses the enantioselectivity of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase. *ChemCatChem*, 1:1–5.
- Nakamura, K., Yamanaka, R. (2002a). Light mediated cofactor recycling system in biocatalytic asymmetric reduction of ketones. *Chem Commun (Camb)*, (16):1782–1783.
- Nakamura, K., Yamanaka, R. (2002b). Light-mediated regulation of asymmetric reduction of ketones by a cyanobacterium. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16:2529–2533.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harada, T. (2003a). Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14(18):2659–2681.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Tohi, K., Hamada., H. (2000). Cyanobacterium-catalyzed asymmetric reduction of ketones. *Tetrahedron Letters*, 41:6799–6802.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. (2003b). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res*, 10(4):137–145.
- Nallamsetty, S., Waugh, D. S. (2007). A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His<sub>6</sub>-maltose binding protein fusion tag. *Nat Protoc*, 2(2):383–391.
- Nelissen, B., De Baere, R., Wilmotte, A., De Wachter, R. (1996). Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J Mol Evol*, 42(2):194–200.
- Nelissen, B., Van de Peer, Y., Wilmotte, A., De Wachter, R. (1995). An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol Biol Evol*, 12(6):1166–1173.

- Nguyen, L., Heb, H., Pham-Huyc, C. (2006). Chiral drugs. An overview. *International Journal of Biomedical Science*, 2:85–100.
- Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M., Giulio, A. D., Gambacorta, A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*, 52:639–647.
- Niefind, K., Riebel, B., Müller, J., Hummel, W., Schomburg, D. (2000). Crystallization and preliminary characterization of crystals of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 12):1696–1698.
- Nomura, C. T., Persson, S., Shen, G., Inoue-Sakamoto, K., Bryant, D. A. (2006). Characterization of two cytochrome oxidase operons in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002: inactivation of ctaDI affects the PS I:PS II ratio. *Photosynth Res*, 87(2):215–228.
- Novagen (2003). Rosetta 2(DE3) competent cells for enhanced coverage of codon bias in *E. coli*. *inNovations*, 18:28–29.
- Nultsch, W. (1996). *Allgemeine Botanik*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Nusser, M., Hüsing, B., Wydra, S. (2007). *Potenzialanalyse der industriellen, weißen Biotechnologie*. Fraunhofer-Institut für System- und Innovationsforschung, Karlsruhe.
- O'Day, D. (2005). The cell membrane. Internetpublikation, <http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio315/pdf/lecture2.pdf>.
- Ohkuma, T., Kitamura, M., Noyori, R. (2000). *Asymmetric hydrogenation*. In: *Chiral Asymmetric Synthesis, I. Ojima (Herausgeber)*. Wiley VCH, Weinheim.
- Olive, C., Geroch, M. E., Levy, H. R. (1971). Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Kinetic studies. *J Biol Chem*, 246(7):2047–2057.
- Olive, C., Levy, H. R. (1971). Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Physical studies. *J Biol Chem*, 246(7):2043–2046.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, 143-144:247–253.
- Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R., Jörnvall, H. (1997). Active site directed mutagenesis of 3 beta/17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochemistry*, 36(1):34–40.
- Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M. A., Kanesaki, Y., Satoh, S., Tabata, S., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Hayashi, H., Tanticharoen, M., Suzuki, I., Murata, N. (2004). Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *J Biol Chem*, 279(51):53078–53086.

- Parks, T. D., Howard, E. D., Wolpert, T. J., Arp, D. J., Dougherty, W. G. (1995). Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology*, 210(1):194–201.
- Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., Dougherty, W. G. (1994). Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem*, 216(2):413–417.
- Partensky, F., Hoepffner, N., Li, W. K. W., Ulloa, O., Vaultot, D. (1993). Photoacclimation of *Prochlorococcus* sp. (prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean Sea. *Plant Physiol*, 101(1):285–296.
- Patel, M. P., Liu, W.-S., West, J., Tew, D., Meek, T. D., Thrall, S. H. (2005). Kinetic and chemical mechanisms of the *fabG*-encoded *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-ACP reductase. *Biochemistry*, 44(50):16753–16765.
- Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., AndersonGD, Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y., Isakson, P. C. (1997). Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1h-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (sc-58635, celecoxib). *J Med Chem*, 40(9):1347–1365.
- Pereira, R. (1998). The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18:25–64.
- Perrin, D., Dempsey, B. (1974). *Buffers for pH and metal ion control*. Chapman und Hall, London.
- Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact*, 143-144:271–278.
- Peters, J. (1998). *Dehydrogenases - characteristics, design of reaction conditions, and applications*. In: HJ Rehm, H Reed (Hrsg.), *Biotechnology, Band 8a*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Petersen, M., Kiener, A. (1999). Biocatalysis. preparation and functionalization of N-heterocycles. *Green Chem*, 1:99–106.
- Pfruender, H., Amidjojo, M., Kragl, U., Weuster-Botz., D. (2004). Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system. *Angewandte Chemie*, 43:4529–4531.
- Popov, V. O., Lamzin, V. S. (1994). NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Biochem J*, 301 (Pt 3):625–643.
- Prachayasittikul, V., Ljung, S., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Bülow, L. (2006). NAD(H) recycling activity of an engineered bifunctional enzyme galactose dehydrogenase/lactate dehydrogenase. *Int J Biol Sci*, 2(1):10–16.

- Prelog, V. (1964). Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure Appl. Chem.*, 9:119–130.
- Price, A. C., Zhang, Y. M., Rock, C. O., White, S. W. (2001). Structure of beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase from *Escherichia coli*: negative cooperativity and its structural basis. *Biochemistry*, 40(43):12772–12781.
- Priebe, A., Jäger, H. (1978). Responses of amino acid metabolizing enzymes from plants differing in salt tolerance to NaCl. *Oecologia*, 36:307–315.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 57:287–293.
- Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(6):635–648.
- Raghava, G. (2002). APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning. *CASP5*, A:132.
- Ramaley, R. F., Vasantha, N. (1983). Glycerol protection and purification of *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase. *J Biol Chem*, 258(20):12558–12565.
- Randolph, T., Blanch, H., Prausnitz, J., Wilke, C. (1985). Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnology Letters*, 7:325–328.
- Rawlings, M., Cronan, J. E. (1992). The gene encoding escherichia coli acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J Biol Chem*, 267(9):5751–5754.
- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Prog Lipid Res*, 41(2):182–196.
- Ren, Q., Siervo, N., Witholt, B., Kessler, B. (2000). FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 182(10):2978–2981.
- Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J. M., Robertson, D. E., Miller, C. (2002). A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. discovery and optimization of a low ph, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem*, 277(29):26501–26507.
- Riesenberg, D., Guthke, R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(4):422–430.
- Rippka, R., Coursin, T., Hess, W., Lichtlé, C., Scanlan, D. J., Palinska, K. A., Iteman, I., Partensky, F., Houmard, J., Herdman, M. (2000). *Prochlorococcus marinus* chisholm *et al.* 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain pcc 9511, the first axenic chlorophyll a<sub>2</sub>/b<sub>2</sub>-containing cyanobacterium (*Oxyphotobacteria*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 5:1833–1847.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(2):1–61.

- Rippka, R., Waterbury, J., Cohen-Bazire, G. (1974). A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Arch. Microbiol.*, 100:419–436.
- Robertson, D. E., Steer, B. A. (2004). Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr Opin Chem Biol*, 8(2):141–149.
- Rock, C. O., Cronan, J. E. (1996). *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1302(1):1–16.
- Rogers, R. D., Seddon, K. R. (2003). Chemistry. Ionic liquids—solvents of the future? *Science*, 302(5646):792–793.
- Rojek, R., Harms, C., Hebel, M., Grimme, L. (1994). Cyclic variations of photosynthetic activity under nitrogen fixing conditions in *Synechococcus* RF-1. *Arch Microbiol*, 162:80–84.
- Rosen, T., Feldmann, R., Dünkemann, P., Dausmann, T. (2006). Bioreductive synthesis of perfluorinated chiral alcohols. *Tetrahedron Lett.*, 47:4803–4806.
- Rosenthaler, L. (1908). Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthese. *Biochem Z*, 14:238–253.
- Rossi, J., Roberts, M., Yoo, H., Gerwick, W. (1997). Pilot scale culture of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* for its pharmaceutically-useful natural metabolite curacin A. *Journal of Applied Phycology*, 9:195–204.
- Rossmann, M., Liljas, A., Brändén, C., Banaszak, L. (1975). *Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases*, in: *The Enzymes*, PD Boyer, Vol. 1., 3. Auflage. Academic Press, New York.
- Rost, B., Sander, C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy. *J Mol Biol*, 232:584–599.
- Roughan, P. G., Ohlrogge, J. B. (1996). Evidence that isolated chloroplasts contain an integrated lipid-synthesizing assembly that channels acetate into long-chain fatty acids. *Plant Physiol*, 110(4):1239–1247.
- Rubio, F. C., Camacho, F. G., Sevilla, J. M. F., Chisti, Y., Grima, E. M. (2003). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol Bioeng*, 81(4):459–473.
- Rudolph, R., Lillie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, 10:49–56.
- Saha, S., Uma, L., Subramanian, G. (2005). An improved method for marine cyanobacterial DNA isolation. *World J Microbiol Biotechnol*, 21:877–881.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491.
- Sakai, T., Miki, Y., Nakatani, M., Ema, T., Uneyama, K., Utaka, M. (1998). Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-acyloxy-2-(pentafluorophenyl)acetonitrile. *Tetrahedron Letters*, 39:5233–5236.

- Sakamoto, T., Shen, G., Higashi, S., Murata, N., Bryant, D. A. (1998). Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. *Arch Microbiol*, 169(1):20–28.
- Salles, I. M., Forchhammer, N., Croux, C., Girbal, L., Soucaille, P. (2007). Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 9(2):152–159.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schägger, H., Cramer, W., von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 217:220–230.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.*, 199:223–231.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817):258–268.
- Schubert, T., Hummel, W., Müller, M. (2002). Highly enantioselective preparation of multifunctionalized propargylic building blocks. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 41:634–637.
- Seaburg, K., Parker, B., Wharton, R., Simmons, G. (1981). Temperature-growth responses of algal isolates from antarctic oases. *J Phycol*, 17:353–360.
- Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M., Tishkov, V., Egorov, A., Wandrey, C., Kragl, U. (1996). A novel, efficient regenerating method for NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters*, 37:1377–1380.
- Segel, I. (1993). *Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Serov, A. E., Popova, A. S., Fedorchuk, V. V., Tishkov, V. I. (2002). Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 367(Pt 3):841–847.
- Sharma, S. K., Kapoor, M., Ramya, T. N. C., Kumar, S., Kumar, G., Modak, R., Sharma, S., Surolia, N., Surolia, A. (2003). Identification, characterization, and inhibition of *Plasmodium falciparum* beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ). *J Biol Chem*, 278(46):45661–45671.
- Shimizu, S., Kataoka, M., Katoh, M., Morikawa, T., Miyoshi, T., Yamada, H. (1990). Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by a microbial aldehyde reductase in an organic solvent-water biphasic system. *Appl Environ Microbiol*, 56(8):2374–2377.
- Shimoda, K., Kubota, N., Hamada, H., Kajib, M., Hirata, T. (2004). Asymmetric reduction of enones with *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15:1677–1679.
- Shimoji, M., Yin, H., Higgins, L., Jones, J. P. (1998). Design of a novel P450: a functional bacterial-human cytochrome P450 chimera. *Biochemistry*, 37(25):8848–8852.

- Singh, S., Sinha, R., Häder, D. (2002). Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozool*, 41:297–308.
- Skulberg, O. (1990). Culture collection of algae, norwegian institute for water research, catalogue of strains. *Oslo: Norwegian Institute for Water Research (NIVA)*.
- Slabas, A., Smith, C. (1988). Immunogold localization of acyl carrier protein in plants and *Escherichia coli*: Evidence for membrane association in plants. *Planta*, 175:145–152.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M. R., Pohl, M. (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem*, 267(5):1280–1289.
- Smith, C. (2009). Division cyanophyta. Internetpublikation, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/webb/BOT201/BOT201/Algae/Cyanophytalecturenotes.htm>.
- Smith, D., Johnson, K. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67:31–40.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76–85.
- Stapleton, S., Jaworski, J. (1984). Characterization of fatty acid biosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 794:249–255.
- Steindler, L., Huchon, D., Avni, A., Ilan, M. (2005). 16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 71(7):4127–4131.
- Stewart, J. D. (2001). Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 5(2):120–129.
- Stomp, M., Huisman, J., Stal, L. J., Matthijs, H. C. P. (2007). Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *The ISME Journal*, 1:271–282.
- Su, W., Li, J., Xu, N. (2003). State and parameter estimation of microalgal photobioreactor cultures based on local irradiance measurement. *J Biotech*, 105:165–178.
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L., Meeks, J. C. (1995). Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J Bacteriol*, 177(21):6184–6194.
- Sun, Y.-H., Cheng, Q., Tian, W.-X., Wu, X.-D. (2008). A substitutive substrate for measurements of beta-ketoacyl reductases in two fatty acid synthase systems. *J Biochem Biophys Methods*, 70(6):850–856.
- Swingle, W. D., Hohmann-Marriott, M. F., Olson, T. L., Blankenship, R. E. (2005). Effect of iron on growth and ultrastructure of *Acaryochloris marina*. *Appl Environ Microbiol*, 71(12):8606–8610.
- Tahajodi, S., Marschnig, S., Guggisberg, D., Rehberger, B., Bisig, W. (2008). Milchproteine als Emulgatoren. *Alimenta*, 03:34–35.

- Thelen, J. J., Ohlrogge, J. B. (2002). The multisubunit acetyl-CoA carboxylase is strongly associated with the chloroplast envelope through non-ionic interactions to the carboxyl-transferase subunits. *Arch Biochem Biophys*, 400(2):245–257.
- Tishkov, V. I., Popov, V. O. (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc)*, 69(11):1252–1267.
- Toren, A., Ron, E. Z., Bekerman, R., Rosenberg, E. (2002). Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AInA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59(4-5):580–584.
- Tredici, M. (1999). *Photobioreactors*. In: *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation*, MC Flickinger und SW Drew (Hrsg.). Wiley, New York.
- Vagelos, P. (1971). Regulation of fatty acid biosynthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 4:119–165.
- van der Donk, W. A., Zhao, H. (2003). Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr Opin Biotechnol*, 14(4):421–426.
- Velasco-García, R., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. A. (2000). Steady-state kinetic mechanism of the NADP<sup>+</sup>- and NAD<sup>+</sup>-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J*, 352 Pt 3:675–683.
- Vermuë, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R., Tramper, J. (1993). Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Bioeng*, 42(6):747–758.
- Vermuë, M., Tramper, J. (1995). Biocatalysis in non-conventional media: Medium engineering aspects. *Pure and Applied Chemistry*, 67:345–373.
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2002). *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Völkl, P., Markiewicz, P., Stetter, K. O., Miller, J. H. (1994). The sequence of a subtilisin-type protease (aerolysin) from the hyperthermophilic archaeum *Pyrobaculum aerophilum* reveals sites important to thermostability. *Protein Sci*, 3(8):1329–1340.
- Vrtis, J. M., White, A. K., Metcalf, W. W., van der Donk, W. A. (2002). Phosphite dehydrogenase: a versatile cofactor-regeneration enzyme. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(17):3257–3259.
- Walter, C., Steinau, T., Gerbsch, N., Buchholz, R. (2003). Monoseptic cultivation of phototrophic microorganisms—development and scale-up of a photobioreactor system with thermal sterilization. *Biomol Eng*, 20(4-6):261–271.
- Wasserscheid, P., Welton, T. (2003). *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Waterbury, J. (2006). *The Cyanobacteria - Isolation, Purification and Identification*. In: *The Prokaryotes, Vol. 4 Bacteria Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer-Verlag, Berlin.
- Waterbury, J., Watson, S., Guillard, R., Brand, L. (1979). Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic cyanobacterium. *Nature*, 277:293–294.

- Waugh, D. (2009). TEV protease FAQ. Internetpublikation, [http://mcl1.ncifcrf.gov/waugh\\_tech/faq/tev.pdf](http://mcl1.ncifcrf.gov/waugh_tech/faq/tev.pdf).
- Westgate, S., Vaidya, A., Bell, G., Halling, P. (1998). High specific activity of whole cells in an aqueous-organic two-phase membrane bioreactor. *Enzyme Microb Technol*, 22:575–577.
- Weuster-Botz, D. (1999). *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*. Schriften des Forschungszentrums Jülich. Reihe Lebenswissenschaften/Life Science, Band 2.
- White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., Rock (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 74:791–831.
- Wickramasinghe, S. R., Inglis, K. A., Urch, J. E., Müller, S., van Aalten, D. M. F., Fairlamb, A. H. (2006). Kinetic, inhibition and structural studies on 3-oxoacyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum*, a key enzyme in fatty acid biosynthesis. *Biochem J*, 393(2):447–457.
- Wiemann, L. O., Buthe, A., Klein, M., van den Wittenboer, A., Dähne, L., Ansorge-Schumacher, M. B. (2009). Encapsulation of synthetically valuable biocatalysts into polyelectrolyte multilayer systems. *Langmuir*, 25(1):618–623.
- Wienkamp, R., Steckhan, E. (1982). Selective generation of NADH by visible light. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 21:782.
- Wittig, I., Braun, H., Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*, 1:418–428.
- Wright, H. (2004). Cofactors in fatty acid biosynthesis - active site organizers and drug targets. *Structure*, 12:358–359.
- Wu, J. T., Wu, L. H., Knight, J. A. (1986). Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin Chem*, 32(2):314–319.
- Wu, X., Zarka, A., Boussiba, S. (2000). A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Mol Biol Rep*, 18:385–392.
- Wyatt, P., Warren, S. (2007). *Organic Synthesis: Strategy and Control*. Wiley & Sons, Hoboken.
- Yamamoto, H., Matsuyama, A., Kobayashi, Y. (2003). Synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *fabG*-homologues. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(2):133–139.
- Yamamoto, H., Mitsuhashi, K., Kimoto, N., Kobayashi, Y., Esaki, N. (2005). Robust NADH-regenerator: improved alpha-haloketone-resistant formate dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67(1):33–39.
- Yamaoka, T., Satoh, K., Katoh, S. (1978). Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga. *Plant Cell Physiol.*, 19:943–954.
- Yang, S., Su, Z., Li, H., Feng, J., Xie, J., Xia, A., Gong, Y., Zhao, J. (2007). Demonstration of phycobilisome mobility by the time- and space-correlated fluorescence imaging of a cyanobacterial cell. *Biochim Biophys Acta*, 1767(1):15–21.

- You, L., Arnold, F. H. (1996). Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng*, 9(1):77–83.
- Zaccai, N. R., Carter, L. G., Berrow, N. S., Sainsbury, S., Nettleship, J. E., Walter, T. S., Harlos, K., Owens, R. J., Wilson, K. S., Stuart, D. I., Esnouf, R. M. (2008). Crystal structure of a 3-oxoacyl-(acylcarrier protein) reductase (BA3989) from *Bacillus anthracis* at 2.4-Å resolution. *Proteins*, 70(2):562–567.
- Zelinski, T., Kula, M. (1997). Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrins. *Biocatalysis and Biotransformation*, 15:57–74.
- Zhang, Y.-M., Wu, B., Zheng, J., Rock, C. O. (2003). Key residues responsible for acyl carrier protein and beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) interaction. *J Biol Chem*, 278(52):52935–52943.
- Zhao, G., Meier, T. I., Hoskins, J., Jaskunas, S. R. (1999). Penicillin-binding protein 2a of *Streptococcus pneumoniae*: expression in *Escherichia coli* and purification and refolding of inclusion bodies into a soluble and enzymatically active enzyme. *Protein Expr Purif*, 16(2):331–339.
- Zhao, W., Guo, Q., Zhao, J. (2007). A membrane-associated Mn-superoxide dismutase protects the photosynthetic apparatus and nitrogenase from oxidative damage in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol.*, 48:563–572.
- Zinser, E. R., Coe, A., Johnson, Z. I., Martiny, A. C., Fuller, N. J., Scanlan, D. J., Chisholm, S. W. (2006). *Prochlorococcus* ecotype abundances in the North Atlantic Ocean as revealed by an improved quantitative PCR method. *Appl Environ Microbiol*, 72(1):723–732.

# Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 9.1:** Verwendete Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Begriff</b>
ACCase	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADH	Alkoholdehydrogenase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APSSP2	<i>Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server 2</i>
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bis-Tris	2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bp	Basenpaar
BTM	Biotrockenmasse
CoA	Coenzym A
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DH	3-Hydroxyacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (FabA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss ( <i>enantiomeric excess</i> )
[(EO2E)MPL] <sup>+</sup>	1-(Ethoxycarbonyl)methyl-1-methylpyrrolidinium
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ER	Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (FabI)
FAD	Flavinadenindinukleotid
fab	<i>fatty acid biosynthesis</i>
FAS I / II	Fettsäure-Synthase Typ I / Typ II
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer

Tabelle 9.1: Verwendete Abkürzungen (Fortsetzung)

Abkürzung	Begriff
GC	Gaschromatographie
GCUA	<i>Graphical Codon Usage Analyser</i>
GDH	Glukosedehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
G6PDH	Glukose-6-phosphat-dehydrogenase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
[HMPL] <sup>+</sup>	1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium
[HPYR] <sup>+</sup>	N-Hexylpyridinium
IL	ionische Flüssigkeit ( <i>ionic liquid</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KAS	3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Synthase (FabH, FabB, FabF)
kb	Kilobasenpaar
KR	3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (FabG)
LB-ADH	<i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase
LK-ADH	<i>Lactobacillus kefir</i> -Alkoholdehydrogenase
LB	<i>Luria broth</i>
MBP	Maltose-bindendes Protein
MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoroacetamid)
MCAT	Malonyl-CoA-(Acyl-Carrier-Protein)-Transacylase (FabD)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
[(NEMM)EO <sub>2</sub> E] <sup>+</sup>	Ethyl-dimethyl-(ethoxycarbonyl)methylammonium
[NTF] <sup>-</sup>	Bis(trifluormethylsulfonyl)imid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	<i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCC	<i>Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFAP	2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon
PFE	1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol

**Tabelle 9.1:** Verwendete Abkürzungen (Fortsetzung)

<b>Abkürzung</b>	<b>Begriff</b>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTDH	Phosphitdehydrogenase
PQQ	Pyrrolochinolinchinon ( <i>Pyrroloquinolin quinone</i> )
[(P3OH)PYR] <sup>+</sup>	N-(3-hydroxypropyl)pyridinium
RCC	<i>Roscoff Culture Collection</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure ( <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
SDR	Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TB	<i>Terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tabakätzvirus ( <i>tobacco etch virus</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure ( <i>transfer ribonucleic acid</i> )
TTN	<i>total turnover number</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent auf Volumen bezogen (1 % = 10 g L <sup>-1</sup> )
% w/w	Gewichtsprozent
YASARA	<i>Yet Another Scientific Artificial Reality Application</i>

**Tabelle 9.2:** Einbuchstabencode für Aminosäuren

<b>Aminosäure</b>	<b>Buchstabe</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Aminosäure</b>	<b>Buchstabe</b>	<b>Eigenschaft</b>
Alanin	A	hydrophob	Leucin	L	hydrophob
Arginin	R	geladen	Lysin	K	geladen
Asparagin	N	polar	Methionin	M	hydrophob
Aspartat	D	geladen	Phenylalanin	F	aromatisch
Cystein	C	polar	Prolin	P	hydrophob
Glutamat	E	geladen	Serin	S	polar
Glutamin	Q	polar	Threonin	T	polar
Glycin	G	-	Tyrosin	Y	aromatisch
Histidin	H	geladen	Tryptophan	W	aromatisch
Isoleucin	I	hydrophob	Valin	V	hydrophob

# Anhang A

## Allgemeines Material

### A.1 Geräte

**Tabelle A.1:** Allgemeine Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analytische Waage Explorer 10 mg-210 g	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 5 g-32 kg	Ohaus, Gießen
Blutzucker-Messgerät Accu-Chek mit Sensorstäbchen Accu-Chek Sensor Comfort	Roche Diagnostics, Mannheim
Elektrophoresekammer P8DS	Owl, Portsmouth, USA
Elektrophorese-Stromquelle E 802	Consort, Fournhout, Belgien
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenphotometer Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg
Hamilton Digitalspritze Serie 700	Hamilton, Reno, USA
Heizblock Standard	Henry Troemner LLC, Thorofare, NJ, USA
Inkubationshaube	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Kompaktschüttler KS 15	Bühler, Hechingen
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Mehrfachrührplatz Multipoint 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mehrfachrührplatz Variomag Poly 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Midi-Gellaufapparatur MGU 402T	CBS Scientific, Del Mar, USA
Mikrotiterplattenphotometer EL 808	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Mikrowelle	BOSCH, Stuttgart
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
Photospektrometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Neuss
Photospektrometer Biomate 3	Thermo Spectronic, Neuss
Quantumsensor LI-190 SZ mit Datenlogger LI-250 A LI-COR	Lincoln, USA
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach

**Tabelle A.1:** Allgemeine Laborgeräte (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Schüttelinkubator Multitron	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Standzentrifuge Sorvall-RC5C	Kendro, Langenselbo
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen
Ultra-Turrax	IKA, Staufen
Vakuumpumpe	Edwards, Sussex, England
Wasserbad Typ 1002	GFL, Hannover
Wasserbad W15 C15	Thermo Haake, Karlsruhe

**Tabelle A.2:** Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Anlage und zugehörige Chromatographiesäulen

Komponente	Hersteller
GradiFrac FPLC-Einheit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GSTrap FF Säulen, 1 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiLoad 26/60 Superdex-200-Säule	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
DEAE52 Anionenaustauschersäule, 65 mL	Serva, Heidelberg
HiTrap Benzamidin FF Säulen, 1 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HisTrap FF crude Säulen, 1 mL und 5 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IV-7 Ventil	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pumpe P50	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV-Spectrophotometer LKB Uvicord S II	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
280 nm Filter	

**Tabelle A.3:** Gaschromatograph und zugehörige Chromatographiesäulen

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt
Injektor 1079 PTV	temperaturprogrammierbar
Splitregelung	elektronische Flusskontrolle (EFC)
FID-Detektor	Brenngase Wasserstoff und Luft, Trägergas/Make-Up-Gas Helium

**Tabelle A.3:** Gaschromatograph und zugehörige Chromatographiesäulen (Fortsetzung)

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Software Star Version 5.51	Varian, Darmstadt
Probengeber CombiPal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Trennsäule BGB-174	BGB Analytik, Schlossbockelheim, Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trennsäule BGB-175	BGB Analytik, Schlossbockelheim, Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trennsäule Lipodex E	Macherey Nagel, Düren, Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Helium 99.999 % (v/v)	Air Liquide, Krefeld
Wasserstoff 99.999 % (v/v)	Air Liquide, Krefeld
Synthetische Luft	Hausleitung

**Tabelle A.4:** Paralleles Blasensäulensystem

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Brooks Massflowmeter E5850	Westphal, Ottobrunn
Gasmischsystem WMR 4000	Westphal, Ottobrunn
Lasergebohrte Stahlplatten, 60 µm Poren	
Leuchtstoffröhren Fluora 77	Osram, München
Leuchtstoffröhren SunGlo	Hagen, Holm
Polyestertrenngewebe, Nr. 13420	Sartorius, Gottingen
Profors-Blasensäule 250 mL	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Profors-Inkubator	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Sterilfilter PTFE, 0,2 µm	Sartorius, Gottingen

**Tabelle A.5:** 20 L-Photobioreaktor

Komponente	Hersteller/Spezifikation
25 L-Labor-Pilot-Reaktor CF 3000	Chemap AG, Volketswil, Schweiz
Brooks Massflowmeter E5850	Westphal, Ottobrunn
Gasmischsystem WMR 4000	Westphal, Ottobrunn
Glaszylinder Typ G	Chemap AG, Volketswil, Schweiz
Leuchtstoffröhren Fluora 77	Osram, München
Leuchtstoffröhren SunGlo	Hagen, Holm
pH-Elektrode InFit 764-50	Mettler-Toledo, Gießen

**Tabelle A.6:** 7,5 L-Rührkesselreaktor

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Labfors-Reaktor, 7,5 L	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Kontrolleinheit	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/325	Mettler-Toledo, Gießen
pO <sub>2</sub> -Elektrode InPro 6000	Mettler-Toledo, Gießen

Abgesehen von laborüblichem Verbrauchsmaterial - wie z.B. Pipettenspitzen und Eppendorfreaktionsgefäßen - wurde folgendes spezielles Verbrauchsmaterial benutzt:

**Tabelle A.7:** Spezielles Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Produktnummer
Bio-Beads SM-2	Bio-Rad	152-8920
Dialysiermembran ZelluTrans T3, Größenausschlussgrenze 12-14 kDa	Roth	E676.1
Gewebekulturflasche T-25, Polystyrol	Sarstedt	83.1810
Glasperlen, Ø 0,25-0,50 mm	Roth	A553
Kreuzmagnetührstäbchen, Ø 10 mm	VWR	442-0075
Polypropylenmembran Accurel 2E	Akzo Nobel, Wuppertal	
Rotilabo®-Probenröhrchen, Ø 15 mm, Glas, klar	Roth	H306.1
Vivaspin 20 mL Zentrifugalkonzentrator, Größenausschlussgrenze 5 kDa	Sartorius	VS2011

## A.2 Chemikalien

**Tabelle A.8:** Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Agar-Agar	unb.	Roth	5210
Agarose NEE0	DNA-Grad	Roth	2267
Agarose Elektran	DNA-Grad	VWR	438792U
Aluminiumkaliumsulfat*12H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Merck	101047
ε-Aminocapronsäure	> 99,0 %	Roth	3113
Ammoniak 32 %	reinst	Merck	105426

Tabelle A.8: Allgemeine Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Ammoniumeisen(III)-citrat	unb.	Merck	103762
Ammoniumheptamolybdat*4H <sub>2</sub> O	unb.	Merck	101182
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	98,0 %	Merck	103762
Ammoniumsulfat	≥ 99,5 %	Merck	101217
Ampicillin Natriumsalz	≥ 99,0 %	Roth	K029
L-Arginin	≥ 99,0 %	Merck	101542
2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	≥ 99,0 %	Merck	103252
Borsäure	≥ 99,0 %	Merck	100165
Bromphenolblau	ACS	Merck	108122
Calciumchlorid*2H <sub>2</sub> O	> 99,5 %	Merck	102382
Cadmiumdinitrat*4H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Fluka	20911
Chloramphenicol	unb.	Sigma	C-0378
Chloroform	≥ 99,0 %	Merck	102445
Chrom(III)nitrat*9H <sub>2</sub> O	≥ 97,0 %	Fluka	27080
Clerol FBA 265	unb.	Cognis	
Cobaltdinitrat*6H <sub>2</sub> O	> 99,0 %	Merck	102536
Coomassie Blau G 250	unb.	Roth	9598
Coomassie Blau R 250	unb.	Roth	3862
Cyclohexan	≥ 99,9 %	Roth	CP81.1
1,4-Dithiothreitol (DTT)	≥ 99,0 %	Merck	111474
EDTA	≥ 98,0 %	Merck	100944
EDTA-Na <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Merck	108418
Essigsäure	≥ 99,8 %	Merck	100056
Ethanol	≥ 99,5 %	Merck	100986
Ethidiumbromidlösung 1,0 %	unb.	Roth	2218
Ethylacetat	≥ 99,5%	Merck	109623
Formaldehyd 37,0 %	unb.	Merck	104002
D-Glukose*H <sub>2</sub> O	≥ 98,5 %	Roth	6780
D-Glukose-6-phosphat-Na <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O	≥ 98,0 %	Roth	CN72
Glutaraldehyd 25,0 %	technisch	Fluka	49630
Glycerin	> 98,0 %	Roth	7530
Glycin	≥ 99,7 %	Merck	104169
Guanidiniumchlorid (GdmCl)	≥ 99,0 %	Merck	369079
Hefeextrakt OHLY KAT	unb.	Dt. Hefewerke	
n-Hexan	≥ 98,0%	Roth	7339
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	≥ 99,0 %	Merck	110110

Tabelle A.8: Allgemeine Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Imidazol	99,0 %	Alfa Aesar	A10221
Isopropanol	≥ 99,5 %	Merck	818766
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	≥ 98,0 %	VWR	43714
Kaliumbromid	≥ 99,0 %	Alfa Aesar	A16339
Kaliumcarbonat	≥ 99,5 %	Merck	104924
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Roth	3907
di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Roth	P749
Kaliumiodid	> 99,0 %	Merck	105040
Kanamycinsulfat	unb.	Roth	T832
Kupfer(II)sulfat*5H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Merck	102790
Magnesiumsulfat*7H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Merck	105886
Mangan(II)chlorid*4H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Merck	105927
Mangan(II)sulfat*H <sub>2</sub> O	≥ 98,0 %	Merck	105941
β-Mercaptoethanol	> 99,0 %	Merck	115433
Methanol	99,9 %	Roth	7342
Methyl-tert-butylether	> 99,5%	Merck	101849
2-Morpholinoethansulfonsäure-H <sub>2</sub> O (MES)	≥ 99,0 %	Merck	106126
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	≥ 99,0 %	Roth	6979
NADH-Na <sub>2</sub>	≥ 98,0%	Roth	AE12
NADP-Na	≥ 95,0 %	Calbiochem	481971
NADPH-Na <sub>4</sub>	≥ 97,0 %	Roth	AE14
Natriumacetat	> 99,5 %	Merck	116100
Natriumcarbonat	≥ 99,9 %	Merck	106392
Natriumchlorid	≥ 99,0 %	Roth	P029
Natriumcitrat	≥ 99,5 %	Fluka	71497
Natriumdihydrogenphosphat*H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Merck	106346
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 85,0 %	Merck	817034
Natriumformiat	≥ 98,0 %	Fluka	71540
di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Merck	106586
Natriumhydroxid	≥ 99,0 %	Roth	9356
Natriumlauroylsarcosinat	~95,0 %	Merck	814715
Natriummolybdat*2H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Merck	106521
Natriumnitrat	≥ 99,0 %	Roth	A136
Natriumthiosulfat	≥ 97,0 %	Merck	106512
Natriumwolframat*2H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Fluka	72070

Tabelle A.8: Allgemeine Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Nickelchlorid*6H <sub>2</sub> O			
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	99,0 %	Roth	2367
Pepton aus Casein	unb.	Roth	8986.1
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	≥ 99,0 %	Roth	6367
<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85,0 %	pro analysi	Merck	100563
Roti <sup>®</sup> -Phenol	unb.	Roth	0038
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40 (19:1)	unb.	Roth	3030.1
Rotiphorese <sup>®</sup> 10X SDS-PAGE	unb.	Roth	3060
Salzsäure 32,0 %	pro analysi	Merck	100319
Selendioxid	≥ 97,0 %	Fluka	84905
Silbernitrat	≥ 99,8 %	Merck	101512
SOC-Medium	unb.	Sigma	S1797
Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan (Tris)	≥ 99,9 %	Roth	4855
Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan-hydrochlorid (Tris-HCl)	≥ 99,0 %	Roth	9090
Vanadium(IV)oxidsulfat*5H <sub>2</sub> O	≥ 95,0 %	Riedel De Haen	14229
Vitamin B <sub>12</sub>	≥ 96,0 %	Merck	524950
Zinksulfat*7H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Merck	108883
Zitronensäure*H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Roth	5110

Tabelle A.9: Edukte der Biokatalyse

Edukt	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Aceton	≥ 99,5 %	Roth	5025
Acetophenon	> 98,0 %	Merck	800028
2-Butanon	≥ 99,5 %	Roth	8403
$\alpha$ -Chloracetophenon	≥ 98,0 %	Fluka	77460
4'-Chloracetophenon	> 98,0 %	Merck	802605
5-Chlor-2-pentanon	> 90,0 %	Merck	841726
Diisobutylketon	~75,0 %	Merck	818831
Ethylacetoacetat	> 98,0	Merck	809622
Ethyl-4-chloracetoacetat	> 98,0 %	Merck	818571
Ethyl-4,4,4-trichloracetoacetat	≥ 95,0 %	Sigma-Aldrich	91072
Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat	> 98,0 %	Alfa Aesar	A13717

Tabelle A.9: Edukte der Biokatalyse (Fortsetzung)

Edukt	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Ethylbenzoylacetat	~93,0 %	Merck	801808
3'-Fluoracetophenon	98,0 %	Alfa Aesar	A11733
4'-Fluoracetophenon	99,0 %	Alfa Aesar	A13950
2-Heptanon	> 98,0	Merck	818711
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon	≥ 98,0 %	Merck	804512
2-Oktanon	≥ 98,0 %	Merck	820926
2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon	97,0 %	Interchim	32258
Propiophenon	≥ 99,0 %	Fluka	82050
1,1,1-Trifluoracetone	97,0 %	Aldrich	T6,280-4

Tabelle A.10: Produkte der Biokatalyse

Produkt	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
( <i>R,S</i> )-2-Butanol	≥ 99,5 %	Merck	109630
( <i>R</i> )- $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol	≥ 97,0%	Fluka	25903
( <i>S</i> )- $\alpha$ -Chlor-1-phenylethanol	≥ 97,0%	Fluka	25905
( <i>R,S</i> )-1-(4'-Chlorphenyl)ethanol	> 97,0 %	Merck	814834
( <i>R</i> )-5-Chlor-2-pentanol	≥ 95%	Fluka	27618
Ethyl-( <i>S</i> )-4-chlor-3-hydroxybutyrat	~96,0 %	Aldrich	460524
Ethyl-( <i>R</i> )-4-chlor-3-hydroxybutyrat	98,0 %	Aldrich	E3,060-3
Ethyl-( <i>R,S</i> )-3-hydroxybutyrat	~96,0 %	Aldrich	460516
Ethyl-( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-4,4,4-trichlorbutyrat	unb. %	Sigma-Aldrich	S539392
Ethyl-( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-4,4,4-trifluorbutyrat	97,0 %	Alfa Aesar	L12753
( <i>R,S</i> )-2-Heptanol	> 99,0 %	Merck	820619
Ethyl-( <i>R</i> )-3-hydroxy-3-phenylpropionat	≥ 99,0 %	Fluka	56187
( <i>R,S</i> )-1-(3'-Fluorphenyl)ethanol	97,0 %	Alfa Aesar	B23144
( <i>S</i> )-1-(3'-Fluorphenyl)ethanol	unb.	Apollo Scientific	PC0608
( <i>R,S</i> )-1-(4'-Fluorphenyl)ethanol	98,0 %	Alfa Aesar	B22097
( <i>S</i> )-1-(4'-Fluorphenyl)ethanol	98,0 %	Apollo Scientific	PC0610
( <i>R,S</i> )-2-Oktanol	> 97,0 %	Merck	820925
( <i>R</i> )-2-Oktanol	99,0 %	Aldrich	147990
( <i>R,S</i> )-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol	> 97,0 %	Fluka	76748

Tabelle A.10: Produkte der Biokatalyse (Fortsetzung)

Produkt	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
(S)-1-(2',3',4',5',6'-Pentafluorphenyl)ethanol	unb.	Interchim	858330
(R,S)-1-Phenylethanol	≥ 96,0%	Fluka	77850
(S)-1-Phenylethanol	≥ 98,5%	Fluka	05512
(R,S)-1-Phenyl-1-propanol	≥ 97,0%	Aldrich	111309
(R)-1-Phenyl-1-propanol	99,0%	Aldrich	256331
(R,S)-1,1,1-Trifluor-2-propanol	97,0%	Aldrich	540323

Tabelle A.11: Ionische Flüssigkeiten

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
[(EO2E)MPL][NTF]	1-(Ethoxycarbonyl)methyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	Merck	IOLI-JE-783
[HMPL][NTF]	1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	Merck	490100
[HPYR][NTF]	N-Hexylpyridinium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	Merck	490124
[(NEMM)EO2E][NTF]	Ethyl-dimethyl-(ethoxycarbonyl)methylammonium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	Merck	IOLI-JE-782
[(P3OH)PYR][NTF]	N-(3-hydroxypropyl)pyridinium bis(trifluormethylsulfonyl)imid	Merck	490264

## A.3 Enzyme

Tabelle A.12: Enzyme

Enzym	Hersteller	Produktnummer
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs	M0289
Cloned <i>Pfu</i> DNA-Polymerase AD	Stratagene	60035
DNase I	New England Biolabs	M0303
Lysozym	Sigma	L6876
Phusion™High-Fidelity PCR-Polymerase	Finnzymes	F-530
Proteinase K	Roth	7528
Restriktionsenzym BamHI	New England Biolabs	R0136

Tabelle A.12: Enzyme (Fortsetzung)

Enzym	Hersteller	Produktnummer
Restriktionsenzym EcoRI	New England Biolabs	R0101
Restriktionsenzym KpnI	New England Biolabs	R0142
Restriktionsenzym NcoI	New England Biolabs	R0193
Restriktionsenzym NdeI	New England Biolabs	R0111
Restriktionsenzym NheI HF	New England Biolabs	R3131
Restriktionsenzym NotI	New England Biolabs	R0189
Restriktionsenzym Sall HF	New England Biolabs	R3138
Restriktionsenzym XhoI	New England Biolabs	R0146
Thrombin	Merck	112374
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs	M0202
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs	M0321

## A.4 Standards und Kits

Tabelle A.13: Standards und Kits

Enzym	Hersteller	Produktnummer
Bicinchonin-Säure ( <i>bicinchoninic acid</i> , BCA)	Pierce	23227
Protein Assay Kit		
Derivatisierungsmethoden-Entwicklungskit	Macherey-Nagel	701952
Desoxynukleotid (dNTP)-Mix	New England Biolabs	N0447S
GST · Tag™ Assay Kit	Novagen	70532-3
kb DNA-Leiter	GenScript	M1010
100 bp DNA-Leiter	GenScript	M1020
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs	N3231
Native Markerproteine	Sigma	-
Perfect Protein Marker, 10-225 kDa	Novagen	69079-3
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12163
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27104
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen	28304
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104
QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	210518
Roti®-Mark Standard	Roth	T851

## A.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden anhand der DNA-Sequenzen der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)-Datenbank konzipiert. Eine Übersicht über die internen Zugriffsschlüssel (*accession numbers*) für die verwendeten DNA- und die daraus resultierenden Protein-Sequenzen befindet sich in Anhang C.2. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt.

**Tabelle A.14:** Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
<u>Klonierung in den pETM-41-Vektor</u>	
pETM41-Amar-For	AGAGATCCCATGGCCATGAATTCATTGCAAGATAAGGTCCG
pETM41-Amar-Rev	AGAGATCGGTACCCTAAGCCATCACCATGCCAC
pETM41-Prcl-For	AGAGATCCCATGGCCATGACATTATCAA AATTACTTG
pETM41-Prcl-Rev	AGAGATCGGTACCTTAACTCATAACCATCCCTC
pETM41-Syn-Fwd	AGAGATCCCATGGCCATGACTGCTTTGCCCTAA
pETM41-Syn-Rev	AGAGATCGGTACCCTAGGCCATCACCAAGCC
pETM41-S555-For	AGAGATCCCATGGCCATGACGACCCACGCCTC
pETM41-S555-Rev	AGAGATCGGTACCTCAGCCCATCACCATGCC
pETM41-Telo-For	AGAGATCCCATGGCCATGAGCGAAACAGCCGTTGC
pETM41-Telo-Rev	AGAGATCGGTACCCTAGGCCATCACCATACCAC
pETM41-29413-For	AGAGATCCCATGGCCATGGCGATCTTAAGTGAAAATTTACG
pETM41-29413-Rev	AGAGATCGGTACCTTAAGCCATTACCATCCCGCCATCG
pETM41-307-For	AGAGATCCCATGGCCATGAGTTCATTGGCACCCCTGG
pETM41-307-Rev	AGAGATCGGTACCCTAGGCCATCACCATCCCACC
pETM41-6803-For	AGAGATCCCATGGCCATGACGGCATTAAACGGCACAGG
pETM41-6803-Rev	AGAGATCGGTACCTTAGAACATTACCATGCCGCCATCC
pETM41-7002-fwd2	AGAGATCCCATGGCCATGGAGCTTTTACCCGCCGC
pETM41-7002-rev2	AGAGATCGGTACCTTAATGCATCACCATCCCGCCATC
pETM41-7120-For	AGAGATCCCATGGCCATGGCAATCTTAAGTGAAAATTTACG
pETM41-7120-Rev	AGAGATCGGTACCTTAAGCCATCACCATACCGCCATCG
pETM41-73102-For	AGAGATCCCATGGCCATGACATTATTACAAGGTAAAGTCCG
pETM41-73102-Rev	AGAGATCGGTACCTTAAGCCATGACCATTCCGCCATCG
pETM41-7421-For	AGAGATCCCATGGCCATGACGGGATTGCTCACAGG
pETM41-7421-Rev	AGAGATCGGTACCTCAGGCCATCACCATGC
pETM41-8106-For	AGAGATCCCATGGCCATGGACGTTTTACCCGAAACC
pETM41-8106-Rev	AGAGATCGGTACCCTAGGCCATCACCATTCCACC

**Tabelle A.14:** Oligonukleotide (Fortsetzung)

Name	Sequenz (5' → 3')
pETM41-8801-For	AGAGATCCCATGGCCATGGCAGACAGTCAAGC
pETM41-8801-Rev	AGAGATCGGTACCTTAAGCCATTACCATGCCAC
<u>Klonierung in den pET21-a(+)-Vektor</u>	
FabG_Sall_For	AGAGATCGTCGACTGATGACTGCTTTGCCCTAAC
FabG_NotI_rev	AGAGATAGCGGCCCGCCTAGGCCATCACCAAGC
FDH_EcoRI_for	GCTAGAATTCATGGCAAAGGTCCTGTGCGTTC
FDH_NotI_rev	GCTAGCGGCCGCTCAGACCGCCTTCTTGAAC
Linker-lf-AP-f	GCCGGAATTCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGC GCCCGCGCCCGCGGAATTCCGGC
Linker-lf-AP-r	GCCGGAATTCCGCGGGCGCGGGCGCGGGCGCGGGCG CGGGCGCGGGCGCGAATTCCGGC
Linker-ls-AP11-f	GCCGGAATTCGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC CCCCCCCCCGCGGAATTCCGGC
Linker-ls-AP11-r	GCCGGAATTCCGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGCGCGAATTCCGGC
Linker-sf-AP-f	GCCGGAATTCGCGCCCGCGCCCGCGGAATTCCGGC
Linker-sf-AP-r	GCCGGAATTCCGCGGGCGCGGGCGCGAATTCCGGC
LMG6PDH_NheI_For	AGAGATCGCTAGCATGGTTTCAGAAATCAAGACG
LMG6PDH_NotI_Rev	AGAGATCGCGGCCGCTTAACCTTTAAACACCCAAGC
LMG6PDH_Sall_For	AGAGATCGTCGACTGATGGTTTCAGAAATCAAGACG
LMG6PDH_BamH_Rev	AGAGATCGGATCCTTACCTTTAAACACCCAAGC
KS_for	AGAGATCCATATGACTGCTTTGCCCTAACCGAT
KS_back1	AGAGATCGAATTCCTAGGCCATCACCAAGCC
Syn_Fshift_For	AGAGATCGAATTCTATGACTGCTTTGCCCTAAC
<u>Klonierung in den pGEX-4T-1-Vektor</u>	
pGEX_RCC556_for	AGAGATGGATCCATGACCACCTCAGCC
pGEX_RCC556_rev	AGAGATGAATTCTCAGCCCATCACCATGC
syn_GST_for1	AGAGATCGAATTCATGACTGCTTTGCCCTAAC
syn_GST_rev1	AGAGATACTCGAGCTAGGCCATCACCAAGC
<u>Ortsgerichtete Mutagenese</u>	
FabG_t747g	GGCTTGGTGATGGCCGAGGAATTCGAGCTCC
FabG_t747g_rev	GGAGCTCGAATTCCTCGGCCATCACCAAGCC

**Tabelle A.14:** Oligonukleotide (Fortsetzung)

Name	Sequenz (5' → 3')
Y39D	GGCCAAGGTTGCGGTGAATGACGCGAGTTC
Y39D_antisense	GAACTCGCGTCATTCACCGCAACCTTGGCC
<u>Sequenzierprimer</u>	
pGex for	ATAGCATGGCCTTTGCAGG
pGex rev	GAGCTGCATGTGTCAGAGG
TEVsite_Fwd	ATGAGCGAGAATCTTTATTTTCAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

## A.6 Puffer

Der pH einer Pufferlösung wurde bei der jeweiligen Verwendungstemperatur eingestellt. Phosphatpufferlösungen wurden nach Holtzhauer (1997) hergestellt. Dazu wurden die mit Gleichung A.1 und Gleichung A.2 errechneten Mengen der Puffersalze in VE-Wasser gelöst. Für Puffer, die bei Proteinreinigungen und Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGEs) zum Einsatz kamen, wurde bidestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Alle Puffer für Proteinreinigungen wurden filtriert (0,22 µm), bei der Verwendung mit einer Benzamidin- oder Gelfiltrationssäule zusätzlich entgast. Instabile Komponenten, wie DTT oder PMSF, wurden jeweils kurz vor der Verwendung hinzugefügt.

$$m_{\text{Monosalz}} = MG_{\text{Monosalz}} \cdot M \cdot x \quad (\text{A.1})$$

$$m_{\text{Disalz}} = MG_{\text{Disalz}} \cdot M \cdot (x - 1) \quad (\text{A.2})$$

$m$	Masse, g
$MG$	Molekulargewicht, g mol <sup>-1</sup>
$M$	Molarität des Puffers, mol L <sup>-1</sup>
$x$	Molenbruch nach Holtzhauer (1997), -

**Tabelle A.16:** Puffer für die Proteinreinigung

<u>HisTrap-Bindepuffer</u>		<u>HisTrap-Elutionspuffer</u>	
Na-Phosphat	50 mM, pH 7,4	Na-Phosphat	50 mM, pH 7,4
Imidazol	20 mM	Imidazol	500 mM
NaCl	500 mM	NaCl	500 mM
<u>TEV-Bindepuffer</u>		<u>TEV-Elutionspuffer</u>	
Na-Phosphat	50 mM, pH 8,0	Na-Phosphat	50 mM, pH 8,0
Imidazol	25 mM	Imidazol	200 mM
NaCl	100 mM	NaCl	100 mM
Glycerin	10 % (v/v)	Glycerin	10 % (v/v)
<u>TEV-Dialysepuffer</u>		<u>Gelfiltrationspuffer</u>	
Na-Phosphat	25 mM, pH 8,0	Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
NaCl	200 mM	NaCl	200 mM
EDTA	2 mM	EDTA	1 mM
DTT	1 mM		
<u>GSTrap-Bindepuffer</u>		<u>GSTrap-Elutionspuffer</u>	
PBS, pH 7,3		Tris-HCl	50 mM, pH 8,0
siehe Tabelle A.17		Glutathion	10 mM
<u>Benzamidin-Bindepuffer</u>		<u>Benzamidin-Elutionspuffer</u>	
Tris-HCl	50 mM, pH 7,4	HCl	10 mM, pH 2,0
NaCl	500 mM	NaCl	500 mM
<u>Niedrigsalzpuffer</u>		<u>Hochsalzpuffer</u>	
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0	Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
PMSF	0,1 mM	PMSF	0,1 mM
		NaCl	3 M

**Tabelle A.17:** Puffer für mikro- und molekularbiologische Arbeiten

<u>DNA-Isolationspuffer I</u>		<u>DNA-Isolationspuffer II</u>	
Tris	100 mM, pH 8,0	Tris	50 mM, pH 8,0
EDTA	50 mM	EDTA	5 mM
NaCl	100 mM	NaCl	50 mM
<u>DNA-Isolationspuffer III</u>		<u>DNA-Isolationspuffer IV</u>	
Tris	10 mM, pH 8,0	Tris	50 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM	EDTA	10 mM
<u>10x TAE-Puffer</u>		<u>1x Phosphate Buffered Saline (PBS)</u>	
Tris	400 mM, pH 8,0	pH 7,3:	
EDTA	10 mM	NaCl	140 mM
Eisessig	1,14 % (v/v)	KCl	2,7 mM
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
<u>CaCl<sub>2</sub>-Lösung</u>		<u>Lysepuffer</u>	
Na-Acetat	3 M, 13,35 mL	Tris-HCl	50 mM, pH 7,5
CaCl <sub>2</sub>	1 M, 100 mL	NaCl	50 mM
mischen, pH 5,5 einstellen, autoklavieren, steril zugeben:		Glycerin	5 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	2,8 M, 25 mL	DTT	1 mM
VE-H <sub>2</sub> O	861 mL	PMSF	1 mM

**Tabelle A.18:** Puffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

<u>2x Sammelgelpuffer</u>		<u>4x Trenngelpuffer</u>	
Tris-HCl	250 mM, pH 6,8	Tris-HCl	1,5 M, pH 8,8
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,8 % (w/v)
<u>5x Laemmlipuffer</u>		<u>10x Laufpuffer</u>	
Tris-HCl	300 mM, pH 6,8	Rotiphorese	10x SDS-PAGE-Puffer
Glycerin	50 % (v/v)	Roth	Produktnummer 3060
SDS	10 % (w/v)	Tris	250 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 % (v/v)	Glycin	1,92 M
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)	SDS	1% (w/v)

**Tabelle A.19:** Puffer für die Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)

<u>2x BN-Probenpuffer</u>		<u>BN-Kathodenpuffer</u>	
Bis-Tris-HCl	100 mM, pH 7,0	Tricin	50 mM, pH 7,0
Glycerin	30 % (v/v)	Bis-Tris-HCl	15 mM
		Coomassie Brilliant Blau G250	0,02 % (w/v)
<u>BN-Anodenpuffer</u>		<u>3x BN-Gelpuffer</u>	
Bis-Tris-HCl	50 mM, pH 7,0	Bis-Tris-HCl	150 mM, pH 7,0
		$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	1,5 M

Neben dem blauen BN-Kathodenpuffer wurde zusätzlich ein farbstofffreier BN-Kathodenpuffer hergestellt.

**Tabelle A.20:** Puffer für die Coomassie- und Silberfärbung

<u>Fairbanks A</u>		<u>Fairbanks B</u>	
Isopropanol	25 % (v/v)	Isopropanol	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)	Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Brilliant Blau R250	0,05 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R250	0,005 % (w/v)
<u>Fairbanks C</u>		<u>Silberfixierlösung 1</u>	
Essigsäure	10 % (v/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
		Ethanol	30 % (v/v)
<u>Silberfixierlösung 2</u>		<u>Silberfärbelösung</u>	
Na-Acetat	400 mM, pH 6,0	AgNO <sub>3</sub>	6 mg L <sup>-1</sup>
Essigsäure	0,5 % (v/v)	Formaldehyd	0,025 % (v/v)
Ethanol	30 % (v/v)		
Frisch hinzufügen:		<u>Entwicklungslösung</u>	
Glutaraldehyd	2 mL	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,1 g	Formaldehyd	0,04 % (v/v)
<u>Stopplösung</u>			
EDTA	50 mM, pH 7,5		

**Tabelle A.21:** Puffer für die Isolation und Rückfaltung von Einschlusskörpern

4x Membranextraktionspuffer		Waschpuffer I	
Triton X-100	6 % (v/v)	Tris-HCl	50 mM, pH 7,5
NaCl	1,5 M	NaCl	50 mM
EDTA	60 mM	Triton X-100	1 % (v/v)
		GdmCl	1 M
Waschpuffer II		Solubilisierungspuffer	
Tris-HCl	50 mM, pH 7,5	Tris	50 mM, pH 7,5
NaCl	50 mM	GdmCl	6 M
		DTT	1 mM
		PMSF	1 mM

## A.7 Medien

**Tabelle A.22:** Medien für die Kultivierung von *Escherichia coli*

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>	
	Luria broth (LB)	Terrific broth (TB)
Pepton	10,0	12,0
Hefeextrakt	5,0	24,0
NaCl	5,0	-
Glycerin	-	5,04
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	2,13
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	12,54
pH	7,2	7,2

Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurden 15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar hinzugegeben. Je nach Antibiotikaresistenz wurden zur Selektion sterilfiltriertes Ampicillin (100 mg L<sup>-1</sup>), Chloramphenicol (34 mg L<sup>-1</sup>), Kanamycin (34 mg L<sup>-1</sup>) oder Kombinationen daraus zugesetzt.

Bei der Herstellung von Medien für Cyanobakterien wurden von allen Komponenten mit Konzentrationen unter 1 mM 1000-fach konzentrierte Vorratslösungen angesetzt, von NaNO<sub>3</sub> eine 100-fach konzentrierte Lösung. Die restlichen Salze wurden jeweils frisch eingewogen. Der EDTA-Na<sub>2</sub>/FeCl<sub>3</sub>-Komplex (2 mM) wurde hergestellt, indem 270 mg FeCl<sub>3</sub> und 372 mg Na<sub>2</sub>-EDTA in 10 mL HCl (0,1 M) bzw. 10 mL NaOH (0,1 M) gelöst wurden. Anschließend

wurden beide Lösungen gemischt und mit sterilem VE-Wasser auf ein finales Volumen von 500 mL aufgefüllt (Skulberg, 1990). Bei obligatem Vitamin B<sub>12</sub>-Bedarf wurden 10 µg L<sup>-1</sup> sterilfiltriert hinzugegeben. Die Herstellung von Schrägagarröhrchen bzw. Agarplatten erfolgte mit 15,0 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar.

**Tabelle A.23:** Medien für die Kultivierung von Cyanobakterien

Komponente	Konzentration, mM		
	BG-11 Allen (1968)	ASN-III Rippka <i>et al.</i> (1979)	PCR-Tu <sub>2</sub> Rippka <i>et al.</i> (2000)
NaCl	-	427,0	480,0
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	-	9,8	27,0
KCl	-	6,7	9,0
NaNO <sub>3</sub>	17,65	8,8	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,14	0,07	-
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,30	14,2	28,0
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,25	3,4	10,0
Zitronensäure	0,03	0,015	-
Ammonium Eisen(III)-citrat	0,03	0,015	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	0,4
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,003	0,0015	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,19	0,19	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	2,0
HEPES-NaOH, pH 7,5	-	-	1,0
Na-Phosphat, pH 7,5	-	-	0,05
EDTA-Na <sub>2</sub> /FeCl <sub>3</sub>	-	-	0,008
Spurenelemente A5+Co	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,05 % (v/v)
pH	7,4	7,5	7,5

**Tabelle A.24:** Spurenelementmischung A5+Co

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,860
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1,810
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,390
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,049

## Anhang B

### Kinetische Parameter

#### B.1 Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien

**Tabelle B.1:** Kinetische Parameter der Ganzzellbiotransformationen mit Cyanobakterien und 2',3',4',5'-Pentafluoracetophenon als Substrat. n.b. = nicht bestimmt

Cyanobakterium	$V_{\max}$ (U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$K_{iu}$ (mM)
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	1,62 ± 0,15	1,62 ± 0,71	-
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	0,01 ± 0,00	n.b.	n.b.
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,61 ± 0,12	0,27 ± 0,17	11,49 ± 6,73
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	0,58 ± 0,03	1,47 ± 0,21	-
<i>Synechococcus</i> RCC 307	0,35 ± 0,02	2,01 ± 0,31	-
<i>Synechococcus</i> RCC 555	0,61 ± 0,05	1,28 ± 0,27	-
<i>Synechococcus</i> RCC 556	0,39 ± 0,02	1,19 ± 0,17	-
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	0,16 ± 0,00	6,50 ± 0,46	-
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	0,05 ± 0,00	2,24 ± 0,47	-
<i>Anabaena variabilis</i>	4,25 ± 0,54	0,62 ± 0,18	5,81 ± 1,27
<i>Nostoc</i> PCC 7120	0,23 ± 0,01	1,78 ± 0,51	-
<i>Nostoc</i> PCC 73102	0,79 ± 0,05	0,09 ± 0,09	-
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	0,20 ± 0,10	8,53 ± 9,99	-
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	2,02 ± 0,90	2,84 ± 1,71	2,84 ± 1,71
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Acaryochloris marina</i>	1,10 ± 0,10	0,31 ± 0,06	1,70 ± 0,22

## B.2 Enzymkinetiken mit 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon als Substrat

**Tabelle B.2:** Kinetische Parameter der Reduktion von 2',3',4',5',6'-Pentafluoracetophenon durch cyanobakterielle Ketoreduktasen. n.b. = nicht bestimmt

KR aus	$v_{\max}$ (U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	0,91 ± 0,02	5,41 ± 0,49
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,01 ± 0,00	n.b.
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	0,17 ± 0,01	16,37 ± 3,73
<i>Synechococcus</i> RCC 307	6,13 ± 0,19	5,33 ± 0,70
<i>Synechococcus</i> RCC 555	0,58 ± 0,01	16,50 ± 8,60
<i>Synechococcus</i> RCC 556	0,35 ± 0,01	4,11 ± 0,42
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	0,25 ± 0,00	8,07 ± 1,33
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	0,01 ± 0,00	8,45 ± 1,85
<i>Anabaena variabilis</i>	0,16 ± 0,01	7,76 ± 0,90
<i>Nostoc</i> PCC 7120	0,17 ± 0,00	6,89 ± 0,59
<i>Nostoc</i> PCC 73102	0,24 ± 0,02	12,79 ± 3,14
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	0,12 ± 0,00	20,65 ± 2,20
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	0,01	n.b.
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	0,02	n.b.
<i>Acaryochloris marina</i>	0,03 ± 0,00	9,23 ± 1,46

## B.3 Enzymkinetiken mit Ethyl-4-chloracetoacetat als Substrat

**Tabelle B.3:** Kinetische Parameter der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat durch cyanobakterielle Ketoreduktasen. n.b. = nicht bestimmt

KR aus	$v_{\max}$ (U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	256,10 ± 15,49	16,48 ± 2,42
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,64 ± 0,04	36,26 ± 4,93
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	12,54 ± 1,03	14,11 ± 2,34
<i>Synechococcus</i> RCC 307	110,07 ± 9,83	18,60 ± 3,98
<i>Synechococcus</i> RCC 555	92,55 ± 6,22	14,80 ± 2,57
<i>Synechococcus</i> RCC 556	47,65 ± 2,98	10,90 ± 2,10
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	16,57 ± 0,30	20,88 ± 4,09

**Tabelle B.3:** Kinetische Parameter der Reduktion von Ethyl-4-chloracetoacetat durch cyanobakterielle Ketoreduktasen. n.b. = nicht bestimmt (Fortsetzung)

KR aus	$v_{\max}$ (U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	10,07 ± 0,29	14,62 ± 3,95
<i>Anabaena variabilis</i>	21,23 ± 0,58	1,52 ± 0,18
<i>Nostoc</i> PCC 7120	23,19 ± 1,11	4,39 ± 0,90
<i>Nostoc</i> PCC 73102	140,88 ± 9,03	20,43 ± 3,04
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	11,23 ± 1,03	12,75 ± 1,67
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	0,08	n.b.
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	0,10	n.b.
<i>Acaryochloris marina</i>	1,67 ± 0,15	24,00 ± 4,49

## B.4 Enzymkinetiken mit Ethylbenzoylacetat als Substrat

**Tabelle B.4:** Kinetische Parameter der Reduktion von Ethylbenzoylacetat durch cyanobakterielle Ketoreduktasen. n.b. = nicht bestimmt

KR aus	$v_{\max}$ (U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	8,12 ± 0,70	5,31 ± 1,32
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,00	-
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	1,36 ± 0,06	14,25 ± 2,97
<i>Synechococcus</i> RCC 307	4,91 ± 0,27	2,96 ± 0,75
<i>Synechococcus</i> RCC 555	0,21 ± 0,01	1,00 ± 0,29
<i>Synechococcus</i> RCC 556	0,03 ± 0,00	n.b.
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	0,76 ± 0,06	9,21 ± 3,10
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	1,34 ± 0,05	1,34 ± 0,05
<i>Anabaena variabilis</i>	1,67 ± 0,03	3,00 ± 0,30
<i>Nostoc</i> PCC 7120	1,70 ± 0,04	1,97 ± 0,21
<i>Nostoc</i> PCC 73102	2,53 ± 0,13	2,52 ± 0,13
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	0,30 ± 0,02	4,05 ± 1,95
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	0,01	n.b.
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	0,01	n.b.
<i>Acaryochloris marina</i>	0,06 ± 0,00	n.b.

## B.5 Enzymkinetiken mit 4'-Chloracetophenon als Substrat

**Tabelle B.5:** Kinetische Parameter der Reduktion von 4'-Chloracetophenon durch cyanobakterielle Ketoreduktasen. n.b. = nicht bestimmt

KR aus	$v_{\max}$ (U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	0,43 ± 0,03	20,38 ± 3,61
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0,00	-
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	0,06 ± 0,00	6,07 ± 1,07
<i>Synechococcus</i> RCC 307	0,23 ± 0,00	17,16 ± 2,57
<i>Synechococcus</i> RCC 555	0,03 ± 0,00	4,07 ± 0,67
<i>Synechococcus</i> RCC 556	0,01 ± 0,00	n.b.
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	0,09 ± 0,00	7,35 ± 0,66
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	0,01 ± 0,00	3,55 ± 0,53
<i>Anabaena variabilis</i>	0,01 ± 0,00	11,42 ± 2,68
<i>Nostoc</i> PCC 7120	0,07 ± 0,00	11,89 ± 2,38
<i>Nostoc</i> PCC 73102	0,04 ± 0,00	4,37 ± 0,38
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	0,02 ± 0,00	14,71 ± 3,08
<i>Prochlorococcus</i> NATL1	0,002	n.b.
<i>Prochlorococcus</i> NATL2	0,002	n.b.
<i>Acaryochloris marina</i>	0,02 ± 0,00	15,74 ± 1,81

## Anhang C

### Sonstiges

#### C.1 Löslichkeiten

**Tabelle C.1:** Maximale Löslichkeit verschiedener Ketone in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) bei Raumtemperatur

Substrat	Löslichkeit	Substrat	Löslichkeit
Acetophenon	36,8 mM	Ethylbenzoylacetat	10,6 mM
$\alpha$ -Chloracetophenon	3,3 mM	3'-Fluoracetophenon	13,9 mM
4'-Chloracetophenon	5,8 mM	4'-Fluoracetophenon	15,0 mM
5-Chlor-2-pentanon	97,1 mM	2-Heptanon	78,3 mM
Ethylacetoacetat	583,5 mM	2-Oktanon	5,2 mM
Ethyl-4-chloracetoacetat	201,0 mM	2',3',4',5',6'-Pentafluor- acetophenon	4,3 mM
Ethyl-4,4,4-trichloracetoacetat	61,0 mM	Propiophenon	25,6 mM
Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat	512,8 mM		

1,1,1-Trifluoraceton ist mit Wasser mischbar (Datenblatt). Für Diisobutylketon wurde keine GC-Methode entwickelt, da der korrespondierende Alkohol achiral ist. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 3,5 mM (Datenblatt). Die Löslichkeit des Alkohols Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat in Puffer wurde von Engelking (2004) zu 759 mM bestimmt.

#### C.2 Zugriffsschlüssel für DNA- und Proteinsequenzen

**Tabelle C.2:** Zugriffsschlüssel der NCBI-Datenbank für die DNA- und Proteinsequenzen

Protein	DNA-Zugriffsschlüssel	Protein-Zugriffsschlüssel
3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase aus:		
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	NC_007604	YP_399703
<i>Cyanothece</i> PCC 8801	NC_011726	YP_002374344
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	NC_000911	NP_440934

**Tabelle C.2:** Zugriffsschlüssel der NCBI-Datenbank für die DNA- und Proteinsequenzen (Fortsetzung)

Protein	DNA-Zugriffsschlüssel	Protein-Zugriffsschlüssel
<i>Thermosynechococcus</i> BP-1	NC_004113	NP_682292
<i>Synechococcus</i> RCC 307	NC_009482	YP_001226937
<i>Synechococcus</i> RCC 555	NZ_AAUA01000001	ZP_01470732
<i>Synechococcus</i> RCC 556	NZ_AANP01000002	ZP_01079595
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	NC_010475	YP_001735600
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	NC_005125	NP_926452
<i>Anabaena variabilis</i>	NC_007413	YP_324264
<i>Nostoc</i> PCC 7120	NC_003272	NP_485934
<i>Nostoc</i> PCC 73102	NC_010628	YP_001865860
<i>Lyngbya</i> PCC 8106	NZ_AAVU01000036	ZP_01623074
<i>Prochlorococcus</i> RCC 158	NC_008819	YP_001014335
<i>Prochlorococcus</i> RCC 314	NC_007335	YP_292976
<i>Acaryochloris marina</i>	NC_009925	YP_001519901
Formiatdehydrogenase aus:		
<i>Mycobacterium vaccae</i>	AB072394 <sup>a</sup>	BAB69476 <sup>a</sup>
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus:		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	M64446 <sup>a</sup>	1DPG_A

<sup>a</sup>Zugriffsschlüssel der GenBank-Datenbank

### C.3 Sequenzvergleich der cyanobakteriellen Kettoreduktasen

YP_399703	----MTALP	LTDRIALVTG	ASRGIGRAIA	LELAAAGAKV	AVNYASSAGA	ADEVVAAIAA	AGGEFAVKA
YP_002374344	----MADSQL	.SEQV.I...	.....K...	.A..SQ..L..	V....R.SS.	.E.L.Q..IN	S....I..QG
NP_440934	-----MTA	..AQV.....	.....K.T.	.A...T.M..	V....Q.ST.	..A...E.I.	N....I..Q.
NP_682292	-----M	SETAV.I...	.....K.E..T.	V....R..E.	.L...QR.EQ	Q..T.I..IA.	
YP_001226937	----MSSLA.	.AGQ.....	.....Q..E...E.	V.....D.	.EQ..S..T.	...S.Y.L..	
ZP_01470732	---MT.HAS	.AGQT.....	.....V.	QA..E...E.	V.....PD.	.ES..NE.T.	...K.Y.LQ.
ZP_01079595	---MT.SA.	M.GQT.I...	.....CV.	.A..D...E.	V....R..E.	.EA...E.LE	...Q.Y.L..
YP_001735600	MELLPAAQQR	.K.QV.I...	.....K.T.	IT..TE...	VI...R.SA.	.EAL..E.Q.	.....I.LQ.
NP_926452	-----MTGL	..GKV.....	.G.....C.	.A..SE..A.	...SR.EE.	.QQ.....E.	...Q.V.L..
YP_324264	---MAILSEN	.RGQV.V...	.....NY..T.	V.....ST.	.....E.TG	....V.LQ.	
NP_485934	---MAILSEN	.RGQV.V...	.....NY..T.	V.....ST.	.....E.TG	....V.L..	
YP_001865860	-----MTL	.QGKV.I...	.....K...	I..SQ..IA	V.....SA.	.EA..TE.T.	V..Q.I..IQ.
ZP_01623074	MDVLPE.QQH	.KEQV.I...	.....IA..SL..NI	V.....S..	...L.EE.TN	S..N.I.LC.	
YP_001014335	---MTLSKL	.EGQT.I...	.....K...	IF..KE..E.	II..S..LEN	.NK..SE.NS	F..K.YPLQ.
YP_292976	---MTLSKL	.EGQT.I...	.....K...	IF..KE..E.	II..S..LEN	.NK..SE.NS	F..K.YPLQ.
YP_001519901	-----MNS	.Q.KV.I...	.....T.	.A..GE....	.I...N.S..	..A...E.TG	Q....L.LQ.
Identität			*:*** *..***:.*	** *	:**:*	*:* *	** * :.

### C.3 Sequenzvergleich der cyanobakteriellen Ketoreduktasen

YP_399703	DVSQESEVEA	LFAAVIERWG	RLDVLVNNAG	ITRDTLRLM	KRDDWQSVLD	LNIGGVFLCS	RAAAKIMLKQ
YP_002374344	.KTE..DT	.IQTTLDKF	.I.....	.....M..	.LEQ..E.I	...T....V	K.VT.T....
NP_440934	N.ANAD..DQ	.IKTTLDKFS	.I.....	.....	.LE...A.I	...T....T	K.VS.L....
NP_682292	...VPEQ.DT	.V.KTV.TY	.V.....	.....	SLE...A.IN	...T....T	..VS.L....
YP_001226937	.....DQ..Q	.M...L.KS	.I...I...	....G..M..	.TP...A...	...S....T	..VTRT....
ZP_01470732	N.AD.DA.DG	.IKT.L..S	.I.....	....G..M..	.TA....I...	...T....T	..VTRP....
ZP_01079595	..AE.HA...	MVKTAL..S	.I...I...	....G..M..	.T...A.IN	...T....T	..VTRT....
YP_001735600	.....DQ.ND	.VEKTLAQ.D	QI..I.....	.K...M...	.L.A..A.I	...T....T	K.VT.P.M.K
NP_926452	..ADPEQ..R	...DLLAKY	..A.....	....G..I..	SLE..ND.VS	...T.T...L	K..SR.....
YP_324264	.....VDQ.DN	.IDGA.DKFK	HI..I.....	.....	.PE...A.I	...T....T	..VS.L....
NP_485934	...VEQ.DN	.INGA.DKFK	.I..I.....	.....	.PE...A.I	...T....T	..VS.L....
YP_001865860	...KGDQ.D	.VN..M.KFS	.V..I.....	.....L	.PE...A.I	...T....T	..VS.....
ZP_01623074	...AEQ.DT	.INT.M.K..	.V..I.....	.....	.PEE..A.I	...T....T	..VS.....K
YP_001014335	.I.N.NS.ND	.IKT.L.KNN	KI.....	.K.G..M..	.T...K...	...S...Y.T	..VSRQ....
YP_292976	.I.N.NS.NE	.IKT.L.KNN	KI.....	.K.G..M..	.T...K...	...S...Y.T	..VSRQ....
YP_001519901	N.AEADQ.DT	..KT.LDK..	.A.....	.....	.PE...A.IN	...T...Y..T	..VS.V....
Identität	::: * : :	: * * : * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *
YP_399703	RSGRIINIAS	VVGEMGNPGQ	ANYSAKAGV	IGLTKTVAKE	LASRGITVNA	VAPGFIATDM	TSELAA-EKL
YP_002374344	K.....T	.S.L.....	.....	.....V...	.....T...	.....	..DIKS-.EI
NP_440934	K.....T	.A.M.....	.....	.F.....V...	.....	.....	.EN.N-.PI
NP_682292	KR.....	.A.Q.....	.....	.FS.....	.....	.....	.A.K-.DI
YP_001226937	KQ.....T	..L..A..	..A.....	.F..ST.R.	.....	.....	.KD...-A
ZP_01470732	K.....T	..L..A..	..A.....	V..RSA..M	.....	.....	.KD.D.-DGI
ZP_01079595	K.....T	..L..A..	..A.....	V..RSA..M	.....	.....	.KD.D.-GI
YP_001735600	.R.....T	.A.L.....	.....	.F.....N.V..	.....T...	.....	.EG.E.-DEI
NP_926452	...VV..S	TS.VA..A	.....	L..RSA.R.	.G.....	.....	..A.EL-.PI
YP_324264	.....T	.A.Q.....	.....	.F.....	.....	.....	..N.KS-.GI
NP_485934	.....T	.A.Q.....	.....	.F.....	.....	.....	..N.KS-.GI
YP_001865860	.....T	.A.Q.....	S.....	.F..S...	.T.....T...	.....	..D.NNP.DI
ZP_01623074	.....T	.A.Q.....	.....	.F.....	.....	.....	.KD.KNT.EI
YP_001014335	KK.....T	..L.....	.....	V...QSA..F	.....S...	.....	.KD.DS-.SI
YP_292976	KK.....T	..L.....	.....	V...QSA..F	.....S...	.....	.KD.NS-.SI
YP_001519901	.....T	.A.Q.....	.....	.F.....M...V..	.....	.....	.EG.GS-.EI
Identität	: * * : * * * *	: * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *
YP_399703	LEVIPLGRYG	EAAEVAGVVR	FLAADPAAAY	ITGQVINIDG	GLVMA		
YP_002374344	IKF.....	MPE...M..	..T...S	....F.V..	.M...		
NP_440934	.QF...A...	QPE...TI	.....	...TF.V..	.M..F		
NP_682292	.KF.....	.PT...M..	..L.....	....F.V..	.M...		
YP_001226937	.NA.....	.VD...A..	.....	....LQV..	.M...		
ZP_01470732	.AA...SF	TPEHI..T	.....	....LQV..	.M..G		
ZP_01079595	.AA...F	NPDQ..A..	.....	....LQV..	.M..G		
YP_001735600	.KY.....	QPE..I..MI	.....	...TF.V..	.M..H		
NP_926452	.AQV..R.V	QPE...L..C	.....	....T...	.M...		
YP_324264	.QY.....	QPE..I..M	.....	....F.V..	.M...		
NP_485934	.QY.....	QPE..I..M	.....	....F.V..	.M...		
YP_001865860	.KY...F	QPE...M..N	.....	....F.V..	.M...		
ZP_01623074	.KF.....	QPQ...M..S	.....	....F.V..	.M...		
YP_001014335	.SA...F	NPED..A..S.S	.....	....QV..	.M..S		
YP_292976	.SA...F	NPED..A.K.S.S	.....	....QV..	.M..S		
YP_001519901	IKF.....	QPE...MI	.....S	....F.V..	.M...		
Identität	: * * * * *	: * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *	: * * * * * * * *

**Abbildung C.1:** Sequenzvergleich der cyanobakteriellen Ketoreduktasen im Einbuchstaben-code (Tabelle 9.2). Die Beschriftung richtet sich nach dem Datenbank-Zugriffsschlüssel aus Tabelle C.2. Sequenzunterschiede sind im Einbuchstaben-code eingetragen, während Sequenzidentitäten als Punkte markiert sind. Die letzte Zeile betrachtet die Identität der Aminosäuren in allen Sequenzen. Hierbei markiert ein Asterisk identische Aminosäuren, ein bzw. zwei Punkte einen semi-konservativen bzw. konservativen Austausch.