

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

## Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

### **Gestaltung des Cosubstrat-Bindevhaltens von Enreduktasen für asymmetrische Synthesen**

**Christoph Mähler**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Lieleg  
Prüfer: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Prof. Dr. Kathrin Castiglione  
3. Prof. Dr. rer. nat. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 24.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 01.09.2019 angenommen.



*„Im Laufe des Lebens verliert alles seine Reize wie seine Schrecken; nur eines hören wir nie  
auf zu fürchten: das Unbekannte“*

Marie von Ebner-Eschenbach



## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Betreuung von Prof. Dr. Kathrin Castiglione und Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Finanziell wurde die Dissertation vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz im Rahmen des ‚BayBiotech‘ Projektverbundes Ressourcenschonende Biotechnologie unterstützt. Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken möchte!

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kathrin Castiglione für die hervorragende Betreuung bedanken. Ich hatte stets das Gefühl gefordert und gefördert zu werden, Unterstützung zu erhalten, wenn ich diese benötigte, sowie die Freiheit zu genießen, dieses Forschungsvorhaben nach meinen Vorstellungen zu gestalten. Durch ihr lösungsorientiertes Denken, ihre umfangreiche Erfahrung und ihre stets konstruktive Kritik hat sie nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit, sondern auch sehr zu meiner persönlichen Weiterentwicklung während des Forschungsvorhabens beigetragen.

Auch bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Ich bin mit Fragen stets auf offene Ohren gestoßen und durch seine Fähigkeit Möglichkeiten und offene Fragestellungen zu erkennen, hat er ebenfalls sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei dem Koreferenten Prof. Dr. Johannes Buchner und bei dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Oliver Lieleg bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, sowie der Professuren für Systembiotechnologie und Selektive Trenntechnik bedanke ich mich herzlich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und das großartige Arbeitsklima. Bei Andreas Schmieder, Christian Burger, Ingmar Polte und Dominik Schäfer möchte ich mich zusätzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Bioprozesse bedanken. Für die Hilfe bei der Erstellung der Homologiemodelle möchte ich Andreas Tosstorff und Johannes Hermann danken. Darüber hinaus bedanke ich mich insbesondere bei meinen Kollegen Ingmar Polte, Christian Burger, Dominik Schäfer, Johannes Hermann und Ljubomir Grozdev, sowie bei meiner Schwester Barbara Mähler für das Korrekturlesen und die wertvollen fachlichen Hinweise bei der Anfertigung meiner Dissertation. Des Weiteren möchte ich den aktuellen und ehemaligen Festangestellten des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik Marlene Schocher, Gabriele Herbrink, Ellen Truxius, Markus Amann, Florian Sedlmaier, Georg Kojro und Norbert Werth für die Zusammenarbeit danken.

Bei James Bostick, Michelle Ebersberger, Stefan Vinnenberg, Ludwig Kübelsbeck, Sebastian Urzinger, Maurits Brinkman, Melina Vogel, Tom Paturet, Felix Schöpf, Sophie von Schönberg, David Auber, Fereshteh Sadeqi, Franziska Kratzl, Konstantin Wolf, Konstantina Efthymia

Xypolia Vasila, Stephanie Grümbel, Melanie Knesebeck und Simone Rothmiller bedanke ich mich für die vielseitige Unterstützung im Labor.

Zuletzt gilt mein größter Dank meiner Freundin Sabine Wagner für den bedingungslosen Rückhalt und die entgegengebrachte Unterstützung während der vergangenen Jahre.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
3.1	Enzymkatalyse in der organischen Synthese .....	5
3.1.1	Vorteile enzymkatalysierter Synthesen .....	5
3.1.2	Hürden enzymkatalysierter Synthesen.....	6
3.1.3	Enzymklassen.....	6
3.1.4	Oxidoreduktasen als industrielle Biokatalysatoren .....	7
3.1.5	Cosubstratregenerierung .....	9
3.2	<i>Enzyme Engineering</i> .....	11
3.2.1	Austausch von <i>Loop</i> -Regionen als Optimierungsstrategie .....	11
3.2.2	Änderung der Cosubstratspezifität .....	13
3.2.3	Änderung der Cosubstratspezifität durch den Austausch von <i>Loop</i> - Regionen .....	16
3.3	Die Enzymfamilie der Enreduktasen (ER) .....	18
3.3.1	Phylogenetische Einordnung .....	19
3.3.2	Physiologische Rolle.....	21
3.3.3	Struktur .....	22
3.3.4	Aufbau des aktiven Zentrums .....	25
3.3.5	Mechanismus der ER-katalysierten <i>trans</i> -Hydrierung .....	28
3.3.6	<i>Enzyme Engineering</i> bei ER .....	31
3.3.7	Enreduktase 1 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC7120 ( <i>NostocER1</i> ) .....	34
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
4.1	Allgemeines und biologisches Material .....	37
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	37
4.2.1	Isolation von DNS .....	37
4.2.2	Amplifikation von DNS-Fragmenten.....	37
4.2.3	Ortsgerichtete Mutagenese .....	40
4.2.4	Bestimmung der DNS-Konzentration .....	40
4.2.5	Agarosegelelektrophorese .....	40
4.2.6	Restriktion und Ligation von DNS .....	40
4.2.7	Assemblierung nach Gibson .....	41
4.2.8	Präparation kompetenter <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )-Zellen .....	41
4.2.9	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	42

4.2.10	Sequenzierung von DNS .....	42
4.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	42
4.3.1	Stammhaltung .....	42
4.3.2	Bestimmung der Zellkonzentration.....	43
4.3.3	Vorkulturherstellung.....	43
4.3.4	Heterologe Expression von Proteinen im Schüttelkolben.....	44
4.3.5	Heterologe Expression von Proteinen im Bioreaktor.....	44
4.3.6	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	47
4.4	Isolation und Analytik von Proteinen.....	48
4.4.1	Metallaffinitätschromatographie .....	48
4.4.2	Größenausschlusschromatographie .....	48
4.4.3	Pufferaustausch.....	49
4.4.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	49
4.4.5	Proteinquantifizierung.....	50
4.5	Enzymcharakterisierung .....	50
4.5.1	Photometrische Messung der Enzymaktivität.....	50
4.5.2	Auswertung photometrischer Messdaten .....	52
4.5.3	Gaschromatographische Messung der Enzymaktivität.....	53
4.5.4	Bestimmung des enzymgebundenen Flavinmononukleotid (FMN).....	54
4.5.5	Bestimmung der Thermostabilität .....	55
4.5.6	Bestimmung des pH-Optimums .....	55
4.6	Analytische Methoden .....	56
4.6.1	Gaschromatographische Quantifizierung von cyclischen Monoterpenoiden.....	56
4.6.2	Bestimmung der Diastereomerenüberschüsse .....	57
4.7	Biotransformationen von ( <i>R</i> )-Carvon .....	58
4.7.1	Ganzzellbiotransformationen im Rührkesselreaktor.....	58
4.7.2	Biotransformation im mL-Maßstab .....	59
4.8	Statistik.....	59
4.9	Software .....	60
4.9.1	Erstellen von Homologiemodellen.....	60
4.9.2	Verwendete Software .....	60
<b>5</b>	<b>Analyse der NostocER1</b> .....	<b>63</b>
5.1	Primärstruktur.....	63
5.2	Reaktivität.....	64
5.2.1	Aktivität mit NAD(P)H .....	64
5.2.2	Enzymkinetische Parameter .....	65



5.2.3	Aktivität mit ( <i>R</i> )-Carvon.....	66
5.3	Einflussfaktoren der Expression in <i>E. coli</i> auf die Enzymaktivität.....	68
5.3.1	Variation der Expressionstemperatur.....	68
5.3.2	Variation des Sauerstoffeintrags.....	70
5.4	Thermische Inaktivierung.....	71
5.5	pH-Optimum.....	73
5.6	Diskussion.....	74
<b>6</b>	<b>Gestaltung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1</b>	<b>79</b>
6.1	Singuläre <i>Loop</i> -Austausche.....	79
6.1.1	Identifizierung interagierender <i>Loop</i> -Regionen.....	79
6.1.2	Aktivität mit NADH.....	81
6.1.3	Enzymkinetische Parameter.....	83
6.1.4	Aktivität mit NADPH.....	86
6.1.5	Aktivität mit ( <i>R</i> )-Carvon.....	88
6.1.6	Diskussion.....	90
6.2	Multiple <i>Loop</i> -Austausche.....	93
6.2.1	Aktivität mit NADH.....	93
6.2.2	Enzymkinetische Parameter.....	95
6.2.3	Aktivität mit NADPH.....	98
6.2.4	Aktivität mit ( <i>R</i> )-Carvon.....	99
6.2.5	Diskussion.....	102
6.3	Weitergehende Untersuchung ausgewählter Aminosäurepositionen.....	104
6.3.1	Glutamin an Position 30 (Q30).....	105
6.3.2	Alanin an Position 57 (A57).....	110
6.3.3	Doppelmutationen.....	112
6.3.4	Diskussion.....	114
<b>7</b>	<b>Biotransformation mit neu gestalteten NostocER1</b>	<b>117</b>
7.1	Reduktion von ( <i>R</i> )-Carvon.....	118
7.1.1	Konstruktion der <i>E. coli</i> -Stämme.....	119
7.1.2	Ganze Zellen.....	120
7.1.3	Geklärte Lysate.....	121
7.2	Biokatalysatorproduktion im Rührkesselreaktor.....	122
7.3	Biotransformation von ( <i>R</i> )-Carvon in 15 mL-Reaktionsgefäßen.....	127
7.4	Biotransformation von ( <i>R</i> )-Carvon im Rührkesselreaktor.....	129
7.5	Diskussion.....	132
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>137</b>

---

<b>9</b>	<b>Ausblick</b>	<b>143</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>12</b>	<b>Anhang</b>	<b>162</b>
12.1	Allgemeines Material .....	162
12.1.1	Geräte .....	162
12.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	165
12.1.3	Biologisches Material.....	166
12.1.4	Chemikalien.....	167
12.1.5	Enzyme, Standards und <i>Kits</i> .....	169
12.1.6	Oligonukleotide.....	170
12.1.7	Gen- und Proteinsequenzen .....	176
12.1.8	Puffer und Medien .....	180
12.2	Ermittelte Daten.....	184
12.2.1	Originaldaten .....	184
12.2.2	Kapitel 5 .....	189
12.2.3	Kapitel 6 .....	192
12.2.4	Kapitel 7 .....	203

# 1 Einleitung

Seit der Antike werden Enzyme aus natürlichen Quellen in der Produktion von Nahrungsmitteln wie beispielsweise Käse, Sauerteig, Wein und Essig verwendet. Darüber hinaus fanden sie Anwendung bei der Herstellung von Bedarfsgütern, wie Leder, Indigo und Leinen. All diese Prozesse basierten auf Enzymen, die entweder durch spontan wachsende Mikroorganismen bereitgestellt oder durch die Zugabe verschiedener Präparationen beigemischt wurden. Letzteres war beispielsweise die Verwendung von Kälberlab oder Papayafrüchten. All diese Anwendungen hatten gemeinsam, dass die Enzyme weder in reiner noch in einer gut verstandenen Form verwendet wurden. (Kirk et al. 2002)

Im Laufe der vergangenen zwei Jahrhunderte ermöglichte die Entwicklung von spezifischen Bioprozessen eine gezieltere Herstellung von Enzymen. Durch die Selektion verschiedener Produktionsstämme konnten zum ersten Mal auch große Mengen definierter und gut charakterisierter Enzympräparationen bereitgestellt werden. In diesem Kontext wurde 1874 im dänischen Kopenhagen von Christian Hansen das bis heute agierende gleichnamige Unternehmen (Chr. Hansen) gegründet, welches die ersten definierten Enzymmischungen für die Käseindustrie produzierte. Diese Entwicklung bereitete den Weg für die Einführung großtechnischer enzymkatalysierter Reaktionen in verschiedenen Industriezweigen. (Bornscheuer & Buchholz 2005)

Trotz dieser lange zurückliegenden ersten industriellen Anwendungen von Enzymen führte erst die in den 1970igern aufkommende Gentechnik zu einer enormen Verbreiterung der Einsatzmöglichkeiten von Biokatalysatoren. Durch den Einsatz rekombinanter Mikroorganismen war es möglich die Produktionskosten von Enzymen deutlich zu reduzieren (Bornscheuer et al. 2012). Dies zeigt sich heute an der Tatsache, dass mit Ausnahme der Nahrungsmittelindustrie fast alle als Biokatalysatoren genutzten Enzyme rekombinant hergestellt werden (Buchholz et al. 2012). Neben der Senkung der Produktionskosten brachte die moderne Biotechnologie auch die Möglichkeit, Enzyme zu verändern. Hierdurch wurde es nicht nur ermöglicht diese Biokatalysatoren für eine Anwendung in bereits existierenden Prozessen anzupassen, sondern auch für die Lösung von bisher unzugänglichen synthetischen Problemen zu gestalten (Bornscheuer et al. 2012). Die Option maßgeschneiderte Enzyme bereitzustellen führte dadurch zu einer zusätzlichen Revolution ihres Einsatzes als Biokatalysatoren, wodurch *Enzyme Engineering* zu einer Schlüsseltechnologie der industriellen Biokatalyse avancierte.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Chirale Verbindungen sind wichtige Bausteine für die Synthese bioaktiver Substanzen wie beispielsweise Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffe, Futtermittel und Agrochemikalien. Für die Herstellung von chiralen Molekülen ist die asymmetrische Reduktion von Alkenen von industrieller Relevanz, da in einem Schritt bis zu zwei chirale Zentren gebildet werden können (Stuermer et al. 2007). Während die *syn*-Hydrierung von Alkenen mit klassisch-chemischen Verfahren industriell etabliert ist, stellt deren *anti*-Hydrierung eine große Herausforderung für die chemische Katalyse dar und befindet sich noch im Entwicklungsstadium (Faisca Phillips & Pombeiro 2017). Trotz der meist anspruchsvollen und arbeitsintensiven Synthese chiraler Liganden, weisen chemische Katalysatoren häufig geringe Regioselektivitäten auf. Dies limitiert ihre Anwendbarkeit und macht den Einsatz von Schutzgruppen und die damit einhergehenden zusätzlichen Syntheseschritte oft unvermeidbar, was aus ökologischer und ökonomischer Sicht unvorteilhaft ist (Sheldon & Woodley 2018).

Eine umweltfreundlichere und wirtschaftlich interessantere Alternative stellt die biokatalysierte Reduktion von Alkenen dar. Dabei werden die Doppelbindungen der Alkene mit Hilfe von Enreduktasen (ER) *anti*-spezifisch hydriert. ER sind von industriellem Interesse, da sie diese Reaktion mit einer hohen Regio-, Stereo- und Enantioselectivität katalysieren und dabei ein breites Substratspektrum akzeptieren (Toogood et al. 2010, Durchschein et al. 2013, Toogood & Scrutton 2014). Diese Substrate sind Alkene mit einer konjugierten elektronenziehenden Gruppe (EZG), wie beispielsweise  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Ketone, Aldehyde, Carbonsäuren, Ester, Imide, Nitrile und Nitrate (Toogood et al. 2010). Trotz dieser positiven Eigenschaften der Biokatalysatoren zeichnet sich eine weit verbreitete industrielle Anwendung von ER momentan noch nicht ab. Ein Hauptgrund hierfür ist die Cosubstratpräferenz dieser Enzyme. Für die Reduktion von Kohlenstoffdoppelbindungen benötigen ER das Cosubstrat Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NAD(P)H), welches als Transportmetabolit zur Elektronenübertragung dient. Die überwiegende Mehrheit der ER bevorzugen dabei NADPH über NADH (Toogood et al. 2010). Für eine industrielle Anwendung wird hingegen NADH aufgrund seiner geringeren Kosten, höheren Stabilität und vielseitigeren Rezyklierungsmöglichkeiten bevorzugt (Wu et al. 1986, Uppada et al. 2014, You et al. 2017).

Daher war das Ziel dieser Arbeit, das Cosubstrat-Bindevverhalten von ER mittels eines semi-rationalen Ansatzes zu verändern, so dass ein effizienter Einsatz von NADH ermöglicht wird. Semi-rationale Ansätze sind in diesem Kontext vorteilhaft, da sie weder ein detailliertes Vorwissen über die Cosubstrat-Bindetasche benötigen, noch einen hohen

Durchmusterungsaufwand mit sich bringen (You et al. 2017). Aufgrund vorangegangener erfolgreicher Beispiele in anderen Enzymfamilien (Chánique & Parra 2018) bietet sich die semi-rationale Methode des Austauschs von *Loop*-Regionen hierfür besonders an. Dabei werden die flexiblen *Loop*-Regionen eines Zielenzyms durch die entsprechenden Bereiche homologer Enzyme ersetzt, welche ein vorteilhaftes Cosubstrat-Bindevverhalten besitzen. Als Zielenzym wurde die cyanobakterielle Enreduktase 1 aus *Nostoc* sp. PCC7120 (NostocER1) ausgewählt, da sich diese ER durch ein breites Substratspektrum und exzellente Stereoselektivität auszeichnet. Darüber hinaus besitzt NostocER1 sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten mit dem bevorzugten Cosubstrat NADPH, was auf eine wünschenswerte hohe Reduktionsgeschwindigkeit der Kohlenstoffdoppelbindungen schließen lässt. Wie die meisten ER besitzt die NostocER1 jedoch eine starke Präferenz für NADPH (Fu et al. 2013), wodurch sie sich besonders für dieses Forschungsvorhaben eignet.

Trotz der weitaus niedrigeren Kosten von NADH im Vergleich zu NADPH wäre die wirtschaftliche Umsetzung eines Bioprozesses unter einem stöchiometrischen Einsatz dieses Cosubstrats schwer realisierbar (Kara & Langermann 2018). Daher ist der Einsatz einer Methode zur Cosubstratregenerierung unabdingbar. Aus diesem Grund wurden NostocER1-Varianten mit einem gezielt gestalteten NADH-Bindevverhalten mit einer Formiatdehydrogenase zur Rezyklierung des Cosubstrats NADH mit *Escherichia coli* bereitgestellt und für die Synthese einer Feinchemikalie von industrieller Relevanz angewendet. Hierfür wurde die Reduktion von (*R*)-Carvon zu Dihydrocarvon ausgewählt, da Dihydrocarvone unter anderem Schlüsselbausteine in der Synthese von Antimalaria-Wirkstoffen (Dong et al. 2010) und Naturstoffen, wie beispielsweise der Terpenderivate Thujopsen oder Decipienin (Silva et al. 2012), sind.

Im ersten Teil der Arbeit wird daher das Wissen über die NostocER1 vertieft, um darauf aufbauend gezielt Einfluss auf das NADH-Bindevverhalten dieses Enzyms zu nehmen. Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurden die veränderten NostocER1-Varianten in einem skalierbaren Bioprozess bereitgestellt und für die Reduktion von (*R*)-Carvon eingesetzt. Somit ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Kinetische Charakterisierung der NostocER1 mit den beiden Cosubstraten NADH und NADPH, Untersuchungen zur thermischen Stabilität und zur pH-Abhängigkeit
- Identifikation von Einflussfaktoren auf die rekombinante Expression dieser Reduktase in *E. coli* zur Gewährleistung einer reproduzierbaren Bereitstellung
- Gestaltung des Cosubstrat-Bindevhaltens der NostocER1 zur Steigerung der Aktivität des Biokatalysators mit dem industriell bevorzugten Cosubstrat NADH

- Skalierbare Bereitstellung der gestalteten NostocER1-Varianten zusammen mit einer Formiatdehydrogenase zur Cosubstratregenerierung in *Escherichia coli*
- Skalierbare biokatalytische Reduktion von (*R*)-Carvon in einem Rührkesselreaktor

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Enzymkatalyse in der organischen Synthese

Der Einsatz von Katalysatoren ist ein wichtiges Element, um eine Vielzahl von Synthesen energetisch und wirtschaftlich zu ermöglichen. Dabei werden in der organischen Synthese neben Säure-, Base- und Metallkatalysatoren immer häufiger Biokatalysatoren eingesetzt (Nestl et al. 2014). So kommen biokatalytische Syntheseschritte, *in vitro* oder *in vivo*, bei der Herstellung einer Vielzahl chemischer Produkte zur Anwendung (Meyer & Turner 2009). Diese sind zum Beispiel Feinchemikalien, Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmittel, Kosmetika, Agrochemikalien, Polymere oder Kraftstoffe (Schmid et al. 2001, Meyer & Turner 2009). Insbesondere bei der Synthese von Molekülen mit einer hohen strukturellen Komplexität, was meist bei Pharmazeutika der Fall ist, gestaltet sich die Herstellung über rein chemosynthetische Routen zum Teil äußerst schwierig (Classen & Pietruszka 2018). Hier ist der Einsatz von Biokatalysatoren ausgesprochen nützlich, um in Kombination mit chemischen Katalysatoren ökonomisch und ökologisch sinnvolle Synthesewege zu ermöglichen (Classen & Pietruszka 2018).

#### 3.1.1 Vorteile enzymkatalysierter Synthesen

Der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese bringt einige Vorteile gegenüber klassisch chemischen Katalysatoren mit sich. So sind Enzyme sehr effiziente Katalysatoren, welche die Reaktionen um Faktoren von  $10^8$  bis  $10^{10}$  verglichen zur entsprechenden unkatalysierten Konfiguration beschleunigen. Damit übertreffen sie im Mittel die Werte von chemischen Katalysatoren (Wolfenden & Snider 2001). Des Weiteren sind Enzyme vollständig biologisch abbaubar und dadurch umweltschonender als chemische Katalysatoren, die beispielsweise Schwermetalle beinhalten. Darüber hinaus funktionieren die meisten Enzyme unter relativ milden Bedingungen (pH 5 – 8 und 20 – 40 °C), was das Risiko von Nebenreaktionen der Edukte und Produkte minimiert und die Kosten der Prozessführung senkt (Nestl et al. 2014). Abgesehen von Proteasen können Enzyme durch ihre gemeinsame Funktion unter ähnlichen, milden Bedingungen relativ leicht miteinander kombiniert werden. Hierdurch können Syntheserouten vereinfacht und Gleichgewichte in Richtung von gewünschten Produkten verschoben werden (Ricca et al. 2011). Darüber hinaus katalysieren Enzyme häufig die Umwandlung eines breiten Spektrums von Substraten. So gibt es heutzutage für fast jeden Typ von organischer Reaktion eine enzymkatalysierte Möglichkeit (Faber 2011). Ferner ist ein großer Vorteil von Enzymen ihr hohes Maß an Selektivität. Viele Enzyme sind chemoselektiv, sodass

nur eine funktionelle Gruppe reagiert und alle weiteren reaktiven Gruppen des Substrats unverändert bleiben. Des Weiteren sind einige Enzyme aufgrund ihrer komplexen dreidimensionalen Struktur regioselektiv. Dies bedeutet, dass auch bei Substraten mit mehreren gleichen funktionellen Gruppen selektiv nur eine dieser Gruppen reagiert (Koeller & Wong 2001). Enzyme sind, aufgrund ihres Aufbaus aus chiralen Aminosäuren, chirale Katalysatoren, wodurch die Stereoinformation eines Substrats im Enzym-Substrat-Komplex erkannt oder gebildet werden kann. Dies ermöglicht enzymkatalysierte asymmetrische Synthesen von höchstem wirtschaftlichen Interesse (Koeller & Wong 2001).

### 3.1.2 Hürden enzymkatalysierter Synthesen

Trotz der in Kapitel 3.1.1 genannten Vorteile wird der synthetische Einsatz von Enzymen durch verschiedene Hürden erschwert. So kommen Enzyme natürlich in nur einer enantiomeren Form vor, wodurch nur eine enantiomere beziehungsweise diastereomere Form des Produkts gebildet werden kann. Will man die ‚gedrehte‘ Stereoinformation generieren, ist es im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren nicht möglich das Enantiomer zu verwenden. In den meisten Fällen muss ein Enzym mit der entgegengesetzten Stereoselektivität identifiziert werden oder dieses durch Methoden der Enzymveränderung zugänglich gemacht werden (Mugford et al. 2008). Die milden Reaktionsbedingungen bei denen Enzyme funktionsfähig sind können sich bei geringen Reaktionsgeschwindigkeiten als Nachteil herausstellen. Radikale Änderungen des pH oder der Temperatur führen meist zur Deaktivierung der Enzyme und stehen dadurch nicht als Optionen der Prozessänderung zur Verfügung (Phillips 1996). Das natürliche Solvent der Enzyme, Wasser, ist durch seine hohe Reaktivität, hohe Verdampfungswärme und seinen relativ hohen Siedepunkt aus chemischer Sicht für viele Anwendungen ungeeignet (Klibanov 1990). Darüber hinaus benötigen viele Enzyme, insbesondere die organochemisch interessanten Oxidoreduktasen, natürliche Cofaktoren. Diese sind jedoch sehr teuer, wenig stabil, selten ersetzbar und ihre Regeneration ist ein zusätzlicher Schritt, der in einem Prozess mit berücksichtigt werden muss (Sellés Vidal et al. 2018). Zusätzlich können enzymatische Reaktionen Substrat- oder Produktinhibitionen ausgesetzt sein, welche ihre Effizienz senken (D'Arrigo et al. 1998).

### 3.1.3 Enzymklassen

Die im Laufe des vergangenen Jahrhunderts rapide wachsende Anzahl entdeckter und charakterisierter Enzyme machte die Etablierung einer einheitlichen Enzymnomenklatur unausweichlich. Daher wurde eine international einheitliche Klassifizierung der Enzyme



auf Basis der von ihnen katalysierten Reaktionen eingerichtet. Insgesamt wurden hierdurch sechs übergeordnete Reaktionsklassen definiert, welche in Tabelle 3.1 aufgelistet werden. Darauf aufbauend wird jedes Enzym in zusätzliche Unterklassen kategorisiert, wodurch ein enzymspezifischer vierzähliger Schlüssel, die *Enzyme Classification* (EC)-Nummer entsteht. Zusätzlich hierzu wird jedem Enzym eine systematische Bezeichnung zugeordnet, welche die katalytische Aktivität so exakt wie möglich beschreibt. (Castiglione 2018)

**Tabelle 3.1:** Die sechs übergeordneten Reaktionsklassen der von der International Union of Biochemistry im Jahr 1961 etablierten Klassifizierung von Enzymen.

EC-Nummer	Enzymklasse	Reaktionstyp
EC 1	Oxidoreduktase	Redoxreaktionen
EC 2	Transferase	Transfer chemischer Gruppen
EC 3	Hydrolase	Hydrolytische Bindungsspaltung
EC 4	Lyase	Nicht-hydrolytische Bindungsspaltung
EC 5	Isomerase	Transfer chemischer Gruppen innerhalb eines Moleküls
EC 6	Ligase	Bindungsbildung unter Nukleosidtriphosphat (NTP)-Verbrauch

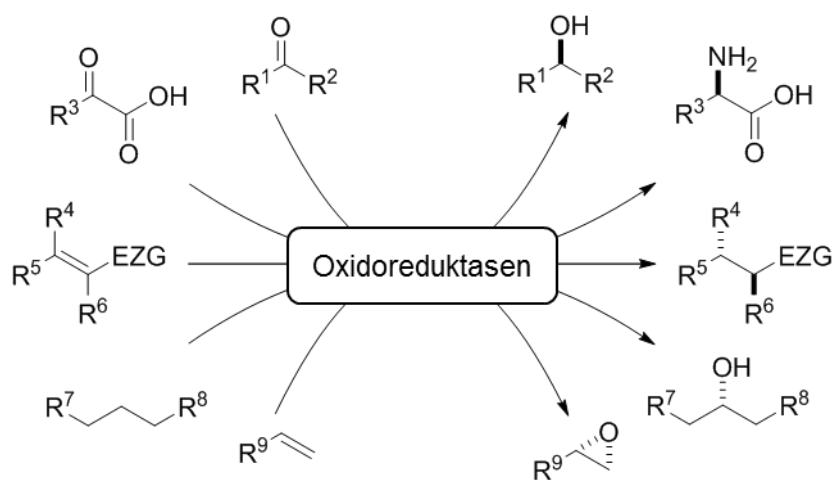
Mit der Entwicklung zusätzlicher Messtechniken zur Enzymcharakterisierung, sowie dem Aufkommen und der stetigen Weiterentwicklung der Bioinformatik ergaben sich ergänzende Klassifizierungsmöglichkeiten. So werden Enzyme beispielsweise nach ihren Überfamilien gruppiert, welche sich durch Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz, der räumlichen Struktur oder dem Auftreten bestimmter Domänen definieren. (Buchholz et al. 2012)

### 3.1.4 Oxidoreduktasen als industrielle Biokatalysatoren

Oxidoreduktasen (EC 1) katalysieren die Oxidation einer chemischen Spezies, welche dabei als Elektronen-Donor fungiert, bei simultaner Reduktion einer zweiten, elektronen-akzeptierenden Spezies. Mehr als 30 % der in der Braunschweig Enzyme Database

(BRENDA) hinterlegten Enzyme katalysieren diese nach der allgemeinen Gleichung  $A + B \rightarrow A + B^-$  ablaufende Reaktion. Damit stellen Oxidoreduktasen die größte Gruppe der sechs EC-Klassen in dieser Datenbank dar. (Sellés Vidal et al. 2018)

Als Substrate können diesen Enzymen nicht nur organische Verbindungen wie beispielsweise Alkene, Alkohole, Amine oder Ketone dienen, sondern auch anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfid und Metalle wie Quecksilber (Martínez et al. 2017). So konnte diese Enzymklasse bereits in einer Vielzahl industriell relevanter Reduktions- und Oxidationsprozessen angewendet werden (Gröger & Asano 2012). Beispiele durch Oxidoreduktasen katalysierter Reaktionen finden sich in Abbildung 3.1 wieder.



**Abbildung 3.1:** Übersicht einer Auswahl industriell relevanter Reaktionen, die von Oxidoreduktasen (EC 1) katalysiert werden (Gröger & Asano 2012). EZG: Elektronenziehende Gruppe.

Aufgrund der großen Bedeutung asymmetrischer Reduktionen für die organische Synthese, wurde die industrielle Anwendung von Oxidoreduktasen bei diesen Reaktionstypen frühzeitig etabliert. Ein Beispiel stellt die Reduktion von Carbonylfunktionen zu Alkoholen durch Ketoreduktasen dar, welche bereits seit mehr als zwei Jahrzehnten in der organischen Synthese Anwendung finden (Munoz Solano et al. 2012). Eine industrielle Nutzung von Enreduktasen zur selektiven Reduktion von Kohlenstoff-Doppelbindungen deutet sich durch die Patentierung verschiedener Anwendungen mit diesen Oxidoreduktasen im Laufe des letzten Jahrzehnts an (Gröger & Asano 2012).

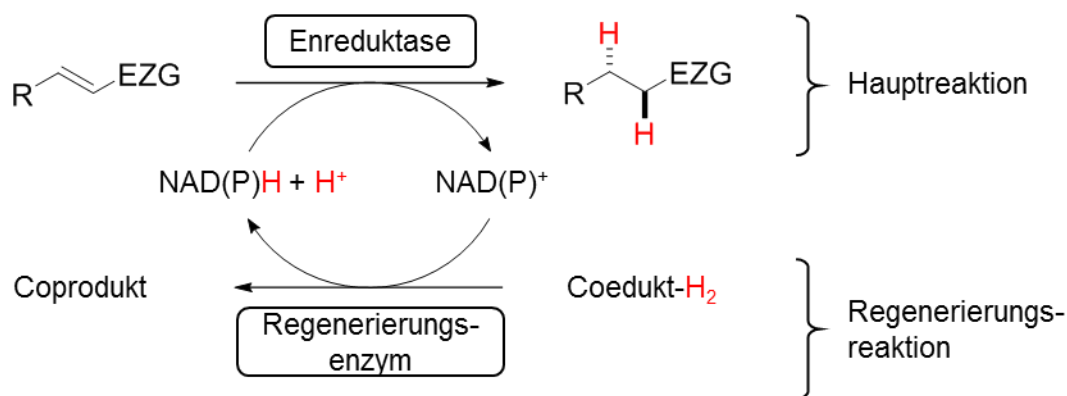
Zusätzlich zu den verschiedenen etablierten Reduktionsreaktionen wurde die Nutzung von Oxidoreduktasen katalysierten Oxidationen eruiert. Auch für diese Reaktionstypen konnten Enzyme identifiziert werden, welche selbst bei der Verwendung von unfunktionierten Substraten eine hervorragende Stereoselektivität aufweisen (Gröger & Asano 2012). Darüber hinaus ermöglichen sie die Verwendung von kostengünstigen

Oxidationsmitteln wie beispielsweise molekularem Sauerstoff (Gröger & Asano 2012). So ist es wenig verwunderlich, dass ein Großteil der industriell durchgeführten Hydroxylierungen von Steroiden durch Oxidoreduktasen katalysiert werden (Kardinahl et al. 2006). Des Weiteren konnten Oxidoreduktasen eingesetzt werden um chemosynthetisch schwer zugängliche Verbindungen herzustellen. So sind die verschiedenen chemisch-katalytischen Oxidationen primärer Alkohole arbeitsintensiv und führen teilweise zur Bildung toxischer Nebenprodukte (May 1999). Diese Nachteile konnten durch den Einsatz von Biokatalysatoren umgangen werden (May 1999).

### 3.1.5 Cosubstratregenerierung

Fast alle Oxidoreduktasen benötigen Cosubstrate zur Entfaltung ihrer katalytischen Aktivität. Diese dienen für den Transport von Elektronen, Hydridionen, Wasserstoff, Sauerstoff, sowie anderer Atome und kleiner Moleküle. Die überwiegende Mehrheit der Oxidoreduktasen benötigt dabei Nicotinamid-basierende Cosubstrate (Wu et al. 2013, Sellés Vidal et al. 2018). Aufgrund der hohen Kosten ist die wirtschaftliche Umsetzung einer Biotransformation unter einem stöchiometrischen Einsatz der Cosubstrate kaum realisierbar. Daher ist die Integration von Methoden zur Cosubstratregenerierung in Oxidoreduktase-katalysierte Prozesse meist unumgänglich (Sellés Vidal et al. 2018).

Hierbei unterscheidet man allgemein zwischen chemischen und biologischen Verfahren (Uppada et al. 2014). Chemische Ansätze haben den Vorteil, dass sie zum Teil eine hohe Energieeffizienz vorweisen können, wie beispielsweise durch die direkte Nutzung von Elektronen bei elektrochemischen Ansätzen, oder wie bei der direkten chemischen Regenerierung durch den Einsatz günstiger Reagenzien preisliche Vorteile liefern (Kara & Langermann 2018). Da sie jedoch zu unerwünschten Nebenreaktionen neigen, sowie durch geringe Wechselzahlen eine meist ungenügende Produktivität aufweisen, finden chemische Verfahren nur selten Anwendung (Kara & Langermann 2018). Aus diesem Grund kommen häufiger biokatalytische Verfahren zur Cosubstratregenerierung zum Einsatz. Durch ihre universelle Anwendbarkeit sind in diesem Kontext Enzym-gekoppelte Ansätze weit verbreitet. Dabei wird das Cosubstrat durch ein zweites Regenerierungsenzym rezykliert, welches für diese Regenerierungsreaktion der gewünschten Hauptreaktion beigefügt wurde. Dies erfolgt unter Verbrauch eines Coedukts. Abbildung 3.2 zeigt schematisch die Rezyklierung von NAD(P)H nach einer Enreduktase-katalysierten Reduktion eines Alkens.



**Abbildung 3.2:** Enzym-gekoppelter Ansatz für die Rezyklisierung von NAD(P)H. Als beispielhafte Hauptreaktion wird die durch Enreduktasen katalysierte Reduktion einer Kohlenstoff-Doppelbindung dargestellt, wobei das Cosubstrat NAD(P)H oxidiert wird. Dieses wird in einer gekoppelten Regenerierungsreaktion über ein zweites Enzym und unter dem Verbrauch eines für diesen Zweck beigefügten Coedukts rezykliert. EZG: Elektronenziehende Gruppe.

Im Idealfall weisen Hauptenzym und Regenerierungsenzym unterschiedliche Substratspektren auf, sodass keine Kreuzreaktionen durch die Regenerierung verursacht werden. Des Weiteren darf das verwendete Coedukt keine negativen Auswirkungen auf die eingesetzten Enzyme haben und sollte kostengünstig sein. Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen wurden verschiedene Enzyme für diesen Zweck identifiziert. (Zhao & van der Donk 2003)

Die Formiatdehydrogenasen (FDHs, EC 1.2.1.2) stellen ein Beispiel für eine Gruppe von Enzymen dar, welche diese Bedingungen bei der Regenerierung von reduzierten Nicotinamid-basierten Cosubstraten erfüllen (Kara et al. 2014). FDHs katalysieren die Oxidation von Formiat (Coedukt) zu  $CO_2$  (Coprodukt) wodurch  $NAD(P)^+$  zu  $NAD(P)H$  reduziert wird. Da Formiat kostengünstig ist, sowie Coedukt und Coprodukt in der Regel keine negativen Auswirkungen auf die Enzyme besitzen, eignen sich FDHs sehr gut zur Cosubstratregenerierung (Wichmann & Vasic-Racki 2005). Darüber hinaus tritt der Großteil des gebildeten  $CO_2$  aus dem Reaktionsmedium aus, was zu einer günstigen Lage des Gleichgewichts der Regenerierungsreaktion führt (Wichmann & Vasic-Racki 2005). Nachteile der FDHs sind ihre häufig geringe Aktivität und Stabilität, sowie eine starke Präferenz für das nicht-phosphorylierte Cosubstrat  $NAD^+$  (Kara & Langermann 2018). Diese Charakteristika konnten jedoch bereits durch die Identifizierung von FDHs aus neuen Mikroorganismen (Wichmann & Vasic-Racki 2005) und die Anwendung von Methoden der Enzymveränderung beeinflusst werden (Gul-Karaguler et al. 2001, Tishkov & Popov 2006, Hoelsch et al. 2013).

## 3.2 Enzyme Engineering

Die Bedingungen, denen Biokatalysatoren in industriellen Prozessen ausgesetzt sind, unterscheiden sich meist sehr von denjenigen in ihrer natürlichen Umgebung (Woodley 2013). Um den kosteneffektiven Einsatz trotzdem zu ermöglichen, besteht eine Möglichkeit darin, die Biokatalysatoren an die Anforderungen der industriellen Prozesse anzupassen (Bornscheuer et al. 2012). Geschieht dies auf Enzymebene spricht man vom *Enzyme Engineering* (Bornscheuer et al. 2012).

Als erste Methode um Enzyme zu manipulieren und für die entsprechende Anwendung maßzuschneidern, hat sich vor ungefähr drei Jahrzehnten die Gerichtete Evolution entwickelt (Lutz & Bornscheuer 2008). Traditionell wird hierbei ein zweistufiges Protokoll angewendet. In einem ersten Schritt wird molekulare Diversität durch die Einführung zufälliger Mutationen in einem Zielgen erzielt. Daraufhin wird in einem zweiten Schritt die entstandene Bibliothek nach der gewünschten Verbesserung des Phänotyps untersucht (Lutz 2010). Nachteilig hierbei ist, dass sich die Identifikation dieser Verbesserungen bei der Einführung zufälliger Mutationen jedoch als äußerst schwierig gestaltet. Selbst die Untersuchung von mehreren Millionen Varianten repräsentiert nur einen Bruchteil des möglichen Sequenzraumes, wodurch die Wahrscheinlichkeit einen Treffer zu identifizieren sehr gering wird. Hinzu kommt die Redundanz des genetischen Codes, welche die tatsächliche Anzahl an Enzymvarianten in der Bibliothek durch stille Mutationen weiter einschränkt (Wong et al. 2006). Anstatt mit größeren Bibliotheken und einem höheren Aufwand der Durchmusterung auf diese Problematik zu reagieren, geht der Trend im *Enzyme Engineering* zu kleineren und qualitativ hochwertigen Bibliotheken (Lutz 2010). Dies wird durch Informationen über die Proteinsequenz, -struktur, -funktion, sowie mittels des Einsatzes von prädikativen Algorithmen und Simulationstechniken erreicht. Hierdurch kann eine Auswahl an vielversprechenden Aminosäurepositionen und Aminosäureresten getroffen werden, was die Bibliothek in ihrer Größe dramatisch reduziert und zugleich ihre funktionelle Variabilität erhöht (Lutz 2010).

### 3.2.1 Austausch von *Loop*-Regionen als Optimierungsstrategie

Eine dieser informationsbasierten Optimierungsstrategien ist der Austausch von *Loop*-Regionen. Als *Loop*-Regionen bezeichnet man die Bereiche zwischen den maßgeblich strukturgebenden Sekundärstrukturelementen ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) der Enzyme. Während des katalytischen Prozesses müssen Aminosäurereste, insbesondere die um das aktive Zentrum, häufig konformelle Veränderungen durchlaufen. Dies geschieht um das Substrat oder Cosubstrat zu binden beziehungsweise freizugeben, den katalytischen

Raum und die sich darin befindenden Intermediate während der Reaktion zu schützen und zu stabilisieren, sowie die Wechselwirkung katalytisch aktiver Aminosäurereste und Reaktanten zu ermöglichen (Kokkinidis et al. 2012). Aufgrund ihrer zum Teil ausgesprochen hohen Flexibilität sind *Loop*-Regionen häufig an diesen konformellen Änderungen beteiligt (Nestl & Hauer 2014). Dies wiederum macht sie zu einem hervorragenden Ansatzpunkt der Enzymoptimierung. Diese Tatsache wird durch Beobachtungen aus der natürlichen Evolution unterstrichen. Vergleicht man die Primärstrukturen von verwandten Enzymen innerhalb eines Faltungsmusters, so ist die Diversität zwischen den wichtigsten strukturgebenden Elementen ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern) häufig weit weniger stark ausgeprägt als diejenige der *Loop*-Regionen (Furnham et al. 2012). Dies hebt die Bedeutung von *Loop*-Veränderungen bei der Diversifizierung von Enzymen im Laufe natürlicher Evolution hervor (Seibert & Raushel 2005, Furnham et al. 2012). Im Vergleich zu ‚klassischen‘ Optimierungsstrategien, bei denen in erster Linie punktuelle Veränderungen einzelner Aminosäuren durchgeführt werden, erhöht der Austausch von gesamten *Loop*-Regionen den Variabilitätsraum deutlich. Aufgrund der großen Diversität der *Loops* haben *Loop*-Austausche nicht nur Änderungen der Aminosäurereste zur Folge sondern bringen auch Insertionen und Deletionen mit sich (Bogarad & Deem 1999). Daher ist es wenig überraschend, dass in verschiedenen Studien Enzymeigenschaften durch den Austausch von *Loops* positiv verändern konnten. Bereits Ende der 1990iger Jahre konnte der Austausch von *Loop*-Regionen das Substratspektrum einer humanen Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSDH) selektiv verändern. Mit Hilfe einer Kristallstruktur der  $3\alpha$ -HSDH konnten drei *Loops*, die in engem Kontakt mit dem Steroid in der Bindetasche stehen, identifiziert werden. Diese wurden anschließend in verschiedenen Kombinationen durch die entsprechenden Regionen der  $20\alpha$ -HSDH ersetzt, wodurch ein Transfer der Substratspezifität möglich war. (Ma & Penning 1999)

In einem vergleichbaren System war es möglich, die Aktivität der humanen Aldose-Reduktase (AD) auf die thermostabile Alkohol-Dehydrogenase D (AdhD) zu übertragen. So zeigte der Austausch von zwei *Loop*-Regionen der AdhD einen Transfer der kinetischen Parameter der hAD bei einer gewünschten Beibehaltung der Thermostabilität. (Campbell et al. 2013)

In einer umfangreichen Studie wurden die *Loops* 2, 4 und 6 der nach einer  $(\beta,\alpha)_8$ -Fassstruktur gefalteten Phosphoribosylanthranilat (PRA)-Isomerase durch die entsprechenden *Loops* einer Vielzahl von Enzymen mit der gleichen Faltung aber äußerst unterschiedlicher Herkunft und Aktivität ersetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass je nach generierter Bibliothek zwischen 30 und 90 % der Mutanten gefaltet vorlagen (Ochoa-Leyva et al. 2009). Besonderes Augenmerk wurde bei diesem *Loop*-Transfer auf die Variabilität der ‚Gelenke‘ der *Loops*, also der Aminosäuren an N- und C-Terminus der entsprechenden

Regionen gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Diversität dieser Aminosäurepositionen beim *Loop*-Austausch einen positiven Effekt auf die Faltung der Enzyme hat (Ochoa-Leyva et al. 2009). Aufbauend auf diesem Wissen konnte in einer weiteren Studie die PRA-Isomerase aus *E. coli*, welche in die Tryptophan-Biosynthese der Organismen involviert ist, verändert werden. Durch den Austausch der *Loop*-Region 6 und Sättigungsmutagenese der ‚Gelenk‘-Aminosäuren war es möglich Enzymvarianten mit einer gesteigerten Aktivität mit dem natürlichen Substrat PRA zu charakterisieren (Ochoa-Leyva et al. 2011). Ein weiteres Beispiel ist durch die Veränderung der humanen Guanin-Deaminase (GDA) gegeben. Die Länge, Konformation und Sequenz einer entscheidenden *Loop*-Region im aktiven Zentrum des Enzyms wurden auf Basis eines Vergleichs mit einer bakteriellen Cytosin-Deaminase (CDA) modellbasiert gestaltet. Durch die Deletion von zwei Aminosäuren und die Mutation von vier Aminosäuren war es möglich, CDA-Aktivität auf die GDA zu übertragen (Murphy et al. 2009).

### 3.2.2 Änderung der Cosubstratspezifität

Viele enzymkatalysierte Reaktionen benötigen Cosubstrate, wie beispielsweise NAD(H) oder NADP(H). Dies gilt insbesondere für die größte Klasse der bisher charakterisierten Enzyme, die der Oxidoreduktasen (You et al. 2017). So brachte der industrielle Einsatz von Oxidoreduktasen das Bestreben nach einer Änderung der Cosubstratspezifität mit sich. Beim Einsatz von *in vitro* Systemen, zum Beispiel in Form von isolierten Enzymen oder Zelllysaten, wird häufig ein Wechsel von NADP(H) zu NAD(H) angestrebt. Dies liegt in erster Linie am deutlich geringeren Preis von NAD(H), der um etwa eine Zehnerpotenz niedriger ist als der des phosphorylierten Derivats (You et al. 2017). Zusätzlich ist die Stabilität von NAD(H) deutlich höher (Wu et al. 1986), was die mögliche Prozesslaufzeit verlängert. Darüber hinaus ist die Vielfalt an Regenerationssystemen für NAD(H) größer (You et al. 2017), wodurch die Integration in einen industriellen Prozess erleichtert wird (Uppada et al. 2014). Beim Einsatz von *in vivo* Systemen in Form von Ganzzellbiokatalysatoren werden je nach Bedarf Änderungen der Cosubstratspezifität in beide Richtungen durchgeführt, beispielsweise um die intrazelluläre Cosubstratverfügbarkeit im Gleichgewicht zu halten (Bengtsson et al. 2009) oder die Effizienz eines Stoffwechselweges zu erhöhen (Tamakawa et al. 2011, Hasegawa et al. 2012).

Eine neue Option bei der Gestaltung von industriellen Prozessen ergibt sich durch die Entwicklung biomimetischer Cosubstrate. Ihre Synthese ist weniger aufwendig als diejenige von natürlichen Cosubstraten und ihre Stabilität zudem höher, was zu vergleichsweise niedrigen Kosten führt (Paul & Hollmann 2016). Neben einem

erfolgreichen Einsatz *in vitro* (Paul et al. 2013), konnten diese unnatürlichen Hydrid-spender auch *in vivo* als bioorthogonale Redoxsysteme eingesetzt werden (Ji et al. 2011, Wang et al. 2017). So kann die gezielte Enzymveränderung hin zu einer hohen Aktivität mit Biomimetika ebenfalls von großem Interesse sein.

Die Ansätze die Cosubstratspezifität zu ändern können in drei große Gruppen zusammengefasst werden: ungerichtete, rationale und semi-rationale Verfahren.

### **Ungerichtete Verfahren**

Die Anwendung von ungerichteten Verfahren benötigt kein Vorwissen über das Enzym oder seine Interaktion mit den Cosubstraten. Diese basieren lediglich auf dem Generieren zufälliger genetischer Diversität und anschließender Selektion der gewünschten Verbesserung. Auch wenn einige Methoden existieren, ungerichtete genetische Diversität zu generieren (Lutz & Bornscheuer 2008), werden diese äußerst selten eingesetzt, um Einfluss auf die Cosubstratspezifität von Enzymen zu nehmen (You et al. 2017). Verbesserungen sind fast ausschließlich auf Änderungen der Cosubstrat-Bindestelle zurückzuführen (Chánique & Parra 2018), wodurch die Durchmusterung großer Bibliotheken wenig vielversprechend wird.

### **Rationale Verfahren**

Um die Anwendung von rationalen Verfahren zu ermöglichen, sind sehr genaue Kenntnisse über die Struktur, die Cosubstrat-Bindetasche und den katalytischen Mechanismus des Zielenzyms nötig. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen werden ortsgerecht Aminosäurereste mutiert (You et al. 2017). Somit ist der erste Schritt eines solchen Verbesserungsvorhabens meist durch die Identifikation von Residuen geprägt, welche direkt mit dem Cosubstrat interagieren. Dabei kann es sich um Aminosäurereste handeln die in Wechselwirkung mit der 2' Phosphatgruppe von NADP(H) treten (Rosell et al. 2003), die in die Adenosin-Bindetasche ragen (Morikawa et al. 2014), die sich in räumlicher Nähe zur Cosubstrat-Bindetasche befinden (Bubner et al. 2008, Wulf et al. 2012) oder die sich direkt an der Katalyse beteiligen (Rosado et al. 2012, Chen et al. 2016). Hierdurch war es möglich, seit der ersten beschriebenen Studie zur Änderung der Cosubstratspezifität (Scrutton et al. 1990), das Bindevverhalten einer Vielzahl von Enzymen zu beeinflussen (Chánique & Parra 2018).

Aufgrund des limitierten Wissens über Proteinfaltung und den Zusammenhang von Struktur und Funktion der Enzyme ist die Anwendung rationaler Verfahren auf wenige, sehr gut charakterisierte Systeme beschränkt (Lutz & Bornscheuer 2008). Das bekannteste Beispiel eines solchen Systems ist das hochkonservierte Cosubstrat-Bindemotiv von



NAD(P)-bindenden Enzymen mit einer Rossmann-ähnlichen Domäne (Lesk 1995). Diese Domäne (CATH-Nummer [3.40.50.720]) tritt zu über 50 % in EC 1.1 auf, wodurch es wenig verwunderlich ist, dass die Mehrheit der Beispiele einer erfolgreichen Einflussnahme auf die Cosubstratspezifität ebenfalls in dieser Enzymklasse anzutreffen ist (Chánique & Parra 2018). Bei weniger ausgiebig charakterisierten Systemen wird daher der Einsatz von semi-rationalen Verfahren präferiert.

### **Semi-rationale Verfahren**

Semi-rationale Verfahren zur Veränderung der Cosubstratspezifität benötigen ebenfalls Kenntnisse über Struktur und Bindeverhalten des Enzyms, im Gegensatz zu rationalen Verfahren können diese aber weniger umfangreich sein. Diese Informationslücke wird durch größere Änderungen der Primärstruktur und immer häufiger durch den Einsatz von computerbasierten Methoden geschlossen. Dadurch wird die Identifikation von potentiellen *Hotspots* der Sequenz wahrscheinlicher, wodurch kleinere und ‚intelligentere‘ Bibliotheken generiert werden können.

Aufbauend auf Arbeiten zur Änderung der Cosubstratspezifität von Ketosäure-Reduktisomerasen (KARI) (Bastian et al. 2011, Cahn et al. 2015), wurde ein vielversprechendes und benutzerfreundliches Programm namens *Cofactor Specificity Reversal-Structural Analysis and Library Design* (CRS-SALAD) entwickelt (Cahn et al. 2017). Dieses Programm hat den Anspruch die Cosubstratpräferenz jeder Oxidoreduktase beeinflussen zu können. Hierfür wird die Struktur des Zielenzyms komplexiert mit dem bevorzugten Cosubstrat benötigt, ungeachtet dessen, ob es sich um eine Kristallstruktur oder Homologiemodell handelt. CRS-SALAD bestimmt aufbauend auf dieser Struktur Aminosäuren, die für die Determinierung des bevorzugten Cosubstrats entscheidend sind und schlägt Bibliotheken mit degenerierten Codons für die Mutagenese vor. Da die Einbringung von cosubstratbeeinflussenden Mutationen fast immer zu Lasten der Enzymaktivität gehen, werden weitere Veränderungen des Enzyms zur Wiederherstellung dieser Aktivität benötigt, die ebenfalls von CRS-SALAD vorgeschlagen werden. So war es möglich die Cosubstratspezifität von vier Oxidoreduktasen mit unterschiedlichen Tertiärstrukturen zu ändern (Cahn et al. 2017). Die Funktionsfähigkeit von CRS-SALAD wurde bereits im Rahmen weiterer Optimierungsstudien bewiesen (Borlinghaus & Nestl 2018, Tonin et al. 2018), sowie die Funktionsweise weiter optimiert um noch kleinere Bibliotheken zu generieren (You et al. 2018).

Eine weitere computerbasierte Strategie zielt auf die Stärkung der Wasserstoffbrücken zwischen Enzym und Cosubstrat ab. Dafür wird zwar die Struktur des Zielenzyms benötigt, jedoch keinerlei Kenntnisse über homologe Enzyme und deren Bindeverhalten mit den

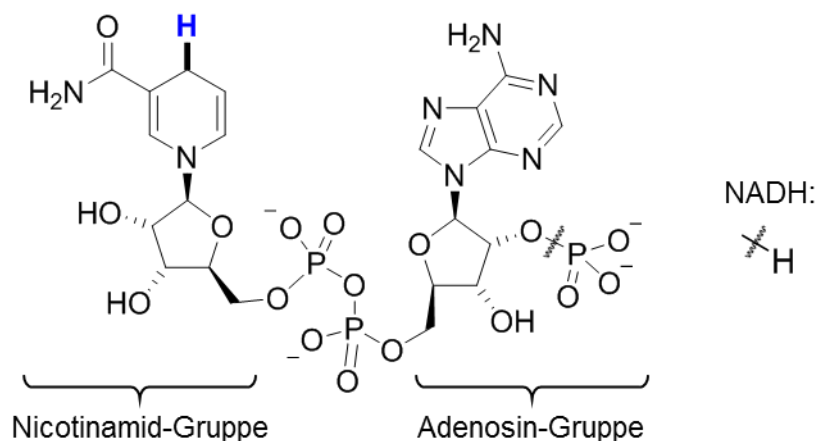
Cosubstraten. Nach zahlreichen molekulardynamischen (MD)-Simulationen war es so möglich die Cosubstratpräferenz der strikt NADPH-präferierenden Reduktase Gox2181 aus *Gluconobacter oxydans* deutlich zu relaxieren (Cui et al. 2015).

Darüber hinaus ist ein Einsatz semi-rationaler Verfahren auch mit weniger rechenintensiven Methoden möglich. So konnte beispielsweise die Cosubstratspezifität einer Phosphit-Dehydrogenase über den Vergleich mit Primär- und zum Teil auch Tertiärstrukturen homologer Enzyme beeinflusst werden. Ein Vergleich verschiedener Sequenzen deutete auf zwei benachbarte Schlüsselaminosäuren, deren Sättigungsmutagenesen eine Aktivitätssteigerung mit beiden Cosubstraten herbeiführte (Woodyer et al. 2003).

Ein weiterer semi-rationaler Ansatz, der die Beeinflussung des Cosubstrat-Bindevhaltens ermöglicht, ist der Austausch von größeren Sequenzbereichen wie beispielsweise von *Loops* (Nestl & Hauer 2014) oder gesamten Proteinbindedomänen (Rollin et al. 2013). Während es nicht möglich war, die Cosubstratpräferenz einer NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase durch den Austausch einzelner, mit dem Cosubstrat interagierender Aminosäuren zu beeinflussen, war jedoch der Austausch der gesamten NADP-Bindetasche gegen eine homologe NAD-Bindetasche erfolgreich (Yaoi et al. 1996). Eine detailliertere Beschreibung von erfolgreichen Änderungen der Cosubstratspezifität durch den Austausch von *Loop*-Regionen findet sich in Kapitel 3.2.3.

### **3.2.3 Änderung der Cosubstratspezifität durch den Austausch von *Loop*-Regionen**

Mit der Nicotinamid- und Adenosin-Gruppe besitzt NAD(P)H zwei Molekülteile, die sich nicht nur aufgrund der Größe des Cosubstrats räumlich weit voneinander entfernt befinden, sondern durch unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften auch differente Bindevverhalten mit sich bringen (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** Die Nicotinamid- und die Adenosin-Gruppe des Nicotinamidadenindinukleotid(phosphats) (NAD(P)H). Dargestellt ist die mit dem reaktiven Hydridion (blau) gebundene, reduzierte Form der Cosubstrate.

Hierdurch lässt sich bei manchen Enzymen ein zweiteiliger Bindemechanismus des Cosubstrats beobachten (Deng et al. 1999), was durch die Existenz von zwei unterschiedlichen Bindestellen im aktiven Zentrum hervorgerufen wird (Pudney et al. 2009). Die Bindestelle der Adenosin-Gruppe befindet sich häufig in räumlicher Distanz zu derjenigen der Nicotinamid-Gruppe (Cahn et al. 2017). Aufgrund der Reaktivität der Nicotinamid-Gruppe interagiert diese in ihrer Bindestelle vermehrt mit dem Substrat, einer prosthetischen Gruppe und konservierten Aminosäuren, wodurch die Veränderbarkeit dieser Bindestelle erschwert wird. Hingegen sind durch die Distanz der Adenosin-Bindestelle unerwünschte negative Auswirkungen durch Änderungen dieses Enzymteils weniger wahrscheinlich. Noch dazu stellt die Adenosin-Gruppe, deren Ribose durch die Konjugation mit der 2'-Phosphat-Gruppe beziehungsweise 2'-Hydroxy-Gruppe den einzigen Unterschied zwischen den beiden Cosubstratspezies darstellt, das primäre Ziel für Veränderungen der Cosubstratspezifität von Enzymen dar. Diesen Sachverhalt kann man sich hervorragend durch den Austausch von Sequenzbereichen (meist *Loops*) dieser Bindestelle zu Nutze machen (Sellés Vidal et al. 2018).

Aufbauend auf diesem Wissen war es möglich eine Vielzahl von NAD(P)H bindenden Enzymen mit einer Rossmann-Faltung zu verändern. Der hochkonservierte Kern dieser Enzyme ist ein  $\beta\alpha\beta$ -Motiv: zwei parallele  $\beta$ -Faltblätter, die von einer  $\alpha$ -Helix getrennt werden. Zwischen dem ersten  $\beta$ -Faltblatt und der  $\alpha$ -Helix wird in diesem Motiv ein kurzer *Loop* geformt, welcher in direktem Kontakt mit der Adenosin-Gruppe des Cosubstrats steht (Hanukoglu 2015). Der Austausch dieses ‚Cosubstrat-Bindelooops‘ stellt demnach eine perfekte Möglichkeit dar, um die Cosubstratpräferenz zwischen den Enzymen zu transferieren. So wurde beispielsweise durch einen Austausch die Cosubstratpräferenz

einer Malat-Dehydrogenase (Nishiyama et al. 1993) oder einer Isopropylmalat-Dehydrogenase (Chen et al. 1996) verändert. Ein weiteres Beispiel stellt der Übertrag von zwei *Loop*-Regionen einer  $\alpha$ -Ketosäure-Reduktase aus *Sphingomonas* sp. A1 (A1-R) dar. Der Austausch des ‚Cosubstrat-Bindelops‘ und eines zusätzlichen *Loops* führte zu einem exzellenten Transfer der NADP(H)-Präferenz auf ein homologes Enzym namens A1-R‘ (Takase et al. 2014). Trotz des großen Potentials und der bereits sehr erfolgreichen Anwendung dieser Methode, wurde der Austausch von *Loop*-Regionen für die Änderung der Cosubstratspezifität bisher nur in seltenen Fällen angewendet (Chánique & Parra 2018). Insbesondere existiert keine Studie über ein Enzym ohne Rossmann-Faltung, bei dem diese Methode für ein selektives Cosubstrat-*Engineering* genutzt wurde.

### 3.3 Die Enzymfamilie der Enreduktasen (ER)

Enreduktasen (ER) sind Enzyme, welche in der Lage sind asymmetrische *trans*-Hydrierungen von aktivierten C=C-Doppelbindungen zu katalysieren (Toogood et al. 2010). Diese Reaktion ist von besonderem wirtschaftlichen Interesse, da bis zu zwei Stereozentren in einer Reaktion aufgebaut werden können (Stuermer et al. 2007). Eine Vielzahl von chemischen Katalysatoren ermöglicht die Hydrierung von ungesättigten Substraten zu den entsprechenden *cis*-Produkten (Tungler & Fogassy 2001, Gladiali & Alberico 2006, Paradies 2014). Die Anzahl an chemischen Katalysatoren für die analoge *trans*-Hydrierung ist jedoch sehr limitiert (Yang et al. 2005), wodurch ein großes Interesse an einem Einsatz von ER für diesen Zweck besteht.

ER können generell in vier Gruppen von Enzymen unterteilt werden (Fu et al. 2015). Man unterscheidet zwischen Enzymen der 2-Enoatereduktasen (EnoR; EC 1.3.1.31), der mittelkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR; EC 1.3.1), der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR; EC 1.1.1.207-8) und Reduktasen der Old Yellow Enzyme (OYE)-Familie (EC 1.6.99.1) (Fu et al. 2015, Toogood & Scrutton 2018).

EnoRs sind spezifisch für die Umsetzung von Substraten mit Carbonsäuren oder Estern als aktivierenden Gruppe (Rohdich et al. 2001). Ihre Abhängigkeit von Flavinadenin-dinukleotid (FAD) und [4Fe-4S]-Clustern im aktiven Zentrum machen diese Enzyme jedoch sensitiv gegenüber Sauerstoff und erschweren ihren industriellen Einsatz (Rohdich et al. 2001, Fu et al. 2015). Dagegen ist ein wirtschaftlicher Einsatz der Flavin unabhängigen MDRs (Nordling et al. 2002, Mansell et al. 2013) und SDRs weitaus wahrscheinlicher (Moummou et al. 2012, Lygidakis et al. 2016). Typische Substrate dieser Enzymklassen umfassen aromatische und monozyklische Alkene mit aktivierenden Aldehyd- oder Ketogruppen (Moummou et al. 2012, Lygidakis et al. 2016). Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und zum Teil exzellenten Spezifitäten werden die ER der OYE-

Familie als vielversprechendste Biokatalysatoren für einen industriellen Einsatz gesehen (Fu et al. 2015, Toogood & Scrutton 2018). Substrate dieser Flavinmononukleotid (FMN)-abhängigen Reduktasen umfassen eine Vielzahl aktivierter Alkene, wie beispielsweise  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren und Carbonsäurederivate (unter anderem Ester, Amide, Anhydride, Imide, Halogenide), Nitroalkene, organische Nitrate, Nitramine und Nitrile (Toogood et al. 2010, Toogood & Scrutton 2018). Durch das große Interesse an ER der OYE-Familie beschränken sich alle nachfolgenden Beschreibungen ausschließlich auf die Enzyme dieser Klasse.

### 3.3.1 Phylogenetische Einordnung

Die erste charakterisierte ER stammt aus der Bierhefe *Saccharomyces carlsbergensis*, auch bekannt unter dem Namen *Saccharomyces pastorianus*, und wurde in den ersten Beschreibungen aus den 1930iger Jahren aufgrund ihrer Farbe als ‚Gelbes Ferment‘ bezeichnet (Warburg & Christian 1932). Diese Aufzeichnung über die Oxidation von NADPH mit molekularem Sauerstoff war nicht nur die erste Beschreibung einer ER sondern eines Flavoenzyms überhaupt (Toogood et al. 2010). Die Entdeckung eines zweiten ‚neuen gelben Ferments‘ aus *Saccharomyces cerevisiae* (Haas 1938) führte zur Umbenennung des initial charakterisierten Enzyms in *Old Yellow Enzyme*, wodurch die ganze Enzymfamilie ihren Namen erhielt (Toogood et al. 2010).

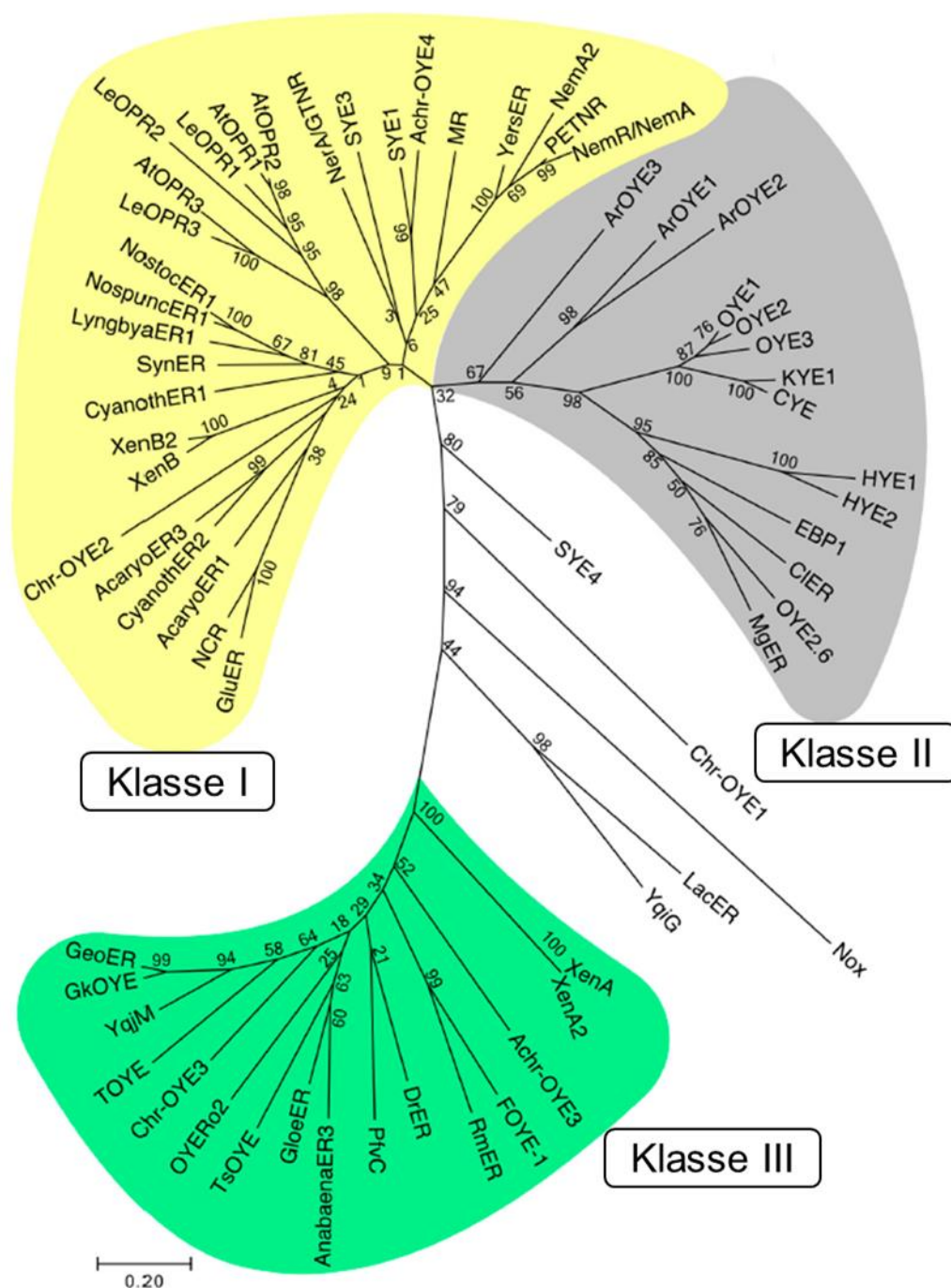
Im Laufe der nachfolgenden Jahrzehnte wurden viele weitere ER identifiziert. Über 60 dieser Enzyme wurden bisher rekombinant exprimiert und ausgiebig charakterisiert (Scholtissek et al. 2017). Dabei konnten, durch die Untersuchung der ER YqjM aus einem *Bacillus subtilis*-Stamm, zwei Subkategorien von ER der OYE-Familie definiert werden: die ‚klassischen‘ und ‚thermophil-ähnlichen‘ ER (Kitzing et al. 2005, Toogood et al. 2010). Wie ihre Bezeichnung bereits vermuten lässt, weisen viele ‚thermophil-ähnliche‘ ER eine höhere thermische Stabilität als ‚klassische‘ ER auf (Adalbjörnsson et al. 2010). Zusätzlich besitzen sie im Mittel eine kürzere Primärstruktur als die ‚klassischen‘ Vertreter dieser Enzymklasse (Scholtissek et al. 2017). Nichtsdestotrotz ist die Varietät innerhalb dieser zwei Subkategorien sehr groß, weshalb sich die Beschreibung beziehungsweise Vorhersage gemeinsamer Eigenschaften als schwierig erweist. Aus diesem Grund haben Paul und Mitarbeiter eine neue Kategorisierung nach einer phylogenetischen Analyse vorgeschlagen (Scholtissek et al. 2017). Hierzu wurde ein phylogenetischer Baum von 63 charakterisierten ER erstellt (Abbildung 3.4), welcher die Kategorisierung in drei anstelle von zwei Gruppen ermöglicht (Scholtissek et al. 2017).

Eine Gruppe besteht dabei aus vormals ‚klassischen‘ ER aus Pflanzen, Actino-, Proteo- und Flavobakterien und einem ausgeprägten Unterstamm cyanobakterieller ER (Klasse I,

gelb eingefärbt). Eine weitere Gruppe befindet sich genetisch relativ nahe an den Enzymen dieser Klasse I, besteht aber ausschließlich aus pilzlichen ‚klassischen‘ ER (Klasse II, grau eingefärbt). Die dritte Gruppe befindet sich genetisch weiter entfernt von den anderen beiden Gruppen und besteht aus den vormals als ‚thermophil-ähnlich‘ bezeichneten ER (Klasse III, grün eingefärbt). Diese stammen sowohl aus bakteriellen Abteilungen, welche sich ebenfalls in Klasse I wiederfinden (Actino-, Proteo-, Cyanobakterien beziehungsweise Bacteroidetes), als auch aus weiteren bakteriellen Abteilungen (Deinococcus-Thermus oder Firmicutes). Zusätzlich wurden Primärstrukturen identifiziert, welche keiner Klasse zugeordnet werden konnten. Durch ihre bakterielle Herkunft könnte es sich hierbei um evolutionäre Intermediate zwischen Klasse I und III handeln. Die nahe Verwandtschaft von Klasse I und II lässt eine Coevolution der Enzyme dieser beiden Klassen vermuten. Jedoch zeigt ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der Vertreter beider Klassen einen evolutiven Fortschritt in Klasse II, was eine Entwicklung dieser Enzyme aus Klasse I heraus nahelegt.<sup>1</sup> In diesem Kontext nehmen ER aus Cyanobakterien auf Grund ihrer ‚höheren‘ Entwicklung eine Sonderstellung innerhalb von Klasse I ein. Durch den großen evolutiven Abstand zwischen Klasse I und III könnte es sich um eine konvergente Entwicklung dieser beiden Gruppen von ER handeln. Dies würde die Unterschiede in der Länge der Sequenz beziehungsweise der biochemischen und strukturellen Eigenschaften dieser beiden Klassen erklären, obwohl die Komplexität der Primärstrukturen der Enzyme vergleichbar ‚simpel‘ sind (Scholtissek et al. 2017).

---

<sup>1</sup> Hierzu wurde die Anzahl ‚einfacher‘ Aminosäuren (Ala, Thr und Val) mit derjenigen ‚komplexer‘ Aminosäuren (Cys, Leu, Phe, Trp und Tyr) verglichen.



**Abbildung 3.4:** Phylogenetischer Baum von 63 bakteriellen, pilzlichen und pflanzlichen ER und ihre Unterteilung in drei Subklassen nach (Scholtissek et al. 2017).

### 3.3.2 Physiologische Rolle

ER der OYE-Familie sind allgegenwärtig in der Natur vertreten (Toogood et al. 2010, Winkler et al. 2012). Somit ist es wenig überraschend, dass die Zuordnung einer einzigen, gemeinsamen physiologischen Rolle für diese Enzyme nicht möglich ist (Toogood et al.

2010). Nichtsdestotrotz konnten einige ER mit der Detoxifizierung von elektrophilen Stoffen in Verbindung gebracht werden (Williams & Bruce 2002, Trotter et al. 2006). Zusätzlich konnte das Auftreten von ER bestimmten Umwelteinflüssen und den damit verbundenen Änderungen im Metabolismus des Wirts zugeordnet werden. So treten einige bakterielle ER im Zusammenhang mit oxidativem Stress auf (Fitzpatrick et al. 2003, Brigé et al. 2006, Taglieber et al. 2008, Ehira et al. 2010) oder pflanzliche ER unter Substratlimitation (Peters et al. 1996) und bei der Abwehr von Bakterien- und Insektenbefall (Farmer et al. 2003). Weiterhin wurden ER im Rahmen verschiedener metabolischer Routen identifiziert, beispielsweise bei der Biosynthese von Alkaloiden (Cheng et al. 2010) oder Hormonen (Schaller et al. 2000, Kubata et al. 2002).

### 3.3.3 Struktur

#### Primärstruktur

Die Primärstrukturlänge der bisher charakterisierten ER liegen zwischen 349 und 412 Aminosäuren bei Vertretern der Klasse I und II und 337 und 371 Aminosäuren bei Vertretern der Klasse III. Bestimmte Aminosäuren zeigen ein hohes Maß an Konservierung innerhalb der ER. So brachte ein Vergleich der Primärstrukturen 56 hochkonservierte Aminosäuren zum Vorschein. Dies entspricht im Mittel ungefähr 15 % Sequenzidentität über alle drei Klassen von ER. Vergleicht man ER der Klassen untereinander erhöht sich die Identität um 8,5 % bis 11,5 %. Insbesondere Aminosäuren, die an der Bindung von FMN, Cosubstrat, Substrat oder Inhibitoren und an der Ausbildung der oligomeren Struktur beteiligt sind, zeigen ein hohes Maß an Konservierung (Scholtissek et al. 2017).

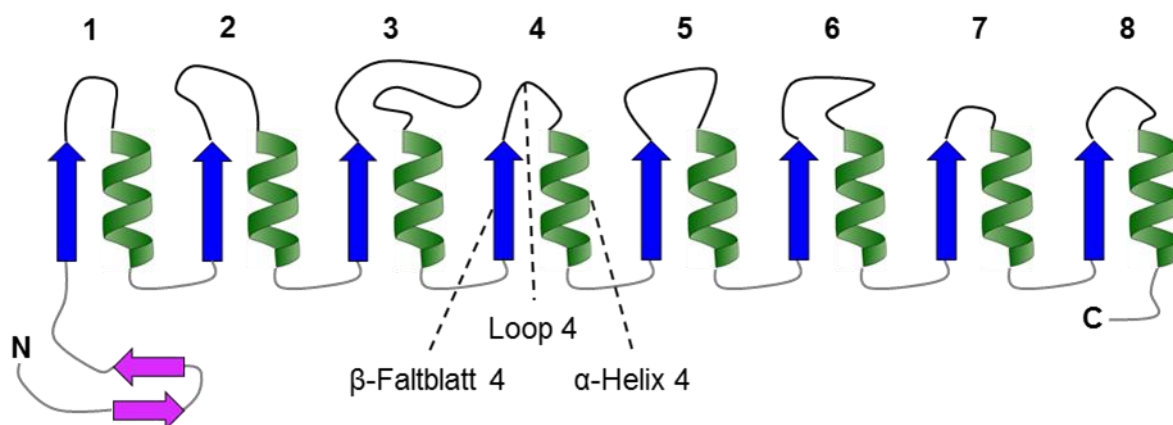
#### Sekundärstruktur

Alle ER besitzen eine gleiche Grundausstattung an zentralen Sekundärstrukturelementen. Diese sind in erster Linie acht  $\beta$ -Faltblätter und acht  $\alpha$ -Helices, welche in aufeinanderfolgenden Pärchen auftreten. Diese werden systematisch durchnummeriert, beginnend am N-Terminus bei 1 bis hin zur 8 am C-Terminus. Die Bereiche zwischen diesen Sekundärstrukturelementen werden als Oberflächenschleifen (*Loops*) bezeichnet. Insbesondere die *Loops* zwischen den  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices ( $\beta\alpha$ -*Loops*) haben eine ausgesprochen wichtige Funktion, da sie maßgeblich an der Katalyse der ER beteiligt sind. Sie unterscheiden sich in Sequenz und Länge innerhalb der ER stark voneinander. Diese *Loops* werden ebenfalls systematisch nummeriert, entsprechend des zugehörigen Faltblatt/Helix-Paars. Zusätzlich finden sich zwei kurze  $\beta$ -Faltblätter am N-Terminus der



ER. Alle Kernstrukturelemente finden sich schematisch dargestellt in Abbildung 3.5 wieder (Toogood et al. 2010).

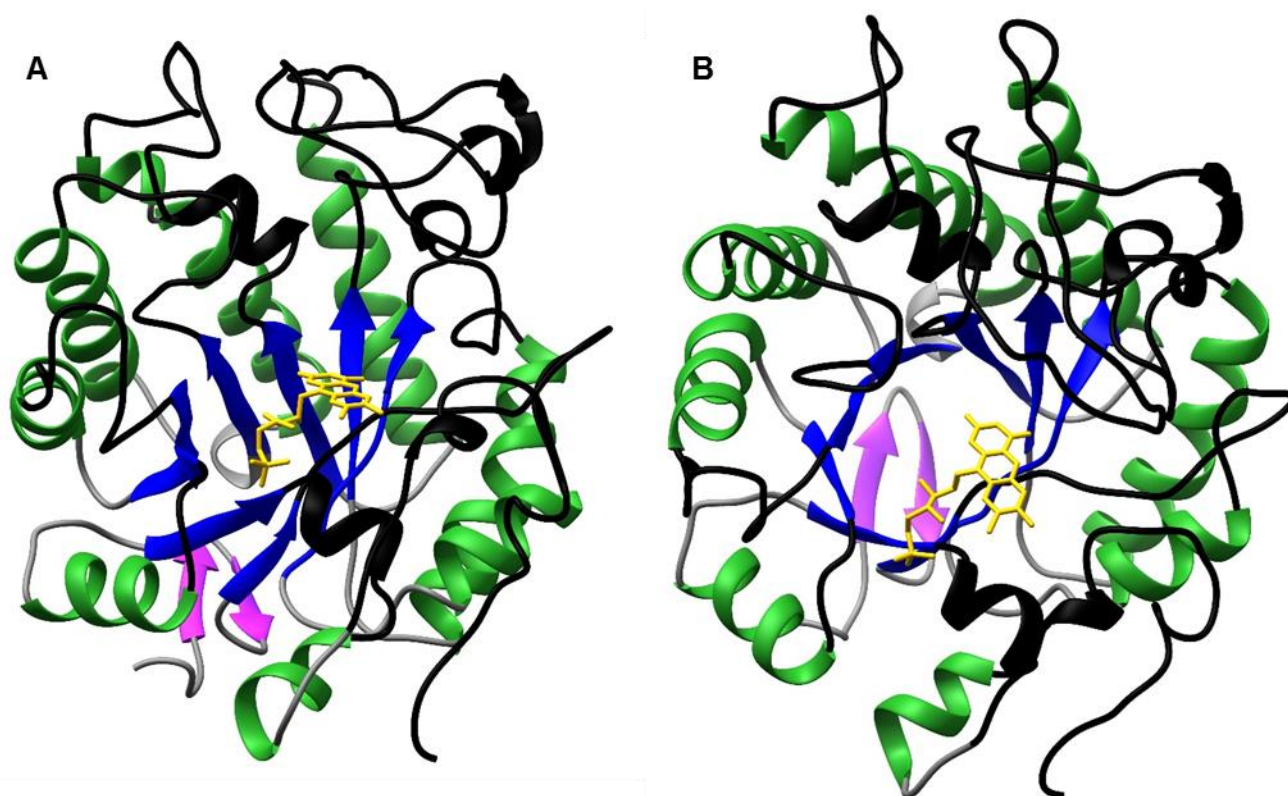
Des Weiteren bilden viele ER zusätzliche Sekundärstrukturen zwischen den zentralen Kernelementen aus. So sind die Bereiche von *Loop* 3, 5 und 6, sowie der Bereich nach *Helix* 8 häufig länger als die anderen flexiblen Regionen, wodurch sie vermehrt zusätzliche Sekundärstrukturelemente beinhalten (Scholtissek et al. 2017).



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung der bei allen ER vorhandenen Sekundärstrukturelemente. Gezeigt sind die acht zentralen Paare aus  $\beta$ -Faltblatt (blau) und  $\alpha$ -Helix (grün), die zwei kurzen N-terminalen  $\beta$ -Faltblätter (pink), die  $\beta\alpha$ -Loops (schwarz) und die  $\alpha\beta$ -Loops (grau). Zusätzlich wird die Nummerierung der drei wiederkehrenden Kernelemente im Bereich 4 exemplarisch aufgeführt.

### Tertiärstruktur

Alle bisher charakterisierten ER besitzen im Grundgerüst die gleiche Tertiärstruktur, eine  $(\beta,\alpha)_8$ -Fasstruktur oder auch bekannt als Triosephosphat Isomerase (TIM)-Fasstruktur (Toogood et al. 2010). Dabei bilden die acht alternierenden Paare aus  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix eine Fass-ähnliche Struktur aus, wobei die Faltblätter die innere Wand des Fasses, die Helices die äußere Wand des Fasses bilden (Abbildung 3.6). Die flexiblen *Loops* zwischen  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt ( $\alpha\beta$ -Loops) in Kombination mit den zwei kurzen  $\beta$ -Faltblättern bilden in dieser Struktur den Boden des Fasses aus. Eine sehr viel wichtigere Rolle übernehmen die *Loops* zwischen  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helices ( $\beta\alpha$ -Loops) am oberen Ende des Fasses. Sie sind maßgeblich für die Ausbildung des aktiven Zentrums verantwortlich. Dementsprechend wird das sich innerhalb der ER befindende FMN dort gebunden.



**Abbildung 3.6:** Tertiärstruktur einer ER der Klasse I in der Seitenansicht (**A**) und Draufsicht (**B**). Dargestellt ist das doppelwandige Fass aus  $\beta$ -Faltblättern (blau) und  $\alpha$ -Helices (grün). Die zwei kurzen N-terminalen  $\beta$ -Faltblätter (pink) bilden mit den  $\alpha\beta$ -Loops (grau) den Boden des Fasses. Die  $\beta\alpha$ -Loops (schwarz) formen das aktive Zentrum der ER, in dem FMN gebunden dargestellt wird (gelb).

### Quartärstruktur

Verschiedene oligomere Zustände konnten für ER der OYE-Familie beobachtet werden. ER der Klasse III kommen in Lösung hauptsächlich als Homodimere und Homotetramere vor (Toogood et al. 2010, Scholtissek et al. 2017). Aber auch höhere oligomere Zustände, wie Octamere und Dodecamere konnten beobachtet werden (Adalbjörnsson et al. 2010). Demgegenüber treten ER der Klassen I und II ausschließlich als Monomere oder Homodimere auf (Scholtissek et al. 2017).

### 3.3.4 Aufbau des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum der ER wird neben den in diesem Kapitel beschriebenen konservierten Aminosäuren durch eine Vielzahl aromatischer Residuen aufgebaut. Es ist zu einer Seite weit geöffnet, wodurch zum Teil sterisch anspruchsvolle Substrate und das relativ große Cosubstrat NAD(P)H eindringen können. Darüber hinaus sorgt diese Öffnung für die Präsenz von Lösemittel und Ionen im aktiven Zentrum. Die Tiefe der Bindetasche von ER beträgt um die 20 Å (Toogood et al. 2010, Scholtissek et al. 2017).

#### Bindung von FMN

Das FMN der ER der OYE-Familie wird im Bereich der C-terminalen Enden der strukturgebenden acht  $\beta$ -Faltblätter gebunden (Toogood et al. 2010), was einer typischen Position für Enzyme mit einer  $(\beta, \alpha)_8$ -Fasstruktur entspricht (Wierenga 2001). Dies hat zur Folge, dass die *re*-Seite des Isoalloxazinrings komplett vom Enzym verdeckt wird (Barna et al. 2001). Diese Seite befindet sich unter anderem in engem Kontakt mit dem  $\beta$ -Faltblatt 1 der ER (Barna et al. 2001, Spiegelhauer et al. 2010). Die gegenüberliegende *si*-Seite des Flavins zeigt hingegen in das aktive Zentrum des Enzyms (van den Hemel et al. 2006). Somit bildet die prosthetische Gruppe den Boden des aktiven Zentrums (van den Hemel et al. 2006).

Die Bindung des FMNs geschieht durch eine Reihe von Aminosäuren, die zum Teil in allen drei Klassen der Enzyme konserviert vorliegen. Insbesondere die Bindung der Isoalloxazin-Gruppe des FMNs ist in einer Vielzahl von ER fast identisch. Diese wird exemplarisch anhand der Kristallstruktur der MR (mit der zugehörigen Nummerierung) in Abbildung 3.7 dargestellt. So interagiert die Aminosäure Q104 mit den Heteroatomen O2 und N3 des Pyrimidin-Rings des Flavins, die Aminosäure R238 mit den Heteroatomen O2 und N1. Zusätzlich bilden die zwei Aminosäuren H186 und N189<sup>2</sup> Wasserstoffbrücken zu den Heteroatomen N1 und N3 aus. Des Weiteren interagieren A62<sup>3</sup> und T32<sup>4</sup> mit dem O4 des Pyrimidin-Rings. Die gegenüberliegende Seite des Isoalloxazin-Rings, die hydrophobe Xylol-Gruppe, steht in Wechselwirkung mit einem konservierten I332<sup>5</sup>. Des Weiteren wechselwirken vermehrt Phenylalanine mit dieser Molekülseite, diese treten jedoch nicht konserviert auf. Die Bindung des Ribityl-Rests erfolgt sehr unterschiedlich. Konserviert sind hierbei ausschließlich R238 und P30. Zusätzlich binden diesen

---

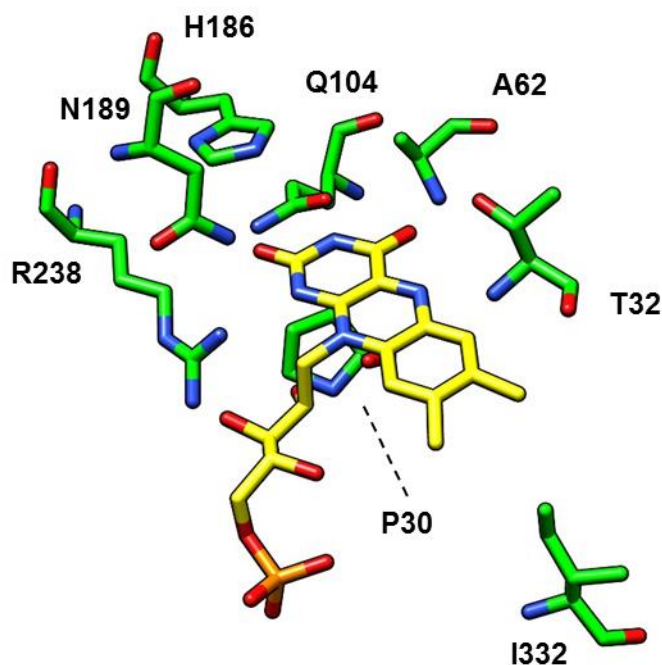
<sup>2</sup> Bei ER der Klasse III (selten auch Klasse I und II) handelt es sich hierbei um ein weiteres Histidin anstelle des Asparagins.

<sup>3</sup> In seltenen Fällen auch ein Glycin.

<sup>4</sup> Bei ER der Klasse III handelt es sich um ein Cystein.

<sup>5</sup> Bei ER der Klasse III ist ein Leucin vorhanden.

Molekülteil häufig Serine, Cysteine, Asparagine und Glutamine, jedoch ebenfalls in keinem einheitlichen Muster. Diese nicht konservierten Interaktionen zwischen Protein und FMN führen zu einer Beeinflussung des Redox-Potentials der prosthetischen Gruppe (Scholtissek et al. 2017).



**Abbildung 3.7:** Darstellung der in allen drei Klassen konservierten Aminosäuren bei der Bindung von FMN. Die Struktur und Nummerierung entsprechen der Morphinonreduktase (MR) aus *Pseudomonas putida* M10 (PDB: 2r14) (Pudney et al. 2007).

### Bindung von Substrat und Cosubstrat

In allen drei Klassen der ER findet die Bindung der reaktiven Gruppe von Substrat und Cosubstrat an derselben Position oberhalb des Isoalloxazin-Rings des FMN statt. Dies konnte durch Kristallisation verschiedener ER mit nicht reaktiven Substrat- und Cosubstrat-Analoga gezeigt werden (Fox & Karplus 1994, van den Hemel et al. 2006, Pudney et al. 2007, Spiegelhauer et al. 2009, Adalbjörnsson et al. 2010). Die grundlegende planare Anordnung der reaktiven Gruppe des (Co)Substrats wird durch  $\pi$ - $\pi$ -Stacking mit dem Isoalloxazin des FMN vorgegeben (Abbildung 3.8). Dieses wechselwirkt im Falle des Substrats mit der  $\pi$ -Bindung der elektronenarmen Doppelbindung (Fox & Karplus 1994, Spiegelhauer et al. 2009), im Falle des Cosubstrats mit dem  $\pi$ -System des Nicotinamids (Pudney et al. 2007, Adalbjörnsson et al. 2010). Ausgehend von dem bereits

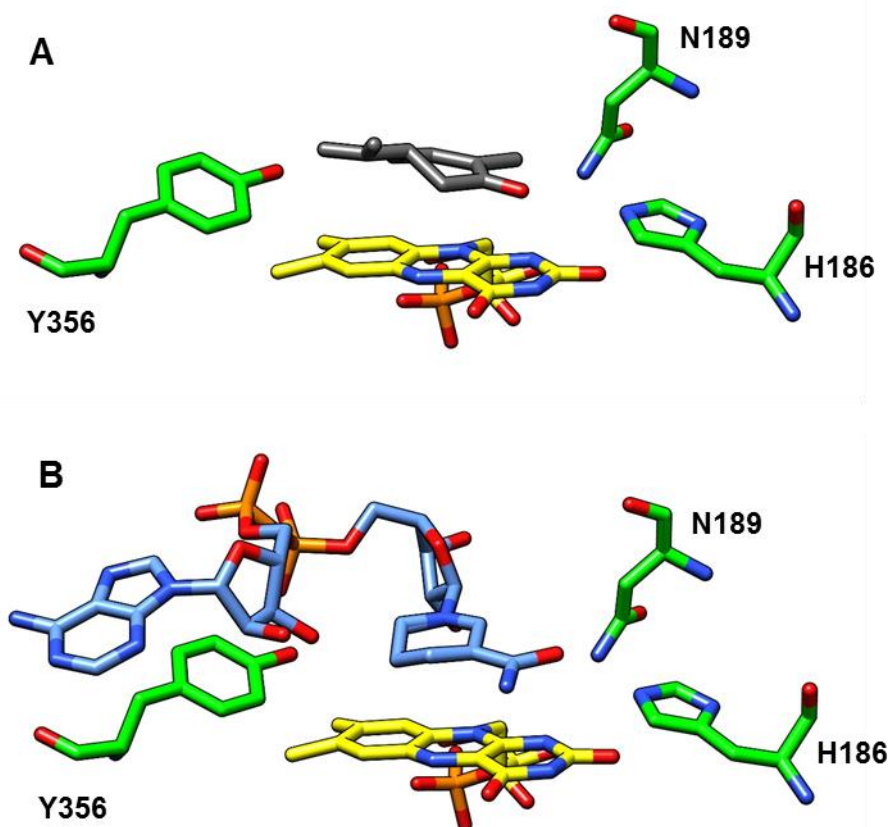
beschriebenen, konservierten Aminosäurepaar H186<sup>6</sup> und N189<sup>2,6</sup> wird das (Co)Substrat über Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich über der prostethischen Gruppe positioniert (Fox & Karplus 1994, Pudney et al. 2007). Hierbei wechselwirkt die elektronenziehende Gruppe des Substrats beziehungsweise das Amid des Nicotinamids des Cosubstrats mit den Aminosäureseitenketten (Fox & Karplus 1994, Pudney et al. 2007). Durch diese Wechselwirkungen wird das C<sub>β</sub>-Atom des Substrats beziehungsweise das C4-Atom des NAD(P)H so positioniert, dass der Hydridtransfer auf das N5-Atom des FMN ermöglicht wird (Fox & Karplus 1994, Pudney et al. 2007).

Die weiteren Wechselwirkungen zwischen aktivem Zentrum und (Co)Substrat liegen innerhalb der Enzymfamilie nicht konserviert vor. Jedoch konnten bei unterschiedlichen ER aus allen Klassen Tyrosinreste mit der Bindung dieser Moleküle in Verbindung gebracht werden. Bei ER der Klassen I und II geht eine Interaktion von einem Tyrosin in der Nähe des C-Terminus aus (Y356 bei der MR), bei ER der Klasse III von einem nahe des N-Terminus (Y25 beim OYE aus *Thermus scotoductus*). Des Weiteren wechselwirkt bei vielen ER aus allen Klassen ein Tyrosin in *Loop 4* mit dem (Co)Substrat (Scholtissek et al. 2017).

Alle beschriebenen Wechselwirkungen befinden sich in räumlicher Nähe zu dem Flavin. Über Interaktionen zwischen Enzym und (Co)Substrat abseits dieser Region ist wenig bekannt, obwohl dies für große Substrate und besonders die Adenosin-Gruppe des NAD(P)H von großem Interesse wäre.

---

<sup>6</sup> MR-Nummerierung

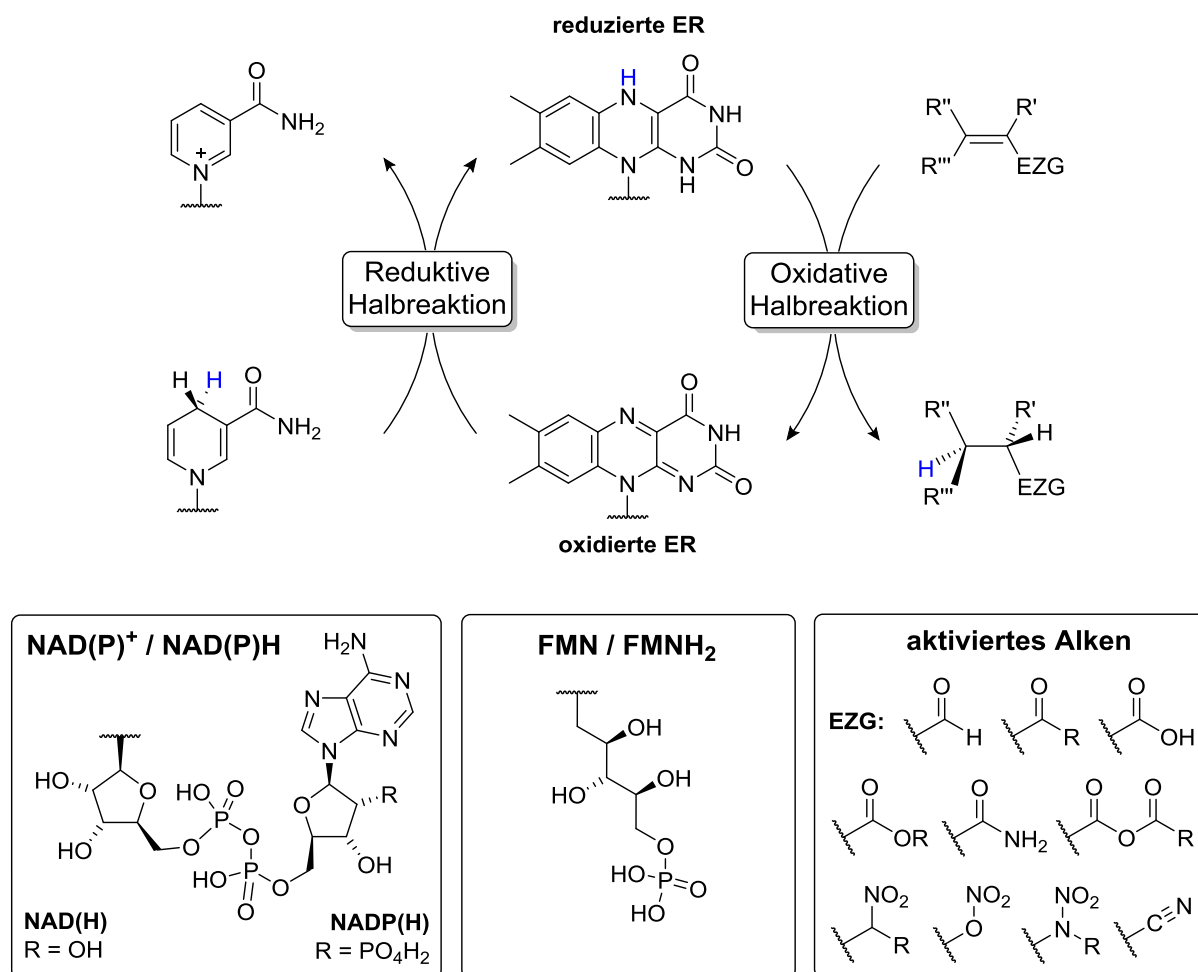


**Abbildung 3.8:** Darstellung der Positionierung von Substraten (**A**, grau, dargestellt ist (*R*)-Carvon) und Cosubstraten (**B**, blau) oberhalb des FMN (gelb) im aktiven Zentrum von ER. Die Struktur entspricht der MR (PDB: 2r14) und des OYE1 (PDB: 3txz), die Nummerierung der MR.

### 3.3.5 Mechanismus der ER-katalysierten *trans*-Hydrierung

Die ER-katalysierte Reduktion von aktivierten Alkenen läuft unter dem Verbrauch von NAD(P)H nach einem Ping-Pong Bi-Bi-Mechanismus ab (Toogood et al. 2010). Somit unterteilt sich die Reaktion in zwei Halbreaktionen, eine reduktive und eine oxidative Halbreaktion (OHR) (Abbildung 3.9). Während der reduktiven Halbreaktion (RHR) bindet NAD(P)H im aktiven Zentrum der ER und es kommt zu einem Hydridtransfer der reduzierten Nicotinamid-Gruppe, wodurch das im Enzym gebundene FMN zu FMNH<sub>2</sub> reduziert wird (Breithaupt et al. 2001). Nachdem das oxidierte Cosubstrat das aktive Zentrum verlassen hat, kommt es zur OHR. Dabei bindet das Alken im aktiven Zentrum der ER, sodass die elektronenarme Doppelbindung dieselbe Position wie das Nicotinamid während der reduktiven Halbreaktion, oberhalb des Isoalloxazinsystems des FMN, einnimmt (Kohli & Massey 1998, Breithaupt et al. 2001, Lonsdale & Reetz 2015). Anschließend kommt es zum Hydridtransfer vom FMNH<sub>2</sub> zum C<sub>β</sub>-Atom der Doppelbindung. Bei einer Vielzahl von ER komplettiert ein Protonenübertrag, ausgehend

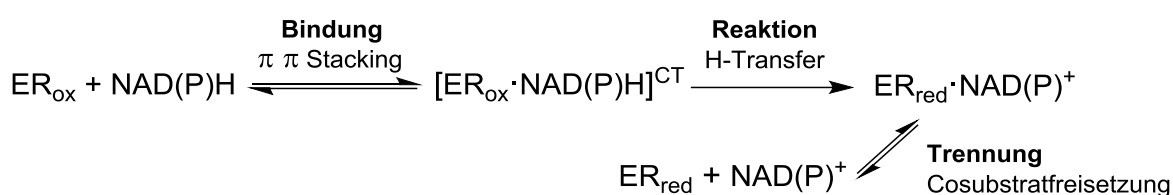
von einem Tyrosin im aktiven Zentrum auf das C<sub>4</sub>-Atom, die Reduktion (Kohli & Massey 1998, Breithaupt et al. 2001). Da Hydrid- und Protonenübertrag von unterschiedlichen Seiten geschieht, entsteht selektiv das jeweilige *anti*-Produkt (Lonsdale & Reetz 2015).



**Abbildung 3.9:** Die zwei Halbreaktionen der Enreduktase (ER)-katalysierten Reduktion von aktivierten Alkenen. Das vom NAD(P)H auf das Alken übertragene Hydridion ist in blau dargestellt. EZG: Elektronenziehende Gruppe.

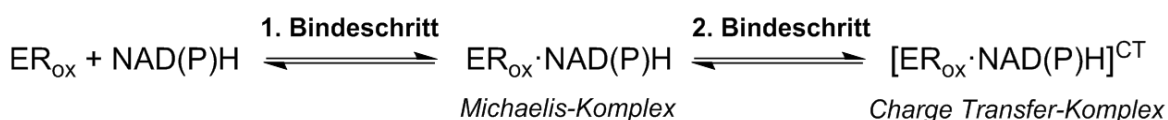
Der Ablauf der RHR wurde für die ER Old Yellow Enzyme 1 (OYE1) aus *Saccharomyces pastorianus* (Karplus et al. 1995), der Morphinonreduktase (MR) aus *Pseudomonas putida* M10 (Pudney et al. 2007) und die Pentaerythritoltetranitrat-Reduktase (PETNR) aus *Enterobacter cloacae* PB2 (Pudney et al. 2009) detailliert aufgeklärt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Halbreaktion in mindestens drei Schritten stattfindet (Abbildung 3.9) (Hay et al. 2009). In einem ersten Schritt kommt es zur bereits erwähnten Bindung des NAD(P)Hs im aktiven Zentrum der ER. Dieser Schritt endet mit dem  $\pi$ - $\pi$  Stacking, der Anlagerung des Nicotinamids des NAD(P)Hs über dem Isoalloxazinrings des FMNs, was über die Bildung eines *Charge Transfer* (CT)-Komplexes mit einer Absorption um 550 nm beobachtet werden kann (Brown et al. 2002, Khan et al. 2002). Dabei fungiert NAD(P)H

als Elektronendonator und FMN als Elektronenakzeptor. Die anschließende Reduktion des FMN und der damit einhergehende H-Transfer stellen den zweiten Schritt der Halbreaktion dar. Dieser kann durch die Abnahme des CT-Komplexes und einer proportionalen Abnahme der Absorption des chromophoren Systems des Isoalloxazins des FMN um 450 nm, bedingt durch die Reduktion zu FMNH<sub>2</sub>, beobachtet werden (Pudney et al. 2009). Die molare Enthalpie dieses Reaktionsschritts konnte für die MR mit ihrem bevorzugten Cosubstrat NADH auf ~60 kJ mol<sup>-1</sup> bestimmt werden (Hay et al. 2008), wodurch ein quasi irreversibler Ablauf der Reaktion bestätigt werden konnte (Hay et al. 2009). Die Trennung von Enzym und oxidiertem NAD(P)<sup>+</sup>, der dritte Schritt der RHR, schließt diese Halbreaktion ab.



**Abbildung 3.10:** Ablauf der reduktiven Halbreaktion. ER: Enreduktase, CT: *Charge Transfer*-Komplex.

Im Falle der RHR der PETNR und des OYE1 konnte ein zusätzlicher initialer Bineschritt vor der Bildung des CT-Komplexes identifiziert werden (Brown et al. 2002, Pudney et al. 2009). Dabei handelt es sich um einen konzentrationsabhängigen Michaelis-Komplex (Brown et al. 2002, Pudney et al. 2009). Vieles deutet darauf hin, dass dieser Reaktionsschritt einer vorgelagerten Bindung der Adenosin-Gruppe des NAD(P)Hs entspricht, wodurch das Cosubstrat im aktiven Zentrum ausgerichtet wird (Pudney et al. 2009). Diese zweiteilige Erkennung bei der Bindung von NAD(P)H ist keine Seltenheit (Deng et al. 1999), da hierdurch der konformative Raum, den die Nicotinamid-Gruppe einnehmen kann, deutlich eingeschränkt wird und somit der katalytisch relevante Übergangszustand mit größerer Wahrscheinlichkeit ausgebildet wird. Interessanterweise konnte dieser zusätzliche Bineschritt bei der MR nicht nachgewiesen werden, was eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeit dieser ER darstellt (Messiha et al. 2005).



**Abbildung 3.11:** Zweistufige Bindung von Nicotinamid-Cosubstraten an Enreduktasen (ER).



### 3.3.6 *Enzyme Engineering* bei ER

Aufgrund des großen Interesses an stereoselektiven Reduktionen von C=C-Doppelbindungen werden ER schon seit den 90iger Jahren für synthetische Zwecke eingesetzt (Vaz et al. 1995). Dazu wurden in der ersten Generation wildtypische Enzyme eingesetzt, wodurch verschiedene Limitationen aufgezeigt wurden (Amato & Stewart 2015).

#### **Änderung der Substratgröße**

Ein Beispiel ist in diesem Kontext die geringe Akzeptanz vieler ER gegenüber sterisch anspruchsvollen Substraten. Dies hat zur Folge, dass die Enzyme zu einem tendenziell frühen Zeitpunkt in der Synthese eingesetzt werden müssen. Dadurch müssen die von den ER gebildeten Chiralitätszentren einen Großteil der Synthesesequenz durchlaufen, wodurch die Gefahr einer Isomerisierung dieser Positionen groß wird. Aus diesem Grund würde die selektive Reduktion eines großen Alkens zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Synthese bevorzugt werden. (Amato & Stewart 2015)

Für den Einsatz einer ER in einer Syntheseroute für das Antiepileptikum (S)-Pregabalin und weiterer Analoga war die Verwendung verschiedener Acrylsäureester-Derivate mit sterisch anspruchsvollen *iso*-Butylresten als Substrate unumgänglich. Da keine wildtypische ER ausreichende Umsätze und Stereoselektivitäten mit diesen Substraten lieferte, sollte das Volumen der Bindetasche verändert werden. Hierzu wurden verschiedene Aminosäuren im aktiven Zentrum der aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) stammenden 12-Oxophytodienoat-Reduktase 1 (OPR1) durch die entsprechenden Residuen aus homologen ER ersetzt. So war es möglich die Stereoselektivität für verschiedene Substrate zu steigern und die Umsätze der Synthesen zum Teil zu verdreifachen, wenngleich sie mit Werten zwischen 8 und 37 % weit entfernt von einem industriell akzeptablen Bereich liegen. (Winkler et al. 2013)

Für das Old Yellow Enzyme 1 (OYE1) aus *Saccharomyces pastorianus* konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der sterisch anspruchsvollen Position W116 im aktiven Zentrum das Substratspektrum um relativ große Baylis-Hillmann-Addukte erweiterte (Walton et al. 2011).

#### **Änderung der Steroselektivität**

Ein weiterer Nachteil bei ER-katalysierten Synthesen ist die immer gleiche Stereoselektivität der Enzyme. Alle bisher charakterisierten Reduktasen ermöglichen die Durchführung ausschließlich einer der zwei möglichen *anti*-Hydrierungen. Das komplementäre *anti*-Produkt bleibt biokatalytisch unzugänglich. Für einen vielseitigen

synthetischen Einsatz wäre jedoch die Existenz enantiokomplementärer ER ideal. Nichtsdestotrotz konnte bisher keine ER mit einer 'reversen' Stereoselektivität identifiziert werden. Dieser negative Aspekt kann in manchen Fällen durch den Wechsel zwischen *cis*- und *trans*-Substrat umgangen werden, wodurch beide Produkte zugänglich werden. Eine Änderung der Alkengeometrie ist jedoch nicht immer umsetzbar und cyclische Substrate verbleiben unveränderbar. (Amato & Stewart 2015)

Diese Einschränkung konnte für das OYE1 überwunden werden. Im Rahmen einer Mutagenese von sterisch anspruchsvollen Aminosäuren im aktiven Zentrum, eigentlich mit dem Ziel ebenfalls die Bindetasche des Enzyms zu vergrößern, wurde zufällig eine W116I-Mutante identifiziert, die eine gedrehte Stereoselektivität aufweist. Hierdurch konnte (*S*)-Carvon selektiv zu (*2S,5S*)-Dihydrocarvon reduziert werden, ein Produkt welches zuvor biokatalytisch unzugänglich war (Padhi et al. 2009). Durch die systematische Untersuchung dieser Enzymposition konnten weitere W116-Mutanten (W116A und W116V) charakterisiert werden, welche für (*S*)- und zusätzlich (*R*)-Carvon eine gedrehte Selektivität aufweisen (Padhi et al. 2009). Durch die Co-Kristallisation der Mutanten komplexiert mit den Substraten konnte eine neue hydrophobe Bindetasche für den Allyl-Rest der Carvon-Spezies identifiziert werden (Pompeu et al. 2013).

Für das Old Yellow Enzyme 2.6 (OYE 2.6) aus *Scheffersomyces stipitis* konnte die Stereoselektivität durch eine Verkleinerung des Bindetaschenvolumens erzielt werden. Eine Y78W Mutation führte zu einer gedrehten Bindung des Substrats 2-(Hydroxymethyl)-2-Cyclopentenon. Durch Strukturaufklärung der Enzymvarianten konnte gezeigt werden, dass die sterisch anspruchsvollere Indol-Gruppe eine Änderung der Position der Hydroxymethyl-Gruppe des Substrats erzwingt, wodurch selektiv das ‚gedrehte‘ Produkt entsteht. Durch eine zusätzliche I113C Mutation und der damit verbundenen Bildung eines alternativen Raumes im aktiven Zentrum konnte dieses Verhalten auf weitere Substrate übertragen werden. (Walton et al. 2014)

Auch die Stereoselektivität der Enreduktase YqjM aus *Bacillus subtilis* konnte für das Substrat 2-Methyl-Cyclohexenon verändert werden. Dies wurde mittels Combinatorial Active site Saturation Testing (CASTing; (Reetz & Krebs 2011) erreicht. Basierend auf einer Kristallstruktur wurden 20 konservierte und nicht-konservierte Aminosäuren des aktiven Zentrums der kombinierten Sättigungsmutagene unterzogen (Bougioukou et al. 2009). Hierdurch konnte nicht nur die Stereoselektivität zum bisherigen (*R*)-Produkt erhöht werden, es wurden auch Mutanten charakterisiert die selektiv das ‚gedrehte‘ (*S*)-Produkt generierten (Bougioukou et al. 2009).

### Anpassung an industrielle Prozessbedingungen

Zusätzlich zum *Enzyme Engineering* zur Überwindung natürlich gegebener Nachteile von ER, wurden diese Enzyme an die Anwendung in industriellen Prozessen angepasst. Einige Veränderungsvorhaben zielten dabei auf die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit ab. In einer umfangreichen Studie wurden in diesem Kontext eine Vielzahl von Circularpermutationen des OYE1 durchgeführt (Daugherty et al. 2013). Hierzu wurden die originalen Termini des Enzyms zusammengefügt und in einer ersten Durchsicht an über 250 unterschiedlichen Positionen des 400 Aminosäuren langen OYE1 versetzt, mit dem Ziel die Reaktionsgeschwindigkeit durch einen vergrößerten und flexibleren Reaktionsraum zu erhöhen. In dieser Studie konnten vier Regionen der ER um die *Loop*-Regionen 3, 5 und 6 identifiziert werden, bei denen einige der Circularpermutanten eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit mit drei Substraten zeigten (Daugherty et al. 2013). Kinetische Messungen konnten zeigen, dass die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit durch eine beschleunigte NADP<sup>+</sup>-Freisetzung erzielt wurde (Daugherty et al. 2015).

Die Reaktionsgeschwindigkeit der PETNR aus *Enterobacter cloacae* wurde durch Sättigungsmutagenesen von vermeintlich am Reaktionszyklus beteiligten Residuen oder Aminosäuren, die sich in Nähe des aktiven Zentrums befinden, erhöht (Hulley et al. 2010). Insbesondere zwei Mutationen zeigten sich als ausgesprochen förderlich, die Veränderung von W102 zu F oder I. Interessanterweise entspricht dieses Tryptophan dem W116 des OYE1, dessen Mutation die Zugänglichkeit der invertierten *trans*-Produkte und die Erweiterung des Substratspektrums ermöglichte.

Mutationen am Eingang des aktiven Zentrums der Nicotinamid-abhängigen Cyclohexenon Reduktase (NCR) aus *Zymomonas mobilis* führten zu einer minimalen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit verschiedenen Cyclohexenon-Derivaten (Reich et al. 2012). Im Rahmen der Arbeit wurden zusätzlich die vier sich am Zugang zur Bindetasche befindenden *Loop*-Regionen durch diejenigen des OYE1 ausgetauscht, jedoch ohne nennenswerten Erfolg (Reich et al. 2012).

Neben der Stereoselektivität wurde auch die Reaktionsgeschwindigkeit von YqjM im Rahmen der CASTing-Studie erhöht (Bougioukou et al. 2009). Es konnten Mutanten identifiziert werden, die eine bis zu 130-fach erhöhte Reduktionsrate des vom Wildtyp schlecht akzeptierten Substrats 2-Methyl-Cyclohexenon aufwiesen. Durch eine Untersuchung der Aktivität der reaktivsten Mutanten mit weiteren Substraten konnte eine weiterreichende Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bestätigt werden (Bougioukou et al. 2009).

Des Weiteren konnte die thermische Stabilität von ER erhöht werden. Hierzu wurden die *Loop*-Regionen 5 und 6 der NCR verkürzt (Reich et al. 2014). Diese Proteinregionen

wurden ausgewählt, da diese zwei Oberflächenschleifen bei der Mehrheit der thermisch stabilen ER kürzer als bei thermisch labilen ER sind (Scholtissek et al. 2017). Zwar zeigten die NCR-Varianten keine zum wildtypischen Enzym veränderten Denaturierungstemperaturen, dafür wurde dieses bei der Stabilität in verschiedenen organischen Lösemitteln und bei der Reaktivität unter erhöhten Temperaturen übertroffen (Reich et al. 2014). Des Weiteren konnte durch den Austausch von *Loop*-Regionen das Substratspektrum der NCR erweitert werden. Durch den Übertrag der *Loop*-Regionen 5 oder 6 des OYE1 beziehungsweise der MR konnten drei unterschiedliche Aldehyde mit zu den Spender-Enzymen vergleichbaren Geschwindigkeiten reduziert werden (Reich et al. 2016). Eine ebenfalls geringere Produktinhibition durch das Nebenprodukt NAD<sup>+</sup> war beobachtbar (Reich et al. 2016).

Zusätzlich wurden Anstrengungen zur Erhöhung der Stereoselektivität der Biokatalysatoren unternommen. So wurden Sättigungsmutagenesen der substratbindenden und innerhalb der ER konservierten Aminosäurepositionen H181 und H184 der PETNR durchgeführt (Toogood et al. 2011). Veränderungen der Position 184, insbesondere eine H184N-Mutation führte in diesem Kontext zur gewünschten Erhöhung der Stereoselektivität.

### 3.3.7 Enreduktase 1 aus *Nostoc* sp. PCC7120 (NostocER1)

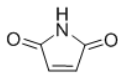
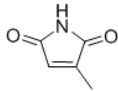
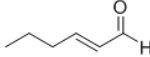
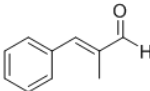
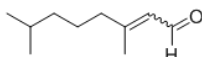
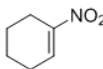



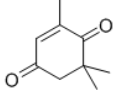
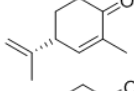
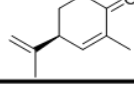
Die ER aus Cyanobakterien nehmen eine herausragende Stellung innerhalb dieser Enzymfamilie ein (Fu et al. 2015). Einige der bisher charakterisierten Vertreter weisen im Gegensatz zu ihren Homologen teilweise hohe Aktivitäten mit zahlreichen Substraten bei gleichzeitig hohen Stereoselektivitäten auf (Fu et al. 2015). Ein besonders vielversprechendes Enzym im Hinblick für eine industrielle Anwendung ist die Enreduktase 1 aus dem cyanobakteriellen Stamm *Nostoc* sp. PCC7120 (NostocER1), auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

#### Substratspektrum

Als Substrate wurden für die NostocER1 die zyklischen Imide Maleimid und 2-Methylmaleimid, die Aldehyde *trans*-2-Hexenal, *trans*-3-Phenyl-2-Methylpropenal und Citral, das Nitroalken 1-Nitrocyclohexen, sowie die Lactone 2-Cyclohexenon, 2-Cyclopentenon, 2-Methyl-2-Cyclopentenon, Ketoisophoron, (*S*)-Carvon und (*R*)-Carvon untersucht (Tabelle 3.2). Dabei konnte gezeigt werden, dass die NostocER1 alle verwendeten Stoffklassen als Substrat akzeptiert. Lediglich die gemessene Aktivität mit den zwei eingesetzten Cyclopentan-Derivaten war sehr gering. Ansonsten waren die gemessenen Aktivitäten im Vergleich zu den Aktivitäten von neun weiteren cyanobakteriellen ER ausgesprochen gut.

Bei fünf der zwölf untersuchten Substrate wies die NostocER1 die höchste Aktivität auf oder besaß keinen signifikanten Unterschied zum Enzym mit der höchsten Aktivität. Des Weiteren waren die Aktivitäten mit den interessanten Synthesebausteinen (R)-Carvon und 1-Nitrocyclohexen ebenfalls vergleichsweise hoch (Fu et al. 2013).

**Tabelle 3.2:** Spezifische Aktivitäten der NostocER1 mit Substraten verschiedener Stoffklassen (Fu et al. 2013). Assay-Bedingungen: 10 mM Substrat, 500  $\mu$ M NADPH, 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,0), 25 °C.

Substrat	Stoffklasse	Struktur	Aktivität, U mg <sup>-1</sup>
Maleimid	Imid		10,28 $\pm$ 0,28
2-Methylmaleimid	Imid		13,53 $\pm$ 2,63
(E)-2-Hexenal	Aldehyd		0,85 $\pm$ 0,22
(E)-3-Phenyl-2-Methylpropenal	Aldehyd		0,38 $\pm$ 0,09
Citral	Aldehyd		0,32 $\pm$ 0,19
1-Nitrocyclohexen	Nitroverbindung		1,04 $\pm$ 0,01
2-Cyclohexenon	Keton		0,59 $\pm$ 0,03
2-Cyclopentenon	Keton		0,08 $\pm$ 0,05
2-Methyl-2-Cyclopentenon	Keton		0,01 $\pm$ 0,01
Ketoisophoron	Keton		2,16 $\pm$ 0,09
(S)-Carvon	Keton		0,78 $\pm$ 0,12
(R)-Carvon	Keton		0,69 $\pm$ 0,02

### Cosubstratpräferenz

Wie die meisten ER präferiert auch die NostocER1 NADPH über NADH (Toogood et al. 2010, Fu et al. 2013). So ist beispielsweise die Aktivität mit 200  $\mu\text{M}$  Cosubstrat und Maleimid als Substrat mit NADH um das 17,2-fache geringer als mit NADPH (Fu et al. 2013). Aufgrund des geringeren Preises und der höheren Stabilität unter Prozessbedingungen ist die Nutzung von NADH jedoch industriell bevorzugt (Wu et al. 1986, You et al. 2017), wodurch sich hier ein Nachteil der NostocER1 offenbart.

Für das bevorzugte Cosubstrat NADPH besitzt die NostocER1 eine höhere Affinität im Vergleich zu fast allen charakterisierten cyanobakteriellen Homologen. Der  $K_m$  für dieses Cosubstrat liegt bei  $92.2 \pm 8.3 \mu\text{M}$  (Fu et al. 2013).

### Weitere Charakteristika und bisherige Anwendungen

Die hohe Stereoselektivität der NostocER1 konnte für die Substrate 2-Methylmaleimid mit einem 99 %igen Diastereomerenüberschuss (de) des (*R*)-Produkts, Ketoisophoron mit einem 94 %igen<sup>7</sup> Enantiomerenüberschuss (ee) des (*R*)-Produkts, (*S*)-Carvon (de 89 %, (*R*)-Produkt) und (*R*)-Carvon (de 97 %, (*R*)-Produkt) bestätigt werden (Fu 2013).

Des Weiteren konnte die NostocER1 für einen Zeitraum von mindestens drei Monaten ohne messbaren Verlust von Aktivität in 25 % (v/v) Glycerol bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Halbwertszeit in 0,1 M Na-Phosphatpuffer lag bei konstanter Temperierung mit  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  bei 68 h, mit  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  bei 30 h und bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  bei 0,15 h. (Fu 2013)

Ihr Potential hat die NostocER1 durch den erfolgreichen Einsatz in verschiedenen Anwendungsbereichen unter Beweis gestellt. So war es möglich in einem Ganzzellansatz im Litermaßstab 96,8 % von 300 mM (*R*)-Carvon in 9 h selektiv zu (*2R,5R*)-Dihydrocarvon umzusetzen (de 96,5 %) (Castiglione et al. 2017). Des Weiteren wurden quervernetzte Enzymaggregate, im Zuge einer trägerfreien Immobilisierung der Enzyme, hergestellt (Mähler 2014). Die Aktivitätsrückgewinnung nach der Quervernetzung lag dabei bei 45,0 % (Mähler 2014). Eine weitere erfolgreich durchgeführte Immobilisierungsstrategie der NostocER1 bestand in der Verankerung der Enzyme in bakterielle Zellhüllen (Polte 2016). Hierbei konnte die ER, sowohl C- als auch N-terminal, über Membrananker an die Cytoplasmamembran von *E. coli* angeheftet werden, wodurch katalytisch aktive Zellhüllen generiert wurden (Polte 2016).

---

<sup>7</sup> Nach 2 h Reaktionszeit.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Allgemeines und biologisches Material

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien kann im Anhang eingesehen werden. Diese beinhaltet die verwendeten Geräte (Kapitel 12.1.1), Verbrauchsmaterialien (Kapitel 12.1.2), biologischen Materialien (Kapitel 12.1.3), Chemikalien (Kapitel 12.1.4), Enzyme, Standards und *Kits* (Kapitel 12.1.5), Oligonukleotide (Kapitel 12.1.6), Gen- und Proteinsequenzen der wildtypischen Enzyme (Kapitel 12.1.7) sowie Puffer und Medien (Kapitel 12.1.8).

### 4.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1 Isolation von DNS

##### Plasmidische DNS

Die Isolation von plasmidischer DNS erfolgte unter Zuhilfenahme des FastGene® Plasmid Mini Kit. Hierzu wurden 5 mL einer Plasmid enthaltenden *E. coli*-Vorkultur sedimentiert und die gewünschte DNS nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmide wurden in 50 µL des vom Hersteller bereitgestellten Niedrigsalz-Tris-Puffers gelöst und bei -20 °C gelagert.

##### DNS-Fragmente

Um amplifizierte DNS zu isolieren wurde das FastGene® Gel/PCR Extraction Kit herangezogen. Die DNS-Fragmente wurden dabei nach Herstellerangaben separiert, in 30 µL des vom Hersteller bereitgestellten Niedrigsalz-Tris-Puffers gelöst und direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten

Die Amplifikation von DNS-Fragmenten wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem *Thermocycler* durchgeführt. Dabei wurden die Polymerasen Phusion® HF, Q5® HF oder OneTaq® verwendet. Die direkte Amplifikation von DNS aus ganzen *E. coli*-Zellen wurde mittels des FastGene® Optima HotStart ReadyMix durchgeführt.

### Phusion® HF und Q5® HF

Die Amplifikation der Fragmente fand in einem 25 µL Ansatz statt. Wurde eine größere DNS-Menge benötigt wurde das Gesamtvolumen auf 50 µL erhöht und die Teilvolumina wurden entsprechend angepasst. Ein PCR-Ansatz beinhaltet 1 µL plasmidische DNS (wobei die Endkonzentration < 10 ng betrug), 0,5 µM Vorwärts- beziehungsweise Rückwärts-*Primer*, 0,2 mM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und 0,02 U µL<sup>-1</sup> der entsprechenden Polymerase mit dem zugehörigen Phusion® HF Puffer beziehungsweise Q5® Reaktionspuffer. Die Bedingungen der PCR werden in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die Temperatur der 30-sekündigen Anlagerung der *Primer* während der Zyklisierung wurde mittels der vom Hersteller bereitgestellten Software (NEB T<sub>m</sub> Calculator) bestimmt.

**Tabelle 4.1:** Für die Polymerasen Phusion® HF und Q5® HF verwendete Bedingungen bei der thermischen Zyklisierung.

Schritt	Temperatur, °C	Zeit, s
Initiale Denaturierung	98	30
Zyklisierung mit 35 Zyklen	98	10
	variabel	30
	72	30 pro kb
Finale Elongation	72	300

### OneTaq®

Die Amplifikation der Fragmente wurde ebenfalls in 25 µL Ansätzen, beziehungsweise falls nötig in 50 µL Ansätzen durchgeführt. Da der vorgemischte OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer verwendet wurde, wurden 50 % (v/v) dieser Mischung mit 2 µL Ausgangs-DNS (bis zu einer absoluten Menge von 1 µg) und je 0,5 µM Vorwärts- beziehungsweise Rückwärts-*Primer* vereinigt. Das fehlende Volumen wurde mit sterilem, entionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub>) aufgefüllt. Die Bedingungen der PCR werden in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Temperatur der 30-sekündigen Anlagerung der *Primer* während der Zyklisierung wurde ebenfalls mittels der vom Hersteller bereitgestellten Software (NEB T<sub>m</sub> Calculator) bestimmt.



**Tabelle 4.2:** Ablauf der thermischen Zyklisierung mit der Polymerase OneTaq®.

Schritt	Temperatur, °C	Zeit, s
Initiale Denaturierung	94	30
Zyklisierung mit 30 Zyklen	94	20
	variabel	30
	68	60 pro kb
Finale Elongation	68	300

### DNS-Amplifikation aus ganzen Zellen

Um DNS direkt aus ganzen *E. coli*-Zellen zu amplifizieren, wurde eine Kolonie-PCR in einem 20 µL Ansatz durchgeführt. Hierfür wurde ein Teil der Kolonien von einer Agarplatte in 8 µL sterilem H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub> suspendiert. Diese Suspension wurde anschließend mit je 0,5 µM Vorwärts- beziehungsweise Rückwärts-*Primer* und 10 µL FastGene Optima HotStart Ready Mix versetzt. Dieser Mix besteht aus einer einer Mischung zweier Polymerasen (einer Taq-Polymerase und einer optimierten archealen DNA Polymerase), dNTPs, dem zu den Polymerasen gehörenden Puffer und dem Beladungsfarbstoff, welcher für die anschließende Beladung eines Agarosegels benötigt wird. Die Bedingungen der PCR werden in Tabelle 4.3 aufgeführt.

**Tabelle 4.3:** Ablauf der thermischen Zyklisierung mit dem FastGene Optima Hot-Start Ready Mix.

Schritt	Temperatur, °C	Zeit, min
Initiale Denaturierung	95	5
Zyklisierung mit 35 Zyklen	95	0,25
	50	0,25
	72	1,5
Finale Elongation	72	5

### 4.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Der ortsgerechte Austausch von einzelnen Aminosäurepositionen wurde unter Verwendung des QuikChange Lightning® Site-Directed Mutagenesis Kit in einem *Thermocycler* weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz betrug entgegen des Herstellerprotokolls 10  $\mu\text{L}$ . Die für die Mutagenese benötigten *Primer* wurden mittels der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software (QuikChange Primer Design) konzipiert. Mit den bereitgestellten Plasmiden wurden abschließend *E. coli* XL-10 Gold oder DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert.

### 4.2.4 Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentration doppelsträngiger DNS wurde mittels eines *BioSpectrometer* unter Zuhilfenahme einer Mikroküvette ermittelt. Als Nullprobe wurde Elutionspuffer des Plasmidreinigungssets beziehungsweise DNS-Fragmentreinigungssets verwendet. Die DNS-Konzentration wurde bei 260 nm vermessen. Eine Abschätzung der Reinheit wurde durch den Absorptionsquotienten aus 260 und 280 nm durchgeführt. Dieser befand sich zwischen 1,85 und 2,15.

### 4.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Amplifikation von DNS-Fragmenten wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden die Proben in Ladepuffer suspendiert und in einem Agarosegel aus 1 % (w/v) Agarose und Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer bei einer Spannung zwischen 120 und 140 V für 30 bis 45 min aufgetrennt. Zur Visualisierung der aufgetragenen DNS wurde in dem Agarose-Gel 5  $\mu\text{L}$  des DNS-Farbstoffes MIDORI green gelöst. Ein 100 bp-Standard wurde zur Größenbestimmung der Fragmente mitgeführt.

### 4.2.6 Restriktion und Ligation von DNS

Amplifizierte DNS-Fragmente und Plasmide wurden in einer Konzentration von 10 – 20  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten. Dabei wurden die Enzyme mit der DNS nach Herstellerangaben vereint und für 1 – 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die Wahrscheinlichkeit einer Rezyklisierung bei der Spaltung von Plasmiden zu minimieren wurde der Restriktion eine Dephosphorylierung angeschlossen. Hierzu wurden den entsprechenden Restriktionsansätzen 0,2 U  $\mu\text{L}^{-1}$  Antarctic Phosphatase und der entsprechende Puffer beigegeben. Daraufhin wurde die DNS für 15 min bei 37 °C dephosphoryliert und die Phosphatase abschließend für 5 min bei 65 °C thermisch inaktiviert.

Die gespaltenen DNS Fragmente wurden mittels des GenElute PCR Clean-up Kits isoliert. Die Plasmide wurden anschließend mit Hilfe des Quick Ligation Kits binnen 5 min bei Raumtemperatur (RT) oder der T4 DNA Ligase bei 16 °C über Nacht nach den entsprechenden Herstellerangaben zusammengefügt und zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen herangezogen.

#### 4.2.7 Assemblierung nach Gibson

Für die Assemblierung von PCR-generierten DNS-Fragmenten nach Gibson wurde der NEBuilder<sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Master Mix verwendet. Hierzu wurden in einen 20  $\mu$ L Ansatz je 0,2 pmol der kurzen (< 1 kb) Genfragmente, 0,02 pmol des längeren Vektorfragments und 10  $\mu$ L des Master Mix miteinander vereint. Anschließend wurde der Ansatz für 60 min bei 50 °C in einem *Thermocycler* inkubiert. Danach wurden 8  $\mu$ L des Ansatzes mit 1  $\mu$ L DpnI und dem zugehörigen *CutSmart<sup>™</sup> Buffer* versetzt und für 30 min bei 37 °C temperiert. Dies war nötig um die nicht synthetisch generierten und somit methylierten Plasmide, welche als Vorlage für die Amplifizierung der DNS-Fragmente verwendet wurden, abzubauen. Dieser verdaut Ansatz wurde abschließend für 20 min bei 80 °C inkubiert und direkt für die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  oder XL-10 Gold-Zellen herangezogen.

#### 4.2.8 Präparation kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen

Um Fremd-DNS erfolgreich in *E. coli* einbringen zu können, wurden chemisch kompetente Zellen hergestellt. Hierfür wurde zunächst eine 4 mL Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms hergestellt. 1 mL dieser Vorkultur diente als Inokulum für eine 100 mL Kultivierung im Schüttelkolben bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,3 - 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen über einer Lagerung auf Eis auf < 4 °C gekühlt. Während des gesamten folgenden Vorgangs wurde darauf geachtet, eine Temperaturerhöhung zu vermeiden, um die finale Transformationsfähigkeit der Zellen zu maximieren. Die Zellen wurden für 10 min bei 7000 g und 4 °C sedimentiert. Nach Entfernen des Zentrifugats wurden die Zellen in 20 mL vorgekühlter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend erfolgte die erneute Sedimentation der Zellen für 10 min bei 7000 g und im Anschluss daran die Suspendierung in 10 mL vorgekühlter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 20 % (v/v) Glycerin. Abschließend wurden die Zellen in aliquote Teile von 90  $\mu$ L beziehungsweise 180  $\mu$ L aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für bis zu sechs Monate gelagert.

### 4.2.9 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Das Einbringen von plasmidischer DNS erfolgte durch Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen. Dazu wurden bei Ligationsansätzen und Ansätzen der Assemblierung nach Gibson 180  $\mu\text{L}$  der bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 20  $\mu\text{L}$  der jeweiligen DNS-Präparation (10 % (v/v)) gemischt. Bei Plasmidpräparationen wurden 2  $\mu\text{L}$  auf 90  $\mu\text{L}$  aufgetaute Zellen (2,2 % (v/v)) gegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem 30 s Hitzeschock bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  unterzogen und für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde den Zellen 400 % (v/v) eines auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten Transformationsmediums (SOC-Medium) zugegeben und die Zellsuspension wurde für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 300 rpm in einem Thermomixer regeneriert. Bei eingebrachten Plasmidpräparationen wurden 200  $\mu\text{L}$  dieser Suspension direkt auf *Lysogeny broth* (LB)-Agarplatten des entsprechenden Selektionsmarkers ausplattiert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Um die ausplattierte Zellmenge bei der Transformation mit einem Ligationsansatz zu erhöhen, wurden die regenerierten Zellen vor dem Auftrag auf die Agarplatte sedimentiert (Tischzentrifuge, 2500 g, 5 min) und in 200  $\mu\text{L}$  Medium resuspendiert.

### 4.2.10 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS wurde als Auftragsarbeit von der Firma Eurofins Genomics GmbH durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden ausschließlich gereinigte Plasmidpräparationen mit einer Gesamtmasse von  $> 100\text{ ng}$  herangezogen. Soweit möglich wurden die verwendeten *Primer* vom Dienstleister bereitgestellt. Spezifische *Primer* wurden mit den Plasmidpräparationen in einem gesonderten Eppendorf-Reaktionsgefäß in einer Konzentration von 0,1 mM an den Dienstleister versandt.

## 4.3 Kultivierung von *E. coli*

### 4.3.1 Stammhaltung

Die kurzfristige Stammhaltung bis zu zwölf Wochen von *E. coli*-Zellen erfolgte auf LB-Agar-Platten versetzt mit dem entsprechenden Selektionsmarker. Diese wurden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und ihr Austrocknen wurde durch den Verschluss der Petrischalen mit Parafilm verzögert. Für eine verlängerte Lagerung wurde eine Zellbank angelegt. Hierfür wurden die Zellen zunächst in 3 mL LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsmarker, bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $200\text{ min}^{-1}$  (Exzentrizität 5 cm) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6

bis 1,0 kultiviert. Anschließend wurde 15 % (v/v) steriles Glycerin zugegeben und die Zellen wurden auf die finale Temperatur von -80 °C abgekühlt.

### 4.3.2 Bestimmung der Zellkonzentration

#### Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von *E-coli*-Zellsuspensionen wurde mit einem Einstrahlphotometer in Küvetten zur einmaligen Verwendung mit einer Schichtdicke von 1 cm und bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

#### Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse (BTM) wurde gravimetrisch bestimmt. Hierfür wurden leere 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 80 °C für mindestens 24 h getrocknet und nach ihrem Abkühlen gewogen. Anschließend wurden 1 - 2 mL der zu bestimmenden Zellsuspension in den Reaktionsgefäßen sedimentiert (Tischzentrifuge, 17200 g, 10 min), der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde für mindestens 24 h bei 80 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Reaktionsgefäße erneut gewogen und über die Differenz der Massen die Konzentration der BTM bestimmt (Gleichung 4.1).

$$c_x = \frac{m_{voll} - m_{leer}}{V} \quad 4.1$$

$c_x$	Biotrockenmassekonzentration, g L <sup>-1</sup>
$m_{voll}$	Masse des Reaktionsgefäßes mit Zellen, g
$m_{leer}$	Masse des Reaktionsgefäßes ohne Zellen, g
$V$	Volumen der zu bestimmenden Zellsuspension, L

### 4.3.3 Vorkulturherstellung

Vorkulturen wurden in sterilen Reagenzröhren mit einem Nominalvolumen von 13 mL und montiertem Belüftungsstopfen durchgeführt. Diese wurden mit 4 mL *Terrific broth* (TB)-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsmarker, befüllt und entweder durch den Übertrag einer Einzelkolonie einer Agar-Platte oder mit Zellen der Zellbank inokuliert.

#### 4.3.4 Heterologe Expression von Proteinen im Schüttelkolben

Je 2 mL einer Vorkultur wurden für die Inokulation von Schüttelkolben (Nominalvolumen 1000 mL) gefüllt mit 200 mL TB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsmarker, verwendet. Das Wachstum erfolgte im Schüttelinkubator bei  $200 \text{ min}^{-1}$  (Exzentrizität 5 cm) und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  exakt bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6. Anschließend wurden die Kolben für 2 min auf Eis abgekühlt um die Expressionstemperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  zu erreichen. Die Expression wurde durch die Zugabe von 0,2 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Herstellung der Enzyme erfolgte im Schüttelinkubator bei  $250 \text{ min}^{-1}$  (Exzentrizität 3,5 cm) und  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für exakt 20 h. Anschließend wurden die Zellen für die weitere Verwendung durch Sedimentation isoliert und direkt aufgeschlossen oder kurzzeitig bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  oder  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Untersuchung des Einflusses der Expressionstemperatur wurde nach dem Erreichen der  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 die Zeit des Abkühlens der Kolben entsprechend verlängert, verkürzt oder gestrichen, um die gewünschte Temperatur der Zellsuspension zwischen  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  zu erreichen.

#### 4.3.5 Heterologe Expression von Proteinen im Bioreaktor

Um Proteine in einem skalierbaren Reaktionssystem bereitzustellen wurden Expressionen im DASGIP® Parallel Bioreactor System durchgeführt. Dieses Reaktionssystem besteht aus vier identischen, gläsernen Rührkesselreaktoren mit einem Flachboden und einem Nominalvolumen von 1,5 L. Das Arbeitsvolumen beträgt 0,3 – 0,8 L. Die Reaktoren sind jeweils mit zwei Seitenarmen ausgerüstet, wobei ein Arm bestückt mit einem Schraubdeckel mit Silikonseptum die sterile Zugabe von Flüssigkeiten und Suspensionen erlaubt. Der Leistungseintrag erfolgt durch einen Überkopf-Elektromotor, welcher eine von oben eingetauchte Rührwelle mit zwei 6 Blatt-Scheibenrührern antreibt. Für die separate Regelung der Temperatur ist der untere Teil jedes Reaktors von einem Heizblock umgeben. Im Deckel der Reaktoren sind Durchführungen für pH-Sonde, Sauerstoffpartialdruck ( $\text{pO}_2$ )-Sonde, Füllstandssonde, Temperaturfühler, Begasungsrohr, Abluftkühlung, Probenahmerohr und insgesamt fünf Luer-Lock-Schraubanschlüsse für die Zugabe von Säure, Base, Antischaummittel und Zulaufmedium. Die Zugabe der Lösungen erfolgt über vier individuell ansteuerbare Mikropumpen. Die Begasung wird über vier Gasmischstationen bewerkstelligt, die eine individuelle Begasung mit Druckluft und Stickstoff oder einer Mischung dieser Gase erlauben. Ab einem Reaktordrucküberdruck von 0,4 bar wird der Zuluftvolumenstrom automatisch reduziert, um eine Schädigung der Glaskessel zu vermeiden. Die Prozesssteuerung sowie Dokumentation erfolgt mit der

Software DASware® control, die eine separate Einstellung der Prozessparameter für jeden Reaktor erlaubt.

### **Heterologe Expression mit Zulauf**

Nach abgeschlossener Vorkulturherstellung wurde je 1 mL Zellsuspension zur Inokulation eines Schüttelkolbens (Nominalvolumen 500 mL) gefüllt mit 100 mL Wilms-Medium, versetzt mit 5 g L<sup>-1</sup> Glucose und Selektionsmarker, verwendet. Dieser Schüttelkolben wurde bei 200 min<sup>-1</sup> (Exzentrizität 5 cm) und 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator temperiert. Die Zellen wurden durch Sedimentation isoliert und durch die Zugabe von frischem, mit Glucose und Selektionsmarker versetztem Wilms-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 30 konzentriert. Die Bioreaktoren wurden mit je 295 mL sterilem Wilms-Medium, versetzt mit 1 g L<sup>-1</sup> Glucose und Selektionsmarker, befüllt und durch die Zugabe von 5 mL Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 inokuliert. Der pH wurde während der gesamten Kultivierung auf 7,0 reguliert. Dies erfolgte durch die automatische Zugabe einer 12,5 % (v/v) wässrigen Ammoniaklösung (NH<sub>3</sub>) beziehungsweise einer 1 M Phosphorsäurelösung (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Der pO<sub>2</sub> wurde während des gesamten Bioprozesses über 20 % Luftsättigung gehalten und über den Leistungseintrag sowie die Begasungsrate geregelt. Für die heterologe Coexpression einer Enreduktase und einer Formiatdehydrogenase wurde ein leicht verändertes, literaturbekanntes Hochzelldichteverfahren verwendet (Castiglione et al. 2017), welches in die drei Prozessabschnitte Satzphase, Zulaufphase und Produktionsphase unterteilt werden kann. Die ersten beiden Prozessabschnitte dienen hierbei zur initialen Biomassebildung, wogegen die darauffolgende Produktionsphase zur Bereitstellung der Zielproteine durchgeführt wurde.

#### Satzphase

Während der Satzphase sollte die dem Medium vorgelegte Glucose (1 g L<sup>-1</sup>) verbraucht werden. Hierzu wurde die Temperatur auf 37 °C geregelt. Der komplette Verbrauch der Kohlenstoffquelle und somit das Ende der Satzphase wurde durch einen sprunghaften Anstieg des pO<sub>2</sub> angezeigt.

#### Zulaufphase

Für die Zulaufphase wurde die Temperatur auf 30 °C verringert, um den metabolischen Stress für die Zellen zu reduzieren. Über einen exponentiellen Zulauf wurde eine Wachstumsrate von 0,15 h<sup>-1</sup> vorgegeben. Hierfür wurde die Zugabe einer Substratlösung mit 100 g L<sup>-1</sup> Glucose, 19,8 g L<sup>-1</sup> Diammoniumhydrogenphosphat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und 30 mg L<sup>-1</sup> Kanamycin von 1,77 mL h<sup>-1</sup> L<sub>Kultur</sub><sup>-1</sup> über 19,5 h exponentiell auf 64,80 mL h<sup>-1</sup> L<sub>Kultur</sub><sup>-1</sup> gesteigert (Gleichung 4.2). Nach 5,5 h dieses Prozessabschnitts

wurde eine Einmalzugabe von  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  Magnesiumsulfat Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ) und  $3 \text{ mL L}^{-1}_{\text{Kultur}}$  Spurenelementlösung durchgeführt.

$$F_{\text{ein}}(t) = \frac{\mu_{\text{soll}} \cdot c_{x,0} \cdot V_R^0}{Y_{x,s} \cdot c_s} \cdot e^{\mu_{\text{soll}} \cdot t} \quad 4.2$$

$F_{\text{ein}}$	Zulauftrate, $\text{L h}^{-1}$
$\mu_{\text{soll}}$	Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$
$c_{x,0}$	Anfangsbiomassekonzentration, $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$
$V_R^0$	Anfangsreaktionsvolumen, L
$Y_{x,s}$	Substratbezogener Biomasseausbeutekoeffizient (hier: 0,39), $\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}_S^{-1}$
$c_s$	Substratkonzentration Zulauf, $\text{g}_S \text{L}^{-1}$
$t$	Zeit, h

### Produktionsphase

Nach der Biomassebildungsphase wurde die rekombinante Produktion der Zielenzyme über eine Prozesszeit von 25 h durchgeführt. Hierzu wurde die Temperatur für die ersten 7,25 h des Prozessabschnitts auf  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  reduziert und aufgrund von Akkumulation von Glucose für die verbleibende Zeit auf  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht. Die Wachstumsrate wurde während des Prozessabschnitts auf  $0,04 \text{ h}^{-1}$  über die Zugabe einer Substratlösung mit  $500 \text{ g L}^{-1}$  Glucose,  $99 \text{ g L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  und  $30 \text{ mg L}^{-1}$  Kanamycin eingestellt. Hierfür wurde die Beigabe von  $4,49 \text{ mL h}^{-1} \text{ L}_{\text{Kultur}}^{-1}$  über 25 h exponentiell auf  $15,99 \text{ mL h}^{-1} \text{ L}_{\text{Kultur}}^{-1}$  gesteigert. Die Expression wurde durch die Zugabe von  $0,2 \text{ mM}$  IPTG gestartet. Nach 5 h dieses Prozessabschnitts wurde eine Einmalzugabe von  $0,5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $3 \text{ mL L}^{-1}_{\text{Kultur}}$  Spurenelementlösung und  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  Thiamin durchgeführt. Nach Beendigung des Bioprozesses wurden die Zellen in Zentrifugenflaschen (Nominalvolumen 1 L) überführt und bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für maximal 18 h gelagert.

### **Heterologe Expression ohne Zulauf**

Nach abgeschlossener Vorkulturherstellung wurden  $2 \text{ mL}$  Zellsuspension zur Inokulation eines Schüttelkolbens (Nominalvolumen 1 L) gefüllt mit  $200 \text{ mL}$  TB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsmarker, verwendet. Dieser Schüttelkolben wurde bei  $200 \text{ min}^{-1}$  (Exzentrizität 5 cm) und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht im Schüttelinkubator temperiert. Die Zellen wurden durch Sedimentation isoliert, in frischem TB-Medium resuspendiert und ihre



OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Bioreaktoren wurden mit je 500 mL sterilem TB-Medium, versetzt mit 10 g L<sup>-1</sup> Glucose und Selektionsmarker, befüllt und durch die Zugabe von der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 inokuliert. Die Temperatur wurde bis zum Zeitpunkt der Induktion auf 37 °C reguliert. Der minimale pH betrug während der Kultivierung 7,0 und wurde durch die automatische Zugabe einer 12,5 % (v/v) wässrigen Ammoniaklösung (NH<sub>3</sub>) reguliert. Der pO<sub>2</sub> wurde während des gesamten Bioprozesses auf den entsprechenden Sollwert von > 40 %, 15 %, 10 % oder 5 % Luftsättigung gehalten und über die Begasungsrate, sowie den Leistungseintrag geregelt.

Nachdem sich keine detektierbare Glucose mehr im Medium befand (was durch einen sprunghaften Anstieg des pO<sub>2</sub> angezeigt wurde), wurden die Reaktoren auf die Expressionstemperatur von 20 °C gekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde die heterologe Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG gestartet. Nach einer Expressionszeit von 18 h wurden die Zellen in Zentrifugenflaschen (Nominalvolumen 1 L) überführt und bei 4 °C für maximal 72 h gelagert.

### 4.3.6 Zellaufschluss von *E. coli*

#### Zellaufschluss via Ultraschall

Um die *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall aufzuschließen wurden diese mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt. Dabei wurden Zellsuspensionen bis 25 mL Gesamtvolumen mit einer Mikrospitze des Typs MS 72, bis 50 mL mit einer Mikrospitze des Typs MS 73 und Suspensionen mit einem Volumen von bis zu 200 mL mit einem Titanteller des Typs TT 13 behandelt. Die Eintauchtiefe der jeweiligen Mikrospitze bzw. des Titantellers betrug dabei 1,5 cm. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen mit folgenden Geräteeinstellungen über eine Dauer von 5 min behandelt: Impulse 10 x 10 s, Leistung: 80 %, Zyklus: 5 x 10 %.

#### Zellaufschluss via Glasperlen

Um die *E. coli*-Zellen mechanisch aufzuschließen wurden diese mit Glasperlen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Nominalvolumen von 2 mL und Sicherheitsverschluss gemischt. Hierzu wurden 0,5 g Glasperlen mit 1 mL Zellsuspension vereint und in einer Schwingarmmühle für 5 min bei einer Frequenz von 25 s<sup>-1</sup> homogenisiert.

## 4.4 Isolation und Analytik von Proteinen

### 4.4.1 Metallaffinitätschromatographie

Die Isolation von heterolog exprimierten Proteinen wurde mittels Metallaffinitätschromatographie durchgeführt. Hierzu wurden die Zielproteine mit einem N-terminalen Hexahistidinanker (His<sub>6</sub>) versehen. Für die Proteinisolation wurden His-Pur™ Ni-NTA Spin Columns mit 0,2 mL Säulenvolumen oder 3 mL Säulenvolumen (SV) verwendet. Jedoch wurde das Reinigungsverfahren entgegen der Herstellerangaben ohne Zentrifuge, ausschließlich schwerkraftgetrieben durchgeführt und erfolgte unter ständiger Kühlung mit Eis. Zur Vorbereitung der Reinigung wurden die Säulen mit je 1 SV H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub> gewaschen und mit 2 SV Equilibrierpuffer (EQ-Puffer) equilibriert. Anschließend wurden zwischen 5 SV und 10 SV einer in EQ-Puffer aufgeschlossenen und durch Zentrifugation (10 min, mindestens 17000 g und 4 °C) geklärten *E. coli*-Kultur auf die Säule aufgetragen und mit dem Säulenmaterial suspendiert. Die Suspension aus Zellextakt und Säulenmaterial wurde für 30 – 45 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Säule dreimal mit je 2 SV Waschpuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 1 – 2 SV Elutionspuffer.

Nach jeder Reinigung wurden die Säulen regeneriert. Hierfür wurden diese zweimal mit je 2 SV MES-Puffer und anschließend zweimal mit je 2 SV H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub> gewaschen. Für die Lagerung wurde das Wasser durch 1 – 2 SV 20% (v/v) Ethanol ersetzt und die Säulen bei 4 °C aufbewahrt.

### 4.4.2 Größenausschlusschromatographie

Sofern die Reinheit der isolierten Proteine nach der Affinitätschromatographie nicht ausreichend hoch war, wurde als zweiter Reinigungsschritt die Größenausschlusschromatographie herangezogen. Die Reinigung wurde in einem ÄKTA™ Pure Chromatographiesystem bestückt mit einer Superdex® 200 Increase 10/300 GL Säule mit einem SV von 24 mL und einem Trennbereich zwischen 10 und 600 kDa durchgeführt. Als Puffer für die Reinigung diente Physiologischer Puffer bei einem pH von 7,2. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 0,75 mL min<sup>-1</sup> betrieben und vor der Verwendung mit 2 SV H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub> und 2 SV Puffer gespült. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 200 µL mit einer Konzentration von weniger als 10 g L<sup>-1</sup>. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung durch einen Filter mit einem Ausschluss von 0,22 µm filtriert. Das Eluat wurde über einen Fraktionskollektor in Fraktionen mit einem Volumen von maximal 2 mL gesammelt.

### 4.4.3 Pufferaustausch

#### Dialyse

Für den Austausch von Puffern in Proteinlösungen wurden Dialysen durchgeführt. Dabei wurde eine Dialysemembran mit einer Größenausschlussgrenze von 12 – 14 kDa verwendet. Vor Gebrauch der Dialysemembran wurde diese für 30 min in  $H_2O_{VE}$  eingeweicht und gründlich mit  $H_2O_{VE}$  von innen und außen gereinigt. Nach der Befüllung mit Proteinlösung wurden beide Enden des Dialyseschlauches mit Schlauchklemmen verschlossen und leere Eppendorf-Reaktionsgefäße an den Enden angebracht, um ein Absinken der Schläuche zu verhindern. Es wurde mindestens gegen das 200-fache des Probenvolumens über Nacht bei 4 °C und unter leichtem Rühren dialysiert.

#### Ultrafiltrationseinheit

Eine weitere angewendete Möglichkeit den Puffer in Proteinlösungen zu Tauschen bestand im Einsatz von Ultrafiltrationseinheiten für die Zentrifuge. Einheiten mit Nominalvolumina von 1,5 mL und 12 mL wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben angewendet. Dabei wurde das Volumen der Proteinlösung mindestens dreimal auf unter 20 % des Ausgangsvolumens reduziert und mit der entsprechenden Menge Puffer wieder aufgefüllt. Wenn gewünscht wurde das Volumen der Lösung durch den finalen Zentrifugationsschritt reduziert, um die Konzentration der Proteinlösung zu erhöhen.

### 4.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte über diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Trenn- und Sammelgel (Laemmli 1970). Es wurden Trenngele mit einem Acrylamid-Gehalt von 12.5 % (v/v) in Kombination mit einem 3 % (v/v) Sammelgel herangezogen. Die Polymerisation der Gele wurde durch die Zugabe von 100  $\mu$ L Ammoniumperoxidsulfat (APS, 1% (w/v)) und 10  $\mu$ L N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) bewerkstelligt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA pro Gel über einen Zeitraum von 75 min. Gelöste Proteinproben beziehungsweise ganze *E. coli*-Zellen wurden vor dem Auftragen auf das Gel in Laemmlipuffer gegeben und zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Abschätzung der molekularen Masse der Proteine erfolgte durch die Verwendung des JustBlue Prestained Protein Markers (10 kDa – 180 kDa).

Anschließend wurden die Proteinbanden der Gele visualisiert. Hierzu wurde ein abgewandeltes Protokoll von Fairbanks angewendet (Fairbanks et al. 1971). Die Gele

wurden nacheinander in die drei Fairbankslösungen A, B und C gelegt, darin aufgekocht und anschließend für 5 min geschwenkt. Um die Entfärbung des Gels in Lösung C zu beschleunigen wurde nach dem Kochen ein Stück Haushaltspapier der Färbeschale beigefügt. Die Gele wurden nach der Coomassie-Färbung mittels eines *Gel Imager* oder eines Scanners digitalisiert und gegebenenfalls mit Hilfe des Programms *ImageJ* densitometrisch quantifiziert.

#### 4.4.5 Proteinquantifizierung

##### Bicinchoninsäure

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure erfolgte durch das Pierce™ BCA Protein Assay Kit und wurde nach Herstellerangaben verwendet. Trotz des vom Hersteller bezifferten geeigneten Proteinkonzentrationsbereichs zwischen 20 und 2000 mg L<sup>-1</sup> wurden die zu bestimmenden Proteinproben für eine bessere Vergleichbarkeit auf eine Konzentration zwischen 500 und 1500 mg L<sup>-1</sup> verdünnt oder konzentriert.

##### Densitometrische Proteinquantifizierung

Die densitometrische Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde zur Abschätzung der relativen Reinheit der Proteinproben herangezogen. Hierfür wurden die Banden einer Spur der mittels des Scanners digitalisierten SDS-PAGE über die Software *ImageJ* miteinander verglichen. Der Anteil eines Proteins in einer Probe wurde als das Verhältnis der Signalstärke der gesamten Spur im Vergleich zur entsprechenden Bande bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Bicinchoninsäure bestimmt.

### 4.5 Enzymcharakterisierung

#### 4.5.1 Photometrische Messung der Enzymaktivität

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Oxidoreduktasen NAD(P)H verbrauchen oder bilden konnte die Aktivität der Enzyme mit diesen Cosubstraten photometrisch durch die Änderung der Absorption bei 340 nm verfolgt werden. Dabei wurden Cosubstratkonzentrationen von 200 µM und 500 µM betrachtet. Hierzu wurden Messungen in durchsichtigen Flachbodenmikrotiterplatten bei einem Gesamtvolumen von 200 µL durchgeführt. Zur Realisierung der Messung wurde die zu untersuchende Enzymlösung (in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (NaP-Puffer) bei pH 7,0) mit dem entsprechenden Volumen

der Cosubstratlösung vereint und diese auf ein Volumen von 90 % des Gesamtvolumens mit NaP-Puffer aufgefüllt. Jede Reaktionsmischung wurde nach einer Equilibrierung der Reaktanden auf 30 °C durch die Zugabe von 10 % (v/v) einer 100 mM Maleimidlösung gestartet. Die spezifische Aktivität wurde anhand der Photometerdaten auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen-Gesetzes ermittelt (Gleichung 4.3). Als Negativkontrolle dienten Reaktionsansätze in denen das Substrat Maleimid durch NaP-Puffer ersetzt wurde. Die Messungen wurden mindestens im technischen Quintuplikat, die Negativkontrollen im technischen Triplikat durchgeführt.

$$v_x = \frac{\Delta c_{NAD(P)H} \cdot V_R}{\Delta t \cdot V_E \cdot c_E} = \frac{\Delta A_{340} \cdot V_R \cdot 10^6}{\Delta t \cdot \varepsilon_{NAD(P)H} \cdot d \cdot V_E \cdot c_E} \quad 4.3$$

$v_x$	Spezifische Enzymaktivität, U mg <sup>-1</sup>
$\frac{\Delta c_{NAD(P)H}}{\Delta t}$	Änderung der Cosubstratkonzentration über die Zeit, µM min <sup>-1</sup>
$V_R$	Gesamtvolumen der Reaktion, L
$V_E$	Volumen der zugegebenen Enzymlösung, L
$c_E$	Konzentration der zu untersuchenden Enzymlösung, mg L <sup>-1</sup>
$\frac{\Delta A_{340}}{\Delta t}$	Zeitliche Änderung der Absorption bei 340 nm, min <sup>-1</sup>
$\varepsilon_{NAD(P)H}$	molarer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H bei 340 nm, 6300 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
$d$	Schichtdicke der Probe, cm

Die Einheit der Enzymaktivität, eine Unit (U), beschreibt die Oxidation beziehungsweise Reduktion von 1 µmol Cosubstrat pro Minute. Bei der Berechnung der Enzymaktivität von aufgeschlossenen *E. coli*-Zellen wurde die Proteinkonzentration  $c_E$  durch die eingesetzte Biotrockenmassekonzentration  $c_x$  ersetzt. Zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) wurde die Aktivitätsmessung bei mindestens zwölf verschiedenen Cosubstratkonzentrationen zwischen 20 µM und 1600 µM durchgeführt. Bei Konzentrationen des Cosubstrats über 900 µM wurde die Schichtdicke der Messungen reduziert, indem das Gesamtvolumen der Reaktion auf 150 µL oder 100 µL verringert wurde.

### 4.5.2 Auswertung photometrischer Messdaten

Die Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten erfolgte durch die Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten. Jede Messung wurde für 10 min mit 100 Datenpunkten durchgeführt. Mit Hilfe der Software MATLAB R2015b wurde die lineare Regression mit der maximalen Steigung für eine Messlänge zwischen 100 und 20 Datenpunkten ermittelt. Dabei wurden ausschließlich Regressionen berücksichtigt, welche ein minimales Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,995 überschritten. In Kapitel 12.2.1 wird eine solche Regression beispielhaft dargestellt. Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter erfolgte auf Grundlage der gemessenen Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Cosubstratkonzentrationen. Diese wurden durch eine nicht-lineare Regression auf Grundlage einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik über das Programm Sigma-Plot 12.3 ermittelt. Dabei erfolgte die Parameterbestimmung nach Gleichung 4.4. Die Michaelis-Menten-Konstante wurde durch Gleichung 4.5 definiert.

$$v_x = \frac{v_{max} \cdot c_S}{K_m + c_S} \quad 4.4$$

$$K_m = \frac{1}{2} \cdot v_{max} \quad 4.5$$

$v_x$	Spezifische Enzymaktivität, U mg <sup>-1</sup>
$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, U mg <sup>-1</sup>
$c_S$	Substratkonzentration, mM
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante, mM

Auf Grundlage des Verhältnisses der enzymkinetischen Parameter  $v_{max}$  und  $K_m$  wurde die katalytische Effizienz ( $k_{eff}$ ) berechnet (Gleichung 4.6).

$$k_{eff} = \frac{v_{max} \cdot M_E}{K_m \cdot 6 \cdot 10^4} \quad 4.6$$

$k_{eff}$	katalytische Effizienz, $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$
$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, $\text{U mg}^{-1}$
$M_E$	molare Enzymmasse, $\text{g mol}^{-1}$
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante, $\text{mM}$

Zur Bewertung des Einflusses auf das NADH-Bindevverhalten der NostocER1 wurde die relative katalytische Effizienz (RKE) bestimmt. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis der  $k_{eff}$  der modifizierten NostocER1 mit NADH zur wildtypischen NostocER1 mit dem bevorzugten Cosubstrat NADPH (Gleichung 4.7)

$$RKE = \frac{k_{eff_{NADH}}^{Mut}}{k_{eff_{NADPH}}^{WT}} \quad 4.7$$

$RKE$	relative katalytische Effizienz, -
$k_{eff_{NADH}}^{Mut}$	katalytische Effizienz der NostocER1 Mutante mit NADH, $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$
$k_{eff_{NADPH}}^{WT}$	katalytische Effizienz der wildtypischen NostocER1 mit NADPH, $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$

### 4.5.3 Gaschromatographische Messung der Enzymaktivität

Um die spezifische Enzymaktivität der Enreduktasen unter der Verwendung des Substrats (*R*)-Carvon zu bestimmen wurde die Rate der (*2R,5R*)-Dihydrocarvon-Bildung gaschromatographisch gemessen. Hierfür wurden Messungen mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 mL erstellt. Diese bestanden aus 10 mM beziehungsweise der unter diesen Bedingungen maximal löslichen Konzentration von (*R*)-Carvon, 30 – 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Enreduktase und 200  $\mu\text{M}$  oder 500  $\mu\text{M}$  NAD(P)H in 0,1 M NaP-Puffer (pH 7,0). (*R*)-Carvon wurde zur leichteren Handhabung in EtOH gelöst, wobei der finale EtOH-Anteil immer geringer als 5 % (v/v) des Gesamtvolumens betrug. Die Reaktionsansätze wurden in einem Wasserbad auf 30 °C temperiert und durch die Zugabe des Cosubstrats gestartet. Um eine zeitliche Auflösung der Reaktion zu ermöglichen wurden für 5 min alle 30 s Proben entnommen. Diese Proben wurden direkt auf Eis abgekühlt, um die Reaktion zu

stoppen, und für die Quantifizierung im Gaschromatographen vorbereitet (siehe Kapitel 4.6.1).

#### 4.5.4 Bestimmung des enzymgebundenen Flavinmononukleotid (FMN)

Die prosthetische Gruppe der Enreduktasen, das vom Vitamin B<sub>2</sub> abgeleitete Flavinmononukleotid (FMN), wurde für die isolierten Enzymchargen der verschiedenen Expressionen bestimmt. Hierzu wurden 200 µL einer möglichst konzentrierten Enzymlösung mit 50 µL einer 10 % (w/v) SDS-Lösung versetzt. Als Leerprobe wurde der nach der Dialyse der jeweiligen Enzymcharge entstandene Puffer in gleicher Weise mit SDS behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 5 – 15 min bei RT, wurden je 200 µL der nun denaturierten Enzymlösung und der entsprechenden Leerprobe in eine Kavität der Mikrotiterplatte überführt. Aus der Differenz der Absorptionssignale bei 449 nm zwischen Enzymlösung und Puffer mit Berücksichtigung des durch die Denaturierung entstandenen Verdünnungsfaktors 1,25 konnte die Konzentration des enzymgebundenen FMN auf Grundlage des Lambert-Beer'schen-Gesetzes ermittelt werden (Gleichung 4.8). Über den Quotienten der Konzentrationen von enzymgebundenem FMN und der Gesamtproteinmenge konnte der relative enzymgebundene FMN-Anteil berechnet werden (Gleichung 4.9).

$$c_{FMN} = \frac{(A_{E,449} - A_{L,449}) \cdot 1,25}{\varepsilon_{FMN} \cdot d} \quad 4.8$$

$$p_{FMN} = \frac{c_{FMN}}{c_E} \cdot 100 \quad 4.9$$

$c_{FMN}$	Konzentration des enzymgebundenen FMN, mol L <sup>-1</sup>
$A_{E,449}$	Absorption der Enzymlösung bei 449 nm, -
$A_{L,449}$	Absorption der Leerprobe bei 449 nm, -
$\varepsilon_{FMN}$	molarer Extinktionskoeffizient von FMN bei 449 nm, 12500 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
$d$	Schichtdicke der Probe, cm
$p_{FMN}$	Anteil der Enzyme mit gebundenem FMN, %
$c_E$	Konzentration der Enzymlösung, mol L <sup>-1</sup>



### 4.5.5 Bestimmung der Thermostabilität

Die Bestimmung der Thermostabilität wurde durch wiederholte Messung der Enzymaktivität während einer konstanten Inkubation bei 40 °C durchgeführt. Hierzu wurden 4 mL Enzymlösung mit einer Konzentration zwischen 75,1 µg mL<sup>-1</sup> und 16,9 µg mL<sup>-1</sup> in 0,1 M NaP-Puffer (pH 7,0) in 15 mL Reaktionsgefäße überführt und in einem *Thermomixer* mit entsprechendem Aufsatz bei 40 °C temperiert. Die Enzyme wurden vor der Aktivitätsmessung auf eine Temperatur von 30 °C equilibriert. Die photometrische Aktivitätsmessung wurde wie bereits beschrieben (Kapitel 4.5.1) durchgeführt und ausgewertet (Kapitel 4.5.2). Über die Aufnahme der zeitlichen Aktivitätsänderung relativ zur Ausgangsaktivität war die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung möglich. Dabei war ein zweiphasiges Inaktivierungsverhalten beobachtbar, welches durch einen doppelt exponentiellen Abfall (Gleichung 4.10) beschrieben werden kann (Reiner et al. 1987). Da es sich dabei um eine Linearkombination zweier Reaktionen 1. Ordnung handelt und somit die Geschwindigkeitskonstanten unabhängig von der Ausgangskonzentration sein müssen, wurden  $k_s$  und  $k_l$  global für alle Enzymkonzentrationen bestimmt. Der relative Anteil der beiden Phasen zueinander ( $A_s$ ) wurde hingegen konzentrationsabhängig für jede Enzymkonzentration  $i$  individuell bestimmt. Die Bestimmung der Parameter erfolgte mittels der Software MATLAB R2015b.

$$\frac{v_{t,i}}{v_{0,i}} = A_i \cdot e^{-k_s \cdot t} + (1 - A_i) \cdot e^{-k_l \cdot t} \quad 4.10$$

$\frac{v_{t,i}}{v_{0,i}}$	Zur Ausgangsaktivität $v_{0,i}$ relative Enzymaktivität, -
$A_i$	Relativer Anteil des Aktivitätsverlustes der Enzymkonzentration $i$ , -
$k_s$	Geschwindigkeitskonstante der schnellen Inaktivierung, h <sup>-1</sup>
$t$	Zeit, h
$k_l$	Geschwindigkeitskonstante der langsamen Inaktivierung, h <sup>-1</sup>

### 4.5.6 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums der Enzyme erfolgte durch Messungen der Enzymaktivität in Puffern die einen unterschiedlichen pH besaßen. Für einen pH-Bereich zwischen 5,5 und 8,0 wurde Na-Phosphatpuffer angewendet, für einen Bereich zwischen 8,0 und 8,5 Tris-HCl-Puffer. Die photometrische Aktivitätsmessung wurde wie in

Kapitel 4.5.1 beschrieben mit 500  $\mu\text{M}$  NADH als Cosubstrat durchgeführt und nach Kapitel 4.5.2 ausgewertet.

## 4.6 Analytische Methoden

### 4.6.1 Gaschromatographische Quantifizierung von cyclischen Monoterpenoiden

Alle Messungen von cyclischen Monoterpenoiden wurden in einem Gaschromatograph GC-2010 Plus durchgeführt. Die Detektion der Substanzen wurde über einen Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt, ihre Trennung über eine chirale Lipodex E Trennsäule (Länge 25 m,  $\varnothing$  0,25 mm). Die Injektortemperatur betrug bei allen Messungen 200 °C, die des Detektors 250 °C. Helium 5.0 mit einer Flussrate von 3 mL  $\text{min}^{-1}$  diente als Trägergas. In Kapitel 12.2.1 werden exemplarisch Chromatogramme zur gaschromatographischen Quantifizierung von cyclischen Monoterpenoiden aufgeführt.

#### Probenvorbereitung

Um die Monoterpenoide aus den jeweiligen Ansätzen zu isolieren und die verwendete chirale Trennsäule vor dem Eintrag von Wasser zu schützen, wurden diese mit getrocknetem Ethylacetat (EtOAc) aus den wässrigen Proben extrahiert. Dies erfolgte in 1,5 mL oder 2 mL Reaktionsgefäßen mit Sicherheitsverschluss durch die Zugabe von 33 % oder 50 % (v/v) EtOAc zu den wässrigen Proben. Diese Extraktionsansätze wurden in einer Schwingarmmühle für 15 min bei einer Frequenz von 25  $\text{s}^{-1}$  dispergiert. Anschließend wurden wässrige und organische Phase durch 5 min Zentrifugation bei mindestens 17200 g voneinander separiert. 100  $\mu\text{L}$  der organischen Oberphase wurden entweder direkt mit 25  $\mu\text{L}$  einer (*R*)-Limonen Stammlösung (36 mM in trockenem EtOAc) versetzt oder durch die Zugabe von 300  $\mu\text{L}$  EtOAc und 100  $\mu\text{L}$  (*R*)-Limonen Stammlösung verdünnt und dann gaschromatographisch analysiert.

#### Gaschromatographische Messung

Für eine Messung wurde 1  $\mu\text{L}$  der Probe über einen automatisierten Probengeber injiziert. Der Probenauftrag auf die Säule erfolgte mit einem Split von 10. Die Ofentemperatur wurde für 2 min bei 60 °C gehalten und anschließend auf 150 °C mit einer Rate von 3 °C  $\text{min}^{-1}$  erhöht. Dadurch wurden typische Retentionszeiten von 7,5 min für (*R*)-Limonen, 17,4 min für (*2R,5R*)-Dihydrocarvon, 18,8 min für (*2S,5R*)-Dihydrocarvon und 20,2 min für (*R*)-Carvon erreicht.

### Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte über Kalibrierstandards mit 0,1 bis 30 mM (*R*)-Carvon, 0,08 bis 24,83 mM (*2R,5R*)-Dihydrocarvon, 0,02 bis 5,31 mM (*2S,5R*)-Dihydrocarvon und 7,2 mM (*R*)-Limonen als internem Standard. Über das Verhältnis der Peakflächen von Carvon-Spezies und (*R*)-Limonen wurden Standardgeraden gebildet mit denen die Konzentrationsbestimmung der Proben ermöglicht wurde.

Aufgrund der Anwendung von Zweiphasensystemen gestaltete sich die homogene Probennahme problematisch. Besonders Proben mit einem Volumen unter 0,5 mL führten zu gemessenen Gesamtkonzentrationsschwankungen von  $\pm 50\%$ . Daher wurde die finale Dihydrocarvonkonzentration bei Biotransformationen in Zweiphasensystemen durch Normierung auf die eingesetzte Substratkonzentration ( $c_{S,0}$ ) ermittelt (Gleichung 4.11).

Die maximalen Bildungsraten von Dihydrocarvon wurden durch lineare Regression der ermittelten Konzentrationen über die Zeit erhalten. Dabei wurde im Rahmen der ‚Biotransformationen von (*R*)-Carvon‘ von der initial gemessenen Probe bis zu einer DHC-Konzentration von maximal 200 mM und minimal 100 mM regressiert.

$$c_n = \frac{c_A + c_B}{c_A + c_B + c_S} \cdot c_{S,0} \quad 4.11$$

$c_n$	Normierte Dihydrocarvon-Konzentration, mol L <sup>-1</sup>
$c_A$	Konzentration ( <i>2R,5R</i> )-Dihydrocarvon, mol L <sup>-1</sup>
$c_B$	Konzentration ( <i>2S,5R</i> )-Dihydrocarvon, mol L <sup>-1</sup>
$c_S$	Konzentration des Substrats ( <i>R</i> )-Carvon, mol L <sup>-1</sup>
$c_{S,0}$	Initiale Substratkonzentration, mol L <sup>-1</sup>

#### 4.6.2 Bestimmung der Diastereomerenüberschüsse

Um die Stereoselektivität der verwendeten Biokatalysatoren zu bewerten, wurde der Diastereomerenüberschuss (de) der generierten (*2R,5R*)-Dihydrocarvon-Spezies bestimmt. Der de wurde dabei im Vergleich zum möglichen Nebenprodukt (*2S,5R*)-Dihydrocarvon bestimmt und wird in Gleichung 4.12 definiert.

$$de = \frac{|c_A - c_B|}{c_A + c_B} \cdot 100 \quad 4.12$$

$de$	Diastereomerenüberschuss, %
$c_A$	Konzentration (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-Dihydrocarvon, mol L <sup>-1</sup>
$c_B$	Konzentration (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-Dihydrocarvon, mol L <sup>-1</sup>

## 4.7 Biotransformationen von (*R*)-Carvon

Durch die Biotransformationen von (*R*)-Carvon sollte ein Substrat in einem präparativen Maßstab umgesetzt werden. Um den Einsatz der dafür benötigten hohen Substratkonzentrationen zu ermöglichen wurde das Adsorberharz XAD4 als zweite Phase zur *in situ* Substratzugabe und Produktentfernung verwendet. Hierzu wurden 300 mM (*R*)-Carvon mit 450 mM Natriumformiat, 100 - 300 mM NaP-Puffer (pH 7,0) und feuchtes Adsorberharz (AH) in einem auf das Substrat bezogenen Massenverhältnis von 3 (AH) zu 1 (Substrat) in das jeweilige Reaktionsgefäß gegeben. Harz und Substrat wurden für 2 – 14 h equilibriert. Anschließend wurden die Biotransformationen durch die Zugabe von Biokatalysator gestartet und konstant auf 25 °C temperiert.

### 4.7.1 Ganzzellbiotransformationen im Rührkesselreaktor

Die Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* wurden im 0,7 L Maßstab im DASGIP® Parallel Bioreactor System durchgeführt. Dabei wurde das Substrat-Harz-Gemisch bei einer Drehzahl von 500 min<sup>-1</sup> equilibriert und die Reaktion durch die Zugabe von 300 mL in 300 mM Na Phosphat-Puffer (pH 7) suspendierten Zellen mit einer Konzentration zwischen 71,1 g L<sup>-1</sup> und 78,7 g L<sup>-1</sup> gestartet. Direkt im Anschluss wurden der Reaktionsmischung 100 µM NAD<sup>+</sup> beigegeben. Während der Reaktion war der Leistungseintrag 6,1 W L<sup>-1</sup> und der pH wurde durch die automatische Zugabe von 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung konstant auf 7,0 gehalten. Die Probennahme erfolgte über einen Seitenarm mittels einer Pipette (Nominalvolumen 5 mL) bestückt mit einer um 1 cm verkürzten Pipettenspitze. Das Probenvolumen betrug 1 mL und jede Probennahme erfolgte im Triplikat. Um die Raten der Reaktion ermitteln zu können erfolgte die Probennahme bis 4 h Reaktionszeit in einem 30 min Takt. Danach wurden die Intervalle der Probennahme verlängert. Anschließend wurden die Proben wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben aufgearbeitet und quantifiziert.

### 4.7.2 Biotransformation im mL-Maßstab

Die Biotransformation von (*R*)-Carvon im 10 – 15 mL Maßstab erfolgte in Reaktionsgefäßen mit Rollrand, Schnappdeckeln und Kreuzrührern. Die Leistung wurde über eine Mehrstellenrührplatte mit einer eingestellten Rührerdrehzahl von 700 - 900 min<sup>-1</sup> eingetragen. Die Biotransformationen wurden dabei im technischen Triplikat durchgeführt. Die Probennahme erfolgte mittels einer Pipette (Nominalvolumen 1 mL) bestückt mit einer um 7 mm verkürzten Pipettenspitze. Das Probenvolumen betrug zwischen 0,3 mL 0,5 mL. Die Proben wurden anschließend wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben aufgearbeitet und quantifiziert.

## 4.8 Statistik

Die technische Replikation der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen erfolgte zwischen Triplikaten ( $n = 3$ ) und Quintuplikaten ( $n = 5$ ), wodurch arithmetische Mittelwerte  $\mu_T$  mit einer empirischen Standardabweichung  $\sigma_T$  gebildet wurden. Sofern erforderlich wurden zwischen zwei ( $m = 2$ ) und sechs ( $m = 6$ ) biologische Replikate dieser technischen Replikate erzeugt, ausgehend von unterschiedlichen Einzelkolonien. Die finalen aus biologischer und technischer Replikation kombinierten Mittelwerte  $\mu$  wurden nach Gleichung 4.13 berechnet. Basierend auf der inversen Varianz wurde hierbei eine relative Gewichtung  $\beta_i$  für jeden technischen Mittelwert  $\mu_{T,i}$  gebildet (Gleichung 4.14).

$$\mu = \sum_{i=1}^m \mu_{T,i} \cdot \beta_i \quad 4.13$$

$$\beta_i = \frac{\frac{1}{\sigma_{T,i}^2}}{\sum_{j=1}^m \frac{1}{\sigma_{T,j}^2}} \quad 4.14$$

$\mu$	Kombinierter Mittelwert aus biologischer und technischer Replikation
$\mu_T$	Mittelwert der technischen Replikate
$\beta$	Relative Gewichtung
$\sigma_T$	Standardabweichung der technischen Replikate

Die finalen Standardabweichungen  $\sigma$  aus biologischer und technischer Replikation wurden nach Gleichung 4.15 berechnet.

$$\sigma = \sqrt{\sum_i (\mu_{T,i}^2 + \sigma_{T,i}^2) \cdot \beta_i - \mu^2} \quad 4.15$$

$\sigma$       Finale Standardabweichung

## 4.9 Software

### 4.9.1 Erstellen von Homologiemodellen

Auf Grundlage eines mit dem Basic Local Alignment Tool (BLAST) durchgeführten Sequenzvergleichs wurde die literaturbekannte Kristallstruktur mit der größten Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit zum gewünschten Zielenzym identifiziert. Auf Basis dieser Kristallstruktur wurde über die Software MODELLER ein Homologiemodell des Zielenzyms erstellt, welches die gebundene prosthetische Gruppe FMN und ein sich im aktiven Zentrum befindendes, unreaktives Cosubstratanalogon 1,4,5,6-Tetrahydro-nicotinamidadenindinucleotid (NADH<sub>4</sub>) beinhaltet. Anhand der Position von NADH<sub>4</sub> wurde NADH dem Homologiemodell manuell beigefügt. Danach wurde das Zielenzym und NADH in CHARMM36 parametrisiert, unter Zuhilfenahme der präzisierten Parameter CHARMM36m. Für FMN wurde aus einer mol2-Datei der Zink Datenbank über den CGenFF-Server (<https://cgenff.paramchem.org>) ein CHARMM36 kompatibles Kraftfeld generiert. Abschließend wurde eine Energieminimierung über die Methode des steilsten Abstiegs mit Konvergenzkriterien von 8500 Schritten oder 100 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup> durchgeführt. Dies wurde mit Hilfe der GRONingen Machine for Chemical Simulations (GROMACS) Version 2016.3 bewerkstelligt. Die korrekte Positionierung von FMN nach der Energieminimierung wurde durch den Kontakt der prosthetischen Gruppe zu literaturbekannten, konservierten Aminosäurepositionen überprüft. Die Visualisierung der generierten Strukturen erfolgte mit UCSF Chimera 12.

### 4.9.2 Verwendete Software

#### Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) bereitgestelltes Programm für den Vergleich von Gen- oder Proteinsequenzen mit Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken. BLAST wurde für die Determinierung von Proteinsequenzidentität und -ähnlichkeit zweier Primärstrukturen herangezogen.

CHARMM36

Ein Programm zur empirischen Kraftfeldparametrisierung von chemischen Molekülen.

DASware® control

Von der Firma Eppendorf kommerziell vertriebenes Computerprogramm zum Betrieb und der Steuerung von Bioprocessen im vom Hersteller vertriebenen DASGIP® Parallel Bioreactor System.

Groningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS)

Ein Packet aus Computerprogrammen für die Simulation und Auswertung molekular-dynamischer Prozesse.

ImageJ 1.49v

Das vom National Institutes of Health entwickelte, wissenschaftliche Bildverarbeitungsprogramm wurde für die densitometrische Analyse von SDS-Gelen verwendet.

LabSolution Lite for GC

Von der Firma Shimadzu bereitgestellte Software zur Bedienung gaschromatographischer Systeme und Auswertung von Messdaten.

MATLAB R2015b

Ein kommerzielles, von der Firma *MathWorks* vertriebenes Computerprogramm zur Lösung mathematischer Probleme. MATLAB R2015b wurde für die automatisierte Auswertung bei der photometrischen Messung von Enzymaktivitäten verwendet.

MODELLER 9.11

Ein Computerprogramm für die Modellierung von Homologien oder Vergleichen von dreidimensionalen Proteinstrukturen.

NEB T<sub>m</sub> Calculator v1.9.13

Ein Werkzeug zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperaturen von *Primern* bei PCR Reaktionen mit Polymerasen der Firma *New England Biolabs*.

QuikChange Primer Design

Von der Firma Agilent bereitgestelltes Werkzeug zur Konstruktion von *Primern* optimiert für die punktuelle Mutagenese von DNS.

Serial Cloner V2.6.1

Ein Computerprogramm für das Planen und Visualisieren von molekularbiologischen Arbeiten.

### SigmaPlot 12.3

Ein kommerziell von der Firma *Systat Software* vertriebener Funktionenplotter, der Graphen mathematischer Funktionen berechnet und zeichnet.

### T-Coffee 8.99

**T**ree-based **C**onsistency **O**bjective **F**unction **F**or alignment **E**valuation (T-Coffee) ist ein freies Programm zur Erstellung von multiplen Sequenzvergleichen nach einem progressiven Ansatz (Notredame et al. 2000, Di Tommaso et al. 2011). T-Coffee wurde für den Primärstrukturvergleich zweier Enzyme verwendet.

### UNICORN 6

Ein von GE Healthcare vertriebenes Prozessleitsystem für den Betrieb des vom selben Hersteller erhältlichen ÄKTA™ pure Chromatographiesystems.



## 5 Analyse der NostocER1

### 5.1 Primärstruktur

Die ersten Expressionen und Charakterisierungen der NostocER1 wurden mit einem 402<sup>8</sup> Aminosäuren langen Enzym durchgeführt (Fu 2013). Diese Proteinsequenz basierte auf einer initialen Annotation (NP\_484870)<sup>9</sup> im Genom des Cyanobakteriums *Nostoc* sp. 7120 (Kaneko et al. 2001). Durch einen Sequenzvergleich der NostocER1 mit 15 literaturbekannten ER der Klasse I konnte eine auffallend lange N-terminale Sequenz dieses cyanobakteriellen Enzyms identifiziert werden. So umfasst die Sequenz zwischen N-Terminus und dem bei ER der Klasse I konservierten Threonin (MR-Nummerierung: T32), welches an der Bindung der prosthetischen Gruppe FMN beteiligt ist, 27 bis 38 Aminosäuren. Bei der NostocER1 umfasste diese Sequenz hingegen 65 Aminosäuren. Des Weiteren zeigte ein erstelltes Homologiemodell der NostocER1 keinen strukturgebenden Beitrag in diesem Proteinbereich. Zusätzlich wurde die NostocER1 zwischenzeitlich einer neuen Annotation unterzogen (WP\_044521106)<sup>9</sup>, welche eine kürzere N-terminale Sequenz enthielt.

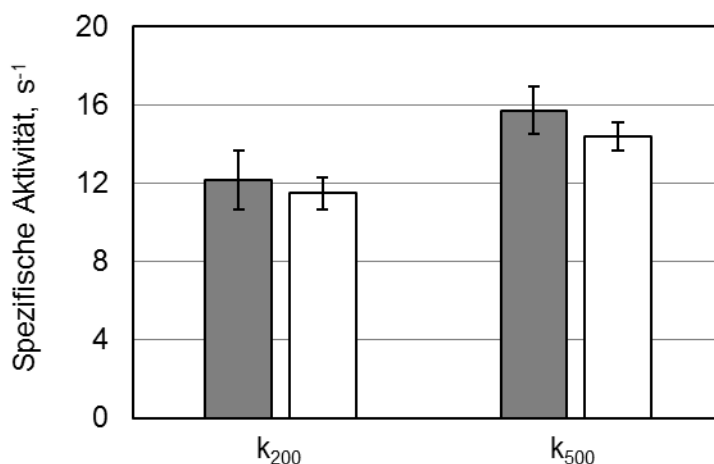
Auf dieser Basis wurde das Gen der NostocER1 um 37 Codons verkürzt, sodass das nächste ATG der Sequenz als neues Startcodon diente. Anschließend wurden beide Enzymvarianten parallel exprimiert, gereinigt und die Aktivität zu ihrem bevorzugten Cosubstrat NADPH gemessen (Abbildung 5.1, Tabelle 12.26).

Wie in Abbildung 5.1 zu erkennen ist, hatte die N-terminale Verkürzung der NostocER1 keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. So ist die auf die Enzymmasse bezogene spezifische Aktivität der ‚ursprünglichen‘ NostocER1<sub>402</sub> bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $k_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  ( $k_{500}$ ) NADPH nicht signifikant unterschiedlich zu der Enzymvariante mit 365 Aminosäuren. Aufgrund dessen wurde für alle weiteren Untersuchungen ausschließlich die kürzere Enzymvariante der NostocER1 verwendet, welche fortan als NostocER1 bezeichnet wird.

---

<sup>8</sup> Alle Proteine verfügen über einen N-terminalen Hexahistidinanker und eine *Linker*-Sequenz, welche bei der Zählung und Nummerierung nicht berücksichtigt wurden. Die Proteinsequenzen befinden sich im Anhang, unter Kapitel 12.1.7.

<sup>9</sup> Accession Number des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)



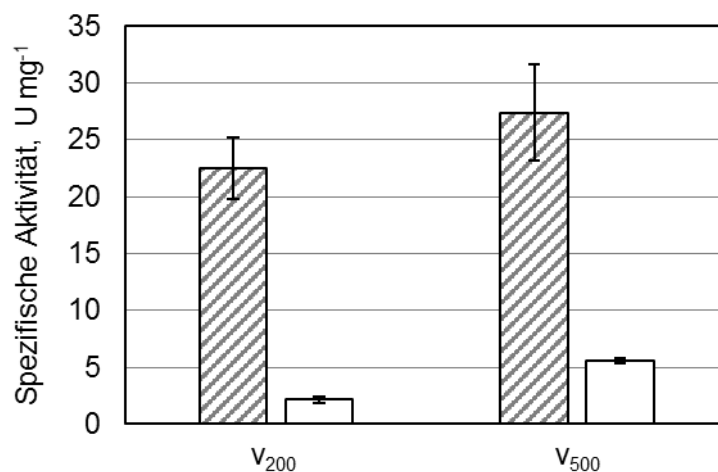
**Abbildung 5.1:** Auf die Enzymmasse bezogene spezifische Aktivitäten der NostocER1 mit 402 Aminosäuren (NostocER1<sub>402</sub>, grau) und der NostocER1 mit 365 Aminosäuren (NostocER1, weiß) bei einer NADPH-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $k_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  ( $k_{500}$ ). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

## 5.2 Reaktivität

Um eine solide Grundlage für einen späteren Vergleich von wildtypischer NostocER1 und den bereitgestellten Varianten mit gestalteten NADH-Bindeeigenschaften zu generieren, wurde die Reaktivität der NostocER1 ausgiebig charakterisiert. Dies umfasste die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten des Enzyms mit den Cosubstraten NADH und NADPH, die enzymkinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) für beide Cosubstrate und die spezifische Aktivität mit (R)-Carvon als Substrat.

### 5.2.1 Aktivität mit NAD(P)H

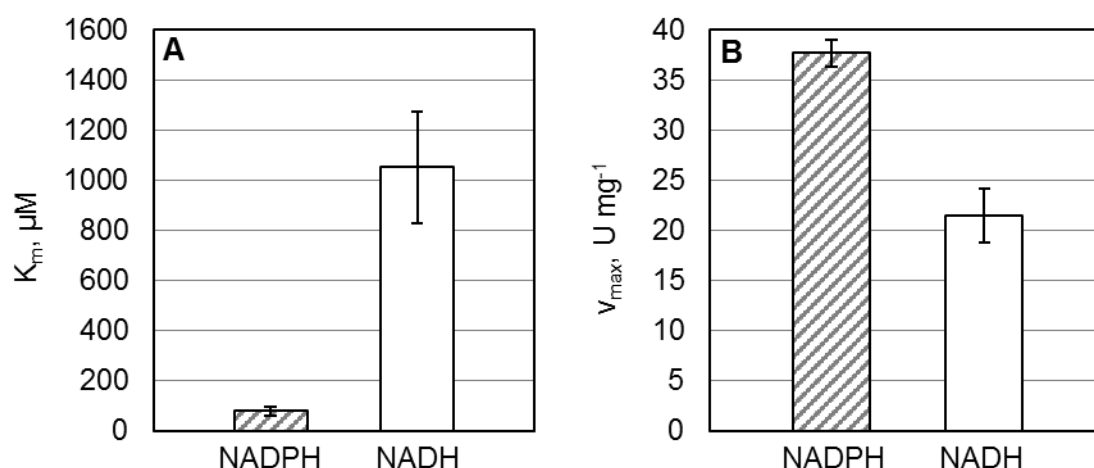
Als Erstes wurden die spezifischen Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $v_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  ( $v_{500}$ ) mit NADH und NADPH ermittelt (Abbildung 5.2, Tabelle 12.27). Dabei konnte die bereits bekannte (Fu et al. 2013) starke Präferenz dieser ER für das phosphorylierte Cosubstrat bestätigt werden. Dies spiegelt sich in einem Aktivitätsverhältnis der beiden  $v_{200}$  Aktivitäten von  $10,45 \pm 1,81$  beziehungsweise der beiden  $v_{500}$  Aktivitäten von  $4,95 \pm 0,98$  wider.



**Abbildung 5.2:** Spezifische Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $v_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  ( $v_{500}$ ) der NostocER1 mit NADPH (grau gestreift) und NADH (weiß). Die dargestellten Werte bilden das Mittel aus fünf (NADPH) beziehungsweise sechs (NADH) biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

### 5.2.2 Enzymkinetische Parameter

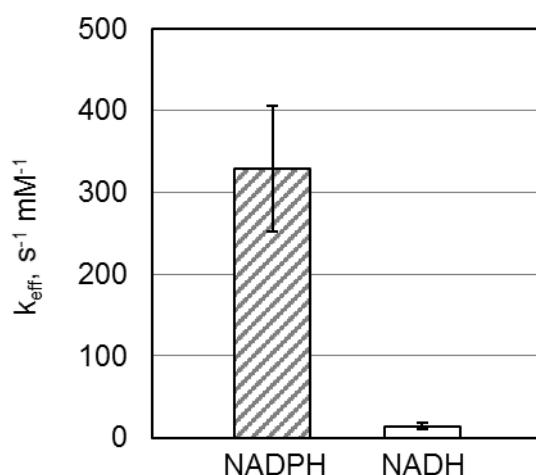
Für eine detailliertere Charakterisierung der Reaktivität wurden die enzymkinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) der NostocER1 mit den beiden Cosubstraten ermittelt (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ , **A**) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ , **B**) der NostocER1 mit NADPH und NADH. Die dargestellten Werte bilden das Mittel aus drei biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Die starke Präferenz der NostocER1 für NADPH kann durch die Betrachtung der enzymkinetischen Parameter noch besser veranschaulicht werden. Obwohl die Messungen mit NADH aufgrund des sehr hohen  $K_m$  von  $1052,8 \pm 222,2 \mu\text{M}$  mit einer größeren Unsicherheit belastet sind, ist ein deutlicher Unterschied zu den Parametern mit NADPH zu erkennen. So ist der  $K_m$  mit dem präferierten Cosubstrat mit  $80,2 \pm 18,6 \mu\text{M}$  um einen Faktor von  $13,13 \pm 4,11$  geringer als derjenige mit NADH. Darüber hinaus ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit NADPH mit  $37,71 \pm 1,33 \text{ U mg}^{-1}$  um einen Faktor von  $1,76 \pm 0,23$  höher als diejenige mit NADH ( $21,48 \pm 2,65 \text{ U mg}^{-1}$ ).

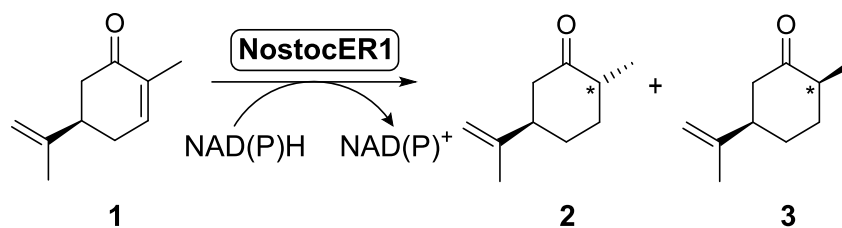
Zusätzlich wurde die katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) für beide Cosubstrate basierend auf den entsprechenden kinetischen Parametern berechnet (Abbildung 5.4). So beträgt die  $k_{\text{eff}}$  mit NADPH als Cosubstrat  $328,3 \pm 76,9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , diejenige mit NADH hingegen nur  $14,3 \pm 3,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Demnach ist die  $k_{\text{eff}}$  mit dem bevorzugten Cosubstrat um einen Faktor von  $23,04 \pm 7,80$  höher. Als zusätzliches Maß für diese Präferenz und zur späteren Einordnung der Gestaltung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1 wird die relative katalytische Effizienz (RKE), welche sich aus dem Verhältnis der  $k_{\text{eff}}$  mit NADH zur  $k_{\text{eff}}$  mit NADPH berechnet (siehe Gleichung 4.7), angegeben. Diese betrug bei der wildtypischen NostocER1  $0,043 \pm 0,015$ .



**Abbildung 5.4:** Katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1 mit NADPH und NADH.

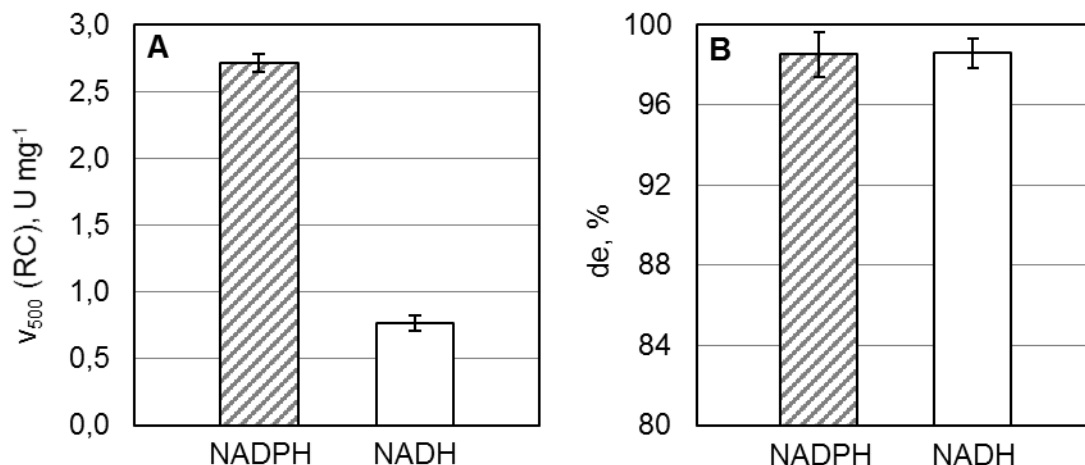
### 5.2.3 Aktivität mit (*R*)-Carvon

Um den Einsatz der NostocER1 in einer Reaktion von industrieller Relevanz abzubilden, wurde die Reduktion von (*R*)-Carvon (**1**) zu (*2R,5R*)-Dihydrocarvon (**2**) betrachtet (Abbildung 5.5). Dabei kann als Nebenprodukt (*2S,5R*)-Dihydrocarvon (**3**) entstehen.



**Abbildung 5.5:** NostocER1 katalysierte Reduktion von (*R*)-Carvon (**1**) zum selektiv gebildeten Produkt (*2R,5R*)-Dihydrocarvon (**2**) unter dem Verbrauch von NAD(P)H. Als Nebenprodukt kann (*2S,5R*)-Dihydrocarvon (**3**) entstehen.

Die  $v_{500}$  der NostocER1 für beide Cosubstrate bei der Reduktion von 10 mM (*R*)-Carvon sind in Abbildung 5.6, A dargestellt. Mit einer spezifischen Aktivität von  $2,71 \pm 0,07$  U  $\text{mg}^{-1}$  mit NADPH als Cosubstrat ist die Reduktase um einen Faktor von  $3,55 \pm 0,29$  schneller als mit dem nichtphosphorylierten Cosubstrat ( $0,77 \pm 0,06$  U  $\text{mg}^{-1}$ ). Somit ist der Aktivitätsunterschied in einem ähnlichen Bereich wie derjenige der zwei  $v_{500}$  Messungen mit Maleimid als Substrat (Abbildung 5.2). Wie zu erwarten war, hat ein Wechsel des Cosubstrats keinen Einfluss auf die Stereoselektivität des Enzyms (Abbildung 5.6, B). Der Diastereomerenüberschuss (de) von **2** über **3** befindet sich bei beiden Reduktionen in einem wünschenswerten hohen Bereich um 98,5 %.



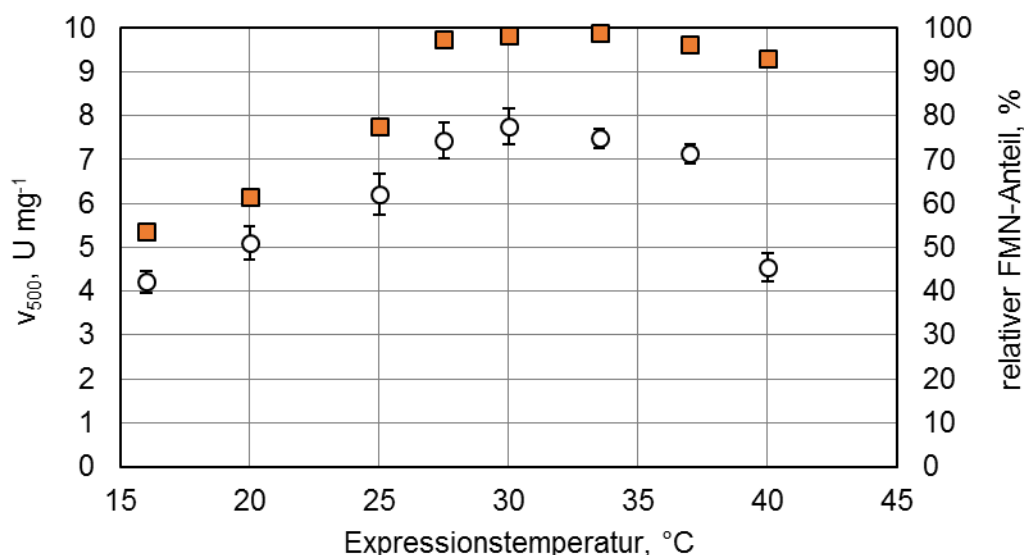
**Abbildung 5.6:** Spezifische Aktivität mit 500  $\mu\text{M}$  Cosubstrat ( $v_{500}$ , **A**) und Diastereomerenüberschuss (de, **B**) bei der NostocER1 katalysierten Reduktion von (*R*)-Carvon, unter der Verwendung von NADPH und NADH als Cosubstrat. Die dargestellten Werte bilden das Mittel aus zwei (NADPH) beziehungsweise drei (NADH) biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM (*R*)-Carvon, pH 7, 30 °C.

## 5.3 Einflussfaktoren der Expression in *E. coli* auf die Enzymaktivität

Die ersten biologischen Replikate der NostocER1 brachten gereinigte Enzymchargen mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten hervor. Darauf wurde einerseits mit der Etablierung eines strikten Expressionsprotokolls reagiert (Kapitel 4.3.4) und andererseits wurden mögliche Ursachen für die beobachteten Unterschiede untersucht. In diesem Kontext wurde die Temperatur während der heterologen Proteinexpression variiert und der Sauerstoffeintrag während der Expression verändert.

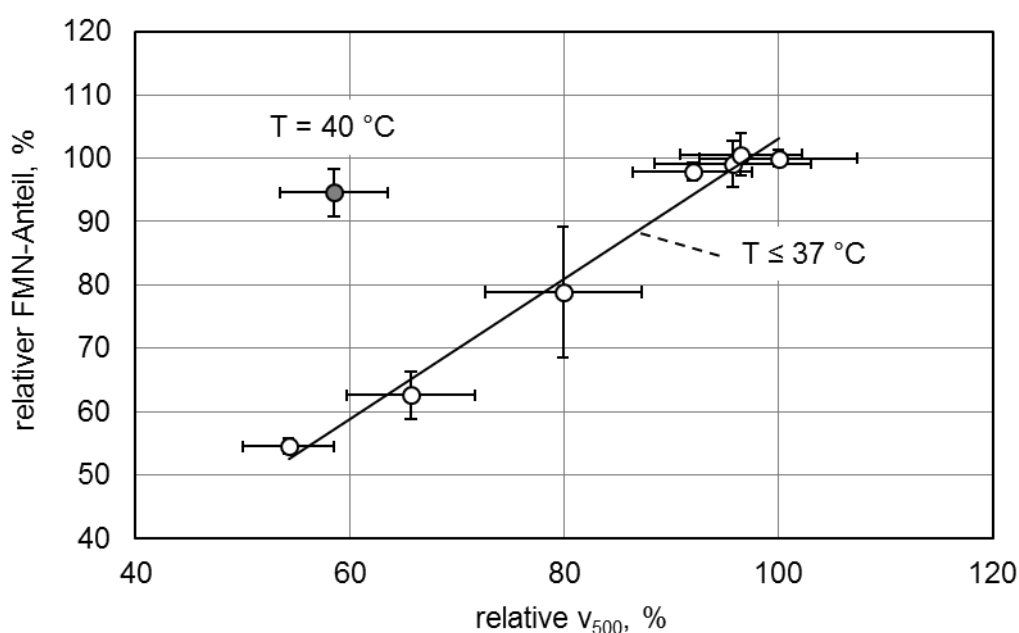
### 5.3.1 Variation der Expressionstemperatur

Der Einfluss der vorherrschenden Temperatur während der Proteinexpression auf die Aktivität der resultierenden Enzyme sollte untersucht werden. Aus diesem Grund wurde NostocER1 im Schüttelkolben, jeweils im biologischen Duplikat, bei Temperaturen zwischen 16 °C und 40 °C in *E. coli* exprimiert und die spezifische Aktivität nach affinitätschromatographischer Reinigung bestimmt. Zusätzlich wurde die proteingebundene FMN-Konzentration bestimmt und relativ zur Enzymkonzentration gesetzt. Die ermittelten Daten sind in Abbildung 5.7 dargestellt und in Tabelle 12.28 aufgelistet.



**Abbildung 5.7:** Spezifische Aktivität mit 500  $\mu$ M NADH als Cosubstrat ( $v_{500}$ , Kreise) und die zur Enzymkonzentration relative FMN-Konzentration (Quadrate) der bei der entsprechenden Temperatur exprimierten Enzymchargen. Die dargestellten Werte bilden das Mittel aus zwei biologischen Replikaten. Die FMN-Konzentrationen wurden im technischen Unikat ermittelt, weswegen die relativen Werte als Mittelwert ohne Standardabweichung angegeben werden. Weitere  $v_{500}$  Assay-Bedingungen: 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Bei Betrachtung der  $v_{500}$  der verschiedenen Enzymchargen ist ein Maximum der Enzymaktivität in einem Bereich der Expressionstemperatur zwischen 27,5 °C und 37 °C zu beobachten. Die bei dieser Temperatur bereitgestellten Enzyme weisen nach ihrer Reinigung eine spezifische Aktivität zwischen  $7,14 \pm 0,22 \text{ U mg}^{-1}$  und  $7,75 \pm 0,45 \text{ U mg}^{-1}$  auf. Deutliche Unterschiede ergaben sich bei niedrigeren und höheren Temperaturen. Die geringste spezifische Aktivität wurde nach der Expression bei 16 °C gemessen. Der bestimmte Wert von  $4,29 \pm 0,43 \text{ U mg}^{-1}$  entspricht nur 55 % des höchsten gemessenen  $v_{500}$ . Zwischen 16 °C und dem beobachteten maximalen Temperaturbereich ist ein stetiger Anstieg der Enzymaktivität mit der Temperatur zu beobachten. Gleichzeitig ist eine Zunahme der proteingebundenen FMN-Menge mit steigender Expressionstemperatur zu erkennen. Da nur ER mit einem gebundenen FMN im aktiven Zentrum Aktivität aufweisen können, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen spezifischer Aktivität und relativem proteingebundenen FMN-Anteil. Demnach kann der beobachtete Anstieg der Aktivität hierdurch begründet werden. Eine Illustration dieses Zusammenhangs wird durch die Auftragung der zu den Maximalwerten nach einer Expression bei 30 °C relativen enzymgebundenen FMN-Konzentration (relativer FMN-Anteil) über die relative Enzymaktivität (relativer  $v_{500}$ ) erhalten (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8:** Auftragung der zur maximal ermittelten Enzymaktivität bei einer Expressionstemperatur von 30 °C relative  $v_{500}$  über den zu 30 °C relativen FMN-Anteil der NostocER1. Die Enzyme nach einer Expression mit 16 – 37 °C (weiße Kreise) folgen dabei einem linearen Zusammenhang (schwarze Linie). Die Enzyme nach einer Expression bei 40 °C (grauer Kreis) weichen von diesem Zusammenhang ab.

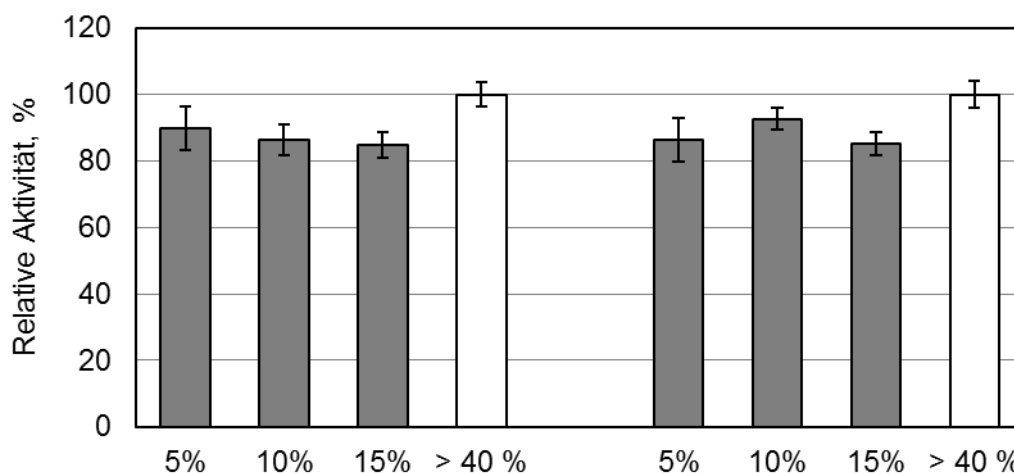
Von einer Expressionstemperatur zwischen 16 °C und 37 °C zeigen alle relativen Werte einen linearen Zusammenhang. Einzige Ausnahme hierzu stellen die bei einer Temperatur von 40 °C exprimierte NostocER1 dar. Die spezifische Aktivität dieser Enzyme ist mit  $4,54 \pm 0,32 \text{ U mg}^{-1}$  deutlich niedriger als die Werte im Bereich der optimalen Expressionstemperatur. Nichtsdestotrotz befindet sich der proteingebundene FMN-Anteil mit 93 % jedoch nahe dem Maximalwert. Gegebenenfalls fanden bereits während der Expression temperaturbedingte Teilentfaltungen der Enzyme statt, die eine Senkung der Aktivität aber keine FMN-Freisetzung verursachten. Eine weitere Möglichkeit besteht im Auftreten von Hitzeschock-Proteasen. Diese Proteasen werden bei thermischem Stress vermehrt in *E. coli* exprimiert (Arsène et al. 2000). Der dadurch verursachte proteolytische Abbau der NostocER1 kann zu einer Senkung der Aktivität führen, ohne dabei die Bindung zwischen ER und FMN zu beeinträchtigen.

### 5.3.2 Variation des Sauerstoffeintrags

Zusätzlich zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die finale Enzymaktivität wurde der Einfluss des Sauerstoffeintrags während der Expression betrachtet. Mit steigender Zellzahl sinkt die Sauerstoffverfügbarkeit während der Kultivierung im Schüttelkolben. Eine Sauerstofflimitierung hat die Expression von über 200 Genen zur Folge, um den Metabolismus der Zelle auf den veränderten Umwelteinfluss einzustellen. Dies wiederum erhöht die Belastung der Zellen und verhindert optimales Wachstum, wodurch negative Einflüsse auf die Proteinexpression entstehen können.

Um die Auswirkung des Sauerstoffeintrags auf die ‚Qualität‘ der Enzyme zu untersuchen, wurde die NostocER1 im Satzverfahren in parallelen Rührkesselreaktoren bereitgestellt. Dabei wurde der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) während des gesamten Prozesses auf > 40 %, 15 %, 10 % und 5 % Luftsättigung geregelt. Die bereitgestellten Enzyme wurden gereinigt und hinsichtlich ihrer Aktivität charakterisiert. In Abbildung 5.9 werden die  $v_{500}$  mit beiden Cosubstraten der NostocER1 relativ zu der nicht Sauerstoff limitiert bereitgestellten NostocER1 ( $pO_2 > 40 \%$ ) dargestellt.





**Abbildung 5.9:** Relative spezifische Aktivitäten der mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken ( $pO_2$ ) im Rührkesselreaktor im Satzverfahren bereitgestellten NostocER1. Die  $v_{500}$  der bei einem  $pO_2$  von 5 %, 10 %, 15 % (grau) exprimierten Enzyme wurden relativ zum entsprechenden  $v_{500}$  der bei einem  $pO_2$  von > 40 % (weiß) exprimierten Enzyme aufgetragen. Assay-Bedingungen: 500  $\mu$ M NAD(P)H, 0,1 M N-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

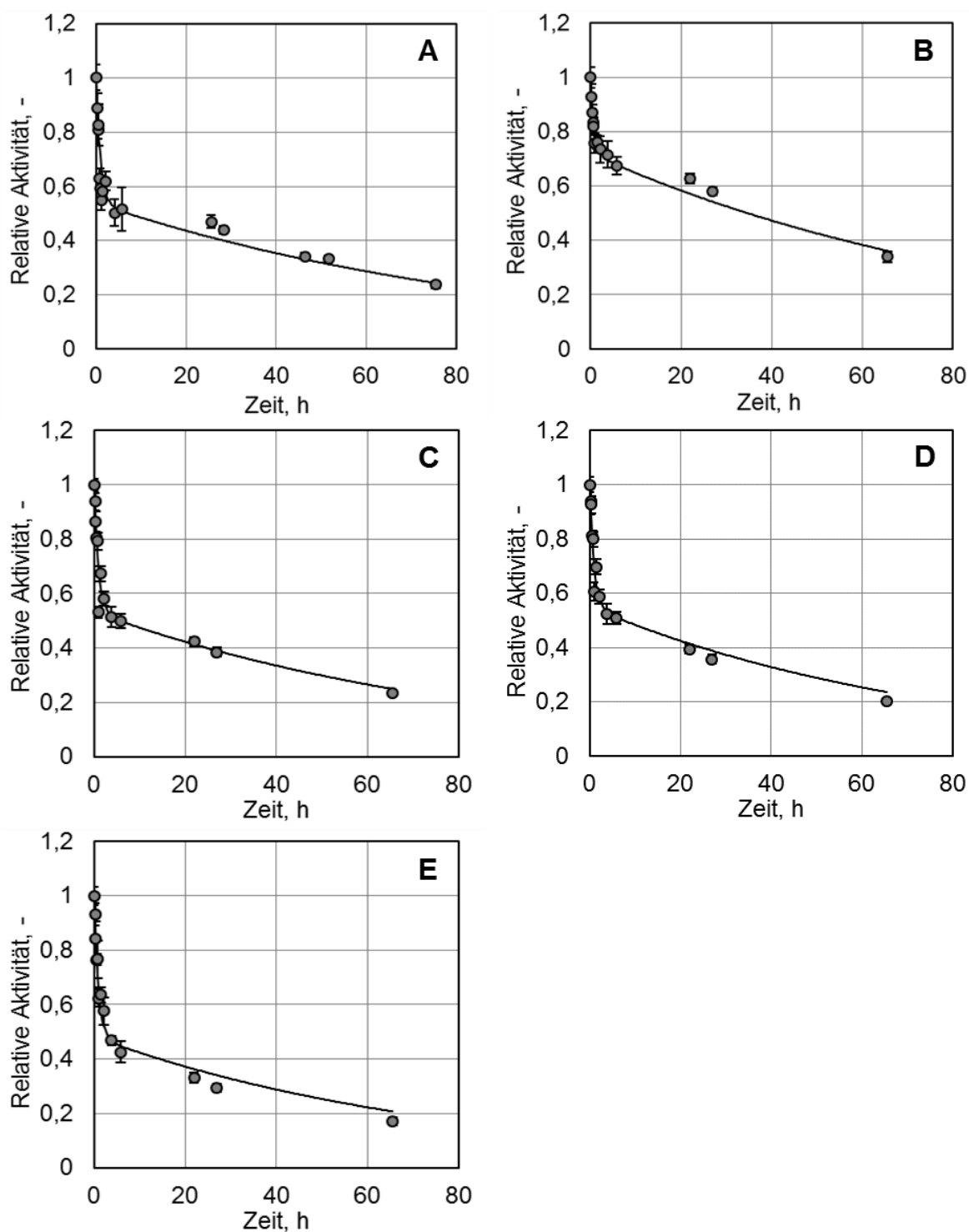
Trotz des stark unterschiedlichen Sauerstoffeintrags vor und während der Expression, zeigen die erhaltenen NostocER1 einen sehr geringen Aktivitätsunterschied. Die spezifische Aktivität der NostocER1, die in dem Reaktor ohne Sauerstofflimitierung bereitgestellt wurde, ist bei der Messung mit beiden Cosubstraten jeweils am höchsten. Jedoch lagen verglichen hierzu die relativen Aktivitäten der Enzyme der drei Reaktoren mit gesenktem Sauerstoffeintrag zwischen  $84,8 \pm 3,7$  und  $92,7 \pm 3,2$  % und somit nur marginal unter derjenigen ohne Limitierung. Darüber hinaus ist kein signifikanter Unterschied zwischen den spezifischen Aktivitäten der drei NostocER1, die bei einem  $pO_2$  von 15 %, 10 % und 5 % hergestellt wurden, erkennbar.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffeintrag während der heterologen NostocER1-Expression in *E. coli* einen sehr geringen Einfluss besitzt, obwohl anhand der Acetat-Akkumulation im Medium das Vorhandensein einer deutlichen Sauerstofflimitierung gezeigt werden konnte (siehe Anhang, Abbildung 12.1).

## 5.4 Thermische Inaktivierung

Zusätzlich wurde die thermische Stabilität der NostocER1 untersucht. Hierzu wurden die Enzyme durch konstante Temperierung mit 40 °C in Konzentrationen zwischen

75,1 mg L<sup>-1</sup> und 16,9 mg L<sup>-1</sup> inaktiviert und die zeitliche Änderung der Aktivität bestimmt. Die erhaltenen zeitlichen Verläufe der relativen Aktivität sind in Abbildung 5.10 dargestellt.



**Abbildung 5.10:** Relative Änderung der Enzymaktivität über die Inkubationszeit bei 40 °C und einer Enzymkonzentration von 75,1 mg L<sup>-1</sup> (A), 67,6 mg L<sup>-1</sup> (B), 33,8 mg L<sup>-1</sup> (C), 22,5 mg L<sup>-1</sup> (D), 16,9 mg L<sup>-1</sup> (E). Die schwarze Linie ist das Ergebnis eines zweiphasigen exponentiellen Abfalls nach Gleichung 4.10. Assay-Bedingungen: 500 μM NADPH, 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Durch Anwendung von Gleichung 4.10 war eine mathematische Beschreibung der Inaktivierungen möglich. Hierdurch konnten die konzentrationsunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten der zwei beobachteten Phasen der Inaktivierung bestimmt werden. Diese war für die schnelle Inaktivierung ( $k_s$ ) mit  $1,041 \pm 0,098 \text{ h}^{-1}$  um einen Faktor von  $89,8 \pm 13,1$  höher als die Konstante der langsamen Inaktivierung ( $k_l$ ) mit  $0,012 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ . Des Weiteren werden in Tabelle 5.1 die konzentrationsabhängigen relativen Anteile ( $A_i$ ) der schnellen ersten Inaktivierungsphase aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass sich  $A_i$  über den untersuchten Konzentrationsbereich der Enzyme nicht signifikant voneinander unterscheiden. Sie befinden sich größtenteils in einem Bereich zwischen  $45,7 \pm 2,6 \%$  und  $52,5 \pm 2,7 \%$ . Lediglich die Messung bei den Enzymkonzentrationen von  $67,6 \text{ mg L}^{-1}$  ergab hierzu ein verändertes Bild. Hier war der relative Anteil der schnellen Inaktivierungsphase mit  $26,7 \pm 2,6 \%$  im Vergleich zu den anderen untersuchten Enzymkonzentrationen deutlich geringer. Dementsprechend war der relative Anteil der langsamen Inaktivierung mit  $73,3 \pm 2,6 \%$  deutlich höher.

**Tabelle 5.1:** Auflistung der relativen Anteile ( $A_i$ ) der zwei Phasen der thermischen Inaktivierung der NostocER1 bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit der Enzymkonzentration.

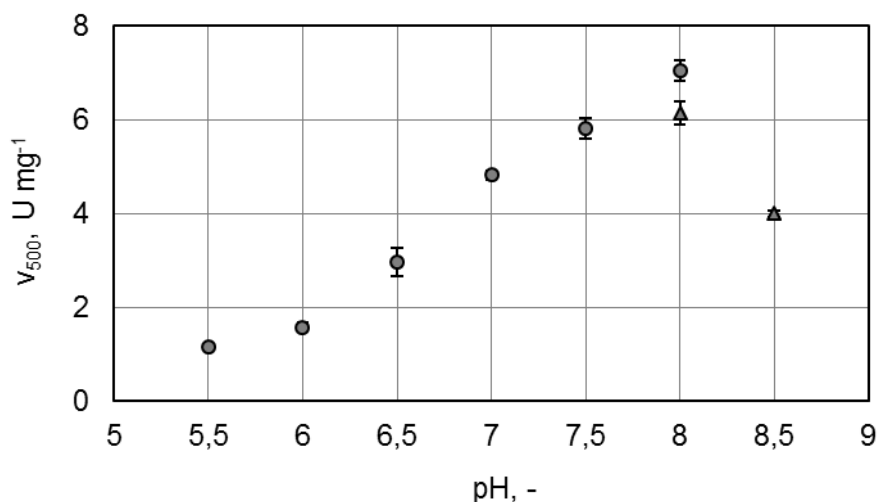
$c_{\text{Enzym}}, \text{ mg L}^{-1}$	$A_i, \%$
75,1	$47,5 \pm 2,6$
67,6	$26,7 \pm 2,6$
33,8	$46,7 \pm 2,6$
22,5	$45,7 \pm 2,6$
16,9	$52,5 \pm 2,7$

## 5.5 pH-Optimum

Das Optimum der Enzymaktivität der NostocER1 wurde für einen pH-Bereich zwischen pH 5,5 und pH 8,5 bestimmt. Hierzu wurden  $v_{500}$  Messungen mit NADH als Cosubstrat in Puffer bei den entsprechenden pH durchgeführt (Abbildung 5.11).

Von einem pH 5,5 hin zu einem pH 8 ist ein starker Anstieg der Aktivität der NostocER1 zu beobachten. So steigt die Enzymaktivität von  $1,15 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$  (pH 5,5) um mehr als das 6-fache auf  $7,09 \pm 0,19 \text{ U mg}^{-1}$  bei pH 8 an. Der ab pH 8 bedingte Pufferwechsel in einen Tris-HCl-Puffer führte zu einer erniedrigten Enzymaktivität ( $6,14 \pm 0,32 \text{ U mg}^{-1}$ ) verglichen zu der bei diesem pH in Na-Phosphatpuffer erhaltenen Aktivität.

Nichtsdestotrotz konnte bei einer weiteren Erhöhung auf pH 8,5 ein zusätzlicher Abfall der Enzymaktivität beobachtet werden. Demnach konnte das pH-Optimum im Rahmen der eingestellten pH auf pH 8 bestimmt werden.



**Abbildung 5.11:** Spezifische Aktivität der NostocER1 bei einer Cosubstratkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ ) in Abhängigkeit des pH. Die Reaktion wurde in 0,1 M Na-Phosphatpuffer (graue Punkte) und 0,1 M Tris-HCl-Puffer (graue Dreiecke) durchgeführt. Weitere Assay-Bedingungen: 10 mM Maleimid, 30 °C.

## 5.6 Diskussion

Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zur Reaktivität der NostocER1 mit den Literaturdaten (Fu 2013, Fu et al. 2013), fallen einige Unterschiede auf. So sind beispielsweise die in der Literatur beschriebenen  $v_{500}$  für beide Cosubstrate deutlich niedriger. Der  $v_{500}$  für NADPH wurde mit  $10,50 \pm 1,22 \text{ U mg}^{-1}$  beziehungsweise  $10,28 \pm 0,28 \text{ U mg}^{-1}$  angegeben, derjenige für NADH mit  $1,36 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$ . Da das in dieser Arbeit verwendete Enzym eine um 37 Aminosäuren kürzere Sequenz aufweist, wurden für einen Vergleich die massebezogenen  $v_{500}$  in auf die stoffmengenbezogenen Wechselzahlen ( $k_{500}$ ) umgerechnet (Tabelle 5.2). Somit konnte in dieser Arbeit, bei einer Cosubstratkonzentration von 500  $\mu\text{M}$ , für NADPH eine um den Faktor  $2,36 \pm 0,45$  gesteigerte Enzymaktivität beobachtet werden, für NADH eine um den Faktor  $3,68 \pm 0,19$  gesteigerte Aktivität. In einem vergleichbaren Rahmen konnte eine geänderte Aktivität mit (*R*)-Carvon als Substrat festgestellt werden. Der  $k_{500}$  war in diesem Kontext um den Faktor  $3,55 \pm 0,14$  höher verglichen mit Literaturangaben. Darüber hinaus werden in Tabelle 5.2 die Michaelis-Konstanten für NADPH angegeben. Hier konnte, im Gegensatz zu den Aktivitäten der Enzyme, kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

**Tabelle 5.2:** Vergleich der molekularen Aktivitäten bei 500  $\mu\text{M}$  Cosubstrat und Maleimid ( $k_{500}$ ) beziehungsweise (*R*)-Carvon als Substrat, sowie der Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) der in dieser Arbeit und in der Literatur charakterisierten NostocER1.

Enzym	NADPH			NADH
	$k_{500}$ , $\text{s}^{-1}$	( <i>R</i> )-Carvon ( $k_{500}$ ), $\text{s}^{-1}$	$K_m$ , $\mu\text{M}$	$k_{500}$ , $\text{s}^{-1}$
NostocER1	$19,13 \pm 2,94$	$1,90 \pm 0,04$	$80,2 \pm 18,6$	$3,87 \pm 0,17$
NostocER1 <sup>a</sup>	$8,12 \pm 0,94$	$0,53 \pm 0,02$	$92,2 \pm 8,3$	$1,05 \pm 0,03$

<sup>a</sup> Daten aus Fu *et al.* (2013)

Die gesteigerten  $k_{500}$  bei einer unveränderten Michaelis-Konstante deuten auf eine gesteigerte maximale Reaktionsgeschwindigkeit der im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellten Enzyme hin. Wie in Kapitel 5.1 gezeigt werden konnte, ist der Ursprung dieser Steigerung nicht bei der N-terminalen Verkürzung der NostocER1 zu finden. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass zum Teil kleine Veränderungen der Expressionsbedingungen große Auswirkungen auf die finale Enzymaktivität haben können. Die bei Fu *et al.* (2013) charakterisierte NostocER1 wurde überwiegend unter zu dieser Arbeit vergleichbaren Bedingungen bereitgestellt. Einzige dokumentierte Unterschiede waren eine variabelere Expressionszeit (18 - 20 h statt exakt 20 h) bei geringerer Schüttelfrequenz im Inkubator (160 rpm statt 250 rpm), eine höhere Induktorkonzentration (1 mM statt 0,2 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)) und das Fehlen des rapiden Kühlens auf 20 °C vor der Induktion. Da gezeigt werden konnte, dass der Sauerstoffeintrag während der Expression nur einen sehr geringen beziehungsweise keinen signifikanten Einfluss auf die finale Enzymaktivität besitzt, wird die verminderte Schüttelfrequenz keine negative Auswirkungen hervorgerufen haben. Des Weiteren sollte sich eine Induktion bei 37 °C und anschließende Kühlung im Inkubator ebenfalls nicht negativ auf die Enzymaktivität ausgewirkt haben. In diesem Zusammenhang war zu beobachten, dass sich eine höhere Expressionstemperatur förderlich auf die Enzymaktivität der NostocER1 auswirkt. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da die Temperatur häufig für die heterologe Proteinproduktion gesenkt wird, um die Translationsgeschwindigkeit zu senken und den neu gebildeten Proteinen Zeit für das Einnehmen der korrekten Faltung zu geben (Schein & Noteborn 1988, Vera *et al.* 2007). Darüber hinaus kann die Senkung der cytosolischen Proteinkonzentration zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer korrekten Faltung führen (Schein & Noteborn 1988). Durch die Begünstigung hydrophober Interaktionen bei höheren Temperaturen, wird zudem die

Wahrscheinlichkeit der Aggregation der Enzyme mit einer Verringerung der Temperatur gesenkt (Baldwin 1986, Schellman 1997). Jedoch führt eine Senkung der Temperatur zu einer verringerten Wachstumsrate, was eine gesenkte Verfügbarkeit von Proteinen und Metaboliten, die an der Expression des Zielproteins beteiligt sind, zur Folge hat (Klumpp et al. 2009). Hierdurch kann der Zusammenhang von höherer Expressionstemperatur und höherer Enzymaktivität der NostocER1 erklärt werden.

Trotz der etwas kürzeren Expressionszeit verglichen zu Literaturangaben, war diese absolut gesehen fast identisch zu derjenigen in dieser Arbeit. Überdies ist die Expressionszeit eher in einen Zusammenhang mit der gebildeten Enzymmenge als mit der spezifischen Enzymaktivität zu setzen. Einzig verbleibender dokumentierter Unterschied war die Induktorkonzentration von 1 mM IPTG, die für das verwendete T7-Promotorsystems relativ hoch gewählt wurde (Baneyx 1999). Ein Vergleich verschiedener Konzentrationen wurde nicht durchgeführt, weswegen hierzu keine eindeutige Aussage möglich ist. Darüber hinaus ist die Expression der Lactosepermease, die neben diffusiven Prozessen die Aufnahme des IPTG verursacht, von Zelle zu Zelle verschieden, wodurch die heterologe Proteinproduktion über die IPTG-Konzentration schwer steuerbar oder vorhersagbar wird (Fernández-Castané et al. 2012). Demnach verursachen die unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen nur sehr unwahrscheinlich einen systematischen, negativen Einfluss auf die Enzymaktivität. Jedoch könnte eine erhöhte Expression prinzipiell negative Auswirkungen auf die Qualität der Enzyme verursachen. Letztendlich ist die Ursache der im Vergleich zur Literatur gesteigerten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der NostocER1 nicht eindeutig bestimmbar.

Das Auftreten von unterschiedlichen ‚Enzymqualitäten‘ ist jedoch keine Seltenheit. Dieses Phänomen wird häufig durch inkomplette Faltung hervorgerufen. Dabei befinden sich die Enzyme in einem teilgefalteten, stabilen und löslichen Zustand, aber besitzen zugleich eine inkorrekte und dadurch inaktive Architektur des aktiven Zentrums (González-Montalbán et al. 2007). Bei Enzymen, die eine prosthetische Gruppe besitzen, kann eine zu geringe Konzentration des benötigten Cofaktors eine Ursache hierfür repräsentieren. Dieser Sachverhalt konnte durch die Variation der Expressionstemperatur beobachtet werden. Die Senkung der Temperatur hatte eine Verringerung des relativen proteingebundenen FMN-Anteils zur Folge. Mit der Temperatur sinkt die Wachstumsrate der Bakterien und dadurch auch die Rate der Biosynthese von FMN (Wilson & Pardee 1962). Somit scheint die Proteinbildungsrate bis Temperaturen von 27 °C höher zu sein als die FMN-Bildungsrate, was sich durch einen relativen FMN-Anteil von < 95 % der heterolog produzierten Flavoenzyme zeigt. Bei Expressionstemperaturen oberhalb von 27 °C lässt sich das gegenteilige Phänomen beobachten, was sich dadurch äußert, dass > 95 % der Enzyme das für die Katalyse benötigte FMN besitzen. Die anscheinend

äußerst variable Verfügbarkeit des Flavin-Moleküls ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Regulation der Flavin-Biosynthese in *E. coli* wenig sensitiv auf physiologische Einflüsse reagiert (Wilson & Pardee 1962). Da keine Informationen über den FMN-Gehalt der von Fu *et al.* (2013) bereitgestellten Enzyme verfügbar sind, kann keine Aussage getroffen werden, ob die geringere maximale Reaktionsgeschwindigkeit hierdurch verursacht wurde. Außerdem konnte durch die Expression der NostocER1 bei einer Temperatur von 40 °C gezeigt werden, dass die Enzymaktivität nicht alleine über den relativen FMN-Anteil erklärt werden kann.

Die Untersuchungen zur thermischen Stabilität der NostocER1 ergab ein zweiphasiges Inaktivierungsverhalten, welches über einen doppelt exponentiellen Abfall beschrieben werden konnte. Dadurch konnte eine schnelle Inaktivierungsphase mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_s$  von  $1,041 \pm 0,098 \text{ h}^{-1}$  und eine langsame Inaktivierungsphase mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_l$  mit  $0,012 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  bestimmt werden. Die Inaktivierung der NostocER1 bei 40 °C wurde in der Literatur nach einem einphasigen exponentiellen Abfall beschrieben und mit einer Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung von  $0,023 \text{ h}^{-1}$  angegeben (Fu 2013). Da in der Literatur eine andere mathematische Beschreibung der Inaktivierung gewählt wurde ist ein direkter Vergleich der Konstanten nicht möglich. Das Auftreten einer zweiphasigen Kinetik bei der thermischen Inaktivierung von Proteinen ist jedoch keine Seltenheit. Meist ist eine thermisch bedingte Änderung der Quartärstruktur oder das Vorhandensein von zwei Isoformen der Enzyme mit unterschiedlichen thermischen Stabilitäten hierfür verantwortlich (Nath *et al.* 1998). Beide Punkte können als Grund der zweiphasigen Inaktivierung der NostocER1 jedoch ausgeschlossen werden. Einerseits ist keine Änderung der Quartärstruktur der Enzyme möglich, da die NostocER1 in monomerer Form auftritt (Fu 2013) und andererseits ist das Auftreten von verschiedenen Isoformen bei heterolog bereitgestellten Enzymen unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz können auch heterolog bereitgestellte, monomere Enzyme durch das Auftreten eines intermediären Zustands während der Inaktivierung nach einer zweiphasigen Kinetik denaturieren (Lencki *et al.* 1992). Dieser intermediäre Zustand kann beispielsweise durch Teilentfaltungen der Proteine, chemische Veränderungen von an der Katalyse beteiligten Aminosäuren des aktiven Zentrums oder Aggregation der Proteine hervorgerufen werden (Misset & van Dijk 1998, Iyer & Ananthanarayan 2008). Dies führt zur Bildung einer zusätzlichen Enzymfraktion, welche im Vergleich zum nativen Enzym eine geänderte Aktivität aufweist. Somit könnte die zweite Phase der Inaktivierung durch die Ausbildung des Intermediats erklärt werden. Da die Inaktivierung der NostocER1 in der Literatur über einen einphasigen Abfall beschrieben wurde, könnte der intermediäre Zustand durch die Ausbildung von katalytisch aktiven Enzymaggregaten erklärt werden. Enzymaggregate bilden sich in Abhängigkeit der Enzymkonzentration aus und ihr

Auftreten wird bei geringen Konzentrationen vernachlässigbar gering (Kiefhaber et al. 1991). Wurde in der Literatur eine geringere Enzymkonzentration als die minimalen  $16,9 \text{ mg L}^{-1}$  dieser Arbeit für die Inaktivierung eingesetzt ist es möglich, dass keine Aggregation beobachtet werden konnte, wodurch das Auftreten eines einphasigen exponentiellen Abfalls erklärt werden kann. Zusätzlich führt die Aggregation von Enzymen häufig zu einer Erhöhung der Thermostabilität (Sheldon 2007), was das Auftreten der gesenkten Geschwindigkeitskonstante der langsamen Inaktivierungsphase im Vergleich zur Literatur erklären würde.

Aufgrund des zum Teil großen Unterschieds zwischen den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Charakteristika der NostocER1 und denjenigen der Literatur, werden alle nachfolgend dargestellten Enzyme ausschließlich mit den NostocER1-Werten der hier durchgeführten Enzymcharakterisierung verglichen.



## 6 Gestaltung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1<sup>10</sup>

Ziel dieses Projektabschnitts war es, Einfluss auf das Cosubstrat-Bindevverhalten der NostocER1 zu nehmen. Daher wird versucht, die spezifische Enzymaktivität mit NADH sowie die Affinität der ER zu NADH als Cosubstrat mittels semi-rationaler Veränderung des Enzyms zu steigern. Hierfür wurden die *Loop*-Regionen, welche sich zwischen den  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices der  $(\beta,\alpha)_8$ -Fasstruktur der ER befinden, als Angriffspunkt ausgewählt. Diese  $\beta\alpha$ -Loops sind an der Katalyse der ER beteiligt (siehe Kapitel 3.3) und tragen höchstwahrscheinlich auch maßgeblich zur Bindung der Cosubstrate bei.

### 6.1 Singuläre *Loop*-Austausche

#### 6.1.1 Identifizierung interagierender *Loop*-Regionen

Zur Determinierung der *Loop*-Regionen des aktiven Zentrums, die mit den Cosubstraten interagieren könnten, wurde ein Homologiemodell basierend auf einer Kristallstruktur der Morphinonreduktase (MR) aus *Pseudomonas putida* M10 erstellt (Abbildung 6.1). Da die Kristallstruktur mit den enzymgebundenen Molekülen FMN und einem NADH-Analogen (NADH<sub>4</sub>) aufgenommen wurde, konnten FMN und NADH hierzu entsprechend im Homologiemodell positioniert werden. Daraufhin wurden acht Zielregionen definiert, die mit NAD(P)H in Wechselwirkung stehen könnten. Dabei handelte es sich um die Regionen *Loop* 1, 2a, 2b, 3a, 3b, 5, 6 und C. Aufgrund ihrer Länge wurden die *Loops* 2 und 3 in zwei mögliche Kontaktflächen (a und b) unterteilt.

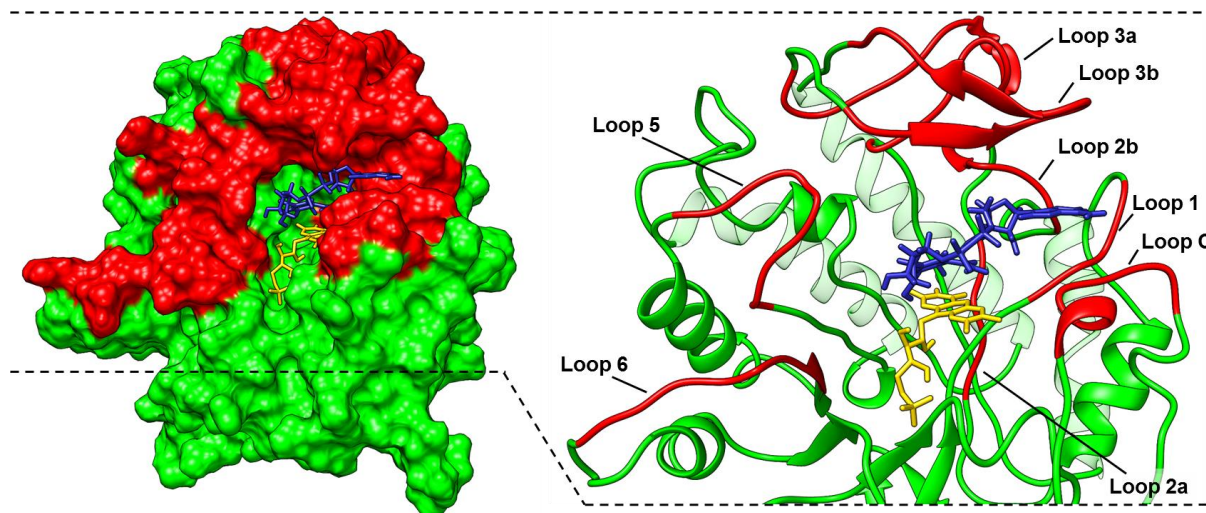
*Loop* C beschreibt in diesem Kontext den Bereich zwischen  $\alpha$ -Helix 8 und dem C-Terminus des Enzyms. Dieser Bereich bildet neben den ausgetauschten  $\beta\alpha$ -Loops ebenfalls eine mögliche Kontaktfläche ab. Dies äußert sich unter anderem an der Lage von Y347<sup>11</sup>, einer in ER konservierten und an der Bindung von Substraten und Cosubstraten beteiligten Aminosäureposition, in dieser Proteinregion. Die *Loop*-Regionen 7 und 8 der NostocER1 wurden nicht ausgetauscht, da sie durch ihre geringe Länge und angenommene Distanz zu NADH nur sehr unwahrscheinlich direkt an der Bindung beteiligt sind. *Loop* 4 wurde nicht verändert, da diese Oberflächenschleife innerhalb der Familie

---

<sup>10</sup> Teilergebnisse dieses Kapitels wurden bereits publiziert in „C. Mähler, F. Kratzl, Vogel M., Vinnenberb S., Weuster-Botz D. und Castiglione, K. (2019), Loop Swapping as a Potent Approach to Increase Ene Reductase Activity with Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). Adv. Synth. Catal., 361.“

<sup>11</sup> Nummerierung der um 37 Aminosäuren verkürzten NostocER1

der ER konserviert vorliegt. Darüber hinaus befinden sich die beiden für die Reaktivität der ER essentiellen Aminosäuren H177<sup>11</sup> und N180<sup>11</sup> in diesem Proteinbereich, was die Mutabilität dieses Proteinbereichs zusätzlich verringert.

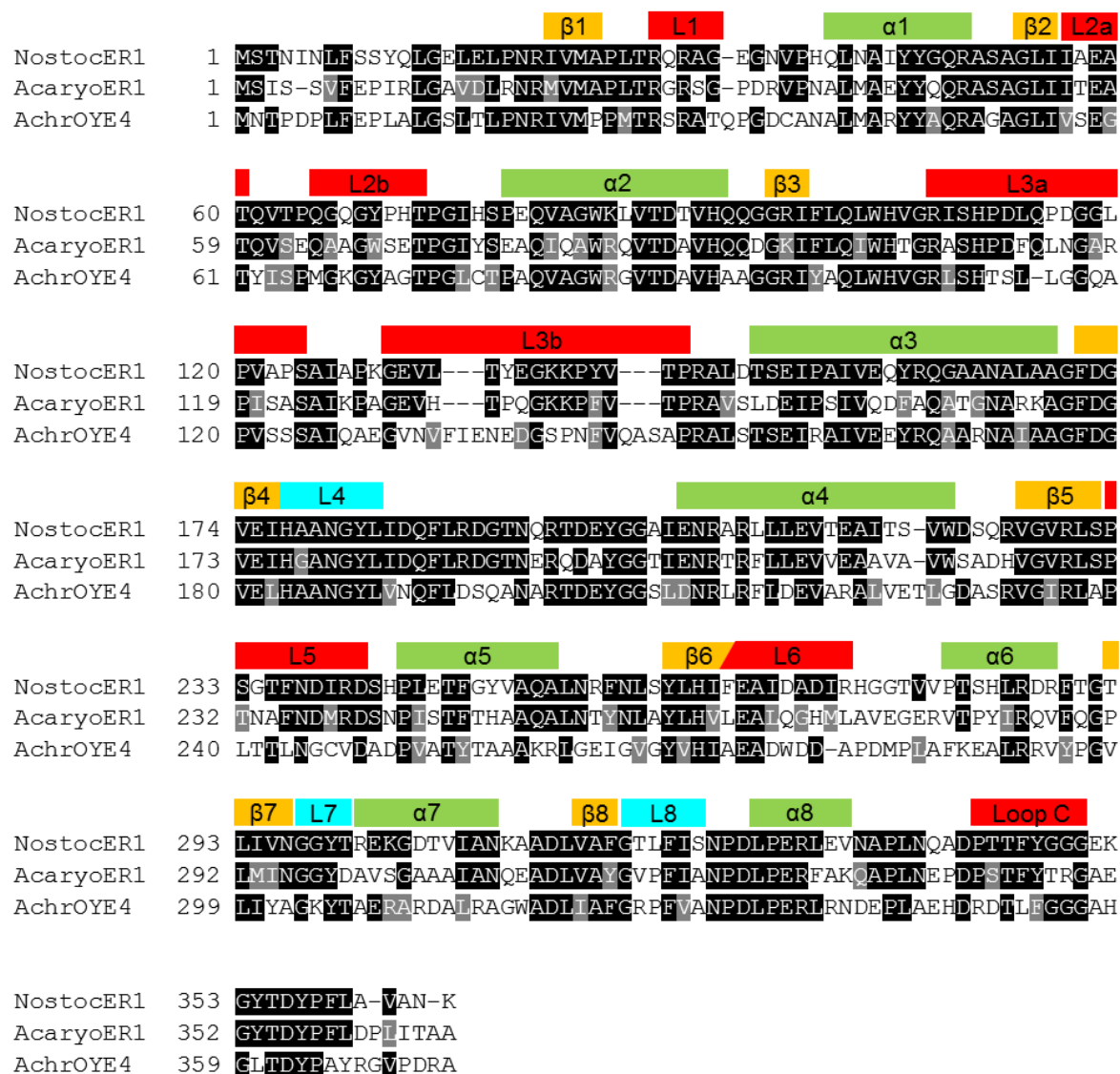


**Abbildung 6.1:** Darstellung der Oberfläche (**links**) und des Proteinrückrats des aktiven Zentrums (**rechts**) des Homologiemodells der NostocER1 basierend auf der Kristallstruktur der Morphinonreduktase (PDB: 2r14). Zusätzlich werden FMN (gelb), NADH (blau) und die *Loop*-Regionen (rot), die mit den Cosubstraten in Kontakt stehen könnten, dargestellt.

Die Unterschiede der determinierten *Loop*-Regionen zu den entsprechenden Bereichen zweier ausgewählter Spender-ER wurden über einen Sequenzvergleich zur NostocER1 ermittelt (Abbildung 6.2). Als ‚*Loop*-Spender‘ dienten zwei ER, die verglichen zur NostocER1 eine stark unterschiedliche Reaktivität mit NADH aufweisen. Zum einen handelt es sich dabei um die genetisch nahe<sup>12</sup>, cyanobakterielle Enreduktase 1 aus *Acaryochloris marina* (AcaryoER1), welche sich durch eine sehr hohe maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $27,86 \pm 3,19 \text{ U mg}^{-1}$  mit NADH auszeichnet (Fu et al. 2013). Zum anderen wurde das genetisch weiter entfernte<sup>13</sup>, proteobakterielle Old Yellow Enzyme 4 aus *Achromobacter* sp. JA81 (AchrOYE4) als Spender herangezogen (Wang et al. 2014). Diese ER befähigt sich durch eine sehr hohe Affinität zu NADH als *Loop*-Donor, welche sich in dem niedrigen  $K_m$  von  $57,1 \pm 17,0 \mu\text{M}$  des AchrOYE4 widerspiegelt.

<sup>12</sup> 59 % Sequenzidentität und 71 % Sequenzähnlichkeit zur NostocER1

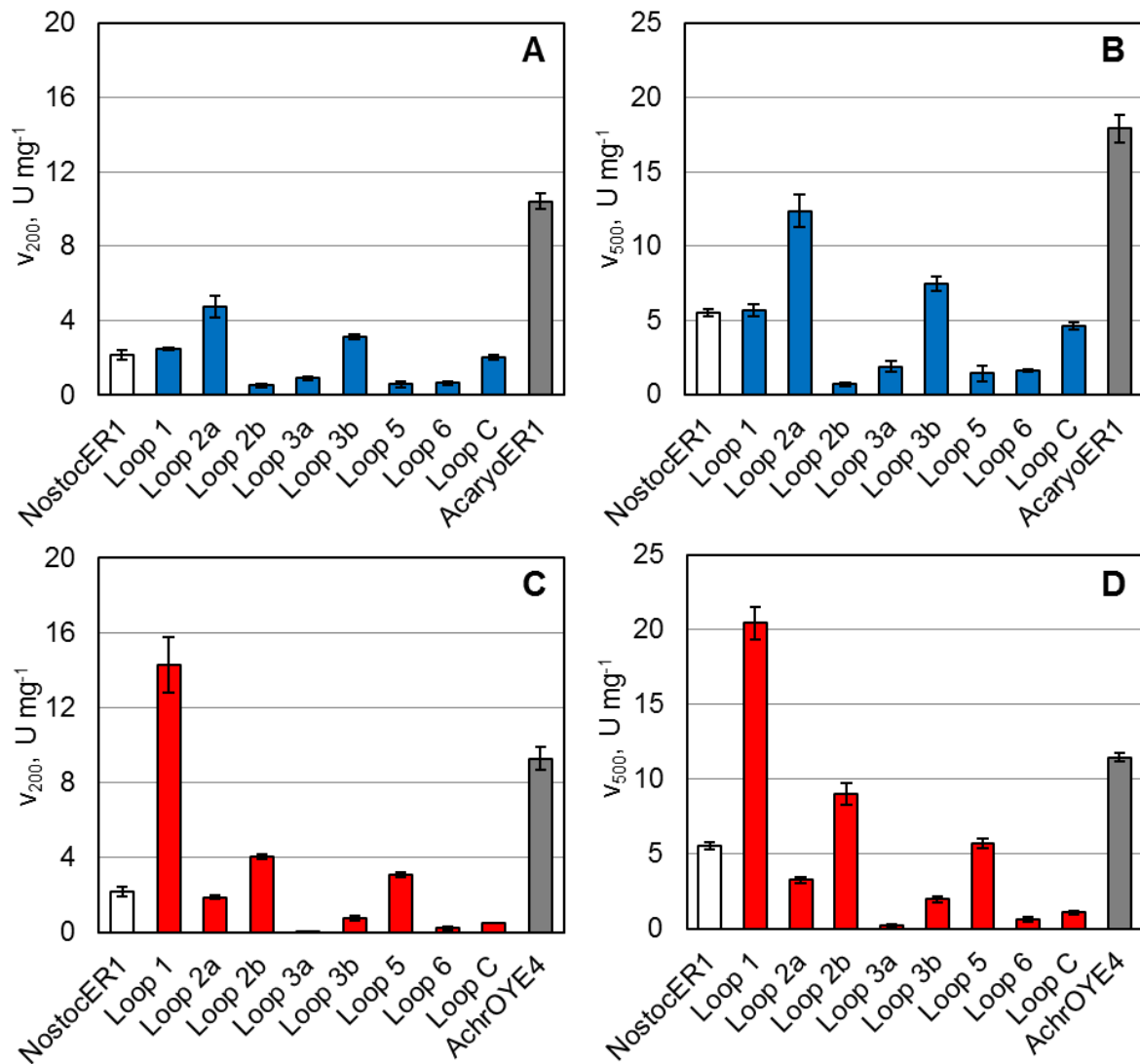
<sup>13</sup> 50 % Sequenzidentität und 63 % Sequenzähnlichkeit zur NostocER1



**Abbildung 6.2:** Sequenzvergleich der NostocER1 mit den zwei Donor-ER AcaryoER1 und AchrOYE4. Zur NostocER1 identische Aminosäuren werden mit schwarzem, ähnliche mit grauem Hintergrund dargestellt. Die Lage der strukturegebenden  $\beta$ -Faltblätter (orange),  $\alpha$ -Helices (grün), sowie die der nicht ausgetauschten (türkis) und ausgetauschten (rot) Loop-Regionen wird zusätzlich angezeigt.

### 6.1.2 Aktivität mit NADH

Um die Wirkung der Alternation der acht determinierten Loop-Regionen auf die Aktivität der NostocER1 zu untersuchen wurden die spezifischen Aktivitäten der 2 x 8 bereitgestellten Hybridproteine bei einer NADH-Konzentration von 200  $\mu$ M ( $v_{200}$ ) und 500  $\mu$ M ( $v_{500}$ ) ermittelt (Abbildung 6.3 und Tabelle 12.31).



**Abbildung 6.3:** Spezifische Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{200}$ , **A / C**) und 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ , **B / D**) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit AcaryoER1 *Loop*-Regionen (blau) beziehungsweise NostocER1 mit AchrOYE4 *Loop*-Regionen (rot). Die dargestellten Aktivitäten bilden das Mittel aus mindestens zwei biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Naphosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

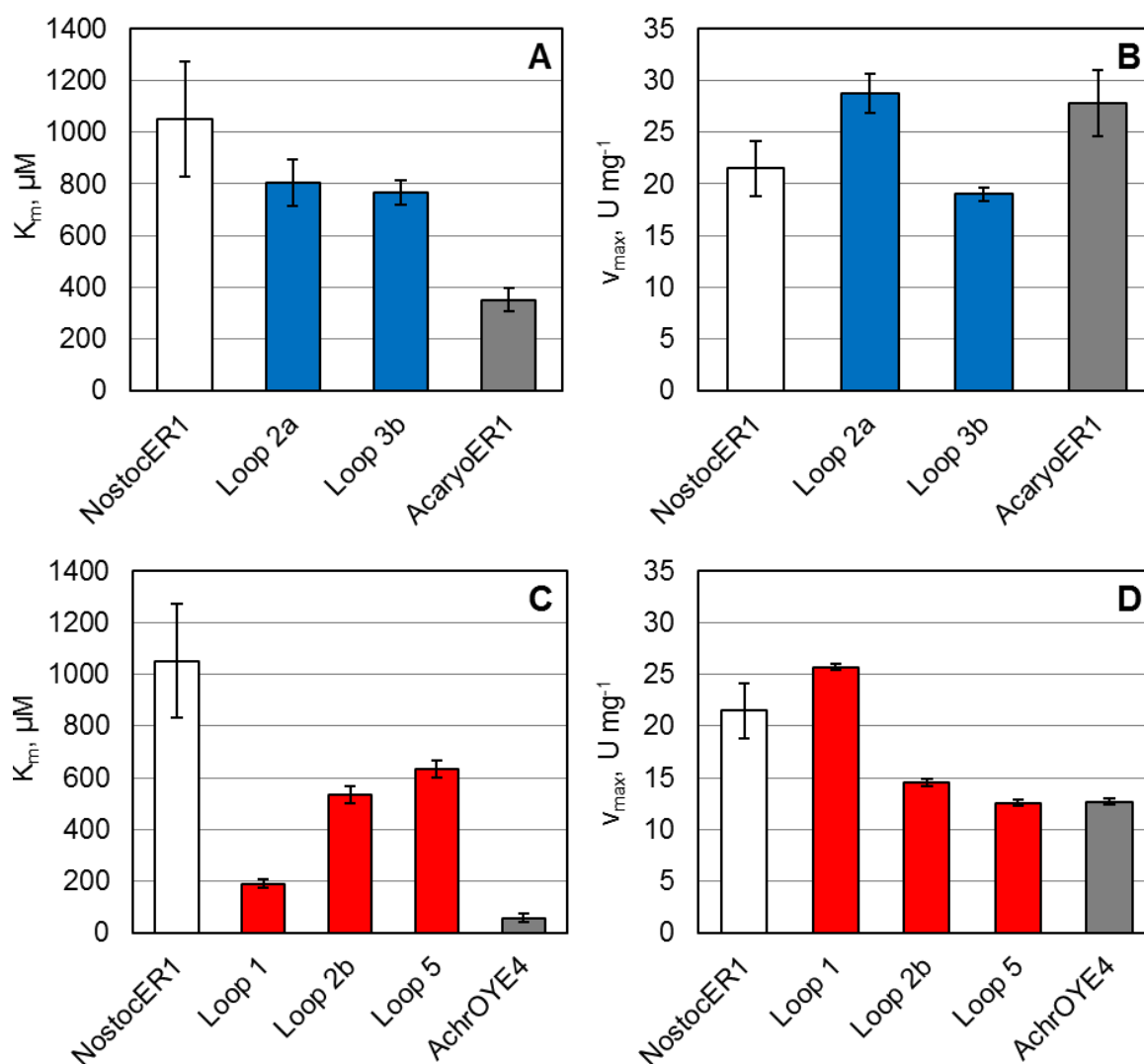
Durch den Austausch der acht determinierten *Loop*-Regionen mit den entsprechenden Regionen der AcaryoER1 konnten zwei Hybridproteine bereitgestellt werden, die eine erhöhte spezifische Aktivität mit NADH als Cosubstrat aufweisen. Dies war einerseits durch die Transferierung des *Loop* 2a und andererseits durch die des *Loop* 3b möglich. Hierdurch konnte  $v_{200}$  im Rahmen des *Loop* 2a-Austauschs um einen Faktor von  $2,2 \pm 0,4$  auf  $4,73 \pm 0,58 \text{ U mg}^{-1}$  erhöht werden, derjenige des *Loop* 3b-Austauschs um einen

Faktor von  $1,5 \pm 0,2$  auf  $3,14 \pm 0,14 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.3, **A**). Jedoch wurde der hohe  $v_{200}$  des Spenders AcaryoER1 von  $10,42 \pm 0,41 \text{ U mg}^{-1}$  von beiden Hybridenzymen nicht erreicht. Des Weiteren ergab der Austausch der *Loop*-Regionen 1 und C einen zur NostocER1 nicht signifikant geänderten  $v_{200}$ . Die Transferierung der *Loops* 2b, 3a, 5 und 6 führte verglichen mit NostocER1 zu einer deutlichen Senkung der spezifischen Aktivität. Ein zu den ermittelten  $v_{200}$  vergleichbares Bild ergab sich nach der Ermittlung der  $v_{500}$  (Abbildung 6.3, **B**).

Der Austausch der acht NostocER1-*Loops* mit denjenigen des AchrOYE4 ergab drei Hybride mit einer gesteigerten spezifischen Aktivität. Interessanterweise wurde diese Steigerung durch die Änderung der *Loops* 1, 2b und 5 erzielt, also zu den AcaryoER1-Austauschen abweichenden Proteinregionen. Insbesondere die Veränderung der *Loop* 1-Region brachte eine deutliche Steigerung der NADH-Aktivität hervor. Der  $v_{200}$  dieses Hybriden lag mit  $14,26 \pm 1,48 \text{ U mg}^{-1}$  um einen Faktor von  $6,6 \pm 1,1$  höher als die entsprechende Aktivität der NostocER1 (Abbildung 6.3, **C**). Somit übertraf diese Mutante nicht nur die spezifische Aktivität seines Spenders AchrOYE4 ( $9,28 \pm 0,63 \text{ U mg}^{-1}$ ), sondern auch diejenige der AcaryoER1. Durch die Veränderung der *Loop*-Regionen 2b und 5 konnte  $v_{200}$  um die Faktoren  $1,9 \pm 0,2$  beziehungsweise  $1,4 \pm 0,2$  gesteigert werden. Die fünf weiteren *Loop*-Austausche ergaben Hybride mit signifikant verringerten spezifischen Aktivitäten. Wie schon im Falle der AcaryoER1-Austausche konnte ein vergleichbares Bild im Rahmen der spezifischen Aktivitäten mit  $500 \mu\text{M}$  NADH ermittelt werden (Abbildung 6.3, **D**).

### 6.1.3 Enzymkinetische Parameter

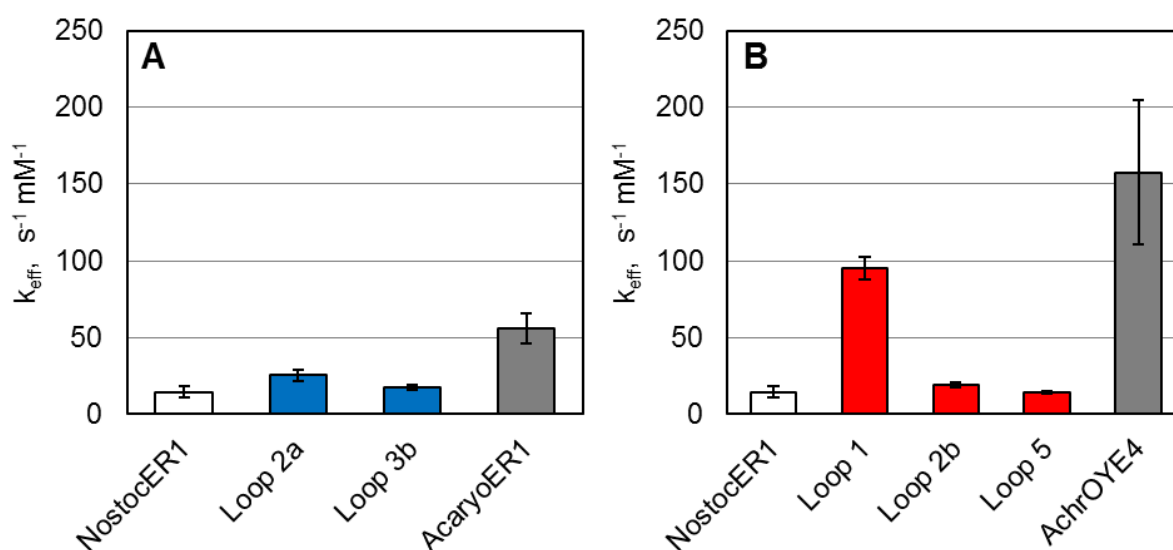
Um eine detailliertere Charakterisierung der Enzymvarianten durchzuführen, wurden aufbauend auf den ermittelten spezifischen Aktivitäten die enzymkinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) mit NADH der fünf Hybridenzyme mit einer zur NostocER1 gesteigerten NADH-Aktivität bestimmt. Die Parameter werden in Abbildung 6.4 dargestellt und in Tabelle 12.32 und Tabelle 12.33 aufgelistet.



**Abbildung 6.4:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ , **A / C**) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ , **B / D**) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit AcaryoER1 Loop-Regionen (blau) beziehungsweise NostocER1 mit AchrOYE4 Loop-Regionen (rot). Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Die Affinität der zwei Hybride mit AcaryoER1-Loop-Regionen war mit Michaelis-Konstanten um 800  $\mu\text{M}$  kaum beziehungsweise nicht signifikant verändert zum  $K_m$  der NostocER1 mit  $1052,8 \pm 222,2 \mu\text{M}$ . Darüber hinaus wurde ein großer Unterschied zum  $K_m$  des AcaryoER1-Spenders identifiziert, der mit  $351,4 \pm 46,2 \mu\text{M}$  um mehr als Faktor 2 unter dem der Hybridproteine lag (Abbildung 6.4, **A**). Des Weiteren konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Loop 2a-Austauschs leicht erhöht werden. Hierdurch zeigte dieses Hybridenzym im Vergleich zum Spender AcaryoER1 einen nicht signifikant unterschiedlichen  $v_{max}$  von  $28,74 \pm 1,89 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.4, **B**).

Eine deutlichere Senkung des  $K_m$  konnte durch den Austausch mit AchrOYE4-Loops beobachtet werden. Insbesondere der Austausch des *Loop 1* führte zur größten Veränderung, was sich durch eine Senkung des  $K_m$  um den Faktor  $5,53 \pm 1,24$  auf  $190,2 \pm 14,4 \mu\text{M}$  zeigte. Aber auch durch die Modifikation des *Loop 2b* und *Loop 5* konnte der  $K_m$  auf  $534,8 \pm 33,3 \mu\text{M}$  beziehungsweise  $632,8 \pm 33,7 \mu\text{M}$  gesenkt werden (Abbildung 6.4, **C**). Zusätzlich zum stark verminderten  $K_m$  übertraf der *Loop 1*-Austausch mit einem  $v_{\text{max}}$  von  $25,72 \pm 0,28 \text{ U mg}^{-1}$  auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der NostocER1. Im Falle des *Loop 2b* und *Loop 5* war hingegen eine Annäherung an den  $v_{\text{max}}$  von AchrOYE4 ( $12,69 \pm 0,26 \text{ U}^{-1}$ ) zu beobachten (Abbildung 6.4, **D**).



**Abbildung 6.5:** Katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit AcaryoER1 *Loop*-Regionen (blau, **A**) beziehungsweise NostocER1 mit AchrOYE4 *Loop*-Regionen (rot, **B**).

Mit Hilfe der enzymkinetischen Parameter wurden die katalytischen Effizienzen ( $k_{\text{eff}}$ ) für NADH der Wildtypenzyme sowie der fünf Hybridenzyme ermittelt (Abbildung 6.5). Dadurch konnte gezeigt werden, dass zwei dieser fünf Hybridenzyme eine zur NostocER1 signifikant erhöhte  $k_{\text{eff}}$  aufweisen. Zum einen war das der *Loop 2a*-Austausch mit der entsprechenden Region der AcaryoER1 mit einer faktoriellen Erhöhung um  $1,75 \pm 0,49$  und zum anderen der Austausch mit der AchrOYE4 *Loop*-Region 1 mit einer Erhöhung um den Faktor  $6,62 \pm 1,70$ . Nichtsdestotrotz war es durch diese singulären *Loop*-Austausche nicht möglich die katalytische Effizienz des entsprechenden Donorenzyms auf die NostocER1 zu übertragen.

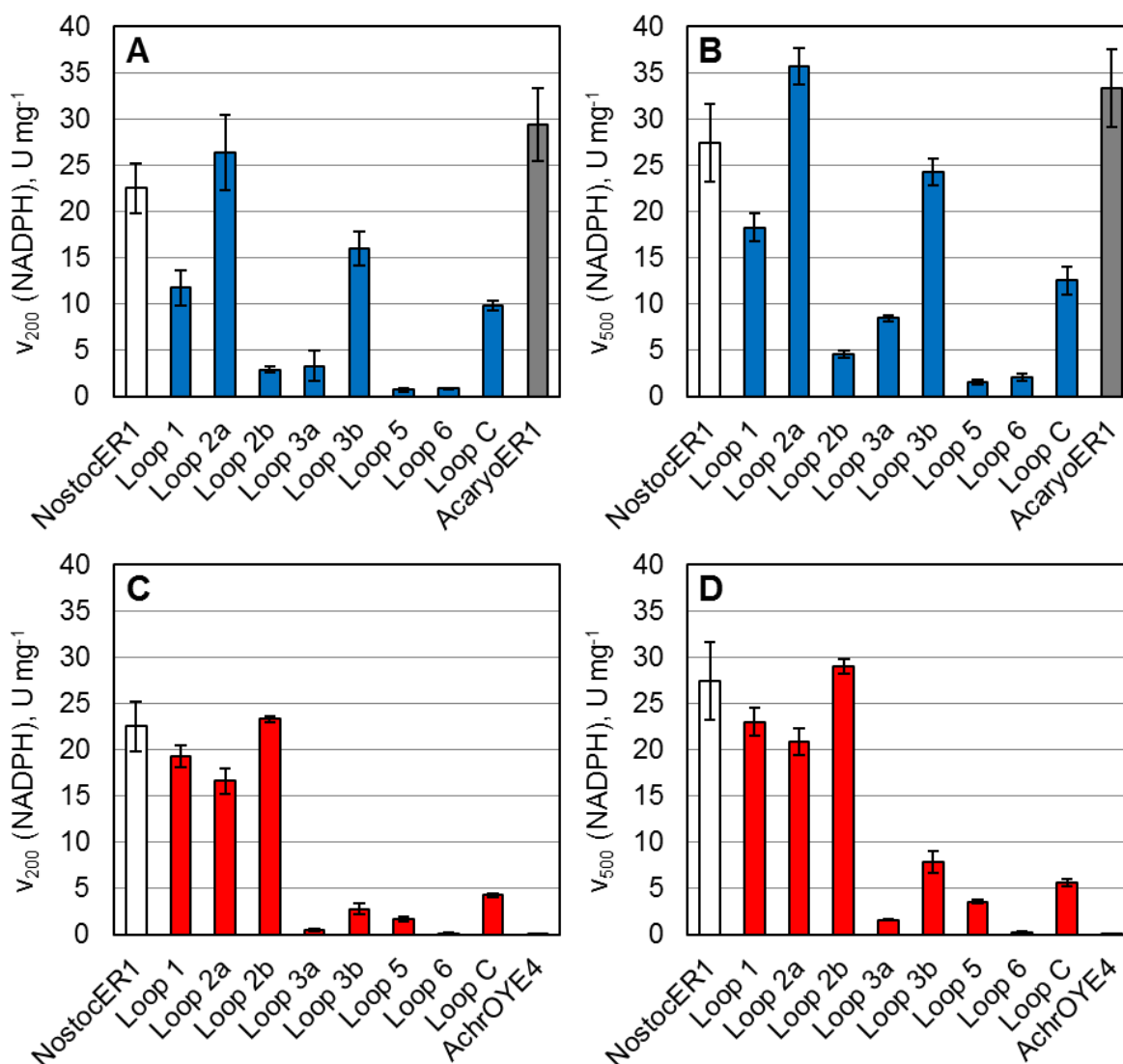
#### 6.1.4 Aktivität mit NADPH

Zusätzlich zur Aktivität mit NADH wurde die Aktivität mit NADPH der Wildtypenzyme und der 2 x 8 generierten NostocER1-Hybridenzyme bestimmt. Hierzu wurde die spezifische Aktivität bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NADPH ( $v_{200}$  (NADPH)) und 500  $\mu\text{M}$  NADPH ( $v_{500}$  (NADPH)) ermittelt (Abbildung 6.6).

Betrachtet man  $v_{200}$  der AcaryoER1-Loop-Austausche, so ist ein zu  $v_{200}$  mit NADH vergleichbares Bild erkennbar. Wie mit NADH als Cosubstrat weist der Loop 2a-Austausch mit  $26,34 \pm 4,05 \text{ U mg}^{-1}$  auch mit NADPH als Cosubstrat die höchste Aktivität aller AcaryoER1-Austausche auf (Abbildung 6.6, **A**). Somit unterscheidet sich die Aktivität dieses Hybrids weder von der NostocER1 ( $22,53 \pm 2,72 \text{ U mg}^{-1}$ ), noch von der AracyoER1 ( $29,38 \pm 3,92 \text{ U mg}^{-1}$ ) signifikant. Ebenfalls analog zu den NADH-Aktivitäten besitzt der Loop 3b-Austausch, eine um einen Faktor von  $1,41 \pm 0,24$  zur NostocER1 verringerten Aktivität. Mit einer zum Ausgangsenzym NostocER1 mäßigen faktoriellen Verringerung von  $1,92 \pm 0,38$  und  $2,28 \pm 0,30$  heben sich zusätzlich der Loop 1- beziehungsweise Loop C-Austausch von den verbleibenden vier Hybriden ab. Diese besitzen eine zur NostocER1 stark verminderte Aktivität. Somit führte der Austausch mit den AcaryoER1-Loops 2b, 3a, 5 und 6 sowohl mit NADH als auch mit NADPH zu einer stark gesenkten Aktivität. Dies deutet auf einen grundlegenden negativen Einfluss auf die reduktive Halbreaktion oder sogar auf beide Halbreaktionen dieser NostocER1-Veränderungen hin. Ein zu  $v_{200}$  sehr ähnliches Bild zeichnet sich bei den Aktivitäten mit 500  $\mu\text{M}$  NADPH ab (Abbildung 6.6, **B**).

Die  $v_{200}$  mit den ausgetauschten AchrOYE4-Loops verhalten sich weitgehendst ähnlich wie die AcaryoER1-Loop-Varianten. Die Hybride, welche eine zur NostocER1 gesteigerte oder unveränderte NADH-Aktivität aufweisen, besitzen eine nicht signifikant geänderte oder leicht verminderte NADPH-Aktivität. Explizit sind das die in Abbildung 6.6, **C** dargestellten ausgetauschten Loops 1, 2a und 2b. Hervorzuheben ist in diesem Kontext jedoch der Loop 5-Austausch. Dieses Hybridenzym besitzt trotz seiner zur NostocER1 gesteigerten NADH-Aktivität eine stark verminderte NADPH-Aktivität. Dieses Ergebnis ist im Rahmen der singulären Loop-Austausche einzigartig und bedeutet, dass durch den Austausch mit dieser Loop-Region selektiv Einfluss auf die Cosubstratspezifität der NostocER1 genommen wurde. Mit diesem Hybridenzym konnte eine NostocER1-Variante bereitgestellt werden, die bevorzugt mit dem nicht-phosphorylierten Cosubstrat reagiert, analog zu ihrem Donor AchrOYE4.





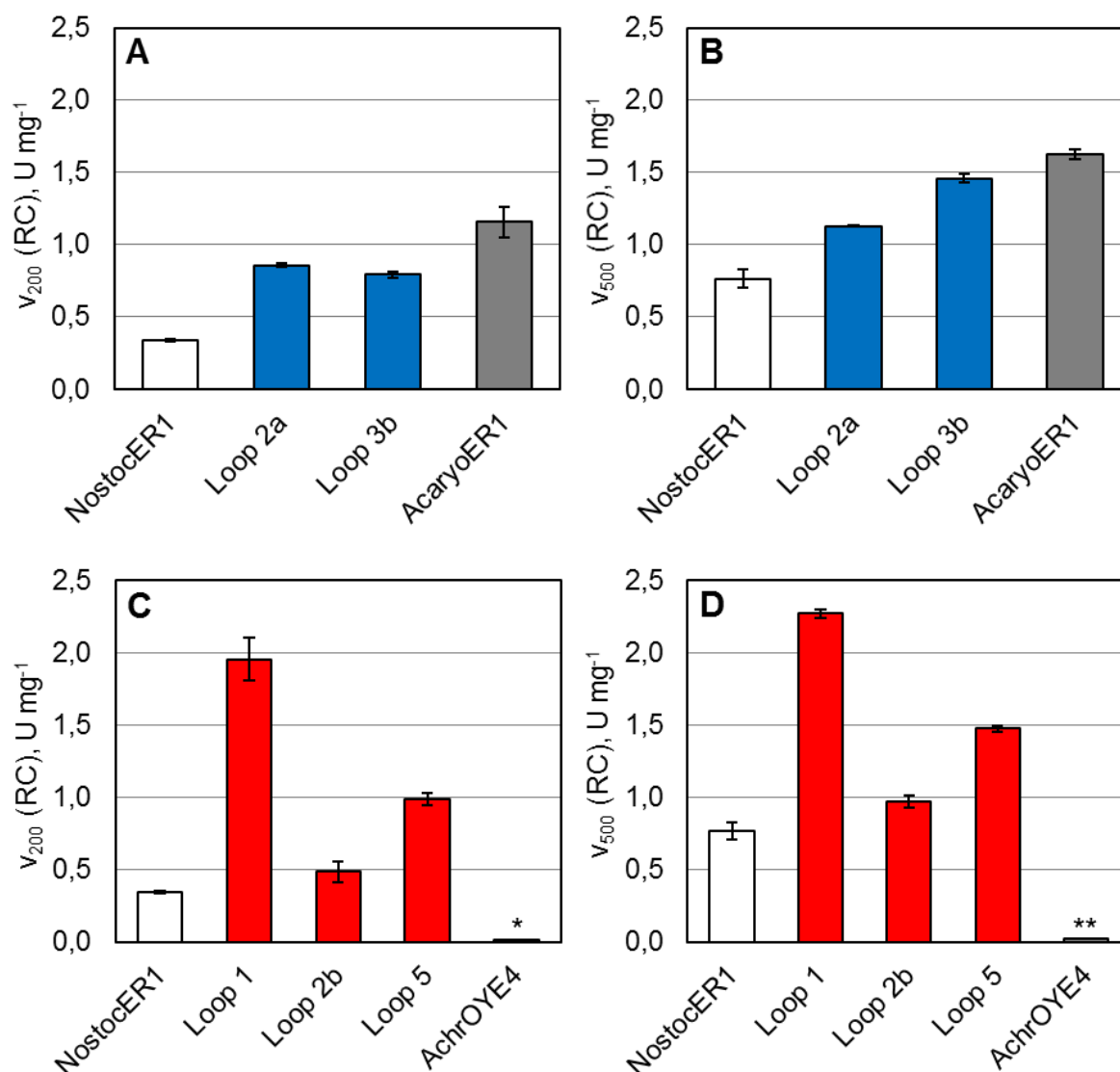
**Abbildung 6.6:** Spezifische Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NADPH ( $v_{200}$ , **A / C**) und 500  $\mu\text{M}$  NADPH ( $v_{500}$ , **B / D**) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit AcaryoER1 *Loop*-Regionen (blau) beziehungsweise NostocER1 mit AchrOYE4 *Loop*-Regionen (rot). Die dargestellten Aktivitäten bilden das Mittel aus mindestens zwei biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Naphosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Die verbleibenden *Loop*-Regionen 3a, 3b, 6 und C besitzen eine zur NostocER1 mindestens um den Faktor  $5,26 \pm 0,67$  verminderte NADPH-Aktivität. Somit wurden, wie bei den ausgetauschten AcaryoER1-*Loops*, vier Hybridenzyme identifiziert, die mit beiden Cosubstraten eine stark gesenkte Aktivität aufweisen. Wie schon zuvor konnte diese Tendenz mit den ermittelten  $v_{500}$  bestätigt werden (Abbildung 6.6, **D**).

### 6.1.5 Aktivität mit (*R*)-Carvon

Um die Auswirkung der singulären *Loop*-Austausche auf die Reaktivität mit einem Substrat von industrieller Relevanz zu untersuchen, wurden spezifische Aktivitäten unter der Verwendung von (*R*)-Carvon ermittelt. Hierzu wurden die spezifischen Aktivitäten der fünf Hybride, welche eine erhöhte NADH-Aktivität aufwiesen, mit 10 mM (*R*)-Carvon und 200  $\mu$ M NADH ( $v_{200}$  (RC)) beziehungsweise 500  $\mu$ M NADH ( $v_{500}$  (RC)) bestimmt (Abbildung 6.7, Tabelle 12.36 und Tabelle 12.37). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass alle Hybride unter den zwei betrachteten Reaktionsbedingungen eine höhere spezifische Aktivität als diejenige der NostocER1 aufweisen. Somit lagen die  $v_{200}$  Aktivitäten der zwei AcaryoER1 *Loop*-Austausche mit  $0,89 \pm 0,01$  U  $\text{mg}^{-1}$  (*Loop* 2a) und  $0,79 \pm 0,02$  U  $\text{mg}^{-1}$  (*Loop* 3b) deutlich über der Aktivität der NostocER1 ( $0,34 \pm 0,01$  U  $\text{mg}^{-1}$ ). Jedoch besaßen beide Hybride eine geringere Aktivität als die des AcaryoER1-Donors mit  $1,16 \pm 0,11$  U  $\text{mg}^{-1}$  (Abbildung 6.7, **A**). Ein vergleichbares Ergebnis konnte für  $v_{500}$  ermittelt werden, mit der einzigen Ausnahme, dass die Aktivität des *Loop* 3b-Austauschs ( $1,46 \pm 0,03$  U  $\text{mg}^{-1}$ ) die des *Loop* 2a-Austauschs ( $1,13 \pm 0,01$  U  $\text{mg}^{-1}$ ), im Gegensatz zu den Messungen mit Maleimid als Substrat, deutlich übertraf (Abbildung 6.7, **B**).

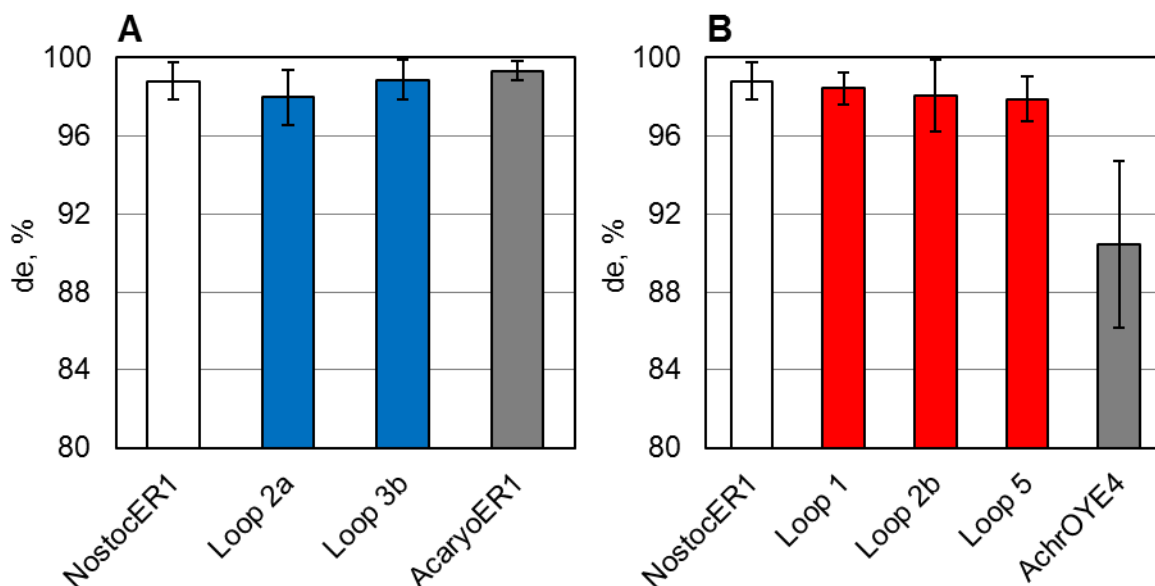
Analog zu vorangegangenen Ergebnissen war eine weitaus deutlichere Aktivitätssteigerung im Rahmen des Austauschs der AchrOYE4-*Loops* zu beobachten. Insbesondere die Steigerung des *Loop* 1-Austauschs um einen Faktor von  $5,74 \pm 0,46$  auf  $v_{200}$  von  $1,95 \pm 0,15$  U  $\text{mg}^{-1}$  stach in diesem Kontext hervor (Abbildung 6.7, **C**). Somit konnte die mit dieser Enzymvariante gesteigerte NADH-Aktivität auch unter der Verwendung von (*R*)-Carvon als Substrat bestätigt werden. Darüber hinaus konnte durch den Austausch dieses *Loops* die spezifische Aktivität der AcaryoER1 übertroffen werden. Mit einer spezifischen Aktivität von  $0,99 \pm 0,04$  U  $\text{mg}^{-1}$  zeigte der *Loop* 5-Austausch ebenfalls eine deutliche Steigerung um einen Faktor von  $2,89 \pm 0,15$  zur NostocER1 und somit keinen signifikanten Unterschied zur AcaryoER1. Des Weiteren wurde die sehr geringe Aktivität des AchrOYE4-Donors ( $0,016 \pm 0,001$  U  $\text{mg}^{-1}$ ) auf keines der Hybridenzyme übertragen. Diese Ergebnisse konnten durch die Messungen bei 500  $\mu$ M Cosubstrat bestätigt werden (Abbildung 6.7, **D**).



**Abbildung 6.7:** Spezifische Aktivitäten mit 10 mM (*R*)-Carvon (RC) als Substrat und 200  $\mu$ M NADH ( $v_{200}$ , **A / C**) beziehungsweise 500  $\mu$ M NADH ( $v_{500}$ , **B / D**) als Cosubstrat der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit AcaryoER1 Loop-Regionen (blau) beziehungsweise NostocER1 mit AchrOYE4 Loop-Regionen (rot). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C. \* 0,016  $\pm$  0,001 U mg<sup>-1</sup>, \*\* 0,019  $\pm$  0,001 U mg<sup>-1</sup>

Neben der Aktivität wurde die Stereospezifität der bereitgestellten Hybride mit einer erhöhten NADH-Aktivität bestimmt. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass weder für die Hybride mit AcaryoER1-Loops (Abbildung 6.8, **A**), noch für diejenigen mit AchrOYE4-Loops (Abbildung 6.8, **B**) ein signifikant negativer Effekt auf die Stereospezifität zu erkennen war. Dies spiegelt sich in einem Diastereomerenüberschuss (de) von mehr als 96 % bei allen Hybridproteinen wider. Des Weiteren wurde, wie schon im Kontext der

Aktivitätsmessungen, kein signifikant negativer Einfluss des AchrOYE4-Donors auf die entsprechenden drei NostocER1-Varianten festgestellt. Der deutlich schlechtere de des AchrOYE4 von  $90,4 \pm 4,2$  % nach der Reduktion von (*R*)-Carvon wurde auf keines der drei Hybridenzyme mit AchrOYE4-*Loops* übertragen.

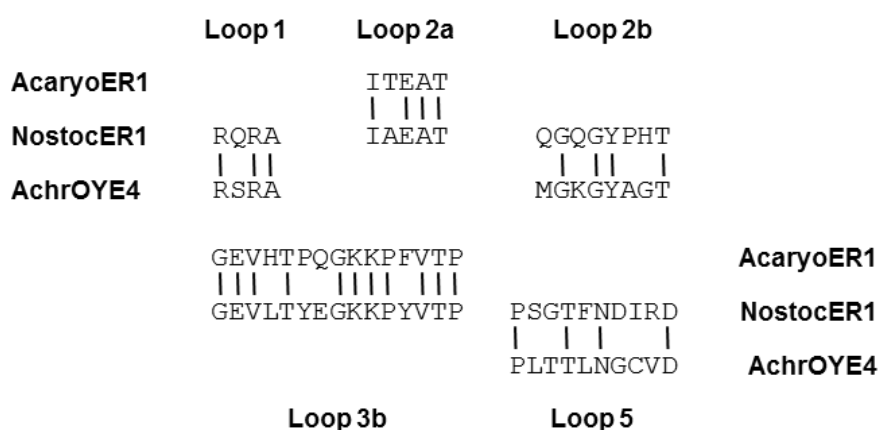


**Abbildung 6.8:** Diastereomerenüberschuss (de) der NostocER1 (weiß), der Donoren AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und den NostocER1-Hybriden mit AcaryoER1-*Loops* (blau, **A**), sowie mit AchrOYE4-*Loops* (rot, **B**) nach der Reduktion von (*R*)-Carvon.

### 6.1.6 Diskussion

Die Strategie der *Loop*-Austausche zur Modifikation von Enzymeigenschaften erwies sich als sehr potenter Ansatz um das Cosubstrat-Bindevverhalten der NostocER1 zu gestalten. Durch die Bereitstellung von nur 16 Hybridproteinen konnten fünf NostocER1-Varianten erzeugt werden, die eine gewünschte erhöhte NADH-Aktivität aufwiesen. Dies entsprach einer hohen Trefferquote von 31,25 %. Darüber hinaus wurden diese fünf Enzymvarianten in fünf unterschiedlichen *Loop*-Regionen verändert. Dies ist nicht nur ein positives Resultat, da eine Kombination der durchgeführten Modifikationen ermöglicht wird, sondern verifiziert durch die positive Veränderung unterschiedlichster Proteinregionen auch den Einsatz des gewählten semi-rationalen *Enzyme Engineering*-Ansatzes. Vier dieser fünf Proteinregionen (*Loop* 1, 2a, 2b und 3b) befanden sich räumlich nahe der Adenosin-Gruppe des Cosubstrats. Dies ist wenig überraschend, da das einzige Unterscheidungsmerkmal von NADPH zu NADH, die 2' Phosphat-Gruppe, sich auf dieser Molekülseite befindet. Aus diesem Grund sind Proteinbereiche in räumlicher Nähe zur 2' Phosphat-beziehungsweise 2' Hydroxy-Gruppe des Cosubstrats häufig Angriffspunkte für das

Cosubstrat-*Engineering* (Cahn et al. 2017, Borlinghaus & Nestl 2018). Mit Ausnahme der *Loop*-Regionen 5 und 6 befanden sich alle ausgetauschten *Loop*-Regionen auf dieser der Adenosin-Gruppe zugewandten Enzymseite, wodurch sich logischerweise die Wahrscheinlichkeit eines Treffers erhöhte. Somit nimmt der *Loop* 5-Austausch mit der Region des AchrOYE4 eine Sonderstellung ein. Er befindet sich auf der ‚anderen Seite‘ der Bindetasche, nahe der Nicotinamid-Gruppe des Cosubstrats und stellt dadurch ein ungewöhnliches Ziel des Cosubstrat-*Engineerings* dar. Durch die Anwendung einer rationaleren *Engineering*-Strategie wäre diese *Loop*-Region höchstwahrscheinlich unberücksichtigt geblieben.



**Abbildung 6.9:** Durchgeführte Änderungen der NostocER1-Primärstruktur, die zu einer Erhöhung der NADH Aktivität führten. Zur NostocER1 identische und somit unveränderte Aminosäuren werden mit einem schwarzen Strich gekennzeichnet.

Nicht nur bei der Betrachtung der räumlichen Lage der ausgetauschten *Loops*, sondern auch bei einem Vergleich der modifizierten Sequenzen ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Die durchgeführten Änderungen der Primärstruktur, welche zu einer gesteigerten NADH-Aktivität führten, werden in Abbildung 6.9 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass sehr diverse Veränderungen, zwischen einer einzelnen Aminosäure (*Loop* 1, *Loop* 2a) und bis zu sechs Aminosäuren (*Loop* 5), durchgeführt wurden. Noch dazu ging bei 13 der insgesamt 16 veränderten Aminosäuren eine Änderung der Polarität beziehungsweise Flexibilität<sup>14</sup> mit dem Austausch einher.

Interessanterweise wurde die größte Veränderung der Reaktivität durch eine der kleinsten Veränderungen der NostocER1 erzielt. Eine verglichen zu den anderen Modifikationen wenig umfangreiche Q30S Punktmutation in *Loop* 1 führte zu einer erstaunlichen

<sup>14</sup> Durch einen Austausch mit Beteiligung der Aminosäuren P und G, welche eine Sonderstellung im Bezug auf die Flexibilität einnehmen (Krieger et al. (2005)

Erhöhung von  $k_{\text{eff}}$  mit NADH um einen Faktor von  $6,62 \pm 1,70$ . Da beide Aminosäuren in ähnlicher Weise Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, könnte die Änderung der Reaktivität mit der mutationsbedingten Variation des sterischen Anspruchs der Aminosäure im aktiven Zentrum begründet werden.

Obwohl der Austausch des *Loop* 5 mit einer faktoriellen Änderung von  $0,97 \pm 0,24$  keine signifikante Verbesserung der  $k_{\text{eff}}$  zum Wildtyp erzeugte, ist dieser *Loop*-Austausch nicht weniger erwähnenswert. Alle bereitgestellten NostocER1-Varianten mit einer zum Wildtyp erhöhten beziehungsweise unveränderten NADH-Aktivität besaßen eine zur NostocER1 nicht signifikant geänderte oder leicht gesenkte Aktivität mit NADPH als Cosubstrat. Die einzige Ausnahme stellt hierbei dieser *Loop* 5-Austausch dar. Im Rahmen dieser Modifikation war eine drastische Senkung der NADPH-Aktivität um einen Faktor zwischen  $13,60 \pm 2,76$  ( $v_{200}$ ) und  $7,73 \pm 1,25$  ( $v_{500}$ ) zum Ausgangsenzym beobachtbar. Somit scheint durch diesen *Loop*-Austausch die sehr geringe NADPH-Akzeptanz des entsprechenden *Loop*-Donors AchROYE4 übertragen worden zu sein. Bei späterer Anwendung der gestalteten Enzyme kann eine stärkere oder schwächere Diskriminierung zwischen den Cosubstraten wünschenswert sein (Chánique & Parra 2018), weswegen eine Möglichkeit der Einflussnahme auf die Cosubstratspezifität willkommen ist. Bei Enzymen mit einer Rossmannfaltung ist unter anderem eine kurze, sehr konservierte *Loop*-Region für die Bildung einer Bindetasche der Adenosin-Gruppe des Cosubstrats verantwortlich. Hierdurch führt die Ladung dieser *Loop*-Region zu einer Diskriminierung zwischen NADPH und NADH (Hanukoglu 2015). Ein Austausch mit elektronenakzeptierenden, basischen Aminosäuren (meist R) fördert eine Bindung von NADPH. Im Gegensatz dazu führt der Austausch mit elektronenreichen Aminosäuren (meist D oder E) zu einer Abstoßung der 2' Phosphat-Gruppe und dadurch zu einer Bevorzugung von NADH (Scrutton et al. 1990). Mittels des durchgeführten *Loop* 5-Austauschs kam es zu zwei ladungsändernden Mutationen, einer D238G und einer R240V Mutation. Demnach war keine klare Verschiebung der Ladung in diesem *Loop* beobachtbar. Hinzu kommt, dass sich dieser *Loop* nach dem generierten NostocER1 Homologiemodell von den fünf ausgetauschten *Loop*-Regionen am weitesten entfernt von der Adenosin-Gruppe des Cosubstrats befindet. Somit ist die beobachtete Verschiebung der Cosubstratspezifität vermutlich durch weniger offensichtliche, mutationsbedingte Tertiärstrukturänderungen zu begründen.

Die gemessene Erhöhung der Reduktionsrate von (*R*)-Carvon unter der Verwendung von NADH bei allen fünf Hybridproteinen mit einer gesteigerten NADH-Aktivität, deutet auf eine Bestätigung der erfolgreichen Gestaltung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1 hin.

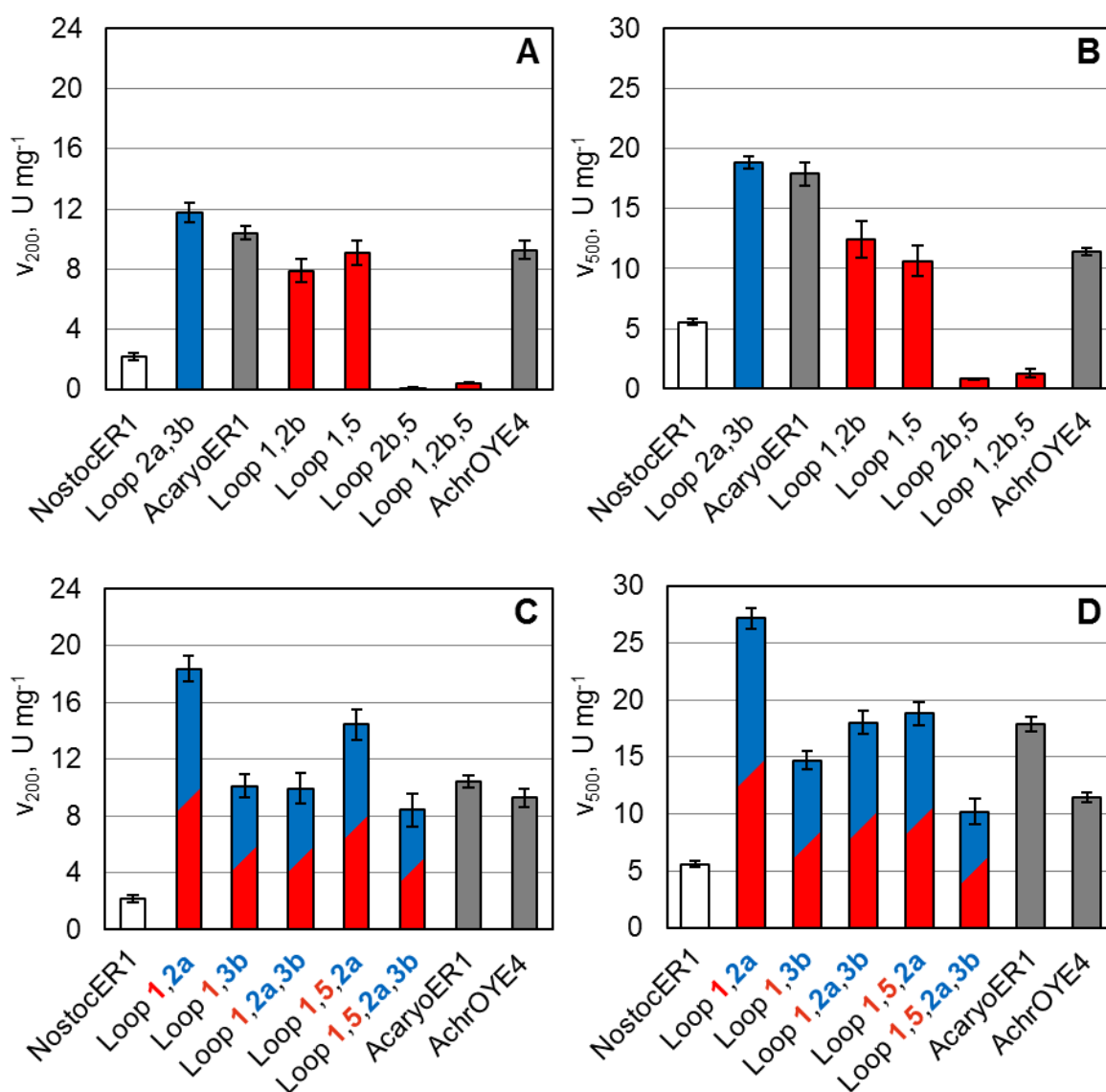
Zusätzlich deutet der geringe Aktivitätsunterschied zwischen  $v_{200}$  und  $v_{500}$  bei der (*R*)-Carvon-Reduktion des AchrOYE4-Loop 1 Austauschs auf eine stark erhöhte Affinität zu dem nicht-phosphorylierten Cosubstrat.

## 6.2 Multiple Loop-Austausche

Um zu überprüfen, ob eine weitere Steigerung der NADH-Aktivität der NostocER1 möglich ist, wurden die fünf identifizierten singulären Loop-Austausche miteinander kombiniert. Hierzu wurden alle donorspezifische Kombinationen durchgeführt, was bedeutet, dass eine Verknüpfung der zwei AcaryoER1-Loops und die vier Kombinationsmöglichkeiten der drei AchrOYE4-Loops bereitgestellt wurden. Zusätzlich wurden die vielversprechendsten Loop-Regionen donorübergreifend kombiniert. So wurden verschiedene Hybride exprimiert, die sowohl die AcaryoER1-Loops 2a und/oder 3b als auch die AchrOYE4-Loops 1 oder 1,5 enthielten. Dieses Set an NostocER1-Varianten wurde, analog zu den vorangegangenen Hybriden, hinsichtlich ihrer Reaktivität charakterisiert und mit den wildtypischen Enzymen verglichen.

### 6.2.1 Aktivität mit NADH

Im Zuge dieser Charakterisierung wurde zunächst die spezifische Aktivität mit NADH ermittelt und mit den Werten der wildtypischen Enzyme verglichen. Die erhaltenen  $v_{200}$  und  $v_{500}$  werden in Abbildung 6.10 dargestellt und in Tabelle 12.38 aufgelistet. Im Zuge der donorspezifischen AcaryoER1-Kombination konnte eine weitere Erhöhung der NADH-Aktivität beobachtet werden. Mit einem  $v_{200}$  von  $11,77 \pm 0,68 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.10, **A**) und  $v_{500}$  von  $18,84 \pm 0,53 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.10, **B**) führte die Kombination der Loops 2a und 3b zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität, verglichen zu den entsprechenden singulären Loop-Austauschen. Hierdurch war es unter beiden Reaktionsbedingungen möglich, die Aktivität des Spenders AcaryoER1 abzubilden. Die donorspezifischen Kombinationen des AchrOYE4 führten verglichen zu dem singulären Loop 1-Austausch zu keiner weiteren Steigerung der Aktivität. Nichtsdestotrotz resultierten die Kombinationen aus Loop 1 mit 2b oder 5 in einer Aktivität, die sich nicht signifikant von derjenigen des AchrOYE4-Spenders unterscheidet. Lediglich die Kombinationen der Loops 2b und 5 zeigten einen negativen Effekt. So führte die Kombination dieser beiden Loops und auch die der drei AchrOYE-Loops (1,2b,5) zu einer drastischen Senkung der Aktivität um einen minimalen Faktor von  $4,32 \pm 1,28$ .



**Abbildung 6.10:** Spezifische Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{200}$ , A / C) und 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ , B / D) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen Loop-Regionen der AcaryoER1 (blau), des AchrOYE4 (rot) oder von beiden Spendern (blau-rot). Die dargestellten Aktivitäten bilden das Mittel aus mindestens zwei biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Zusätzlich wurden donorübergreifende Kombinationen der AcaryoER1 Loops 2a und/oder 3b, sowie der AchrOYE4 Loops 1 und 1,5 durchgeführt. Diese Loop-Regionen wurden aufgrund ihrer gezeigten guten Kombinierbarkeit im Rahmen der donorspezifischen Kombinationen ausgewählt. Bei Betrachtung der  $v_{200}$ , von fünf aus dieser Gruppe von Loops erzeugten Hybriden, ist zu erkennen, dass alle NostocER1-Varianten eine um einen Faktor von  $3,90 \pm 0,72$  zur NostocER1 gesteigerte Aktivität aufweisen.

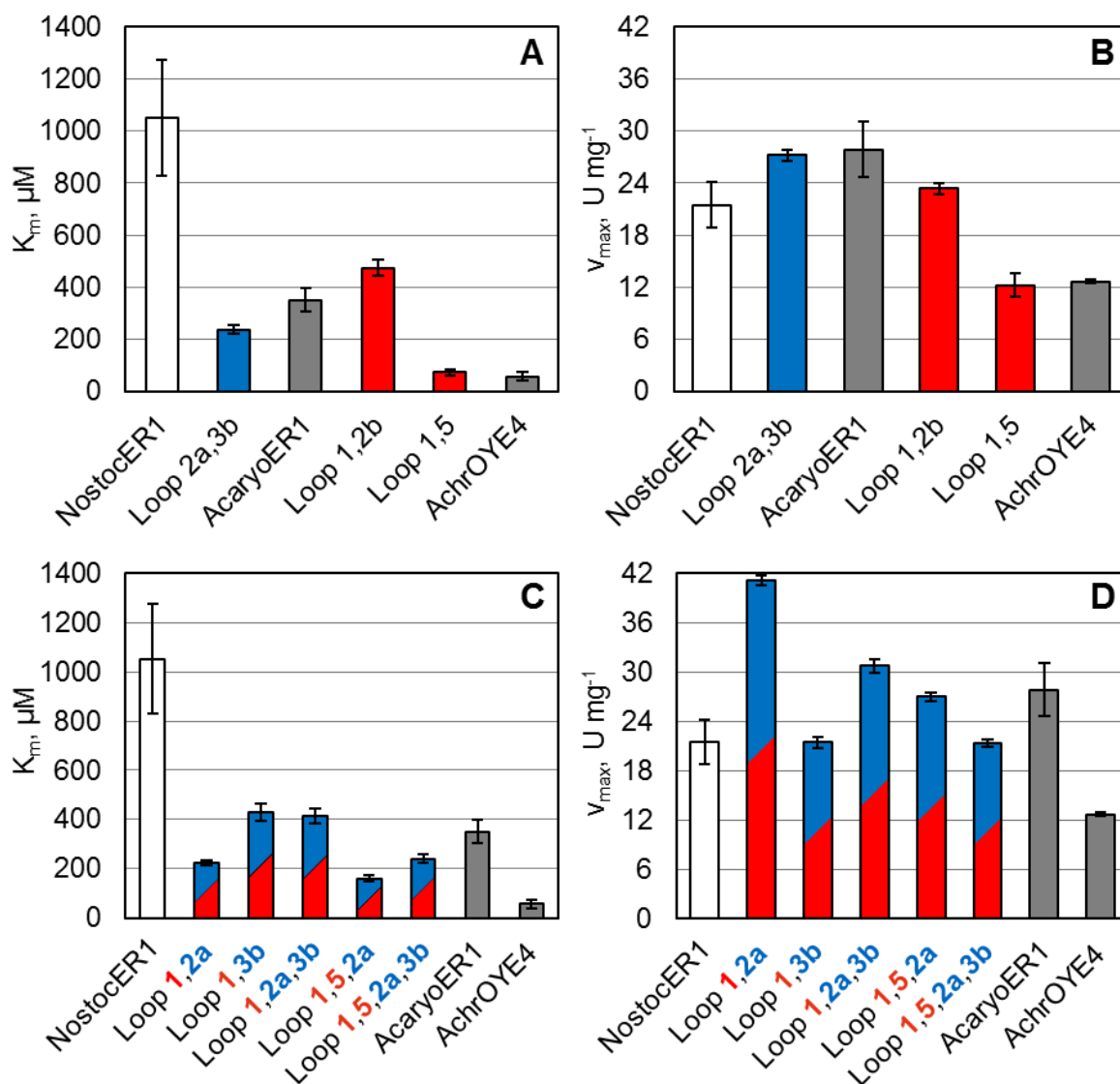


Darüber hinaus besitzen alle Hybride eine zu den *Loop*-Spendern erhöhte beziehungsweise weitestgehend unveränderte Aktivität (Abbildung 6.10, **C**). Insbesondere die Kombination aus *AchrOYE4 Loop 1* und *AcaryoER1 Loop 2a* sticht mit einem  $v_{200}$  von  $18,35 \pm 0,88 \text{ U mg}^{-1}$  hervor. Somit besitzt dieser Hybrid nicht nur eine um einen Faktor von  $8,51 \pm 1,13$  zur *NostocER1* gesteigerte Aktivität, sondern übertrifft auch diejenige der beiden Spender-Enzyme um einen Faktor von  $1,76 \pm 0,11$  (*AcaryoER1*) beziehungsweise  $1,98 \pm 0,16$  (*AchrOYE4*). Die Tendenz der Aktivitätsänderungen konnte im Rahmen der  $v_{500}$  Messungen bestätigt werden, wenngleich die Aktivitätsunterschiede der *NostocER1*-Varianten zu den wildtypischen Enzymen geringer ausfielen (Abbildung 6.10, **D**).

### 6.2.2 Enzymkinetische Parameter

Neben den NADH-Aktivitäten wurden die enzymkinetischen Parameter der Hybride mit einer zur *NostocER1* gesteigerten NADH-Aktivität ermittelt (Abbildung 6.11 und Tabelle 12.39). Vergleicht man zunächst die Michaelis-Konstanten der donorspezifischen *Loop*-Austausche, ist eine deutliche Steigerung der Affinität zu NADH und somit Senkung des  $K_m$  zu erkennen. Die Kombination der *AcaryoER1-Loops 2a* und *3b* führte zu einem  $K_m$  von  $237,1 \pm 17,3 \text{ }\mu\text{M}$ , wodurch die entsprechende Konstante des *AcaryoER1* Spenders mit  $351,4 \pm 46,2 \text{ }\mu\text{M}$  deutlich unterschritten wurde (Abbildung 6.11, **A**). Eine größere Senkung des  $K_m$  konnte auf Seiten der *AchrOYE4*-Kombinationen erzielt werden. Die Modifikation der *Loops 1* und *5* führte zu einem herausragenden  $K_m$  von  $72,6 \pm 13,2 \text{ }\mu\text{M}$ , was einer faktoriellen Änderung von  $14,50 \pm 4,04$  zum Ausgangsenzym *NostocER1* entspricht. Außerdem war kein signifikanter Unterschied zwischen dem  $K_m$  dieses Hybrids und dem Spender *AchrOYE4* mit  $57,1 \pm 17 \text{ }\mu\text{M}$  mehr messbar.

Ein vergleichbares Bild ergab die Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit dieser zwei multiplen *Loop*-Austausche. Durch die Kombination der zwei *AcaryoER1-Loops* wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Spenders *AcaryoER1* auf die *NostocER1* übertragen, wodurch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der wildtypischen *NostocER1* übertroffen wurde. Auch die Kombination der *AchrOYE4-Loops 1* und *5* führte zu einer Abbildung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit des Spenders *AchrOYE4* auf die *NostocER1*, was in diesem Fall allerdings einem zum Ausgangsenzym gesenkten  $v_{\text{max}}$  entspricht (Abbildung 6.11, **B**).

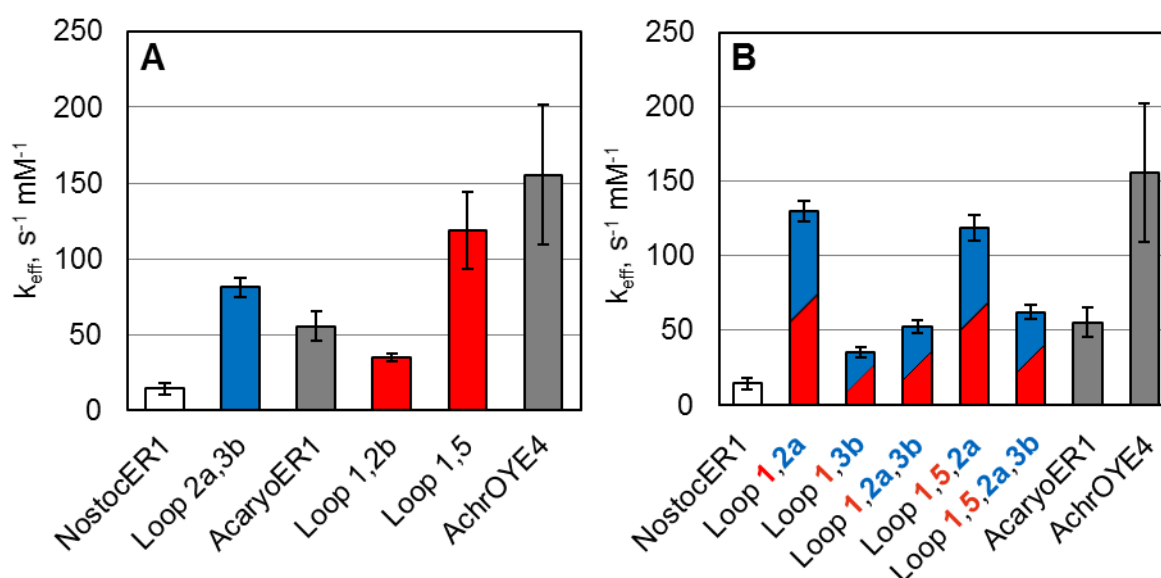


**Abbildung 6.11:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ , **A / C**) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ , **B / D**) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen Loop-Regionen der AcaryoER1 (blau), des AchrOYE4 (rot) oder von beiden Spendern (blau-rot). Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Durch die Generierung der donorübergreifenden Hybride konnte kein zusätzlich positiver Effekt bezüglich der Affinität zu NADH erzielt werden. Nichtsdestotrotz besitzen alle untersuchten NostocER1-Varianten Michaelis-Konstanten zwischen  $160,7 \pm 11,4 \mu\text{M}$  und  $430,4 \pm 36,6 \mu\text{M}$  und zeigen somit eine deutliche Verbesserung zur wildtypischen NostocER1. Damit wurde der  $K_m$  der AcaryoER1 von allen Hybriden übertroffen oder zumindest abgebildet. Dennoch war ein deutlicher Unterschied zum  $K_m$  des zweiten Spenders AchrOYE4 zu beobachten (Abbildung 6.11, **C**). Wie sich bereits im Rahmen der

$v_{200}$  und  $v_{500}$  Messungen abzeichnete, konnte durch den donorübergreifenden Austausch multipler *Loops* eine weitere Steigerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. So besitzen alle fünf untersuchten Hybride mindestens eine zur NostocER1 nicht signifikant unterschiedliche maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 6.11, **D**). Mit  $41,16 \pm 0,64 \text{ U mg}^{-1}$  trat in diesem Kontext der bereits erwähnte *Loop* 1,2a-Austausch hervor. Dieses Hybridprotein besitzt somit einen zur NostocER1 um den Faktor  $1,92 \pm 0,24$  erhöhte  $v_{\text{max}}$ . Aber auch die Dreifach-Kombinationen aus *Loop* 1,2a,3b und *Loop* 1,5,2a wiesen eine zur wildtypischen NostocER1 signifikant erhöhte maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf.

Mit Hilfe der enzymkinetischen Parameter wurden die katalytischen Effizienzen ( $k_{\text{eff}}$ ) aller charakterisierten multiplen NostocER1-Varianten bestimmt (Abbildung 6.12 und Tabelle 12.39). Auf Seiten der donorspezifischen *Loop*-Austausche konnte durch die Kombination der beiden AcaryoER1-*Loops*  $k_{\text{eff}}$  um einen Faktor von  $5,69 \pm 1,46$  im Vergleich zur NostocER1 gesteigert werden, wodurch die entsprechende  $k_{\text{eff}}$  des Spenders AcaryoER1 übertroffen wurde. Da durch die Kombination der AchrOYE4-*Loops* 1 und 5 weitgehend eine Übertragung der enzymkinetischen Parameter auf die NostocER1 stattfand, konnte logischerweise kein signifikanter Unterschied zwischen der  $k_{\text{eff}}$  dieses Hybriden ( $119,0 \pm 25,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) und dem entsprechenden Wert des Donors AchrOYE4 ( $155,4 \pm 46,4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) beobachtet werden (Abbildung 6.12, **A**).



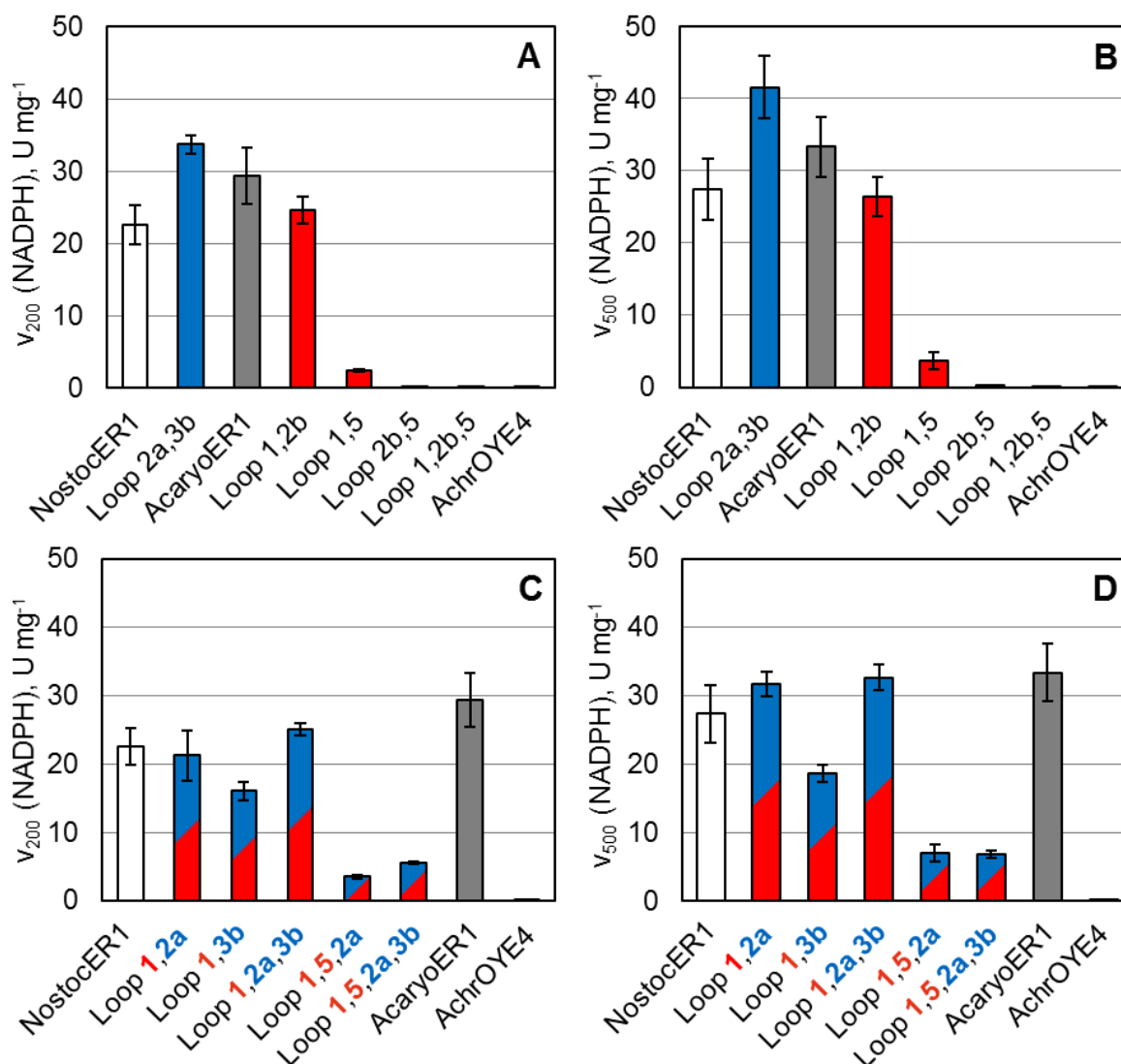
**Abbildung 6.12:** Katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen *Loop*-Regionen der AcaryoER1 (blau) und des AchrOYE4 (rot, **A**) oder von beiden Spendern (blau-rot, **B**).

Bei den donorübergreifenden *Loop*-Austauschen wurde die katalytische Effizienz der NostocER1 maximal um einen Faktor von  $9,12 \pm 2,28$  gesteigert. Dies wurde durch den *Loop* 1,2a-Austausch mit einem Wert von  $130 \pm 6,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  verwirklicht (Abbildung 6.12, **B**). Somit besitzt dieses Hybridprotein ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zum AchrOYE4-Donor. Dies gilt auch für den Hybriden mit der dritthöchsten gemessenen katalytischen Effizienz, den AchrOYE4-*Loops* 1 und 5 in Kombination mit dem AcaryoER1-*Loop* 2a (*Loop* 1,5,2a). Diese NostocER1-Variante besitzt eine  $k_{\text{eff}}$  von  $118,4 \pm 8,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .

### 6.2.3 Aktivität mit NADPH

Zusätzlich zu den spezifischen Aktivitäten mit NADH wurden die  $v_{200}$  und  $v_{500}$  aller Hybridenzyme mit multiplen ausgetauschten *Loop*-Regionen mit NADPH bestimmt. Diese Daten werden in Abbildung 6.13 dargestellt und in Tabelle 12.38 aufgeführt. Im Kontext dieser Datenerhebung konnte gezeigt werden, dass die Kombination der AcaryoER1-*Loops* 2a und 3b zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität mit NADPH führte. So wurde, wie auch schon bei den entsprechenden Messungen mit NADH, die Aktivität des Spenders auf diesen NostocER1-Hybriden übertragen. Dadurch war eine Erhöhung von  $v_{200}$  auf  $33,7 \pm 1,24 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.13, **A**) und von  $v_{500}$  auf  $41,56 \pm 4,32 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.13, **B**) zu beobachten. Bei der Kombination der AchrOYE4-*Loops* konnte ausschließlich für den *Loop* 1,2b-Hybriden eine zur wildtypischen NostocER1 vergleichbare Aktivität gemessen werden. Die *Loop*-Kombination 1 und 5 zeigte eine um Faktor  $9,24 \pm 1,21$  ( $v_{200}$ ) beziehungsweise  $7,31 \pm 2,64$  ( $v_{500}$ ) stark gesenkte NADPH-Aktivität. Die beiden zusätzlichen *Loop*-Kombinationen des AchrOYE4 wiesen eine noch drastischere Reduktion der NADPH-Aktivität auf, analog ihrer spezifischen Aktivitäten mit NADH als Cosubstrat.

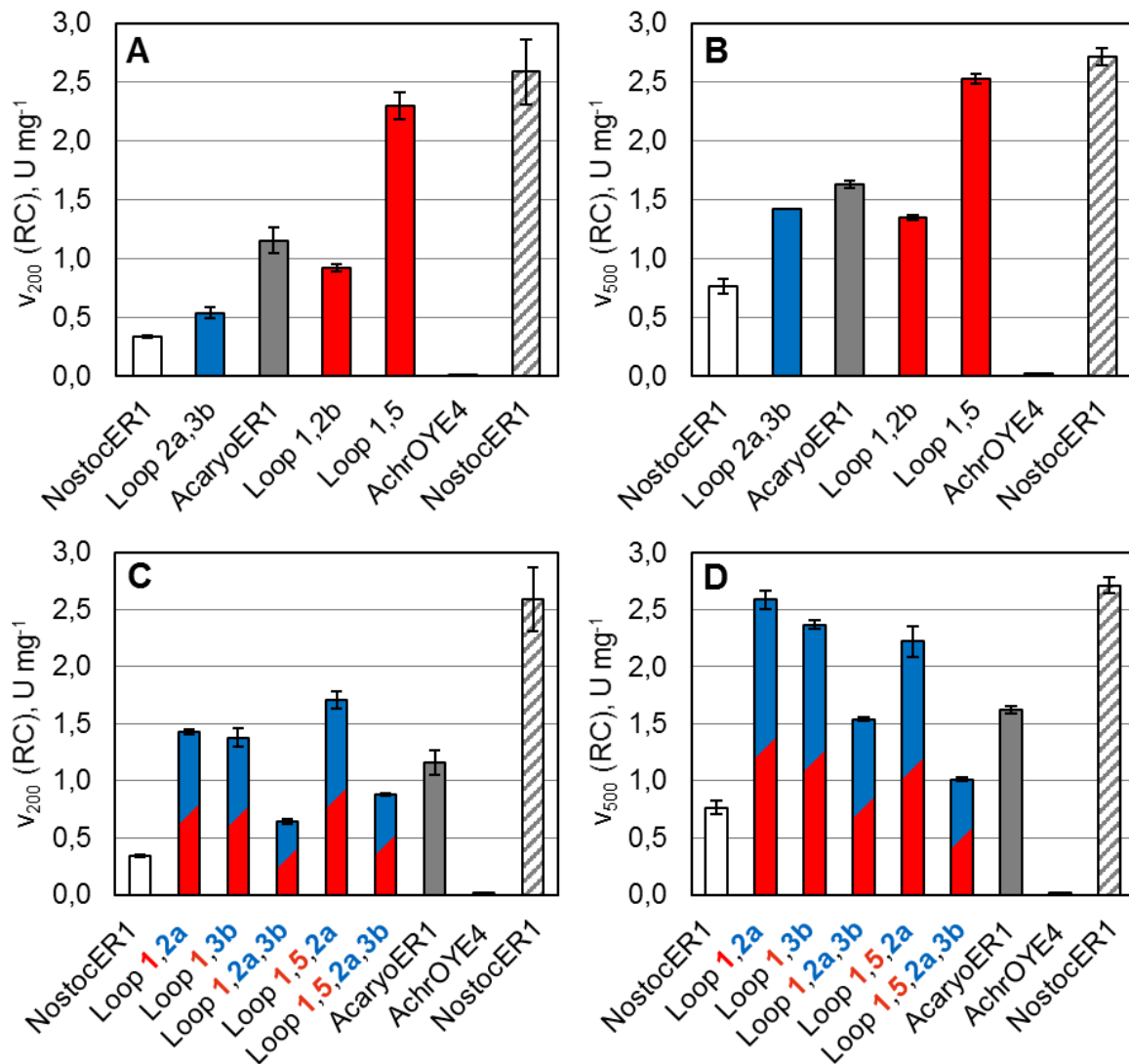
Die donorübergreifenden Kombinationen der *Loop*-Regionen führten zu keiner weiteren Steigerung der NADPH-Aktivität. Die Aktivität der zwei Hybride mit der größten katalytischen Effizienz mit NADH, das heißt die Kombination des AcaryoER1-*Loops* 2a mit dem AchrOYE4-*Loop* 1 (*Loop* 1,2a) beziehungsweise 1 und 5 (*Loop* 1,5,2a), befand sich sowohl bei  $200 \mu\text{M}$  NADPH (Abbildung 6.13, **C**) als auch bei  $500 \mu\text{M}$  NADPH (Abbildung 6.13, **D**) im Rahmen der Aktivitäten der wildtypischen NostocER1 und AcaryoER1. Besonders auffällig sind zum wiederholten Male die Hybride, welche den AchrOYE4-*Loop* 5 enthielten. Wie auch schon bei den singulären *Loop*-Austauschen besitzen all diese Hybride eine stark gesenkte NADPH-Aktivität.



**Abbildung 6.13:** Spezifische Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NADPH ( $v_{200}$ , **A / C**) und 500  $\mu\text{M}$  NADPH ( $v_{500}$ , **B / D**) der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen *Loop*-Regionen der AcaryoER1 (blau), des AchrOYE4 (rot) oder von beiden Spendern (blau-rot). Die dargestellten Aktivitäten bilden das Mittel aus mindestens zwei biologischen Replikaten. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

### 6.2.4 Aktivität mit (*R*)-Carvon

Neben den Auswirkungen der multiplen *Loop*-Veränderungen auf die Reaktivität mit den beiden Cosubstraten, wurde zusätzlich die Änderung der Reduktionsrate von (*R*)-Carvon (RC) ermittelt. Diese Daten werden für 200  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{200}$  (RC)) und 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$  (RC)) in Abbildung 6.14 dargestellt und werden in Tabelle 12.40 aufgelistet.

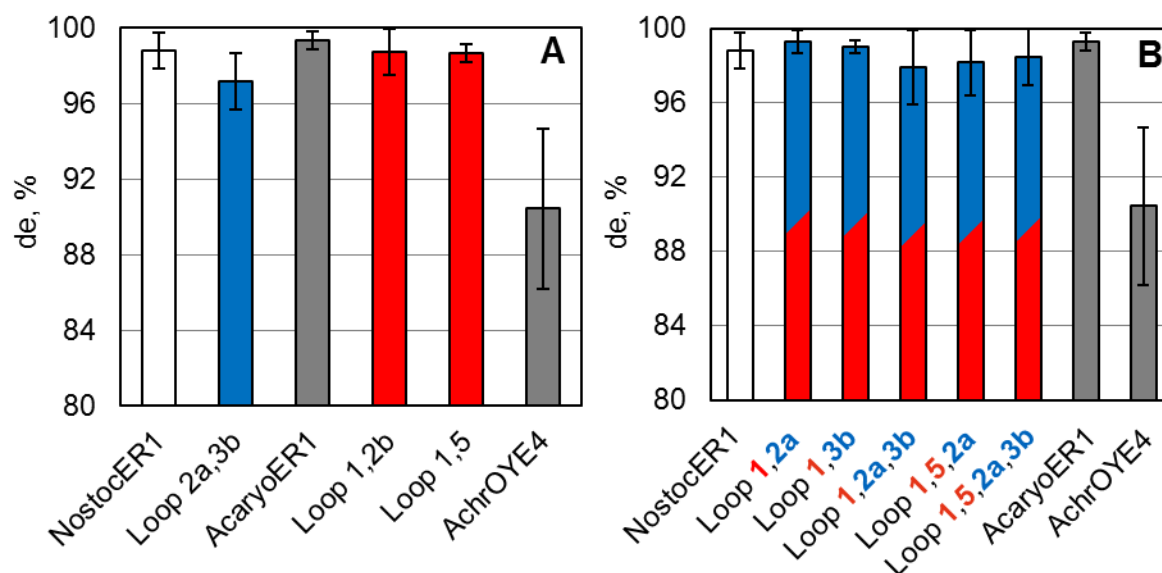


**Abbildung 6.14:** Spezifische Aktivitäten mit 10 mM (*R*-Carvon (RC) als Substrat und 200  $\mu$ M NADH ( $v_{200}$ , **A / C**) beziehungsweise 500  $\mu$ M NADH ( $v_{500}$ , **B / D**) als Cosubstrat der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen *Loop*-Regionen der AcaryoER1 (blau), des AchrOYE4 (rot) oder von beiden Spendern (blau-rot). Zusätzlich wird die spezifische Aktivität der NostocER1 mit dem bevorzugten Cosubstrat NADPH dargestellt (grau gestreift). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C

Alle Enzyme mit multiplen *Loop*-Austauschen zeigten eine im Vergleich zum Ausgangsenzym erhöhte Reduktionsrate für (*R*-Carvon, sowohl bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu$ M NADH als auch bei 500  $\mu$ M NADH. Im Rahmen der donorspezifischen *Loop*-Austausche konnte die größte Aktivitätssteigerung durch die bereits häufig besprochene Insertion der *Loop*-Regionen 1 und 5 des AchrOYE4 erzielt werden. Hierdurch war es möglich  $v_{200}$  um einen Faktor von  $6,76 \pm 0,38$  auf

$2,30 \pm 0,11 \text{ U mg}^{-1}$  zu erhöhen. Des Weiteren konnte kein signifikanter Aktivitätsunterschied zur wildtypischen NostocER1 mit ihrem bevorzugten Cosubstrat NADPH festgestellt werden (Abbildung 6.14, **A**). Des Weiteren deutet der geringe Aktivitätsunterschied zwischen  $v_{200}$  und  $v_{500}$  dieses Hybriden auf einen deutlich gesenkten  $K_m$  (Abbildung 6.14, **B**), welcher ebenfalls vergleichbar zur NostocER1 unter der Verwendung von NADPH ist.

Die ermittelten  $v_{200}$  der donorübergreifenden *Loop*-Kombinationen ergab für drei der fünf charakterisierten Hybride eine zum Donor AcaryoER1 gesteigerte Aktivität. Dies war für die *Loop* 1,2a-, die *Loop* 1,3b- und die *Loop* 1,5,2a-Kombination beobachtbar (Abbildung 6.14, **C**). Die ermittelten  $v_{500}$  ergaben eine weitere deutliche Aktivitätssteigerung dieser drei Hybride, sodass entweder kein signifikanter Unterschied (*Loop* 1,2a) oder eine nur leicht gesenkte Aktivität zum entsprechenden Wert der NostocER1 mit dem bevorzugten phosphorylierten Cosubstrat beobachtet werden konnte (Abbildung 6.14, **D**).



**Abbildung 6.15:** Diastereomerenüberschuss (de) der NostocER1 (weiß), der Donoren AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau) und den NostocER1-Hybriden mit multiplen *Loop*-Regionen der AcaryoER1 (blau) und des AchrOYE4 (rot, **A**) oder von beiden Spendern (blau-rot, **B**) nach der Reduktion von (*R*)-Carvon.

Wie schon bei den singulären *Loop*-Austauschen, war auch im Rahmen der multiplen *Loop*-Veränderung der NostocER1 keine Senkung der Stereoselektivität der Enzymvarianten beobachtbar. So erzeugte keine der modifizierten Enreduktasen bei der Reduktion von (*R*)-Carvon eine signifikant erhöhte (2*S*,5*R*)-Dihydrocarvonmenge. Dies war sowohl für die donorspezifischen *Loop*-Austausche (Abbildung 6.15, **A**), als auch für die donorübergreifenden *Loop*-Austausche (Abbildung 6.15, **B**) der Fall. Des Weiteren

wurde, analog zu den singulären *Loop*-Austauschen, die signifikant schlechtere Stereospezifität des AchrOYE4-Spenders auf keines der Hybride mit AchrOYE4-*Loops* übertragen.

### 6.2.5 Diskussion

Durch die Kombination der singulären *Loop*-Austausche konnte das NADH-Bindevhalten der NostocER1 weitergehend gestaltet werden. Es war möglich, eine zusätzliche Steigerung der Affinität zu NADH und der Aktivität mit NADH im Vergleich zu den singulären *Loop*-Hybriden zu generieren. Durch die donorspezifische Kombination von je zwei *Loop*-Regionen konnten darüber hinaus die enzymkinetischen Parameter des entsprechenden Donors auf das Ausgangsenzym NostocER1 übertragen werden. Einerseits wurde dies durch den Transfer der AcaryoER1-*Loops* 2a und 3b und andererseits durch den Übertrag der AchrOYE4-*Loops* 1 und 5 erzielt. Des Weiteren konnten diese vier *Loop*-Regionen als Auswahl an Spender-*Loops* identifiziert werden, welche eine hervorragende Kompatibilität miteinander aufwiesen. Alle bereitgestellten Kombinationen dieser vier *Loops* führte zu NostocER1-Varianten, welche die gewünschte Erhöhung der NADH-Aktivität besaßen. Diese Ergebnisse spiegeln erneut das hohe Potential dieser Strategie des *Enzyme Engineering* wider, um das Cosubstrat-Bindevhalten von Enreduktasen zu gestalten.

Um den Erfolg der Veränderung der NostocER1 darzustellen, wurden die enzymkinetischen Parameter sowie die relative katalytische Effizienz (RKE) zum von der NostocER1 bevorzugten Cosubstrat NADPH in Tabelle 6.1 aufgelistet. Hier werden die wildtypischen Enzyme, der herausragende singuläre AchrOYE4-*Loop* 1-Austausch sowie die drei multiplen *Loop*-Austausche mit der höchsten katalytischen Effizienz mit NADH verglichen. Durch den signifikant zur NostocER1 gesenkten  $K_m$  und die erhöhte maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit NADH besaß der singuläre *Loop* 1-Austausch bereits eine um den Faktor  $6,62 \pm 1,70$  gesteigerte katalytische Effizienz. Vergleicht man seine enzymkinetischen Parameter jedoch zu denjenigen der NostocER1 mit NADPH als Cosubstrat ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Sowohl der  $K_m$  befindet sich mit  $80,2 \pm 18,6 \mu\text{M}$  deutlich unter dem  $K_m$  des *Loop* 1-Austauschs, als auch  $v_{\text{max}}$  mit  $37,70 \pm 1,33 \text{ U mg}^{-1}$ . Daraus ergibt sich eine RKE von  $0,287 \pm 0,071$ . Durch die multiplen *Loop*-Austausche konnte  $k_{\text{eff}}$  weiter deutlich gesteigert werden, um einen Faktor zwischen  $9,12 \pm 2,28$  und  $8,31 \pm 2,12$  zur NostocER1 mit NADH. Zusätzlich hierzu konnten vergleichbare Parameter zur NostocER1 mit NADPH bestimmt werden. So war der  $K_m$  des *Loop* 1,5-Austauschs mit  $72,6 \pm 13,2 \mu\text{M}$  nicht signifikant unterschiedlich zu demjenigen der NostocER1. Bemerkenswerterweise übertraf der *Loop* 1,2a-Austausch mit einem  $v_{\text{max}}$



von  $41,16 \pm 0,64 \text{ U mg}^{-1}$  sogar die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der NostocER1 mit NADPH. Da diese herausragend verbesserten enzymkinetischen Parameter jedoch nicht in einem Hybridenzym vereint werden konnten, resultierten diese multiplen *Loop*-Austausche in einer relativen katalytischen Effizienz zwischen  $0,356 \pm 0,087$  und  $0,391 \pm 0,113$ . Nichtsdestotrotz war kein signifikanter Unterschied zur RKE des AchrOYE4-Donors mit  $0,473 \pm 0,180$  festzustellen.

**Tabelle 6.1:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ), maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ), die daraus resultierende katalytische Effizienz ( $k_{eff}$ ) und die zur wildtypischen NostocER1  $k_{eff}$  mit NADPH relative katalytische Effizienz (RKE) aller wildtypischen Enzyme sowie der ‚besten‘ NostocER1-Hybridenzyme.

Enzym	$K_m, \mu\text{M}$	$v_{max}, \text{U mg}^{-1}$	$k_{eff}, \text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$	RKE, -
NostocER1	$1052,8 \pm 222,2$	$21,48 \pm 2,65$	$14,2 \pm 3,5$	$0,043 \pm 0,015$
AcaryoER1	$351,4 \pm 46,2$	$27,86 \pm 3,19$	$55,5 \pm 9,7$	$0,169 \pm 0,049$
AchrOYE4	$57,1 \pm 17,0$	$12,69 \pm 0,26$	$155,4 \pm 46,4$	$0,473 \pm 0,180$
Loop <b>1</b>	$190,2 \pm 14,4$	$26,05 \pm 0,28$	$95,5 \pm 7,3$	$0,287 \pm 0,071$
Loop <b>1,5</b>	$72,6 \pm 13,2$	$12,25 \pm 1,35$	$119,0 \pm 25,3$	$0,358 \pm 0,113$
Loop <b>1,2a</b>	$223,9 \pm 11,0$	$41,16 \pm 0,64$	$130,0 \pm 6,7$	$0,391 \pm 0,094$
Loop <b>1,5,2a</b>	$160,7 \pm 11,4$	$26,98 \pm 0,50$	$118,4 \pm 8,7$	$0,356 \pm 0,087$
NostocER1 <sup>a</sup>	$80,2 \pm 18,6$	$37,70 \pm 1,33$	$328,3 \pm 76,9$	$1,000 \pm 0,331$

<sup>a</sup> ermittelte Werte mit NADPH als Cosubstrat

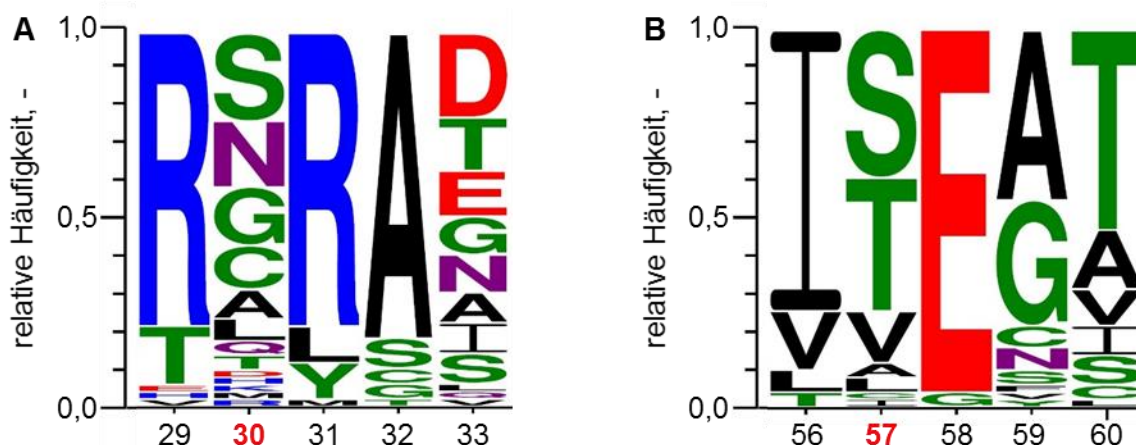
Bisher wurden 51 Oxidoreduktasen in der Literatur beschrieben, bei denen das Cosubstrat-Bindevverhalten hin zu NADH gestaltet wurde (Chánique & Parra 2018). Lediglich elf dieser 51 modifizierten Enzyme besitzen eine höhere relative katalytische Effizienz als die modifizierten NostocER1-Varianten dieser Arbeit. Darüber hinaus besitzen neun dieser elf Oxidoreduktasen eine Rossmann-ähnliche Faltung. Da die Bindung der Cosubstrate bei diesem Faltungstyp bereits gut verstanden wurde, ist die Gestaltung des Cosubstrat-Bindevhaltens meist weniger herausfordernd (Hanukoglu 2015). Im Gegensatz dazu wurde bisher nur ein Beispiel einer erfolgreichen Änderung des NADH-Bindevhaltens der Unterklasse EC 1.6 beschrieben. Die Änderung einer Nitratreduktase dieser Enzymklasse resultierte in einer relativen katalytischen Effizienz

von 0,003 (Shiraishi et al. 1998), also um einen Faktor von 100 geringer als bei der NostocER1. Überdies tendieren Gestaltungen des Cosubstrat-Bindevhaltens von Oxidoreduktasen, die eine prostetische Gruppe wie FMN besitzen, dazu, anspruchsvoller zu sein als diejenigen bei Enzymen ohne zusätzlichen Cofaktor (Chánique & Parra 2018). Somit konnte durch den Austausch von *Loop*-Regionen die Cofaktorabhängigkeit der NostocER1 mit einem für diese Enzymklasse bisher einzigartigen Erfolg verändert werden.

### 6.3 Weitergehende Untersuchung ausgewählter Aminosäurepositionen

Im Rahmen der Gestaltung des Cosubstrat-Bindevhaltens der NostocER1 wurden beachtliche Erfolge durch die Einbringung zweier Punktmutationen erzielt. Dies war einerseits durch eine Q30S Mutation in *Loop* 1 und andererseits durch eine A57T Mutation in *Loop* 2a möglich. Diese Positionen sollten im Folgenden tiefergehend beleuchtet werden, um zu untersuchen, ob die Einbringung anderer Aminosäuren an diesen Positionen zu einer weiteren Verbesserung des NADH-Bindevhaltens führt.

Um eine Auswahl zu treffen, welche zusätzlichen Punktmutationen in diesen beiden *Loops* durchgeführt werden sollen, wurden diese zwei NostocER1-*Loops* mit den entsprechenden Regionen der 50 ähnlichsten Proteinsequenzen<sup>15</sup> verglichen. Eine grafische Darstellung dieses Vergleichs findet sich in Abbildung 6.16 wieder.



**Abbildung 6.16:** Darstellung der relativen Häufigkeit des Auftretens einer Aminosäure in den *Loop*-Regionen 1 (**A**) und 2a (**B**) der 50 zur NostocER1 ähnlichsten<sup>15</sup> Proteine. Die durch die *Loop*-Austausche veränderten Aminosäurepositionen 30 und 57 sind in rot markiert.

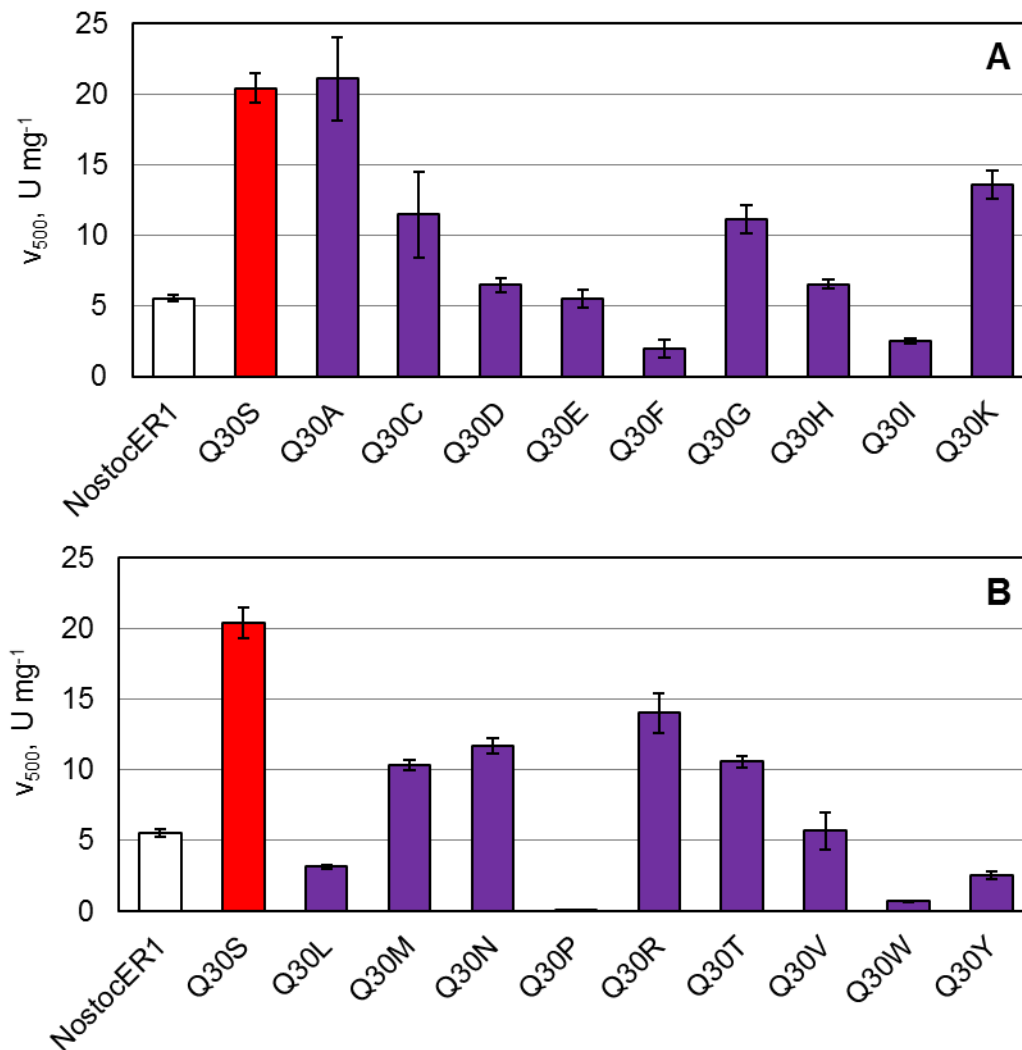
<sup>15</sup> Entsprechend ihres *expect value* basierend auf einem mittels des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) durchgeführten Sequenzvergleich.

Durch diesen Vergleich konnte gezeigt werden, dass die Variabilität der Aminosäurezusammensetzung in *Loop*-Region 1 lediglich an den Positionen 30, mit 13 verschiedenen Aminosäuren, und Position 33, mit 10 unterschiedlichen Aminosäuren, sehr hoch ist (Abbildung 6.16, **A**). Interessanterweise trat an Position 30 das bereits mutierte Serin mit einer relativen Häufigkeit von 0,24 am meisten auf. Danach waren die Aminosäuren N (0,18), G (0,16), C (0,12) und A (0,08) zumeist vertreten. Das sich im wildtypischen *Loop* 1 der NostocER1 befindende Q war mit 0,02 hingegen nur in einem der 50 Vergleichsenzyme vorhanden. Gleiches gilt für die Aminosäuren T, D, H, K, M und R, welche ebenfalls einmal auftraten. Da durch den Vergleich von lediglich 50 Primärstrukturen bereits 13 unterschiedliche Aminosäuren an Position 30 identifiziert werden konnten und diese Stelle somit eine sehr hohe Variabilität aufweist, sollten alle 20 proteinogenen Aminosäuren an diese Position mutiert werden.

Ein anderes Bild zeigte sich für *Loop* 2a. Hier war die im Fokus liegende Position 57 nicht diejenige mit der höchsten Variabilität (Abbildung 6.16, **B**). Die Aminosäuren Serin und Threonin umfassten mit einer relativen Häufigkeit von 0,76 bereits den Großteil der auftretenden Reste. Interessanterweise war auch in *Loop* 2a die Aminosäure (Alanin) der wildtypischen NostocER1 mit einer relativen Häufigkeit von 0,02 innerhalb des durchgeführten Vergleichs nur sehr selten vertreten. Aufgrund der relativ geringen Variabilität an dieser Position sollten neben der bereits durchgeführten A57T-Mutation ausschließlich die weiteren auftretenden Aminosäuren S, V, C, L und F untersucht werden.

### 6.3.1 Glutamin an Position 30 (Q30)

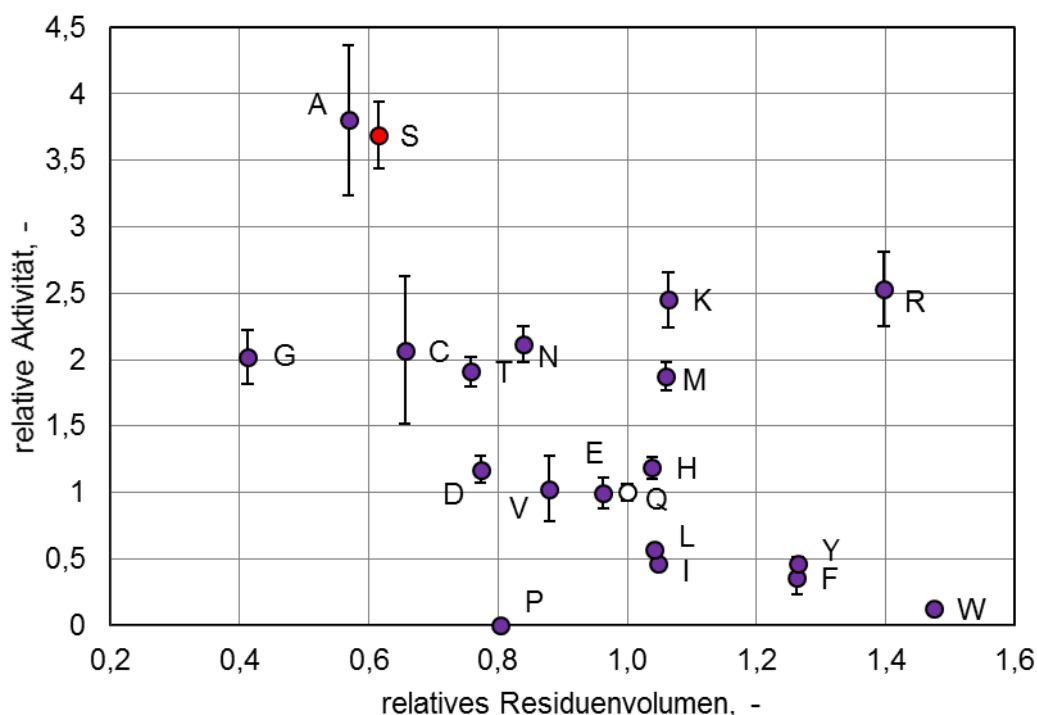
Zunächst wurde die spezifische Aktivität mit 500  $\mu$ M NADH als Cosubstrat ( $v_{500}$ ) aller 18 bereitgestellten Punktmutanten aufgenommen. Diese wurden anschließend sowohl mit dem NostocER1-Wildtyp als auch mit der Q30S-Punktmutante, die dem vorab vorgestellten Hybriden aus NostocER1 und AchrOYE4-*Loop* 1 entspricht, verglichen (Abbildung 6.17 und Tabelle 12.41). Mittels der durchgeführten Sättigungsmutagenese konnten zehn Mutanten identifiziert werden, die eine signifikant höhere spezifische Aktivität als die wildtypische NostocER1 aufweisen. Diese waren die sterisch anspruchsloseren Aminosäuren A, C, G und T, die basischen Aminosäuren H, K und R, das zum Q chemisch verwandte N, sowie D und M. Nichtsdestotrotz befanden sich alle  $v_{500}$  mit Ausnahme der Q30A-Mutante unter dem entsprechenden Wert der Q30S-Mutante. Die Q30A-Mutante besitzt mit  $21,08 \pm 2,98$  U  $\text{mg}^{-1}$  eine zur Q30S-Mutante nicht signifikant unterschiedliche Aktivität.



**Abbildung 6.17:** Spezifische Aktivität bei 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ ) des NostocER1-Wildtyps (Q30, weiß), der bereits dargestellten Q30S-Mutation (rot), sowie der 18 verbleibenden möglichen proteinogenen Aminosäuremutationen A bis K (violett, **A**) und L bis Y (violett, **B**). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Die Insertion aller proteinogenen Aminosäuren an Position 30 der NostocER1 ergab ein sehr diverses Bild der spezifischen Aktivitäten. Für die Gruppe der basischen Aminosäuren war ein durchweg positiver, für die aromatischen Aminosäuren ein negativer Effekt zu beobachten. Abseits dieser zwei Gruppen konnte kein einheitliches Bild in Bezug auf die funktionelle Gruppe der Aminosäuren beobachtet werden. Hingegen deutet die vergleichbare Aktivitätssteigerung der Q30S und Q30A-Mutante auf einen Einfluss des sterischen Anspruchs der Aminosäure. Die Größe dieser zwei Seitenketten, sowie die Flexibilität von Serin und Alanin sind vergleichbar. Dadurch verbleibt als einziger fundamentaler Unterschied der zwei Aminosäuren die Hydroxy-Gruppe des Serins, welche durch den nicht signifikanten Aktivitätsunterschied vermutlich keinen großen

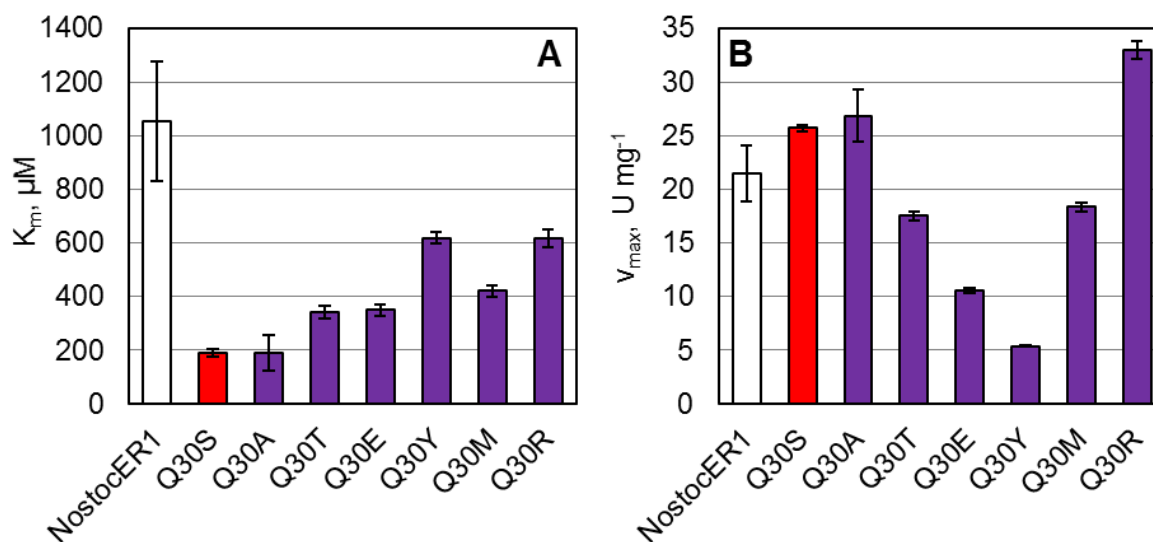
Einfluss hat. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Aktivität der Mutante und sterischen Anspruch der Aminosäureseitenkette (Richards 1977) zu erhalten wurden diese zwei Größen in Abbildung 6.18 gegeneinander dargestellt.



**Abbildung 6.18:** Zur NostocER1 (Q, weiß) relative Aktivität der Q30S-Mutante (rot) und aller weiteren Q30-Punktmutanten (violett) über das zum Q relative Van der Waals-Radius der Aminosäureseitenkette (relatives Residuumvolumen) (Richards 1977).

Hierdurch war zu erkennen, dass eine prinzipielle Korrelation dieser beiden Größen besteht. Lediglich die basischen Aminosäuren (H, K und R) und M besitzen ein größeres Van der Waals (VdW)-Radius als Q und weisen trotzdem eine zur NostocER1 signifikant erhöhte Aktivität auf. Die Q30G-Mutante fügt sich grundsätzlich in diese Korrelation ein, ihre relative Aktivität ist jedoch deutlich geringer als diejenige der Q30S- und Q30A-Mutanten. Die außergewöhnliche Flexibilität dieser Aminosäure könnte ein Grund für die verringerte Aktivität sein (Krieger et al. 2005). Ähnliches gilt für das einzige ‚Negativbeispiel‘, der Q30P-Mutation. Diese Aminosäure nimmt weniger Platz als Q ein und trotzdem war keine Steigerung der Aktivität zu beobachten. Da die NostocER1 durch die Insertion dieser Aminosäure quasi inaktiviert wurde, kann dieses Ergebnis vermutlich auf das hohe Maß an Inflexibilität durch das eingebrachte P in einer generell eher flexiblen *Loop*-Region erklärt werden. Nichtsdestotrotz folgen 14 der 19 Punktmutationen dieser generellen Korrelation.

Um weitergehende Informationen zu gewinnen wurden die enzymkinetischen Parameter der Mutanten Q30A, T, E und Y erhoben, deren Aktivitäten sich entsprechend des räumlichen Anspruchs der inserierten Aminosäure verändern. Zusätzlich wurden die Daten zu zwei ‚Ausreißern‘ der Q30M- beziehungsweise Q30R-Mutante erhoben (Abbildung 6.19 und Tabelle 12.42).



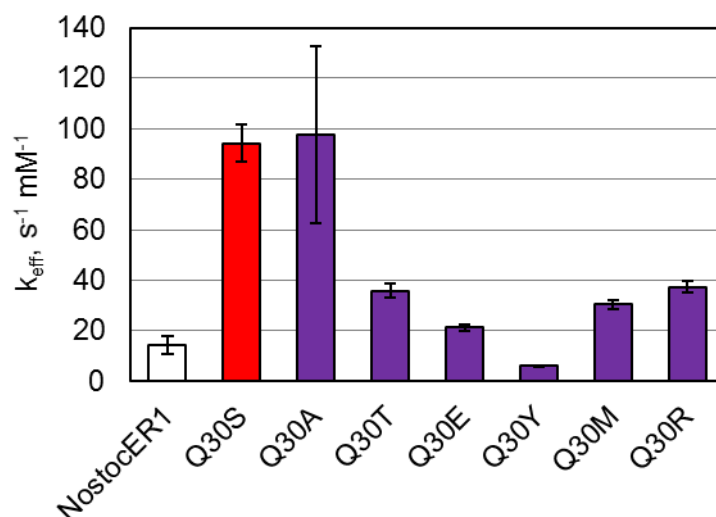
**Abbildung 6.19:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ , **A**) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ , **B**) der NostocER1 (Q30, weiß), der Q30S-Mutante (rot), sowie der Punktmutationen Q30A, T, E, Y, M und R. Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Die Michaelis-Konstanten der Punktmutanten nehmen tendenziell mit dem Volumen der Aminosäureseitenkette zu. Dies bedeutet, dass die Q30A-Mutante erneut keinen signifikanten Unterschied zur Q30S-Mutante aufweist und mit  $191,7 \pm 66,9 \mu\text{M}$  den geringsten  $K_m$  aller weiteren Punktmutanten besitzt (Abbildung 6.19, **A**). Interessanterweise nehmen die zwei ‚Ausreißer‘ Q30M und Q30R im Kontext der Affinität zu NADH keine Sonderstellung ein. So sind der VdW-Radius der Seitenkette mit  $170,8 \text{ \AA}^3$  und der  $K_m$  mit  $420,8 \pm 22,8 \mu\text{M}$  der Aminosäure M leicht höher als die entsprechenden Werte von E mit einem Radius von  $155,1 \text{ \AA}^3$  und einem  $K_m$  mit  $349,7 \pm 20,4 \mu\text{M}$ . Ähnliches gilt für den Vergleich von Y und R die sich in Bezug auf ihren VdW-Radius kaum unterscheiden und keinen signifikant unterschiedlichen  $K_m$  aufweisen.

Deutliche Unterschiede gibt es hingegen bei den maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Q30A-Mutante mit  $26,84 \pm 2,39 \text{ U mg}^{-1}$  unterscheidet sich nicht signifikant zur entsprechenden Geschwindigkeit der Q30S-Punktmutation mit  $25,72 \pm 0,28 \text{ U mg}^{-1}$ . Des Weiteren ist ein stetiger Abfall der maximalen

Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmenden Volumen der Residuen, hin zu einem minimalen Wert von  $5,40 \pm 0,10 \text{ U mg}^{-1}$  der Q30Y-Mutante, zu beobachten (Abbildung 6.19, **B**). In diesem Fall ist die Abweichung der Q30M- und Q30R-Mutation offensichtlich zu erkennen. Die Q30M-Mutante weist mit  $18,34 \pm 0,40 \text{ U mg}^{-1}$  eine ähnliche maximale Reaktionsgeschwindigkeit wie die Q30T-Mutante ( $17,53 \pm 0,43 \text{ U mg}^{-1}$ ) auf, während die Q30R-Mutation mit  $32,98 \pm 0,86 \text{ U mg}^{-1}$  zur höchsten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit aller charakterisierten Q30-Punktmutanten führte.

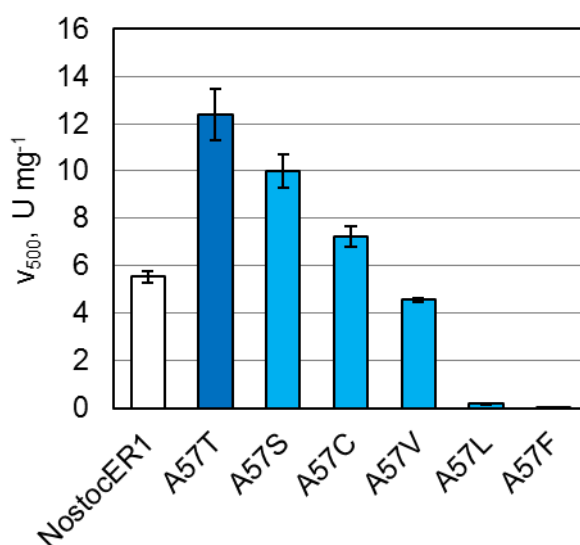
Betrachtet man zusammenfassend die katalytischen Effizienzen der ausgewählten Q30-Punktmutanten ergibt sich ein zur ‚These des sterischen Anspruchs‘ konsistentes Bild, wenn man die Reihe A/S – T – E – Y betrachtet (Abbildung 6.20). Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass nicht nur die katalytische Effizienz der Q30E-Mutante mit derjenigen der wildtypischen NostocER1 vergleichbar ist, sondern sich auch die VdW-Radien von E ( $155,1 \text{ \AA}^3$ ) und Q ( $161,1 \text{ \AA}^3$ ) kaum unterscheiden. Auch in Bezug auf die katalytische Effizienz weichen die zwei ‚Ausreißer‘ Q30M und Q30R deutlich vom allgemeinen Trend ab und finden sich in einem Bereich zwischen der T und E-Insertion wieder.



**Abbildung 6.20:** Katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1 (Q30, weiß), der Q30S-Mutation (rot), sowie der Punktmutationen Q30A, T, E, Y, M und R.

### 6.3.2 Alanin an Position 57 (A57)

Der zweite Fokus lag auf der *Loop 2a*-Region der NostocER1. Hier konnte vorab gezeigt werden, dass eine Mutation der Position 57 von einem A zu einem T die spezifische Aktivität des Enzyms mit NADH signifikant erhöht. Durch einen Sequenzvergleich mit 50 zur NostocER1 ähnlichen Proteinen konnten die Aminosäuren S, V, C, L und F identifiziert werden, die neben A und T an dieser Position 57 auftreten. Daher wurden diese fünf Punktmutanten bereitgestellt und initial hinsichtlich ihrer  $v_{500}$ -Aktivität untersucht (Abbildung 6.21 und Tabelle 12.43).

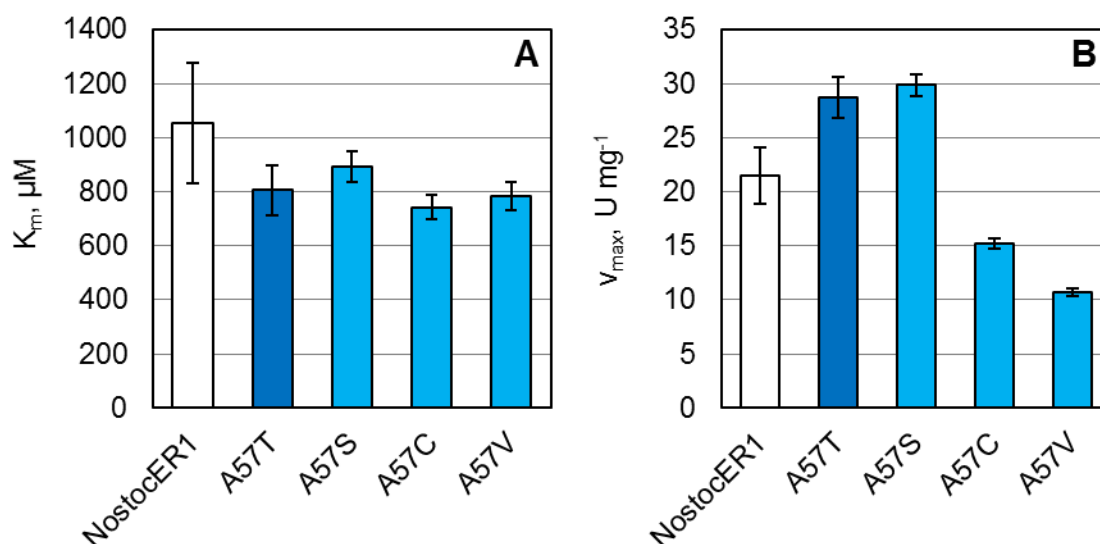


**Abbildung 6.21:** Spezifische Aktivität bei 500  $\mu$ M NADH ( $v_{500}$ ) des NostocER1-Wildtyps (A57, weiß), der bereits dargestellten A57T-Mutation (blau), sowie der A57S, C, V, L und F Mutationen (hellblau). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Die zwei A57S- und A57C-Punktmutanten zeigten in diesem Zusammenhang einen erhöhten  $v_{500}$  verglichen zur wildtypischen NostocER1. Jedoch waren beide Mutanten mit  $v_{500}$  von  $9,99 \pm 0,69$  U mg<sup>-1</sup> beziehungsweise  $7,23 \pm 0,41$  U mg<sup>-1</sup> signifikant weniger aktiv als die bereits bekannte A57T-Mutation. Der Austausch zu einem V in dieser Proteinregion führte zu einer leicht zur NostocER1 gesenkten spezifischen Aktivität von  $4,56 \pm 0,09$  U mg<sup>-1</sup>, der Austausch mit den sehr selten an dieser Position auftretenden Aminosäuren L und F zu einer Inaktivierung des Enzyms.

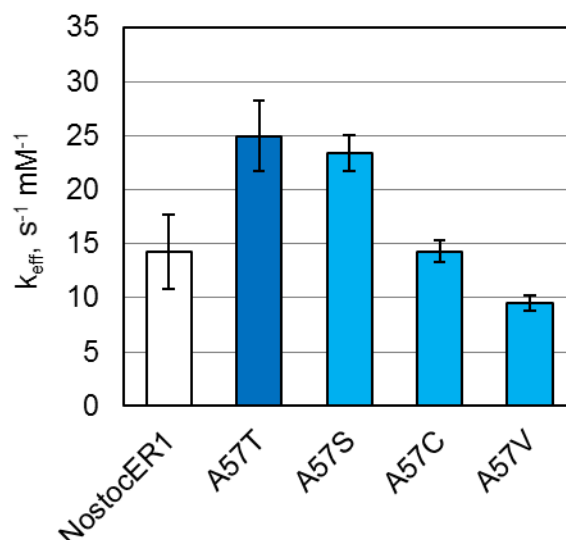
Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die enzymkinetischen Parameter der drei Punktmutanten A57S, C und V ermittelt und mit den entsprechenden Parametern der NostocER1 beziehungsweise A57T-Mutante verglichen (Abbildung 6.22).





**Abbildung 6.22:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ , **A**) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ , **B**) der NostocER1 (A57, weiß), der A57T-Mutante (blau), sowie der A57S, C und V Punktmutationen (hellblau). Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Position 57 keinen Einfluss auf die Affinität zu NADH der NostocER1 hat. Alle drei durchgeführten Punktmutationen besitzen ein  $K_m$  zwischen  $742,7 \pm 45,0 \mu\text{M}$  und  $893,5 \pm 55,7 \mu\text{M}$  und somit keinen signifikanten Unterschied zur A57T-Mutation beziehungsweise, mit Ausnahme der A57C-Mutation, zum NostocER1-Wildtyp (Abbildung 6.22, **A**). Weitaus größere Unterschiede konnten hingegen bei den maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten identifiziert werden. Hier zeigte die Mutation A57S mit  $29,86 \pm 1,01 \text{ U mg}^{-1}$  eine zur NostocER1 signifikant erhöhte und zur A57T-Mutante unveränderte Geschwindigkeit. Deutlich geringer waren die Geschwindigkeiten der A57C-Mutation mit  $15,19 \pm 0,47 \text{ U mg}^{-1}$  und der A57V-Mutation mit  $10,74 \pm 0,37 \text{ U mg}^{-1}$  (Abbildung 6.22, **B**). Aufgrund des ähnlichen  $K_m$  ist eine vergleichbare Abstufung in der katalytischen Effizienz wiederzufinden (Abbildung 6.23).

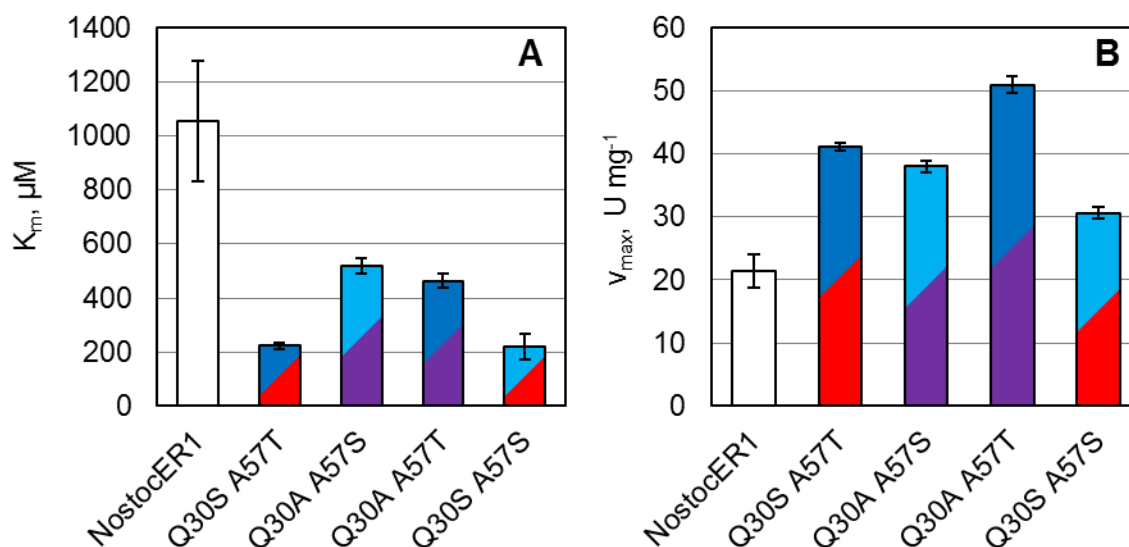


**Abbildung 6.23:** Katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1 (A57, weiß), der A57T-Mutation (blau), sowie der Punktmutationen A57S, C und V (hellblau).

### 6.3.3 Doppelmutationen

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden kombinierte Mutationen in den *Loops* 1 und 2a durchgeführt. Im Rahmen der multiplen *Loop*-Austausche (Kapitel 6.2) konnte das hohe Potential einer gemeinsamen Veränderung der Positionen 30 (*Loop* 1) und 57 (*Loop* 2a) gezeigt werden. Durch die Einbringung einer Q30S-Mutation in Kombination mit einer A57T-Mutation wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit NADH auf den im Kontext der *Loop*-Austausche höchsten gemessenen Wert von  $41,16 \pm 0,64 \text{ U mg}^{-1}$  gesteigert. Da die Q30A-Mutation das NADH-Bindevverhalten der NostocER1 vergleichbar zur Q30S-Mutation änderte und entsprechendes für die A57S-Mutation im Vergleich zur A57T-Mutation beobachtet werden konnte, wurden diese vier Modifikationen miteinander kombiniert. Die ermittelten enzymkinetischen Parameter dieser NostocER1-Varianten werden in Abbildung 6.24 dargestellt und in Tabelle 12.44 aufgelistet.

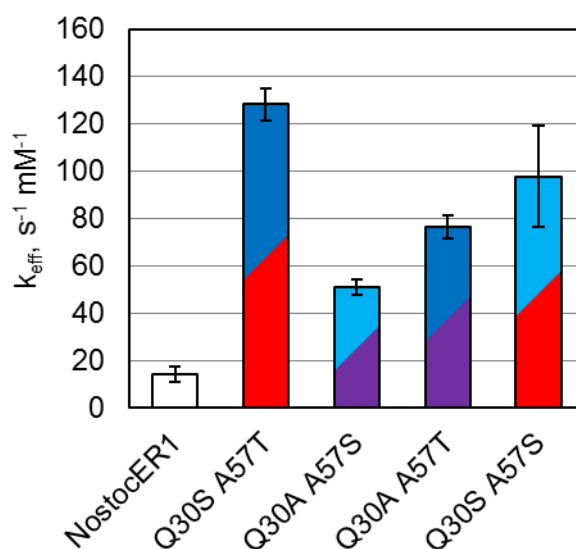
Alle bereitgestellten Doppelmutanten besitzen einen signifikant zur NostocER1 gesenkten  $K_m$  (Abbildung 6.24, **A**). Jedoch war nur derjenige der Q30S A57S-Mutation mit  $218,8 \pm 47,5 \mu\text{M}$  in einem zur Q30S A57T-Mutation vergleichbaren Bereich ( $223,9 \pm 11,0 \mu\text{M}$ ). Die Einbringung einer Q30A-Mutation im Zusammenhang mit einer Veränderung der Position 57, scheint einen negativen Einfluss auf die Affinität der ER zu NADH zu haben. Der zu den beiden Q30S-Doppelmutanten mindestens um den Faktor  $2,07 \pm 0,16$  gesteigerte  $K_m$  der beiden Q30A-Doppelmutanten deutet darauf hin.



**Abbildung 6.24:** Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ , **A**) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ , **B**) der NostocER1 (weiß), der bereits beschriebenen Q30S-A57T-Mutante (blau-rot), sowie der Doppelmutanten Q30A-A57S (hellblau-violett), Q30A-A57T (blau-violett) und Q30S-A57S (hellblau-rot). Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 - 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Ein anderes Bild ergibt sich bei den maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der NostocER1-Doppelmutanten. Wie schon zuvor zeigten alle Mutanten eine deutlich Verbesserung zur NostocER1, was sich in einer gesteigerten  $v_{\text{max}}$  um einen Faktor zwischen  $2,37 \pm 0,23$  und  $1,43 \pm 0,18$  äußert (Abbildung 6.24, **B**). Jedoch führte die Q30A-Mutation in diesem Fall zu einer zusätzlichen Verbesserung. Durch die Kombination mit der A57T-Mutation konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der NostocER1 auf  $50,94 \pm 1,31 \text{ U mg}^{-1}$  gesteigert werden. Somit übertraf diese NostocER1-Variante den bisherigen Maximalwert der Q30S A57T-Mutante.

Nichtsdestotrotz führte diese Steigerung von  $v_{\text{max}}$  zu keiner weiteren Erhöhung der katalytischen Effizienz, da alle drei bereitgestellten Doppelmutanten hinsichtlich dieser Größe hinter der vorab charakterisierten Q30S A57T-Mutante zurückblieben. Dennoch zeigten alle Enzyme eine mindestens um Faktor  $3,58 \pm 0,90$  gesteigerte katalytische Effizienz im Vergleich zur NostocER1.



**Abbildung 6.25:** Katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1 (weiß), der bereits beschriebenen Q30S-A57T-Mutante (blau-rot), sowie der Doppelmutanten Q30A-A57S (hellblau-violett), Q30A-A57T (blau-violett) und Q30S-A57S (hellblau-rot).

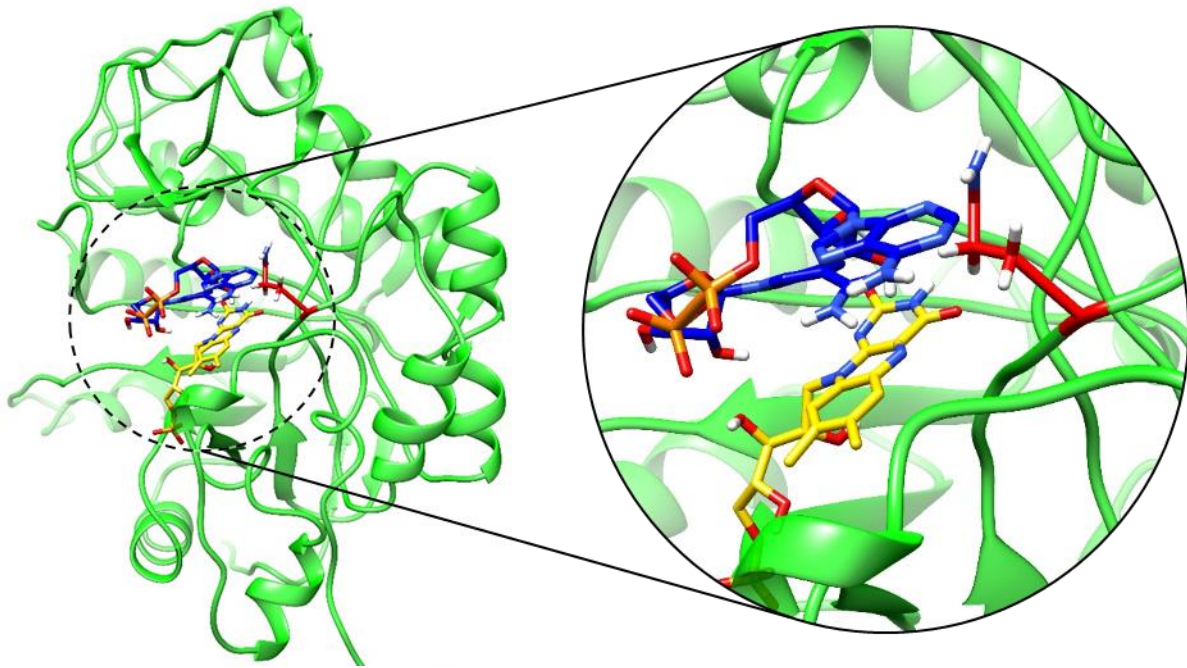
### 6.3.4 Diskussion

Durch die systematische Veränderung der NostocER1 an den Positionen Q30 und A57 konnte keine zusätzliche Verbesserung der Affinität der Enzyme zu NADH erzielt werden. So zeigte keine der bereitgestellten Punktmutanten eine geringere Michaelis-Konstante als die Punktmutanten Q30S und A57T, welche im Rahmen der *Loop*-Austausche charakterisiert wurden (vergleiche Kapitel 6.1). Obwohl die Mutanten Q30R und Q30S A57S höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeiten aufwiesen als die ursprünglichen Varianten Q30S beziehungsweise Q30S A57T, konnte ebenfalls keine weitere Steigerung der katalytischen Effizienz erzielt werden.

Nichtsdestotrotz konnten interessante Einblicke über die Auswirkung von Veränderungen dieser Positionen auf das NADH-Bindevverhalten der NostocER1 gewonnen werden. Zunächst konnte festgestellt werden, dass Aminosäuren, die häufig an diesen Positionen auftreten, förderlich für die Reaktivität mit NADH sind. So brachte die Insertion der fünf am häufigsten auftretenden Aminosäuren (S, N, G, C und A) an Position 30 eine Steigerung von  $v_{500}$  um einen minimalen Faktor von  $2,07 \pm 0,55$  im Vergleich zur wildtypischen NostocER1. Analog hierzu wurden die größten Aktivitätszuwächse an Position 57 durch die zwei mit Abstand am häufigsten an dieser Position auftretenden Aminosäuren S und T erzielt. Des Weiteren konnte die durch den Sequenzvergleich ermittelte, geringe Konservierung der Position 30 durch die hohe Erhaltung der Aktivität nach der Sättigungsmutagenese bestätigt werden. Lediglich die Q30P-Mutation führte zu einer kompletten

Inaktivierung der NostocER1, was aufgrund der mit dieser Aminosäure eingebrachten eingeschränkten Flexibilität wenig verwunderlich ist. Demgegenüber wurde ein hoher Grad an Konservierung der Position 57 festgestellt, was sich in einer geringen Retention der NADH-Aktivität äußerte. Von nur fünf durchgeführten Punktmutationen zeigten bereits zwei Mutanten eine sehr stark verminderte Aktivität. Da es sich bei diesen zwei Punktmutanten um die A57L- und A57F-NostocER1-Varianten handelte, wurde die Inaktivierung des Enzyms durch die Aminosäuren hervorgerufen, welche bei den 50 zur NostocER1 ähnlichsten Proteinen am seltensten in dieser *Loop*-Region auftreten.

Darüber hinaus zeigen elf der 19 eingebrachten Aminosäuren der Sättigungsmutagenese an Position 30 eine Steigerung der Aktivität, was für eine in Bezug auf das NADH-Bindevverhalten ungünstigen Effekt ausgehend von dem in der wildtypischen NostocER1 befindlichen Q spricht. Hier konnte der sterische Anspruch der Aminosäureseitenkette als mögliche Ursache identifiziert werden. Insbesondere die Tatsache, dass die Insertion der Aminosäuren S und A, die sich in Bezug auf ihre Größe und Flexibilität wenig, jedoch hinsichtlich der chemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten sehr unterscheiden, eine ähnliche starke Steigerung der NADH-Aktivität verursachten, führte zu dieser These. Ein weiteres Indiz hierfür ist durch die Lage von Q30 gegeben. Diese Aminosäure ragt, entsprechend des erstellten Homologiemodells der NostocER1, in das aktive Zentrum, wodurch sich die Seitenkette in räumlicher Nähe zur Adenosin-Gruppe des Cosubstrats befindet (Abbildung 6.26). Entsteht durch das Vorhandensein einer räumlich anspruchsvollen Aminosäure eine sterische Behinderung in der Cosubstrat-Bindetasche, wechselwirkt NADH weniger stark mit dem Enzym, wodurch eine geringere Aktivität mit dem Cosubstrat erklärt werden kann. Eine Wechselwirkung der elektronenakzeptierenden Aminosäuren R und K mit der elektronenspendenden Adenin-Gruppe des Cosubstrats könnte die Ursache dafür sein, dass diese basischen Aminosäuren trotz ihres sterischen Anspruchs eine hohe NADH-Aktivität aufweisen. Darüber hinaus befindet sich Q30 in räumlicher Nähe zur 2' Phosphat-Gruppe des NADPH. Durch eine Interaktion der Phosphat-Gruppe des Cosubstrats mit der Amid-Gruppe der Aminosäure kann ein positiver Effekt auf das Bindevverhalten von NADPH erklärt werden, welcher der räumlichen Behinderung entgegenwirkt. Hier könnte ein Grund der starken Präferenz der NostocER1 für NADPH liegen. Da sich Position 57 nicht in räumlicher Nähe zu NADH befindet und die Aminosäureseitenkette auch nicht in Richtung des Cosubstrats ragt, kann eine direkte Wechselwirkung zwischen dieser Enzymposition und NADH ausgeschlossen werden. So ist die durch die Veränderung dieser Aminosäure hervorgerufene Steigerung der Aktivität in nicht über ein Homologiemodell identifizierbaren Sekundäreffekten zu suchen.



**Abbildung 6.26:** Darstellung des gesamten Proteinrückrats (**links**), sowie eine Vergrößerung des aktiven Zentrums (**rechts**) des Homologiemodells der NostocER1 basierend auf der Kristallstruktur der Morphinonreduktase (PDB: 2r14). Zusätzlich werden FMN (gelb), NADH (blau) und die Aminosäure Q30 (rot) dargestellt.

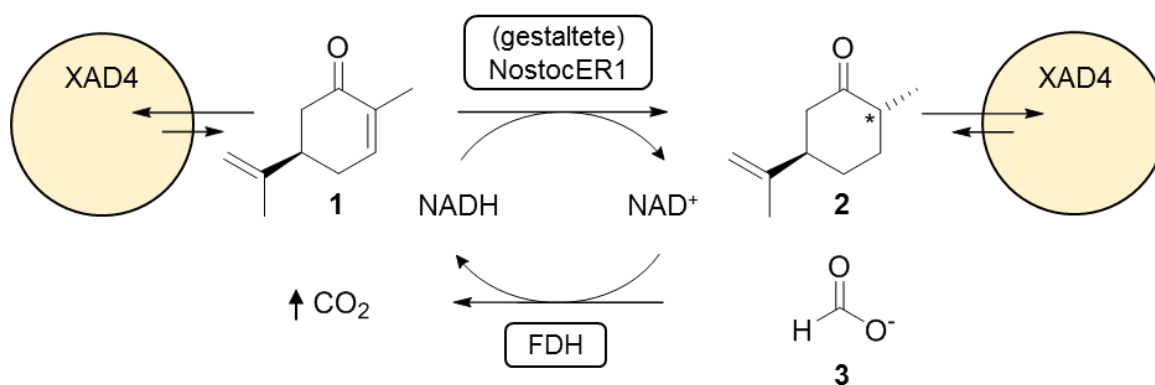
Interessanterweise wurde durch die Veränderung an Position 30 großer Einfluss auf die Affinität zu NADH genommen, was sich in einer Veränderung des  $K_m$  zwischen  $190,2 \pm 14,4 \mu\text{M}$  (Q30S) und  $619 \pm 22,6 \mu\text{M}$  (Q30R) äußerte. Demgegenüber führten die Mutationen der Position 57 zu einer äußerst geringen bis nicht signifikanten Änderung des  $K_m$ . Dies spiegelt sich ebenfalls in der Änderung der katalytischen Effizienzen wider. Änderungen der Position 30 führten zu großen Änderungen von  $k_{\text{eff}}$ , bis hin zu einer Steigerung um den Faktor  $6,85 \pm 2,98$ . Die durch eine A57-Änderung erzielte maximale Steigerung beschränkte sich hingegen auf einen Faktor von  $1,75 \pm 0,49$ . Hierdurch konnte die entscheidende Rolle der NostocER1-Position 30 für das NADH-Bindevverhalten des Enzyms unterstrichen werden.

Bedauerlicherweise konnte keine zusätzliche Erhöhung von  $k_{\text{eff}}$  durch die Kombination der Aminosäuren, welche zu den größten Steigerungen im Rahmen der punktuellen Veränderungen dieser beiden Enzymposition führten, erzielt werden. Mit einer katalytischen Effizienz von  $128,3 \pm 6,6 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  besitzt die vorab charakterisierte Q30S A57T-Mutante weiterhin die höchste katalytische Effizienz.

## 7 Biotransformation mit neu gestalteten NostocER1

Um den Nutzen der Gestaltung des NADH-Bindevorgangs der NostocER1 für präparative Anwendungen zu demonstrieren, sollten die ‚leistungsstärksten‘ Enzymvarianten im Rahmen einer Biotransformation von industrieller Relevanz angewendet werden. Hierzu wurde die bereits in Abbildung 5.5 vorgestellte Reduktion von (*R*)-Carvon zum Hauptprodukt (*2R,5R*)-Dihydrocarvon (DHC) herangezogen. Dihydrocarvon besitzt industrielle Relevanz aufgrund des Einsatzes in der Naturstoffsynthese, beispielsweise bei der Darstellung von Acetonperoxid-Derivaten zur Wirkstoffherstellung gegen Malaria (Dong et al. 2010), der Synthese von Ketodecalin-Derivaten als Mittel zur Insektenabwehr (Jansen et al. 1989, Herrera et al. 2015) oder von Terpen-Derivaten wie Thujopsen oder Decipienin (Silva et al. 2012). Die Biotransformation sollte in einem skalierbaren Prozess ablaufen und ihre Effizienz durch den Einsatz eines Cosubstratregenerierungssystems gesteigert werden. Aufgrund bereits erzielter hoher Raum-Zeit-Ausbeuten bei der präparativen Umsetzung dieser Biotransformation mit rekombinanten *E. coli*-Zellen, konnte bei dieser Arbeit auf Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten aufgebaut werden (Fu 2013, Castiglione et al. 2017).

So wurde die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* N10 zur Cosubstratregenerierung herangezogen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten wurde hierbei das wildtypische Enzym verwendet, da es eine höhere spezifische Aktivität mit NAD<sup>+</sup> aufweist. Wie die Mehrzahl der industriell relevanten Substrate ist (*R*)-Carvon aufgrund seiner Hydrophobizität nur sehr schlecht in Wasser löslich, weswegen eine zweite, hydrophobe Phase eingesetzt wurde. Diese dient als Substratreservoir und zeitgleich zur Produktextraktion. In diesem Zusammenhang hatte sich bereits das Adsorberharz XAD4 als sinnvoll erwiesen (Castiglione et al. 2017), weswegen dieses Harz eingesetzt wurde. Um eine möglichst hohe Substratverfügbarkeit zu gewährleisten, wurde es in einem Harz:Substrat-Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Ein schematischer Aufbau des Reaktionssystems wird in Abbildung 7.1 wiedergegeben.



**Abbildung 7.1:** Schematische Darstellung der NostocER1-katalysierten Reduktion von (*R*)-Carvon (1). Unter Verbrauch von NADH entsteht das Hauptprodukt (2*R*,5*R*)-Dihydrocarvon (2) und das oxidierte Cosubstrat NAD<sup>+</sup>. Dieses wird mittels der Formiatdehydrogenase (FDH)-katalysierten Oxidation von Formiat (3) reduziert und so dem Prozess wieder zugeführt. Der Großteil von 1 und 2 findet sich adsorbiert an das Harz XAD4 wieder.

Da die Aktivität der NostocER1 mit NADH gesteigert wurde, wurde zunächst untersucht, ob das in der Literatur beschriebene Reaktionssystem angepasst werden muss. So bestand die Möglichkeit, dass eine ungenügende Diffusionsgeschwindigkeit von (*R*)-Carvon durch die Zellmembran bei dem Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren zu einer Limitation führen kann. Daher wurden zunächst *E. coli*-Stämme zur Reduktion von (*R*)-Carvon transformiert und ihr Einsatz als Ganzzellbiokatalysator mit demjenigen von geklärten Lysaten verglichen (Kapitel 7.1). Nach der Bereitstellung der Biokatalysatoren unter kontrollierten Bedingungen im Rührkesselreaktor (Kapitel 7.2), wurde die technische Reproduzierbarkeit der Biotransformationen im 15 mL-Maßstab überprüft (Kapitel 7.3). Abschließend wurde die Biotransformation unter kontrollierten Reaktionsbedingungen im Rührkesselreaktor durchgeführt, um die neu gestalteten Biokatalysatoren miteinander vergleichen zu können (Kapitel 7.4).

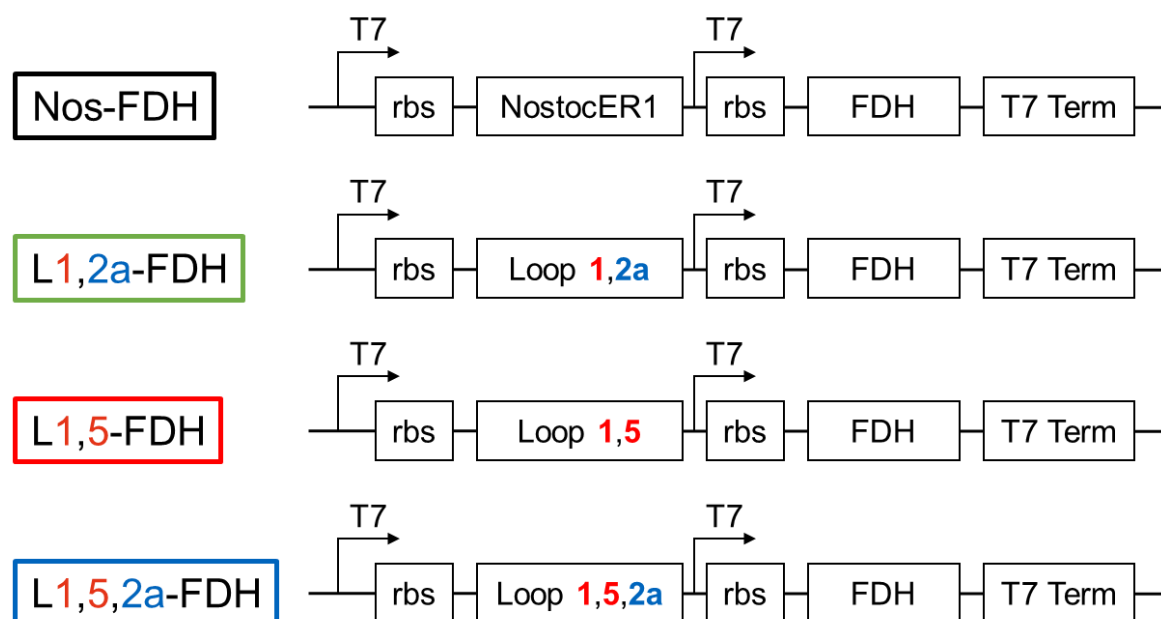
## 7.1 Reduktion von (*R*)-Carvon

Die Entscheidung, welche NostocER1-Varianten für die Biotransformation herangezogen werden sollten, basierte einerseits auf der katalytischen Effizienz mit NADH und andererseits auf der Aktivität der modifizierten Enzyme mit (*R*)-Carvon. Da die unter anderem in Tabelle 6.1 vorgestellten drei NostocER1-Varianten mit den ausgetauschten *Loop*-Regionen 1,5 beziehungsweise 1 und 2a und die Kombination aus allen drei *Loops* nicht nur die höchsten gemessenen katalytischen Effizienzen mit NADH, sondern auch die höchsten Aktivitäten bei der Reduktion von (*R*)-Carvon aufwiesen, wurden sie für diesen Projektabschnitt ausgewählt.



### 7.1.1 Konstruktion der *E. coli*-Stämme

Zur Cosubstratregeneration sollten die NostocER1 beziehungsweise die drei ausgewählten NostocER1-Varianten mit der FDH aus *Mycobacterium vaccae* N10 coexprimiert werden. Dazu wurde der für die Expression der NostocER1(-Varianten) bereits verwendete pET28a-Vektor um einen T7-Promotor (T7), eine Ribosomen-Bindestelle (rbs) und das Gen der FDH erweitert, was sich ebenfalls in vorangegangenen Studien als förderlich erwiesen hatte. Ausschnitte der konstruierten Vektoren werden schematisch in Abbildung 7.2 dargestellt.



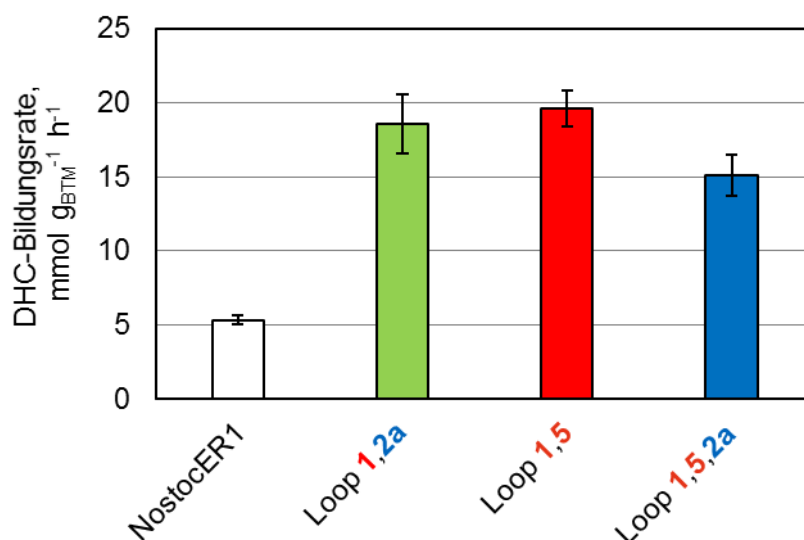
**Abbildung 7.2:** Für die Coexpression der NostocER1 (Nos) beziehungsweise der ausgewählten NostocER1-Varianten mit einem gestalteten NADH-Bindevverhalten und der Formiatdehydrogenase (FDH) konstruierte pET28a Vektoren. Weitere Abkürzungen: T7 – T7-Promotor, rbs – Ribosomen-Bindestelle, T7 Term – T7-Terminator.

Um die drei Hybridenzyme miteinander und mit der wildtypischen NostocER1 vergleichen zu können, wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen zunächst mit diesen konstruierten pET28a-Vektoren transformiert und die jeweilige Enreduktase mit der FDH im Schüttelkolben coexprimiert. Anschließend wurde die Produktion von Dihydrocarvon (DHC) mit den verschiedenen Biokatalysatoren in Form von ganzen Zellen oder geklärten Lysaten verglichen.

### 7.1.2 Ganze Zellen

Die im Schüttelkolben bereitgestellten Zellen wurden im Rahmen einer initialen Biotransformation als ruhender Ganzzellbiokatalysator im 10 mL-Maßstab eingesetzt. Die maximalen zellspezifischen Bildungsraten von Dihydrocarvon (DHC) der vier NostocER1-Varianten werden in Abbildung 7.2 dargestellt und Tabelle 12.45 aufgelistet.

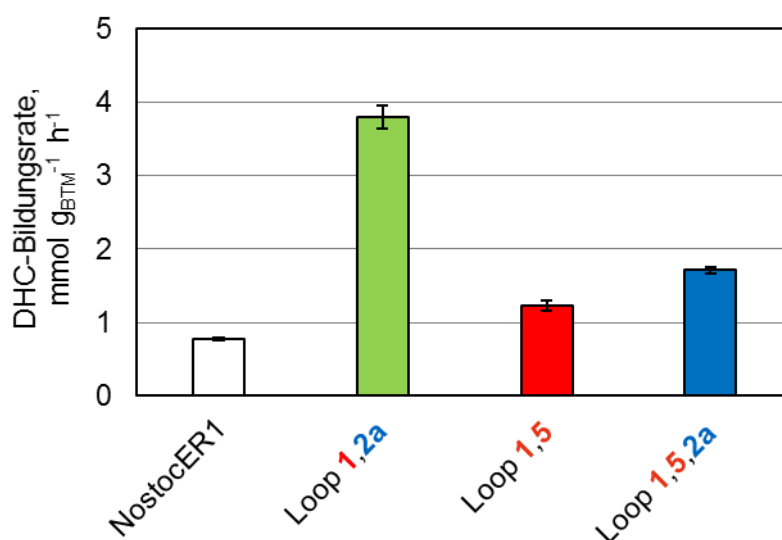
Durch den Einsatz der neu gestalteten NostocER1-Varianten war es möglich, die Katalysatoraktivität deutlich zu steigern. So wurde die DHC-Bildungsrate des Ganzzellbiokatalysators, der die wildtypische NostocER1 enthielt, um einen minimalen Faktor von  $2,84 \pm 0,31$  übertroffen. Die höchsten massebezogenen DHC-Bildungsraten wurden von den zwei Biokatalysatoren erreicht, welche den *Loop 1,2a*-Hybriden und den *Loop 1,5*-Hybriden der NostocER1 enthielt. Diese beiden Katalysatoren zeigten eine Bildungsrate von  $18,55 \pm 2,01$  beziehungsweise  $19,61 \pm 1,23$  mmol  $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  und somit eine Erhöhung um die Faktoren  $3,49 \pm 0,43$  und  $3,69 \pm 0,31$ . Somit führte die Expression von NostocER1-Varianten mit gestaltetem NADH-Bindevverhalten zu einer Steigerung der maximalen zellspezifischen Bildungsrate von DHC bei der Ganzzellbiokatalyse im Satzverfahren.



**Abbildung 7.3:** Die zellspezifische Bildungsrate von Dihydrocarvon (DHC). Verglichen werden die ruhenden Ganzzellbiokatalysatoren mit überexprimierter NostocER1 beziehungsweise den drei ausgewählten NostocER1-Varianten mit neu gestaltetem NADH-Bindevverhalten und coexprimierter Formiatdehydrogenase (FDH) zur Cosubstratregeneration. Die Messungen wurden im technischen Triplikate in gerührten Reaktionsgefäßen mit Rollrand durchgeführt. Reaktionsbedingungen:  $V_{\text{ges}}$  10 mL, 700 rpm, 300 mM (*R*)-Carvon, 450 mM Na-Formiat, 3:1 XAD4 zu Substrat Massenverhältnis, 4,45 - 5,31  $g \text{L}^{-1}$  Biokatalysator-trockenmasse (BTM)-Konzentration, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 30 °C,  $\text{pH}_0$  7,0.

### 7.1.3 Geklärte Lysate

Neben eines Einsatzes der Biokatalysatoren als ruhende ganze Zellen wurde die Biotransformation von (R)-Carvon ebenfalls mit dem geklärten Überstand der aufgeschlossenen Zellen durchgeführt. Da durch den Aufschluss die zelleigene Cosubstratkonzentration stark vermindert wird und die Reaktionsgeschwindigkeit stark gesenkt werden würde, muss diesem Reaktionsansatz externes Cosubstrat von 200  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  zugesetzt werden. Ansonsten wurden die DHC-Bildungsraten analog zu denjenigen der ganzen Zellen bestimmt. Die zugegebene Biomasse wurde auf Basis der Trockenmasse der Zellen vor dem Aufschluss bestimmt. Die ermittelten Daten werden in Abbildung 7.4 dargestellt und in Tabelle 12.45 aufgelistet.



**Abbildung 7.4:** Maximale Bildungsrate von Dihydrocarvon (DHC) pro aufgeschlossener und geklärter Biokatalysatormasse. Verglichen werden die NostocER1 und drei ausgewählte NostocER1-Varianten mit gestaltetem NADH-Bindevverhalten nach der Coexpression mit der Formiatdehydrogenase (FDH) zur Cosubstratregeneration. Die Messungen wurden im technischen Triplikate in gerührten Reaktionsgefäßen mit Rollrand durchgeführt. Reaktionsbedingungen:  $V_{\text{ges}}$  10 mL, 700 rpm, 300 mM (R)-Carvon, 450 mM Na-Formiat, 200  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ , 3:1 XAD4 zu Substrat Massenverhältnis, 4,45 - 5,31 g L<sup>-1</sup> Biokatalysatortrockenmasse (BTM)-Konzentration, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 30 °C, pH<sub>0</sub> 7.

Es ist zu erkennen, dass alle Biokatalysatoren mit gestalteten NostocER1-Varianten eine signifikant höhere DHC-Bildungsrate als der Biokatalysator mit der wildtypischen NostocER1 aufwiesen. Eine deutliche Steigerung wurde hierbei erneut durch den Loop 1,2a-Hybriden erzielt, der eine Erhöhung um einen Faktor von  $4,88 \pm 0,24$  zum

NostocER1-Wildtyp aufwies. Hingegen waren die Steigerungen der zwei weiteren neu gestalteten Enreduktasen mit Faktoren von  $1,58 \pm 0,11$  (*Loop 1,5*) beziehungsweise  $2,20 \pm 0,09$  (*Loop 1,5,2a*) geringer als diejenigen der entsprechenden Ganzzellbiokatalysatoren. Hinzu kommt eine absolute Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit. So ist beispielsweise die Rate des geklärten Lysats mit der wildtypischen NostocER1 mit  $0,78 \pm 0,02 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um einen Faktor von  $6,81 \pm 0,43$  geringer als der entsprechende Ganzzellbiokatalysator, die des L1,2a-Hybriden mit  $3,80 \pm 0,16 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um einen Faktor von  $4,88 \pm 0,53$ . Somit ergab sich in Bezug auf die spezifische Produktbildungsrate durch den Einsatz geklärter Lysate kein Vorteil im Vergleich zu Ganzzellbiokatalysatoren.

## 7.2 Biokatalysatorproduktion im Rührkesselreaktor

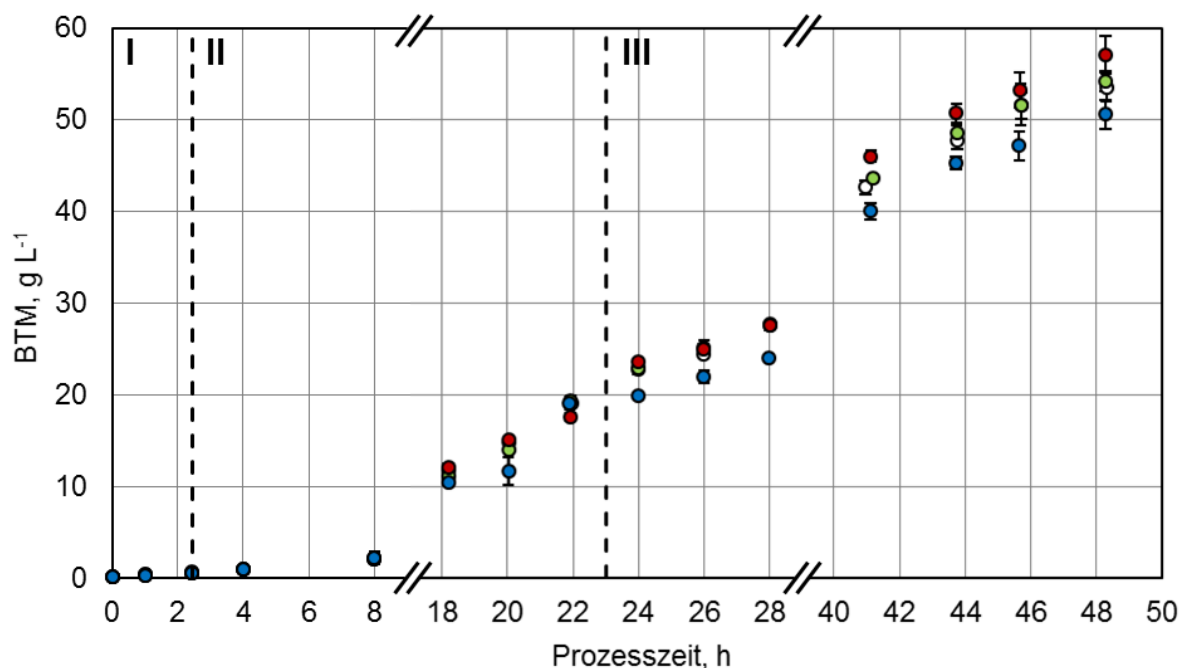
Nachdem die Geschwindigkeitserhöhung bei der Reduktion von (*R*)-Carvon der bereitgestellten Biokatalysatoren mit neu gestalteten NostocER1-Varianten bestätigt werden konnte, sollten diese in einem skalierbaren Bioprozess hergestellt werden. Hierbei sollte die Biokatalysatorproduktion unter möglichst vergleichbaren Bedingungen erfolgen, um Variationen der Enzymexpressionen als Grund für unterschiedliche Katalysatoraktivitäten auszuschließen.

Daher wurden parallele Zulauf-Kultivierungen im parallelen Rührkesselreaktor mit einem initialen Volumen von jeweils 0,3 L durchgeführt. Dabei unterteilten sich die Prozesse in drei Abschnitte: Eine initiale Satzphase, eine exponentielle Zulaufphase und eine abschließende Produktionsphase. Die Satzphase diente zur initialen Biomassebildung bei 37 °C und ihr Ende wurde durch den Verbrauch der im Medium vorgelegten Glucose ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) definiert.

Um einen Überflussmetabolismus der *E.coli*-Zellen und die damit verbundene inhibierende Acetatakkumulation zu verhindern, wird die Wachstumsrate während der Biomasseproduktion häufig zwischen  $0,1 \text{ h}^{-1}$  und  $0,3 \text{ h}^{-1}$  gehalten (Lee 1996). Daher wurde die Temperatur auf 30 °C reduziert und eine Wachstumsrate von  $0,15 \text{ h}^{-1}$  durch eine exponentielle Substratzugabe eingestellt. Während der Produktionsphase wurden Temperatur (23 °C) und Wachstumsrate ( $0,04 \text{ h}^{-1}$ ) weiter gesenkt. Die Expression der Enzyme wurde durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert.

Der Verlauf der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration während der drei Prozessabschnitte wird in Abbildung 7.5 dargestellt. Dabei konnte eine vergleichbare Entwicklung der BTM-Konzentration in allen vier Kultivierungen beobachtet werden. Lediglich die Zellen mit dem Plasmid L1,5,2a-FDH (blau) waren durch einen verblockten Abluffilter zwischen einer Prozesszeit von 12,0 h und 16,5 h einer Sauerstofflimitierung ausgesetzt.

In diesem Prozesszeitraum war der relative Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) geringer als die angestrebten 20 % Luftsättigung. Im folgenden Prozessverlauf konnte eine hierdurch bedingte verringerte BTM-Konzentration um einen maximalen Faktor von  $1,30 \pm 0,17$  beobachtet werden.



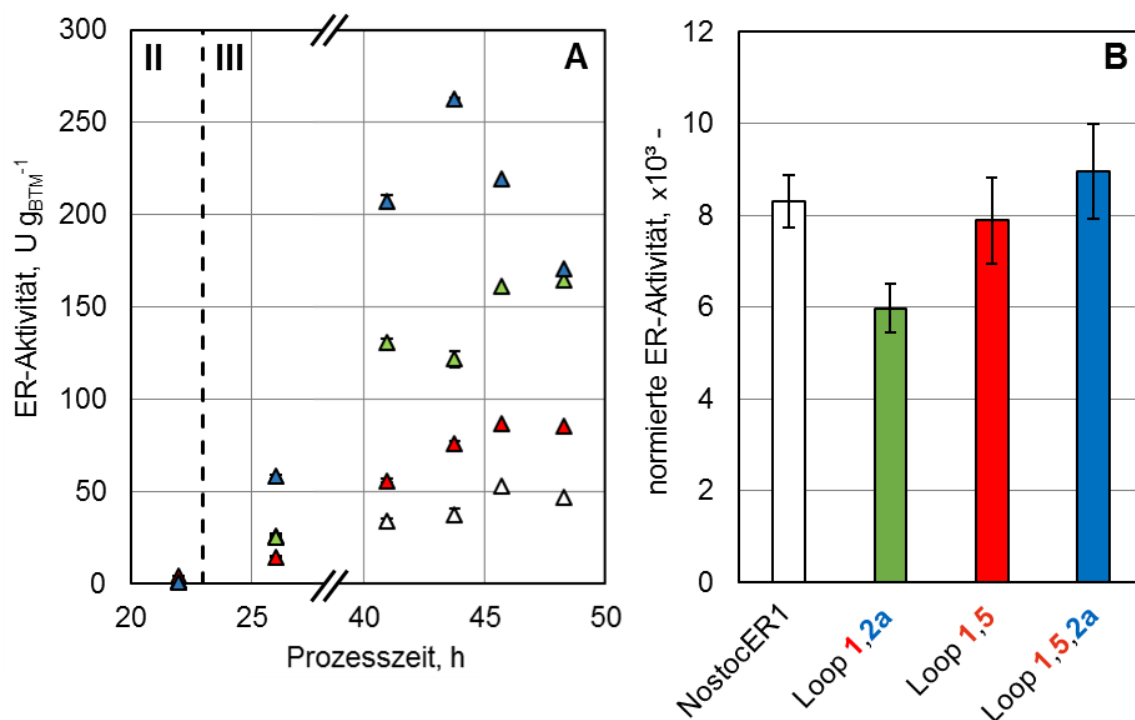
**Abbildung 7.5:** Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) als Funktion der Prozesszeit während der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den pET28a-Plasmiden Nos-FDH (weiß), L1,2a-FDH (grün), L1,5-FDH (rot) und L1,5,2a-FDH (blau) für die Coexpression der NostocER1(-Varianten) und FDH im Rührkesselreaktor. Die unterbrochenen vertikalen Linien markieren das Ende beziehungsweise den Beginn der Prozessabschnitte Satzphase (I), exponentiellen Zulaufphase (II) und exponentiellen Produktionsphase (III). Kultivierungsbedingungen:  $c_{x,0} = 0,21 - 0,18 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_{R,0} = 0,3 \text{ L}$ ,  $pO_{2,\min} = 20 \%$  Luftsättigung,  $P/V_{\max} = 22,6 \text{ W L}^{-1}$ , pH 7.

Ein zusätzliches Maß für die Vergleichbarkeit der Bioprozesse liefern die ermittelten Wachstumsraten der Zulauf- und Produktionsphase der vier Kultivierungen (Tabelle 7.1). Diese schwankten im Falle der Zulaufphase zwischen  $0,155 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$  (L1,2a-FDH) und  $0,139 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$  (L1,5,2a-FDH) und zeigen somit weder einen signifikanten Unterschied zueinander noch zur eingestellten Wachstumsrate von  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Ähnliches gilt für die Wachstumsraten in der Produktionsphase, welche sich bei allen Kultivierungen in einem sehr engen Bereich zwischen  $0,038 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  und  $0,035 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  befanden und somit nur marginal unter dem eingestellten Wert von  $0,04 \text{ h}^{-1}$  lagen.

**Tabelle 7.1:** Wachstumsrate ( $\mu$ ) der exponentiellen Zulaufphase und Produktionsphase sowie finale Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration der vier parallel im Rührkesselreaktor kultivierten *Escherichia coli*-Stämme.

Konstrukt		$\mu, \text{h}^{-1}$		Finale BTM-Konzentration, $\text{g L}^{-1}$
		Zulaufphase	Produktionsphase	
Nos-FDH	□	$0,142 \pm 0,007$	$0,035 \pm 0,001$	$53,5 \pm 1,6$
L1,2a-FDH	■	$0,155 \pm 0,006$	$0,035 \pm 0,001$	$54,2 \pm 1,1$
L1,5-FDH	■	$0,148 \pm 0,010$	$0,037 \pm 0,001$	$57,1 \pm 2,0$
L1,5,2a-FDH	■	$0,139 \pm 0,012$	$0,038 \pm 0,001$	$50,6 \pm 1,6$

Dementsprechend wurde eine nicht signifikant unterschiedliche finale BTM-Konzentration zwischen  $57,1 \pm 2,0 \text{ g L}^{-1}$  und  $53,5 \pm 1,6 \text{ g L}^{-1}$  bei den Kultivierungen der *E. coli*-Zellen mit den Konstrukten Nos-FDH, L1,2a-FDH und L1,5-FDH gemessen. Eine signifikant geringere Konzentration wurde lediglich bei der Kultivierung des L1,5,2a-FDH-Konstrukts bestimmt (Tabelle 7.1). Das ist höchstwahrscheinlich auf die Störung des Sauerstoffeintrags zwischen einer Prozesszeit von 12,0 h und 16,5 h und der dadurch bedingt verringerten Wachstumsrate während der exponentiellen Zulaufphase zurückzuführen. Ein zusätzlicher Vergleich der Zulaufkultivierungen wurde durch die Messung der enzymatischen Aktivität der in den Zellen enthaltenen Enzyme erhalten. Hierzu wurden die Zellen aufgeschlossen und die geklärten Überstände hinsichtlich ihrer ER- und FDH-Aktivität photometrisch untersucht. Die während der Produktionsphase bestimmte Entwicklung der biotrockenmassebezogenen Aktivitäten der verschiedenen Enreduktasen wird in Abbildung 7.6, A dargestellt. Dabei ist nach der Induktion der *E. coli*-Zellen ein deutlicher Anstieg der ER-Aktivität in allen Zulaufprozessen zu erkennen. Mit erneuter Ausnahme des L1,5,2a-FDH-Konstrukts, nehmen die Aktivitäten bis zu einer Prozesszeit von 46,5 h zu. Anschließend ist im Falle des L1,2a-FDH beziehungsweise L1,5-Konstrukts keine weitere signifikante Aktivitätszunahme zu beobachten, im Falle des Nos-FDH-Konstrukts eine leichte Aktivitätsabnahme. Einen deutlich anderen Verlauf zeigt die Aktivität des L1,5,2a-Hybrids. Diese steigt bis zu einer Prozesszeit von 43,7 h auf die höchstgemessene BTM bezogene Aktivität von  $262,8 \pm 0,4 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  an und fällt anschließend auf  $170,4 \pm 5,5 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  ab. Somit war bei diesem Konstrukt in weniger als 3 h Prozesszeit eine Abnahme der ER-Aktivität um 37 % zu beobachten.

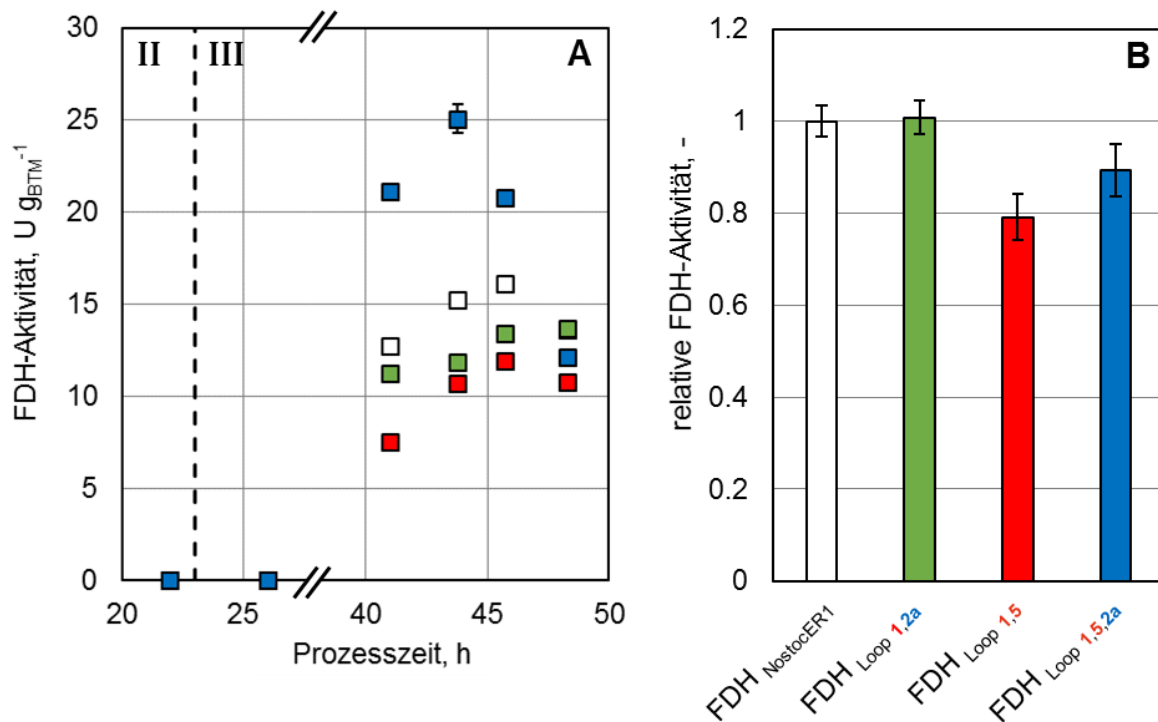


**Abbildung 7.6:** **A** Enreduktase (ER)-Aktivität pro Biotrockenmasse über die Prozesszeit der NostocER1 (weiß) und der NostocER1-Hybride *Loop 1,2a* (grün), *Loop 1,5* (rot) und *Loop 1,5,2a* (blau) im Rührkesselreaktor. Die unterbrochene vertikale Linie markiert das Ende der exponentiellen Zulaufphase (II) und den Beginn der Produktionsphase (III). **B** Die auf die entsprechende isolierte NostocER1(-Variante) normierte ER-Aktivität. Diese wurde durch Division der nach 48 h Prozesszeit gemessener ER-Aktivität und isolierter ER-Aktivität ermittelt. Die Enzymaktivitäten wurden in den geklärten Überständen nach dem Zellaufschluss bestimmt. Eine detaillierte Auflistung findet sich in **Tabelle 12.46** wieder. Assay-Bedingungen: 500  $\mu$ M NADH, 10 mM Maleimid, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C.

Da die exprimierte NostocER1 und die ausgewählten Varianten stark unterschiedliche Aktivitäten mit NADH aufweisen, mussten die BTM-bezogenen Aktivitäten am Ende des Bioprozesses normiert werden, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Hierzu wurde die BTM-bezogenen ER-Aktivität durch die Aktivität des entsprechenden isolierten Enzyms geteilt. Dadurch konnten normierte ER-Aktivitäten bestimmt werden, die einen direkten Vergleich der zellinternen ER-Aktivität zulassen (Abbildung 7.6, **B** und Tabelle 12.46). Dabei ist zu erkennen, dass sich die normierten Aktivitäten der wildtypischen NostocER1 und der *Loop 1,5*- beziehungsweise *Loop 1,5,2a*-Hybriden nicht signifikant unterscheiden. Lediglich die Aktivität des *Loop 1,2a*-Hybriden ist um den Faktor  $1,39 \pm 0,16$  geringer als diejenige der NostocER1. Es bleibt festzuhalten, dass kein Hybrid die Proteinmenge der wildtypischen NostocER1 signifikant übersteigt. Demnach kann

dieser Punkt als Ursache für eine schnellere Bioreduktion von (*R*)-Carvon ausgeschlossen werden.

Die BTM bezogenen FDH-Aktivitäten als Funktion der Prozesszeit während der Produktionsphase wird in Abbildung 7.7, A illustriert. Es konnte ein zu den ER vergleichbarer Verlauf identifiziert werden. Mit Ausnahme der FDH des L1,5,2a-FDH-Konstrukts ist bei den Kultivierungen bis zu einer Prozesszeit von 45,5 h ein deutlicher Anstieg der FDH-Aktivität zu beobachten. Danach folgt wieder eine nicht signifikante Änderung der Aktivität (L1,2a-FDH) oder ein leichter Rückgang der Aktivität (Nos-FDH und L1,5-FDH). Parallel zu der entsprechenden ER-Aktivität steigt die FDH-Aktivität des L1,5,2a-FDH-Konstrukts nach 43,7 h Prozesszeit auf ein Maximum von  $25,1 \pm 0,8 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  an und fällt anschließend auf eine BTM bezogene Aktivität von  $12,2 \pm 0,7 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  ab. Somit ist der Aktivitätsrückgang mit einem Faktor von  $2,07 \pm 0,14$  noch größer als derjenige der entsprechenden *Loop* 1,5,2a-Variante der NostocER1.



**Abbildung 7.7:** **A** Formiatdehydrogenase (FDH)-Aktivität pro Biotrockenmasse über die Prozesszeit der Nos-FDH (weiß), L1,2a-FDH (grün), L1,5-FDH (rot) und der L1,5,2a-FDH (blau) im Rührkesselreaktor. Die unterbrochene vertikale Linie markiert das Ende der exponentiellen Zulaufphase (II) und den Beginn der Produktionsphase (III). **B** Die nach der Zellernte gemessenen finale FDH-Aktivität relativ zur Aktivität der FDH des Nos-FDH-Konstrukts. Die Enzymaktivitäten wurden in den geklärten Überständen nach dem Zellaufschluss bestimmt. Assay-Bedingungen:  $500 \mu\text{M NAD}^+$ ,  $250 \text{ mM Na Formiat}$ ,  $0,1 \text{ M Na-Phosphatpuffer}$ , pH 7,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .



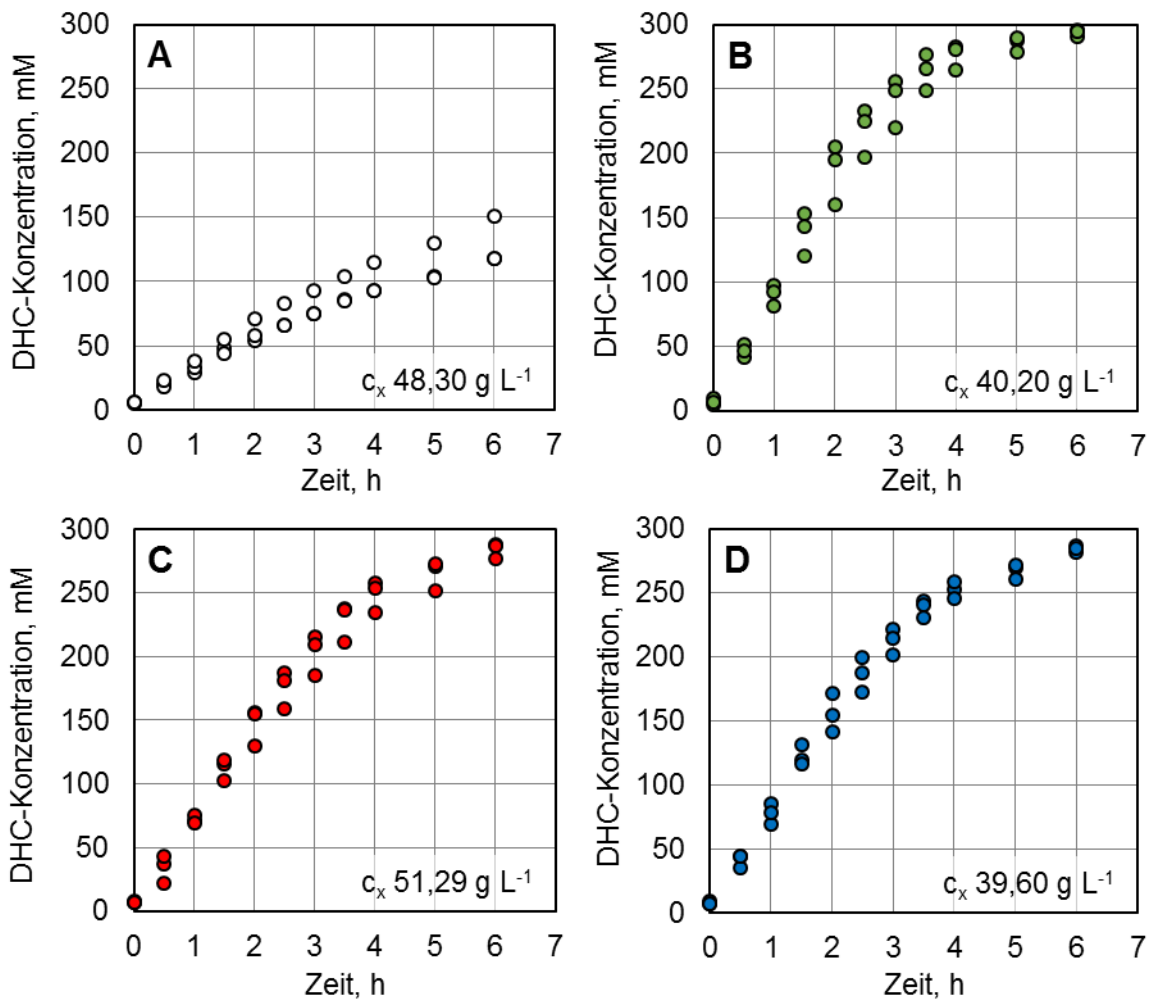
In den vier verwendeten Konstrukten für die Coexpression von ER und FDH war das Gen der FDH identisch. Somit wurden viermal das gleiche Enzym bereitgestellt, was einen direkten Vergleich der BTM bezogenen FDH-Aktivitäten ermöglicht. Da wie im Falle der ER-Aktivitäten für einen Vergleich der Katalysatoraktivitäten die Aktivität der FDH des Nos-FDH-Konstrukts nicht signifikant überschritten werden sollte, wurden die zu diesem Konstrukt relativen Werte am Ende des Bioprozesses bestimmt (Abbildung 7.7, **B**). Dieser Vergleich zeigte, dass lediglich das L1,2a-FDH-Konstrukt eine nicht signifikant unterschiedliche Aktivität aufweist. Die beiden weiteren Konstrukte resultierten in einer um die Faktoren  $1,26 \pm 0,08$  (L1,5-FDH) beziehungsweise  $1,12 \pm 0,07$  (L1,5,2a-FDH) gesenkten finalen Aktivität. Somit kann auch auf Seiten der FDH eine stark unterschiedliche FDH-Aktivität als Ursache für eine unterschiedliche Geschwindigkeit bei einer Bio-reduktion von (*R*)-Carvon ausgeschlossen werden.

### 7.3 Biotransformation von (*R*)-Carvon in 15 mL-Reaktionsgefäßen

In einem nächsten Schritt wurden die im Rührkesselreaktor bereitgestellten Biokatalysatoren als ganze Zellen für die Umsetzung von (*R*)-Carvon eingesetzt. Hierbei sollte die technische Replizierbarkeit des angewendeten Reaktionssystems aus ruhenden Ganzzellbiokatalysatoren, Adsorberharz XAD4, dem Substrat (*R*)-Carvon und dem Co-edukt Na-Formiat überprüft werden. Aus diesem Grund wurden Biotransformationen in technischen Triplikaten in gerührten Reaktionsgefäßen mit Rollrand und einem Maßstab von 15 mL durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Prozessbedingungen wie bei der Biotransformation der in Schüttelkolben bereitgestellten Ganzzellbiokatalysatoren angewendet (Kapitel 7.1.2), mit der Ausnahme der Molarität des Na-Phosphatpuffers. Dieser wurde von 0,1 M auf 0,3 M gesteigert um die Stabilität der Ganzzellbiokatalysatoren zu erhöhen und im Gegensatz zu dieser ersten durchgeführten Biotransformation einen vollständigen Substratumsatz zu gewährleisten (Daten nicht gezeigt).

Die Entwicklung der Dihydrocarvon (DHC)-Konzentration über die Zeit ist für die technischen Triplikate der Ganzzellbiokatalysatoren mit der wildtypischen NostocER1 und den drei *Loop*-modulierten NostocER1-Varianten in Abbildung 7.8 zu sehen. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle Ansätze mit ER, die ein neu gestaltetes NADH-Bindverhalten besitzen, nach 6 h eine DHC-Konzentration von mehr als 270 mM und somit mehr als 90 % Umsatz aufweisen (Abbildung 7.8, **B**, **C**, **D**). Die drei Ansätze, welche die Zellen mit der wildtypischen NostocER1 enthalten, zeigten eine deutlich langsamere Änderung der DHC-Konzentration über die Zeit (Abbildung 7.8, **A**). Dieser Biokatalysator

wies nach 6 h lediglich eine DHC-Konzentration zwischen 118,1 mM und 150,4 mM auf, was einem Umsatz zwischen 39,4 % und 50,1 % entspricht. Dieser Unterschied konnte ebenfalls bei der Betrachtung der mittleren auf die Biokatalysatormenge bezogenen DHC-Bildungsraten beobachtet werden (Tabelle 7.2). Diese waren mit Werten zwischen  $2,24 \pm 0,22 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (L1,2a-FDH) und  $1,40 \pm 0,15 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (L1,5-FDH) deutlich über der entsprechenden Rate der Nos-FDH mit  $0,58 \pm 0,07 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Abbildung 7.8:** Zeitlicher Verlauf der Dihydrocarvon (DHC)-Konzentrationen bei Biotransformationen im Satzverfahren mit *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen nach der Expression von Nos-FDH (weiß, **A**), L1,2a-FDH (grün, **B**), L1,5-FDH (rot, **C**) und der L1,5,2a-FDH (blau, **D**). Die dargestellten technischen Triplikate wurden in gerührten Reaktionsgefäßen mit Rollrand durchgeführt. Reaktionsbedingungen:  $V_{\text{ges}}$  15 mL, 700 rpm, 300 mM (*R*)-Carvon, 450 mM Na-Formiat, 3:1 XAD4 zu Substrat Massenverhältnis, 39,60 - 51,29  $\text{g L}^{-1}$  Biokatalysatortrockenmassekonzentration ( $c_x$ ), 0,3 M Na-Phosphatpuffer, 30 °C, pH 7,0. Die Zellen wurden bei -60 °C in 12,5 % (w/v) Glycerin gelagert und vor der Biotransformation auf Eis aufgetaut und mit 30 mL 0,3 M Na-Phosphatpuffer gewaschen.

Um ein Maß für die technische Reproduzierbarkeit der vier Ganzzellbiotransformationen zu gewinnen, wurden zusätzlich die DHC-Bildungsraten der drei Replikate miteinander verglichen (Tabelle 7.2). Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Produktbildungs-raten von mindestens zwei der drei Ansätze des Triplikats nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die größte Abweichung des dritten Ansatzes war bei den Biokatalysatoren mit dem Nos-FDH-Konstrukt zu beobachten. Dieser wies mit  $0,67 \pm 0,01 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  die maximal gemessene faktorielle Abweichung von  $1,29 \pm 0,10$  zu den anderen beiden technischen Replikaten auf. Somit konnte die technische Reproduzierbarkeit der Biotransformationen mit im Rührkesselreaktor bereitgestellten Biokatalysatoren im 15 mL-Maßstab gezeigt werden.

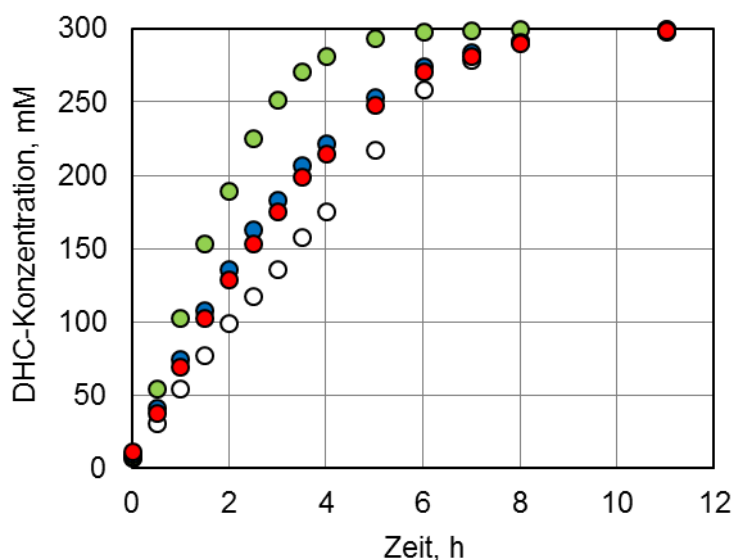
**Tabelle 7.2:** Dihydrocarvon (DHC)-Bildungsraten pro Biokatalysatortrockenmasse (BTM) und Zeit der vier bereitgestellten Konstrukte. Aufgelistet werden jeweils die technischen Replikate sowie der Mittelwert.

Konstrukt		DHC-Bildungsrate, $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$			
		Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittel
Nos-FDH	□	$0,52 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,07$
L1,2a-FDH	■	$1,94 \pm 0,02$	$2,35 \pm 0,07$	$2,44 \pm 0,08$	$2,24 \pm 0,22$
L1,5-FDH	■	$1,46 \pm 0,07$	$1,53 \pm 0,13$	$1,19 \pm 0,03$	$1,40 \pm 0,15$
L1,5,2a-FDH	■	$2,02 \pm 0,09$	$1,78 \pm 0,09$	$1,94 \pm 0,11$	$1,91 \pm 0,10$

## 7.4 Biotransformation von (R)-Carvon im Rührkesselreaktor

Abschließend sollte die Biotransformation von (R)-Carvon unter kontrollierten Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, da nur dann eine Maßstabsvergrößerung der Reaktion sinnvoll möglich ist. Aus diesem Grund wurden Reduktionen dieses Substrats im 0,7 L-Maßstab im Satzverfahren unter Kontrolle des spezifischen Leistungseintrags, der Temperatur und des pH untersucht. Die DHC-Konzentrationen unter Verwendung der vier im Rührkesselreaktor bereitgestellten Ganzzellbiokatalysatoren werden in Abbildung 7.9 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass alle Biokatalysatoren mit ER-Mutanten eine zu den Zellen mit wildtypischer NostocER1 erhöhte Produktbildungsrate aufwiesen. So war die DHC-Konzentration nach 4 h Prozesszeit durch die Anwendung des Biokatalysators

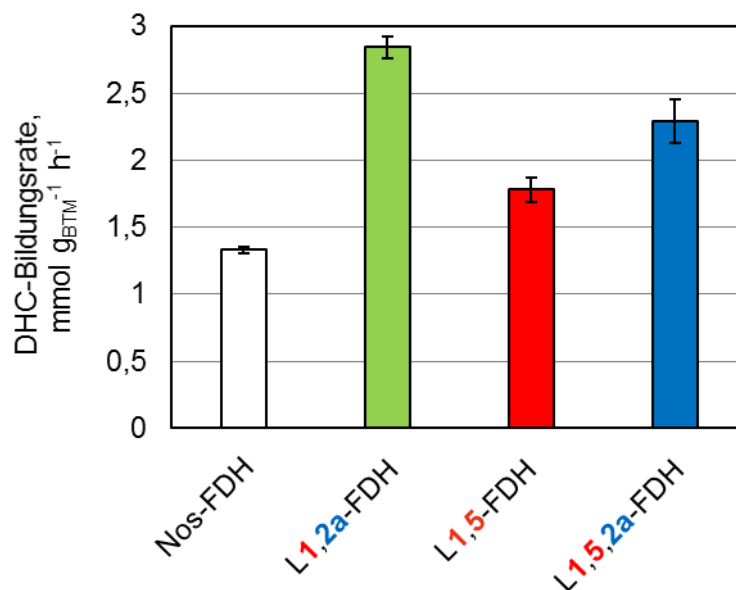
mit dem L1,2a-FDH-Konstrukt bereits bei  $290,3 \pm 0,2$  mM, was einem Umsatz von über 95 % entspricht. Die Anwendung der beiden anderen Biokatalysatoren mit neu gestalteten ER resultierte in Produktkonzentrationen von  $214,8 \pm 0,2$  mM (L1,5-FDH) beziehungsweise  $222,4 \pm 0,2$  mM (L1,5,2a-FDH) zum entsprechenden Zeitpunkt, welche ebenfalls signifikant höher waren als die Konzentration des Katalysators mit wildtypischen Enzymen ( $175,2 \pm 1,1$  mM).



**Abbildung 7.9:** Dihydrocarvon (DHC)-Konzentrationen als Funktion der Prozesszeit bei Biotransformationen mit *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen nach der Expression von Nos-FDH (weiß), L1,2a-FDH (grün), L1,5-FDH (rot) und der L1,5,2a-FDH (blau) im Rührkesselreaktor im Satzverfahren. Reaktionsbedingungen:  $V_{\text{ges}}$  0,7 L, P/V 6,1 W L<sup>-1</sup>, 300 mM (*R*)-Carvon, 450 mM Na-Formiat, 100  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>, 3:1 XAD4 zu Substrat Massenverhältnis, 30,45 - 33,72 g L<sup>-1</sup> Biokatalysatortrockenmassekonzentration, 0,3 M Na-Phosphatpuffer, 30 °C, pH 7.

Dieses Bild spiegelt sich gleichermaßen in den massebezogenen DHC-Bildungsraten der verschiedenen Biokatalysatoren wider (Abbildung 7.10). Alle *E. coli*-Zellen mit Enreduktasen mit neu gestalteten NADH-Aktivitäten zeigen eine signifikant höhere Produktbildungsrate als der Ganzzellbiokatalysator mit der wildtypischen NostocER1. Wie sich schon am Verlauf der DHC-Konzentrationen abzeichnete, wurde die höchste Rate durch den Einsatz des L1,2a-FDH-Konstrukts mit einem Wert von  $2,84 \pm 0,08$  mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erzielt. Die Rate dieses Biokatalysators war somit um einen Faktor von  $2,14 \pm 0,08$  höher als die entsprechende Rate des Biokatalysators mit unveränderter NostocER1 ( $1,33 \pm 0,03$  mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Mit Raten von  $1,78 \pm 0,09$  und  $2,29 \pm 0,16$  mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> besaßen die *E. coli*-Zellen mit den Konstrukten L1,5-FDH

beziehungsweise L1,5,2a-FDH ebenfalls signifikant höhere Raten als die Zellen mit dem Nos-FDH Plasmid.



**Abbildung 7.10:** Maximale Bildungsrate von Dihydrocarvon (DHC) pro eingesetzter *E. coli* BL21 (DE3)-Ganzzell-Biokatalysatormasse. Verglichen werden die NostocER1 und drei NostocER1-Varianten mit neu gestaltetem NADH-Bindevverhalten nach der Coexpression mit der Formiatdehydrogenase (FDH) im Rührkesselreaktor. Reaktionsbedingungen:  $V_{\text{ges}}$  0,7 L, P/V 6,1 W L<sup>-1</sup>, 300 mM (R)-Carvon, 450 mM Na-Formiat, 100  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>, 3:1 XAD4 zu Substrat Massenverhältnis, 30,45 - 33,72 g L<sup>-1</sup> Biokatalysatortrockenmassekonzentration, 0,3 M Na-Phosphatpuffer, 30 °C, pH 7.

Ein zusätzlicher Vergleich der Biotransformationen von (R)-Carvon im Satzverfahren ergibt sich durch eine Auflistung der Prozesszeiten bei denen erstmals ein Umsatz  $\geq 96\%$  ermittelt wurde, sowie die zu diesem Zeitpunkt resultierende Raum-Zeit Ausbeute und der bestimmte Diastereomerenüberschuss (de) von (2R,5R)-Dihydrocarvon zu (2S,5R)-Dihydrocarvon (Tabelle 7.3). Entsprechend ihrer höheren Produktbildungsrate wurde ein fast vollständiger Umsatz von  $\geq 96\%$  durch die *E. coli*-Zellen mit dem L1,2a-FDH-Konstrukt nach der geringsten Prozesszeit von 5 h erreicht. Alle anderen Biokatalysatoren benötigten hingegen eine Prozesszeit von 8 h. Dementsprechend ist die Raum-Zeit Ausbeute des L1,2a-FDH-Konstrukts mit  $57,4 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um einen Faktor von mindestens  $1,61 \pm 0,01$  höher als diejenigen der anderen Biokatalysatoren. Diese befanden sich in einem engen Bereich zwischen  $35,7 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Nos-FDH) und  $35,1 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (L1,5-FDH). Des weiteren weisen alle Biokatalysatoren eine ähnliche Stereospezifität auf, was sich durch vergleichbare de äußert. Die *E. coli*-Zellen mit den wildtypischen Enzymen sowie diejenigen mit dem L1,2a-FDH-Konstrukt weisen

mit je  $95,4 \pm 0,1$  % den höchsten de auf. Die Diastereomerenüberschüsse der weiteren Biokatalysatoren sind mit  $94,3 \pm 0,1$  % (L1,5,2a-FDH) beziehungsweise  $93,6 \pm 0,1$  % (L1,5-FDH) leicht geringer.

**Tabelle 7.3:** Auflistung der Zeit die zur Erreichung von  $\geq 96$  % Umsatz bei Biotransformationen mit *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen nach der Expression von Nos-FDH (weiß), L1,2a-FDH (grün), L1,5-FDH (rot) und der L1,5,2a-FDH (blau) im Rührkesselreaktor im Satzverfahren benötigt wurde. Zusätzlich ist die Raum-Zeit Ausbeute und der Diastereomerenüberschuss von (2*R*,5*R*)-Dihydrocarvon zu diesem Zeitpunkt aufgeführt.

Konstrukt		Prozesszeit für $\geq 96$ % Umsatz, h	Raum-Zeit Ausbeute, $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Diastereomerenüberschuss, %
Nos-FDH	□	8	$35,7 \pm 0,1$	$95,4 \pm 0,1$
L1,2a-FDH	■	5	$57,4 \pm 0,1$	$95,4 \pm 0,1$
L1,5-FDH	■	8	$35,1 \pm 0,1$	$93,6 \pm 0,1$
L1,5,2a-FDH	■	8	$35,4 \pm 0,1$	$94,3 \pm 0,1$

## 7.5 Diskussion

Im Rahmen dieses Kapitels konnte die Relevanz der Neugestaltung des NADH-Bindevhaltens für die Enreduktase NostocER1 veranschaulicht werden. So konnte durch die biokatalysierte Reduktion von (*R*)-Carvon gezeigt werden, dass eine Veränderung der NostocER1 die Produktbildung signifikant erhöht. Dies konnte sowohl im 10 mL und 15 mL-Maßstab als auch für einen skalierbaren Satzprozess mit kontrolliertem spezifischen Leistungseintrag und pH sowie geregelter Temperatur in einem Volumen von 0,7 L im Rührkesselreaktor bestätigt werden.

Ein Vergleich des Einsatzes der Biokatalysatoren als ganze Zellen und geklärte Lysate ergab eine deutlich höhere Produktbildungsrate der Ganzzellbiokatalysatoren, die um einen Faktor zwischen  $15,90 \pm 1,39$  (L1,5-FDH) und  $4,87 \pm 0,52$  (L1,2a-FDH) höher war. Eine mögliche Erklärung könnte in den unterschiedlichen NAD(H) Konzentrationen der beiden Reaktionsansätze zu finden sein. Im Rahmen der geklärten Lysate wurden 0,2 mM des Cosubstrats zugegeben. Diese Konzentration ist deutlich niedriger als die Konzentration des Cosubstrats im Zellinneren von *E. coli*, welche auf 2,6 mM quantifiziert wurde (Bennett et al. 2009). Hierdurch könnte sowohl eine geringere Geschwindigkeit der

FDH-katalysierten  $\text{NAD}^+$ -Regeneration, als auch eine Senkung der reduktiven Halbreaktion der NostocER1(-Varianten) verursacht werden. Des Weiteren könnte eine direkte Interaktion zwischen Protein und Adsorberharz einen negativen Einfluss auf die Aktivität der Proteine haben, welcher durch die schützende Zellhülle der ganzen Zellen verhindert wird. Außerdem könnte ein unvollständiger Zellaufschluss zu geringeren finalen Aktivitäten geführt haben. Ein zusätzlicher Unterschied zeigte sich bei einem Vergleich der drei Biokatalysatoren mit neu gestalteten Enreduktasen gegenüber dem entsprechenden Katalysator mit der wildtypischen NostocER1. Die drei ‚neu gestalteten‘ Ganzzellbiokatalysatoren besitzen eine zum Wildtyp ähnliche Steigerung zwischen einem Faktor von  $3,69 \pm 0,31$  und  $2,84 \pm 0,31$ . Im Falle der geklärten Lysate wurden hierbei weitaus deutlichere Unterschiede festgestellt. So war sowohl eine höhere faktorielle Steigerung der DHC-Bildungsrate von  $4,88 \pm 0,24$  (L1,2a-FDH), als auch eine geringere von  $1,58 \pm 0,11$  (L1,5-FDH) beziehungsweise  $2,20 \pm 0,09$  (L1,2a,5-FDH), verglichen zur wildtypischen Nos-FDH zu beobachten. Da ein relativer Abfall bei den zwei Ansätzen mit einer *Loop 5*-veränderten NostocER1 zu beobachten war, könnte der Grund in dieser *Loop*-Region zu finden sein. Eine verringerte Stabilität gegenüber den vorherrschenden Aufschlussbedingungen oder gegenüber proteolytischen Abbaus könnten als mögliche Gründe angeführt werden. Des Weiteren brachte der *Loop 5*-Austausch die NostocER1-Mutationen S233L, R240V und S242A mit sich. Demnach wurde dieser *Loop* apolarer, was eine selektiv geänderte Interaktion mit dem unpolaren XAD4-Harz mit sich bringen könnte.

Die Bereitstellung der Biokatalysatoren im Rührkesselreaktor wurde analog zu einem in der Literatur beschriebenen Prozesses durchgeführt, mit dem vergleichbare katalytisch aktive *E. coli*-Zellen hergestellt wurden (Castiglione et al. 2017). Durch die parallele Kultivierung war es möglich, eine finale BTM zwischen  $32,01 \pm 1,10$  und  $28,35 \pm 0,88$  g zu erzeugen. Obwohl die Biomasse in den Reaktoren bis zum Prozessende anstieg, wurde eine Stagnation oder ein Abfall der Enzymaktivitäten der in den bakteriellen Zellen befindlichen ER und FDH beobachtet. Die Limitierung einer Medienkomponente könnte hierfür der Grund sein. Das verwendete Zulaufmedium enthielt lediglich Glucose und Diammoniumhydrogenphosphat und keine Mg-Sulfat- und Spurenelementlösung, wie vergleichbare Zulaufmedien für die Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* (Riesenberg et al. 1991, Wilms et al. 2001). Diese Komponenten wurden zwar durch Einmalzugaben den Kultivierungen zugeführt (siehe Kapitel 4.3.5), ihre Konzentration schwanke jedoch dementsprechend während des Bioprozesses und eine Limitierung kann nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich war, bedingt durch das geringe initiale Medienvolumen von 0,3 L der parallelen Rührkesselreaktoren und der durch die Zulaufpumpe bedingte minimale Zulaufstrom, am Ende des Prozesses ein hoher

Zulaufmediumanteil von über 46 % des Gesamtvolumens präsent. Die dadurch bedingte Verdünnung der Bestandteile des Satzmediums könnte ebenfalls zu einer Limitierung geführt haben. Hierbei sind in erster Linie Natrium, Kalium, Citrat, Thiamin zu nennen. Ein besonders starker Abfall der Enzymaktivität von ER und FDH wurde während der Kultivierung des L1,5,2a-FDH-Konstrukts beobachtet. Hier wurde die maximal gemessene Aktivität, im Gegensatz zu den anderen Konstrukten, bereits nach 43,7 h Prozesszeit ermittelt. Anschließend wurde bis zum Prozessende ein drastischer Abfall der ER-Aktivität um einen Faktor von  $1,54 \pm 0,05$  und der FDH-Aktivität um einen Faktor von  $2,07 \pm 0,14$  beobachtet. Da die *E. coli*-Zellen dieser Kultivierung während der Biomassebildung einer 4,5 h andauernden Sauerstofflimitierung ( $pO_2 < 20$  % Luftsättigung) ausgesetzt waren, ist eine zu den anderen Kultivierungen zeitlich versetzter und stärker ausgeprägter Einfluss während der Proteinproduktionsphase erklärbar.

Nichtsdestotrotz konnten die im Rührkesselreaktor bereitgestellten Biokatalysatoren für eine erfolgreiche Bio-reduktion von (*R*)-Carvon angewendet werden. Durch die Biotransformationen im 15 mL Maßstab konnte die technische reproduzierbare Anwendung der Biokatalysatoren bestätigt werden. Diese Biotransformationen resultierten, mit Ausnahme der Zellen mit dem Nos-FDH-Konstrukt, in vergleichbaren DHC-Bildungsraten zu den im Rührkesselreaktor durchgeführten Biotransformationen. Es war bei der Verwendung aller Zelltypen lediglich eine leichte Senkung der Rate zu beobachten. Die Nos-FDH-Zellen wiesen hingegen eine deutlich gesenkte Rate auf. Diese war um einen Faktor von  $2,29 \pm 0,28$  im Vergleich zum Rührkesselreaktor (0,7 L) verringert. Der Aktivitätsunterschied könnte durch die Lagerung der Zellen bedingt sein. Die *E. coli*-Zellen, die für die Biotransformation im Rührkesselreaktor herangezogen wurden, verweilten für weniger als 24 h im Reaktionsmedium bei 4 °C. Diejenigen, die im 15 mL-Maßstab verwendet wurden, wurden hingegen mit 12,5 % (w/v) Glycerol gemischt und bei -60 °C für mehr als drei Monate gelagert. Die mit dieser Lagerung verbundenen Einfrier-, Auftau- und Waschschrte führen zu einer zusätzlichen Belastung der Zellen, wodurch geringere absolute Aktivitäten und geänderte Aktivitätsverhältnisse erklärt werden könnten. Die Lagerung der Zellen des Nos-FDH-Konstrukts bei -60 °C scheint dabei einen stärkeren negativen Effekt auf die Aktivität des Biokatalysators gehabt zu haben. Hierfür könnten Temperaturgradienten innerhalb des Gefrierschranks, inhomogene Verteilung des Glycerols innerhalb des Lagergefäßes oder eine geringere Lagerstabilität des NostocER1-Wildtyps verantwortlich sein.

Zusätzlich zeigten die im Rührkesselreaktor bereitgestellten Zellen eine deutlich geringere absolute DHC-Bildungsrate als diejenigen die in Schüttelkolben bereitgestellt wurden. Eine Bereitstellung unter kontrollierten Bedingungen (Rührkesselreaktor) sollte im Vergleich zur Bereitstellung unter unkontrollierten Bedingungen (Schüttelkolben)



eigentlich in einem Vorteil resultieren. Offensichtlichster Unterschied beider Expressionsarten war das Kultivierungsmedium. In den Rührkesselreaktoren wurde ein Minimalmedium nach Wilms *et al.* (2001) angewendet, in den Schüttelkolben komplexes TB-Medium. Das Vorhandensein essentieller im Komplexmedium vorhandener Komponenten für die Expression der Enzyme könnte dieses Resultat herbeigeführt haben. Im Falle der ER könnten das beispielsweise Intermediate der Biosynthese der prosthetischen Gruppe Flavinmononukleotid (FMN) sein.

**Tabelle 7.4:** Auflistung der Dihydrocarvon (DHC)-Bildungsraten bei Satzprozessen der in dieser Arbeit bereitgestellten *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren im 0,7 L-Maßstab. Zusätzlich werden die entsprechenden Raten aus Castiglione *et al.* (2017) im 0,2 L- und 1,0 L-Maßstab aufgeführt.

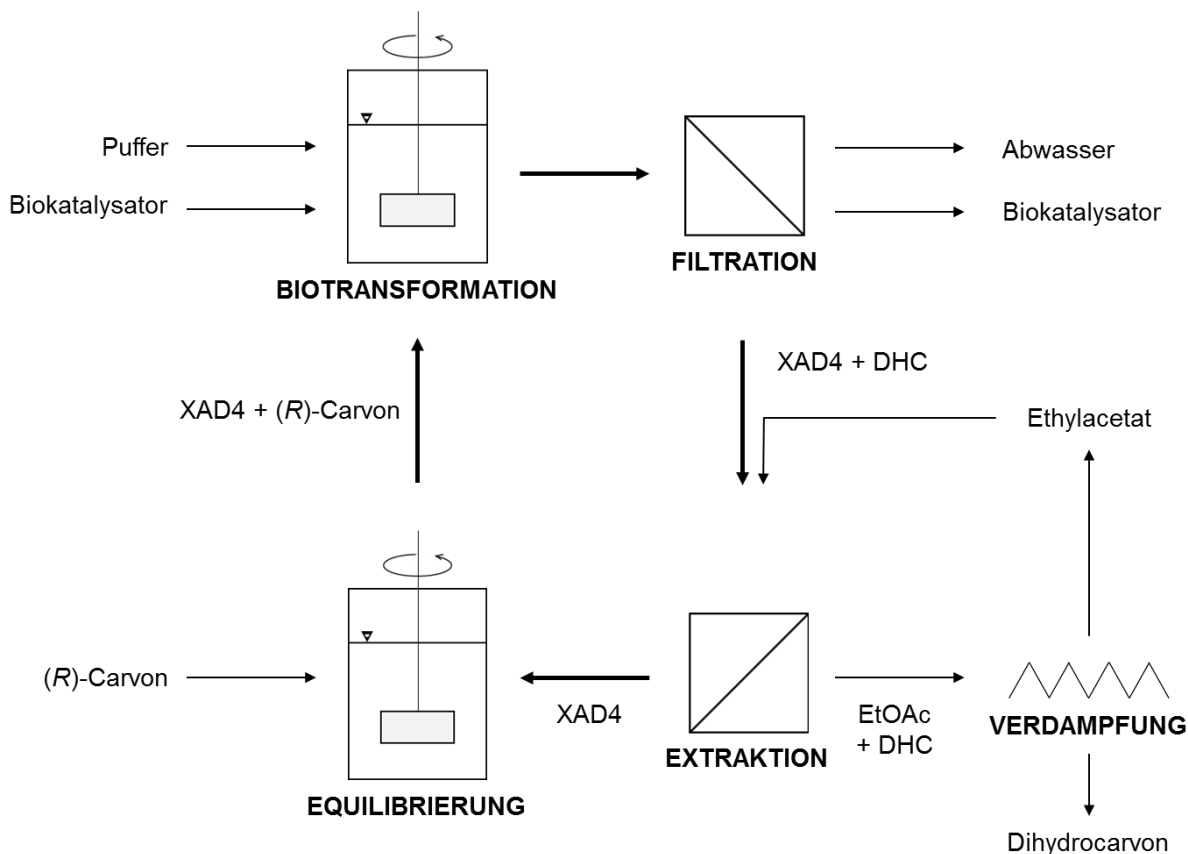
Konstrukt		DHC-Bildungsrate, mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Nos-FDH	□	1,33 ± 0,03
L1,2a-FDH	■	2,84 ± 0,08
L1,5-FDH	■	1,78 ± 0,09
L1,5,2a-FDH	■	2,29 ± 0,16
-----		
Nos-FDH <sub>3M</sub> (0,2 L) <sup>a</sup>		1,39 ± 0,06
Nos-FDH <sub>3M</sub> (1,0 L) <sup>a</sup>		1,25 ± 0,05

<sup>a</sup> Daten aus Castiglione *et al.* (2017)

Abschließend sollen die NostocER1-Ganzzellbiokatalysatoren mit denjenigen der Literatur verglichen werden (Castiglione *et al.* 2017). In dieser vorangegangenen Arbeit wurde die N-terminal um 37 Aminosäuren längere NostocER1 in Kombination mit einer für die Reduktion von NADP<sup>+</sup> nach Hoelsch *et al.* (2013) gestalteten Formiatdehydrogenase (FDH<sub>3M</sub>) bereitgestellt. Vergleicht man die DHC-Bildungsraten der Nos-FDH-*E. coli*-Zellen dieser Arbeit mit denjenigen der Literatur ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Tabelle 7.4). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielte Bildungsrate des Ganzzellbiokatalysators mit den wildtypischen Enzymen befand sich mit 1,33 ± 0,03 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> zwischen den in der Literatur bestimmten Raten. Diese waren im 0,2 L-Maßstab 1,39 ± 0,06 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und im 1,0 L-Maßstab 1,25 ± 0,05 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Da die Anwendung aller untersuchten NostocER1-Varianten mit einem neu gestalteten NADH-

Bindeverhalten eine signifikant gesteigerte Produktbildungsrate im Vergleich zur wild-typischen NostocER1 ermöglichte, wurde dadurch ebenfalls die Bildungsrate der literaturbekannten Ganzzellbiokatalysatoren übertroffen.

Eine schematische Übersicht des Prozesses zur Umsetzung von (*R*)-Carvon wird abschließend in Abbildung 7.11 dargestellt. Nach einer Equilibrierung des Substrats (*R*)-Carvon und dem Adsorberharz XAD4 wird die Biotransformation im Satzprozess durch die Zugabe von Puffer und Biokatalysator gestartet. Nach der Biotransformation kann das Harz mit dem adsorbierten Produkt Dihydrocarvon (DHC) durch Filtration von Abwasser und Biokatalysator getrennt werden. Durch die Zugabe des Extraktionsmittels Ethylacetat (EtOAc) kann das DHC vom Adsorberharz getrennt werden. Das Harz kann anschließend für eine erneute Equilibrierung bereitgestellt werden. Durch Verdampfung kann das Produkt Dihydrocarvon isoliert werden. Das Extraktionsmittel Ethylacetat kann anschließend ebenfalls rezykliert werden.



**Abbildung 7.11:** Prozessschema der Biotransformation von (*R*)-Carvon zu Dihydrocarvon (DHC). Dargestellt werden die Prozessschritte Equilibrierung, Biotransformation, Filtration und Extraktion, sowie die Verdampfung zur Trennung von DHC und dem Extraktionsmittel Ethylacetat (EtOAc).

## 8 Zusammenfassung

Chirale Feinchemikalien sind wichtige Bausteine für die Synthese bioaktiver Substanzen wie beispielsweise Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffe, Futtermittel und Agrochemikalien. Die asymmetrische Reduktion von Kohlenstoffdoppelbindungen stellt eine der am häufigsten angewendeten Strategien dar, chirale Moleküle zugänglich zu machen (Stuermer et al. 2007). Insbesondere die von Enreduktasen (ER) katalysierte *anti*-Hydrierung ist von großem wirtschaftlichen Interesse, da sie mit klassischen chemischen Synthesewegen nur schwer umsetzbar ist (Toogood et al. 2010).

Obwohl einige ER teilweise eine Vielzahl wünschenswerter Eigenschaften, wie beispielsweise ein breites Substratspektrum und eine hohe Regio-, Stereo- und Enantio-selektivität besitzen, hält sich ihre industrielle Verbreitung in Grenzen. Ein Hauptgrund hierfür ist in der Cosubstratpräferenz der ER zu finden. ER benötigen für die Reduktion das Cosubstrat Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NAD(P)H). Die überwiegende Mehrheit der ER bevorzugt dabei NADPH über das weniger kostenintensive und stabilere und daher industriell bevorzugte NADH als Cosubstrat (Wu et al. 1986, You et al. 2017). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit Einfluss auf das NADH-Bindevverhalten von ER genommen werden. Anschließend sollten die neu gestalteten ER im Rahmen einer skalierbaren Biotransformation für die Herstellung eines chiralen Synthesebausteins angewendet werden.

In einem ersten Schritt wurde daher die für diesen Zweck ausgewählte cyanobakterielle Enreduktase 1 aus *Nostoc* sp. PCC7120 (NostocER1) tiefgreifend charakterisiert. Aufbauend auf einer neuen Annotation des Enzyms (WP\_044521106), wurde die Primärstruktur verglichen zu den in der Literatur bereitgestellten NostocER1-Varianten N-terminal um 37 Aminosäuren verkürzt (Fu et al. 2013). Hierdurch konnte keine direkte Auswirkung auf die Aktivität mit NADH beziehungsweise NADPH der NostocER1 beobachtet werden. Jedoch zeigte die im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellte NostocER1 eine deutlich gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit mit den beiden Cosubstraten im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten. So war die ermittelte spezifische Aktivität bei einer Cosubstratkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  ( $v_{500}$ ) NADPH mit  $27,39 \pm 4,21 \text{ U mg}^{-1}$  um einen Faktor von  $2,36 \pm 0,45$  höher als der entsprechende Literaturwert (Fu et al. 2013). Eine noch deutlichere Änderung konnte für  $v_{500}$  mit NADH als Cosubstrat festgestellt werden. Die bestimmte Reaktionsgeschwindigkeit von  $5,54 \pm 0,24 \text{ U mg}^{-1}$  war um einen Faktor von  $3,68 \pm 0,19$  höher als der entsprechende Wert der Literatur. Die gemessene Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) mit NADPH lag bei  $80,2 \pm 18,2 \mu\text{M}$ , diejenige mit NADH bei  $1052,8 \pm 222,2 \mu\text{M}$ . Zusätzlich wurde das

Verhältnis aus maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und  $K_m$ , die katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ), der NostocER1 für beide Cosubstrate mit  $328,3 \pm 76,9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  (NADPH) und  $14,3 \pm 3,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  (NADH) quantifiziert, wodurch die deutliche Präferenz für das phosphorylierte Cosubstrat bestätigt werden konnte.

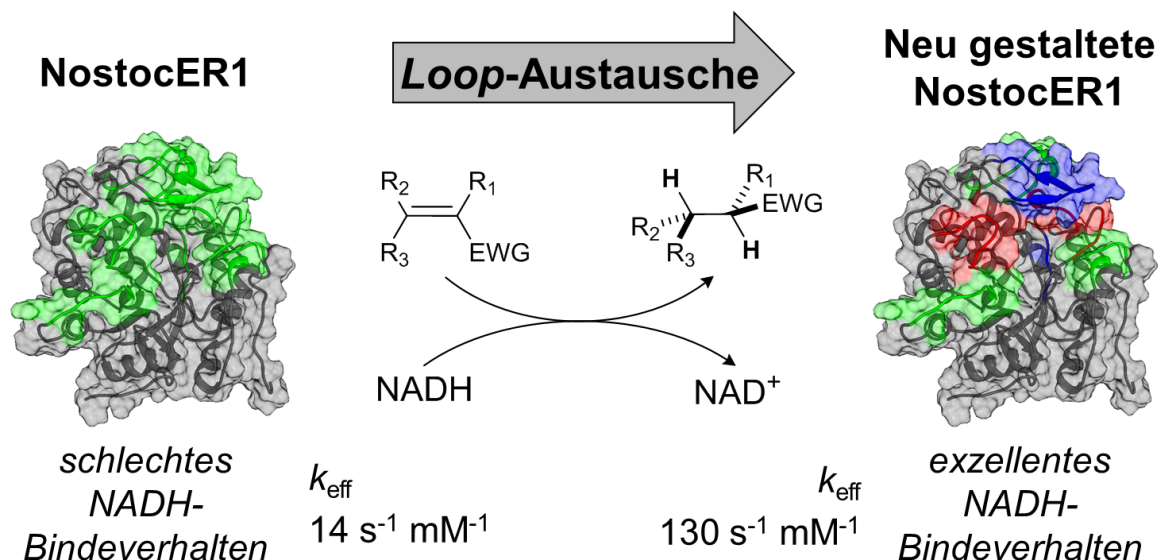
Die Untersuchungen zur thermischen Stabilität der NostocER1 ergab ein zweiphasiges Inaktivierungsverhalten dieses Enzyms. Es konnten mit  $1,041 \pm 0,098 \text{ h}^{-1}$  und  $0,012 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  zwei Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung bestimmt werden. Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der Enzyme in einem Bereich zwischen pH 5,5 und 8,5 ergaben ein Optimum der Enzymaktivität bei pH 8.

Aufgrund der beobachteten Diskrepanz zwischen den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten der NostocER1 zu denjenigen der Literatur, sollten mögliche Ursachen für diese Unterschiede ermittelt werden. Da die rekombinante Expression von Reduktasen in *E. coli* einen entscheidenden Einfluss auf die finale Enzymaktivität hat, wurden verschiedene Faktoren dieses Bereitstellungsprozesses betrachtet. Dies waren die Temperatur und der Sauerstoffeintrag während der heterologen Expression der Enzyme. Eine Änderung des Sauerstoffeintrags führte in diesem Kontext zu keiner veränderten NostocER1-Aktivität. Hingegen konnte durch die Variation der Expressionstemperatur ein deutlicher Unterschied bei den finalen NostocER1-Aktivitäten gemessen werden. So wurde ein Expressionstemperaturbereich zwischen  $27,5 \text{ °C}$  und  $37 \text{ °C}$  identifiziert, der keinen signifikanten Aktivitätsunterschied zwischen den erhaltenen Reduktasen ergab. Die Expressionen bei niedrigeren oder höheren Temperaturen führten zu einer Senkung der Aktivität um einen Faktor von bis zu  $1,84 \pm 0,14$ . Da die im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellten ER und diejenigen der Literatur jedoch mit der gleichen Temperatur von  $20 \text{ °C}$  bereitgestellt wurden, kann dies als Ursache für die auftretende Diskrepanz ausgeschlossen werden. Eine zweifelsfreie Identifikation der Ursache war somit nicht möglich.

Aufbauend auf der Charakterisierung der NostocER1 sollte selektiv Einfluss auf das Cosubstrat-Bindevverhalten dieser Reduktase genommen werden. Dabei sollte vorrangig die unerwünschte aber ausgeprägte Präferenz für NADPH durch eine Steigerung der Enzymaktivität mit NADH verringert werden. Basierend auf einem Homologiemodell wurden acht *Loop*-Regionen, die in Kontakt mit dem gebundenen Cosubstrat der NostocER1 stehen könnten, ausgewählt und durch die entsprechenden Regionen zweier Donorenzyme ersetzt. Diese Donoren waren zum einen die cyanobakterielle Enreduktase 1 aus *Acaryochloris marina* (AcaryoER1) mit einer sehr hohen Aktivität mit NADH und zum anderen das Old Yellow Enzyme 4 aus *Achromobacter* sp. JA81 (AchrOYE4) mit einer sehr hohen Affinität zu NADH. Durch die Bereitstellung von 2 x 8 Hybridproteinen mit ausgetauschten *Loop*-Regionen konnten bereits fünf NostocER1-

Varianten erzeugt werden, die eine gewünschte erhöhte Aktivität mit NADH aufwiesen. Herausragend war in diesem Kontext der Austausch der *Loop*-Region 1 durch den entsprechenden Bereich des AchrOYE4. Hierdurch konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) mit NADH der NostocER1 um einen Faktor von  $1,20 \pm 0,15$  von  $21,48 \pm 2,65 \text{ U mg}^{-1}$  auf  $25,72 \pm 0,28 \text{ U mg}^{-1}$  gesteigert werden. Hinzu kam eine deutliche Senkung des  $K_m$  um einen Faktor von  $5,53 \pm 1,24$  von  $1052,8 \pm 222,2 \mu\text{M}$  auf  $190,2 \pm 14,4 \mu\text{M}$  dieses Hybridenzym. Des Weiteren ist erwähnenswert, dass die fünf identifizierten Hybridenzyme mit einer gesteigerten Aktivität mit NADH in fünf unterschiedlichen *Loop*-Regionen verändert wurden und durch die entsprechenden Bereiche beider Donoren ersetzt wurden. Dies ermöglicht nicht nur eine Kombination der durchgeführten Modifikationen sondern verifiziert zusätzlich den für dieses Projekt gewählten semi-rationalen *Enzyme Engineering*-Ansatz der *Loop*-Austausche. Passend hierzu wurde eine ‚unerwartete‘ Veränderung einer *Loop*-Region nahe der Nicotinamid-Gruppe des Cosubstrats erzielt. Rationale Ansätze zur Beeinflussung des Cosubstrat-Bindevverhalten beschränken sich häufig auf den Bereich in räumlicher Nähe der Adenosin-Gruppe des Cosubstrats, da dessen Ribose den einzigen Unterschied zwischen NADPH und NADH mit sich bringt. Demnach hätte durch die Anwendung einer rationaleren Strategie die Veränderung dieser *Loop*-Region leicht verpasst werden können.

Um zu ergründen, ob eine weitergehende Gestaltung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1 möglich ist, wurden in einem nächsten Arbeitsabschnitt die fünf ausgetauschten *Loop*-Regionen, welche einen positiven Effekt auf das NADH-Bindevverhalten der NostocER1 hervorbrachten, miteinander kombiniert. Hierdurch war es nicht nur möglich, die hervorragende NADH-Affinität des AchrOYE4-Donors auf die NostocER1 zu übertragen, sondern auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des AcaryoER1-Donors zu übertreffen. Durch den kombinierten Austausch der *Loop*-Regionen 1 und 5 mit den entsprechenden Bereichen des AchrOYE4 wurde der  $K_m$  der NostocER1 um einen Faktor von  $14,50 \pm 4,04$  auf  $72,6 \pm 13,2 \mu\text{M}$  gesenkt. Somit wurde kein signifikanter Unterschied zum  $K_m$  des AchrOYE4 mit  $57,1 \pm 17,0 \mu\text{M}$  detektiert. Durch den kombinierten Austausch der *Loop*-Region 1 durch die des AchrOYE4 und der Region 2a durch diejenige der AcaryoER1 wurde die größte im Rahmen dieser Arbeit erzielte Steigerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erzielt. Diese wurde auf  $41,16 \pm 0,64 \text{ U mg}^{-1}$  gesteigert, was einer Erhöhung um einen Faktor von  $1,92 \pm 0,24$  verglichen zur NostocER1 entsprach.



**Abbildung 8.1:** Grafische Zusammenfassung der in dieser Arbeit angewendeten Strategie des Austauschs von *Loop*-Regionen zur Veränderung der NostocER1.

Zusätzlich zu der erzielten Änderung der enzymkinetischen Parameter mit NADH konnte Einfluss auf das NADPH-Bindevverhalten der NostocER1 genommen werden. Dabei besaß die Mehrheit der charakterisierten NostocER1-Varianten eine unveränderte oder nur leicht geänderte NADPH-Aktivität. Demnach konnte bei diesen Enzymvarianten durch die gesteigerte NADH-Aktivität die Cosubstratpräferenz für NADPH gesenkt werden. Darüber hinaus wiesen alle Hybride, die den *Loop* 5 des AchrOYE4 enthielten, eine drastisch gesenkte NADPH-Aktivität auf. So wurde beispielsweise durch den singulären *Loop*-Austausch dieses Bereichs der  $v_{500}$  mit NADPH um einen Faktor von  $7,73 \pm 1,25$  von  $27,39 \pm 4,21 \text{ U mg}^{-1}$  auf  $3,55 \pm 0,18 \text{ U mg}^{-1}$  reduziert. Demnach konnte über die Veränderung der *Loop* 5-Region die Cosubstratpräferenz der NostocER1 von einer Bevorzugung von NADPH zu einer NADH-Bevorzugung gedreht werden. Je nach Verwendungszweck des Biokatalysators kann eine selektive Verwendung eines oder beider Cosubstrate wünschenswert sein (Chánique & Parra 2018).

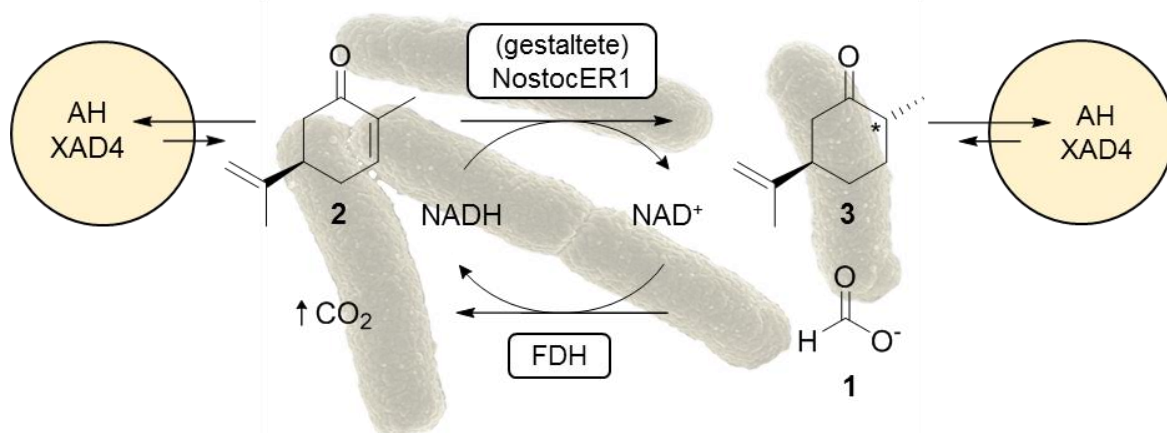
Als Bewertungsgrundlage für den Erfolg der Gestaltung des Cosubstrat Bindevhaltens diente die Betrachtung der katalytischen Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) der NostocER1-Varianten mit NADH und ihr Vergleich mit der  $k_{\text{eff}}$  mit NADPH der wildtypischen NostocER1. So wurde die  $k_{\text{eff}}$  der NostocER1 durch den Austausch der *Loop*-Regionen 1 und 5 des AchrOYE4 um einen Faktor von  $8,35 \pm 2,71$  von  $14,2 \pm 3,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  auf  $119,0 \pm 25,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  gesteigert. Ein vergleichbares Ergebnis wurde durch den Austausch mit den Regionen 1 des AchrOYE4 und 2a der AcaryoER1 erzielt, wodurch eine Steigerung um den Faktor  $9,12 \pm 2,28$  auf  $130,0 \pm 6,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  erreicht werden konnte. Ein Vergleich dieser

Ergebnisse mit der  $k_{\text{eff}}$  der NostocER1 mit NADPH ( $328,3 \pm 76,9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) ergibt die relative katalytische Effizienz (RKE), welche im Falle der beiden Hybridenzyme  $0,358 \pm 0,113$  (*Loop 1,5*) beziehungsweise  $0,391 \pm 0,094$  (*Loop 1,2a*) betrug. Ein Vergleich der erzielten RKE mit 51 literaturbekannten Oxidoreduktasen, bei denen das Cosubstrat-Bindevverhalten hin zu NADH gestaltet werden konnte, zeigt, dass lediglich elf dieser modifizierten Enzyme eine höhere RKE als diejenige dieser Arbeit besitzen (Chánique & Parra 2018). Darüber hinaus verfügen neun dieser elf Oxidoreduktasen über eine Rossmann-ähnliche Faltung. Da die Bindung der Cosubstrate bei diesem Faltungstyp bereits gut verstanden wurde, ist die Gestaltung des Cosubstrat-Bindevhaltens meist weniger herausfordernd (Hanukoglu 2015). Im Gegensatz dazu sind Gestaltungen des Cosubstrat-Bindevhaltens der Enzymklasse, welcher die ER angehören (EC 1.6), sehr selten (Chánique & Parra 2018). Überdies tendieren Gestaltungen des Cosubstrat-Bindevhaltens von Oxidoreduktasen mit einer prosthetischen Gruppe, wie beispielsweise FMN, anspruchsvoller zu sein als diejenigen bei Enzymen ohne zusätzlichen Cofaktor (Chánique & Parra 2018). Somit konnte das NADH-Bindevverhalten der NostocER1 durch die angewendete Strategie des Austauschs von *Loop*-Regionen mit einem für diese Enzymklasse bisher einzigartigen Erfolg durchgeführt werden.

Aufbauend auf der Neugestaltung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1 wurden diese Enzyme für eine Biotransformation im 0,7 L Maßstab bereitgestellt und angewendet. Trotz der mindestens um 75 % niedrigeren Kosten von NAD(H) im Vergleich zu NADP(H) wäre die wirtschaftliche Umsetzung eines Prozesses unter einem stöchiometrischen Einsatz des Cosubstrats schwer realisierbar. Aus diesem Grund wurden die neu gestalteten ER mit einer Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* N10 in *E. coli* coexprimiert. Über die Oxidation von Formiat (**1**) kann durch diesen Enzymgekoppelten Ansatz das Cosubstrat NADH reduziert und somit regeneriert werden. Daher wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit vier unterschiedlichen pET28a-Plasmiden transformiert. Diese Plasmide wurden identisch zur Literatur für die Coexpression der NostocER1 beziehungsweise der drei NostocER1-Varianten mit der höchsten katalytischen Effizienz mit NADH, welche die *Loop 1,5*- und *Loop 1,2a*-Austausche sowie die Kombination aus diesen (*Loop 1,5,2a*) waren, und der FDH konstruiert (Castiglione et al. 2017). Anschließend wurden die vier *E. coli*-Stämme in Zulauf-Kultivierungen in parallelen Rührkesselreaktoren mit einem initialen Volumen von 0,3 L hergestellt. Hierdurch konnten vergleichbare Bioprozesse durchgeführt werden, welche eine finale Biomassekonzentration zwischen  $57,1 \pm 2,0 \text{ g L}^{-1}$  und  $50,6 \pm 1,6 \text{ g L}^{-1}$  lieferten. Ein Vergleich der Menge an exprimiertem Zielprotein der vier Biokatalysatoren ergab einen maximalen Unterschied der ER-Aktivitäten um den Faktor  $1,39 \pm 0,16$  beziehungsweise einen maximalen Unterschied der FDH-Aktivität um den Faktor  $1,26 \pm 0,08$ . Zusätzlich

wurden keine signifikant höhere Enzymexpression zu dem Stamm, in dem die wildtypische NostocER1 exprimiert wurde, erzielt. Somit war es möglich vier Ganzzellbiokatalysatoren mit unterschiedlichen NostocER1-Varianten bereitzustellen, welche für eine direkt vergleichbare Biotransformation geeignet waren.

Diese vier Ganzzellbiokatalysatoren wurden deshalb für die Reduktionen von (*R*)-Carvon (**2**) zum Hauptprodukt (*2R,5R*)-Dihydrocarvon (**3**) in parallelen Rührkesselreaktoren in einem Maßstab von 0,7 L angewendet. Wie die Mehrzahl der Substrate ist (*R*)-Carvon aufgrund seiner Hydrophobizität nur schlecht in Wasser löslich (Fichan et al. 1999), weswegen das Adsorberharz (AR) XAD4 als zweite, hydrophobe Phase eingesetzt wurde. Abbildung 8.2 zeigt eine schematische Darstellung der angewendeten Reaktionszusammensetzung. Ein Vergleich der initialen DHC-Bildungsraten der als ganze Zellen eingesetzten Biokatalysatoren ergab eine signifikante Steigerung der Raten von allen NostocER1-Varianten im Vergleich zu dem Biokatalysator mit der wildtypischen NostocER1. Die maximale Erhöhung der Rate wurde durch den *Loop* 1,2a-Austausch erzielt. Es handelte sich somit um die NostocER1-Variante, die auch die höchste katalytische Effizienz mit NADH aufgewiesen hatte. Explizit wurde die initiale DHC-Bildung von  $1,33 \pm 0,03 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um den Faktor von  $2,14 \pm 0,08$  auf  $2,84 \pm 0,08 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erhöht. Dadurch konnte im Kontext dieses Anwendungsbeispiels die Zweckmäßigkeit einer Gestaltung des NADH-Bindevhaltens der ER bestätigt werden.



**Abbildung 8.2:** Schematische Darstellung des eingesetzten Reaktionssystems zur Biotransformation von (*R*)-Carvon (**2**) zum Hauptprodukt (*2R,5R*)-Dihydrocarvon (**3**) mit *Escherichia coli*-Ganzzellbiokatalysatoren mit exprimierter (neu gestalteter) NostocER1. Zusätzlich wurde eine Formiatdehydrogenase (FDH) exprimiert um durch die Zugabe von Formiat (**1**) das benötigte und oxidierte Cosubstrat NAD<sup>+</sup> zu regenerieren. Das Adsorberharz (AH) XAD4 wurde als zweite Phase zur *in situ* Substratzugabe und Produktentfernung eingesetzt.



## 9 Ausblick

Durch die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens angewendete *Enzyme Engineering*-Strategie der *Loop*-Austausche konnte das NADH-Bindevverhalten der NostocER1 auf eine für die gesamte Enzymklasse (EC 1.6) einzigartige Weise beeinflusst werden. Um die Auswirkungen der durchgeführten *Loop*-Veränderungen auf die Interaktion mit dem Cosubstrat besser verstehen zu können, wäre eine Betrachtung der erzielten Ergebnisse auf molekularer Ebene von Interesse. Dies könnte experimentell über den Vergleich von Bindungsstudien zwischen der NostocER1 beziehungsweise der entsprechenden Enzymvarianten und dem Cosubstrat in einem Kernspinresonanzspektroskop erfolgen. Zusätzlich könnten Molekulardynamik (MD)-Simulationen zur Beschreibung der Interaktionen herangezogen werden. Mit Hilfe von Hochleistungsrechnern ermöglichen MD-Simulationen eine detaillierte Beschreibung molekularer Prozesse.

Des Weiteren könnte die Durchführung der *Loop*-Austausche verbessert werden. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit bereits große Erfolge erzielt werden konnten, wurde das gesamte Potential dieser *Enzyme Engineering*-Methode mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit noch nicht ausgeschöpft. In erster Linie könnte die Bibliothek der *Loop*-Spender deutlich vergrößert werden. Durch die Anwendung einer effizienten Klonierungsstrategie wie der *Gibson*-Assemblierung oder der *Golden Gate*-Assemblierung könnten verschiedenste *Loop*-Kombinationen mit einem deutlich geringen Zeitaufwand bereitgestellt werden. Hierdurch würde der Aufwand der Durchmusterung durch die Vergrößerung der generierten Bibliotheken zwar steigen, die Geschwindigkeit und das Potential herausragende Treffer zu erzielen jedoch ebenso. Passend hierzu könnten zusätzliche Mutationen an den Termini der *Loops* eingebracht werden. Die Flexibilität dieser ‚Gelenke‘ der *Loops* hat einen großen Einfluss auf die korrekte Positionierung und Beweglichkeit der Regionen, wodurch sie eng mit der Funktionalität der finalen modifizierten Enzyme verbunden sind (Ochoa-Leyva et al. 2011).

Zusätzlich wäre es sinnvoll, die Übertragbarkeit dieser Optimierungsstrategie tiefgreifender zu beleuchten. Im Detail könnte überprüft werden, ob diese Strategie auf andere Enreduktasen oder andere Enzyme mit einer vergleichbaren Tertiärstruktur angewendet werden kann. Insbesondere letzteres wäre aufgrund des ausgesprochen häufigen Auftretens des  $(\beta, \alpha)_8$ -Faltungsmotivs der ER von großem Interesse.

Neben der Reduktion von (*R*)-Carvon wäre der Einsatz der gestalteten NostocER1-Varianten in Rahmen weiterer Synthesen aufschlussreich. Insbesondere könnte eine mögliche Erhöhung der Hydrierungsgeschwindigkeit bei Alkenen mit synthetisch

interessanten elektronenziehenden Gruppen wie beispielsweise Nitrogruppen, Nitrilen oder Säurehalogeniden untersucht werden.

## 10 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

**Tabelle 10.1:** Verwendete Abkürzungen und Symbole

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	auf das Volumen bezogene Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	Wachstumsrate
A	Alanin
A1-R	α-Ketosäure-Reduktase aus <i>Sphingomonas</i> sp. A1
AcaryoER1	Enreduktase 1 aus <i>Acaryochloris marina</i>
AchrOYE4	Old Yellow Enzyme 4 aus <i>Achromobacter</i> sp. JA81
AdhD	Alkohol-Dehydrogenase D
A <sub>l</sub>	Relativer Anteil des langsamen Aktivitätsverlusts
APS	Ammoniumperoxidsulfat
A <sub>s</sub>	relativen Anteile des schnellen Aktivitätsverlusts
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRENDA	Braunschweig Enzyme Database
BTM	Biotrockenmasse
C	Cystein
CASTing	<i>Combinatorial Active site Saturation Testing</i>
CDA	Cytosin-Deaminase
CRS-SALAD	<i>Cofactor Specificity Reversal-Structural Analysis and Library Design</i>
CT	<i>Charge Transfer</i>
D	Asparaginsäure
de	Diastereomerenüberschuss
DHC	Dihydrocarvon
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Classification</i> (EC)-Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

**Tabelle 10.1:** Verwendete Abkürzungen und Symbole (Fortsetzung)

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ee	Enantiomerenüberschuss
EnoR	2-Enoatereduktasen
EQ-Puffer	Equilibrierpuffer
ER	Enreduktase
EtOAc	Ethylacetat
EZG	elektronenziehende Gruppe
F	Phenylalanin
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FDH <sub>3M</sub>	Formiatdehydrogenase mit gestaltetem NADP+-Bindeverhalten
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
G	Glycin
g	Gramm
H	Histidin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>VE</sub>	entionisiertes Wasser
AD	Aldose-Reduktase
GDA	Guanin-Deaminase
His <sub>6</sub>	Hexahistidinanker
HSDH	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
M	Methionin
MD	Molekulardynamik
MDR	mittelkettige Dehydrogenase/Reduktase
MR	Morphinonreduktase
N	Asparagin

**Tabelle 10.1:** Verwendete Abkürzungen und Symbole (Fortsetzung)

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADH <sub>4</sub>	1,4,5,6-Tetrahydronicotinamidadenindinucleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	Nicotinamid-abhängige Cyclohexenon Reduktase aus <i>Zymomonas mobilis</i>
NostocER1	Enreduktase 1 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC7120
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
OHR	oxidative Halbreaktion
OPR1	12-Oxophytodienoat Reduktase aus <i>Lycopersicon esculentum</i>
OYE	Old Yellow Enzyme
OYE 2.6	Old Yellow Enzyme 2.6 aus <i>Scheffersomyces stipitis</i>
OYE1	Old Yellow Enzyme 1 aus <i>Saccharomyces pastorianus</i>
P	Prolin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PETNR	Pentaerythritoltetranitrat-Reduktase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PRA	Phosphoribosylanthranilat
π-System	konjugiertes System aus Elektronenpaaren
Q	Glutamin
R	Arginin
rbs	Ribosomen-Bindestelle
RC	( <i>R</i> )-Carvon
RHR	reduktive Halbreaktion
RKE	relative katalytische Effizienz
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen

**Tabelle 10.1:** Verwendete Abkürzungen und Symbole (Fortsetzung)

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
T	Threonin
T7	T7-Promotor
T7-Term	T7-Terminator
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific broth</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIM	Triosephosphat-Isomerase
U	Unit
V	Valin
$V_{200}$	spezifische Aktivität bei einer Cosubstratkonzentration von 200 $\mu\text{M}$
$V_{500}$	spezifische Aktivität bei einer Cosubstratkonzentration von 500 $\mu\text{M}$
VdW-Radius	Van der Waals-Radius
$V_{\text{max}}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
$\alpha\beta$ -Loop	Oberflächenschleife zwischen $\alpha$ -Helix und $\beta$ -Faltblatt
$\beta\alpha$ -Loop	Oberflächenschleife zwischen $\beta$ -Faltblatt und $\alpha$ -Helix
$\tau$	Halbwertszeit

## 11 Literaturverzeichnis

- ADALBJÖRNSSON, B. V., H. S. TOOGOOD, A. FRYSKOWSKA, C. R. PUDNEY, T. A. JOWITT, D. LEYS & N. S. SCRUTTON (2010): Biocatalysis with thermostable enzymes: Structure and properties of a thermophilic 'ene'-reductase related to old yellow enzyme. *ChemBioChem* 11: 197–207.
- AMATO, E. D. & J. D. STEWART (2015): Applications of protein engineering to members of the old yellow enzyme family. *Biotechnol. Adv.* 33: 624–631.
- ARSÈNE, F., T. TOMOYASU & B. BUKAU (2000): The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 3–9.
- BALDWIN, R. L. (1986): Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8069–8072.
- BANEYX, F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411–421.
- BARNA, T. M., H. KHAN, N. C. BRUCE, I. BARSUKOV, N. S. SCRUTTON & P. C. MOODY (2001): Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme. *J. Mol. Biol.* 310: 433–447.
- BASTIAN, S., X. LIU, J. T. MEYEROWITZ, C. D. SNOW, M. M. Y. CHEN & F. H. ARNOLD (2011): Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 13: 345–352.
- BENGTSSON, O., B. HAHN-HÄGERDAL & M. F. GORWA-GRAUSLUND (2009): Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 2: 9.
- BENNETT, B. D., E. H. KIMBALL, M. GAO, R. OSTERHOUT, S. J. VAN DIEN & J. D. RABINOWITZ (2009): Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 593–599.
- BOGARAD, L. D. & M. W. DEEM (1999): A hierarchical approach to protein molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 2591–2595.
- BORLINGHAUS, N. & B. M. NESTL (2018): Switching the Cofactor Specificity of an Imine Reductase. *ChemCatChem* 10: 183–187.
- BORNSCHEUER, U. T. & K. BUCHHOLZ (2005): Highlights in Biocatalysis - Historical Landmarks and Current Trends. *Eng. Life Sci.* 5: 309–323.
- BORNSCHEUER, U. T., G. W. HUISMAN, R. J. KAZLAUSKAS, S. LUTZ, J. C. MOORE & K. ROBINS (2012): Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485: 185–194.
- BOUGIOUKOU, D. J., S. KILLE, A. TAGLIEBER & M. T. REETZ (2009): Directed Evolution of an Enantioselective Enoate-Reductase: Testing the Utility of Iterative Saturation Mutagenesis. *Adv. Synth. Catal.* 351: 3287–3305.

- BREITHAUPT, C., J. STRASSNER, U. BREITINGER, R. HUBER, P. MACHEROUX, A. SCHALLER & T. CLAUSEN (2001): X-Ray Structure of 12-Oxophytodienoate Reductase 1 Provides Structural Insight into Substrate Binding and Specificity within the Family of OYE. *Structure* 9: 419–429.
- BRIGÉ, A., D. VAN DEN HEMEL, W. CARPENTIER, L. de SMET & J. J. VAN BEEUMEN (2006): Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from *Shewanella oneidensis* indicate differences in physiological function. *Biochem. J.* 394: 335–344.
- BROWN, B. J., J.-W. HYUN, S. DUVVURI, P. A. KARPLUS & V. MASSEY (2002): The role of glutamine 114 in old yellow enzyme. *J. Biol. Chem.* 277: 2138–2145.
- BUBNER, P., M. KLIMACEK & B. NIDETZKY (2008): Structure-guided engineering of the coenzyme specificity of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase to enable efficient utilization of NAD(H) and NADP(H). *FEBS Lett.* 582: 233–237.
- BUCHHOLZ, K., V. KASCHE & U. T. BORNSCHEUER (2012): *Biocatalysts and Enzyme Technology*. 2. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.
- CAHN, J. K. B., S. BRINKMANN-CHEN, T. SPATZAL, J. A. WIIG, A. R. BULLER, O. EINSLE, Y. HU, M. W. RIBBE & F. H. ARNOLD (2015): Cofactor specificity motifs and the induced fit mechanism in class I ketol-acid reductoisomerases. *Biochem. J.* 468: 475–484.
- CAHN, J. K. B., C. A. WERLANG, A. BAUMSCHLAGER, S. BRINKMANN-CHEN, S. L. MAYO & F. H. ARNOLD (2017): A General Tool for Engineering the NAD/NADP Cofactor Preference of Oxidoreductases. *ACS Synth. Biol.* 6: 326–333.
- CAMPBELL, E., S. CHUANG & S. BANTA (2013): Modular exchange of substrate-binding loops alters both substrate and cofactor specificity in a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Protein Eng. Des. Sel.* 26: 181–186.
- CARLSON, R. & F. SRIENC (2004): Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 1–19.
- CASTIGLIONE, K. (2018): Enzymkinetik. S. 3–44 in: H. CHMIEL, R. TAKORS & D. WEUSTER-BOTZ (Hrsg.): *Bioprozesstechnik*. 4. Aufl. Springer Spektrum, Berlin, Deutschland.
- CASTIGLIONE, K., Y. FU, I. POLTE, S. LEUPOLD, A. MEO & D. WEUSTER-BOTZ (2017): Asymmetric whole-cell bioreduction of (*R*)-carvone by recombinant *Escherichia coli* with in situ substrate supply and product removal. *Biochem. Eng. J.* 117: 102–111.
- CHÁNIQUE, A. M. & L. P. PARRA (2018): Protein Engineering for Nicotinamide Coenzyme Specificity in Oxidoreductases: Attempts and Challenges. *Front. Microbiol.* 9: 1–14.
- CHEN, H., Z. ZHU, R. HUANG & Y.-H. P. ZHANG (2016): Coenzyme Engineering of a Hyperthermophilic 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from NADP<sup>+</sup> to NAD<sup>+</sup> with Its Application to Biobatteries. *Sci. Rep.* 6: 36311.
- CHEN, R., A. GREER & A. M. DEAN (1996): Redesigning secondary structure to invert coenzyme specificity in isopropylmalate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 12171–12176.
- CHENG, J. Z., C. M. COYLE, D. G. PANACCIONE & S. E. O'CONNOR (2010): A role for Old Yellow Enzyme in ergot alkaloid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 1776–1777.



- CLASSEN, T. & J. PIETRUSZKA (2018): Complex molecules, clever solutions - Enzymatic approaches towards natural product and active agent syntheses. *Bioorg. Med. Chem.* 26: 1285–1303.
- CUI, D., L. ZHANG, S. JIANG, Z. YAO, B. GAO, J. LIN, Y. A. YUAN & D. WEI (2015): A computational strategy for altering an enzyme in its cofactor preference to NAD(H) and/or NADP(H). *FEBS J.* 282: 2339–2351.
- D'ARRIGO, P., C. FUGANTI, G. PEDROCCHI FANTONI & S. SERVI (1998): Extractive biocatalysis: A powerful tool in selectivity control in yeast biotransformations. *Tetrahedron* 54: 15017–15026.
- DAUGHERTY, A. B., S. GOVINDARAJAN & S. LUTZ (2013): Improved biocatalysts from a synthetic circular permutation library of the flavin-dependent oxidoreductase old yellow enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 14425–14432.
- DAUGHERTY, A. B., J. R. HORTON, X. CHENG & S. LUTZ (2015): Structural and Functional Consequences of Circular Permutation on the Active Site. *ACS Catal.* 5: 892–899.
- DENG, Z., A. ALIVERTI, Zanetti, Giuliana, Arakaki, Adrián, E. ORELLANO, N. CALCATERRA, E. CECCARELLI, N. CARRILLO & P. A. KARPLUS (1999): A productive NADP<sup>+</sup> binding mode of ferredoxin–NADP<sup>+</sup> reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 6: 847–853.
- DI TOMMASO, P., S. MORETTI, I. XENARIOS, M. OROBITG, A. MONTANYOLA, J.-M. CHANG, J.-F. TALY & C. NOTREDAME (2011): T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* 39: 7-13.
- DONG, Y., K. J. MCCULLOUGH, S. WITTLIN, J. CHOLLET & J. L. VENNERSTROM (2010): The structure and antimalarial activity of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes derived from (+)-dihydrocarvone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 6359–6361.
- DURCHSCHEIN, K., M. HALL & K. FABER (2013): Unusual reactions mediated by FMN-dependent ene- and nitro-reductases. *Green Chem.* 15: 1764.
- EHIRA, S., H. TERAMOTO, M. INUI & H. YUKAWA (2010): A novel redox-sensing transcriptional regulator CyeR controls expression of an Old Yellow Enzyme family protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiol.* 156: 1335–1341.
- FABER, K. (2011): *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 6. Aufl. Springer-Verlag GmbH, Berlin.
- FAIRBANKS, G., T. L. STECK & D. F. H. WALLACH (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606–2617.
- FAÍSCA PHILLIPS, A. M. & A. J. L. POMBEIRO (2017): Recent advances in organocatalytic enantioselective transfer hydrogenation. *Org. Biomol. Chem.* 15: 2307–2340.
- FARMER, E. E., E. ALMÉRAS & V. KRISHNAMURTHY (2003): Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 372–378.
- FERNÁNDEZ-CASTANÉ, A., C. E. VINE, G. CAMINAL & J. LÓPEZ-SANTÍN (2012): Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *J. Biotechnol.* 157: 391–398.

- FICHAN, I., C. LARROCHE & C. B. GROS (1999): Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. *J. Chem. Eng. Data* 44: 56–62.
- FITZPATRICK, T. B., N. AMRHEIN & P. MACHEROUX (2003): Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme homolog from *Bacillus subtilis* involved in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* 278: 19891–19897.
- FOX, K. M. & P. A. KARPLUS (1994): Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure* 2: 1089–1105.
- FU, Y. (2013): Asymmetric reductions using novel ene-reductases from cyanobacteria. Dissertation, Technische Universität München.
- FU, Y., K. CASTIGLIONE & D. WEUSTER-BOTZ (2013): Comparative Characterization of Novel Ene-Reductases from Cyanobacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 1293–1301.
- FU, Y., K. CASTIGLIONE & D. WEUSTER-BOTZ (2015): Ene-Reductases from Cyanobacteria for Industrial Biocatalysis. S. 631–661 in: P. GRUNWALD (Hrsg.): *Industrial biocatalysis. Pan Stanford series on biocatalysis 1.* Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapur, Singapur.
- FURNHAM, N., I. SILLITOE, G. L. HOLLIDAY, A. L. CUFF, R. A. LASKOWSKI, C. A. ORENGO & J. M. THORNTON (2012): Exploring the evolution of novel enzyme functions within structurally defined protein superfamilies. *PLoS Comput. Biol.* 8: e1002403.
- GLADIALI, S. & E. ALBERICO (2006): Asymmetric transfer hydrogenation: Chiral ligands and applications. *Chem. Soc. Rev.* 35: 226–236.
- GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N., E. GARCÍA-FRUITÓS & A. VILLAVARDE (2007): Recombinant protein solubility - does more mean better? *Nat. Biotechnol.* 25: 718–720.
- GRÖGER, H. & Y. ASANO (2012): Introduction – Principles and Historical Landmarks of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. S. 3–42 in: K. DRAUZ, H. GRÖGER & O. MAY (Hrsg.): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.
- GUL-KARAGULER, N., R. B. SESSIONS, A. R. CLARKE & J. J. HOLBROOK (2001): A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylca* allows the enzyme to use NADP. *Biotechnol. Lett.* 23: 283–287.
- HAAS, E. (1938): Isolierung eines neuen gelben Ferments: Structure and properties of a thermophilic 'ene'-reductase related to old yellow enzyme. *Biochem. Ztschr.* 298: 378–390.
- HANUKOGLU, I. (2015): Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 43: 206–209.
- HASEGAWA, S., K. UEMATSU, Y. NATSUMA, M. SUDA, K. HIRAGA, T. JOJIMA, M. INUI & H. YUKAWA (2012): Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 865–875.
- HAY, S., C. R. PUDNEY & N. S. SCRUTTON (2009): Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: Probes of hydrogen tunnelling. *FEBS J.* 276: 3930–3941.

- HAY, S., C. R. PUDNEY, M. J. SUTCLIFFE & N. S. SCRUTTON (2008): Solvent as a probe of active site motion and chemistry during the hydrogen tunnelling reaction in morphinone reductase. *ChemPhysChem* 9: 1875–1881.
- HERRERA, J. M., M. P. ZUNINO, J. S. DAMBOLENA, R. P. PIZZOLITTO, N. A. GAÑAN, E. I. LUCINI & J. A. ZYGADLO (2015): Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Ind. Crop. Prod.* 70: 435–442.
- HOELSCH, K., I. SÜHRER, M. HEUSEL & D. WEUSTER-BOTZ (2013): Engineering of formate dehydrogenase: Synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl. Microbiol. Biot.* 97: 2473–2481.
- HULLEY, M. E., H. S. TOOGOOD, A. FRYSZKOWSKA, D. MANSELL, G. M. STEPHENS, J. M. GARDINER & N. S. SCRUTTON (2010): Focused directed evolution of pentaerythritol tetranitrate reductase by using automated anaerobic kinetic screening of site-saturated libraries. *ChemBioChem* 11: 2433–2447.
- IYER, P. V. & L. ANANTHANARAYAN (2008): Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 43: 1019–1032.
- JANSEN, B. J. M., J. A. KREUGER & A. d. GROOT (1989): The conversion of (-)-and (+)-dihydrocarvone into chiral intermediates for the synthesis of (-)-polygodial, (-)-warburganal and (-)-muzigadial. *Tetrahedron* 45: 1447–1452.
- JI, D., L. WANG, S. HOU, W. LIU, J. WANG, Q. WANG & Z. K. ZHAO (2011): Creation of bioorthogonal redox systems depending on nicotinamide flucytosine dinucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 20857–20862.
- KANEKO, T., Y. NAKAMURA, P. C. WOLK, T. KURITZ, S. SASAMOTO, A. WATANABE, M. IRIGUCHI, A. ISHIKAWA, K. KAWASHIMA, T. KIMURA, Y. KISHIDA, M. KOHARA, M. MATSUMOTO, A. MATSUNO, A. MURAKI, N. NAKAZAKI, S. SHIMPO, M. SUGIMOTO, M. TAKAZAWA, M. YAMADA, M. YASUDA & S. TABATA (2001): Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Res.* 8: 205–213.
- KARA, S. & J. von LANGERMANN (2018): Prinzipien der angewandten Biokatalyse: Cofaktorabhängige Biotransformationen. S. 226–232 in: K.-E. JAEGER, A. LIESE & C. SYLDATK (Hrsg.): Einführung in die Enzymtechnologie. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Deutschland.
- KARA, S., J. H. SCHRITTWIESER, F. HOLLMANN & M. B. ANSORGE-SCHUMACHER (2014): Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Appl. Microbiol. Biot.* 98: 1517–1529.
- KARDINAH, S., D. RABELT & M. RESCHKE (2006): Biotransformation: Von der Vision zur Technologie! *Chemie Ingenieur Technik* 78: 209–217.
- KARPLUS, P. A., K. M. FOX & V. MASSEY (1995): Flavoprotein structure and mechanism. 8. Structure-function relations for old yellow enzyme. *FASEB J.* 9: 1518–1526.
- KHAN, H., R. J. HARRIS, T. BARNA, D. H. CRAIG, N. C. BRUCE, A. W. MUNRO, P. C. E. MOODY & N. S. SCRUTTON (2002): Kinetic and structural basis of reactivity of pentaerythritol tetranitrate reductase with NADPH, 2-cyclohexenone, nitroesters, and nitroaromatic explosives. *J. Biol. Chem.* 277: 21906–21912.

- KIEFHABER, T., R. RUDOLPH, H.-H. KOHLER & J. BUCHNER (1991): Protein Aggregation in vitro and in vivo: A Quantitative Model of the Kinetic Competition between Folding and Aggregation. *Nat. Biotechnol.* 9: 825–829.
- KIRK, O., T. V. BORCHERT & C. C. FUGLSANG (2002): Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 345–351.
- KITZING, K., T. B. FITZPATRICK, C. WILKEN, J. SAWA, G. P. BOURENKOV, P. MACHEROUX & T. CLAUSEN (2005): The 1.3 Å crystal structure of the flavoprotein YqjM reveals a novel class of Old Yellow Enzymes. *J. Biol. Chem.* 280: 27904–27913.
- KLIBANOV, A. M. (1990): Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.* 23: 114–120.
- KLUMPP, S., Z. ZHANG & T. HWA (2009): Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* 139: 1366–1375.
- KOELLER, K. M. & C.-H. WONG (2001): Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409: 232–240.
- KOHLI, R. M. & V. MASSEY (1998): The Oxidative Half-reaction of Old Yellow Enzyme: THE ROLE OF TYROSINE 196. *J. Biol. Chem.* 273: 32763–32770.
- KOKKINIDIS, M., N. M. GLYKOS & V. E. FADOULOGLOU (2012): Protein flexibility and enzymatic catalysis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 87: 181–218.
- KRIEGER, F., A. MÖGLICH & T. KIEFHABER (2005): Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 3346–3352.
- KUBATA, B. K., Z. KABUTUTU, T. NOZAKI, C. J. MUNDAY, S. FUKUZUMI, K. OHKUBO, M. LAZARUS, T. MARUYAMA, S. K. MARTIN, M. DUSZENKO & Y. URADE (2002): A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 196: 1241–1252.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- LEE, S. Y. (1996): High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends. Biotechnol.* 14: 98–105.
- LENCKI, R. W., J. ARUL & R. J. NEUFELD (1992): Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation, and decomposition on enzyme inactivation kinetics: II. Biphasic and grace period behavior. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1427–1434.
- LESK, A. M. (1995): NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 775–783.
- LONSDALE, R. & M. T. REETZ (2015): Reduction of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ketones by Old Yellow Enzymes: Mechanistic Insights from Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 137: 14733–14742.
- LUTZ, S. (2010): Beyond directed evolution - semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 734–743.
- LUTZ & BORNSCHEUER (2008): Protein Engineering Handbook: Structure, function and methods. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.

- LYGIDAKIS, A., V. KARUPPIAH, R. HOEVEN, A. NÍ CHEALLAIGH, D. LEYS, J. M. GARDINER, H. S. TOOGOOD & N. S. SCRUTTON (2016): Pinpointing a Mechanistic Switch Between Ketoreduction and "Ene" Reduction in Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Angew. Chem.* 128: 9748–9752.
- MA, H. & T. M. PENNING (1999): Conversion of mammalian 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase to 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase using loop chimeras Changing specificity from androgens to progestins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11161–11166.
- MÄHLER, C. (2014): Trägerfreie Immobilisierung von Oxidoreduktasen. Masterarbeit, Technische Universität München.
- MANSELL, D. J., H. S. TOOGOOD, J. WALLER, J. M. X. HUGHES, C. W. LEVY, J. M. GARDINER & N. S. SCRUTTON (2013): Biocatalytic Asymmetric Alkene Reduction: Crystal Structure and Characterization of a Double Bond Reductase from *Nicotiana tabacum*. *ACS Catal.* 3: 370–379.
- MARTÍNEZ, A. T., F. J. RUIZ-DUEÑAS, S. CAMARERO, A. SERRANO, D. LINDE, H. LUND, J. VIND, M. TOVBORG, O. M. HEROLD-MAJUMDAR, M. HOFRICHTER, C. LIERS, R. ULLRICH, K. SCHEIBNER, G. SANNIA, A. PISCITELLI, C. PEZZELLA, M. E. SENER, S. KILIÇ, W. J. H. VAN BERKEL, V. GUALLAR, M. F. LUCAS, R. ZUHSE, R. LUDWIG, F. HOLLMANN, E. FERNÁNDEZ-FUEYO, E. RECORD, C. B. FAULDS, M. TORTAJADA, I. WINCKELMANN, J.-A. RASMUSSEN, M. GELO-PUJIC, A. GUTIÉRREZ, J. C. DEL RÍO, J. RENCORET & M. ALCALDE (2017): Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology advances* 35: 815–831.
- MAY, S. W. (1999): Applications of oxidoreductases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 370–375.
- MESSIHA, H. L., N. C. BRUCE, B. M. SATTELLE, M. J. SUTCLIFFE, A. W. MUNRO & N. S. SCRUTTON (2005): Role of active site residues and solvent in proton transfer and the modulation of flavin reduction potential in bacterial morphinone reductase. *J. Biol. Chem.* 280: 27103–27110.
- MEYER, H.-P. & N. TURNER (2009): Biotechnological Manufacturing Options for Organic Chemistry. *MROC* 6: 300–306.
- MISSET, O. & A. VAN DIJK (1998): Diagnosing the inactivating process of enzymes. S. 3–18 in: : *Stability and Stabilization of Biocatalysts*. Progress in Biotechnology. Elsevier, Amsterdam.
- MORIKAWA, S., T. NAKAI, Y. YASOHARA, H. NANBA, N. KIZAKI & J. HASEGAWA (2014): Highly Active Mutants of Carbonyl Reductase S1 with Inverted Coenzyme Specificity and Production of Optically Active Alcohols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 544–552.
- MOUMMOU, H., Y. KALLBERG, L. B. TONFACK, B. PERSSON & B. VAN DER REST (2012): The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: Genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC plant biology* 12: 219.
- MUGFORD, P. F., U. G. WAGNER, Y. JIANG, K. FABER & R. J. KAZLAUSKAS (2008): Enantiocomplementary enzymes: Classification, molecular basis for their enantioselectivity, and prospects for mirror-image biotransformations. *Angew. Chem.* 47: 8782–8793.

- MUNOZ SOLANO, D., P. HOYOS, M. J. HERNAIZ, A. R. ALCANTARA & J. M. SANCHEZ-MONTERO (2012): Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource technology* 115: 196–207.
- MURPHY, P. M., J. M. BOLDUC, J. L. GALLAHER, B. L. STODDARD & D. BAKER (2009): Alteration of enzyme specificity by computational loop remodeling and design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 9215–9220.
- NATH, S., G. R. SATPATHY, R. MANTRI, S. DEEP & J. C. AHLUWALIA (1998): Thermal stability of alcohol dehydrogenase enzyme determined by activity assay and calorimetry. *Thermochimica Acta* 309: 193–196.
- NESTL, B. M., S. C. HAMMER, B. A. NEBEL & B. HAUER (2014): New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chem.* 53: 3070–3095.
- NESTL, B. M. & B. HAUER (2014): Engineering of Flexible Loops in Enzymes. *ACS Catal.* 4: 3201–3211.
- NISHIYAMA, M., J. J. BIRKTOFT & T. BEPPU (1993): Alteration of Coenzyme Specificity of Malate Dehydrogenase from *Thermus flavus* by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 268.
- NORDLING, E., H. JÖRNVALL & B. PERSSON (2002): Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). *Eur. J. Biochem.* 269: 4267–4276.
- NOTREDAME, C., D. G. HIGGINS & J. HERINGA (2000): T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302: 205–217.
- OCHOA-LEYVA, A., F. BARONA-GÓMEZ, G. SAAB-RINCÓN, K. VERDEL-ARANDA, F. SÁNCHEZ & X. SOBERÓN (2011): Exploring the Structure-Function Loop Adaptability of a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzyme through Loop Swapping and Hinge Variability. *J. Mol. Biol.* 411: 143–157.
- OCHOA-LEYVA, A., X. SOBERÓN, F. SÁNCHEZ, M. ARGÜELLO, G. MONTERO-MORÁN & G. SAAB-RINCÓN (2009): Protein design through systematic catalytic loop exchange in the ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> fold. *J. Mol. Biol.* 387: 949–964.
- PADHI, S. K., D. J. BOUGIOUKOU & J. D. STEWART (2009): Site-saturation mutagenesis of tryptophan 116 of *Saccharomyces pastorianus* old yellow enzyme uncovers stereocomplementary variants. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 3271–3280.
- PARADIES, J. (2014): Metal-free hydrogenation of unsaturated hydrocarbons employing molecular hydrogen. *Angew. Chem.* 53: 3552–3557.
- PAUL, C. E., S. GARGIULO, D. J. OPPERMAN, I. LAVANDERA, V. GOTOR-FERNÁNDEZ, V. GOTOR, A. TAGLIEBER, Arends, Isabel W. C. E. & F. HOLLMANN (2013): Mimicking nature: Synthetic nicotinamide cofactors for C=C bioreduction using enoate reductases. *Org. Lett.* 15: 180–183.
- PAUL, C. E. & F. HOLLMANN (2016): A survey of synthetic nicotinamide cofactors in enzymatic processes. *Appl. Microbiol. Biot.* 100: 4773–4778.
- PETERS, W., E. VAN DER KNAAP & H. KENDE (1996): The level of a mRNA with sequence similarity to the old yellow enzyme-NADPH dehydrogenase increases in *Chenopodium rubrum* cells in response to cytokinin. *Journal of Plant Physiology* 149: 233–236.

- PHILLIPS, R. S. (1996): Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: Prospects for exploitation. *Trends. Biotechnol.* 14: 13–16.
- POLTE, I. (2016): Asymmetrische Reduktion von (*R*)-Carvon durch bakterielle Zellhüllen mit immobilisierten Zweienzymsystem. Masterarbeit, Technische Universität München.
- POMPEU, Y. A., B. SULLIVAN & J. D. STEWART (2013): X-ray Crystallography Reveals How Subtle Changes Control the Orientation of Substrate Binding in an Alkene Reductase. *ACS Catal.* 3: 2376–2390.
- PUDNEY, C. R., S. HAY, J. PANG, C. COSTELLO, D. LEYS, M. J. SUTCLIFFE & N. S. SCRUTTON (2007): Mutagenesis of Morphinone Reductase Induces Multiple Reactive Configurations and Identifies Potential Ambiguity in Kinetic Analysis of Enzyme Tunneling Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 13949–13956.
- PUDNEY, C. R., S. HAY & N. S. SCRUTTON (2009): Bipartite recognition and conformational sampling mechanisms for hydride transfer from nicotinamide coenzyme to FMN in pentaerythritol tetranitrate reductase. *FEBS J.* 276: 4780–4789.
- REETZ, M. T. & G.P.L. KREBS (2011): Challenges in the directed evolution of stereoselective enzymes for use in organic chemistry. *C. R. Chim.* 14: 811–818.
- REICH, S., H. W. HOEFFKEN, B. ROSCHE, B. M. NESTL & B. HAUER (2012): Crystal structure determination and mutagenesis analysis of the ene reductase NCR. *ChemBioChem* 13: 2400–2407.
- REICH, S., N. KRESS, B. M. NESTL & B. HAUER (2014): Variations in the stability of NCR ene reductase by rational enzyme loop modulation. *J. Struct. Biol.* 185: 228–233.
- REICH, S., B. M. NESTL & B. HAUER (2016): Loop-Grafted Old Yellow Enzymes in the Bienzymatic Cascade Reduction of Allylic Alcohols. *ChemBioChem* 17: 561–565.
- REINER, E., C. S. DAVIS, B. W. SCHWAB, L. M. SCHOPFER & R. J. RICHARDSON (1987): Kinetics of heat inactivation of phenyl valerate hydrolases from hen and rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 36: 3181–3185.
- RICCA, E., B. BRUCHER & J. H. SCHRITTWIESER (2011): Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.* 353: 2239–2262.
- RICHARDS, F. M. (1977): Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* 6: 151–176.
- RIESENBERG, D., V. SCHULZ, W. A. KNORRE, H.-D. POHL, D. KORZ, E. A. SANDERS, A. ROß & W.-D. DECKWER (1991): High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20: 17–27.
- ROHDICH, F., A. WIESE, R. FEICHT, H. SIMON & A. BACHER (2001): Enoate reductases of Clostridia. Cloning, sequencing, and expression. *J. Biol. Chem.* 276: 5779–5787.
- ROLLIN, J. A., T. K. TAM & Y.-H. P. ZHANG (2013): New biotechnology paradigm: Cell-free biosystems for biomanufacturing. *Green Chem.* 15: 1708.
- ROSADO, L. A., R. A. CACERES, W. F. de AZEVEDO, L. A. BASSO & D. S. SANTOS (2012): Role of Serine140 in the mode of action of *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl-ACP Reductase (MabA). *BMC Res. Notes* 5: 526.

- ROSELL, A., E. VALENCIA, W. F. OCHOA, I. FITA, X. PARÉS & J. FARRÉS (2003): Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 278: 40573–40580.
- SCHALLER, F., C. BIEGEN, C. MÜSSIG, T. ALTMANN & E. W. WEILER (2000): 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210: 979–984.
- SCHEIN, C. H. & M. H. M. NOTEBORN (1988): Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nat. Biotechnol.* 6: 291–294.
- SHELLMAN, J. A. (1997): Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. *Biophys. J.* 73: 2960–2964.
- SCHMID, A., J. S. DORDICK, B. HAUER, A. KIENER, M. WUBBOLTS & B. WITHOLT (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258–268.
- SCHOLTISSEK, A., D. TISCHLER, A. WESTPHAL, W. VAN BERKEL & C. PAUL (2017): Old Yellow Enzyme-Catalysed Asymmetric Hydrogenation: Linking Family Roots with Improved Catalysis. *Catalysts* 7: 130.
- SCRUTTON, N. S., A. BERRY & R. N. PERHAM (1990): Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343: 38–43.
- SEIBERT, C. M. & F. M. RAUSHEL (2005): Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 44: 6383–6391.
- SELLÉS VIDAL, L., C. L. KELLY, P. M. MORDAKA & J. T. HEAP (2018): Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochim. Biophys. Acta* 1866: 327–347.
- SHELDON, R. A. (2007): Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc.* 35: 1583–1587.
- SHELDON, R. A. & J. M. WOODLEY (2018): Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* 118: 801–838.
- SHIRAIISHI, N., C. CROY, J. KAUR & W. H. CAMPBELL (1998): Engineering of pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase: Mutagenesis of recombinant cytochrome b reductase fragment of *Neurospora crassa* NADPH:Nitrate reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 358: 104–115.
- SILVA, V. D., B. U. STAMBUK & M. d. G. NASCIMENTO (2012): Asymmetric reduction of (4R)-(-)-carvone catalyzed by Baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 77: 98–104.
- SPIEGELHAUER, O., F. DICKERT, S. MENDE, D. NIKS, R. HILLE, M. ULLMANN & H. DOBBEK (2009): Kinetic characterization of xenobiotic reductase A from *Pseudomonas putida* 86. *Biochemistry* 48: 11412–11420.
- SPIEGELHAUER, O., T. WERTHER, S. MENDE, S. H. KNAUER & H. DOBBEK (2010): Determinants of substrate binding and protonation in the flavoenzyme xenobiotic reductase A. *J. Mol. Biol.* 403: 286–298.



- STUERMER, R., B. HAUER, M. HALL & K. FABER (2007): Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 203–213.
- TAGLIEBER, A., F. SCHULZ, F. HOLLMANN, M. RUSEK & M. T. REETZ (2008): Light-driven biocatalytic oxidation and reduction reactions: Scope and limitations. *ChemBioChem* 9: 565–572.
- TAKASE, R., B. MIKAMI, S. KAWAI, K. MURATA & W. HASHIMOTO (2014): Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *J. Biol. Chem.* 289: 33198–33214.
- TAMAKAWA, H., S. IKUSHIMA & S. YOSHIDA (2011): Ethanol production from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain expressing protein-engineered xylose reductase and xylitol dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1994–2000.
- TISHKOV, V. I. & V. O. POPOV (2006): Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol. Eng.* 23: 89–110.
- TONIN, F., L. G. OTTEN & Arends, Isabel W. C. E. (2018): NAD<sup>+</sup>-Dependent Enzymatic Route for the Epimerization of Hydroxysteroids. *ChemSusChem*.
- TOOGOOD, H. S., A. FRYSZKOWSKA, M. HULLEY, M. SAKUMA, D. MANSELL, G. M. STEPHENS, J. M. GARDINER & N. S. SCRUTTON (2011): A site-saturated mutagenesis study of pentaerythritol tetranitrate reductase reveals that residues 181 and 184 influence ligand binding, stereochemistry and reactivity. *ChemBioChem* 12: 738–749.
- TOOGOOD, H. S., J. M. GARDINER & N. S. SCRUTTON (2010): Biocatalytic Reductions and Chemical Versatility of the Old Yellow Enzyme Family of Flavoprotein Oxidoreductases. *ChemCatChem* 2: 892–914.
- TOOGOOD, H. S. & N. S. SCRUTTON (2014): New developments in 'ene'-reductase catalysed biological hydrogenations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19: 107–115.
- TOOGOOD, H. S. & N. S. SCRUTTON (2018): Discovery, Characterization, Engineering, and Applications of Ene-Reductases for Industrial Biocatalysis. *ACS Catal.* 8: 3532–3549.
- TROTTER, E. W., E. J. COLLINSON, I. W. DAWES & C. M. GRANT (2006): Old Yellow Enzymes Protect against Acrolein Toxicity in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4885–4892.
- TUNGLER, A. & G. FOGASSY (2001): Catalysis with supported palladium metal, selectivity in the hydrogenation of C=C, C=O and C=N bonds, from chemo- to enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 173: 231–247.
- UPPADA, V., S. BHADURI & S. B. NORONHA (2014): Cofactor regeneration - an important aspect of biocatalysis. *Curr. Sci.* 106: 946–957.
- VAN DEN HEMEL, D., A. BRIGE, S. N. SAVVIDES & J. VAN BEEUMEN (2006): Ligand-induced Conformational Changes in the Capping Subdomain of a Bacterial Old Yellow Enzyme Homologue and Conserved Sequence Fingerprints Provide New Insights into Substrate Binding. *J. Biol. Chem.* 281: 28152–28161.
- VAZ, A. D. N., S. CHAKRABORTY & V. MASSEY (1995): Old yellow enzyme: Aromatization of cyclic enones and the mechanism of a novel dismutation reaction. *Biochemistry* 34: 4246–4256.

- VERA, A., N. GONZÁLEZ-MONTALBÁN, A. ARÍS & A. VILLAVERDE (2007): The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 96: 1101–1106.
- WALTON, A. Z., W. C. CONERLY, Y. POMPEU, B. SULLIVAN & J. D. STEWART (2011): Biocatalytic Reductions of Baylis–Hillman Adducts. *ACS Catal.* 1: 989–993.
- WALTON, A. Z., B. SULLIVAN, A. C. PATTERSON-ORAZEM & J. D. STEWART (2014): Residues Controlling Facial Selectivity in an Alkene Reductase and Semirational Alterations to Create Stereocomplementary Variants. *ACS Catal.* 4: 2307–2318.
- WANG, H.-B., X.-Q. PEI & Z.-L. WU (2014): An enoate reductase Achr-OYE4 from *Achromobacter* sp. JA81: Characterization and application in asymmetric bioreduction of C=C bonds. *Appl. Microbiol. Biot.* 98: 705–715.
- WANG, L., D. JI, Y. LIU, Q. WANG, X. WANG, Y. J. ZHOU, Y. ZHANG, W. LIU & Z. K. ZHAO (2017): Synthetic Cofactor-Linked Metabolic Circuits for Selective Energy Transfer. *ACS Catal.* 7: 1977–1983.
- WARBURG, O. & W. CHRISTIAN (1932): Über das neue Oxydationsferment. *Naturwissenschaften* 20: 980–981.
- WICHMANN, R. & D. VASIC-RACKI (2005): Cofactor Regeneration at the Lab Scale. S. 225–260 in: U. KRAGL & A. AIVASIDIS (Hrsg.): *Technology transfer in biotechnology: From lab to industry to production. Advances in biochemical engineering, biotechnology* 92. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Deutschland.
- WIERENGA, R.K. (2001): The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* 492: 193–198.
- WILLIAMS, R. E. & N. C. BRUCE (2002): 'New uses for an Old Enzyme' - the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. *Microbiol.* 148: 1607–1614.
- WILMS, B., A. HAUCK, M. REUSS, C. SYLDATK, R. MATTES, M. SIEMANN & J. ALTENBUCHNER (2001): High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 95–103.
- WILSON, A. C. & A. B. PARDEE (1962): Regulation of flavin synthesis by *Escherichia coli*. *Journal of general microbiology* 28: 283–303.
- WINKLER, C. K., D. CLAY, S. DAVIES, P. O'NEILL, P. MCDAID, S. DEBARGE, J. STEFLIK, M. KARMILOWICZ, J. W. WONG & K. FABER (2013): Chemoenzymatic asymmetric synthesis of pregabalin precursors via asymmetric bioreduction of  $\beta$ -cyanoacrylate esters using ene-reductases. *J. Org. Chem.* 78: 1525–1533.
- WINKLER, C. K., G. TASNÁDI, D. CLAY, M. HALL & K. FABER (2012): Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. *J. Biotechnol.* 162: 381–389.
- WOLFENDEN, R. & M. J. SNIDER (2001): The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Acc. Chem. Res.* 34: 938–945.
- WONG, T., D. ZHURINA & U. SCHWANEBERG (2006): The Diversity Challenge in Directed Protein Evolution. *CCHTS* 9: 271–288.

- WOODLEY, J. M. (2013): Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17: 310–316.
- WOODYER, R., W. A. VAN DER DONK & H. ZHAO (2003): Relaxing the nicotinamide cofactor specificity of phosphite dehydrogenase by rational design. *Biochemistry* 42: 11604–11614.
- WU, H., C. TIAN, X. SONG, C. LIU, D. YANG & Z. JIANG (2013): Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chem.* 15: 1773.
- WU, J. T., L. H. WU & J. A. KNIGHT (1986): Stability of NADPH: Effect of Various Factors on Kinetics of Degradation. *Clin. Chem.* 32: 314–319.
- WULF, H., H. MALLIN & U. T. BORNSCHEUER (2012): Protein engineering of a thermostable polyol dehydrogenase. *Enzyme Microb. Technol.* 51: 217–224.
- YANG, J. W., M. T. HECHAVARRIA FONSECA, N. VIGNOLA & B. LIST (2005): Metal-Free, Organocatalytic Asymmetric Transfer Hydrogenation of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes. *Angew. Chem.* 117: 110–112.
- YAOI, T., K. MIYAZAKI, T. OSHIMA, Y. KOMUKAI & M. GO (1996): Conversion of the Coenzyme Specificity of Isocitrate Dehydrogenase by Module Replacement. *J. Biochem.* 119: 1014–1018.
- YOU, C., R. HUANG, X. WEI, Z. ZHU & Y.-H. P. ZHANG (2017): Protein engineering of oxidoreductases utilizing nicotinamide-based coenzymes, with applications in synthetic biology. *Synthetic Syst. Biotechnol.* 2: 208–218.
- YOU, Z.-N., Q. CHEN, S.-C. SHI, M.-M. ZHENG, J. PAN, X.-L. QIAN, C.-X. LI & J.-H. XU (2018): Switching Cofactor Dependence of 7 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase for Cost-Effective Production of Ursodeoxycholic Acid. *ACS Catal.* 9: 466–473.
- ZHAO, H. & W. A. VAN DER DONK (2003): Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 583–589.

## 12 Anhang

### 12.1 Allgemeines Material

#### 12.1.1 Geräte

**Tabelle 12.1:** Allgemeine Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Blue Line 14	pH-Elektrode	Schott AG, Mainz, Deutschland
AOC-20s	Autosampler	Shimadzu Corp., Kyōto, Japan
Autoklav 5075 ELV	Autoklav	Systeme GmbH, Karlsruhe, Deutschland
C.A 862 Thermometer	Thermometer	Chauvin Arnaud, Paris, Frankreich
Comfort No Frost -20 °C	Tiefkühlschrank	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
D-6010	Rühr- und Heizplatte	neoLab Migge GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine AF80	Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophorese- Kammer P8DS	Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Elektrophorese- Stromquelle E 802	Gelelektrophorese	Consort, Fournhout bvba, Belgien
Explorer T2914	Analysenwaage	OHAUS, Gießen, Deutschland
Extend ED 1245	Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
FD 53 L	Trockenschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
GC-2010 Plus	Gaschromatograph	Shimadzu Corp., Kyōto, Japan
Gel iX Imager	Geldokumentation	Intas-Science-Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Heraeus Fresco 17	Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HisPur™ Ni-NTA Spin Säulen (3 mL)	Säulen für Affinitätschromatographie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
IKA-Combimag Ret	Magnetrührgerät	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Infinite M200	V96 Well Mikrotiter- plattenphotometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
IPP 500	Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Julabo Se 12	Temperierbares Wasserbad	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland

**Tabelle 12.1:** Allgemeine Laborgeräte (Fortsetzung)

<b>Gerät</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Köttermann 8511	Sicherheitswerkbank	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, Deutschland
Lab 850	pH-Messinstrument	Schott AG, Mainz, Deutschland
Labcycler	Thermocycler	SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikro 20	Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
MJ MiniTM Personal	Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
MTS 2/4	Mikrotiterplatten Schüttler	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
MultiscanTM FC	UV/VIS-Photometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Multitron	Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
MW 781	Mikrowelle	CLATRONIC® International GmbH, Kempen, Deutschland
neoMix Q-Thermoshaker	Thermomixer	Quantifoil Instruments GmbH, Jena, Deutschland
Perfect Spin Mini	Zentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reax top	Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Rotanta 460R	Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Rotixa 50RS	Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
SANYO ultra low MDF-394	Tiefkühlschrank (-80°C)	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Schwingarmmühle MM200	Homogenisator	Retsch, Haan, Deutschland
Shaker-DTS	V96 Well Mikrotiterplatten-Thermoschüttler	neoLab Migge GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Sonopuls UW 2070	Ultraschallhomogenisator	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Stabthermometer	Thermometer	Smart Living Ltd, Hongkong, China
Transferpipette® S	Pipette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Transferpipette®-8 electronic	Mehrfach-Pipette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
TS-100	Thermoschüttler	Biosan Medical-Biological Research & Technologies, Riga, Lettland
Typ TGN 87-60	Schüttler	Groschopp AG, Viersen, Deutschland
Ultra-Turrax	Homogenisator	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

**Tabelle 12.1:** Allgemeine Laborgeräte (Fortsetzung)

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Varioklav 500 E	Autoklav	H + P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Variolab Mobilien W90	Sicherheitswerkbank	Waldner-Laboreinrichtungen GmbH, Wangen, Deutschland
Variomag Multipoint 15	Rührplatte	H + P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Vortex Mixer	Homogenisator	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad Typ 1002	Wasserbad	GFL, Hannover, Deutschland
WiseCube WIS-20	Schüttelinkubator	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland

**Tabelle 12.2:** Komponenten des DASGIP® Parallel Bioreactor Systems

Komponente	Spezifikation	Hersteller
1,5 L-Rührkesselreaktor mit oben eintauchender Rührwelle	SR07000DLS	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Antischaumsonde	Level Sensor OD 4mm, L275 mm, Li 235 mm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gasmischstation	MX4/4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Luftfilter	Midisart 2000	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mehrkanalschlauchpumpe	MP8	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Elektrode	405 DPAS SC-K8S/225	Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA
pO <sub>2</sub> -Elektrode	Visiform D12mm, L225mm	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Rührer- und Temperaturregelungseinheit	TC4SC4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rührerantrieb	RE40, Maxon Motor	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Steuerungseinheit mit Reaktortemperierung und Abluftkühlung	CWD 4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Temperatursensor	Pt100/0	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 12.1.2 Verbrauchsmaterialien

Neben den üblichen im Labor verwendeten Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäßen, Handschuhe, Küchenrolle,...), kamen spezielle Verbrauchsmaterialien zur Anwendung. Diese werden in Tabelle 12.3 aufgelistet.

**Tabelle 12.3:** Verwendete spezielle Verbrauchsmaterialien

Material	Anwendung	Hersteller
Amberlite® XAD4	Adsorberharz	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (10 kDa)	Dialyse/Konzentration	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dialysiermembran ZelluTrans T3 (12-14 kDa)	Dialyse	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter, 0,2 µm	Filtration	neoLab GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Glasperlen, Ø 0,25-0,50 mm	Homogenisation	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Halbmikroküvetten	photometrische Messungen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Helium 99.999 % (v/v)	Gaschromatographie	Air Liquide, Paris, Frankreich
HisPur™ Ni-NTA Zentrifugensäulen (3 mL)	Proteinreinigung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kreuzmagnetührstäbchen, Ø 10 mm	Biotransformationen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrospitze MS72	Ultraschall-homogenisation	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Mikrospitze MS73	Ultraschall-homogenisation	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Reagenzröhre (13mL)	Zellkultivierung	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spitzenvorsatzfilter Chromafil RC-20/15 MS, 0,2 µm	Filtration	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Titanteller TT13	Ultraschall-homogenisation	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
V96 Well Mikrotiterplatte	photometrische Messungen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Wasserstoff 99.999 % (v/v)	Gaschromatographie	Air Liquide, Paris, Frankreich

### 12.1.3 Biologisches Material

**Tabelle 12.4:** Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Lieferant
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB-mB-) $\lambda$ (DE3[ <i>lacI lacUV5- T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Novagen, San Diego, USA
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pir	<i>endA1 hsdR17 glnV44</i> (=supE44) <i>thi-1 recA1 gyrA96 relA1 <math>\phi</math>80dlac<math>\Delta</math>(lacZ)M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 zdg-232::Tn10 uidA::pir+</i>	Professur für Systembiotechnologie, TU München, Deutschland
<i>E. coli</i> XL10-Gold®	Tetr $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZ<math>\Delta</math>M15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr]	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

**Tabelle 12.5:** Im Rahmen der Arbeit erhaltene Plasmide und ihre Bezugsquelle.

Name	Quelle
pET28a(+)	Florian Sedlmaier, BioVT TU München, Deutschland
pET28a(+)-NostocER1_N-His <sub>6</sub>	Dr. Yilei Fu, BioVT TU München, Deutschland
pET28a(+)-AcaryoER1_N-His <sub>6</sub>	Dr. Yilei Fu, BioVT TU München, Deutschland
pET28-MCS1-NostocER1-FDH3M	Dr. Yilei Fu, BioVT TU München, Deutschland



### 12.1.4 Chemikalien

**Tabelle 12.6:** Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
(+)-Dihydrocarvon (Isomerenmischung)	98,0 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
(R)-Carvon	98,0 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
(R)-Limonen	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Agar-Agar	-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumcitrat	≥ 97,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	98,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R250	-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose · H <sub>2</sub> O	≥ 98,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA-Na <sub>2</sub>	≥ 99,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	≥ 99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureethylester	≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureethylester	≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FeCl <sub>3</sub>	≥ 97,0 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Glycerin	≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCl	32,0 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	-	Deutsche Hefewerke GmbH, Nürnberg, Deutschland
Imidazol	99,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 12.6:** Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

<b>Chemikalie</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Hersteller</b>
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	$\geq 99,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$K_2HPO_4$	$\geq 99,0$ %	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kanamycinsulfat	-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$KH_2PO_4$	$\geq 99,0$ %	CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland
Maleimid	99,0 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$\geq 99,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$MnSO_4 \cdot H_2O$	$\geq 99,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	99,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$Na_2HPO_4$	$\geq 99,0$ %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaCl	$\geq 99,0$ %	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
NAD <sup>+</sup>	$\geq 97,5$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NADH-Na2	$\geq 98,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NADPH-Na4	$\geq 97,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	$\geq 99,0$ %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaOH	$\geq 99,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	$\geq 85,0$ %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumformiat	$\geq 99,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$NH_4Cl$	$\geq 99,0$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pepton aus Casein	-	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Riboflavin 5'-monophosphat-Na $\cdot$ xH <sub>2</sub> O (FMN)	> 70 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Thiamin Hydrochlorid	$\geq 99,0$ %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
TRIS Pufferan®	$\geq 99,9$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$\geq 99,0$ %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	99,0 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 12.1.5 Enzyme, Standards und Kits

**Tabelle 12.7:** Verwendete Enzyme, Standards und Kits

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
100 bp DNA Standard	Nippon Genetics Co. Ltd, Tokio, Japan
Antartic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastGene® TAQ Ready Mix + dye	Nippon Genetics Co. Ltd, Tokio, Japan
FastGene® Gel/PCR Extraction Kits	Nippon Genetics Co. Ltd, Tokio, Japan
FastGene® Plasmid Mini Kit	Nippon Genetics Co. Ltd, Tokio, Japan
JustBlue Protein Marker	Nippon Genetics Co. Ltd, Tokio, Japan
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs, Ipswich, USA
OneTaq® 2x Master Mix with Standard Buffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
OneTaq® DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Quick Ligase™ Kit	New England Biolabs, Ipswich, USA
QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Restriktionsenzym BamHI-HF®	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym DpnI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym NcoI-HF®	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym NdeI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym NheI-HF®	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym SacI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym XhoI	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA

### 12.1.6 Oligonukleotide

**Tabelle 12.8:** Für die Amplifizierung der gesamten wildtypischen Gene und der modifizierten nostocER1-Gene verwendete Oligonukleotide. Neben der Sequenz wird die Anlagerungstemperaturen (T) für die Nutzung der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase in Standard HF-Puffer angegeben. Die Schnittstellen werden fett, die start/stop codons unterstrichen dargestellt.

Name	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1-NdeI-for	GGAATT <b>CCATATG</b> TCTACCAACATCAACCTATTC	60
nostocER1-BamHI-rev	CGC <b>GGATCC</b> TTACTTATTAGCAACTGCTAAAAATGG	60
acaryoER1-NheI-for	CTAG <b>GCTAGC</b> ATGTCAATTTTCATCCGTG	57
acaryoER1-BamHI-rev	CGC <b>GGATCC</b> CTATGCGGCAGTTATTAGTG	57
achrOYE4_NdeI_fw	ggaattc <b>CATATG</b> AATACACCGGATCCGC	59
achrOYE4_SacI_rev	ggttac <b>GAGCTC</b> TTATGCACGATCCGGA	59

**Tabelle 12.9:** Oligonukleotide für die mittels QuikChange® Lightning Kit durchgeführte ortsgerichtete Mutagenese zum Austausch von *Loop*-Regionen. Nichtübereinstimmende Basen werden in Großbuchstaben dargestellt. Die angegebene Anlagerungstemperatur (T) entspricht dem mit dem Kit angewendeten Wert.

Name	Spender	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1( <i>Loop1</i> )_fw	acaryoER1	gatggctcctttaaccaga <b>GGaaga</b> Tctggtgagggga aatgtacc	78
nostocER1( <i>Loop1</i> )_rev	acaryoER1	ggtacattccctcaccag <b>AtcttCC</b> tctggtaaaggag ccatc	78
nostocER1( <i>Loop1</i> )_fw	achrOYE4	gatggctcctttaaccaga <b>TCaagagct</b> ggtgagggga aat	78
nostocER1( <i>Loop1</i> )_rev	achrOYE4	attccctcaccagctctt <b>G</b> Atctggtaaaggagccatc	78
nostocER1( <i>Loop2a</i> )_fw	acaryoER1	gtgcttcagcaggattaattattaccgaagctacc	78
nostocER1( <i>Loop2a</i> )_rev	acaryoER1	gggtagcttcggaataattaatcctgctgaagcac	78

**Tabelle 12.10:** Vor (fw)- und Rückwärts (rev)-Oligonukleotide beziehungsweise Gruppen von Oligonukleotide für die Assemblierung von DNA-Fragmenten, welche durch die Assemblierung nach Gibson zu den entsprechenden Genen zusammengeführt wurden. Die Anlagerungstemperatur (T) entspricht der Nutzung der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase in Standard HF-Puffer.

Name	Donor	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1( <i>Loop2a</i> )_fw	achrOYE4	GATTAATTGTCAGCGAAGGCACCCAG GTGACACCC	67
nostocER1( <i>Loop2a</i> )_rev	achrOYE4	CTGGGTGCCTTCGCTGACAATTAATC CTGCTGAAGCACG	67
nostocER1( <i>Loop2b</i> )_fw	acaryoER1	GGCGGGCTGGTCTGAAACACCAGGC ATCCATTC	62
nostocER1( <i>Loop2b</i> )_rev	acaryoER1	TCAGACCAGCCCGCCGCTTGGGGTG TCACCTGG	62
nostocER1( <i>Loop2b</i> )_fw	achrOYE4	GGGCTACGCCGGCACACCAGGCATC CATTCC	64
nostocER1( <i>Loop2b</i> )_rev	achrOYE4	GCCGGCGTAGCCCTTTCCTTGGGGT GTCACCT	64
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_1	acaryoER1	GGCACGTCGGCAGAGCCTCTCATCC AG	56
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_2	acaryoER1	GTGCCCCATTCAACTGAAAATCTGGA TGAGAGGCTCTGC	56
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_3	acaryoER1	AGATTTTCAGTTGAATGGGGCACGAC CGATTTCTGCCT	56
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_4	acaryoER1	CTGCTGGCTTAATCGCCGAGGCAGAA ATCGGTCTGTG	56
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_5	acaryoER1	GGCGATTAAGCCAGCAGGTGAAGTCT TAACTTATGAAGG	56
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_6	acaryoER1	AGGTTTCTTGCCTTCATAAGTTAAGAC TTCACCTG	56
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_fw	achrOYE4	CAGCCTGCTGGGCGGGCAGGCGCCC GTGTCGTCGTCAGCCATTGCGCC	62
nostocER1( <i>Loop3a</i> )_rev	achrOYE4	CCGCCCAGCAGGCTGGTGTGGCTCA GTCTGCCGACGTGCC	62
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_1	acaryoER1	TCAGCCATTGCGCCTAAAGGTGAAGT CCAT	56
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_2	acaryoER1	GGTTTCTTACCCTGCGGAGTATGGAC TTCACCTTTAGGCG	56
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_3	acaryoER1	CTCCGCAGGGTAAGAAACCATTTGTT ACGCCTCGTGCTTT	56
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_4	acaryoER1	GATGTGTCCAAAGCACGAGGCGTAA CAAATG	56

Tabelle 12.10: Fortsetzung

Name	Donor	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_1	achrOYE4	TCAGCCATTGCGCCTAAAGGCGTCAAT GTTTTTCATCG	50
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_2	achrOYE4	TGGGGCTGCCGTCCTCGTTCTCGATGA AAACATTGACGCCTTTAGGC	50
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_3	achrOYE4	GAACGAGGACGGCAGCCCCAACTTCGT GCAGGCGTCTGCGCC	50
nostocER1( <i>Loop3b</i> )_4	achrOYE4	TGTGTCCAAAGCACGAGGCGCAGACGC CTGC	50
nostocER1( <i>Loop5</i> )_fw	acaryoER1	GAATGCCTTTAATGACATGCGTGACTCT CATCCTTTAGAAACAT	62
nostocER1( <i>Loop5</i> )_rev	acaryoER1	CATGTCATTAAGGCATTTCGTAGGCGAT AGTCTGACTCCTACC	62
nostocER1( <i>Loop5</i> )_fw	achrOYE4	ACCACGCTCAATGGCTGCGTGGACTCTC ATCCTTTAGAAACATTTG	62
nostocER1( <i>Loop5</i> )_rev	achrOYE4	GCAGCCATTGAGCGTGGTCAGAGGCGAT AGTCTGACTCCTACC	62
nostocER1( <i>Loop6</i> )_fw	acaryoER1	TGAAGCCTTGCAAGGGCATATGCTGCAT GGTGGCACAGTTGTAC	60
nostocER1( <i>Loop6</i> )_rev	acaryoER1	GCCCTTGCAAGGCTTCAAGGACATGTAA ATAGGATAAGTTGAAGCGG	60
nostocER1( <i>Loop6</i> )_fw	achrOYE4	CGAGGCCGACTGGGACGATGCGCATGG TGGCACAGTTGTAC	60
nostocER1( <i>Loop6</i> )_rev	achrOYE4	GTCCCAGTCGGCCTCGGCGATATGTAAA TAGGATAAGTTGAAGCG	60
nostocER1( <i>Loop8</i> )_fw	acaryoER1	CCGGGTATAGAACGTGGAGGGGTCTGC CTGATTGAGTG	67
nostocER1( <i>Loop8</i> )_rev	acaryoER1	CCGGGTATAGAACGTGGAGGGGTCTGC CTGATTGAGTG	67
nostocER1( <i>Loop8</i> )_fw	achrOYE4	CGCGACACCCTGTTTGGTGGTGGTGAAA AAGGCTAT	67
nostocER1( <i>Loop8</i> )_rev	achrOYE4	CCAAACAGGGTGTGCGGGTCTGCCTGAT TGAGTGGTG	67

**Tabelle 12.11:** Oligonukleotide für die mittels QuikChange® Lightning Kit durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen für die Sättigungsmutagenese der NostocER1 Position Q30. Die angegebene Anlagerungstemperatur (T) entspricht dem mit dem Kit angewendeten Wert.

Name	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1-Q30A_fw	gatggctccttaaccagagcaagagctggtgagggaaat	79
nostocER1-Q30A_rev	attccctcaccagctcttgctctggttaaaggagccatc	79
nostocER1-Q30C_fw	cggatagtgatggctccttaaccagatgcagagctggtgaggg	80
nostocER1-Q30C_rev	ccctcaccagctctgcatctggttaaaggagccatcactatccg	80
nostocER1-Q30D_fw	gatagtgatggctccttaaccagagacagagctggtgagg	80
nostocER1-Q30D_rev	cctcaccagctctgtctctggttaaaggagccatcactatc	80
nostocER1-Q30E_fw	ggctccttaaccagagaaagagctggtgaggg	80
nostocER1-Q30E_rev	ccctcaccagctctttctctggttaaaggagcc	80
nostocER1-Q30F_fw	cggatagtgatggctccttaaccagatttagagctggtgaggg	80
nostocER1-Q30F_rev	ccctcaccagctctaaatctggttaaaggagccatcactatccg	80
nostocER1-Q30G_fw	gatggctccttaaccagaggaagagctggtgagggaaat	79
nostocER1-Q30G_rev	attccctcaccagctcttctctggttaaaggagccatc	79
nostocER1-Q30H_fw	gtgatggctccttaaccagacacagagctggtgag	80
nostocER1-Q30H_rev	ctcaccagctctgtgtctggttaaaggagccatcac	80
nostocER1-Q30I_fw	gatggctccttaaccagaataagagctggtgagggaaat	78
nostocER1-Q30I_rev	attccctcaccagctcttattctggttaaaggagccatc	78
nostocER1-Q30K_fw	ggctccttaaccagaaaaagagctggtgaggg	79
nostocER1-Q30K_rev	ccctcaccagctcttttctggttaaaggagcc	79
nostocER1-Q30L_fw	gctccttaaccagactaagagctggtgagga	79
nostocER1-Q30L_rev	tcctcaccagctcttagtctggttaaaggagc	79
nostocER1-Q30M_fw	cggatagtgatggctccttaaccagaatgagagctggtgaggg	80
nostocER1-Q30M_rev	ccctcaccagctctcattctggttaaaggagccatcactatccg	80
nostocER1-Q30N_fw	gatagtgatggctccttaaccagaaacagagctggtgagg	79
nostocER1-Q30N_rev	cctcaccagctctgttctggttaaaggagccatcactatc	79
nostocER1-Q30P_fw	gctccttaaccagaccaagagctggtgagggga	79
nostocER1-Q30P_rev	tcctcaccagctcttggtctggttaaaggagc	79

Tabelle 12.11: Fortsetzung

Name	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1-Q30R_fw	gctccttaaccagacgaagagctggtgagggga	79
nostocER1-Q30R_rev	tcctcaccagctcttcgctctggtaaaggagc	79
nostocER1-Q30T_fw	gatggctccttaaccagaacaagagctggtgagggaaat	78
nostocER1-Q30T_rev	attccctcaccagctctgttctggtaaaggagccatc	78
nostocER1-Q30V_fw	gatggctccttaaccagagtaagagctggtgagggaaat	79
nostocER1-Q30V_rev	attccctcaccagctcttactctggtaaaggagccatc	79
nostocER1-Q30W_fw	cggatagtgatggctccttaaccagatggagagctggtgaggg	80
nostocER1-Q30W_rev	ccctcaccagctctccatctggtaaaggagccatcactatccg	80
nostocER1-Q30Y_fw	gatagtgatggctccttaaccagatacagagctggtgagg	79
nostocER1-Q30Y_rev	cctcaccagctctgtatctggtaaaggagccatcactatc	79
nostocER1-Q30T_fw	gatggctccttaaccagaacaagagctggtgagggaaat	78
nostocER1-Q30T_rev	attccctcaccagctctgttctggtaaaggagccatc	78
nostocER1-Q30V_fw	gatggctccttaaccagagtaagagctggtgagggaaat	79
nostocER1-Q30V_rev	attccctcaccagctcttactctggtaaaggagccatc	79
nostocER1-Q30W_fw	cggatagtgatggctccttaaccagatggagagctggtgaggg	80
nostocER1-Q30W_rev	ccctcaccagctctccatctggtaaaggagccatcactatccg	80
nostocER1-Q30Y_fw	gatagtgatggctccttaaccagatacagagctggtgagg	79
nostocER1-Q30Y_rev	cctcaccagctctgtatctggtaaaggagccatcactatc	79



**Tabelle 12.12:** Oligonukleotide für die mittels QuikChange® Lightning Kit durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen für die Sättigungsmutagenese der NostocER1 Position A57. Die angegebene Anlagerungstemperatur (T) entspricht dem mit dem Kit angewendeten Wert.

Name	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1-A57C_fw	acgtgcttcagcaggattaattatttgcgaagctaccag	78
nostocER1-A57C_rev	ctgggtagcttcgcaaataattaatcctgctgaagcacgt	78
nostocER1-A57F_fw	caacgtgcttcagcaggattaattatttgcgaagctaccag	79
nostocER1-A57F_rev	cctgggtagcttcgaaaataattaatcctgctgaagcacgttg	79
nostocER1-A57L_fw	acgtgcttcagcaggattaattattctcgaagctaccag	78
nostocER1-A57L_rev	ctgggtagcttcgagaataattaatcctgctgaagcacgt	78
nostocER1-A57S_fw	gtgcttcagcaggattaattattccgaagctacc	78
nostocER1-A57S_rev	gggtagcttcggaaataattaatcctgctgaagcac	78
nostocER1-A57V_fw	ttcagcaggattaattattgtcgaagctaccaggtg	78
nostocER1-A57V_rev	cacctgggtagcttcgacaataattaatcctgctgaa	78

**Tabelle 12.13:** Zur Bereitstellung der Plasmide für die Coexpression von NostocER1 und FDH verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz, 5' → 3'	T, °C
nostocER1-NcoI-for	GGAATTCCCATGGGCTCTACCAACATCAACCTAT TCTCT	60
nostocER1-BamHI-rev	CGCGGATCCTTACTTATTAGCAACTGCTAAAAAT GG	60
fdh-NdeI-fw	AGGAATTCCATATGGCAAAGGTCCTGTGCGT	59
fdh-KpnI-rev	CAATTGGTACCTTCAGACCGCCTTCTTG	59

### 12.1.7 Gen- und Proteinsequenzen

**Tabelle 12.14:** Gen- (nostocER1) und Proteinsequenz (NostocER1) der Enreduktase 1 aus *Nostoc* sp. PCC7120. Der unterstrichene und fett markierte Bereich stellt den Beginn der um 37 Aminosäuren verkürzten NostocER1 dar.

Name	Sequenz, 5' → 3'
nostocER1	<p>GTGTCTGATGAAGCAGAGAGGCAAAGGGGAAATAACCTGTATAAGAA  CTCTCCTCTGCTCCCTGTTTCTATCTCTCAAGTATCCACATCCCAATTA  CGAGAAACTGAGATT <b>ATG</b>TCTACCAACATCAACCTATTCTCTTCCCTACC  AATTGGGAGAACTAGAATTACCCAACCGGATAGTGATGGCTCCTTTAA  CCAGACAAAGAGCTGGTGAGGGAAATGTACCGCATCAACTTAATGCT  ATCTACTATGGTCAACGTGCTTCAGCAGGATTAATTATTGCCGAAGCT  ACCCAGGTGACACCCCAAGGACAAGGGTATCCCCATACACCAGGCAT  CCATTCCCCAGAACAAGTAGCAGGGTGGAAACTAGTAAGTACTGACTGT  ACATCAACAAGGGGGCAGAATTTTTCTGCAACTGTGGCACGTCGGCA  GAATATCTCACCTGACTTGCAGCCAGATGGGGGATTACCTGTAGCA  CCTTCAGCCATTGCGCCTAAAGGTGAGGTATTAAGTTATGAAGGCAAG  AAACCTTATGTTACGCCTCGTGCTTTGGACACATCAGAAATTCCCGCT  ATTGTGCAACAATATCGCCAAGGGGGCTGCAAACGCCCTAGCGGCTGG  GTTTGATGGTGTAGAAATTCATGCTGCCAATGGTTATTTAATCGACCA  GTTTCTTAGAGATGGGACGAATCAACGTACAGACGAGTATGGGGGTG  CGATTGAGAATCGCGCCCGACTTTTATTAGAAGTAACCGAGGGCGATAA  CAAGTGTGTGGGATTCCCAAAGGGTAGGAGTCAGACTATCGCCTAGT  GGGACATTTAACGATATCCGTGACTCTCATCCTTTAGAAACATTTGGTT  ACGTAGCTCAAGCACTGAACCGCTTCAACTTATCCTATTTACATATCTT  TGAAGCTATAGACGCAGACATTAGACATGGTGGCACAGTTGTACCTAC  TAGCCATCTACGCGATCGCTTTACAGGTACACTCATTGTTAATGGTGG  TTATACCCGTGAAAAAGGCGATACTGTCATAGCCAACAAAGCAGCAGA  TTTAGTTGCCTTTGGGACGCTGTTTATCTCCAATCCTGATTTACCTGAA  CGCCTAGAGGTGAACGCACCACTCAATCAGGCAGACCCCAACCTT  TTATGGTGGTGGTAAAAAGGCTATACAGATTATCCATTTTTAGCAGTT  GCTAATAAGTAA</p>
NostocER1	<p>MSDEAERQRGNNLYKNSPLLPVVISQVSTSQLRETEI <b>M</b>STNINLFSSYQL  GELELPNRIVMAPLTRQRAGEGNVPHQLNAIYYGQRASAGLIAEATQVTP  QQQGYPHTPGIHSPEQVAGWKLVTDTVHQQGGRIFLQLWHVGRISHPDL  QPDGGLPVAPSAIAPKGEVLTYEGKKPYVTPRALDTSEIPAIVEQYRQGA  ANALAAGFDGVEIHAANGYLIDQFLRDGTNQRTEYGGAIENRARLLLEV  TEAITSVWDSQRVGVRLSPSGTFNDIRDHPLETFGYVAQALNRFNLSYL  HIFEAIDADIRHGGTVVPTSHLRDRFTGLIVNGGYTREKGDVIANKAAD  LVAFGTLFISNPDLPERLEVNAPLNQADPTTFYGGGEKGYTDYPFLAVAN  K</p>

**Tabelle 12.15:** Gen- (acaryoER1) und Proteinsequenz (AcaryoER1) der Enreduktase 1 aus *Acaryochloris marina*.

Name	Sequenz, 5' → 3'
acaryoER1	ATGTCAATTTTCATCCGTGTTTCGAACCCATTCGTCTGGGTGCGGTTGAC CTCCGCAACCGCATGGTAATGGCACCGTTAACCCGAGGTTCGATCAGG ACCAGATCGAGTTCCCAACGCTTTAATGGCTGAGTATTACCAGCAACG GGCGAGTGCGGGTCTGATTATTACGGAAGCGACTCAGGTCTCTGAGC AAGCGGCGGGCTGGTCTGAAACGCCAGGGATCTACTCTGAAGCCCAA ATACAGGCTTGGCGCCAGGTAACAGATGCCGTCCACCAGCAAGATGG CAAGATTTTCTGCAAATTTGGCATAACAGGACGGGCCTCTCATCCAGA TTTTCAGTTGAATGGGGCACGACCGATTTCTGCCTCGGCGATTAAGCC AGCAGGTGAAGTCCATACTCCGCAGGGTAAGAAACCATTTGTCACCC CCAGAGCTGTGAGTCTGGACGAGATTCCAAGCATTGTTCAAGATTTTG CTCAGGCCACTGGCAATGCTCGAAAAGCGGGATTTGATGGGGTTGAA ATCCATGGGGCTAATGGATACTTAATTGATCAGTTCCTTCGAGATGGC ACCAACGAACGGCAAGATGCCTATGGGGGCACGATCGAAAACCGTAC CCGTTTTCTGTTAGAAGTTGTTGAGGCAGCGGTAGCTGTCTGGAGTG CTGATCATGTAGGCGTTCGACTTTCTCCTACGAATGCCTTTAATGACA TGAGAGATAGTAATCCGATCTCAACCTTCACACATGCAGCTCAAGCCC TCAATACTTACAATTTGGCCTATCTTCATGTCCTTGAAGCCTTGAAGG GCATATGCTGGCAGTGAAGGCGAGCGGGTGACTCCCTATATCCGAC AGGTTTTTCAAGGTCCGCTGATGATCAACGGTGGCTATGATGCAGTCA GTGGTGC GGCTGCGATCGCAAACCAAGAAGCCGATTTAGTCGCCTAT GCGTCCCGTTTATTGCTAACCCCTGACTTACCGGAACGCTTTGCAAAA CAAGCCCCCTCAATGAACCCGACCCATCCACGTTCTATACCCGGGG GGCAGAAGGCTATACGGACTATCCATTTTTAGATCCACTAATAACTGC CGCATA
AcaryoER1	MSISSVFEPiRLGAVDLRNRMVMAPLTRGRSGPDRVPNALMAEYYQQR SAGLIITEATQVSEQAAGWSETPGIYSEAQIQAWRQVTDVAVHQDQKIFL QIWHTGRASHPDFQLNGARPISASAIKPAGEVHTPQGKPFVTPRAVSLD EIPSIVQDFAQATGNARKAGFDGVEIHGANGYLIDQFLRDGTNERQDAYG GTIENRTRFLLEVVEAAVAVWSADHVGVRSLPTNAFNDMRDSNPSTFTH AAQALNTYNLAYLHVLEALQGHMLAVEGERVTPYIRQVFQGPLMINGGY DAVSGAAAIAHQEADLVAYGVPIANPDLPERFAKQAPLNEPDPSTFYTR GAEGYTDYPFLDPLITAA

**Tabelle 12.16:** Gen- (achrOYE4) und Proteinsequenz (AchrOYE4) des Old Yellow Enzyme 4 aus *Achromobacter* sp. JA81.

Name	Sequenz, 5' → 3'
achrOYE4	ATGAACACACCCGATCCCCTGTTTGAACCGCTGGCCCTCGGCAGCCT CACGCTGCCCAACCGCATCGTCATGCCGCCGATGACGCGCTCGCGC GCCACCCAGCCCGGCGATTGCGCCAACGCGCTGATGGCGCGCTACT ACGCGCAGCGCGCCGGCGCCGGCCTGATCGTCAGCGAAGGCACGTA CATCTCGCCCATGGGCAAGGGCTACGCCGGCACGCCCGGCCTTTGC ACGCCGGCGCAGGTGGCCGGCTGGCGCGGCGTCACGGATGCCGTG CACGCCGCCGGCGGCCGCATCTACGCGCAGCTGTGGCATGTGGGCC GGCTGAGCCACACCAGCCTGCTGGGCGGGCAGGCGCCCGTGTCTGTC GTCGGCCATCCAGGCCGAAGGCGTCAATGTTTTTCATCGAGAACGAGG ACGGCAGCCCAACTTCGTGCAGGCGTCTGCGCCGCGCGCGCTGTC GACAAGCGAGATCCGCGCCATCGTCGAGGAATACCGCCAGGCGGGC CGCAACGCCATCGCGGCGGGCTTTGACGGCGTGGAAGTGCATGCGG CCAACGGCTACCTGGTCAACCAGTTCCTGGACTCGCAGGCCAATGCC CGCACCGACGAATACGGCGGCTCGCTGGACAACCGCCTGCGCTTCC TGGACGAGGTGGCCCGCGCGCTGGTTCGAGACCCTGGGCGACGCGT CCCGCGTCGGCATCCGCCTGGCCCCGCTGACCACGCTCAATGGCTG CGTGGATGCGGATCCGGTGGCCACCTACACCGCCGCGGCCAAGCGC CTGGGCGAGATCGGCGTCGGCTACGTCCACATCGCCGAGGCCGACT GGGACGATGCGCCGGACATGCCGCTGGCGTTCAAGGAAGCGCTGCG GCGCGTCTACCCGGGCGTGCTCATCTATGCCGGCAAGTACACCGCC GAACGCGCCCGCGACGCACTGCGCGCCGGCTGGGCCGACCTGATC GCCTTCGGCCGGCCCTTCGTGGCCAACCCCGACCTGCCGGAACGGC TCGCAACGACGAGCCGCTGGCCGAGCACGACCGCGACACCCTGTT TGGCGGCGGGGCGCATGGGCTCACGGACTATCCCGCCTATCGGGGG GTTCCGGACCGCGCCTGA
AchrOYE4	MNTPDPLFEPLALGSLTLPNRIVMPPMTRS RATQPGDCANALMARYYAQ RAGAGLIVSEGTYISPMGKGYAGTPGLCTPAQVAGWRGVTDVAVHAAGG RIYAQLWHVGRLSHTSLLGGQAPVSSSAIQAEVNVFIENEDGSPNFVQA SAPRALSTSEIRAIVEEYRQAARNAIAAGFDGVELHAANGYLVNQFLDSQ ANARTDEYGGSLDNRLRFLDEVARALVETLGDASRVGIRLAPLTTLNGCV DADPVATYTAARKRLGEIGVGYVHIAEADWDDAPDMPLAFKEALRRVYP GVLIYAGKYAERARDALRAGWADLIAFG RPFVANPDLPERLRNDEPLAE HDRDTLFGGGAHGLTDYPAYRGVPDRA

**Tabelle 12.17:** Gen- (fdh) und Proteinsequenz (FDH) der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10.

Name	Sequenz, 5' → 3'
fdh	ATGGCAAAGGTCCTGTGCGTTCTTTACGATGATCCGGTTCGACGGCTA CCCGAAGACCTATGCCCGCGACGATCTTCCGAAGATCGACCACTATC CGGGCGGCCAGATCTTGCCGACGCCGAAGGCCATCGACTTCACGCC CGGGCAGTTGCTCGGCTCCGTCTCCGGCGAGCTCGGCCTGCGCGAA TATCTCGAATCCAACGGCCACACCCTGGTCGTGACCTCCGACAAGGA CGGCCCGACTCGGTGTTGAGCGCGAGCTGGTCGATGCGGATGTC GTCATCTCCCAGCCCTTCTGGCCGGCCTATCTGACGCCCGAGCGCAT CGCCAAGGCCAAGAACCTGAAGCTCGCGCTCACCGCCGGCATCGGT TCCGACCACGTCGATCTTCAGTCGGCTATCGACCGCAACGTCACCGT GCGGAAGTCACCTACTGCAACTCGATCAGCGTCGCCGAGCATGTGG TGATGATGATCCTGTGCTGGTGCGCAACTATCTGCCCTCGCACGAA TGGGCGCGGAAGGGCGGCTGGAACATCGCCGACTGCGTCTCCACG CCTACGACCTCGAGGCGATGCATGTGCGCACCGTGGCCGCCGGCCG CATCGGTCTCGCGGTGCTGCGCCGTCTGGCGCCGTTGACGTGCAC CTGCACTACACCGACCGTCACCGCCTGCCGGAATCGGTGAGAAGG AGCTCAACCTCACCTGGCACGCGACCCGCGAGGACATGTATCCGTT TGCGACGTGGTGCAGCTGAACTGCCCGCTGCACCCCGAAACCGAGC ACATGATCAATGACGAGACGCTGAAGCTGTTCAAGCGTGGCGCCTAC ATCGTCAACACCGCCCGCGGCAAGCTGTGCGACCGCGATGCCGTGG CACGTGCGCTCGAATCCGGCCGGCTGGCCGGCTATGCCGGCGACGT GTGGTTCCCGCAGCCGGCGCCGAAGGACCACCCTGGCCGACGATG CCCTATAACGGCATGACCCCGCACATCTCCGGCACACGCTGACCCG GCAGGCGCGTTATGCGGCGGGCACCCGCGAGATCCTGGAGTGCTTC TTCGAGGGCCGTCCGATCCGCGACGAATACCTCATCGTGAGGGCG GCGCTCTTGCCGGCACCGGCGCGCATTCTACTCGAAGGGCAATGC CACCGGCGGTTCCGGAAGAGGCCGCCAAGTTCAAGAAGGCGGTC
FDH	MAKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLKIDHYPGGQILPTPKAIDFTPQQLL GSVSGELGLREYLESNGHTLVVTSKDGPDVFERELVDADVVISQPFW PAYLTPERIAKAKNLKLALTAGIGSDHVDLQSAIDRNVTVAEVTYCNSISVA EHVMMILSLVRNYLPSHEWARKGGWNIADCVSHAYDLEAMHVGTVA GRIGLAVLRLAPFDVHLHYTDRHRLPESVEKELNLTWHATREDMYPVC DVVTLNCPHPETEHMINDETLKLFKRGAYIVNTARGKLCDRDAVARALE SGRLAGYAGDVWFQPAKDPWPRTMPYNGMTPHISGTTLTAQARYAA GTREILECFEGRPIRDEYLIVQGGALAGTGAHSYSKGNATGGSEEA KFAV

### 12.1.8 Puffer und Medien

**Tabelle 12.18:** Zusammensetzung der verwendeten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) und des physiologischen Puffers.

Komponente	PBS-Puffer	Physiologischer Puffer
Na Phosphat	20 mM	50 mM
NaCl	300 mM	150 mM
pH	7,4	7,2

**Tabelle 12.19:** Für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendete Puffer.

Komponente	HisTrap EQ-Puffer	HisTrap Waschpuffer	HisTrap Elutionspuffer	MES-Puffer
Na Phosphat	20 mM	20 mM	20 mM	-
MES <sup>a</sup>	-	-	-	20 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	100 mM
Imidazol	20 mM	55 mM	250 mM	-
pH	7,4	7,4	7,4	5,0

<sup>a</sup>2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

**Tabelle 12.20:** Zusammensetzung von Sammelgel (3 %) und Trenngel (12 %) für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).

Komponente	Sammelgel (3 %)	Trenngel (12,5%)
Acrylamid (40%)	3,0 mL	12,5 mL
Sammelgelpuffer	20,0 mL	-
Trenngelpuffer	-	10,0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>VE</sub>	15,0 mL	17,5 mL

**Tabelle 12.21:** Zusammensetzung von Sammelgel- und Trenngelpuffer für die SDS-PAGE.

Komponente	Sammelgelpuffer (2x)	Trenngelpuffer (4x)
TRIS	0,25 M (pH 6,8)	1,5 M (pH 8,8)
SDS	0,4 % (w/v)	0,8 % (w/v)

**Tabelle 12.22:** Zusammensetzung von 5-fach konzentriertem Laemmlipuffer für die SDS-PAGE.

Komponente	Laemmlipuffer (5x)
TRIS	300 mM
SDS	10 % (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
pH	6,8

**Tabelle 12.23:** Zusammensetzung der Puffer für die Coomassie-Färbung.

Komponente	Fairbanks A	Fairbanks B	Fairbanks C
Isopropanol	25 % (v/v)	10 % (v/v)	-
Essigsäure	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau	0,05 % (w/v)	0,005 % (w/v)	-

**Tabelle 12.24:** Komplexmedienzusammensetzungen für die Kultivierung von *E. coli*.

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>		
	<i>Luria broth</i> (LB)	<i>Terrific broth</i> (TB)	SOC
Pepton	10,0	12,0	-
Trypton	-	-	20,0
Hefeextrakt	5,0	24,0	5,0
NaCl	5,0	-	0,5
Glycerin	-	5,1	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	2,1	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	12,6	-
KCl	-	-	0,2
MgCl <sub>2</sub>	-	-	1,0
MgSO <sub>4</sub>	-	-	1,2
Glucose	-	-	3,6

Alle Komplexmedien wurden auf einen pH von 7,2 eingestellt. Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurden LB-Medium vor dem autoklavieren 15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar zugesetzt. Falls erforderlich wurden den Medien nach der Sterilisation 35 mg L<sup>-1</sup> steriles Kanamycin als Selektionsmarker zugesetzt.



**Tabelle 12.25:** Minimalmediumzusammensetzung für die Kultivierung von *E. coli* nach Wilms *et al.* (2001).

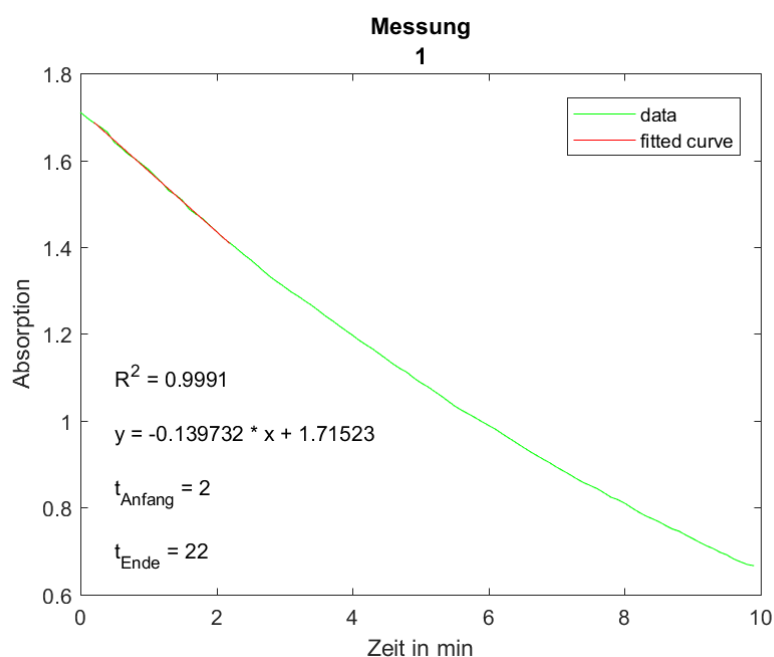
Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>	Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
	Wilms Medium		Spurenelemente
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	CaCl <sub>2</sub>	0,50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,7	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,18
NH <sub>4</sub> Cl	0,5	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,6	Na <sub>2</sub> -EDTA	10,05
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	4,0	FeCl <sub>3</sub>	8,35
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -H-Citrat	1,0	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,16
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,18
Spurenelemente	3,0		
Thiamin	0,01		

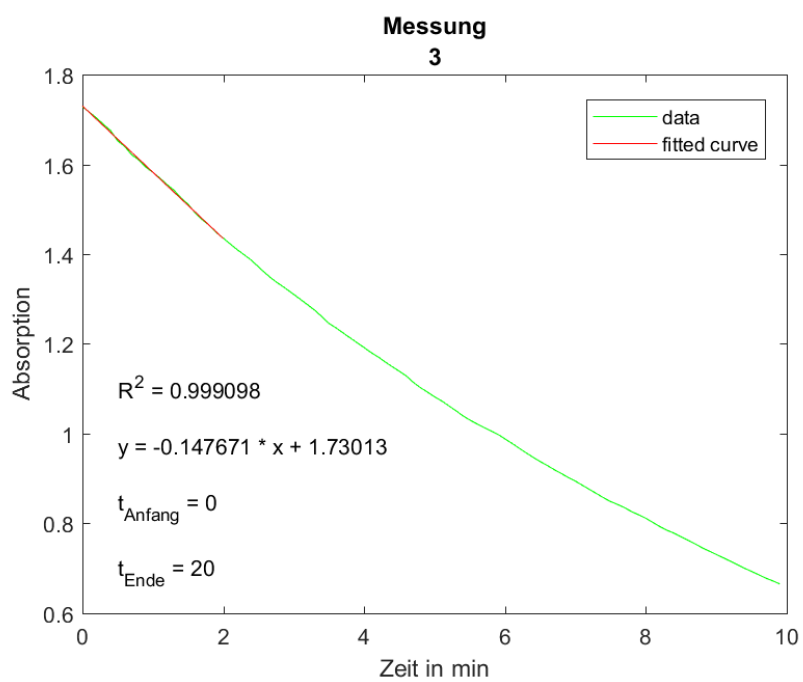
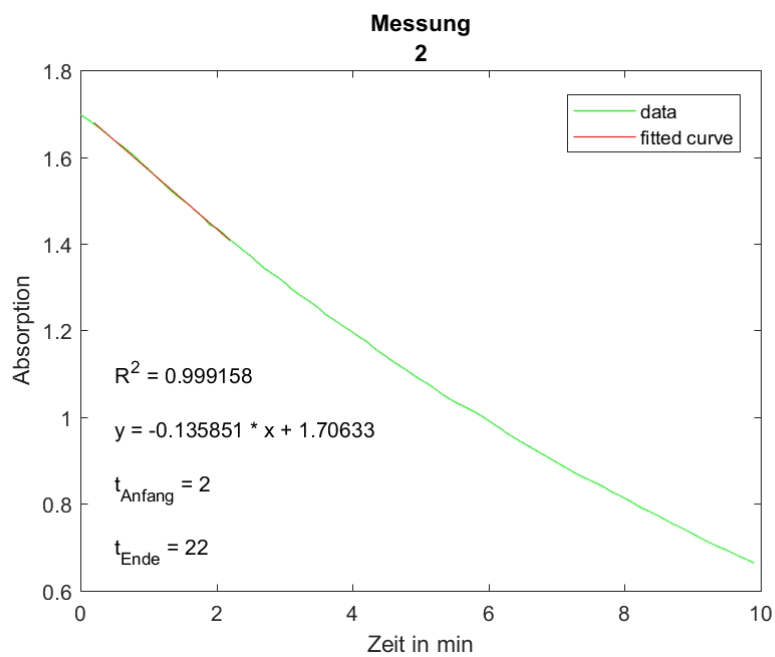
## 12.2 Ermittelte Daten

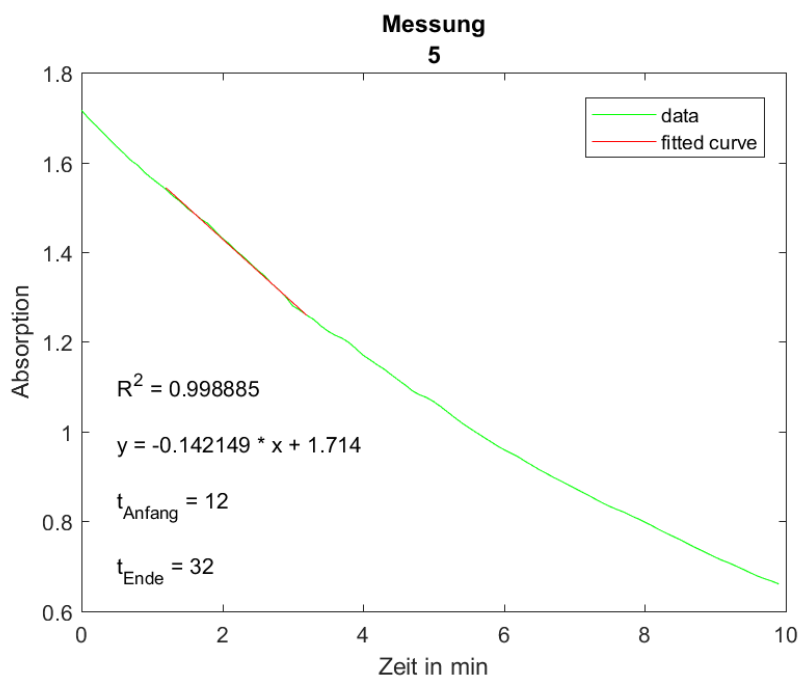
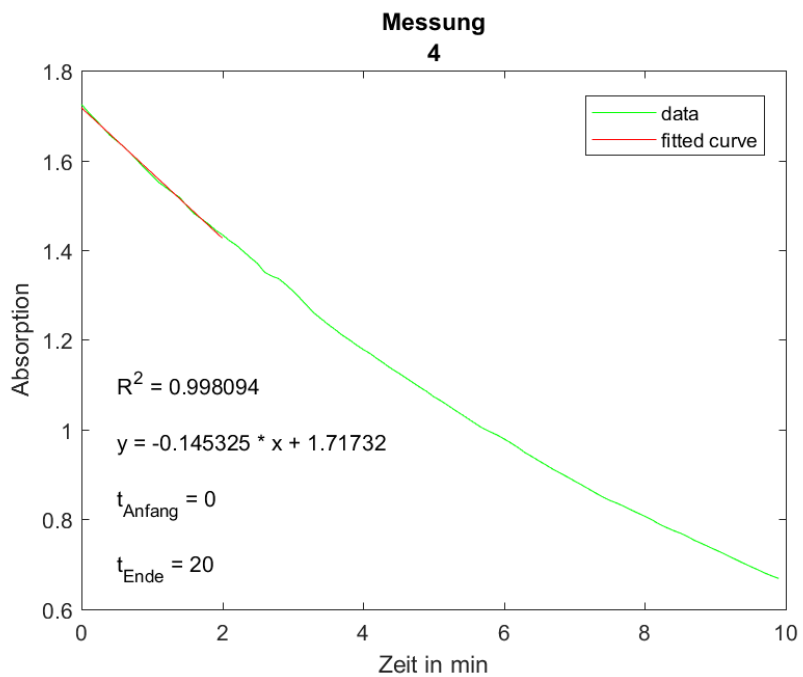
### 12.2.1 Originaldaten

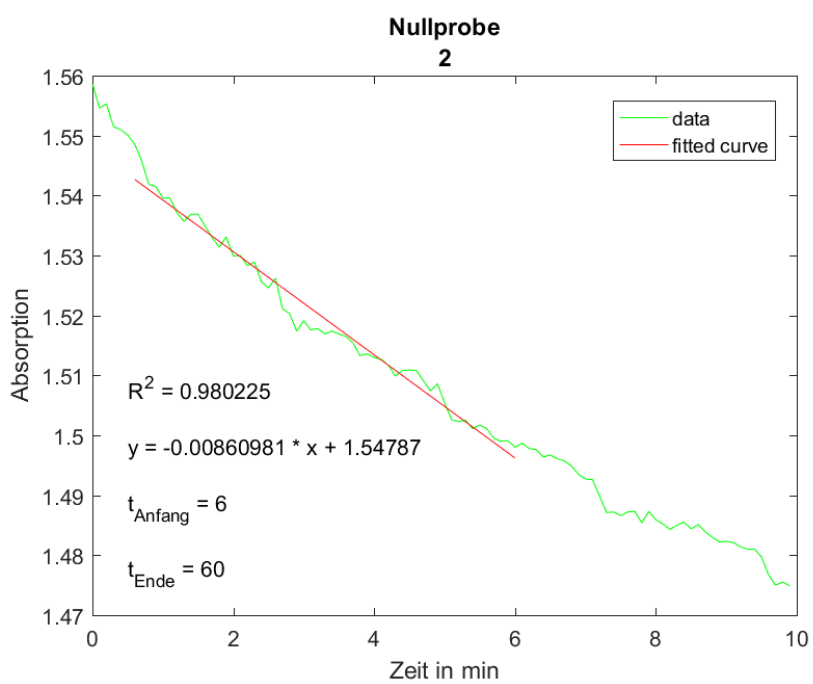
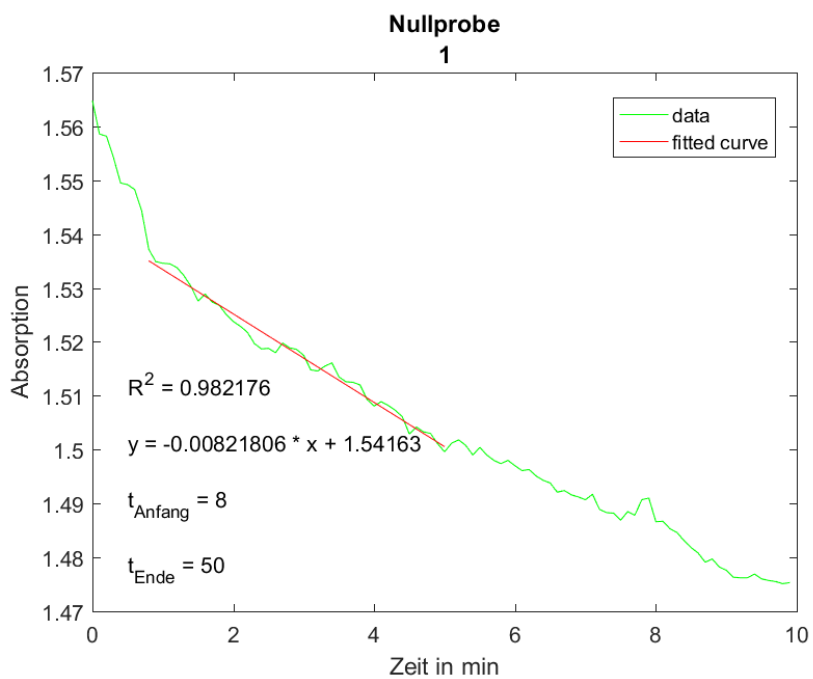
Im folgenden Abschnitt werden Originaldaten zur photometrischen Messung der zeitlichen NAD(P)H Änderung (vergleiche Kapitel 4.5.2), sowie zur gaschromatografischen Messung von Carvon (vergleiche Kapitel 4.6.1) aufgeführt. Es wird beispielhaft die NADH-Messung im technischen Quintuplikat mit den Negativkontrollen im technischen Triplikat des NostocER1 *Loop 1,2a*-Hybrids bei einer Cosubstratkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  dargestellt. Außerdem wird exemplarisch ein Chromatogramm der Referenzsubstanzen (*R*)-Limonen (Interner Standard, 7,2 mM), (*2R,5R*)-Dihydrocarvon ((2), 4.12 mM), (*2S,5R*)-Dihydrocarvon ((3), 0.88 mM), (*R*)-Carvon ((1), 5 mM), sowie ein Chromatogramm des NostocER1 *Loop 1,2a*-Hybrids nach 5 min Reaktionszeit mit 500  $\mu\text{M}$  NADH und 10 mM (*R*)-Carvon dargestellt.

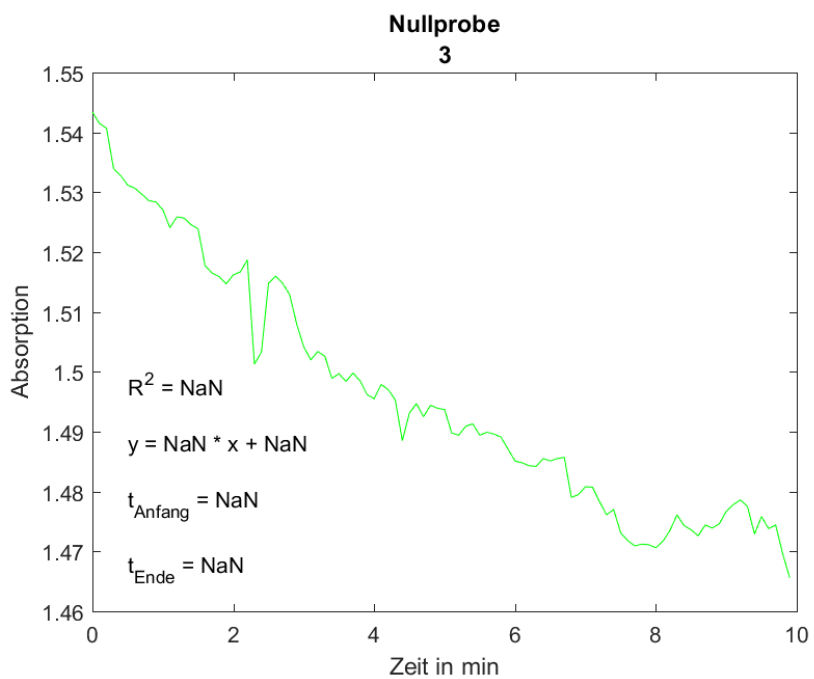
### Messung von NAD(P)H



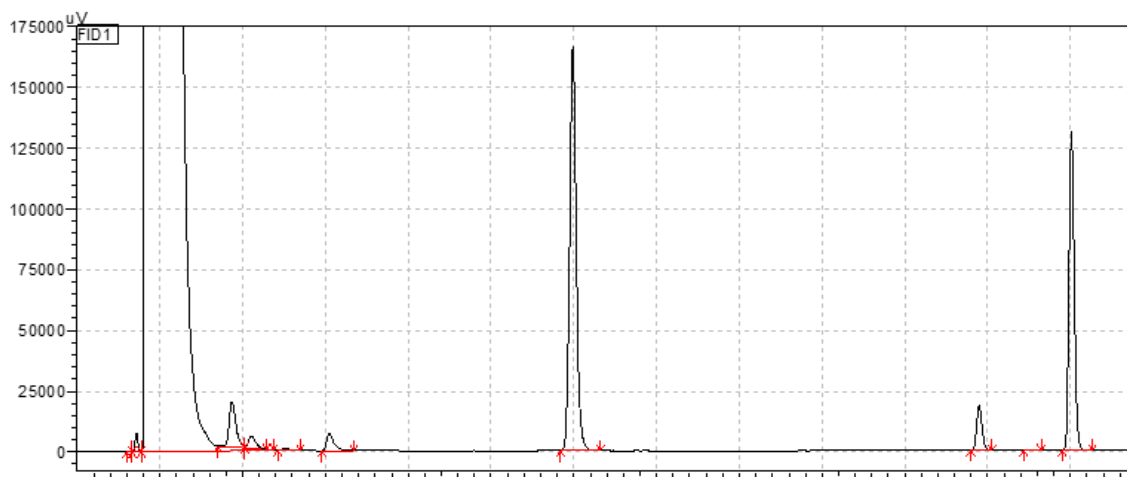
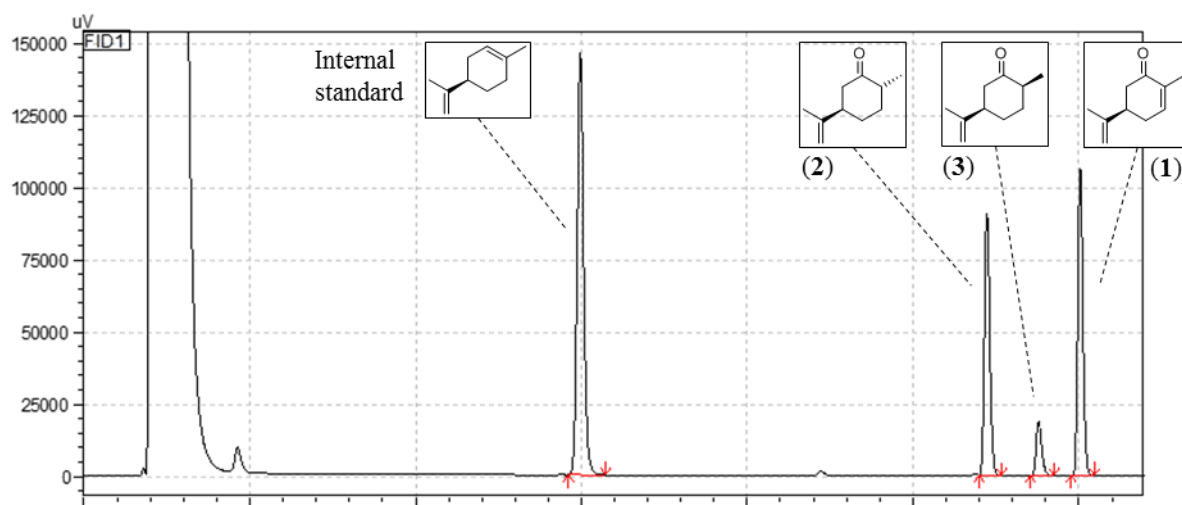








### Messung von Carvonen



## 12.2.2 Kapitel 5

### Abschnitt 5.1 ‚Primärstruktur‘

**Tabelle 12.26:** In Abbildung 5.1 gezeigte Daten der auf die Enzymmasse bezogenen spezifischen Aktivitäten der NostocER1 mit 402 Aminosäuren (NostocER1<sub>402</sub>) und der NostocER1 mit 365 Aminosäuren (NostocER1) bei einer NADPH-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $v_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  ( $v_{500}$ ). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Enzym	NADPH	
	$k_{200}, \text{s}^{-1}$	$k_{500}, \text{s}^{-1}$
NostocER1 <sub>402</sub>	12,19 $\pm$ 1,5	15,73 $\pm$ 1,21
NostocER1	11,48 $\pm$ 0,79	14,40 $\pm$ 0,74

### Abschnitt 5.2 ‚Reaktivität‘

#### 5.2.1 ‚Aktivität mit NAD(P)H‘

**Tabelle 12.27:** In Abbildung 5.2 gezeigte Daten der spezifischen Aktivitäten der NostocER1 bei einer NAD(P)H-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $v_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  (rechts,  $v_{500}$ ). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Enzym	NADPH		NADH	
	$v_{200}, \text{U mg}^{-1}$	$v_{500}, \text{U mg}^{-1}$	$v_{200}, \text{U mg}^{-1}$	$v_{500}, \text{U mg}^{-1}$
NostocER1	22,53 $\pm$ 2,72	27,39 $\pm$ 4,21	2,16 $\pm$ 0,27	5,54 $\pm$ 0,24

### Abschnitt 5.3 ‚Einflussfaktoren der Expression in *E. coli* auf die Enzymaktivität‘

#### 5.3.1 ‚Variation der Expressionstemperatur‘

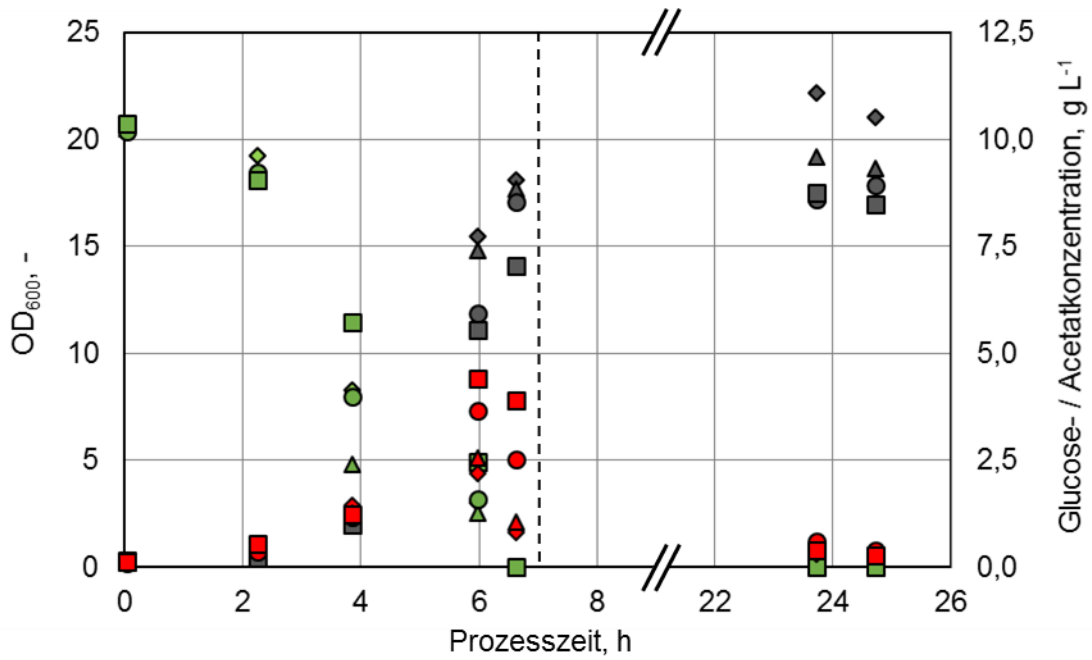
**Tabelle 12.28:** In Abbildung 5.7 gezeigte Daten der spezifischen Aktivitäten der NostocER1 und des proteingebundenen FMN-Anteils über die Expressionstemperatur. Assay-Bedingungen: 500  $\mu$ M NADH, 0,1 M Na Phosphat-puffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Temperatur während der Expression	NADH	Relativer FMN-Anteil, %	Theoretisch maximal erreichbarer $v_{500}$
	$v_{500}$ , U $\text{mg}^{-1}$		
16 °C	4,21 $\pm$ 0,25	53,6	7,86 $\pm$ 0,46
20 °C	5,10 $\pm$ 0,39	61,6	8,28 $\pm$ 0,62
25 °C	6,20 $\pm$ 0,47	77,5	7,99 $\pm$ 0,60
27,5 °C	7,43 $\pm$ 0,41	97,5	7,62 $\pm$ 0,42
30 °C	7,76 $\pm$ 0,40	98,3	7,89 $\pm$ 0,41
33,5 °C	7,49 $\pm$ 0,22	99,0	7,57 $\pm$ 0,22
37 °C	7,14 $\pm$ 0,22	96,2	7,42 $\pm$ 0,23
40 °C	4,54 $\pm$ 0,32	93,0	4,88 $\pm$ 0,34

#### 5.3.2 ‚Variation des Sauerstoffeintrags‘

Die untersuchten  $p\text{O}_2$  lassen, ohne eine weitergehende Charakterisierung der Reaktoren, keine Aussage über das Vorhandensein einer Sauerstofflimitierung zu. Während des Prozesses wurde daher vor der Induktion zusätzlich die Akkumulation von Acetat im Medium aufgezeichnet. Hierdurch konnte eine Korrelation zwischen gebildeter Acetatmenge und Sauerstoffeintrag beobachtet werden (Abbildung 12.1). Die Acetatkonzentration lag nach einer Prozesszeit von 6 h je nach  $p\text{O}_2$  bei 2,2  $\text{g L}^{-1}$  (> 40 %), bei 2,6  $\text{g L}^{-1}$  (15 %), bei 3,7  $\text{g L}^{-1}$  (10 %) und bei 4,4  $\text{g L}^{-1}$  (5 %). Dies zeigt, dass die Zellen wie erwartet mit einem geänderten Metabolismus auf diese unterschiedlichen Sauerstoffverfügbarkeiten reagierten. So konnte in diesem Kontext eine Änderung der gemischten Säuregärung beobachtet werden. Auf Grund der Sauerstofflimitierung wurde vermehrt Acetat als Nebenprodukt gebildet, um die Energieausbeute pro Sauerstoffmolekül zu erhöhen (Carlson & Srienc 2004).





**Abbildung 12.1:** Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ , grau), der Glucose- (grün) und Acetatkonzentration (rot) über die Prozesszeit bei einem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) von > 40 % (Raute), 15 % (Dreieck), 10 % (Kreis) und 5 % (Quadrat). Die unterbrochene vertikale Linie repräsentiert den Zeitpunkt der Induktion. Weitere Kultivierungsbedingungen:  $V_{R,0}$  0,5 L (TB-Medium),  $c_{s,0}$  10 g L<sup>-1</sup> (Glucose),  $P/V_{max}$  24,8 W L<sup>-1</sup>, pH 7.

### Abschnitt 5.5 ‚pH-Optimum‘

**Tabelle 12.29:** In Abbildung 5.11 gezeigte Daten der spezifischen Aktivitäten der Nostoc-ER1 bei einer NADH-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  ( $v_{500}$ ) über den pH.

pH, -	Puffer	NADH
		$v_{500}$ , U $\text{mg}^{-1}$
5,5	Na Phosphat	1,15 $\pm$ 0,03
6,0	Na Phosphat	1,58 $\pm$ 0,09
6,5	Na Phosphat	2,97 $\pm$ 0,29
7,0	Na Phosphat	4,82 $\pm$ 0,10
7,5	Na Phosphat	5,82 $\pm$ 0,21
8,0	Na Phosphat	7,09 $\pm$ 0,19
8,0	TRIS-HCl	6,14 $\pm$ 0,32
8,5	TRIS-HCl	4,00 $\pm$ 0,13

### 12.2.3 Kapitel 6

#### Abschnitt 6.1.2 ‚Aktivität mit NADH‘

**Tabelle 12.30:** Die in Abbildung 6.3 dargestellte spezifische Aktivität mit 200 und 500  $\mu\text{M}$  NADH der wildtypischen Enzyme NostocER1, AcaryoER1 und AchrOYE4. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Enzym	NADH	
	$v_{200}$ , U $\text{mg}^{-1}$	$v_{500}$ , U $\text{mg}^{-1}$
NostocER1	2,16 $\pm$ 0,27	5,54 $\pm$ 0,24
AcaryoER1	10,42 $\pm$ 0,41	11,43 $\pm$ 0,28
AchrOYE4	9,28 $\pm$ 0,63	17,90 $\pm$ 0,94

**Tabelle 12.31:** Die in Abbildung 6.3 dargestellte spezifische Aktivität mit 200 und 500  $\mu\text{M}$  NADH der Hybridproteine aus NostocER1 und AcaryoER1-Loops beziehungsweise AchrOYE4-Loops. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

NostocER1 Hybrid	AcaryoER1-Loops		AchrOYE4-Loops	
	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>
Loop 1	2,47 ± 0,08	5.64 ± 0.41	14,26 ± 1,48	20,42 ± 1,06
Loop 2a	4,73 ± 0,58	12.36 ± 1.08	1,87 ± 0,09	3,25 ± 0,19
Loop 2b	0,51 ± 0,08	0.67 ± 0.1	4,05 ± 0,13	9,03 ± 0,71
Loop 3a	0,91 ± 0,10	1.88 ± 0.4	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,05
Loop 3b	3,14 ± 0,14	7.45 ± 0.48	0,75 ± 0,15	1,98 ± 0,21
Loop 5	0,58 ± 0,16	1.41 ± 0.5	3,07 ± 0,14	5,7 ± 0,35
Loop 6	0,64 ± 0,09	1.61 ± 0.09	0,21 ± 0,07	0,61 ± 0,14
Loop C	2,02 ± 0,12	4.59 ± 0.26	0,49 ± 0,02	1,08 ± 0,12

### Abschnitt 6.1.3 ‚Enzymkinetische Parameter‘

**Tabelle 12.32:** Die in Abbildung 6.4 und Abbildung 6.5 gezeigten enzymkinetischen Parameter der wildtypischen Enzyme NostocER1, AcaryoER1 und AchrOYE4 mit NADH. Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Enzym	NADH		
	$K_m$ , mM	$v_{max}$ , U mg <sup>-1</sup>	$k_{eff}$ , s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup>
NostocER1	1052,8 ± 222,2	21,48 ± 2,65	14,4 ± 3,5
AcaryoER1	351,4 ± 46,2	12,69 ± 0,26	56,2 ± 9,8
AchrOYE4	57,1 ± 17,0	27,86 ± 3,19	157,4 ± 47,0

**Tabelle 12.33:** Die in Abbildung 6.4 und Abbildung 6.5 gezeigten enzymkinetischen Parameter mit NADH der NostocER1-Hybridproteine mit einer gesteigerten NADH-Aktivität. Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 - 1200  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Hybrid	AcaryoER1-Loops		AchrOYE4-Loops		$k_{\text{eff}}$ , $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$
	$K_m$ , mM	$V_{\text{max}}$ , $\text{U mg}^{-1}$	$K_m$ , mM	$V_{\text{max}}$ , $\text{U mg}^{-1}$	
Loop 1	-	-	$190,2 \pm 14,4$	$25,72 \pm 0,28$	$95,5 \pm 7,3$
Loop 2a	$805,3 \pm 91,3$	$28,74 \pm 1,89$	-	-	$25,3 \pm 3,3$
Loop 2b	-	-	$534,8 \pm 33,3$	$14,54 \pm 0,4$	$19,2 \pm 1,3$
Loop 3b	$767,5 \pm 48,3$	$19,01 \pm 0,63$	-	-	$17,5 \pm 1,2$
Loop 5	-	-	$632,8 \pm 33,7$	$12,55 \pm 0,32$	$14,0 \pm 0,8$

#### Abschnitt 6.1.4 ‚Aktivität mit NADPH‘

**Tabelle 12.34:** Die in Abbildung 6.6 dargestellten spezifischen Aktivitäten mit 200  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  NADPH der wildtypischen Enzyme NostocER1, AcaryoER1 und AchrOYE4. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Enzym	NADPH	
	$v_{200}$ , $\text{U mg}^{-1}$	$v_{500}$ , $\text{U mg}^{-1}$
NostocER1	$22,53 \pm 2,72$	$27,39 \pm 4,21$
AcaryoER1	$29,38 \pm 3,92$	$33,31 \pm 4,20$
AchrOYE4	$0,07 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$

**Tabelle 12.35:** Die in Abbildung 6.6 dargestellten spezifischen Aktivitäten mit 200  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  NADPH der Hybridproteine aus NostocER1 und AcaryoER1-Loops beziehungsweise AchrOYE4-Loops. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

NostocER1 Hybrid	AcaryoER1-Loops		AchrOYE4-Loops	
	$v_{200}$ , U $\text{mg}^{-1}$	$v_{500}$ , U $\text{mg}^{-1}$	$v_{200}$ , U $\text{mg}^{-1}$	$v_{500}$ , U $\text{mg}^{-1}$
Loop 1	11,74 $\pm$ 1,85	18,29 $\pm$ 1,55	19,25 $\pm$ 1,19	23,00 $\pm$ 1,50
Loop 2a	26,34 $\pm$ 4,05	35,67 $\pm$ 1,99	16,62 $\pm$ 1,36	20,88 $\pm$ 1,45
Loop 2b	2,90 $\pm$ 0,31	4,56 $\pm$ 0,39	23,31 $\pm$ 0,31	28,95 $\pm$ 0,79
Loop 3a	3,32 $\pm$ 1,69	8,49 $\pm$ 0,31	0,49 $\pm$ 0,07	1,61 $\pm$ 0,05
Loop 3b	15,99 $\pm$ 1,86	24,28 $\pm$ 1,40	2,79 $\pm$ 0,60	7,89 $\pm$ 1,16
Loop 5	0,73 $\pm$ 0,22	1,57 $\pm$ 0,28	1,66 $\pm$ 0,27	3,55 $\pm$ 0,18
Loop 6	0,88 $\pm$ 0,06	2,09 $\pm$ 0,42	0,12 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,09
Loop C	9,88 $\pm$ 0,53	12,54 $\pm$ 1,48	4,29 $\pm$ 0,18	5,64 $\pm$ 0,42

### Abschnitt 6.1.5 ‚Aktivität mit (R)-Carvon‘

**Tabelle 12.36:** Die in Abbildung 6.7 dargestellten spezifischen Aktivitäten mit 10 mM (R)-Carvon und 200  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 500  $\mu\text{M}$  NADH der wildtypischen Enzyme NostocER1, AcaryoER1 und AchrOYE4. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C.

Enzym	NADH ((R)-Carvon)	
	$v_{200}$ , U $\text{mg}^{-1}$	$v_{500}$ , U $\text{mg}^{-1}$
NostocER1	0,34 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,06
AcaryoER1	1,16 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,03
AchrOYE4	0,016 $\pm$ 0,001	0,019 $\pm$ 0,001

**Tabelle 12.37:** Die in Abbildung 6.7 dargestellten spezifischen Aktivitäten mit 10 mM (*R*)-Carvon und 200  $\mu$ M beziehungsweise 500  $\mu$ M NADH der Hybridproteine aus NostocER1 und AcaryoER1-*Loops* beziehungsweise AchrOYE4-*Loops*. Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C.

Hybrid	AcaryoER1- <i>Loops</i>		AchrOYE4- <i>Loops</i>	
	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>
Loop 1	-	-	1,95 ± 0,15	2,27 ± 0,03
Loop 2a	0,86 ± 0,01	1,13 ± 0	-	-
Loop 2b	-	-	0,48 ± 0,07	0,97 ± 0,04
Loop 3b	0,79 ± 0,02	1,46 ± 0,03	-	-
Loop 5	-	-	0,98 ± 0,04	1,48 ± 0,02

**Abschnitt 6.2.1 ,Aktivität mit NADH‘ & Abschnitt 6.2.3 ,Aktivität mit NADPH‘**

**Tabelle 12.38:** Die in Abbildung 6.10 und Abbildung 6.13 dargestellten spezifischen Aktivitäten bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NAD(P)H ( $v_{200}$ ) und 500  $\mu\text{M}$  NAD(P)H ( $v_{500}$ ) der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen *Loop*-Regionen der AcaryoER1 (blau), des AchrOYE4 (rot) oder von beiden Spendern (blau-rot). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

NostocER1 Hybrid	NADH		NADPH	
	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>
Loop <b>2a,3b</b>	11,77 ± 0,68	18,84 ± 0,53	33,7 ± 1,24	41,56 ± 4,32
Loop <b>1,2b</b>	7,90 ± 0,77	12,42 ± 1,5	24,62 ± 1,87	26,45 ± 2,77
Loop <b>1,5</b>	9,08 ± 0,82	10,65 ± 1,26	2,44 ± 0,12	3,75 ± 1,22
Loop <b>2b,5</b>	0,07 ± 0,05	0,82 ± 0,07	0,05 ± 0,01	0,27 ± 0,04
Loop <b>1,2b,5</b>	0,41 ± 0,04	1,28 ± 0,37	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Loop <b>1,2a</b>	18,35 ± 0,88	27,17 ± 1,85	21,2 ± 3,61	31,74 ± 1,81
Loop <b>1,3b</b>	10,10 ± 0,81	14,70 ± 0,68	16,08 ± 1,34	18,62 ± 1,23
Loop <b>1,2a,3b</b>	9,95 ± 1,05	18,01 ± 1,42	25,04 ± 0,83	32,65 ± 1,82
Loop <b>1,5,2a</b>	14,43 ± 1,05	18,78 ± 2,08	3,48 ± 0,23	6,95 ± 1,25
Loop <b>1,5,2a,3b</b>	8,42 ± 1,15	10,18 ± 1,81	5,50 ± 0,15	6,90 ± 0,57

### Abschnitt 6.2.2 ‚Enzymkinetische Parameter‘

**Tabelle 12.39:** Die in Abbildung 6.11 und Abbildung 6.12 gezeigten enzymkinetischen Parameter der NostocER1-Hybride mit multiplen AcaryoER1-Loops (blau) beziehungsweise AchrOYE4-Loops (rot). Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu$ M NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

NostocER1 Hybrid	NADH		$k_{\text{eff}}$ , $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$
	$K_m$ , mM	$v_{\text{max}}$ , $\text{U mg}^{-1}$	
Loop <b>2a,3b</b>	$237,1 \pm 17,3$	$27,20 \pm 0,59$	$81,1 \pm 6,2$
Loop <b>1,2b</b>	$474,5 \pm 30,8$	$23,39 \pm 0,63$	$34,7 \pm 2,4$
Loop <b>1,5</b>	$72,6 \pm 13,2$	$12,25 \pm 1,35$	$119 \pm 25,3$
Loop <b>1,2a</b>	$223,9 \pm 11,0$	$41,16 \pm 0,64$	$130 \pm 6,7$
Loop <b>1,3b</b>	$430,4 \pm 36,6$	$21,46 \pm 0,71$	$35,2 \pm 3,2$
Loop <b>1,2a,3b</b>	$413,2 \pm 29,5$	$30,78 \pm 0,85$	$52,6 \pm 4,0$
Loop <b>1,5,2a</b>	$160,7 \pm 11,4$	$26,98 \pm 0,50$	$118,4 \pm 8,7$
Loop <b>1,5,2a,3b</b>	$241,0 \pm 17,6$	$21,31 \pm 0,46$	$62,3 \pm 4,8$



## Abschnitt 6.2.4 ‚Aktivität mit (R)-Carvon‘

**Tabelle 12.40:** Die in Abbildung 6.14 und Abbildung 6.15 dargestellten Daten der spezifischen Aktivität und des Diastereomerenüberschuss bei der Reduktion von 10 mM (R)-Carvon der Hybridenzyme aus NostocER1 mit multiplen *Loop*-Regionen der AcaryoER1 (blau), des AchrOYE4 (rot) oder von beiden Spendern (blau-rot). Weitere Assay-Bedingungen: 200  $\mu$ M NADH ( $v_{200}$ ) oder 500  $\mu$ M NADH ( $v_{500}$ ), 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C

NostocER1 Hybrid	(R)-Carvon		de, %
	$v_{200}$ , U mg <sup>-1</sup>	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>	
Loop 2a,3b	0,54 ± 0,05	1,42 ± 0,01	97,17 ± 1,51
Loop 1,2b	0,93 ± 0,03	1,35 ± 0,02	98,71 ± 1,22
Loop 1,5	2,30 ± 0,11	2,52 ± 0,04	98,62 ± 0,47
Loop 1,2a	1,43 ± 0,02	2,59 ± 0,08	99,3 ± 0,61
Loop 1,3b	1,37 ± 0,08	2,37 ± 0,03	99,04 ± 0,35
Loop 1,2a,3b	0,64 ± 0,02	1,54 ± 0,01	97,92 ± 1,99
Loop 1,5,2a	1,71 ± 0,08	2,22 ± 0,14	98,15 ± 1,77
Loop 1,5,2a,3b	0,88 ± 0,01	1,01 ± 0,02	98,45 ± 1,49

**Abschnitt 6.3.1 ‚Glutamin an Position 30 (Q30)‘**

**Tabelle 12.41:** Die in Abbildung 6.17 und Abbildung 6.18 dargestellten spezifischen Aktivitäten bei 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ ) des NostocER1-Wildtyps (Q30) und aller Q30-Punktmutanten. Zusätzlich werden die Van der Waals-Radien der Aminosäureseitenketten aufgelistet (Richards 1977). Weitere Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Q30-Mutante	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>	VdW-Radius, Å <sup>3</sup>	Q30-Mutante	$v_{500}$ , U mg <sup>-1</sup>	VdW-Radius, Å <sup>3</sup>
Q30	5,54 ± 0,24	161,10	Q30K	13,58 ± 0,98	171,3
Q30S	20,42 ± 1,06	99,10	Q30L	3,15 ± 0,13	167,9
Q30A	21,08 ± 2,98	91,50	Q30M	10,37 ± 0,36	170,8
Q30C	11,47 ± 3,02	105,6	Q30N	11,71 ± 0,56	135,2
Q30D	6,50 ± 0,50	124,5	Q30P	0,03 ± 0,02	129,3
Q30E	5,53 ± 0,61	155,1	Q30R	14,03 ± 1,41	225,0
Q30F	1,96 ± 0,65	203,4	Q30T	10,58 ± 0,41	122,1
Q30G	11,17 ± 1,01	66,4	Q30V	5,69 ± 1,34	141,7
Q30H	6,56 ± 0,35	167,3	Q30W	0,69 ± 0,04	237,6
Q30I	2,57 ± 0,18	168,8	Q30Y	2,55 ± 0,26	203,6

**Tabelle 12.42:** Die in Abbildung 6.19 und Abbildung 6.20 dargestellten Daten zu den enzymkinetischen Parametern Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ), maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{eff}$ ) der NostocER1 (Q30), der Q30S-Mutante, sowie der Punktmutationen Q30A, T, E, Y, M und R. Assay-Bedingungen: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 20 – 1200  $\mu$ M NADH, 10 mM Maleimid, pH 7, 30 °C.

Q30-Mutante	NADH		$k_{eff}$ , s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup>
	$K_m$ , mM	$v_{max}$ , U mg <sup>-1</sup>	
Q30	1052,8 ± 222,2	21,48 ± 2,65	14,2 ± 3,5
Q30S	190,2 ± 14,4	25,72 ± 0,28	94,3 ± 7,2
Q30A	191,7 ± 66,9	26,84 ± 2,39	97,6 ± 35,2
Q30E	349,7 ± 20,4	10,61 ± 0,23	21,2 ± 1,3
Q30M	420,8 ± 22,8	18,34 ± 0,40	30,4 ± 1,8
Q30R	617,8 ± 34,1	32,98 ± 0,86	37,3 ± 2,3
Q30T	340,9 ± 22,9	17,53 ± 0,43	35,9 ± 2,6
Q30Y	619,0 ± 22,6	5,40 ± 0,10	6,1 ± 0,3

### Abschnitt 6.3.2 ‚Alanin an Position 57 (A57)‘

**Tabelle 12.43:** In Abbildung 6.21, Abbildung 6.22 und Abbildung 6.23 dargestellte Daten der bereitgestellten A57-Punktmutanten der NostocER1. Aufgelistet werden die spezifische Aktivität bei 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ ), die enzymkinetischen Parametern Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ), maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) und die daraus ermittelte katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ).

A57-Mutante	NADH			$k_{\text{eff}}$ , $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$
	$v_{500}$ , $\text{U mg}^{-1}$	$K_m$ , $\text{mM}$	$v_{\text{max}}$ , $\text{U mg}^{-1}$	
A57	$5,54 \pm 0,24$	$1052,8 \pm 222,2$	$21,48 \pm 2,65$	$14,2 \pm 3,5$
A57T	$12,36 \pm 1,08$	$805,3 \pm 91,3$	$28,74 \pm 1,89$	$24,9 \pm 3,3$
A57S	$9,99 \pm 0,69$	$893,5 \pm 55,7$	$29,86 \pm 1,01$	$23,3 \pm 1,7$
A57C	$7,23 \pm 0,41$	$742,7 \pm 45,0$	$15,19 \pm 0,47$	$14,3 \pm 1,0$
A57V	$4,56 \pm 0,09$	$784,9 \pm 51,9$	$10,74 \pm 0,37$	$9,6 \pm 0,7$
A57L	$0,17 \pm 0,02$	-	-	-
A57F	$0,05 \pm 0,01$	-	-	-





## Abschnitt 6.3.3 ‚Doppelmutationen‘

Tabelle 12.44: In Abbildung 6.24 und Abbildung 6.25 dargestellte Daten der kombinierten Q30- und A57-Punktmutanten der NostocER1. Aufgelistet werden die nicht grafisch dargestellte spezifische Aktivität bei 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ ), die enzymkinetischen Parametern Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ), maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) und die daraus ermittelte katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ).

NostocER1-Mutante	NADH			$k_{\text{eff}}$ , $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$
	$v_{500}$ , $\text{U mg}^{-1}$	$K_m$ , $\text{mM}$	$v_{\text{max}}$ , $\text{U mg}^{-1}$	
NostocER1	$5,54 \pm 0,24$	$1052,8 \pm 222,2$	$21,48 \pm 2,65$	$14,2 \pm 3,5$
Q30S A57T	$27,17 \pm 1,85$	$223,9 \pm 11,0$	$41,16 \pm 0,64$	$128,3 \pm 6,6$
Q30A A57S	$19,06 \pm 1,34$	$519,8 \pm 28,1$	$38,05 \pm 0,93$	$51,1 \pm 3,0$
Q30A A57T	$19,22 \pm 1,42$	$463,1 \pm 27,0$	$50,94 \pm 1,31$	$76,7 \pm 4,9$
Q30S A57S	$22,97 \pm 1,55$	$218,8 \pm 47,5$	$30,65 \pm 0,95$	$97,7 \pm 21,4$

## 12.2.4 Kapitel 7

**Tabelle 12.45:** Auflistung der in Abbildung 7.3 und Abbildung 7.4 dargestellten Daten der Dihydrocarvon (DHC)-Bildungsraten von ruhenden Ganzzellbiokatalysatoren und den entsprechenden geklärten Lysaten. Assay-Bedingungen:  $V_{\text{ges}}$  10 mL, 700 rpm, 300 mM (*R*)-Carvon, 450 mM Na Formiat, 3:1 XAD4 zu Substrat Massenverhältnis, 4,45 - 5,31  $\text{g L}^{-1}$  Biokatalysatortrockenmasse (BTM)-Konzentration, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 30 °C,  $\text{pH}_0$  7.

Konstrukt	DHC-Bildungsrate, $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	
	Ganze Zellen	Geklärte Lysate
Nos-FDH 	$5,31 \pm 0,3$	$0,78 \pm 0,02$
L1,2a-FDH 	$18,55 \pm 2,01$	$3,80 \pm 0,16$
L1,5-FDH 	$19,61 \pm 1,23$	$1,23 \pm 0,08$
L1,5,2a-FDH 	$15,07 \pm 1,37$	$1,71 \pm 0,05$

**Tabelle 12.46:** Auflistung der in Abbildung 7.6 gezeigten Daten. Aufgeführt wird die nach 48 h Prozesszeit auf die Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration bezogene Enreduktase (ER)-Aktivität, die Aktivität der in Kapitel 6.2.1 isolierten (gereinigten) ER und das Verhältnis aus beiden Aktivitäten (normierte ER-Aktivität). Assay-Bedingungen: 500  $\mu\text{M}$  NADH ( $v_{500}$ ), 10 mM Maleimid, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 30 °C. Die BTM-bezogenen Aktivitäten wurden durch die Zugabe der entsprechenden aufgeschlossenen und geklärten Zellen erhalten.

Enreduktase	ER-Aktivität ( $v_{500}$ )		Normierte ER-Aktivität, -
	BTM-bezogen, $\text{U g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Isoliertes Enzym, $\text{U mg}^{-1}$	
NostocER1 <span style="color: black;">□</span>	$46,61 \pm 2,43$	$5,61 \pm 0,25$	$8,31 \pm 0,57$
Loop 1,2a <span style="color: green;">■</span>	$164,26 \pm 9,39$	$27,52 \pm 1,87$	$5,97 \pm 0,53$
Loop 1,5 <span style="color: red;">■</span>	$85,07 \pm 0,77$	$10,79 \pm 1,28$	$7,89 \pm 0,94$
Loop 1,5,2a <span style="color: blue;">■</span>	$170,39 \pm 5,48$	$19,03 \pm 2,11$	$8,96 \pm 1,03$