

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
FAKULTÄT WISSENSCHAFTSZENTRUM WEIHENSTEPHAN
FÜR ERNÄHRUNG, LANDNUTZUNG UND UMWELT
LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE

**Synthese von L-Methionin
durch biokatalytische Fixierung von CO₂**

Julia Martin, M. Sc.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Bernhard Küster

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Arne Skerra
2. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 27.05.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 03.08.2020 angenommen.

Meinen Eltern

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit, ein so spannendes Thema im Rahmen meiner Doktorarbeit zu bearbeiten. Ich danke ihm für sein stetes Interesse sowie seine fachliche Unterstützung, die maßgeblich zum Fortgang meiner Arbeit beitrugen.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Dr. Lukas Eisoldt für seine Hilfsbereitschaft während meiner Einarbeitungsphase, die Überlassung zahlreicher Plasmide und Vorarbeiten und viele wertvolle Diskussionen während der gesamten Dauer meiner Arbeit. Außerdem danke ich ihm und Dr. Ludwig Kirmair besonders für die gute Zusammenarbeit und gemeinsame Zeit im Labor und darüber hinaus.

Bei Dr. André Schiefner möchte ich mich für die Erstellung des LeuDH-Homologie Modells und seine Hilfsbereitschaft bedanken.

Großer Dank gilt all meinen Mitstreitern im Labor. Sie haben fachlich, aber auch durch außerfachliche gemeinsame Unternehmungen, wie Grillabende oder die inzwischen zur Tradition gewordene Skihütte, entscheidend zu meiner guten Zeit am Lehrstuhl beigetragen. In diesem Rahmen möchte ich mich besonders bei Carina Sommer, Christian Deuschle, Fabian Rodewald und Emanuel Peplau für zahlreiche Tipps und Diskussionen, die inner- und gerne auch mal außerhalb des Labors auf der Suche nach Nervennahrung stattfanden, bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie für ihre Unterstützung im Laboralltag. Insbesondere danke ich Therese Wiedemann und Martina Dotzauer für das Bereitstellen von Kulturmedien & Agarplatten und die gute Labornachbarschaft und Irmgard Neumaier für ihre Hilfe bei der Produktion der ein oder anderen KdcA-Variante.

Bei Vincenz Buschinger bedanke ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und seinen Beitrag zu meinem Projekt im Rahmen seiner Abschlussarbeit.

Danken möchte ich auch Evonik Industries für die regelmäßigen Projekttreffen im Rahmen dieses Kooperationsprojekts und die Bereitstellung von Gerätschaften sowie Prof. Dr. Corinna Dawid und Christian Schmid vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik für die LC-MS/MS Messungen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie. Durch ihren Beistand und Vertrauen in meine Fähigkeiten waren sie mir immer eine wertvolle Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Benni für die bedingungslose Unterstützung und stete Aufmunterung bedanken.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. zum Patent angemeldet:

- 1) **Martin, J., Eisoldt, L. & Skerra, A.** (2018) Fixation of gaseous CO₂ by reversing a decarboxylase for the biocatalytic synthesis of the essential amino acid L-methionine. *Nat Catal.* 1, 555–561.
- 2) **Skerra, A., Martin, J., Jakob, H., Fischer, D.** (2018) Enzymatic method for producing 2-hydroxy-4-methylmercaptobutanoic acid (mha). Zum Patent angemeldet. EP3388524(A1). Evonik Degussa.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Verwendung essenzieller Aminosäuren in der Tierzucht	1
1.2 Nachteil der chemischen Methionin-Synthese.....	2
1.3 Biokatalytische Fixierung von CO ₂ in L-Methionin.....	3
1.4 Carboxylierung mit der Decarboxylase KdcA aus <i>L. lactis</i>	6
1.5 Entzug des Carboxylierungsprodukts aus dem Gleichgewicht durch Reduktion der α -Carbonylgruppe	8
1.6 NADH-Regenerierung durch eine Formiat-Dehydrogenase.....	10
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.2 Oligodesoxynukleotide	13
2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine	14
2.1.4 Chemikalien	15
2.1.5 Standards und Kits	18
2.1.6 Geräte	18
2.1.7 Verbrauchsmaterial	20
2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	26
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	27
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	28
2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	28
2.2.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA	29
2.3 In-vitro-Modifizierung von DNA	29
2.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.3.2 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA.....	29
2.3.3 Ligierung von DNA-Fragmenten.....	30
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen.....	30
2.3.5 Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese durch <i>Overlap Extension</i> PCR.....	31
2.3.6 Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange PCR.....	31
2.3.7 Herstellung einer LeuDH-Plasmid-Bibliothek.....	31
2.3.8 Identifizierung von stabilisierenden Mutationen in der KdcA.....	32

2.4	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	33
2.4.1	Proteinproduktion in <i>E. coli</i> im 1-2 l-Maßstab	33
2.4.2	Proteinproduktion und Zellaufschluss im 1 ml-Maßstab	34
2.5	Proteinchemische Methoden	35
2.5.1	Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	35
2.5.2	Größenausschlusschromatographie	36
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.5.4	Konzentrierung von Proteinen.....	38
2.5.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
2.6	Enzymatische Aktivitätsanalyse.....	39
2.6.1	Bestimmung der Decarboxylase-Aktivität der KdcA.....	39
2.6.2	Bestimmung der Halbwertszeiten der KdcA-Varianten.....	39
2.6.3	Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten für die Carboxylierung.....	40
2.6.4	Aktivitätsnachweis und Bestimmung der Stereospezifität der YbdL.....	41
2.6.5	Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenasen.....	42
2.6.6	Parallelisierter Screening-Assay für LeuDh-Mutanten.....	43
2.6.7	Biokatalytische Produktion von L-Methionin, L-Leucin und L-Isoleucin..	44
2.6.8	Biokatalytische Produktion des Methionin-Hydroxy-Analogons (MHA) ..	45
2.6.9	Produktnachweis mittels RP-HPLC	45
2.6.10	Produktnachweis mittels LC-MS/MS.....	46
2.7	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Biokatalytische Synthese von L-Methionin mit Hilfe einer Decarboxylase und Aminotransferase.....	48
3.1.1	Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Decarboxylase KdcA... 48	
3.1.2	Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Aminotransferase YbdL	50
3.1.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Steigerung der L-Met-Ausbeute.....	51
3.1.4	Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Carboxylierung von Methional anhand der Haldane-Beziehung	53
3.2	Alternativer Syntheseweg für L-Methionin mit Hilfe einer Decarboxylase und Aminosäuredehydrogenase.....	55
3.2.1	Vergleich einer Leucin- und Phenylalanin-Dehydrogenase.....	55
3.2.2	NADH-Regenerierung mit Hilfe der Formiat-Dehydrogenase CboFDH....	59
3.3	Optimierung der Substratspezifität der Leucin-Dehydrogenase	61
3.3.1	Rationale Mutagenese der LeuDh an Position A113G.....	61
3.3.2	Semi-rationale Mutagenese der LeuDh an Position L40.....	63

3.3.3	Kombination und Charakterisierung verbesserter LeuDH-Varianten.....	65
3.3.4	Vergleich der besten LeuDH-Varianten in der Methionin-Produktion.....	67
3.4	Optimierung der Decarboxylase durch Enzym-Engineering	68
3.4.1	Stabilisierung der Decarboxylase KdcA	68
3.4.2	Substratspezifität der Decarboxylase KdcA.....	72
3.5	Übertragbarkeit der Reaktion auf die Synthese von anderen Aminosäuren und Methionin-Derivaten.....	74
3.5.1	Biokatalytische Produktion von L-Leucin und L-Isoleucin.....	75
3.5.2	Biokatalytische Produktion der D/L-Methionin-Hydroxy-Analoga	76
4.	Diskussion	80
4.1	Biokatalytische CO ₂ -Fixierung entgegen des chemischen Gleichgewichts	80
4.2	Steigerung der L-Methionin-Ausbeute	82
4.2.1	Optimierung der Aminierung.....	82
4.2.2	Optimierung der Carboxylierung.....	84
4.3	Potential der dargestellten Reaktion zur Synthese von L-Met.....	86
4.4	Betrachtung zur ökonomischen Regenerierung des Cofaktors.....	88
4.5	Transfer der gezeigten Reaktion auf die Synthese weiterer Aminosäuren bzw. Derivate.....	90
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Abkürzungsverzeichnis	95
7.	Literaturverzeichnis.....	97

1. Einleitung

1.1 Verwendung essenzieller Aminosäuren in der Tierzucht

Laut einer Studie zur Entwicklung der Weltbevölkerung wird diese von 7,7 Milliarden im Jahr 2019 bis 2050 auf ca. 9,7 Milliarden anwachsen (United Nations, 2019). Um den dadurch steigenden Bedarf an Nahrungsmitteln zu decken, wird versucht, die Tierzucht möglichst effizient und ressourcenschonend zu gestalten (Drauz *et al.*, 2007). Neben Kohlenhydraten, Fetten, Vitaminen und Mineralstoffen sind Proteine ein wichtiger Bestandteil der Nahrung. Die darin enthaltenen Aminosäuren werden durch Verdau freigesetzt und zu großen Teilen für die Synthese von körpereigenen Proteinen, aber auch als Stickstofflieferant – zum Beispiel für die Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren – verwendet (Kirchgeßner, 2014). Während nicht-essenzielle Aminosäuren vom tierischen Körper bei Bedarf selbst synthetisiert werden können, müssen essenzielle Aminosäuren in vollem Umfang über den Verzehr pflanzlicher oder anderer tierischer Proteine aufgenommen werden (Willke, 2014).

Bei unzureichender Zufuhr einer essenziellen Aminosäure werden die im Überschuss zugeführten Aminosäuren über die Niere ausgeschieden und erhöhen dadurch die Stickstoffbelastung der Umwelt (Drauz *et al.*, 2007). Daher werden solche essenzielle Aminosäuren, deren Bedarf durch das Futterprotein nicht gedeckt werden kann, als limitierend bezeichnet (Kirchgeßner, 2014). Um einer Limitierung zu entgehen und dadurch die Gewichtszunahme pro kg Futtermittel zu erhöhen, können mehrere Proteine entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung kombiniert oder, effizienter, die limitierenden Aminosäuren selektiv supplementiert werden. Beides trägt zur Steigerung der biologischen Wertigkeit der eingesetzten Futtermittel bei, wobei die biologische Wertigkeit ein Maß für die Effizienz der Verwertung der konsumierten Proteine bzw. Aminosäuren ist (Drauz *et al.*, 2007; Hoffman & Flavo, 2004).

Deshalb werden zu Effizienzsteigerung und Kostenreduktion konventionelle Futtermittel bereits seit den 1950er Jahren mit D/L-Methionin, eine der am häufigsten limitierenden Aminosäuren in der Geflügel- und Schweinezucht, versetzt (Willke, 2014). Da Tiere in der Lage sind, das metabolisch inaktive D-Met durch eine D-Aminosäure-Oxidase und Transaminase in L-Met umzuwandeln, kann D/L-Met effektiv als Racemat verfüttert werden (Yang *et al.*, 2018; Brachet & Puigserver, 1992). Dies erlaubt die nicht chirale Herstellung von D/L-Met durch chemische Synthese, wohingegen andere limitierende Aminosäuren wie L-Lysin (L-Lys), L-Threonin (L-Thr) und L-Tryptophan (L-Trp) als L-Enantiomere supplementiert werden müssen und daher eine fermentative Herstellung erfordern (Drauz *et al.*, 2007).

Eine alternative, möglicherweise weniger effiziente L-Met-Quelle für Geflügel ist 2-Hydroxy-4(methylthio)buttersäure, welche auch als Methionin-Hydroxy-Analog (MHA) bezeichnet

wird. Ähnlich wie D-Met kann D/L-MHA nach Absorption im Darm von stereospezifischen Oxidasen zur 2-Ketosäure oxidiert und anschließend zu L-Met transaminiert werden (Dilger *et al.*, 2007; Payne *et al.*, 2006)

1.2 Nachteil der chemischen Methionin-Synthese

Da trotz intensiver Forschung bislang noch kein reines Fermentationsverfahren ausgehend von nicht fossilen Ressourcen kommerzielle Anwendung findet, wird der jährliche Bedarf von weltweit 1 Millionen Tonnen D/L-Met durch chemische Synthese ausgehend von petrochemischen Rohstoffen gedeckt (Willke, 2014). Für pharmazeutische Anwendungen und Nahrungsmittel kann durch enzymatische Aufarbeitung des Racemats reines L-Met in kleineren Mengen gewonnen werden (Breuer *et al.*, 2004; Drauz *et al.*, 2007). Mit einer Produktionskapazität von ca. 60 % des Marktvolumens ist die Evonik Industries AG aktuell Marktführer, wobei die Herstellung nach wie vor auf dem Degussa-Verfahren von 1974 basiert (Wilke, 2014; Lussling *et al.*, 1981; Abbildung 1). Durch Additionsreaktion von Acrolein (1) und Methylmercaptan (2) entsteht das Aldehyd 3-Methylthiopropional (Methional, 3), welches anschließend mit Blausäure und Ammoniumhydrogencarbonat nach der Bucherer-Bergs-Reaktion zu 5-(2-Methylthioethyl)-hydantoin (4) umgesetzt wird. Letzteres wird bei 170 °C unter Überschuss von Kaliumcarbonat zu D/L-Kaliummethionat (5) hydrolysiert. Aus dem dabei anfallenden CO₂ und Ammoniak wird Ammoniumhydrogencarbonat für die Bucherer-Bergs-Reaktion rückgewonnen. Abschließend wird die Lösung mit Hilfe von gasförmigem CO₂ angesäuert und D/L-Met (6) sowie Kaliumhydrogencarbonat, welches unter geeigneten Bedingungen für die alkalische Lyse zurückgeführt werden kann, freigesetzt (Lussling *et al.*, 1981; Breuer *et al.*, 2004).

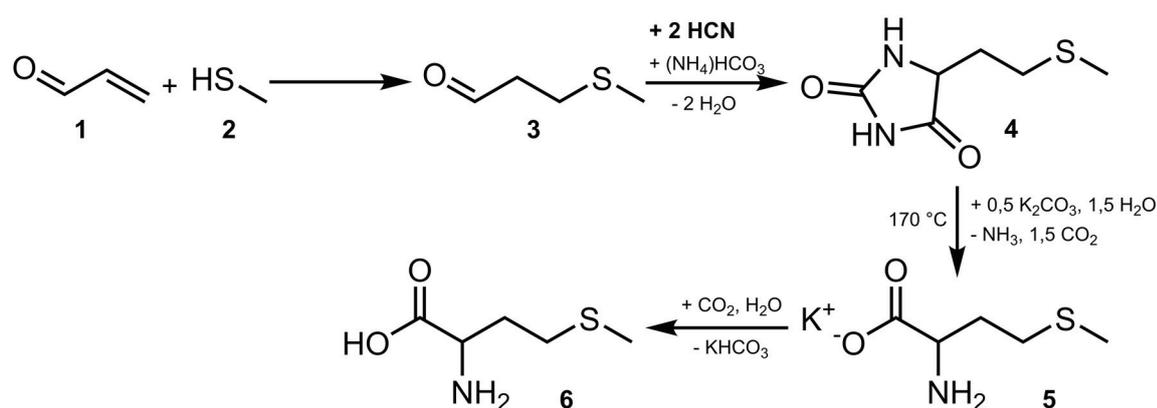


Abbildung 1. Synthese von D/L-Met nach dem Degussa-Verfahren. Nach Addition von Acrolein (1) und Methylmercaptan (2) wird das resultierende 3-Methylthiopropional (Methional, 3) mit Blausäure und Ammoniumhydrogencarbonat nach der Bucherer-Bergs-Reaktion zu 5-(2-Methylthioethyl)-hydantoin (4) umgesetzt, welches dann bei 170 °C mit Kaliumcarbonat zu D/L-Kaliummethionat (5) hydrolysiert wird. Durch Ansäuern der Lösung mit gasförmigem CO₂ entsteht D/L-Met (6) sowie Kaliumhydrogencarbonat.

Aufgrund der langfristig begrenzten Verfügbarkeit der petrochemischen Ausgangsstoffe, aber auch wegen der hohen Toxizität von Acrolein und insbesondere Blausäure wäre ein nachhaltiges Herstellungsverfahren von Vorteil (Shafiee & Topal, 2009; IPCC, 2014; Willke, 2014). Allerdings stellt die sehr komplexe Biosynthese von L-Met, die von verschiedenen zellulären Regulationsmechanismen gesteuert und vom biochemischen Schwefeleinbau abhängig ist, eine große Herausforderung für die rein fermentative Produktion dar (Ferla & Patrick, 2014; Hondorp & Matthews, 2006; Krömer *et al.*, 2006). Die Firmen Arkema und CJ CheilJedang, die zusammen 2015 die erste Produktionsanlage für „Biomethionin“ in Malaysia eröffnet haben, gewinnen L-Met durch enzymatische Umsetzung eines fermentativ produzierten L-Met Vorläufers wie O-Acetyl-L-Homoserin mit Methylmercaptan (Fremy *et al.*, 2013; Arkema, 2015). Metabolic Explorer S.A. war dagegen das erste Unternehmen, das durch Optimierung des zellulären Sulfatimports, des Met-Exports sowie durch Reduktion der Feedback-Sensitivität die Probleme der rein biosynthetischen Herstellung gelöst zu haben schien (Dischert & Figge, 2013; Dischert *et al.*, 2018; Figge & Dumon-Seignovert, 2019). Allerdings gab es seit dem Verkauf relevanter Bakterienstämme und Patente an Evonik Industries im Jahr 2016 keine Pressemitteilung, die auf den Bau einer entsprechenden Produktionsanlage hindeuten würde (Metabolic-Explorer, 2016).

Angesichts der hohen Toxizität von Blausäure, die durch Bindung an die Cytochrom-*c*-Oxidase die Zellatmung zum Erliegen bringt und als Konsequenz zur inneren Erstickung von Mensch und Tier führt, suchte Evonik 2013 in einem Wettbewerb nach innovativen wissenschaftlichen Konzepten, um den leicht verfügbaren Vorläufer Methional in einem HCN-freien Prozess zu D/L-Met umzusetzen (National-Research-Council, 2002; Willke, 2014). Im Rahmen dessen sollte eine alternative HCN-freie Syntheseroute zur Gewinnung des L-Enantiomers entwickelt werden. Durch die spezifische Synthese von L-Met ohne umständliche Racematspaltung erschließt sich neben dem Markt der Futtermittel auch der der Pharma- und Lebensmittelbranche, auf dem der 5 bis 60-fache Preis pro kg L-Met im Vergleich zu D/L-Met erzielt wird (Willke, 2014).

1.3 Biokatalytische Fixierung von CO₂ in L-Methionin

In Anbetracht der stetig steigenden atmosphärischen CO₂-Konzentration und den damit verbundenen Folgen für das Erdklima gewinnt die Suche nach Strategien zur Fixierung dieses Treibhausgases zunehmend an Relevanz (IPCC, 2014). Allerdings stellt die Rückführung des hauptsächlich durch Verbrennung von fossilen Brennstoffen freigesetzten Kohlendioxids in die Wertschöpfungskette aufgrund seiner chemischen Eigenschaften eine Herausforderung dar. Um den in CO₂ maximal oxidierten und dadurch thermodynamisch sehr stabilen Kohlenstoff als Ausgangsmaterial zu verwenden, muss Energie eingesetzt oder das chemische

Gleichgewicht durch Entzug des Reaktionsprodukts nach dem Prinzip von Le Chatelier beeinflusst werden (Sakakura *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2014).

Pflanzen und autotrophe Bakterien, die CO₂ mit Hilfe der Photosynthese zu Kohlenhydraten umsetzen (Berg, 2011), gewinnen die benötigte Energie durch Umwandlung von Lichtenergie in biochemische Energieträger wie ATP und NAD(P)H (Barber & Andersson, 1994). Zur Fixierung von einem Molekül CO₂ verbraucht das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RubisCO, EC 4.1.1.39) in der lichtunabhängigen Reaktion der Photosynthese, dem Calvin-Benson-Bassham Zyklus, drei Moleküle ATP und zwei Moleküle NAD(P)H, was einer Energie von ~114 kcal/mol (Glueck *et al.*, 2010) entspricht. Obwohl autotrophe Organismen auf diese Weise jährlich ca. 315 gt CO₂ in Biomasse assimilieren (Schwander *et al.*, 2016), kommt eine ökonomische Verwendung der RubisCO zur biotechnologischen CO₂-Assimilation nicht in Frage. Zudem erschwert die Komplexität des katalytischen Mechanismus und die Spezialisierung auf ihr natürliches Substrat Ribulose-1,5-bisphosphat – abgesehen von der störenden Nebenreaktion mit O₂ (Lorimer & Andrews, 1973) – die gezielte Herstellung anderer Produkte (Glueck *et al.*, 2010).

Andere Wege zur biologischen Fixierung von CO₂, wie zum Beispiel der reduktive Zitratzyklus (Evans *et al.*, 1966) oder der reduktive Acetyl-CoA-Weg (Ragsdale & Pierce, 2008), sind ebenfalls von hochspezifischen Enzymen, die Energie in Form von ATP oder Redoxequivalenten wie NAD(P)H oder Ferredoxin benötigen, abhängig. Eine weniger komplexe, aber ebenfalls ATP-verbrauchende biochemische Reaktion stellt die von der Pyruvatcarboxylase katalysierte anaplerotische Reaktion für den Zitratzyklus dar (Jitrapakdee *et al.*, 2008). Im Unterschied zu den beschriebenen anabolen Reaktionen benötigen Decarboxylasen (Carboxy-Lyasen, EC 4.1.1), die verschiedene katabole Reaktionen unter Freisetzung von CO₂ katalysieren, zwar einen katalytischen Cofaktor wie Thiamindiphosphat (TPP), jedoch keine typischen metabolischen Energieträger wie ATP oder NAD(P)H. Ein weiterer Vorteil für die biotechnologische Fixierung von CO₂ in gezielten Produkten ist das meist breitere Substratspektrum kataboler Enzyme (Glueck *et al.*, 2010).

Für die HCN-freie biokatalytische Umsetzung des aliphatischen Substrats Methional zu L-Met unter Verbrauch des Treibhausgases CO₂, sollte daher ein kataboles Enzym identifiziert werden, das Methional aufgrund seiner natürlichen Spezifität oder eines breiten Substratspektrums unter geeigneten Bedingungen ohne die Notwendigkeit einer biochemischen Energiequelle carboxyliert.

Interessanterweise treten sowohl Methional als auch CO₂ beim Abbau von L-Met über den 1907 von Felix Ehrlich in Hefen entdeckten, jedoch auch in anderen Organismen nachgewiesenen Weg zur Stickstoffgewinnung aus Aminosäuren unter Ammoniummangel auf (Ehrlich, 1907; Wei *et al.*, 2013). Neben L-Met werden Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin zunächst oxidativ zur α -Ketosäure deaminiert, dann zum Aldehyd decarboxyliert und

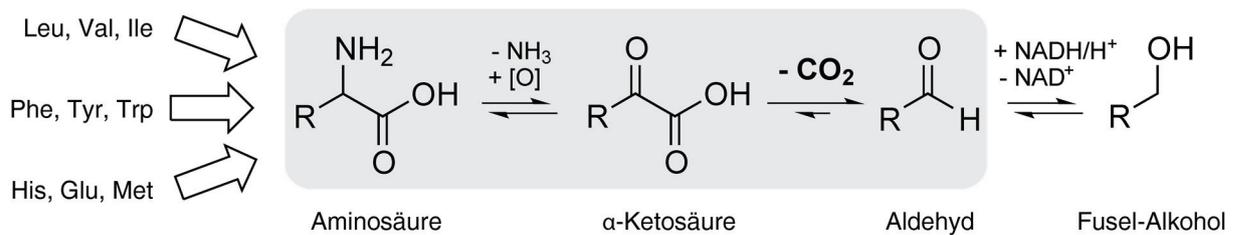


Abbildung 2. Aminosäuregärung nach Felix Ehrlich. Unter Ammoniummangel können Mikroorganismen durch den Abbau verschiedener Aminosäuren Stickstoff gewinnen. Durch Deaminierung, Decarboxylierung und anschließende Reduktion oder Oxidation werden die Aminosäuren zum korrespondierenden Fusel-Alkohol oder zur Fusel-Säure (nicht gezeigt) abgebaut. Treibende Kraft ist die wegen des niedrigen CO_2 -Partialdrucks (0,04 %) als irreversibel geltende Decarboxylierung (Hazelwood *et al.*, 2008). Allerdings kann die Reaktion nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität schon unter 2-8 bar CO_2 und mit der Triebkraft einer reduktiven Aminierung zur Synthese von Aminosäuren aus Fusel-Aldehyden (grau hinterlegt) umgekehrt werden.

schließlich entweder zum Fusel-Alkohol reduziert oder zur Fusel-Säure oxidiert (Abbildung 2; Hazelwood *et al.*, 2008; Brunke *et al.*, 2014). Ferner liegt der Katabolismus von Glutamat auf diesem Stoffwechselweg nahe. Darauf deutet die in der Trivalliteratur berichtete Bildung des als Neurostimulans wirksamen Fusel-Alkohols γ -Hydroxybuttersäure (GHB) durch Fermentation von Zuckern mit Bäckerhefe unter Zugabe von Glutamat. Andererseits kann GHB auch als Nebenprodukt des GAD/GABA-Wegs entstehen (Bach *et al.*, 2009).

Treibende Kraft des Ehrlich Pathways ist die Decarboxylierung, die wegen des niedrigen CO_2 -Partialdrucks (0,04 %) unter Normalatmosphäre als irreversibel gilt (Hazelwood *et al.*, 2008; IPCC, 2014). Nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität sollte die Umkehrung vor allem der ersten beiden Schritte des Ehrlich Pathways zugunsten der Synthese von L-Met durch (a) Carboxylierung des energiearmen aliphatischen Aldehyds Methional unter erhöhtem CO_2 -Druck und (b) anschließende Aminierung der resultierenden α -Ketosäure 4-Methylthio-2-oxobutansäure (MTOB) möglich sein (Abbildung 3 A). Tatsächlich wurde in Pilotstudien am Lehrstuhl für Biologische Chemie gezeigt, dass bereits 2-8 bar CO_2 ausreichen, um Methional mit Hilfe der gereinigten Decarboxylase KdcA aus *Lactococcus lactis* zu carboxylieren (Skerra & Eisoldt, 2016).

Aufgrund des ungünstigen chemischen Gleichgewichts ($\Delta G > 0$; Glück *et al.*, 2010) war es jedoch erforderlich, das Carboxylierungsprodukt durch Aminierung zu L-Met mit Hilfe einer Transaminase – oder alternativ einer Dehydrogenase – dem Gleichgewicht zu entziehen. Durch die gekoppelte enzymatische Reaktion wurde zudem eine sofortige Decarboxylierung nach Wiedereinstellung des atmosphärischen CO_2 -Partialdrucks verhindert. Sowohl durch Kombination der KdcA mit der Aminotransferase YbdL aus *Escherichia coli* wie auch mit der Aminosäuredehydrogenase LeuDh aus *Bacillus sphaericus* bzw. PheDH aus *Thermoactinomyces intermedius* gelang es unter 2 bar CO_2 , bis zu 3 % des eingesetzten Methionals zu L-Met umzusetzen. Dabei führte die Erhöhung der Konzentration der KdcA in der gekoppelten Reaktion mit der YbdL zu einer Zunahme der L-Met Ausbeute auf 12,5 %

(Skerra & Eisoldt, 2016). Anders als erwartet, resultierte eine Steigerung des CO₂-Drucks auf bis zu 8 bar bei einer Reaktionszeit > 10 min nicht in einer verbesserten Ausbeute. Grund hierfür könnte eine stärkere Aggregationstendenz der YbdL bei 8 bar sein, weshalb für alle nachfolgenden Versuche 2 bar CO₂ verwendet wurde (Dr. Lukas Eisoldt, unveröffentlichte Daten, 2015).

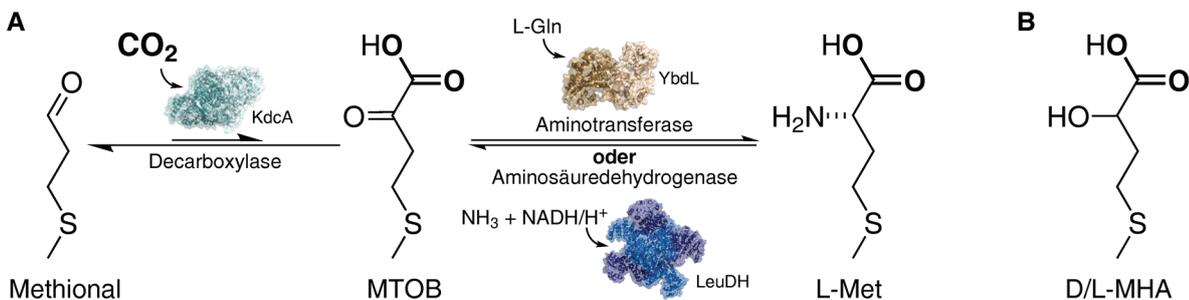


Abbildung 3. Biokatalytische Fixierung von CO₂ in L-Met. (A) Durch Carboxylierung des energiearmen Aldehyds Methional mit Hilfe der Decarboxylase KdcA entsteht die α -Ketosäure 4-Methylthio-2-oxobutansäure (MTOB). Durch anschließende Aminierung der α -Carbonylgruppe entweder durch die Aminotransferase YbdL oder die Aminosäuredehydrogenase LeuDH entsteht L-Met. (B) Alternativ kann MTOB durch enzymkatalysierte Hydrierung zum D/L-Methionin-Hydroxy-Analog (D/L-MHA) aus dem ungünstigen Gleichgewicht der ersten Reaktion entzogen werden. (PDB Codes: KdcA, 2VBF; YbdL, 1U08; LeuDH, 1LEH)

1.4 Carboxylierung mit der Decarboxylase KdcA aus *L. lactis*

Die Decarboxylase KdcA aus *L. lactis* sup. *cremoris* B1157 ist eine TPP-abhängige Decarboxylase für verzweigte α -Ketosäuren aus der Gruppe der Lyasen (EC 4.1.1.72). Sie wurde 2005 als Faktor der Geschmacksentwicklung während der Reifung von mittelharterm Käse wie Gouda entdeckt (Smit *et al.*, 2005). Dabei entstehen durch Deaminierung verschiedener Aminosäuren α -Ketosäuren, welche schließlich von der KdcA zu den korrespondierenden Aldehyden decarboxyliert werden. Letztere können zu Alkoholen reduziert bzw. zur Säure oxidiert werden, die zusammen mit den geschmacksintensiveren Aldehyden zum Geschmack beitragen (Yvon & Rijnen, 2001; Sablé & Cotteceau, 1999). Wie andere homologe TPP-abhängige Decarboxylasen aus der Aminosäuregärung nach Felix Ehrlich, darunter die Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (*scPDC*) oder die Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* (*ecIPDC*), ist die KdcA auch von Mg²⁺ als weiteren Cofaktor abhängig und besitzt im aktiven Zentrum vier konservierte ionisierbare Aminosäuren, die zur Stabilisierung der Übergangszustände beitragen (Smit *et al.*, 2005; Andrews & McLeish, 2012; Liu *et al.*, 2001). Dazu zählen zwei benachbarte Histidin-Reste (His112, His113; HH-Motiv) sowie ein konservierter Aspartatrest (Asp26) und ein Glutamatrest (Glu462), die laut der publizierten Kristallstruktur (2VBF) alle in der Nähe des Thiazoliumrings von TPP lokalisiert sind (Berthold *et al.*, 2007; Andrews & McLeish, 2012). Gemäß der Kristallstruktur weist ein KdcA-Monomer den klassischen Aufbau eines TPP-abhängigen Enzyms aus drei Domänen mit α/β -Topologie auf (Abbildung 4, A-B). Der

Die typische V-artige Konformation des TPPs, die die Bildung des für die Reaktion notwendigen TPP-Ylids unterstützt, wird von dem großen hydrophoben Rest Ile404 unterhalb des Thiazoliumrings stabilisiert (Andrews & McLeish, 2012; Berthold *et al.*, 2007). Im Unterschied zu anderen Mitgliedern der Familie enthält die mittlere Domäne der KdcA (R-Domäne; vgl. Abbildung 4 A) keine Nukleotid-Bindestelle (Muller *et al.*, 1993; Berthold *et al.*, 2007). Die katalysierte Decarboxylierung ist also unabhängig von NAD^+ , NADP^+ , ADP oder FAD und folgt nach der gut beschriebenen Deprotonierung des C2-Atoms von TPP, wodurch das C2-Carbanion oder Ylid entsteht, dem bekannten Mechanismus für TTP-abhängige Decarboxylasen (Kern *et al.*, 1997; Andrews & McLeish, 2012).

Durch Anlegen einer CO_2 -Atmosphäre sollte auch die Carboxylierung als Rückreaktion möglich sein. Der Mechanismus der bereits gezeigten Carboxylierung von Methional zu MTOB (Skerra & Eisoldt, 2016) entspräche im Sinne des Prinzips der „Mikroskopischen Reversibilität“ dem der Decarboxylierung in umgekehrter Reihenfolge. Das TPP-Ylid würde statt der Carbonylgruppe der α -Ketosäure die des Aldehyds nukleophil angreifen. Durch basenkatalysierte Abstraktion eines Protons entsteht ein über die Enamin-Form mesomeriestabilisiertes Carbanion, das im kritischsten Schritt der Reaktion CO_2 nukleophil angreift. Nach Protonierung der neu entstandenen Carboxylgruppe, wird die α -Ketosäure basenkatalysiert freigesetzt (Abbildung 4 C; abgewandelt nach Andrews & McLeish, 2012).

Im Vergleich zu anderen TTP-abhängigen Decarboxylasen ist das Substratspektrum der KdcA, die aliphatisch-verzweigte aber auch lineare α -Ketosäuren mit vier bis sechs C-Atomen sowie aromatische α -Ketosäuren umfasst, ungewöhnlich breit (Smit *et al.*, 2005; Yep *et al.*, 2006). In Kombination mit dem ebenfalls breiten pH-Aktivitätsprofil (pH 5-8), mit einem Optimum bei pH 6,3 (Smit *et al.*, 2005), macht dies die KdcA zu einem geeigneten Kandidaten für die thermodynamisch ungünstige Carboxylierung von Methional bei pH 6-7 unter 2-8 bar CO_2 .

1.5 Entzug des Carboxylierungsprodukts aus dem Gleichgewicht durch Reduktion der α -Carbonylgruppe

Da das Gleichgewicht der Carboxylierungsreaktion weit auf der Seite der Edukte liegt, ist der Entzug des Carboxylierungsprodukts MTOB – neben einem erhöhten CO_2 -Druck – nach dem Prinzip von Le Chatelier essenziell (Glueck *et al.*, 2010; Sakakura *et al.*, 2007). Letzteres besagt, dass ein im Gleichgewicht befindliches System so auf einen äußeren Zwang reagiert, dass die Wirkung des Zwanges minimiert wird (Atkins *et al.*, 2014). Im Fall der Abnahme der MTOB-Konzentration, beispielsweise durch Reduktion der α -Carbonylgruppe, sollte MTOB also solange nachgebildet werden, bis sich das Gleichgewicht neu eingestellt hat. Daher hat die enzymatische Aminierung zu L-Met oder, alternativ, die Hydrierung zu MHA neben der Gewinnung der letztlich gewünschten Aminosäure bzw. des Hydroxy-Analogons auch den

Vorteil, die thermodynamisch ungünstige Carboxylierungsreaktion anzutreiben.

Die Methionin-Aminotransferase YbdL aus *E. coli* (EC 2.6.1.88) verdankt ihren Namen der hohen Präferenz von L-Met als Aminogruppendonor (Dolzan *et al.*, 2004). Sie ist ein Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) abhängiges Enzym, das den Transfer von Aminogruppen zwischen Aminosäuren und α -Ketosäuren unter Bildung eines kovalenten Intermediates zwischen dem Substrat und dem PLP-Cofaktor katalysiert (John, 1995). Die kleinste katalytische Einheit ist ein Homodimer mit zwei aktiven Zentren an der Grenzfläche zwischen den beiden Monomeren. Da sie im Vergleich zu den strukturell nah verwandten Aspartat-Aminotransferasen eine stärker hydrophobe Substratbindetasche aufweist, welche die Substratspezifität für aromatische und aliphatische Aminosäuren (wie L-Met) bewirkt (Dolzan *et al.*, 2004), bot sie einen geeigneten Kandidaten für die Aminierung von L-Met. Als Aminogruppendonor wurde von den von Dolzan *et al.* (2004) nach abnehmender Aktivität geordneten Aminogruppendonoren L-Met, L-His, L-Phe, L-Tyr, L-Leu und L-Glu zunächst L-His eingesetzt (Dr. Lukas Eisoldt, unveröffentlichte Daten, 2015). Allerdings stellte sich heraus, dass L-Gln ebenfalls als Aminogruppendonor akzeptiert wird und sich zumindest für die Synthese von L-Met besser eignet als L-His (Skerra & Eisoldt, 2016).

Eine ökonomischere Alternative zu den Aminotransferasen stellen Aminosäuredehydrogenasen dar. Die von ihnen katalysierte reduktive Aminierung von α -Ketosäuren zu Aminosäuren benötigt statt anderer Aminosäuren nur Ammoniak als Stickstoffquelle und NADH als stöchiometrischen Cofaktor. Da NADH, einfacher als L-Gln regeneriert werden kann, wurde in Vorexperimenten bereits eine Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus sphaericus* ATCC 4525 (Li *et al.*, 2009) und eine Phenylalanin-Dehydrogenase (PheDH) aus *Thermoactinomyces intermedius* IFO 14230 (Takada *et al.*, 1991) für die Aminierung von MTOB eingesetzt (Skerra & Eisoldt, 2016). Sowohl die LeuDH (EC 1.4.1.9) als auch die PheDH (EC 1.4.1.20) waren in der Literatur dafür beschrieben, neben ihren vermutlich natürlichen Substraten 2-Ketoisocaproat/L-Leu bzw. Phenylpyruvat/L-Phe auch MTOB/L-Met als Substrat zu akzeptieren (Ohshima *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2009).

Ein potentieller Vorteil der PheDH in Bezug auf Enzymstabilität ist ihr Ursprung aus einem thermophilen Organismus. Andererseits war ebenfalls bekannt, dass die als Hexamer aktive PheDH zur irreversiblen Aggregation unter Niedrig-Salzbedingungen neigt (Takada *et al.*, 1991; Kataoka *et al.*, 1993). Obwohl für die PheDH im Unterschied zur LeuDH zwar keine Kristallstruktur vorliegt, konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die C-terminale Domäne an der Nukleotidbindung beteiligt ist und ihrerseits die Substratbindung an der N-terminalen Domäne beeinflusst (Kataoka *et al.*, 1994a). Ähnlich zeigt die apo-Kristallstruktur der aus einem mesophilen Organismus stammenden LeuDH (PDB-ID: 1LEH), dass das als Oktamer aktive Enzym ebenfalls aus einer Substrat-bindenden und einer Nukleotid-bindenden Domäne besteht (Turnbull *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1995). Allerdings weist sie mit den

Aminosäureresten L40, G41, G42, G77, G78, A113, G290, V291 und V294 in der Substratbindetasche – anders als die auf aromatische Aminosäuren spezialisierte PheDH – ein breites Substratspektrum für aliphatische Substrate auf und setzt diese stereospezifisch zu den entsprechenden L-Enantiomeren um (Li *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 1995; Kataoka *et al.*, 1994a).

Beide Enzyme verfügen – wie auch die strukturell verwandte Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) – über zwei konservierte Lysinreste im aktiven Zentrum, die an der Substratbindung und dessen Umsetzung beteiligt sind (Kataoka *et al.*, 1994b; Baker *et al.*, 1995). In der LeuDH bindet das protonierte Lys68 ($pK_a = 10,7$) durch ionische Wechselwirkung die Carboxylatgruppe des Substrats, während Lys80 dank des durch Umgebungseffekte erniedrigten pK_a von nur 8,9 als Säurekatalysator in der Aminierung (bzw. Basenkatalysator in der Deaminierung) dafür sorgt, dass Ammoniak (bzw. H_2O) das C_α -Atom des Substrats nukleophil angreifen kann (Sekimoto *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1995). Entsprechend ist das pH-Optimum dieses Enzyms für die Aminierung mit ~ 9 niedriger als für die Deaminierung mit $\sim 10,5$ bis 11 (Ohshima *et al.*, 1991; Ohshima *et al.*, 1978). Welches der beiden Enzyme die bessere Alternative zur Aminotransferase YbdL darstellt, muss der direkte Vergleich ihrer Eignung für den Entzug des Carboxylierungsprodukts aus der Reaktion bei pH 6 bis 7 zeigen.

Eine weitere Möglichkeit, die Carboxylierung zu begünstigen, ist die NADH-abhängige Hydrierung der α -Carbonylgruppe von MTOB zu MHA, welches vergleichbar mit D/L-Met in der Tierzucht eingesetzt werden kann (siehe Abschnitt 1.1 und Abbildung 3 B). Als Katalysator kommt in diesem Fall die als Homodimer aktive D-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (D-HicDH, EC 1.1.1.345) aus *Lactobacillus casei*, welche laut Literatur neben ihrem natürlichen Substrat 2-Ketoisocaproat auch MTOB umsetzt, in Frage (Hummel *et al.*, 1985; Dengler *et al.*, 1997). Ebenfalls denkbar ist der Einsatz der als Tetramer aktiven L-HicDH (EC 1.1.1.337) aus *Lactobacillus confusus*. Sie akzeptiert neben ihrem natürlichen Substrat 2-Ketoisocaproat auch 2-Ketocaproat, von dem sich MTOB nur durch ein etwas größeres Schwefelatom anstelle der Position C_5 unterscheidet (Schütte *et al.*, 1984; Niefind *et al.*, 1995). Die pH-Optima für die Hydrierung liegen mit pH 5-7,5 bzw. pH 7 für die D- bzw. L-HicDH innerhalb des pH-Bereichs (pH 6-7) der Carboxylierung. Eine Rückreaktion ist aufgrund des dafür benötigten alkalischeren pH von 8-9 dabei nicht begünstigt (Hummel *et al.*, 1985; Schütte *et al.*, 1984).

1.6 NADH-Regenerierung durch eine Formiat-Dehydrogenase

Der Einsatz von Dehydrogenasen zur Reduktion der α -Carbonylgruppe von MTOB verlangt wegen des stöchiometrischen Verbrauchs des teuren Cofaktors NADH (2600 \$ pro mol) ein effizientes System zur NADH-Regenerierung (Faber, 2018). Aufgrund milder Reaktionsbedingungen, die die Kompatibilität mit der NADH-verbrauchenden Hauptreaktion erleichtern, sowie geringen Energieverbrauchs, hoher Spezifität und Aktivität finden bisher nur enzymbasierte Ansätze industrielle Anwendung (Wang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2013).

Besonders häufig werden für die in situ Regenerierung Formiat-Dehydrogenasen (FDH) und Glucose-Dehydrogenasen (GDH) mit Formiat bzw. Glucose als Hydrid-Donoren, die ein Proton und zwei Elektronen für die Reduktion von NAD^+ zu NADH liefern, eingesetzt (Hollmann *et al.*, 2011). Während im Falle der FDH dabei nur CO_2 als Nebenprodukt entsteht, führt die Oxidation des Substrats Glucose zur Gluconsäure, die spontan zu Gluconolacton hydrolysiert. Durch das Ausgasen von CO_2 bzw. die chemische Instabilität der Gluconsäure gelten beide Reaktionen als irreversibel (Hummel & Kula, 1989; Hollmann *et al.*, 2011), wodurch die Reduktion von NAD^+ zu NADH angetrieben wird (Faber, 2018). In Folge dessen kann in der NADH -verbrauchenden Hauptreaktion ein Umsatz von bis zu 100 % erreicht werden (Tishkov & Popov, 2006). Zudem beeinflusst die Verwendung der FDH als in situ Regenerationsenzym die Aufarbeitung des Hauptprodukts dank des gasförmigen Nebenprodukts nicht (Wang *et al.*, 2017).

Aufgrund der beschriebenen Vorteile bietet sich die Verwendung einer FDH zur kontinuierlichen NADH -Regenerierung bei der Reduktion von MTOB durch die LeuDh, PheDH oder D- bzw. L-HicDH an (Abbildung 5). In Verbindung mit der Carboxylierung von Methional zu MTOB könnte das entstehende CO_2 sogar als Cosubstrat dienen. Allerdings könnte die für die Carboxylierung erhöhte CO_2 -Konzentration dazu führen, dass das Ausgasen von CO_2 nicht länger als Triebkraft der Reaktion wirkt und die FDH daher auch die Umkehrreaktion, d.h. die Reduktion von CO_2 zu Formiat unter Verbrauch von NADH , katalysiert (Obert & Dave, 1999). Dies sollte jedoch durch Zugabe einer ausreichend hohen Formiat-Konzentration bei gleichzeitig katalytischen Mengen des Cofaktors NAD^+ weitgehend verhindert werden können.

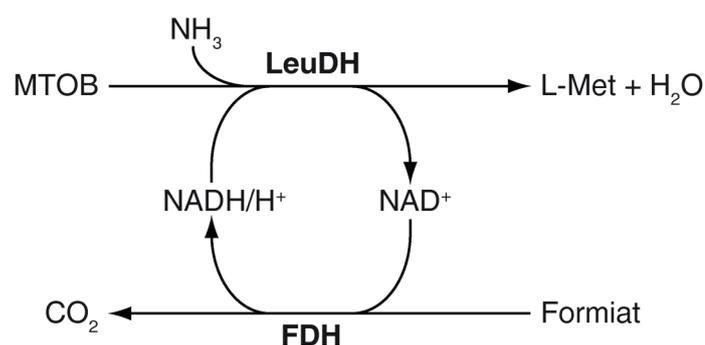


Abbildung 5. NADH -Regenerierung unter Einsatz einer Formiat-Dehydrogenase. Für die Katalyse der reduktiven Aminierung der α -Carbonylgruppe von MTOB benötigt die LeuDh Ammoniak und NADH als Hydrid-Donor. Zur Wiederverwertung des stöchiometrischen Cofaktors können durch eine Formiat-Dehydrogenase (FDH) Hydrid-Ionen von Formiat auf NAD^+ übertragen werden. Das dabei freigesetzte Proton verbleibt in Lösung und wird in der gekoppelten Reaktion mit der LeuDh für die reduktive Aminierung verwendet. Vorteile der FDH ergeben sich aus der Bildung von gasförmigem CO_2 als Nebenprodukt, was zum einen die Aufarbeitung erleichtert und zum anderen – unter üblichen Druckbedingungen – als Triebkraft für die dargestellte Reaktion wirkt. In Verbindung mit der durch die KdcA katalysierten Reaktion, könnte das freiwerdende CO_2 zudem als Substrat für die Carboxylierung von Methional dienen.

Da die FDH aus *Candida boidinii* ATCC32195 im industriellen Maßstab zur Produktion von L-*tert*-Leucin aus Trimethylpyruvat mit Hilfe einer LeuDH verwendet wird (Schütte *et al.*, 1976; Bommarius *et al.*, 1995), sollte sie auch in der gekoppelten Reaktion mit der KdcA und LeuDH eingesetzt und auf ihre Eignung zur NADH-Regenerierung unter CO₂-Druck getestet werden. Die als Homodimer aktive CboFDH weist pro Monomer zwei Cysteinreste auf, wovon C23 exponiert und dadurch zugänglich für Lösungsmittel und molekularen Sauerstoff ist, während C262 im Proteininneren begraben ist. Da die Prozessstabilität durch die Substitution von C23 durch die aliphatische Aminosäure Serin bei gleichbleibender Aktivität erhöht werden konnte (Slusarczyk *et al.*, 2000), sollte eine Thiol-vermittelte Inaktivierung in der vorliegenden Arbeit durch den Austausch C23A verhindert werden. Zusätzlich sollte die von Felber (2001) identifizierte Mutation F285S zur Erhöhung der spezifischen Aktivität durch bessere Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Formiat eingebracht werden.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bildung von L-Met durch Umkehrung des Ehrlich Pathways zur enzymatischen Carboxylierung und Aminierung des gut verfügbaren Vorläufers Methional untersucht und optimiert werden. Dazu sollten die aus der Literatur bekannten und für die Reaktion notwendigen Enzyme produziert, gereinigt und charakterisiert werden. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen sollte die bislang unbefriedigende Ausbeute durch Einsatz der Decarboxylase KdcA in Verbindung mit der Aminotransferase YbdL gesteigert werden. Die Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Carboxylierung sollte Erkenntnisse über das Potential der Reaktion für eine spätere großtechnische Umsetzung der unter physiologischen Bedingungen als irreversibel geltenden Reaktion liefern. Zudem sollte durch Vergleich der Aminotransferase YbdL mit den Aminosäuredehydrogenasen LeuDH und PheDH – unter Beachtung einer möglichst ökonomischen Bereitstellung des stöchiometrischen Cofaktors (L-Gln oder NADH) – der vielversprechendste Kandidat für die Folgereaktion identifiziert werden. Das entsprechende Enzym sollte ebenso wie die KdcA durch Protein Engineering verbessert werden, um die Methionin-Bildung effizienter zu machen. Darüber hinaus wurde der Transfer des Reaktionsprinzips dieser zweistufigen Carboxylierungsreaktion auf weitere Aminosäuren und Derivate wie zum Beispiel D/L-MHA angestrebt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Escherichia coli-Stämme:

BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (λ DE3) (Studier & Moffatt, 1986)
NEB 10-beta	Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>araD139</i> , <i>fhuA</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galK16</i> , <i>galE15</i> , e14 ⁻ , φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i> (str ^R), <i>rph</i> , <i>spoT1</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 [F': <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> ZΔM15, Tn10(<i>tet^r</i>)] (Bullock, 1987)

Plasmide:

pASK75-T7RBS	Prof. Dr. Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pASK-IBA35(+)	IBA, Göttingen
pASK-IBA35(+)-YbdL	Dr. Lukas Eisoldt, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pASK-IBA35(+)-LeuDH	Dr. Lukas Eisoldt, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pASK-IBA35(+)-PheDH	Dr. Lukas Eisoldt, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pET21-KdcA	Dr. Lukas Eisoldt, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pET21-KdcA(Y144E)	Vinzenz Buschinger, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pET21-KdcA(I264E)	Vinzenz Buschinger, Lehrstuhl für Biologische Chemie
pET21-KdcA(T486V)	Vinzenz Buschinger, Lehrstuhl für Biologische Chemie

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Als Sequenzierprimer und zur Amplifizierung von Genen

D20	5' - CCACTCCCTATCAGTGAT - 3'
PR1	5' - CGCAGTAGCGGTAAACG - 3'

Zur QuikChange-Mutagenese

LeuDh-A113G-fw	5' -GTCGTTATATTACCGGCGAAGATGTTGGCAC - 3'
LeuDh-A113G-rv	5' -GTGCCAACATCTTCGCCGGTAATATAACGAC - 3'
KdcA-F382L-fw	5' -GGCACCAGTTTTCTGGGTGCAAGCACC - 3'
KdcA-F382L-rv	5' -GGTGCTTGCACCCAGAAAACCTGGTGCC - 3'
KdcA-I465V-fw	5' -GTGGAACGTGAAGTGCATGGTCCGACC - 3'
KdcA-I465V-rv	5' -GGTCGGACCATGCACTTCACGTTCCAC - 3'
KdcA-F542L-fw	5' -GAAAAAATGGGTAAACTGCTGGCCGAGCAGAATAAACTCG - 3'
KdcA-F542L-rv	5' -CGAGTTTATTCTGCTCGCCAGCAGTTTACCCATTTTTTTC - 3'

Zur Randomisierung mittels ortsgerichteter Sättigungsmutagenese

LeuDh-L40N-fw	5' -GTGGTGACACGTATGTGGACC - 3'
LeuDh-L40N-rv	5' -GGTCCACATACGTGCACCACCSNNTGCCGGACCCAGGGTGG - 3'

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg in RP-HPLC-gereinigter Form bezogen.

Gensynthesen

Die Strukturgene für die D-HicDH (UniProt ID: P17584) und die L-HicDH (UniProt ID: P14295), sowie die CboFDH (UniProt ID: O13437; einschließlich der Austausch C23A/F285S) wurden optimiert für die heterologe Expression in *E. coli* von Thermo Fisher Scientific, Regensburg als doppelsträngige DNA-Fragmente synthetisiert. Zur Amplifizierung und Klonierung auf den entsprechenden Expressionsplasmiden wurden die Gensequenzen zusätzlich mit den entsprechenden Schnittstellen (CboFDH & D-HicDH: *KasI/HindIII*; L-HicDH: *NdeI/Eco47III*) sowie einer D20- bzw. PR1-Bindestelle am 5'- bzw. 3'-Ende versehen.

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase (aus Garnele)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Alkohol-Dehydrogenase (aus Pferdeleber)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
β-Amylase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Apo ferritin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Carboanhydrase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Cytochrom C	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Lysozym (Huhn)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

<i>Pfu</i> Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
T4 DNA-Ligase (1 U/ μ l und 4 U/ μ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Thyroglobulin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.4 Chemikalien

Acetonitril, HPLC grade (ACN)	VWR International, Darmstadt
Acetonitril, LC-MS grade (ACN)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-Stammlösung 30 % w/v mit 0,8 % v/v Bisacrylamid	SERVA, Heidelberg
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	AppliChem, Darmstadt
Universal Agarose für die Gelelektrophorese	Bio&SELL, Feucht
Ammoniaklösung, 25 %, w/v p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat, p.a.	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetrazyklin (aTc)	Acros Organics, Geel, BE
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem, Darmstadt
2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat (dATP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat (dCTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat (dGTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat (dTTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, p.a.	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol, technisch.	CLN Laborgroßhandel, Niederhummel
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Natriumformiat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Gln	Merck, Darmstadt
Glycerin, 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
2-Hydroxy-4-Methylthiobutansäure, Calciumsalz (MHA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Ile	Merck, Darmstadt
L-Ile [¹³ C ₆]	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA
Imidazol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, technisch	CLN Laborgroßhandel, Niederhummel
Isovaleraldehyd (3-Methylbutanal)	Alfa Aesar, Kandel
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
α-Keto-γ-Methylthiobutansäure, Natriumsalz (MTOB)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kohlendioxid (Druckgas, 99,8 %)	Westfalen, Münster
Kupfer-(II)-Sulfat	Merck, Darmstadt
L-Leu	Merck, Darmstadt
L-Leu [¹³ C ₂]	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	J. T. Baker, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D-Met	Carl Roth, Karlsruhe

L-Met	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Met [Methyl-D ₃]	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA
2-Methylbutyraldehyd (2-Methylbutanal)	Alfa Aesar, Kandel
3-Methylthiopropionaldehyd (Methional)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Methyl-2-Oxovaleriansäure (2-Ketoisocaproat)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid, ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Nickelsulfat	AppliChem, Darmstadt
NAD ⁺ (Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form)	Carl Roth, Karlsruhe
NADH (Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form), Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure, 85 % w/v	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylpyruvat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %, w/v p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff N50 CO-frei (Druckgas, 99,999 %)	Linde, Pullach
Synthetische Luft, KW-frei (20 % Sauerstoff, Rest Stickstoff)	Linde, Pullach
Thiaminpyrophosphat (TPP)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
tRNA aus <i>S. cerevisiae</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.5 Standards und Kits

DNA- und Proteingrößenstandards

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Unstained Protein M _w Marker	Thermo Fisher Scientific St. Leon-Rot

Kits zur DNA-Isolierung bzw. Aufbereitung

QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Quiagen, Hilden
Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kit	Promega, Madison, WI, USA

Kit zur DNA-Sequenzierung

Mix2Seq-Sequenzierungskit	Eurofins Genomics, Ebersberg
---------------------------	------------------------------

2.1.6 Geräte

Elektrophorese

Beleuchtungstisch T13	Biometra, Göttingen
HE33 Submarine (DNA-Auftrennung)	Hofer, Holliston, MA, USA
Minigel-Twin (Protein-Auftrennung)	Biometra, Göttingen
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator TI 3 (254 nm)	Biometra, Göttingen

Inkubatoren

Friocell	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Innova 43 series	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Minitron	Infors, Bottmingen, Schweiz
Multitron	Infors, Bottmingen, Schweiz

Proteinreinigung

ÄKTA Prime	GE Healthcare, Freiburg
ÄKTA Purifier	GE Healthcare, Freiburg
Fraktionssammler Frac900	GE Healthcare, Freiburg
Peristaltische Pumpe P-1	GE Healthcare, Freiburg
Signalschreiber Rec 112	GE Healthcare, Freiburg

Pipetten und Pipettierhilfe

Gilson P20, P200, P1000	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
Eppendorf Research Plus, 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
8-fach Mehrkanalpipette Research, 30 – 300 µl	Eppendorf, Hamburg
12-fach Mehrkanalpipette Research Plus, 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy acu	Integra Bioscience, Fernwald

Spektralphotometer

Microplaterereader Synergy 2	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Spektrophotometer Ultraspec 2100 pro	GE Healthcare, Freiburg
Spektrophotometer Ultraspec 3000	GE Healthcare, Freiburg

Waagen

Feinwaage 125A	Precisa Gravimetrics, Dietikon Schweiz
Laborwaage XB22C	Precisa Gravimetrics, Dietikon Schweiz
Laborwaage PE620	Gebr. Bosch, Jungingen

Wasserfilter- und Destillationsanlagen

ddH ₂ O Anlage Typ 2304	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Reinstwasser Anlage Synergy 185	Merck, Darmstadt

Zentrifugen/Rotoren

Eppendorf 5418R	Eppendorf, Hamburg
Sigma 4-16K mit Rotoren 11118 und 11156	Sigma, Osterode
Sigma 4-16KS mit Rotoren 11118 und 11156	Sigma, Osterode
Sorvall RC 12BP+ mit Rotor H-12000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sorvall RC 6 Plus mit Rotoren SS-34, SLA-3000 und 4X1L LEX	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Sonstige Geräte

Agilent Technologies 1200 Series HPLC-System	Agilent Technologies, Waldbronn
API 3200 LC-MS/MS Gerät	Sciex, Darmstadt
Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, Oberschleißheim
Elektroporator Typ „MicroPulser“	Bio-Rad Laboratories, München
IKA Combimag-RET	IKA-Werke, Staufen
Mix 15 eco Multi-Magnetrüherer	2mag, München
pH-Meter inolab pH720	WTW, Weilheim
Pipettierrobotersystem LabStar plus	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux, Wertheim
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler TPersonal	Biometra, Göttingen
Tinyclave Steel, 10 ml Autoklav	Büchi Labortechnik, Uster, Schweiz
UltiMate 3000 UHPLC	Dionex Softron, Germering
Ultraschallhomogenisator S250D mit Rosettengefäß, 20 ml	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Zellhomogenisator French Press	SLM Aminco, Urbana, IL, USA

2.1.7 VerbrauchsmaterialChromatographie-Säulen und Materialien

Chirex 3126, 4,6 x 15 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
Gemini C18, 4,6 x 150 mm, 3 µm, 110 Å	Phenomenex, Aschaffenburg
Ni-Sepharose High Performance, 1 bzw. 5 ml	GE Healthcare, Freiburg
Protino, 96-Well Ni ²⁺ -NTA Platte	Macherey-Nagel, Düren
Nucleoshell, RP18plus, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm	Macherey-Nagel, Düren
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Freiburg
Superdex 200 HiLoad 16/60, <i>prep grade</i>	GE Healthcare, Freiburg
Superdex 200 HiLoad 26/60, <i>prep grade</i>	GE Healthcare, Freiburg
XBridge Amide, 2,1 x 150 mm, 3,5 µm	Waters, Baden-Dättwil, Schweiz

Sonstiges Material

Amicon Ultrafiltrationsröhrchen, 4/15 ml (MWCO: 10 kDa, 30 kDa)	Merck, Darmstadt
Atmungsaktive Verschlussfolie für Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deep-Well Block, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einweg-Spritzen (2, 10, 30, 50 ml)	Braun Melsungen, Melsungen
Elektroporationsküvetten, Elektrodenabstand 0,2 cm	Bio-Rad Laboratories, München
Erlenmeyerkolben (50, 100, 250, 1000, 5000 ml)	Duran Group, Wertheim
Filtropur Spritzenfilter (0,22 bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Glaspipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt, Nürnberg
Laborglasflaschen (25, 50, 100, 500, 1000, 2000 ml)	Duran Group, Wertheim
Membranfilter Microsart CN, 0,45 µm	Satorius, Göttingen
Membranfilter NC20, 0,2 µm	GE Healthcare, Freiburg
Mikrotiterplatte 96-Well, Flachboden	Sarstedt, Nürnberg
Mikrotiterplatte 96-Well, Rundboden	Sarstedt, Nürnberg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, WI, USA
Petrischalen, rund ø 94 mm	Sarstedt, Nürnberg
Petrischalen, quadratisch 120x120 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	
Kristallklar (0,5 bis 10 µl)	Brand, Wertheim
Gelb (10-200 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Blau (100-1000 µl)	Gilson International, Limburg-Offheim
Spitzen für Hamilton Workstation (10, 50, 300 & 1000 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
pH-Indikatorstäbchen, pH-Fix pH 0-14	Carl Roth, Karlsruhe
Probenfläschchen für die HPLC, Typ N9, 1,5 ml mit Insets, 0,25 ml	Macherey-Nagel, Düren
Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Slida-A-Lyzer Mini Dialysis Unit (MWCO: 10 kDa, 10-100 µl)	Precisa Gravimetrics, Dietikon, Schweiz
Snap cap vials, Typ N 18, 5 ml	Macherey-Nagel, Düren
Sterilfilter Filtropur (0,45 und 9,2 µm)	Sarstedt, Nürnberg

Transferpipetten (1 mL, 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Verschlussmatte für Deep-Well Blocks	Greiner Bio-One, Frickenhausen
VIS Halbküvetten, Plastik	Sarstedt, Nürnberg
Vivaspin 500 (MWCO: 10 kDa)	Sartorius, Göttingen
Vorlegegefäße für Hamilton Workstation	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenbecher/-röhrchen (SLA1500, SS-34, H-12000)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Proteinen und DNA wurden zur Sterilisation entweder für mind. 20 min bei 121 °C autoklaviert oder filtriert (Sterilfilter 0,2 µm). Mit Ausnahme der Kulturmedien, für die entionisiertes Wasser verwendet wurde, wurden sämtliche Lösungen mit Reinstwasser (Typ I, 18,2 MΩ·cm) hergestellt. Die verwendeten Kulturplatten wurden bei 4 °C, Lösungen, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte bei Festmedien vor dem Gießen nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C und bei Flüssigmedien erst unmittelbar vor der Verwendung.

Stammlösungen (Aufbewahrung bei -20 °C)

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in 50 % v/v Ethanol (1:1000 zum Medium)
Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in DMF (1:10000 zum Medium)
IPTG	1 M in ddH ₂ O (1:1000 zum Medium)

LB-Medium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Hefeextract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.

TB-Medium

TB-Puffer-Stammlösung (10x)

KH ₂ PO ₄	0,17 M
K ₂ HPO ₄	0,72 M

TB-Medium

Bacto Trypton	12 g/l
Bacto Hefeextract	24 g/l
Glycerin	4 ml/l

Die Zugabe der autoklavierten Pufferstammlösung erfolgte nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums im Verhältnis 1:10.

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

10x Auftragspuffer für Agarosegele

Bromphenolblau	1 mg/ml
Glycerin	50 % v/v
Xylencyanol	1 mg/ml

TE-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Puffer für die SDS-PAGE

1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson (1986)

Glycin	190 mM
Tris	50 mM
SDS	1 g/L

pH 8,8 stellt sich ein.

4x Lower-Tris

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS	4 g/l

4x Upper-Tris

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	4 g/L

5x Auftragspuffer

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
Glycerin	25 % v/v
SDS	7,5 % w/v
β -Mercaptoethanol	12,5 % v/v (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung

Coomassie Brilliantblau R-250	1 % w/v
Essigsäure	10 % v/v
Isopropanol	25 % v/v

Entfärbelösung I

Essigsäure	10 % v/v
Isopropanol	25 % v/v

Entfärbelösung II

Essigsäure	10 % v/v
------------	----------

Chromatographiepuffer für die Reinigung der KdcA

IMAC:

PIPES/NaOH pH 7,0	20 mM
NaCl	300 mM
TPP	0,5 mM
MgSO ₄	1 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC:

PIPES/NaOH pH 7,0	20 mM
NaCl	500 mM
TPP	0,5 mM
MgSO ₄	1 mM

Chromatographiepuffer für die Reinigung der YbdL

IMAC:

Tris/HCl pH 7,4	40 mM
NaCl	500 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC:

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	500 mM

Chromatographiepuffer für die Reinigung der LeuDH

IMAC:

Tris/HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC:

Tris/HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	500 mM

Chromatographiepuffer für die Reinigung der PheDH

IMAC:

Tris/HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC:

Tris/HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	300 mM
β -Mercaptoethanol	0,02 % v/v

Chromatographiepuffer für die Reinigung der CboFDH

IMAC:

KP _i (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC:

KP _i (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) pH 7,5	20 mM
NaCl	300 mM

Chromatographiepuffer für die Reinigung der D-HicDH

IMAC:

PIPES/NaOH pH 7,0	50 mM
NaCl	150 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC

PIPES/NaOH pH 7,0	50 mM
NaCl	150 mM

Chromatographiepuffer für die Reinigung der L-HicDH

IMAC:

KP _i (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) pH 7,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol/HCl (im Elutionspuffer)	500 mM

SEC:

KP _i (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) pH 6,5	20 mM
NaCl	300 mM

2.2 Molekularbiologische Methoden

Etablierte Standardarbeitsvorschriften des Lehrstuhls für Biologische Chemie der TU München wurden an frühere Dissertationen der Arbeitsgruppe angelehnt, aktualisiert und ergänzt (Schlapschy, 2004; Gebauer, 2013; Kirmair, 2017).

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* XL1-blue und BL21 wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und maximal 4 Wochen zur Inokulation von Flüssigkulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden mit LB-Medium oder TB-Medium unter Zugabe geeigneter Antibiotika angesetzt. Hierzu wurden 4 ml Medium in 13 ml Kulturröhrchen mit Belüftungskappe und, bei größeren Ansätzen, 50 ml in 100 ml, 1 l in 3 l bzw. 2 l in 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Größere Kulturen wurden im Verhältnis 1:40 mit einer stationären 50 ml Übernachtskultur (30 °C, 200 rpm)

inokuliert. Die Inkubation von XL1-Blue Kulturen erfolgte bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm, im Fall von BL21 bei 22 bis 30 °C und 200 rpm. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) mit Hilfe eines Ultraspec 2100 Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten ≥ 1 wurden die Zellsuspensionen nach entsprechender Verdünnung in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurden 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 1 ml hitzesterilisiertem 87 %igem v/v Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA müssen *E. coli*-Zellen in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde, wenn nicht anders angegeben, die klassische CaCl₂-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt, wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca. 10⁵ bis zu 10⁶ Transformanden pro µg Plasmid-DNA erhalten wurden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stamms inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde die Kultur in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, 15 min) abgetrennt. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. oben) wurden die Zellen in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert (s. oben), das Sediment in 2 ml 50 mM CaCl₂, 15 % v/v Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei -80 °C bis zur Transformation gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt. Zur Transformation wurden 100 µl der auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 1 bis 5 µl Plasmid-DNA-Lsg. gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s bei 42 °C im Heizblock erwärmt und nach kurzem Abkühlen auf Eis mit 900 µl LB-Medium versetzt. Nach Inkubation dieser Zellsuspension für 45 min bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm wurden davon 20 bis 200 µl auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Herstellung der LeuDH-Genbibliothek (siehe Abschnitt 2.3.7) wurden elektrokompente NEB 10-beta Zellen (mögliche Transformationseffizienz: 10⁹ Transformanden pro µg Plasmid-DNA; New England Biolabs, Cat. #C3019) mit Hilfe der Elektroporation transformiert. Dazu wurde die DNA des Ligierungsansatzes (100 µl) zunächst gefällt, indem sie mit dem gleichen Volumen einer 5 M Ammoniumacetatlösung, 1/40 Volumen tRNA-Stammlösung

(10 mg/ml in TE-Puffer) und vier Volumen Ethanol (p. a.) versetzt und für 1 h bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 30 min), der Überstand abgenommen und das DNA-Präzipitat in 500 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Präzipitat nach Entfernung des Überstands für mindestens 2 h bei RT getrocknet. Für die Transformation wurde die DNA in 5 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst, mit 50 µl elektrokompenten NEB 10-beta Zellen (New England Biolabs) gemischt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Nach einer Minute Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe des Elektroporators „MicroPulser“ (Bio-Rad) im Programm „Ec2“ und einem elektrischen Puls von 5-6 ms Länge ausgesetzt. Um die Regenerierung der Zellen zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension sofort danach in der Küvette mit 1 ml LB-Medium versetzt, in ein 13 ml Kulturröhrchen mit Belüftungskappe, in dem bereits 1 ml LB-Medium vorgelegt war, überführt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Zellsuspension auf zwei quadratischen Petrischalen mit LB/Amp Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein Kit der Firma Qiagen (QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit) verwendet. Dieses beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der reversiblen Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Silicagel als Trägermaterial. Eine stationäre Übernachtskultur mit 3 bis 5 ml wurde nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Die Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA betrug zwischen 5 und 15 µg Plasmid-DNA, welche bei -20 °C gelagert und ohne weitere Aufarbeitung zur Spaltung mit Restriktionsenzymen eingesetzt wurde.

2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden im allgemeinen Gele mit 0,8 bis 1 % w/v Agarose verwendet. Dazu wurden 0,4 bis 0,5 g universal Agarose in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Die entstandene klare Lösung wurde anschließend abgekühlt, bevor der noch gut handwarmen Lösung im Verhältnis 1:10000 einer 1 % w/v Ethidiumbromid-Stammlösung zugesetzt wurden. Nach Durchmischen der Flüssigkeit durch kurzes Schwenken wurde sie sofort in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformern gegossen. Die Abmessungen des Gels betragen 10,5 cm in der Länge, 7,5 cm in der Breite und ca. 0,5 cm in der Dicke. Das erstarrte Agarose-Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Geltaschenformer vorsichtig entfernt. Die Beladung der Taschen erfolgte mit geeigneten Volumina der jeweiligen DNA-Lösung, welche vorher mit 6× DNA-Auftragspuffer versetzt wurde. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 bis 90 V betrieben. Durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm wurden

die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente anschließend sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten für Klonierungszwecke wurde die Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab mit breiten Geltaschenformern durchgeführt. Um Strahlenschäden zu vermeiden, wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht (312 nm) geringer Intensität visualisiert. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde unter Verwendung des Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kits (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. DNA-Konzentrationen wurden im Anschluss am NanoDrop Photometer mit Hilfe des automatischen Programms zur Messung der DNA-Konzentration bestimmt und die gereinigten DNA-Fragmente bei 4 °C gelagert.

2.2.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch PCR amplifizierte oder durch Mutagenese veränderte DNA-Abschnitte wurden der Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzierung der doppelsträngigen DNA nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger et al., (1977) erfolgte durch den Anbieter Eurofins Genomics, Ebersberg.

2.3 In-vitro-Modifizierung von DNA

2.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie die Präparation von DNA-Fragmenten wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Wahl des Puffersystems sowie der Temperatur für die enzymatische Hydrolyse erfolgte nach den jeweiligen Empfehlungen des Herstellers. Im analytischen Maßstab wurden üblicherweise ca. 0,5 µg Plasmid-DNA von 5 U einer oder jeweils zwei Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 20 µl gespalten. Der Verdau im präparativen Maßstab wurde in Reaktionsvolumina von 50 bis 100 µl mit bis zu 10 µg Plasmid-DNA und je 20 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug in beiden Fällen 1 bis 3 h bei der für die jeweiligen Endonukleasen empfohlenen Temperatur.

2.3.2 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Um eine intramolekulare Rezirkularisierung und Bildung von Konkatameren bei der Ligierung von DNA-Fragmenten ohne Überhang zu verhindern, wurde das Vektorfragment mit Alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Dazu wurden 1 h nach Beginn des Restriktionsverdau des Vektors bei 37 °C 5 U AP zugeben. Nach einer weiteren Stunde wurde das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und das dephosphorylierte

DNA-Fragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4) isoliert. Falls das zu inserierende DNA-Fragment statt mit Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.3.1) durch PCR (siehe Abschnitt 2.3.4) erzeugt worden war, wurden die 5'-Enden dagegen mit Hilfe einer T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert. Hierzu wurde das DNA-Fragment in einem Volumen von 30 μl mit 3 μl 10x T4-PNK-Puffer (Fertiglösung des Herstellers), 3 μl 10 mM ATP sowie 5 U T4-PNK für 45 min bei 37 °C inkubiert. Wiederum wurde die PNK durch Hitze inaktiviert, bevor das phosphorylierte Genfragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert wurde.

2.3.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die durch Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder durch PCR-Amplifizierung erzeugten und durch Agarosegelelektrophorese isolierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Ligierungsreaktionen wurden üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 20 μl bei 25 °C oder 4 °C für 1 bis 20 h durchgeführt. Ein Standardansatz enthielt 2 μl 10 \times Ligasepuffer (Fertiglösung des Herstellers, inkl. ATP), 1 μl T4 DNA-Ligase (1 bis 4 Weiss U/ μl) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente. 5 μl des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation CaCl_2 -kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen

Zur Amplifizierung von DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (engl.: = *Polymerase Chain Reaction*, PCR) durchgeführt (Saiki *et al.*, 1988). Die dafür als Primer eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Von der Matrizen-DNA teilweise abweichende Sequenzen konnten erzeugt werden, indem Oligodesoxynukleotide eingesetzt wurden, die stromaufwärts dieser Hybridisierungsregion an definierten Positionen andere Basen aufwiesen (Skerra, 1992). Für die Amplifizierung wurden aufgrund ihrer 3'→5'- Exonuklease-Aktivität die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase sowie die *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase unter den jeweils vom Hersteller empfohlenen Angaben eingesetzt. Ein Standardansatz von 50 μl enthielt ca. 10 ng Template-DNA, entsprechend der Herstellerangaben 0,2 bzw. 0,5 μM der jeweiligen Primer, je 200 μM der vier dNTPs, 10 μl des 5x Q5-Puffers bzw. 5 μl des 10x *Pfu* Ultra II-Puffers sowie 1 U Q5- bzw. 2,5 U *Pfu*-Polymerase. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte initial bei 95 °C für 2 min. Anschließend wurde die DNA in 30 Zyklen, die jeweils aus den folgenden drei Schritten bestanden, amplifiziert: auf die Denaturierung bei 95 °C für 20 s folgte die Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize, angepasst an deren Doppelstrang-Schmelztemperatur (Q5: $T_m + 3$ °C, *Pfu*: $T_m - 5$ °C), bei 50 bis 60 °C für 30 s. Je nach Länge des zu amplifizierenden Abschnitts sowie der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase (Q5: 10 s/kb, *Pfu*: 15 s/kb) erfolgte die Synthese der DNA bei 72 °C für 1 bis 2 min.

Zur Vervollständigung der Syntheseprodukte wurde final für weitere 3 min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C gekühlt. Zur Reinigung des PCR-Produkts wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.3.5 Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese durch *Overlap Extension PCR*

Zur Randomisierung einer Aminosäureposition wurde das Prinzip der *Overlap Extension PCR* (Ho *et al.*, 1989) verwendet. Dazu wurden in parallelen PCR-Ansätzen zwei DNA-Abschnitte mit überlappenden Enden in der Nähe der Mutagenese-position amplifiziert und nach Reinigung durch präparative Gelelektrophorese in einer dritten PCR mit Hilfe von flankierenden Primern assembliert. Die Verwendung partiell degenerierter Oligodesoxynukleotide mit einem NNS-Codon an der zu randomisierenden Aminosäureposition, wobei diese nicht im Überlappungsbereich der Primer lag, erlaubte die ortsgerichtete Randomisierung. Wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, bestimmte die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer die Hybridisierungstemperatur, während die benötigte Zeit zur Elongation durch die DNA-Polymerase von der Länge des entsprechenden DNA-Abschnitts abhing. Das final assemblierte Gen wurde mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kits nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt und für die Klonierung der Genbibliothek (siehe Abschnitt 2.3.7) bereitgestellt.

2.3.6 Ortsgerichtete Mutagenese durch *QuikChange PCR*

Der zielgerichtete Austausch von Basentriplets erfolgte durch PCR unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.2 angegebenen Mutagenese-Primer in Anlehnung an das Protokoll des QuikChange SiteDirected Mutagenesis Kit (Zheng *et al.*, 2004). Das als Matrize dienende Plasmid wurde durch die *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase gemäß den Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Als Matrize dienten ca. 10 ng Plasmid-DNA, welche aus einem *dam*⁺ *E. coli*-Stamm (z.B. XL1-Blue) isoliert wurde. Die Matrize wurde in 20 Zyklen, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, amplifiziert. Der Erfolg der PCR wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Parentale, methylierte DNA wurde anschließend durch Zugabe von 30 U *DpnI* zum PCR-Ansatz bei 37 °C für eine Stunde gespalten und anschließend über das Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt. Anschließend wurden 5 µl der DNA-Lösung für die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen (vgl. Abschnitt 2.2.2) verwendet.

2.3.7 Herstellung einer LeuDH-Plasmid-Bibliothek

Zur Klonierung der LeuDH-Plasmid-Bibliothek wurden das durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese erzeugte Gen (siehe Abschnitt 2.3.5) sowie der Vektor pASK-IBA35(+)-LeuDH mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (*XbaI/HindIII*) gespalten und durch präparative

Gelelektrophorese isoliert. Anschließend wurden sie in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit einer DNA-Konzentration von ca. 10 ng/µl über 2,5 h bei RT ligiert und zur Transformation elektrokompenter NEB 10-beta Zellen verwendet (siehe Abschnitte 2.1.1 und 2.2.2). Zur Bestimmung der Komplexität der Genbibliothek wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe auf LB/Amp Agarplatten ausgestrichen, der Rest der Zellsuspension wurde auf quadratischen LB/Amp Agarplatte ausgestrichen. Der darauf gewachsene Kolonierasen wurde mit einem sterilen Zellschaber in 5 bis 10 ml LB-Medium pro Platte abgeschabt, in einem 50 ml Röhrchen vereinigt und 10 min bei 30 °C zur Vereinzelung von Zellanhäufungen geschüttelt. Zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek wurden die Zellen aufgeteilt in vier 13 ml Kulturröhrchen sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Mini Kits isoliert (siehe Abschnitt 2.2.3).

2.3.8 Identifizierung von stabilisierenden Mutationen in der KdcA

Zur Identifizierung stabilisierender Mutationen in der KdcA sollten nach Davidson *et al.* (2006) basierend auf einem Multiplen Alignment homologer Sequenzen nicht konservierte Reste durch die an der entsprechenden Position am häufigsten auftretende Aminosäure ausgetauscht werden, um die Stabilität möglichst bei gleichbleibender Aktivität zu erhöhen. In einem ersten Schritt wurde die Aminosäuresequenz der KdcA (Uniprot ID: Q6QBS4; fasta-Format) für eine PSI-BLAST Suche in NCBI (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet. Dabei wurden Sequenzen von 46 bis 100 % Identität erhalten. Sequenzen, die keiner spezifischen Spezies zugeordnet waren oder als hypothetisch bezeichnet wurden, wurden gelöscht, die übrigen 418 wurden im fasta-Format gespeichert und für eine weitere Iteration der PSI-BLAST Suche verwendet. Diese lieferte Sequenzen mit 42 bis 48 % Identität zur KdcA. Erneut wurden Sequenzen, die keiner spezifischen Spezies zugeordnet waren oder als hypothetisch bezeichnet wurden, gelöscht. Die übrigen 427 Sequenzen wurden zusammen mit den Sequenzen der ersten Iteration im fasta-Format gespeichert. Anschließend wurde mit der Software UGene unter Verwendung des ClustalW Algorithmus ein Multiples Alignment aus allen so identifizierten 845 homologen Aminosäuresequenzen und der der KdcA erstellt und gespeichert. Zur Visualisierung und Editierung des Alignments wurde das Alignment im Programm Jalview geöffnet. Nach manueller Entfernung zu kurzer bzw. langer Sequenzen wurden durch Verminderung der Redundanz auf unter 90 % der KdcA zu ähnliche Sequenzen entfernt. Das resultierende Multiple Alignment enthielt neben der KdcA noch 40 homologe Sequenzen. Zur Analyse des Alignments wurden zunächst die absoluten Häufigkeiten, mit der eine Aminosäure an einer Position der KdcA bzw. an einer Position der Konsensussequenz gegenüber allen 41 Sequenzen vorkam, berechnet. Anschließend wurde der Quotient aus den beiden absoluten Häufigkeiten gebildet, um besonders schlecht konservierte Reste in der KdcA zu identifizieren. Während Positionen, bei denen die Sequenz der KdcA mit der Konsensussequenz übereinstimmte, zu einer relativen Häufigkeit von 1 führten, wurden Positionen, die eine

relative Häufigkeit von $\leq 0,10$ aufwies, anhand der Kristallstruktur geprüft, um besonders vielversprechende Positionen für eine Substitution mit der jeweils häufigsten Aminosäure auszuwählen. Abschließend wurde die Mutation durch ortsgerichtete Mutagenese im Rahmen der Bachelorarbeit von V. Buschinger in die KdcA eingeführt.

2.4 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.4.1 Proteinproduktion in *E. coli* im 1-2 l-Maßstab

Zur Produktion rekombinanter Proteine wurde *E. coli* BL21 mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und eine Vorkultur (50 ml LB, 100 mg/l Ampicillin) mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Biosynthese des Zielproteins erfolgte am nächsten Tag durch Inokulation von 1 l oder 2 l LB/Amp- oder TB/Amp-Medium mit der Vorkultur im Verhältnis 1:40 (Tabelle 1) in einem 3 bzw. 5 l-Erlenmeyerkolben. Diese Hauptkultur wurde bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Bei $OD_{550} = 0,3 - 0,4$ wurde die Temperatur, wenn nicht anders angegeben, auf 22 °C gesenkt und nach einer Stunde bei $OD_{550} = 0,6 - 0,8$ die Genexpression durch Zugabe von aTc oder IPTG (Tabelle 1) für 5 h induziert. Zur Ernte wurden die Zellen abzentrifugiert (4X1L LEX, 6000 rpm, 4 °C, 10 min) und das Sediment mit Hilfe eines Spatels in 50 ml-Röhrchen gesammelt und bei -20 °C eingefroren.

Um den Gesamtzellproteinextrakt zu erhalten, wurden die Zellen unter Zugabe von 3 ml des jeweiligen Chromatographiepuffers (siehe Abschnitt 2.1.8) pro 1 g Nasszellgewicht aufgetaut und resuspendiert. Im Fall der KdcA wurden 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO₄ frisch zu den resuspendierten Zellen zugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines *French Press*-Zellhomogenisators aufgeschlossen (1100 Psi, 3 Passagen). Zellmassen von weniger als 3 g wurden dagegen mit einem Ultraschallhomogenisator (S250D, 30 s Puls bei einer Amplitude von 40 %, 30 s Pause, Gesamtschallzeit 5 min) in einem Rosettengefäß auf Eis bis zur vollständigen Zellyse behandelt. In beiden Fällen wurde der erhaltene Zellextrakt durch Zentrifugation (SS-34, 16.000 rpm, 4 °C, 30 min) geklärt und der erhaltene klare Überstand für die darauffolgenden Proteinreinigungsschritte filtriert (0,45 µm).

Zur Analyse der Proteinproduktion wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten 200 µl der Kultur zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 5 min). Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellsediment in reduzierendem SDS-PAGE-Auftragspuffer auf eine Zelldichte entsprechend $OD_{550} = 1$ resuspendiert und einer Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) für die Analyse mittels SDS-PAGE unterworfen.

Tabelle 1. Kultivierungsparameter für die in der vorliegenden Arbeit in *Escherichia coli* produzierten Enzyme

Protein	Affinitätstag	E. coli-Stamm	Anzucht [°C]	Produktion [°C]	Medium	Induktor [µg/l]
KdcA	C-term. His ₆	BL21(DE3)	30	22	TB	0,1 mM IPTG
YbdL	N-term. His ₆	BL21	30	22	LB	200 aTc
LeuD _H	N-term. His ₆	BL21	30	22	LB	200 aTc
PheD _H	N-term. His ₆	BL21	30	22	LB	200 aTc
D-HicD _H	N-term. His ₆	BL21	30	22	LB	200 aTc
L-HicD _H	C-term. His ₆	BL21	30	30	LB	200 aTc
CboFD _H	N-term. His ₆	BL21	30	22	LB	200 aTc

2.4.2 Proteinproduktion und Zellaufschluss im 1 ml-Maßstab

Für das parallelisierte Screening der LeuD_H-Mutanten-Bibliothek wurde *E. coli* BL21 mit der Genbibliothek (siehe Abschnitt 2.3.7) transformiert, wobei der gesamte Transformationsansatz ausplattiert wurde (je 50 µl auf einer runden LB/Amp-Agarplatte, Ø 94 mm). Für die Produktion der LeuD_H-Varianten im 1 ml-Maßstab wurden je 150 µl TB/Amp in den Vertiefungen einer 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je einer Einzelkolonie der Bibliothek angeimpft. Als Referenz wurden sechs Vertiefungen mit je einem Klon, der mit dem Wildtyp-Gen transformiert war, angeimpft. Als Positivkontrolle dienten drei Wells mit Klonen, die LeuD_H(A113G) produzierten. Zur Messung der Hintergrundabsorption enthielten drei weitere Wells nur Medium. Nach Verschluss dieser als Vorkultur dienenden Platte mit einer atmungsaktiven Folie wurde sie über Nacht bei 37 °C, 180 rpm und 75 % Luftfeuchtigkeit in einem Multitron Inkubator inkubiert. Für die Hauptkultur wurde am nächsten Tag je 1 ml TB/Amp in die Vertiefungen einer 2 ml Deep-Well-Platte mit Hilfe eines automatisierten Pipettierroboters (LabStar plus) vorgelegt und mit je 15 µl aus der Vorkulturplatte inokuliert und unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Vorkulturplatte wurde daraufhin mit einer luftdichten Folie verschlossen und bei -20 °C aufbewahrt. Das Wachstum der Bakterienkultur wurde durch Messen der OD₅₅₀-Werte in einem Mikrotiterplattenphotometer (Synergy 2) verfolgt, indem zur Messung jeweils 100 µl der Zellsuspension in eine Flachboden-Mikrotiterplatte entnommen wurden. Bei einem (um den Hintergrund bereinigten) OD₅₅₀-Wert = 0,1 - 0,3 wurde die Genexpression durch Zugabe von 100 µl aTc-Lösung (0,2 mg/l final im Ansatz) pro Vertiefung induziert und die Temperatur auf 30 °C gesenkt. Nach 3,5 h wurde der finale OD₅₅₀-Wert gemessen, die Platte zentrifugiert (Sigma 4-16K, Rotor 11122, 5000 rpm, 4 °C, 20 min), das Kulturmedium abgegossen und der Deep-Well-Block mitsamt den Zellsedimenten bei -20 °C gelagert.

Zum Aufschluss der Zellen wurden die aufgetauten Sedimente sie mit je 1 ml auf 4 °C gekühltem Lysepuffer (2 mg/ml Lysozym, 0,06 µl/ml Benzonase, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) überschichtet und mit der 96er-Pipettiereinheit des Roboters auf einer Kühlplatte im Pipettierroboter (15 °C) für 2 min durch wiederholtes Pipettieren mit 500 µl/s resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für weitere 30 min durch wiederholtes Pipettieren mit 33 µl/s durchmischt. Abschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (Sigma 4-16K, Rotor 11122, 5500 rpm, 4 °C, 30 min) sedimentiert. Die Reinigung der LeuDh-Varianten aus dem so erhaltenen löslichen Rohextrakt erfolgte mit Hilfe des N-Terminale His₆-tags durch Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) im 96-Well Format (siehe Abschnitt 2.5.1).

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem N- oder C-terminalen Hexahistidinhängsel (His₆-tag, Tabelle 1) in *E. coli* BL21 produziert. Daher konnten sie nach dem Zellaufschluss (vgl. Abschnitte 2.4.1 und 2.4.2) in einem ersten Reinigungsschritt durch Ni²⁺-vermittelte Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) aus dem Proteinextrakt isoliert werden (Skerra *et al.*, 1991).

IMAC mit einer 1-5 ml Ni-Sepharose High Performance Säule

Wenn nicht anders angegeben, wurde der Rohextrakt mit 10 bis 30 mM Imidazol/HCl (pH 8) versetzt und mit einer Flussrate von 1-3 ml/min auf eine zuvor mit dem entsprechenden Chromatographiepuffer (siehe Abschnitt 2.1.8) äquilibrierte Ni-Sepharose High Performance Säule (5 ml Bettvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Flussrate auf bis zu 5 ml/min erhöht. Nach Erreichen der Basislinie (A₂₈₀) wurde das zu reinigende Enzym durch Anlegen eines linearen Imidazolgradienten (0 bis 500 mM Imidazol/HCl im Chromatographiepuffer) über 100-125 ml eluiert und die im Verlauf der Elution gesammelten Fraktionen (außer die der Mg²⁺ abhängigen KdcA) direkt mit EDTA zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und durch SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das Zielprotein in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und bei 4 °C bis zum nächsten Reinigungsschritt gelagert.

Zur genaueren Analyse der LeuDh-Varianten genügte eine kleinere Ni-Sepharose High Performance Säule (1 ml Bettvolumen). Nach dem Probenauftrag wurden Wirtszell-Proteine durch einen Stufengradienten mit 80 mM Imidazol/HCl im Laufpuffer von der Säule gewaschen, bevor das jeweilige Enzym über einen linearen Imidazolgradienten (80 bis 350 mM

Imidazol/HCl im Chromatographiepuffer) über 12 ml eluiert und geeignete Fraktionen für die anschließende Reinigung mittels SEC vereinigt wurden.

Zu Regeneration wurden beide Säulen nacheinander mit je 10 Säulenvolumen ddH₂O, Stripping Buffer (20 mM NaP_i, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 7,4), ddH₂O, 1 M NaOH und abschließend ddH₂O gespült und in 20 % EtOH gelagert oder für einen weiteren Lauf mit 0,1 M NiSO₄ beladen und mit ddH₂O gespült.

IMAC mit einer 96-Well Ni²⁺-Nitriloessigsäure-Agarose-Platte

Zur parallelen Reinigung der im 1 ml-Maßstab mit Hilfe der Roboter-Plattform produzierten LeuDH-Varianten wurde eine 96-Well Ni²⁺-Nitriloessigsäure-Agarose-Platte (Ni²⁺-NTA) und wiederum der Roboter verwendet. Nach dem Zellaufschluss und der Sedimentation unlöslicher Bestandteile (siehe Abschnitt 2.4.2) wurde der lösliche Rohextrakt auf die Ni²⁺-NTA-Platte übertragen. Nach 2 min Inkubation wurde der gravimetrische Fluss, wie in allen folgenden Schritten auch, durch Anlegen von Vakuum beschleunigt. Um Wirtszell-Proteine zu entfernen, wurde anschließend zweimal mit je 800 µl Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) gewaschen. Die Elution erfolgte daraufhin in zwei Stufen, zuerst mit 100 mM Imidazol/HCl im Waschpuffer, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren, dann zur Elution der LeuDH-Varianten mit 250 mM Imidazol/HCl im Waschpuffer. Das Eluat wurde in einer Flachbodenmikrotiterplatte gesammelt, mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein der LeuDH-Varianten überprüft und die Proteinkonzentration geschätzt. Bis zum Aktivitäts-Screening (siehe Abschnitt 2.6.6) wurde das Eluat bei 4 °C gelagert.

Um die Platte zu regenerieren, wurden die Säulchen unter Anlegen von Vakuum mit je 500 µl 100 mM EDTA, pH 8 und dann mit 500 µl ddH₂O gewaschen. Vor der Lagerung bei 4 °C wurden die Säulchen mit 500 µl 100 mM NiSO₄ beladen und erneut mit 500 µl ddH₂O gespült.

2.5.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde in der vorliegenden Arbeit analytisch zur Bestimmung der Quartärstruktur von Proteinen sowie präparativ zur Feinreinigung und zum Pufferwechsel verwendet. Sämtliche Chromatographiepuffer (siehe Abschnitt 2.1.8) wurden vor ihrer Verwendung filtriert (ø 0,45 µm) und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast. Zur Reinigung wurden je nach Proteinmenge Superdex 200 HiLoad 16/60 bzw. 26/60 *prep grade* Säulen (Bettvolumen 124 ml bzw. 320 ml) oder eine Superdex 200 10/300 GL Säule (Bettvolumen 24 ml) mit einem Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proteinprobe wurde die zu trennende Proteinlösung auf 1-3 % des gewählten Säulenbettvolumens eingengt (vgl. Abschnitt 2.5.4) und dann mittels einer 1 bis 10 ml fassenden Probenschleife auf die zuvor mit zwei Säulenvolumina Chromatographiepuffer äquilibrierte Säule appliziert. Anhand der

Absorption bei 280 nm wurde die Chromatographie verfolgt und Fraktionen von 0,5 bis 3 ml mit Hilfe eines Fraktionskollektors gesammelt. Nach Analyse der Fraktionen durch reduzierende SDS-PAGE wurden Fraktionen entsprechend dem gewünschten Oligomerisierungszustand vereinigt und bei 4 °C (LeuDH, PheDH) oder bei -20 °C nach Zugabe von 10 % v/v Glycerin (KdcA, YbdL, D/L-HicDH, CboFDH) bis zur Verwendung gelagert. Die Säule wurde durch Spülen mit einem Säulenvolumen 0,5 M NaOH regeneriert, mit destilliertem Wasser gespült und in 0,02 % w/v NaN₃, 1 mM EDTA gelagert.

Zur Bestimmung der apparenten Molekülmassen wurden Kalibriergeraden bezüglich des Elutionsvolumens mit folgenden Proteinen erstellt: Carboanhydrase (29,0 kDa), Rinderserumalbumin (66,0 kDa), Ovalbumin (43,0 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa), β -Amylase (200 kDa) und Apoferritin (443 kDa).

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) wurde unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (1986) zur Analyse der Proteingröße eingesetzt. Die elektrophoretische Mobilität eines mit negativ geladenen SDS-Molekülen beladenen Proteins wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins.

Zur Herstellung der 15 %igen und 0,8 mm dicken Polyacrylamid-Gele wurden zwei Glasplatten (Minigel-Twin: 10,5 cm x 9,8 cm) mit Hilfe einer Silikondichtung zusammengesetzt und mit Klammern fixiert. Für ein Trenngel des Formats 5,5 cm x 8,5 cm wurden 4,5 ml einer frisch angesetzten, polymerisierenden Trenngel-Lösung (5 ml 30 % w/v Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 2,5 ml 4 x Lower Tris, 2,5 ml Wasser, 2,5 μ l TEMED, 50 μ l 10 % w/v APS-Lösung) zwischen die Platten gefüllt und vorsichtig mit Wasser überschichtet, um Lufteintritt zu vermeiden und dadurch eine definierte Grenzfläche zum Sammelgel zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde das Wasser entfernt, 2,5 ml einer polymerisierenden Sammelgel-Lösung (1 ml 30 % w/v Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 1,5 ml 4 x Upper Tris, 3,5 ml Wasser, 4 μ l TEMED, 40 μ l 10 % w/v APS-Lösung) eingefüllt und der Taschenformer eingesetzt.

Das vollständig polymerisierte Gel zwischen den beiden Glasplatten wurde vertikal und luftblasenfrei in die mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Gelkammer eingesetzt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden jeweils mit 5 x SDS-PAGE Auftragspuffer gemischt und zur vollständigen Denaturierung für 5 min im Metallblockthermostat auf 95 °C erhitzt. Pro Geltasche wurde ein maximales Volumen von 20 μ l aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140 V für ca. 100 min. Anschließend wurden das Gel mit Coomassie Brilliantblau R-250 gefärbt. Nach Verblässen des Hintergrundes durch Schwenken in Entfärbelösung traten die Proteinbanden blau hervor. Das fertige Gel wurde photographisch

dokumentiert. Falls erforderlich, wurden anhand der Pixel-Graphikdatei ausgewählte Proteinbanden mit der Software TotalLab Quant quantifiziert.

2.5.4 Konzentrierung von Proteinen

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu erhöhen, wurde die Ausgangslösung mittels einer Konzentratoreinheit (Amicon) mit geeigneter Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, max. 4000 rpm, 4°C) auf ein der gewünschten Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Das Konzentrat wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 10 min) und der Überstand weiterverwendet. Die Konzentration der Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinlösungen (c) wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm im NanoDrop Photometer unter Korrektur um die Absorption des Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($A_{280} = \epsilon \times c \times d$) ermittelt. Der Extinktionskoeffizient ϵ wurde dabei nach einem Algorithmus, der die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und gegebenenfalls Cystin für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette summiert (Gill & von Hippel, 1989), für jedes Protein individuell mit Hilfe des Programms ProtParam auf dem ExPASy-Server (Gasteiger *et al.*, 2003) berechnet (Tabelle 2).

Tabelle 2. Anhand der Primärstruktur kalkulierte Molmasse und berechnete Extinktionskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit in *Escherichia coli* produzierten Proteine.

Protein	Anzahl Reste	Molmasse [Da]	Extinktionskoeffizient ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
KdcA (mit His ₆ -tag)	555	61949	52830
YbdL (mit His ₆ -tag)	400	44504	49850
LeuDH (mit His ₆ -tag)	378	41259	33810
PheDH (mit His ₆ -tag)	380	42029	20400
D-HicDH (mit His ₆ -tag)	347	38434	41830
L-HicDH (mit His ₆ -tag)	318	34161	21430
CboFDH (mit His ₆ -tag)	378	41819	51340

2.6 Enzymatische Aktivitätsanalyse

2.6.1 Bestimmung der Decarboxylase-Aktivität der KdcA

Zur Messung der Decarboxylase-Aktivität der KdcA wurde ein gekoppelter Assay mit einer Alkoholdehydrogenase (ADH aus Pferdeleber) verwendet. Letztere lag im Überschuss vor, sodass die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der KdcA abhing, und erlaubte durch Reduktion des Decarboxylierungsprodukts Methional unter äquimolarem NADH-Verbrauch die photometrische Verfolgung der KdcA-Aktivität bei dem NADH-Absorptionsmaximum von 340 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (Synergy 2). Alle Kinetiken wurden in Triplikaten bei 30 °C in einem Volumen von 250 µl in einer Flachboden-Mikrotiterplatte gemessen. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,1 µM KdcA, 200 µM NADH, 6 µM ADH, 0,5 mM TPP, 1 mM MgSO₄, und 50 mM PIPES/NaOH pH 7. Durch Zugabe von 0,05 bis 8 mM MTOB wurden die Reaktionen gestartet. Anschließend wurden die initialen Geschwindigkeiten innerhalb des anfänglich linearen Bereichs mit Hilfe einer NADH-Kalibriergeraden bestimmt und gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Die Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten erfolgte mit der Software OriginPro 2016G (OriginLab) mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung (Johnson & Goody, 2011).

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1)$$

2.6.2 Bestimmung der Halbwertszeiten der KdcA-Varianten

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten der KdcA-Varianten wurden je 10 µM Enzym in 20 mM PIPES/NaOH pH 7, 500 mM NaCl, 1 mM MgSO₄ und 0,5 mM TPP bei 40 °C in einem Gesamtvolumen von 1,7 ml in einem 5 ml Glasgefäß (Snap cap vials, Typ N 18) bis zu 31 h unter Rühren bei 200 rpm inkubiert. Nach 1, 3, 6, 9, 12, 16, 21, 29 und 31 h wurden je 100 µl Probe entnommen, zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 5 min) und dann 25 µl des löslichen Überstands in 975 µl 20 mM PIPES/NaOH pH 7, 500 mM NaCl, 1 mM MgSO₄ und 0,5 mM TPP verdünnt. Anschließend wurden 50 µl dieser Verdünnung zur Bestimmung der verbliebenen Enzymaktivität über den gekoppelten Assay mit der ADH (siehe Abschnitt 2.6.1) in Gegenwart von 3 mM MTOB bestimmt. Nach Normalisierung der Aktivitäten auf den jeweiligen Startwert bei $t = 0$ h wurden die Daten mit Hilfe einer exponentiellen Zerfallsfunktion (Gleichung 2) angepasst und daraus die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ (Gleichung 3) bestimmt.

$$y = y_0 + A_0 e^{-kt} \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (3)$$

2.6.3 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten für die Carboxylierung

Zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} für die reversible Carboxylierung von Methional zu MTOB mit Hilfe der Haldane-Beziehung (vgl. Abschnitt 3.1.4, Gleichung 8) wurden die Michaelis/Menten-Kinetiken der KdcA für die bimolekulare Carboxylierung und unimolekulare Decarboxylierung sowie die Produktinhibition der Decarboxylierung durch Methional jeweils bei Raumtemperatur und pH 7,1 in 250 mM NaP_i bestimmt.

Die Carboxylierung erfolgte in einem 10 ml Autoklaven (Tynyclave Steel) in einem Volumen von 1 ml unter Variation des CO₂-Drucks (1 bis 8 bar) bzw. der Methionalkonzentration (0,5 bis 20 mM). Um die schnelle Decarboxylierung bei Ablassen des CO₂-Gases zu verhindern, wurde das primäre Carboxylierungsprodukt *in situ* durch eine im Überschuss vorliegende Transaminase YbdL in Gegenwart von L-Gln als Donoraminosäure zu L-Met umgesetzt. Durch den Überschuss der YbdL hing die Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion ausschließlich von der Enzymaktivität der KdcA ab. Ein Reaktionsansatz enthielt 10 µM KdcA, 5 µM YbdL, 50 mM L-Gln, 0,5 mM TPP, 2 mM MgCl₂ und 250 mM NaP_i pH7,4, wobei der pH nach Anlegen der CO₂-Atmosphäre auf ~pH 7,1 sank (gemessen mit einem pH-Indikatorstreifen: pH-Fix pH 0-14). Die Kinetiken in Abhängigkeit von Methional wurden unter 4 bar CO₂ in Triplikaten gemessen, während die Kinetiken für CO₂ in Duplikaten mit 8 mM Methional bestimmt wurden. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Reaktionsansatz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde die Bildung von L-Met (das Produkt der gekoppelten Reaktion) durch sofortige Analyse des Überstands mit Hilfe von RP-HPLC quantifiziert. Anhand der bekannten Reaktionszeit und der ermittelten L-Met Konzentration konnte die initiale Geschwindigkeit der Carboxylierung in Abhängigkeit von der jeweiligen Substratkonzentration berechnet werden.

Durch Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten mit der Michaelis/Menten-Gleichung (siehe Abschnitt 2.6.1, Gleichung 1) wurden jeweils die enzymkinetischen Parameter bestimmt. Da die Carboxylierung von Methional in Abhängigkeit vom CO₂-Druck unter einer limitierenden Methionalkonzentration (8 mM bei $K_M(\text{Methional}) = 7,23 \text{ mM}$) gemessen wurde, musste aus dem gemessenen apparenten k_{cat} -Wert für CO₂ (k_{cat}^{app}) der Wert ohne Substratlimitierung (k_{cat}) berechnet werden. Aufgrund der plausiblen Annahme, dass in einer bimolekularen Reaktion k_{cat} für beide Substrate gleich ist, konnte aus der apparenten katalytischen Konstante ($k_{cat 1}^{app}$), die für ein Substrat unter Limitierung des anderen ($[S_2]$) gemessen wurde, durch Einsatz der (inversen) Michaelis/Menten-Gleichung (Gleichung 4) für das zweite Substrat (mit $K_{M 2}$) und Extrapolation auf die Sättigungsbedingung für das zweite Substrat, der reale $k_{cat 1}$ für das erste Substrat berechnet werden.

$$k_{cat 1} = k_{cat 1}^{app} \frac{[S_2] + K_{M 2}}{[S_2]} \quad (4)$$

Die unimolekulare Decarboxylierung von MTOB wurde wie zuvor mit Hilfe eines gekoppelten NADH Assays gemessen, allerdings unter Anpassung der Pufferbedingungen auf die der Carboxylierungskinetiken (vgl. Abschnitt 2.6.1). Dementsprechend enthielt ein 250 μ l Ansatz 0,1 μ M KdcA, 2 μ M ADH, 200 μ M NADH, 0,5 mM TPP, 2 mM MgCl₂, 250 mM NaP_i pH 7,1, und 0 bis 4 mM MTOB.

Die Produktinhibition der Decarboxylierung von MTOB durch das entstehende Methional wurde durch Messung der Abnahme der Substratkonzentration (MTOB) in Anwesenheit verschiedener vorgelegter Inhibitorkonzentrationen (Methional) bestimmt. Daher war eine indirekte Bestimmung der Decarboxylierungskinetiken über den gekoppelten NADH Assay in Abhängigkeit von der Produktbildung, wie oben bzw. in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, nicht möglich. Stattdessen wurde zur direkten Quantifizierung der Abnahme von MTOB die RP-HPLC Analyse verwendet. Pro Inhibitorkonzentration (0, 10, 20 mM Methional) wurde eine Endpunkt-Kinetik in Abhängigkeit von der variierten Substratkonzentration (0 bis 4 mM MTOB) aufgenommen. Neben den Substraten enthielten die 2 ml Reaktionsansätze je 0,1 μ M KdcA, 0,5 mM TPP, 2 mM MgCl₂ in 250 mM NaP_i pH 7,1. Durch Zugabe von 75 μ l 18,5 % w/v HCl innerhalb des linearen Bereichs, d.h. nach Decarboxylierung von 5-15 % MTOB wurde die Reaktion durch Absenkung des pH-Werts auf 2 gestoppt. Die Reaktionszeit zur Decarboxylierung von 5-15 % betrug je nach Substratkonzentration zwischen 100 bis 500 s. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 5 min), steril filtriert und mittels RP-HPLC an einer RP18plus Säule (Nucleoshell) analysiert. Durch Berechnung des Umsatzes von MTOB innerhalb der bekannten Reaktionszeit wurde die jeweilige Anfangsgeschwindigkeit bestimmt. Die Inhibitionskonstante K_i wurde durch globalen Fit der drei Kurven für kompetitive Inhibition (Gleichung 5) mit v_{\max} , K_M und K_i als gemeinsame Parameter bei jeweils fixierter Inhibitorkonzentration [I] von 0, 10 und 20 mM mit OriginPro 2016G (OriginLab) ermittelt.

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (5)$$

2.6.4 Aktivitätsnachweis und Bestimmung der Stereospezifität der YbdL

Für den Nachweis der Aktivität und zur Bestimmung der Stereospezifität der YbdL wurden in einem Volumen von 1 ml 5 μ M gereinigte YbdL in 100 mM PIPES/NaOH pH 7,0, 0,5 mM TPP, 1 mM MgSO₄ und 5 mM MTOB mit 50 mM L-Gln als Substrat bzw. Cosubstrat für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 5 min) und das Transaminierungsprodukt nach Ultrafiltration des Überstands mit Hilfe einer 4 ml Zentrifugen-Filtereinheit (MWCO 10 kDa) auf einer chiralen HPLC-Säule (Chirex 3126, 4,6 x 15 mm) analysiert. Als mobile Phase diente eine wässrige 1 mM CuSO₄ Lösung, die zur Bildung eines (D/L)-Met Komplexes mit Cu(II) führt und die Detektion bei

254 nm gestattet (Luo *et al.*, 2017). Der Vergleich der Retentionszeit des Transaminierungsprodukt mit den unterschiedlichen Retentionszeiten der chiralen D- bzw. L-Met-Standards (je 5 mM) bei isokratischer Elution ermöglichte die Bestimmung der Stereospezifität der enzymatischen Produktbildung.

2.6.5 Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenasen

Die Aktivitäten aller in dieser Arbeit hergestellten Dehydrogenasen wurden durch Verfolgen der äquimolaren Ab- bzw. Zunahme des Cosubstrats NADH bei 340 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers und einer NADH-Kalibriergeraden in einem Volumen von 250 μ l im Dreifachansatz bestimmt. Dazu wurden die initialen Geschwindigkeiten in Abhängigkeit verschiedener Substrat-konzentrationen durch lineare Regression bestimmt und gegen die entsprechende Substratkonzentration aufgetragen. Je nach Kinetik erfolgte die Kurvenanpassung mit der Michaelis/Menten-Gleichung (siehe Abschnitt 2.6.1, Gleichung 1), wenn nötig unter Beachtung unkompetitiver Substratinhibition (Gleichung 6) oder mit der Hill-Funktion (Gleichung 7) unter Verwendung der Software OriginPro 2016G (OriginLab). Gleichung 7 stellt eine allgemeinere Form der Michaelis/Menten-Gleichung unter Einbeziehung einer möglichen Kooperativität der Substratbindung in einem oligomeren Enzym charakterisiert durch den Hill-Faktor n dar. Bei $n = 1$ liegt keine Kooperativität vor, bei $n < 1$ bzw. $n > 1$ beeinflusst sich die Substratbindung der einzelnen Enzymuntereinheiten negativ bzw. positiv.

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i} \right) + K_M} \quad (6)$$

$$v = v_{\max} \frac{[S]^n}{K_M^n + [S]^n} \quad (7)$$

Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der Aktivität der LeuDh bzw. der PheDH mit ihren natürlichen Substraten (2-Ketoisocaproat bzw. Phenylpyruvat) sowie gegenüber und MTOB enthielten 20 nM LeuDh bzw. 5 nM PheDH, 200 μ M NADH, 300 mM $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9 und 100 mM $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ pH 9. Im Fall der LeuDh wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,05 bis 5 mM 2-Ketoisocaproat bzw. 0,25 bis 40 mM MTOB gestartet. Bei der PheDH wurden 10 bis 800 μ M Phenylpyruvat bzw. 0,05 bis 8 mM MTOB zugegeben.

Die Aktivität der CboFDH(C23A/F285S) wurde in Abhängigkeit von Formiat und des Cosubstrats NAD^+ , jeweils im Überschuss des anderen Substrats, bestimmt. Ein Reaktionsansatz enthielt dementsprechend 125 nM CboFDH(C23A/F285S), 100 mM KPi pH 7,5 und entweder 1 bis 200 mM Na-Formiat in Gegenwart von 2 mM NAD^+ oder 5 bis 2000 μ M NAD^+ in Gegenwart von 200 mM Na-Formiat. Gestartet wurden die Reaktionen

jeweils durch Zugabe desjenigen Substrats, in dessen Abhängigkeit die Kinetik bestimmt werden sollte.

Die Bestimmung der Aktivitäten der D-HicDH und der L-HicDH erfolgte jeweils in Abhängigkeit des natürlichen Substrats 2-Ketoisocaproat sowie von MTOB. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der D-HicDH enthielten 200 μM NADH in 100 mM NaP_i pH 7,0 sowie in Gegenwart von 5 bis 1000 μM 2-Ketoisocaproat 20 nM D-HicDH und in Gegenwart von 0,05 bis 5 mM MTOB 10 nM D-HicDH. Im Fall der L-HicDH enthielt ein Ansatz 240 μM NADH in 100 mM KP_i pH 7,0 sowie 1 nM L-HicDH und 5 bis 800 μM 2-Ketoisocaproat oder 2 nM L-HicDH und 0,02 bis 4 mM MTOB. Durch Zugabe des jeweiligen Substrats wurden die Reaktionen gestartet.

2.6.6 Parallelisierter Screening-Assay für LeuDh-Mutanten

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der im 96-Well Format produzierten und gereinigten LeuDh-Varianten (siehe Abschnitte 2.4.2 und 2.5.1) wurde die katalysierte reduktive Aminierung von MTOB anhand der äquimolaren Abnahme von NADH bei 340 nm photometrisch in einem Mikrotiterplattenphotometer verfolgt. Dazu wurden in einer Flachboden-Mikrotiterplatte mit Hilfe des Pipettierroboters (LabStar plus) pro Vertiefung 180 μl der vorbereiteten Reaktionslösung (200 μM NADH, 10 mM MTOB, 300 mM $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9, 100 mM $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ pH 9) vorgelegt und für 5 min bei 30 °C vortemperiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch die simultane Zugabe von je 20 μl der ebenfalls auf 30 °C vortemperierten Chromatographie-Elutionsplatte (siehe Abschnitt 2.5.1) mit Hilfe der 96er-Pipettiereinheit des Roboters. Die Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm erlaubte anhand einer NADH-Kalibriergeraden die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten der LeuDh-Varianten in Gegenwart von 10 mM MTOB bei 30 °C. Diese MTOB-Konzentration entspricht etwa dem K_M -Wert der wtLeuDh (10,8 mM) und wurde gewählt, da sie erlaubte eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit verbesserter Varianten gegenüber der wtLeuDh nachzuweisen. Als Referenz bzw. Positivkontrolle dienten sechs Vertiefungen, die die wtLeuDh bzw. drei Vertiefungen, die die LeuDh(A113G) enthielten. Die drei Wells, die zur Messung der Hintergrundabsorption nicht beimpft worden waren (siehe Abschnitt 4.2.2), dienten als Negativkontrolle. Da sich Variationen des Zellwachstums während der Proteinproduktion auf die gemessenen Aktivitäten auswirkten, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten auf die um die Hintergrundabsorption bereinigte Zelldichte bei der Ernte normalisiert. Um die besten Varianten zu identifizieren, wurden ihre Aktivitäten mit dem Mittelwert der sechs wtLeuDh-Proben verglichen. Varianten, die eine um mind. eine Standardabweichung höhere Aktivität als der Mittelwert des Wildtyp-Enzyms aufwiesen, wurden anschließend bezüglich ihres Genotyps untersucht, indem der entsprechende Klon der Vorkulturplatte (siehe Abschnitt 2.4.2) für die DNA-Isolierung und Sequenzierung kultiviert wurde (siehe Abschnitte 2.2.1; 2.2.3 und 2.2.5).

2.6.7 Biokatalytische Produktion von L-Methionin, L-Leucin und L-Isoleucin

Für die biokatalytische Produktion von L-Met mit Hilfe der Decarboxylase KdcA und der Transaminase YbdL wurden die gereinigten Enzyme (Konzentrationen sind im jeweiligen Versuch angegeben) mit den folgenden Reaktionskomponenten in einem Volumen von 1 ml in einem 10 ml Autoklaven inkubiert: 200 mM NaHCO₃ pH 8, 0,5 mM TPP, 1 mM MgSO₄, 50 mM L-Gln. Durch Zugabe von 1 bis 4 mM Methional und Anlegen von 2 bis 8 bar CO₂ wurde die Reaktion gestartet, wobei der initiale pH der Lösung durch die CO₂-Atmosphäre auf ca. 6,4 (gemessen mit einem pH-Indikatorstreifen: pH-Fix pH 0-14) sank. Nach 1 bis 48 h wurde der Reaktionsansatz entnommen und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 5 min), um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Direkt im Anschluss wurde der klare Überstand durch RP-HPLC auf die Bildung von L-Met analysiert.

Zur Produktion von L-Met mit der KdcA und einer der Aminosäuredehydrogenasen LeuDh oder PheDH wurden die gereinigten Enzyme (Konzentrationen sind im jeweiligen Versuch angegeben) in einem Volumen von 1 ml mit folgenden Reaktionskomponenten versetzt: 500 mM NH₄HCO₃ pH 8, 0,5 mM TPP, 1 mM MgSO₄ und 2 bis 4 mM NADH. Anschließend wurde die Reaktion im 10 ml Autoklaven durch Zugabe von 4 mM Methional und das Anlegen von 2 bis 8 bar CO₂ gestartet. Der initiale pH der Lösung betrug 8 und sank unter der CO₂-Atmosphäre auf ca. 7 (gemessen mit einem pH-Indikatorstreifen: pH-Fix pH 0-14). Zur Produktion von L-Met unter NADH-Regeneration wurden dem Reaktionsansatz bestehend aus 4 mM Methional, 20 µM KdcA, 7 µM LeuDh in 500 mM NH₄HCO₃ pH 8, 0,5 mM TPP, 1 mM MgSO₄ anstelle des reduzierten Cofaktors NADH 600 µM des oxidierten Cofaktors NAD⁺ sowie 5 µM der Formiatdehydrogenase CboFDH(C23A/F285S) und 140 mM Na-Formiat (~Sättigungskonzentration) als Hydrid-Donor zugesetzt. Die Produktbildung wurde nach 1 bis 24 h Reaktionszeit direkt im Anschluss wie zuvor beschrieben mittels RP-HPLC bestimmt.

Für den Nachweis der Synthese von L-Met, L-Leu und L-Ile mittels LC-MS/MS wurden in einem 10 ml Autoklaven in einem Endvolumen von 1 ml 30 µM KdcA und 20 µM LeuDh mit 500 mM NH₄HCO₃ pH 8, 0,5 mM TPP, 1 mM MgSO₄ und 4 mM NADH versetzt. Durch Zugabe von 4 mM des entsprechenden Aldehyds, d.h. Methional, 3-Methylbutanal oder 2-Methylbutanal, und das Anlegen von 2 bar CO₂ wurde die Reaktion gestartet. Nach 48 h wurde die Lösung wie zuvor zentrifugiert und der Überstand sofort einer Ultrafiltration mit Hilfe einer 4 ml Zentrifugen-Filtereinheit (MWCO 10 kDa) unterzogen. Die biokatalytischen Reaktionsprodukte in dem enzymfreien Filtrat wurden bei -20 °C bis zur Analyse mittels LC-MS/MS gelagert.

2.6.8 Biokatalytische Produktion des Methionin-Hydroxy-Analogons (MHA)

Zur Produktion von (D/L)-MHA mit der KdcA und der D- bzw. L-HicDH wurden die gereinigten Enzyme (Konzentrationen sind im jeweiligen Versuch angegeben) in einem 10 ml Autoklaven in einem Endvolumen von 1 ml mit folgenden Reaktionskomponenten versetzt: 200 mM NaHCO₃, 0,5 mM TPP, 1 mM MgCl₂ und 600 µM NADH. Durch Zugabe von 4 mM Methional und das Anlegen von 8 bar CO₂ wurde die Reaktion gestartet. Unter CO₂ Atmosphäre betrug der pH ~6,4 (gemessen mit einem pH-Indikatorstreifen: pH Fix pH 0-14). Zur Produktion von (D/L)-MHA unter NADH-Regeneration wurden anstelle von NADH 600 µM NAD⁺ und zusätzlich 5 µM CboFDH(C23A/F285S) sowie 140 mM Na-Formiat (Sättigungskonzentration) als Hydrid-Donor zugeben. Nach 1,5 bis 8 h wurde die Bildung von D/L-MHA wie für die biokatalytische Produktion von L-Met beschrieben durch sofortige Analyse des Überstands der zentrifugierten Lösung mittels HPLC nachgewiesen.

2.6.9 Produktnachweis mittels RP-HPLC

Die Bildung von L-Met und (D/L)-MHA wurde durch *Reverse Phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) unter Verwendung einer C18-Säule (Gemini, 4,6 x 15 mm) mit Hilfe des Agilent Technologies 1200 Series HPLC-Systems bei einer Flussrate von 1 ml/min quantifiziert. Als mobile Phase dienten folgende Lösungen: A) 1 % v/v H₃PO₄ in H₂O (pH ~2) und B) 100 % Acetonitril. Nach Injektion von 5 µl Probe wurde für 10 min isokratisch mit 4 % B eluiert. Anschließend wurde der Anteil von B innerhalb von 5 min auf 100 % erhöht, für 4 min gehalten und dann im Verlauf von 5 min wieder auf 4 % gesenkt. Nach weiteren 11 min war die Säule zum Auftragen der nächsten Probe äquilibriert.

Die Quantifizierung von MTOB erfolgte auf einer RP 18plus Säule (Nucleoshell, 4,6 x 15 mm, 2,7 µm) durch RP-HPLC bei einer Flussrate von 1 ml/min. Als mobile Phase A wurden 0,1 % v/v H₃PO₄ in H₂O (pH 6,9, eingestellt mit NaOH) und als mobile Phase B 100 % Acetonitril verwendet. Nach dem Auftragen von 5 µl Probe wurde die isokratische Elution mit 5 % B eingeleitet. Nach 3 min wurde der Anteil B innerhalb von 1 min auf 50 % erhöht, für 3 min gehalten, und dann innerhalb von 1 min auf 5 % gesenkt. Nach weiteren 7 min war die Säule für die Analyse einer weiteren Probe äquilibriert.

Die Detektion von L-Met, D/L-MHA und MTOB erfolgte anhand der mit den Reinsubstanzen bestimmten Retentionszeiten durch Absorptionsmessung bei 210 nm. Zur Quantifizierung wurden Kalibrierchromatogramme der Reinsubstanzen gelöst im Puffer der jeweiligen Enzymreaktion aufgenommen. Nach manueller Integration der Peak-Fläche der jeweiligen Reinsubstanz ab der Basislinie wurden die Peakflächen bei verschiedenen eingesetzten Konzentrationen als Gerade aufgetragen.

2.6.10 Produktnachweis mittels LC-MS/MS

Der Nachweis und die Quantifizierung der enzymatisch synthetisierten Aminosäuren L-Met, L-Leu, L-Ile erfolgte in modifizierter Weise mit der Methode des *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) (Hillmann & Hofmann, 2016). Die Analyse wurde mit einem API 3200 LC-MS/MS System in Verbindung mit verbunden mit einer UltiMate 3000 UHPLC-Anlage durchgeführt. Diese war mit einer 150 mm x 2,1 mm XBridge Amide Säule für die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) und einer entsprechenden Vorsäule ausgestattet. Als Zerstäubergas (65 psi) wie auch als Turbogas zur Lösungsmitteltrocknung (55 psi) wurde synthetische Luft eingesetzt. Als Gegenstromgas zur Tröpfchenverkleinerung (35 psi) und als Stoßgas (3×10^{-5} Torr) diente Stickstoff. Die Spannung für die Elektrospray Ionisation (ESI) betrug 5500 V bei einer Quelltemperatur von 400 °C. Die Gerätesteuerung und Datenerfassung erfolgte mit der Analyst Software Version 1.6.2 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der TUM mit Unterstützung von Herrn Christian Schmid.

Jede Probe à 196 µl (1:10 in einem 50:50 Gemisch aus H₂O/Acetonitril verdünnt) wurde mit 4 µl der entsprechenden Isotopen-markierten Aminosäure (L-Ile [¹³C₆], L-Leu [¹³C₂], L-Met [Methyl-D₃] je 1 mM) als interner Standard versetzt, bevor 2 µl der Mischung in das LC-MS/MS System injiziert wurden. Als mobile Phase A für die Chromatographie diente Acetonitril mit 5 % v/v wässrigem Ammoniumacetat (5 mM, mit Essigsäure auf pH 3,0 eingestellt) und reines wässriges Ammoniumacetat (5 mM, mit Essigsäure auf pH 3,0 eingestellt) als mobile Phase B. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Während der ersten 5 min des Konzentrationsgradienten wurde der Anteil B von 10 auf 15 % erhöht, dann innerhalb von 4 min von 15 auf 100 %. Nach 4,5 min bei 100 % wurde das Lösungsmittel B innerhalb von 1 min wieder auf 10 % reduziert und für 5 min beibehalten.

Im Verlauf der chromatographischen Trennung wurden die Aminosäuren bzw. die Isotopen-markierten Standards im positiven Ionisierungsmodus (ESI⁺) anhand charakteristischer Massenübergänge (m/z Ausgangs-Ion → Fragment-Ion) und energetischer Parameter (*Declustering-Potential* (DP), *Entrance-Potential* (EP), *Collision Energy* (CE), *Cell Exit-Potential* (CXP)) analysiert. Die Werte für die einzelnen Aminosäuren lauten: L-Met (m/z 150,1 → 104,1; DP: + 21 V, EP: + 8,5 V, CE: + 17 V, CXP: + 4 V); L-Met-[Methyl-D₃] (m/z 153,1 → 107,0; DP: + 26 V, EP: + 8 V, CE: + 17 V, CXP: + 4 V); L-Leu (m/z 132,2 → 86,2; DP: + 21 V, EP: + 9.5 V, CE: + 17 V, CXP: + 4 V); L-Leu [¹³C₂] (m/z 134,2 → 87,1; DP: + 26 V, EP: + 8 V, CE: + 17 V, CXP: + 2 V); L-Ile (m/z 132,2 → 86,2; DP: + 26 V, EP: + 7 V, CE: + 17 V, CXP: + 2 V); L-Ile [¹³C₆] (m/z 138,2 → 91,1; DP: + 26 V, EP: + 8 V, CE: + 17 V, CXP: + 2 V). Diese MRM-Parameter wurden für jede Aminosäure optimiert, indem die Fragmentierung des $[M + H]^+$ Ions in spezifische Produkt-Ionen in Anwesenheit von Stickstoff als Kollisionsgas detektiert wurde. Für die Quantifizierung der biokatalytisch hergestellten Aminosäuren wurden acht verschiedene Konzentrationen der reinen Aminosäure (0,001 bis 1,0 mM) mit jeweils

1 mM des internen Standards versetzt. Die so erhaltenen Kalibrierlösungen wurden dreifach mittels der oben beschriebenen Methode analysiert. Nach Integration der Peakflächen der reinen Aminosäuren sowie die der internen Standards, wurde das Verhältnis der Peakflächen gegen das entsprechende Konzentrationsverhältnis aufgetragen und anschließend anhand linearer Regression die Kalibrierkurve erstellt (Korrelationskoeffizienten $> 0,99$ für jeden Analyten).

2.7 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Agilent ChemStation, B.03.02 [341] 2001-2008	Agilent Technologies, Waldbronn
Analyst 1.6.2	Sciex, Darmstadt
BioDocAnalyse 2.67.0.6	Biometra, Göttingen
(PSI-)BLAST (http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
BRENDA	(Schomburg <i>et al.</i> , 2017)
Creative Suite 4	Design Standard Adobe Systems, San Jose, CA, USA
ChemDraw Ultra 12.0	PerkinElmer, Rodgau
EndNote X7.8	Thomson Reuters, New York City, USA
ExPASy; ProtParam (http://web.expasy.org/protparam)	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
Gen5 1.09.7	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
GENTle 1.9.4	Magnus Manske, Universität Köln
Jalview 2.10.3b1	(Waterhouse <i>et al.</i> , 2009)
NanoDrop 2000/2000c 1.6.198	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Office Professional Plus 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
OriginPro 2016G	OriginLab, Northampton, MA, USA
Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb)	(Berman <i>et al.</i> , 2000)
PyMol 1.3	(DeLano, 2002)
TotalLab Quant	TotalLab, Newcastle upon Tyne, UK
Unicorn 5.20	GE Healthcare, Freiburg
UGene 1.29.0	Unipro, Novosibirsk, Russland (Okonechnikov <i>et al.</i> , 2012)
UniProt (http://www.uniprot.org)	(Apweiler <i>et al.</i> , 2004)

3 Ergebnisse

3.1 Biokatalytische Synthese von L-Methionin mit Hilfe einer Decarboxylase und Aminotransferase

Wie unter anderem in dieser Arbeit demonstriert wird, ist die biokatalytische Synthese von L-Met grundsätzlich durch Umkehrung der aus der Hefe bekannten Aminosäuregärung (Ehrlich-Stoffwechselweg) möglich (Hazelwood *et al.*, 2008). Vorarbeiten von Skerra & Eisoldt (2016) legten nahe, dass schon 2 bar gasförmiges CO₂ ausreichen, um den Aldehyd Methional mit Hilfe der Decarboxylase KdcA aus *L. lactis* (Smit *et al.*, 2005) zu carboxylieren. Die Aminierung der dabei entstehenden α -Ketosäure MTOB zu L-Met durch die Aminotransferase YbdL aus *E. coli* (Dolzan *et al.*, 2004) verhindert die vom Gleichgewicht eigentlich favorisierte Rückreaktion. Allerdings betrug die anfängliche L-Met Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Methionalkonzentration unter Verwendung der KdcA und YbdL höchstens 12,5 % (Skerra & Eisoldt, 2016). Um die Ausbeute durch Optimierung der Reaktionsbedingungen zu steigern, mussten die beiden Enzyme in größerer Menge produziert, gereinigt und charakterisiert werden. Zudem war die in der Literatur noch unbestätigte Stereospezifität der YbdL zu analysieren. Die Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Carboxylierungsreaktion von Methional sollte Erkenntnisse über das Potential der Reaktion für eine spätere technische Umsetzung der unter physiologischen Bedingungen als irreversibel geltenden Reaktion liefern.

3.1.1 Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Decarboxylase KdcA

Die heterologe Produktion der Decarboxylase KdcA mit einem C-terminalen His₆-tag erfolgte unter Kontrolle des T7-Promotor/lac-Operator-Systems mit dem Expressionsplasmid pET21-KdcA in *E. coli* BL21(DE3) (Abbildung 6 A).

Die Induktion der Genexpression der KdcA erfolgte ab OD₅₅₀ = 0,6 - 0,8 mit 0,1 mM IPTG für 5 h bei 22 °C in TB-Medium. Zum Zeitpunkt der Zellernte betrug die OD₅₅₀ \approx 4,5. Nach Zellaufschluss in der *French Press* wurde die KdcA anhand des His₆-Affinitätsanhängsels durch IMAC aus dem löslichen Gesamtzellextrakt isoliert. Das Chromatogramm der darauffolgenden präparativen SEC zeigte einen Peak mit dem Elutionsvolumen entsprechend dem KdcA-Homodimer (apparente Molmasse: 112 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 62 kDa). Die Ausbeute pro Liter Kultur mit einer auf 1 normierten OD₅₅₀ betrug \sim 13 mg bei einer Reinheit von ca. 90-95 % (Abbildung 6 B-C).

Zur Analyse der Funktionalität der KdcA wurde die Decarboxylase-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrats MTOB gemessen. Da die Änderung der Substrat- oder Produktkonzentration nicht direkt photometrisch verfolgt werden konnte, wurde ein gekoppelter Assay mit einer im Überschuss zugegebenen Alkoholdehydrogenase (ADH aus Pferdeleber) verwendet, sodass anhand des äquimolaren NADH-Verbrauchs zur Reduktion des

Decarboxylierungsprodukts Methional die Enzymaktivität bei 340 nm gemessen werden konnte. Der Aktivitätsverlauf unter Variation des Substrats MTOB gehorchte einer klassischen Michaelis/Menten-Kinetik (Johnson & Goody, 2011) mit einem K_M -Wert von $1,04 \pm 0,09$ mM und einer Wechselzahl (k_{cat}) von $12,3 \pm 0,3$ s⁻¹ (Abbildung 6 D).

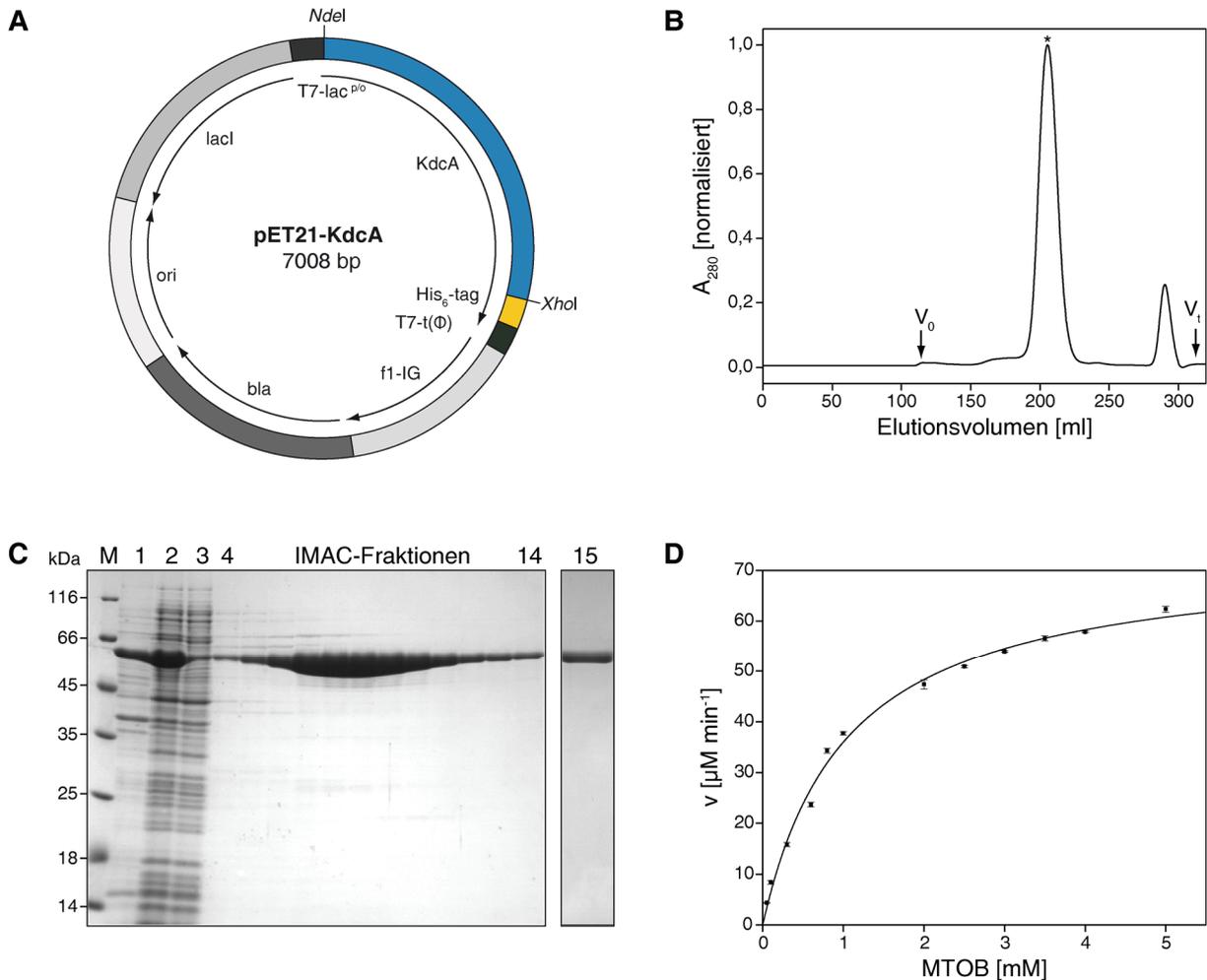


Abbildung 6. Expressionsplasmid, Reinigung und Enzymaktivität der rekombinanten Decarboxylase KdcA. (A) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pET21-KdcA, welches das synthetische Strukturgen für die KdcA inklusive eines His₆-tag am 3'-Ende unter Kontrolle des T7-Promotor/lac-Operators (T7-lac^{oP}), gefolgt vom T7-Terminator (T7-t(Φ)), trägt. Weitere Elemente auf dem Plasmid sind der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (ori), der Replikationsursprung der intergenen Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG) und das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Gen der β-Lactamase (bla). Der kodierte Lac-Repressor (lacI) inhibiert sowohl den lac-Operator des Plasmids als auch den lac-Operator in *E. coli* BL21(DE3), der die Expression der genomisch kodierten T7 RNA-Polymerase steuert. (B) Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) an einer Superdex S200 26/60-Säule im Anschluss an die Reinigung durch IMAC. Das Enzym KdcA eluiert bei einem Volumen (*) entsprechend des Homodimers (apparente Molmasse: 112 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 62 kDa). Der zweite Peak ist auf niedermolekulare Substanzen wie TPP zurückzuführen. (C) Dokumentation der Reinigung der KdcA mittels IMAC und SEC durch reduzierende 15%ige SDS-PAGE. Spur M: Proteingrößenstandard (kDa); Spur 1: sedimentierte Aggregate des bakteriellen Zellextrakts nach Lyse der Bakterien mittels *French Press*; Spur 2: Gesamtzellextrakt mit den löslichen Proteinen; Spur 3: nicht bindende Proteine nach dem Auftrag auf die 5 ml Ni-Sepharose Säule; Spuren 4-14: KdcA-haltige Elutionsfraktionen der IMAC, die anschließend vereinigt und durch präparative SEC gereinigt wurden; Spur 15: vereinigte SEC-Elutionsfraktionen für die KdcA. (D) Messung der enzymatischen KdcA-Aktivität gegenüber dem Substrat MTOB, indem das Decarboxylierungsprodukt Methional von einer im Überschuss vorliegenden Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber unter NADH-Verbrauch reduziert wurde. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,1 μM KdcA in 50 mM PIPES/NaOH (pH 7), 1 mM MgSO₄ und 0,5 mM TPP sowie 6 μM ADH und 200 μM NADH. Die Abnahme der NADH-Konzentration wurde im Dreifachansatz bei 30 °C photometrisch bei 340 nm verfolgt. Durch Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten unter Verwendung der Michaelis/Menten-Gleichung wurde $K_M = 1,04 \pm 0,09$ mM und $k_{cat} = 12,3 \pm 0,3$ s⁻¹ ermittelt.

3.1.2 Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Aminotransferase YbdL

Für die Überproduktion der Aminotransferase YbdL gegenüber dem endogenen Enzym mit einem N-terminalen His₆-tag wurde *E. coli* BL21 mit dem Plasmid pASK-IBA35(+)-YbdL, auf dem das synthetische Strukturgen für die YbdL unter Kontrolle des tet-Promotor-/Operatorsystems (Skerra, 1994) steht, verwendet (Abbildung 7 A).

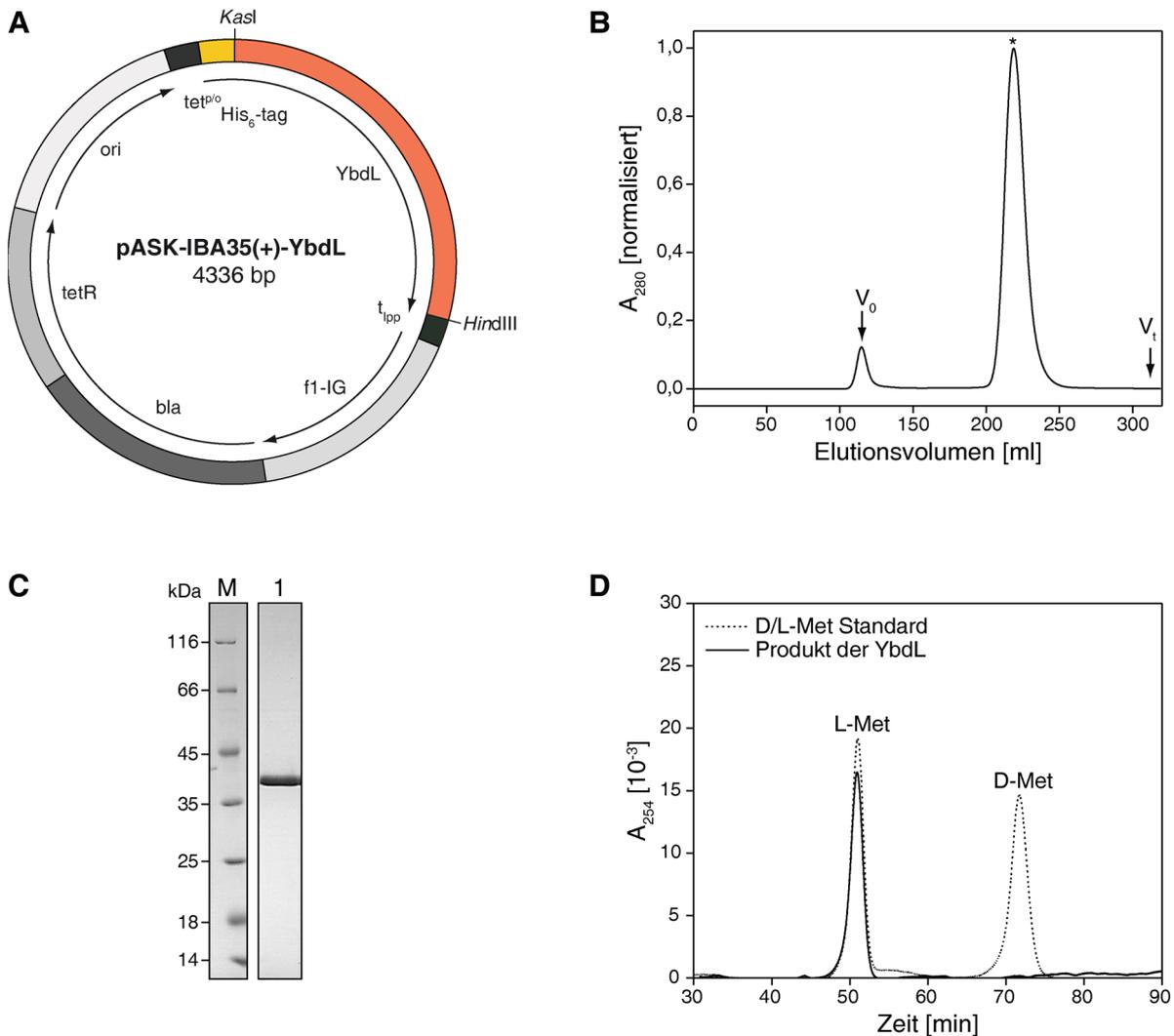


Abbildung 7. Expressionsplasmid, Reinigung und Stereospezifität der rekombinanten Aminotransferase YbdL. (A) Schematische Darstellung des bakteriellen Plasmids pASK-IBA35(+)-YbdL, welches für die YbdL unter Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin regulierbaren tet-Promotor/Operators (*tet^R*) gefolgt vom Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*t_{lpp}*) kodiert. Am 5'-Ende ist das Strukturgen mit einer für das His₆-tag kodierenden Sequenz fusioniert. Die konstitutive Expression des tet-Repressors (*tetR*), in Transkriptionsfusion mit dem *bla*-Gen, reprimiert den Promotor. Außerdem trägt das Plasmid den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (*ori*) und die intergene Region (Replikationsursprung) des filamentösen Phagen f1 (*f1-IG*). (B) Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) an einer Superdex S200 26/60-Säule im Anschluss an die Reinigung durch IMAC. Das Enzym YbdL eluiert bei einem Volumen (*), das annähernd dem Homodimer zugeordnet werden kann (apparente Molmasse: 66 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 45 kDa). (C) 15%ige, reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Proteingrößenstandard (kDa); Spur 1: vereinigte SEC-Elutionsfraktionen der YbdL. (D) Die Stereospezifität der YbdL nach zweistündiger Aminierung von MTOB (5 mM) mit 50 mM L-Gln zu Methionin in Gegenwart von 100 mM PIPES/NaOH (pH 7) wurde mittels chiraler HPLC an einer Chirex 3126 Säule analysiert. Das Elutionsprofil zeigt im Vergleich zu dem racemischen D/L-Met Standard (je 5 mM), die enantioselektive Bildung von L-Methionin.

Die Induktion der Genexpression der YbdL erfolgte ab $OD_{550} = 0,6 - 0,8$ mit $0,2 \text{ mg/l aTc}$ für 5 h bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ in LB-Medium. Bei Zellernte betrug die $OD_{550} \approx 2,9$. Nach der Produktion wurden die Bakterien mit der *French Press* aufgeschlossen und die YbdL anhand des His₆-tags durch IMAC aus dem löslichen Zellextrakt isoliert. In der sich anschließenden präparativen SEC eluierte die YbdL mit einem Elutionsvolumen, das annähernd dem Homodimer zuzuordnen ist (apparente Molmasse: 66 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 45 kDa). Die Ausbeute pro Liter Kultur mit einer auf 1 normierten OD_{550} betrug $\sim 5 \text{ mg}$ bei einer Reinheit von ca. 90-95 % (Abbildung 7 B-C).

Die Stereospezifität der YbdL wurde anhand des Umsatzes der α -Ketosäure MTOB mit der Donoraminosäure L-Glutamin bei anschließender Analyse des Aminierungsprodukts mittels chiraler HPLC an einer Chirex 3126 Säule (siehe Abschnitt 2.6.4) untersucht. Der Vergleich des Elutionsprofils des Reaktionsprodukts mit der Elution des D/L-Met Standards zeigte, dass die YbdL enantioselektiv mit hoher Reinheit L-Methionin bildet (Abbildung 7 D). Auf diese Weise wurde indirekt auch die enzymatische Aktivität nachgewiesen.

3.1.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Steigerung der L-Met-Ausbeute

Nachdem in vorausgehenden Arbeiten in gekoppelter Reaktion mit der gereinigten Decarboxylase KdcA und Aminotransferase YbdL nur bis zu 12,5 % der eingesetzten Methionalkonzentration zu L-Met umgesetzt wurden (Skerra & Eisoldt, 2016), sollte die Ausbeute durch Optimierung der Reaktionsbedingungen gesteigert werden, um die Grundlage für eine praktische Anwendung zu schaffen.

Während die Ausbeute an L-Met durch Erhöhung der Konzentration des Substrats Methional gesteigert werden konnte (Abbildung 8 A, Erhalt der Rohdaten von Dr. Lukas Eisoldt), hatte die Erhöhung des CO_2 -Drucks von 2 auf 8 bar trotz der dadurch erhöhten CO_2 -Substratkonzentration bei einer Reaktionszeit $> 10 \text{ min}$ zu keiner Steigerung der Ausbeute geführt (Dr. Lukas Eisoldt, unveröffentlichte Daten, 2015). Da es zudem Hinweise auf eine verstärkte Aggregation der Transaminase YbdL unter diesen Bedingungen gab, wurde zunächst die Aggregation der beiden Enzyme untersucht. Dazu wurden diese zusammen über 1 h unter 2 bzw. 8 bar CO_2 in 200 mM NaHCO_3 ($\sim \text{pH } 6,4$), $0,5 \text{ mM TPP}$ und 1 mM MgSO_4 inkubiert und anschließend der lösliche Überstand der Ansätze durch SDS-PAGE verglichen. Während der Druckunterschied keinen signifikanten Einfluss auf die Löslichkeit der KdcA hatte, zeigte die YbdL bei 2 bar eine wesentlich geringere Aggregationstendenz als bei 8 bar CO_2 (Abbildung 8 B). Daher wurden alle nachfolgenden Versuche zur Reaktionsoptimierung unter 2 bar CO_2 durchgeführt.

Aufgrund der Ausbeutesteigerung von 3 auf 12,5 % (nach 105 min) durch Vervierfachung der KdcA-Konzentration auf $20 \text{ } \mu\text{M}$ in Gegenwart von $5 \text{ } \mu\text{M}$ YbdL (Skerra & Eisoldt, 2016), wurde

die Konzentration der KdcA hier weiter auf 30 μM und die der YbdL auf 10 μM erhöht. Zusätzlich wurde parallel die Reaktionszeit von 1,75 h verlängert, wobei laut RP-HPLC Analyse der zentrifugierten Überstände an einer Gemini C18 Säule nach 12 h 27,5% und nach 28 h 35 % der initialen Methionalkonzentration zu L-Met umgesetzt worden waren. Da die YbdL nach 28 h laut SDS-PAGE Analyse des löslichen Überstands vollständig aggregiert war, wurde ihre Konzentration auf 20 μM verdoppelt, um einen Reaktionsabbruch bei noch längerer Reaktion zu vermeiden. Damit wurde in einer 48-stündigen Reaktion eine Ausbeute von 40 % (bezogen auf den Umsatz von Methional) erzielt (Abbildung 8 C).

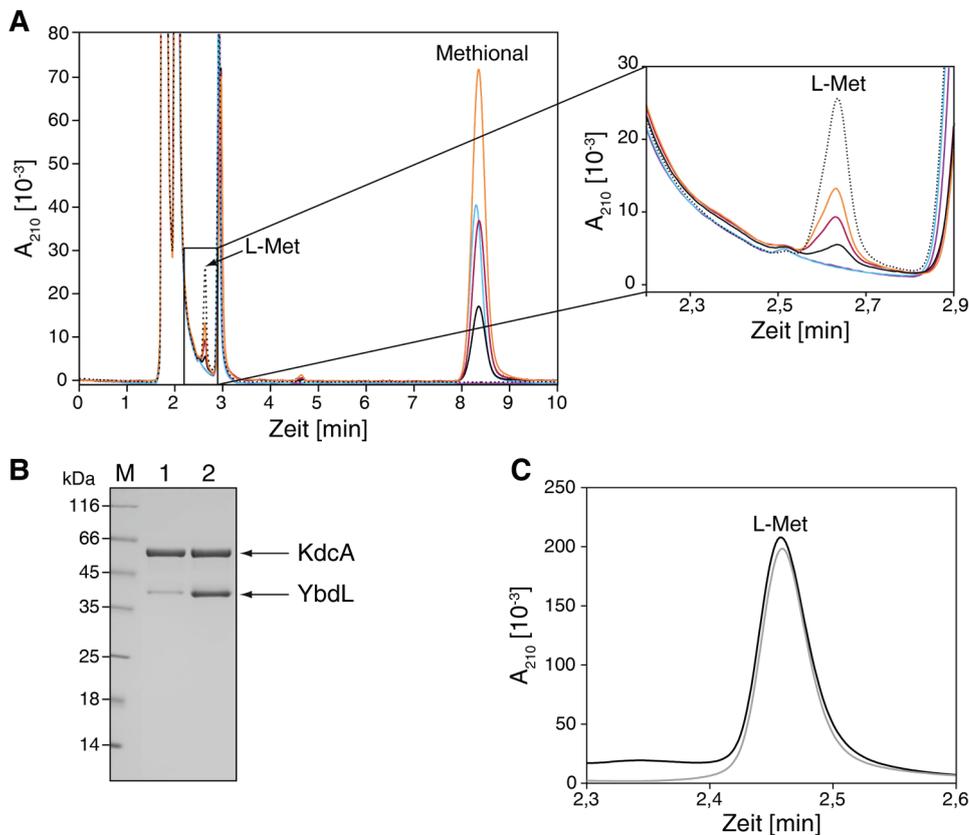


Abbildung 8. Analyse der gekoppelten Reaktion durch die Decarboxylase KdcA und die Aminotransferase YbdL zur Steigerung der Ausbeute an L-Methionin. (A) RP-HPLC Analyse verschiedener Reaktionsbedingungen nach je einstündiger Reaktion an einer Gemini C18 Säule (Erhalt der Rohdaten von Dr. Lukas Eisoldt). Mit zunehmender Konzentration des Substrats Methional (1, 2 u. 4 mM – schwarz, rot u. orange) unter 8 bar CO_2 in Gegenwart von 5 μM KdcA, 5 μM YbdL sowie 50 mM L-Gln in 200 mM PIPES/NaOH ($\sim\text{pH}$ 6,4) stieg die L-Met Konzentration an. In Kontrollen ohne Methional (violett) oder ohne YbdL (hellblau) wurde kein L-Met gebildet. 250 μM reines L-Met im Reaktionspuffer dienten als Referenz (gepunktete Linie). (B) SDS-PAGE Analyse des löslichen Überstands nach einstündiger Inkubation von je 5 μM KdcA und YbdL in 200 mM NaHCO_3 ($\sim\text{pH}$ 6,4) unter 2 bzw. 8 bar CO_2 . Spur 1: 8 bar CO_2 ; Spur 2: 2 bar CO_2 . (C) 40 % Umsatz von 4 mM Methional zu $\sim 1,6$ mM L-Met nach 48 h in Anwesenheit von 30 μM KdcA, 20 μM YbdL und 50 mM L-Gln in 200 mM NaHCO_3 unter 2 bar CO_2 bei $\sim\text{pH}$ 6,4 analysiert mittels RP-HPLC (schwarz). 1,6 mM reines L-Met diente als Referenz (grau). Alle Reaktionsansätze enthielten 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO_4 .

3.1.4 Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Carboxylierung von Methional anhand der Haldane-Beziehung

Für das Verständnis der unter physiologischen Bedingungen als irreversibel geltenden, aber wie hier gezeigt, unter geeigneten Bedingungen umkehrbaren Decarboxylierung (Skerra & Eisoldt, 2016 und Abschnitt 3.1.3), wurde das chemische Gleichgewicht mit Hilfe der Haldane-Beziehung bestimmt (Haldane, 1930). Diese setzt die thermodynamische Gleichgewichtskonstante in Bezug zu den kinetischen Parametern der entsprechenden Hin- und Rückreaktion im Fall der Katalyse durch ein Enzym mit bekanntem Reaktionsmechanismus. Da die Reaktion der KdcA, in der das Aldehyd-Substrat nukleophil vom katalytischen Cofaktor TPP angegriffen wird, bevor CO₂ durch eine Additionsreaktion kovalent fixiert wird (vgl. Abschnitt 3.1.4 und Andrews & McLeish, 2012), nach der Definition von Cleland einem geordneten bi-uni Mechanismus folgt (Cleland, 1963), lautet das Massenwirkungsgesetz und die dazugehörige Haldane Beziehung (Herleitung siehe Supplement Martin *et al.*, 2018):

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\alpha\text{Ka}]_{\text{eq}}}{[\text{Ald}]_{\text{eq}} [\text{CO}_2]_{\text{eq}}} = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{CO}_2} K_{\text{M}}^{\alpha\text{Ka}}}{k_{\text{cat}}^{\alpha\text{Ka}} K_{\text{M}}^{\text{CO}_2} K_{\text{i}}^{\text{Ald}}} \quad (8)$$

Dabei ist K_{eq} die Gleichgewichtskonstante für die Carboxylierung von Methional, wobei $[\alpha\text{Ka}]_{\text{eq}}$, $[\text{Ald}]_{\text{eq}}$ und $[\text{CO}_2]_{\text{eq}}$ die Gleichgewichtskonzentrationen der α -Ketosäure MTOB, des Aldehyds Methional und von CO₂ darstellen. Bei $k_{\text{cat}}^{\text{CO}_2}$ und $k_{\text{cat}}^{\alpha\text{Ka}}$ handelt es sich um die Wechselzahlen bzw. bei $K_{\text{M}}^{\text{CO}_2}$ und $K_{\text{M}}^{\alpha\text{Ka}}$ um die Michaelis-Konstanten der KdcA gegenüber den Substraten CO₂ und MTOB. $K_{\text{i}}^{\text{Ald}}$ ist die Gleichgewichtskonstante der Produktinhibition durch den Aldehyd Methional in der Decarboxylierungsreaktion.

Zur Quantifizierung der Haldane-Beziehung wurde zunächst je eine Michaelis/Menten-Kinetik der bimolekularen Carboxylierungsreaktion von Methional in 250 mM NaPi (pH 7,4; bzw. pH 7,1 nach Anlegen der CO₂-Atmosphäre) in Abhängigkeit von der Konzentration (a) des Aldehyds und (b) von CO₂ im gekoppelten Assay mit der im Überschuss vorliegenden Transaminase YbdL bestimmt (Bereitstellung der Rohdaten durch Dr. Lukas Eisoldt, 2016). Die schnelle Aminierung zu L-Met in der Folgereaktion verhinderte einerseits die schnelle Rückreaktion des Carboxylierungsprodukts nach Wegnahme des CO₂-Überdrucks und erlaubte andererseits die spezifische Quantifizierung des Endprodukts L-Met mittels RP-HPLC (Abbildung 9 A-B).

Unter den gleichen Pufferbedingungen wurde die unimolekulare Decarboxylierung von MTOB, also die Rückreaktion, wie zuvor mit Hilfe eines gekoppelten NADH Assays, katalysiert von einer im Überschuss eingesetzten ADH, unter Nachweis der Reduktion von Methional gemessen (Bereitstellung der Rohdaten durch Dr. Lukas Eisoldt, 2016; Abbildung 9 C). Die Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung (Johnson & Goody, 2011) ergab bei diesen drei Messungen die folgenden Werte:

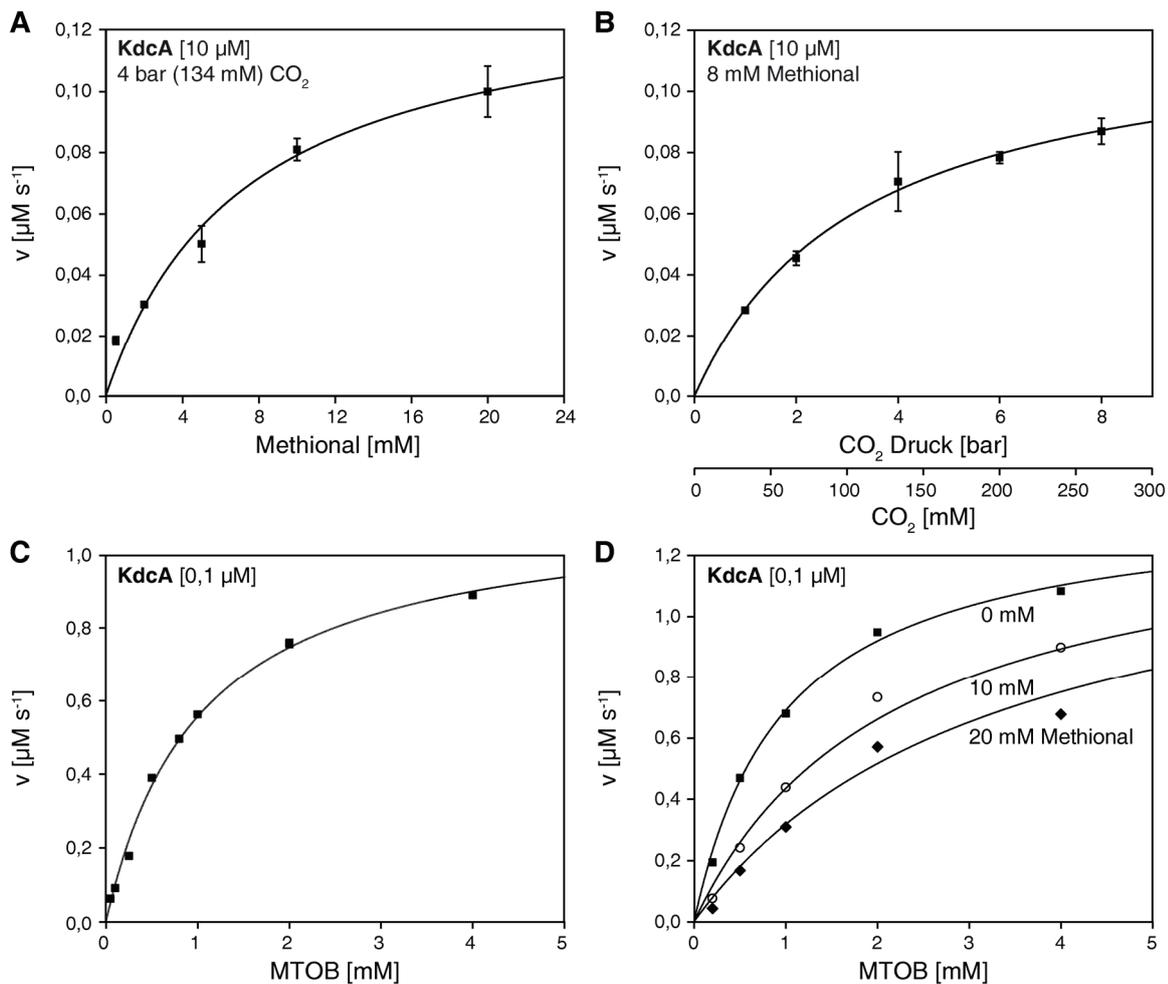


Abbildung 9. Enzymkinetische Parameter zur Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Carboxylierung von Methional. (A-B) Michaelis/Menten-Kinetiken für die Carboxylierung von Methional zu MTOB, katalysiert durch die KdcA, unter Variation der Methional- (A) oder CO₂-Konzentration (B). MTOB wurde durch die im Überschuss vorliegende YbdL aminiert und mittels RP-HPLC Detektion des finalen Reaktionsprodukts L-Met quantifiziert. (C) Michaelis/Menten-Kinetik der durch die KdcA katalysierten Decarboxylierung von MTOB. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mittels Reduktion des entstehenden Methionals unter NADH-Verbrauch durch eine im Überschuss vorliegende ADH bei 340 nm photometrisch bestimmt. (D) Konzentrationsabhängige Produktinhibition der Decarboxylierung von MTOB durch 0 mM (■), 10 mM (○) und 20 mM (◆) Methional. Die Analyse der Anfangsgeschwindigkeiten erfolgte durch direkte RP-HPLC Quantifizierung von MTOB. Alle Messungen fanden in 250 mM NaPi (pH 7,1) mit 0,5 mM TPP und 2 mM MgSO₄ bei RT statt. Die Kurven (A-C) wurden unter Verwendung der Michaelis/Menten-Gleichung angepasst. Die Inhibitionskonstante K_i wurde durch globale Anpassung der drei Kurven in (D) für kompetitive Inhibition mit v_{max} , K_M und K_i als gemeinsame Parameter bei jeweils fixierter Inhibitorkonzentration $[I]$ von 0, 10 und 20 mM mit OriginPro 2016G (OriginLab) ermittelt. Enzym- und/oder Cosubstrat-Konzentrationen sind in der linken oberen Ecke jedes Graphen vermerkt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung. (Bereitstellung der Rohdaten für A-C von Dr. Lukas Eisoldt.)

$$K_M(\text{MTOB}) = 1,0 \text{ mM}; k_{cat}(\text{MTOB}) = 13,7 \text{ s}^{-1}; K_M(\text{CO}_2) = 109,5 \text{ mM}; k_{cat,app}(\text{CO}_2) = 0,012 \text{ s}^{-1}; K_M(\text{Methional}) = 7,23 \text{ mM}; k_{cat,app}(\text{Methional}) = 0,014 \text{ s}^{-1}.$$

Da die beiden Carboxylierungs-Kinetiken jeweils unter limitierenden Cosubstrat-Konzentrationen aufgenommen worden waren – 8 mM Methional- bzw. 134 mM CO₂ –, betragen die Werte der realen Wechselzahlen nach Extrapolation auf entsprechende Sättigung (siehe Abschnitt 2.6.3, Gleichung 4) $k_{cat}(\text{CO}_2) = 0,023 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{cat}(\text{Methional}) = 0,025 \text{ s}^{-1}$. Wie erwartet, war die Wechselzahl für beide Cosubstrate nahezu identisch.

Die abschließende Ermittlung der Produktinhibition bei der Decarboxylierung von MTOB durch Methional unter Variation seiner vorgelegten Konzentration (0 - 20 mM) resultierte in einer Inhibitionskonstante von $K_i(\text{Methional}) = 8,5 \text{ mM}$ (Abbildung 9 D). Dieser Wert ähnelte dem unabhängig bestimmten K_M -Wert für Methional in der Carboxylierungsreaktion, was die Validität des hier angenommenen kinetischen Modells für die KdcA unterstützt. Die Gleichgewichtskonstante für die reversible Carboxylierung von Methional, die mit diesen kinetischen Parametern berechnet wurde (Gleichung 8), betrug $K_{\text{eq}} = 1/554 \text{ M}^{-1}$ (bei pH 7,1).

Mit Hilfe des Henry-Gesetzes für $p\text{CO}_2/[\text{CO}_2]_{\text{aq}} = 29,76 \text{ bar M}^{-1}$, das die Konzentration von gelöstem CO_2 ($[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$) proportional zum Partialdruck von CO_2 ($p\text{CO}_2$) angibt (Sander, 2015), kann die hier ermittelte Gleichgewichtskonstante auch als CO_2 -Druck angegeben werden. Demnach läge bei 16,5 kbar CO_2 ein äquimolares Verhältnis von Methional zu MTOB vor. Dieser Wert ist selbstverständlich hypothetisch, da CO_2 bei einem solchen Druck als Feststoff vorliegt. Unter dem momentanen atmosphärischem CO_2 -Partialdruck von 0,04 % entspräche dies einem Faktor von 41 Millionen, was die praktische Unumkehrbarkeit biochemischer Decarboxylierungen erklärt.

3.2 Alternativer Syntheseweg für L-Methionin mit Hilfe einer Decarboxylase und Aminosäuredehydrogenase

Aufgrund des äquimolaren Verbrauchs des kostspieligen und an sich wertvollen Aminogruppendonors L-Gln in der Aminierungsreaktion sollte die Aminotransferase YbdL zur weiteren Optimierung des biokatalytischen Synthesewegs von L-Met durch eine ökonomisch günstigere Aminosäuredehydrogenase, welche einfachen Ammoniak als Stickstoffquelle verwendet, ersetzt werden. Das Recycling des dabei benötigten Cofaktors NADH sollte in vivo wie auch in vitro mit industriell etablierten Verfahren wie beispielsweise dem Einsatz einer Formiat-Dehydrogenase einfach umzusetzen sein (Wichmann *et al.*, 1981). Zu diesem Zweck wurde eine Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus sphaericus* ATCC 4525 mit bekannter Stereospezifität für L-Met (Li *et al.*, 2009) mit einer Phenylalanin-Dehydrogenase (PheDH) aus *Thermoactinomyces intermedius* (Takada *et al.*, 1991) verglichen. In diesem Zusammenhang wurde auch eine verbesserte Variante (Slusarczyk *et al.*, 2000; Felber, 2001) der bereits technisch eingesetzten Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* (Schütte *et al.*, 1976) für die NADH-Regeneration in vitro untersucht.

3.2.1 Vergleich einer Leucin- und Phenylalanin-Dehydrogenase

Für die heterologe Produktion beider Aminosäuredehydrogenasen, jeweils mit N-terminalem His₆-tag, wurde *E. coli* BL21 mit dem Plasmid pASK-IBA35(+)-LeuDH bzw. pASK-IBA35(+)-PheDH transformiert (Abbildung 10 A). Wegen des auf dem Plasmid verwendeten Tetracyclin-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994) wurde die Genexpression in LB-

Medium bei $OD_{550} = 0,6 - 0,8$ mit $0,2 \text{ mg/l aTc}$ für 5 h bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 rpm induziert. Bei Zellernte betrug die $OD_{550} \approx 3,5$. Zur Gewinnung des löslichen Zellextrakts wurden die Bakterien mit Hilfe der *French Press* aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert. Die zweistufige Reinigung der LeuDH bzw. PheDH umfasste wegen des N-terminalen His₆-Affinitätstags eine IMAC, gefolgt von einer präparativen SEC. Wie auch in der Literatur beschrieben, eluierte die LeuDH als Oktamer und die PheDH als Hexamer (Baker *et al.*, 1995; Ohshima *et al.*, 1991) (Abbildung 10 B). Die Ausbeute pro Liter Kultur mit $OD_{550} = 1$ betrug $\sim 9 \text{ mg}$ für die LeuDH und $\sim 6 \text{ mg}$ für die PheDH bei einer Reinheit von jeweils ca. 95% (Abbildung 10 C).

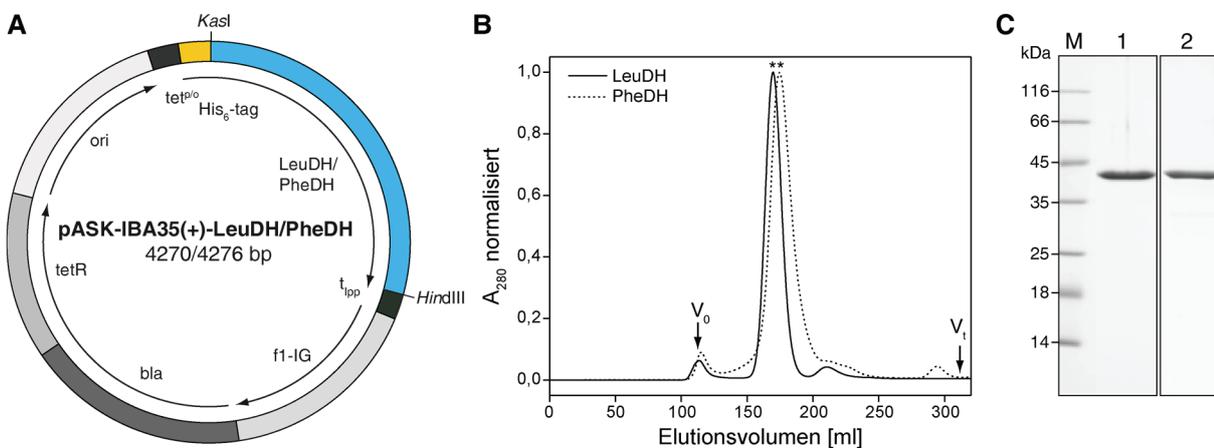


Abbildung 10. Expressionsplasmid und Reinigung der rekombinanten Aminosäuredehydrogenasen LeuDH und PheDH. (A) Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsplasmids pASK-IBA35(+) für die LeuDH bzw. PheDH. Neben den kodierenden Sequenzen für die LeuDH und PheDH, welche am 5'-Ende einen His₆-tag tragen und unter Kontrolle des regulierbaren tet-Promotor/Operators (tet^{pr}) stehen, sind weitere Elemente der Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}), der tet-Repressor (tetR), der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (ori), die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG) und das Gen der β -Lactamase (bla). (B) Präparative Größenausschlusschromatographie der LeuDH und PheDH an einer Superdex S200 26/60 Säule nach IMAC. Die LeuDH eluiert mit einem Elutionsvolumen (*), das annähernd dem Oktamer entspricht (apparente Molmasse: 308 kDa, berechnete Molmasse pro Monomer: 41 kDa), die PheDH bei einem Volumen (*), das dem Hexamer zugeordnet werden kann, aber auf ein größeres hydrodynamisches Volumen des PheDH-Oligomers hindeutet (apparente Molmasse: 285 kDa, berechnete Molmasse pro Monomer: 42 kDa). (C) Reduzierende 15%ige SDS-PAGE zur Analyse der gereinigten Proteine. Spur 1: LeuDH; Spur 2: PheDH. Das Enzym YbdL eluiert bei einem Volumen (*), das annähernd dem Homodimer zugeordnet werden kann (apparente Molmasse: 66 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 45 kDa)

Die katalytische Aktivität der beiden gereinigten Aminosäuredehydrogenasen wurde durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von dem jeweils natürlichen α -Ketosäure-Substrat (LeuDH: 2-Ketoisocaproat; PheDH: Phenylpyruvat) sowie dem in dieser Arbeit relevanten Substrat MTOB bestimmt (Abbildung 11). Durch äquimolaren Verbrauch des Cofaktors NADH konnte die Aktivität anhand der Abnahme seiner Absorption bei 340 nm direkt verfolgt werden. Durch Anpassung der initialen Geschwindigkeiten wurden die kinetischen Parameter ermittelt (Tabelle 3).

Während die LeuDH für beide Substrate einer klassischen Michaelis/Menten-Kinetik folgte, nahm die Reaktionsgeschwindigkeit der PheDH bei höheren Konzentrationen des natürlichen

Substrats Phenylpyruvat ab, was auf eine unkompetitive Substratinhibition (siehe Abschnitt 2.6.5, Gleichung 6) hindeutete. Im Fall von MTOB wies die PheDH jedoch ebenfalls ein normales Michaelis/Menten-Verhalten auf.

Tabelle 3. Kinetische Parameter der LeuDH und PheDH für ihre jeweiligen natürlichen Substrate und MTOB. Die katalytische Aktivität wurde bei pH 9 und 30 °C anhand der Konzentrationsabnahme von NADH photometrisch bei 340 nm bestimmt.

	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]	K_i [mM]
LeuDH				
2-Ketoisocaproat	0,609	154,8	254	-
MTOB	10,8	50,2	4,65	-
PheDH				
Phenylpyruvat	0,045	48,7	$1,1 \times 10^3$	2,92
MTOB	0,637	21,7	34,1	-

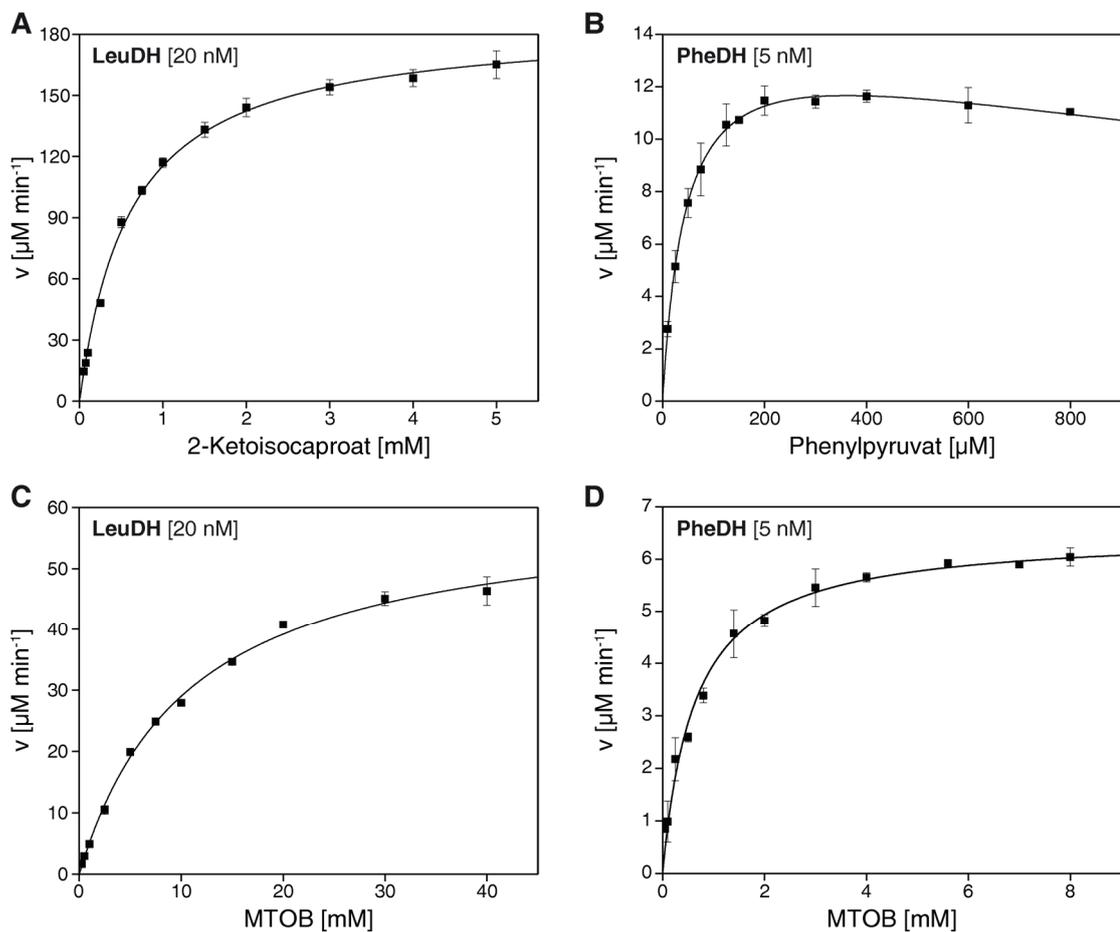


Abbildung 11. Kinetische Charakterisierung der LeuDH und PheDH. Die Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurden in NH_3/NH_4Cl pH 9,0 bei 30 °C photometrisch anhand der Konzentrationsabnahme des Cofaktors NADH bei 340 nm im Dreifachansatz bestimmt und mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung unter Berücksichtigung unkompetitiver Substratinhibition angepasst. Die verwendeten Enzymkonzentrationen sind in der linken oberen Ecke jedes Graphen angegeben. (A) Aktivität der LeuDH in Abhängigkeit von dem natürlichen Substrat 2-Ketoisocaproat. (B) Aktivität der PheDH in Abhängigkeit von dem natürlichen Substrat Phenylpyruvat. (C) Aktivität der LeuDH in Abhängigkeit von MTOB. (D) Aktivität der PheDH in Abhängigkeit von MTOB. Die enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 3 angegeben.

Für beide Enzyme war die Aktivität mit dem jeweils natürlichen Substrat höher als mit MTOB. Dies zeigte sich bei der LeuDh durch einen 18-fach erhöhten K_M -Wert und um den Faktor drei erniedrigten k_{cat} -Wert. Die PheDH zeigte einen ähnlichen Effekt. Da die Aminosäuredehydrogenase für die Aminierung des primären Carboxylierungsprodukts MTOB eingesetzt werden sollte, war es mit dem Ziel einer möglichst effizienten Folgereaktion wichtig, dass das entsprechende zweite Enzym bereits bei einer niedrigen Substratkonzentration hohe Aktivität gegenüber MTOB zeigte (Lerchner *et al.*, 2013). Hierbei versprach die PheDH, deren katalytische Effizienz k_{cat}/K_M etwa 7-fach größer war als die der LeuDh, bei fast 17-fach geringerem K_M -Wert das geeignetere Enzym zu sein.

Im direkten Vergleich beider Enzyme bei Einsatz (je 5 μM) zusammen mit der Decarboxylase KdcA (20 μM) zur biokatalytischen Umsetzung von 4 mM Methional zu L-Met ergab sich jedoch ein anderes Bild. Grundsätzlich konnten beide Enzyme die zuvor verwendete Aminotransferase ersetzen, und nach 1 h war die mittels RP-HPLC bestimmte L-Met Ausbeute mit der PheDH, wie aufgrund der höheren Substrataffinität erwartet, um ca. den Faktor 3 höher als mit der LeuDh. Allerdings nahm bei längeren Inkubationszeiten die Produktbildung bei der PheDH stärker ab, weshalb die L-Met Ausbeute nach 20 h unter Verwendung der LeuDh $\sim 8\%$ und mit der PheDH nur $\sim 6\%$ betrug (Abbildung 12 A). Der lösliche Überstand nach 1/12/20 h deutete darauf hin, dass eine stärkere Proteinaggregation im Fall der PheDH Ursache für die abnehmende Bildungsrate sein könnte (Abbildung 12 B). Zur weiteren Optimierung der zweistufigen Reaktion sollten also (a) die Stabilität der PheDH oder (b) die katalytische Effizienz der LeuDh durch Reduktion des K_M -Werts mittels Enzym-Engineering verbessert werden.

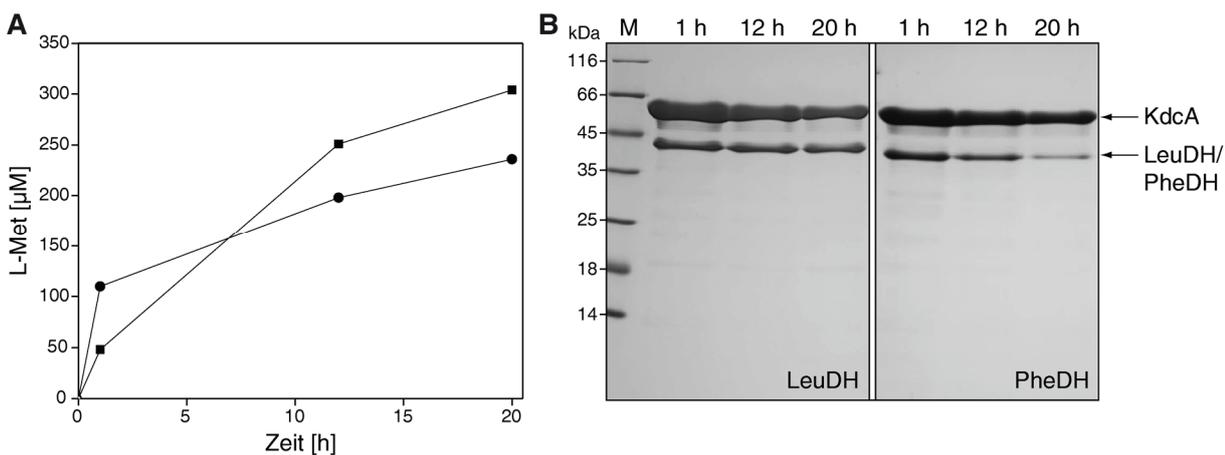


Abbildung 12. Analyse der gekoppelten Reaktion der Decarboxylase KdcA mit der Aminosäuredehydrogenase LeuDh bzw. PheDH. Reaktionsansätze mit 20 μM KdcA und 5 μM LeuDh bzw. PheDH sowie 4 mM Methional, 2 mM NADH in 500 mM NH_4HCO_3 mit 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO_4 wurden bei 2 bar CO_2 (pH 7) für 1/12/20 h inkubiert. (A) Die jeweils mittels RP-HPLC ermittelte L-Met Ausbeute ist für die LeuDh (■) und PheDH (●) gegen die Inkubationszeit aufgetragen. (B) Der lösliche Überstand nach dem Ende der Reaktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert, wobei die Inkubationszeiten oberhalb des Gels angegeben sind.

3.2.2 NADH-Regenerierung mit Hilfe der Formiat-Dehydrogenase CboFDH

Die gentechnische Produktion einer verbesserten Variante der CboFDH aus *Candida boidinii* erfolgte in *E. coli* BL21 mit N-terminalem His₆-tag. Dazu wurde das synthetische Gen, das für die Expression in *E. coli* optimiert und mit den Aminosäuresubstitutionen C23A und F285S versehen war (Felber, 2001), über die Restriktionsschnittstellen *KasI* und *HindIII* auf den Expressionsvektor pASK-IBA35(+) kloniert. Die Induktion der Genexpression erfolgte wiederum mit dem tet-Promotorsystem (Skerra, 1994) mit 0,2 mg/l aTc bei OD₅₅₀ = 0,6 - 0,8 in LB-Medium für 5 h bei 22 °C und 180 rpm. Bei Ernte der Zellen betrug die OD₅₅₀ ≈ 3,9. Nach dem Zellaufschluss mit der *French Press* wurden die unlöslichen Bestandteile sedimentiert und die CboFDH(C23A/F285S) über das His₆-tag durch IMAC und präparative SEC mit einer Reinheit von ca. 95 % isoliert (Abbildung 13 A-B). Das Elutionsvolumen der

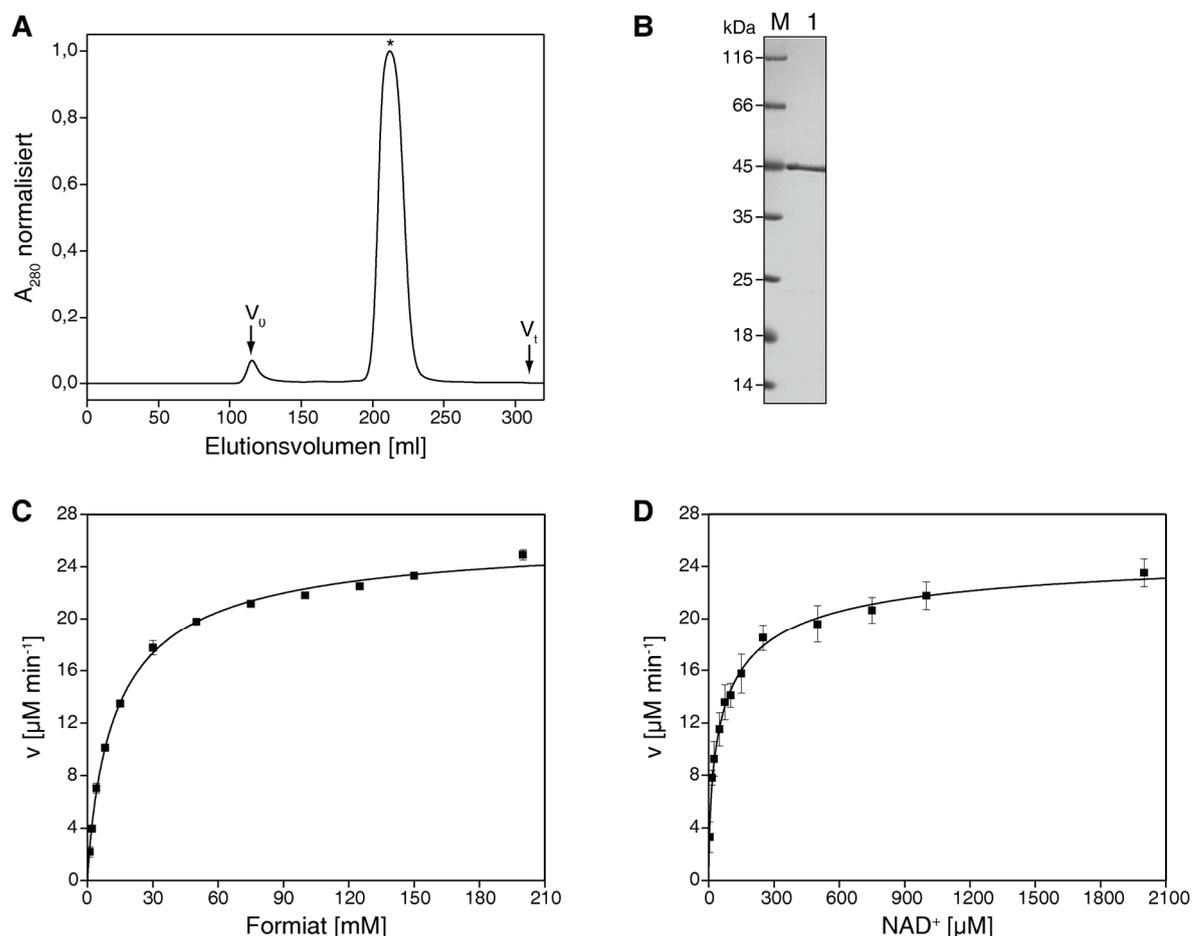


Abbildung 13. Reinigung und kinetische Charakterisierung der rekombinanten CboFDH(C23A/F285S). (A) Präparative SEC an einer Superdex S200 26/60 Säule im Anschluss an die Affinitätsreinigung mittels IMAC. Das Elutionsprofil weist einen Peak (*) auf, der auf einen Homodimer (apparente Molmasse: 72 kDa; Molmasse pro Monomer: 42 kDa) zurückgeführt werden kann. (B) Reduzierende 15%ige SDS-PAGE nach der SEC. Spur 1: CboFDH(C23A/F285S). (C, D) Zur kinetischen Charakterisierung wurden die Anfangsgeschwindigkeiten mit 125 nM CboFDH(C23A/F285S) in Abhängigkeit von Formiat (C) und NAD^+ (D) photometrisch anhand der Konzentrationszunahme des Produkts NADH bei 340 nm in 100 mM KP_i (pH 7,5) bei 30 °C im Dreifachansatz bestimmt. Die Anpassung mit Hilfe der Hill-Funktion lieferte für Formiat einen K_M -Wert von 14,3 mM und $k_{\text{cat}} = 3,5 \text{ s}^{-1}$ und für NAD^+ einen K_M -Wert von 68,5 μM und $k_{\text{cat}} = 3,4 \text{ s}^{-1}$. Der Hill-Faktor n , der Aufschluss über die Kooperativität eines Oligomers gibt, lag für Formiat bei 0,9 und für NAD^+ bei 0,6, was auf eine negative Kooperativität hindeutet.

SEC (apparente Molmasse: 72 kDa) konnte der Molmasse des Homodimers (berechnete Molmasse pro Monomer: 42 kDa) zugeordnet werden und die Ausbeute pro Liter Kultur mit $OD_{550} = 1$ lag bei ~ 12 mg.

Die Aktivität der CboFDH(C23A/F285S) wurde mit Formiat und NAD^+ durch Variation der Konzentration jeweils eines Substrats unter nicht limitierender Konzentration des anderen Substrats in einem photometrischen Assay anhand der Zunahme der NADH-Konzentration bei 340 nm gemessen. Durch Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten mit Hilfe der Hill-Funktion (siehe Abschnitt 2.6.5, Gleichung 7), die eine mögliche Kooperativität in einem oligomeren Enzym in einer erweiterten Form der Michaelis/Menten-Gleichung einbezieht, wurden die enzymkinetischen Parameter bestimmt (Abbildung 13 C-D).

Während die Wechselzahlen k_{cat} für das Substrat Formiat ($3,5 \text{ s}^{-1}$) und NAD^+ ($3,4 \text{ s}^{-1}$), wie zu erwarten, vergleichbar waren, lag der K_M -Wert für Formiat mit 14,3 mM wesentlich höher als der für NAD^+ mit 68,5 μM . Angesichts der Hill-Faktoren $n < 1$ (siehe Abbildung 13) liegt negative Kooperativität vor, wobei hauptsächlich die Bindung von NAD^+ in einer Untereinheit des Homodimers dessen Bindung in der anderen negativ zu beeinflussen scheint. Wegen des mikromolaren K_M -Werts für NAD^+ sollte sich die CboFDH(C23A/F285S) bei ausreichend hohen Formiatkonzentrationen für das effiziente Recycling von NADH aus NAD^+ eignen. Die Anwesenheit von 5 μM der FDH in einem Reaktionsansatz, der neben 20 μM KdcA und 7 μM LeuDH, 4 mM Methional, 140 mM Formiat (Sättigungskonzentration) und 600 μM NAD^+ in

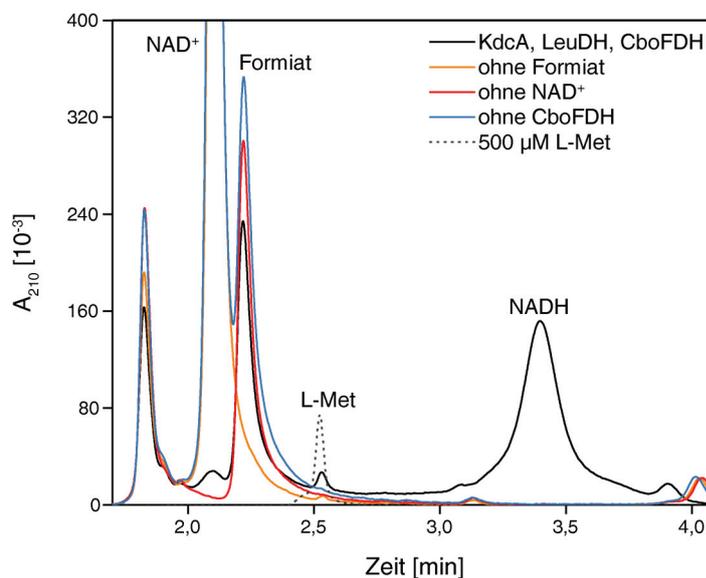


Abbildung 14. RP-HPLC Analyse der gekoppelten Reaktion der Decarboxylase KdcA und Leucin-Dehydrogenase LeuDH in Anwesenheit der Formiat-Dehydrogenase CboFDH(C23A/F285S). Die verschiedenen Reaktionsansätze enthielten 20 μM KdcA, 7 μM LeuDH, 5 μM CboFDH(C23A/F285S), 4 mM Methional, 140 mM Formiat und 600 μM NAD^+ in 500 mM NH_4HCO_3 mit 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO_4 . Als Negativkontrolle wurde wahlweise kein Formiat, NAD^+ bzw. CboFDH zugegeben (orange/rot/blau). Nach je 90 min unter 8 bar CO_2 wurde die Reaktion mittels RP-HPLC analysiert. Nur der Ansatz, der alle Komponenten zur NADH-Regeneration enthielt, zeigte Peaks für L-Met- wie auch NADH (schwarz). Als Referenz diente 500 μM L-Met in Wasser (gestrichelte Linie).

500 mM NH_4HCO_3 mit 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO_4 enthielt, führte nach 90 min unter 8 bar CO_2 (pH ~ 7) laut RP-HPLC zu ca. 110 μM L-Met. Ohne die FDH bzw. in Abwesenheit von Formiat oder NAD^+ konnte L-Met nicht detektiert werden (Abbildung 14). Dies zeigte, dass die CboFDH(C23A/F285S) grundsätzlich auch unter CO_2 -Atmosphäre, also dem Dehydrierungsprodukt von Formiat, für das Recycling des in der zweistufigen Reaktion anfallenden NAD^+ verwendet werden kann.

3.3 Optimierung der Substratspezifität der Leucin-Dehydrogenase

Mit dem Ziel einer effizienten gekoppelten Reaktion der Decarboxylase KdcA mit einer Aminosäuredehydrogenase zur Synthese von L-Met aus Methional erschien es im Licht der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.1 sinnvoll, entweder (a) die Stabilität der PheDH oder (b) die katalytische Effizienz der LeuDh durch Erniedrigung des K_M -Werts mittels Enzym-Engineering zu verbessern. Da die Analyse von Stabilitätsvarianten mittels CD-Messung langwieriger gewesen wäre als ein parallelisiertes Screening verschiedener Varianten anhand ihrer Aktivität, erschien die Verbesserung der Substratspezifität der LeuDh durch rationales Engineering ausgehend von einer in der Literatur beschriebenen Substitution oder semi-rationales Engineering mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit erstellten Homologie Modells der vielversprechendere Weg zu sein.

3.3.1 Rationale Mutagenese der LeuDh an Position A113G

Kataoka & Tanizawa (2003) brachten die Substitution A113G in eine LeuDh aus *Bacillus stearothermophilus* ein, um deren Akzeptanz für größere Substrate, wie zum Beispiel Phenylalanin zu erhöhen. Ein Strukturmodell ließ sie vermuten, dass die Alanin-Seitenkette der LeuDh die Bindung des Benzolrings von Phenylalanin im aktiven Zentrum sterisch verhinderte, aber dass ein Glycinrest, wie er an gleicher Position in der PheDH aus *Bacillus sphaericus* (Okazaki *et al.*, 1988) oder *Thermoactinomyces intermedius* (Takada *et al.*, 1991) vorkommt, den Umsatz aromatischer Substrate ermöglichte (Britton *et al.*, 1993). Obwohl der Austausch zu einem messbaren Umsatz von Phenylalanin führte, blieb die Substrataffinität niedrig. Allerdings erhöhte die Substitution A113G die relative spezifische Aktivität mit MTOB gegenüber dem natürlichen Substrat α -Ketoisocaproat von 15 % auf 130 % (Kataoka & Tanizawa, 2003). Deshalb wurde der gleiche Austausch durch ortsgerichtete Mutagenese auch in die hier verwendete LeuDh, deren Sequenz zu 78 % mit der LeuDh aus *Bacillus stearothermophilus* übereinstimmt, eingebracht.

Für die heterologe Produktion wurde *E. coli* BL21 mit dem Expressionsvektor pASK-IBA35(+)-LeuDh(A113G) transformiert und die Genexpression in LB-Medium wie zuvor mit 0,2 mg/l aTc bei $\text{OD}_{550} = 0,6 - 0,8$ für 5 h bei 22 °C und 180 rpm induziert. Bei Ernte der Zellen betrug die $\text{OD}_{550} \approx 4,9$. Da für die Analyse der Mutante zunächst eine kleinere Menge Enzym

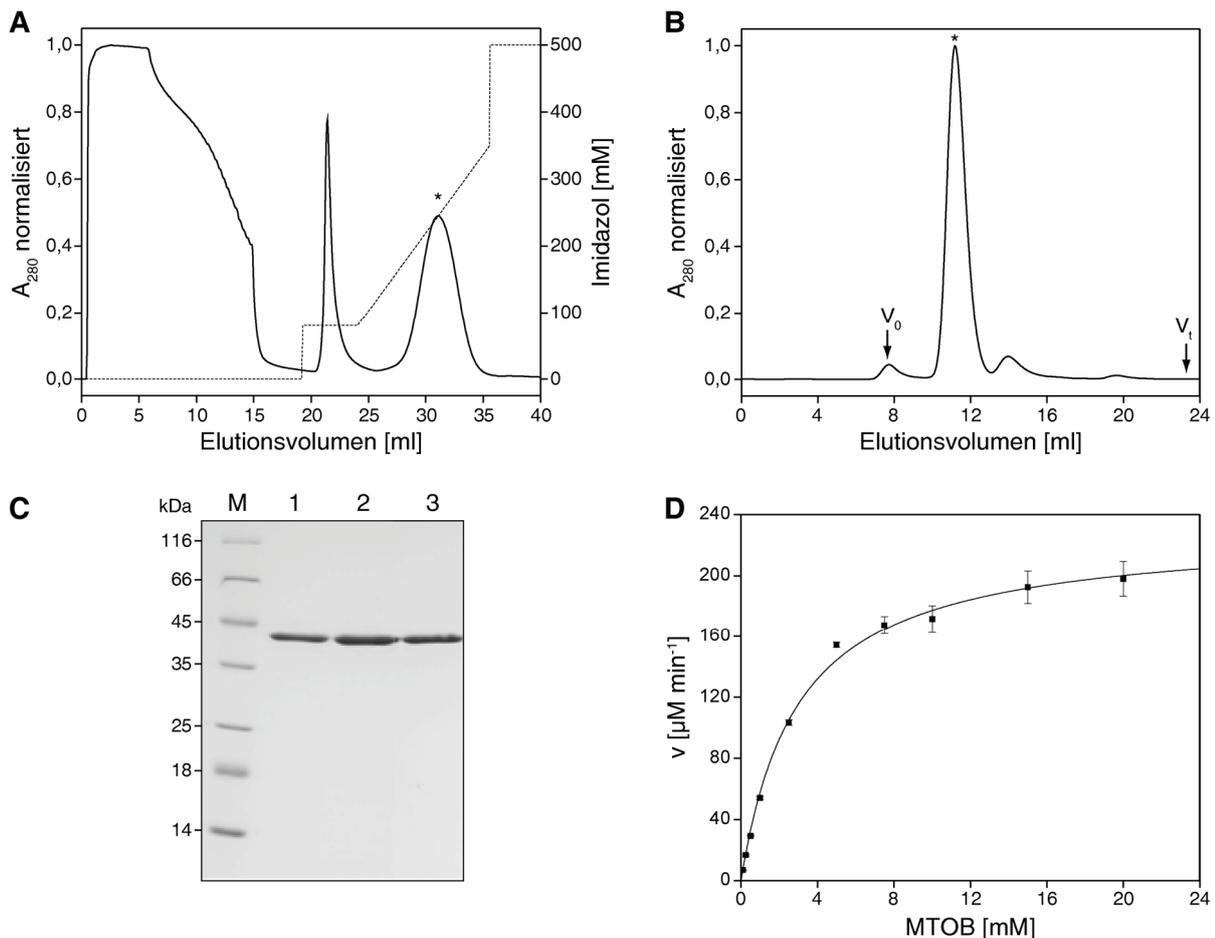


Abbildung 15. Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten LeuDH(A113G). (A) Elutionsprofil der IMAC zur Affinitätsreinigung der LeuDH(A113G) an einer 1 ml Histrap HP Säule. Nach dem Beladen und Waschen wurden mit 80 mM Imidazol aus *E. coli* stammende Proteine entfernt und anschließend die LeuDH-Variante (*) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 80 mM auf 350 mM in 12 Säulenvolumen eluiert. (B) Reinigung von 4 mg des Proteins aus der IMAC durch SEC an einer Superdex S200 10/300 Säule. Das Elutionsvolumen (*) konnte der Molmasse eines Oktamers zugeordnet werden (apparente Molmasse: 309 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 41 kDa). (C) Reduzierende 15 %ige SDS-PAGE der IMAC- und der SEC-Fraktion der LeuDH(A113G). Spur 1: WT als Referenz; Spur 2: IMAC-Fraktion; Spur 3: SEC-Fraktion. (D) Bestimmung der Aktivität gegenüber MTOB durch photometrische Messung der Anfangsgeschwindigkeiten von 20 nM LeuDH(A113G) mit MTOB anhand der Konzentrationsabnahme des Cofaktors NADH bei 340 nm in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9,0 bei 30 °C im Dreifachansatz. Die Anpassung der Daten mit der Michaelis/Menten-Gleichung ergab $k_{\text{cat}} = 191,5 \text{ s}^{-1}$ und einen K_M -Wert von 2,97 mM.

ausreichte, wurde im Unterschied zur Produktion des Wildtyp-Enzyms nicht das gesamte, sondern nur das Zellpellet aus je einem halben Liter bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert. Aufgrund des kleineren Maßstabs und der dadurch bedingten geringeren Zellmasse wurden die Bakterien mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen und der lösliche Zellextrakt durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Wie zuvor schon für die LeuDH beschrieben, wurde die LeuDH-Variante A113G dank ihres N-terminalen His₆-Affinitätstags durch IMAC und präparative SEC gereinigt. Um die spätere Isolierung von unterschiedlichen Varianten effizienter zu gestalten, wurde diesmal eine 1 ml Histrap HP Säule sowie ein Stufengradient auf 80 mM Imidazol zur Abtrennung von Wirtszell-Proteinen etabliert. Die LeuDH wurde daraufhin in einem linearen Konzentrationsgradienten über 12 Säulenvolumen

bei 245 mM Imidazol eluiert, und 4 mg des rekombinanten Enzyms wurden an einer 24 ml S200 10/300 Säule präparativ isoliert (Abbildung 15 A-B).

Die Reinheit der als Oktamer eluierten Variante wurde abschließend mittels SDS-PAGE untersucht und betrug > 95 % (Abbildung 15 C). Die extrapolierte Ausbeute pro Liter Kultur bei $OD_{550} = 1$ betrug für die LeuD_H(A113G) ~0,8 mg. Die geringere Ausbeute im Vergleich zur Produktion und Reinigung des Wildtyp-Enzyms im größeren Maßstab (siehe Abschnitt 3.2.1) war eher durch eine weniger effiziente Reinigung als auf den Einfluss der Mutation zurückzuführen.

Durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der MTOB-Konzentration anhand des Verbrauchs des Cofaktors NADH wurde die Aktivität der LeuD_H(A113G) photometrisch bei 340 nm verfolgt. Die kinetischen Parameter wurden durch Kurvenanpassung der Anfangsgeschwindigkeiten mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung (Johnson & Goody, 2011) bestimmt. Der im Vergleich zu dem Wildtyp-Wert fast vervierfachte k_{cat} -Wert von 191,5 s^{-1} bei gleichzeitig um den Faktor 3,6 kleineren K_M -Wert von 2,97 mM ergab eine 14-fach höhere katalytische Effizienz. Dies zeigte deutlich, dass sich der Austausch A113G positiv, wie bereits im Fall des homologen Enzyms aus *Bacillus stearothermophilus*, auf die Aktivität der LeuD_H aus *Bacillus sphaericus* ATCC 4525 gegenüber MTOB auswirkte. (Abbildung 15 D; Tabelle 4; Abschnitt 3.3.3).

3.3.2 Semi-rationale Mutagenese der LeuD_H an Position L40

Neben dem rationalen Austausch von A113G wurde die Leucin-Seitenkette an Position 40 semi-rational mit dem Ziel der Erhöhung der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) gegenüber MTOB variiert. Ein Vergleich des aktiven Zentrums der LeuD_H mit der GluDH aus *Clostridium symbiosum* hatte gezeigt, dass diese Position nicht konserviert ist und zu den unterschiedlichen Substratspektren der beiden Enzyme beiträgt (Baker *et al.*, 1995). In der GluDH ermöglicht ein geladenes Lysin die Interaktion mit der γ -Carboxylgruppe von Glutamat, während in der LeuD_H die Hydrophobie der Bindetasche durch ein Leucin erhöht und dadurch die Bindung ungeladener Substrate begünstigt wird (Baker *et al.*, 1995; Kataoka & Tanizawa, 2003). Zudem deutete ein von Dr. André Schiefner (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TUM) erstelltes Homologie-Modell der LeuD_H, das basierend auf der Kristallstruktur einer PheDH aus *Rhodococcus sp* (PDB-ID: 1C1D) mit 37 % Sequenzidentität generiert wurde und in dem L-Leu zusammen mit NADH gebunden ist, darauf hin, dass vor allem die Aminosäure an Position 40 – neben anderen Resten, wie V291, V294, P145 – die Größe des Substrats sterisch bestimmen könnte (Abbildung 16).

Um den Effekt aller Aminosäuren an Position 40 auf das Substratspektrum der LeuD_H zu analysieren, wurde diese Sequenz-Position durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese mittels *Overlap Extension* PCR mit partiell degenerierten Oligodesoxynukleotiden, die ein NNS-

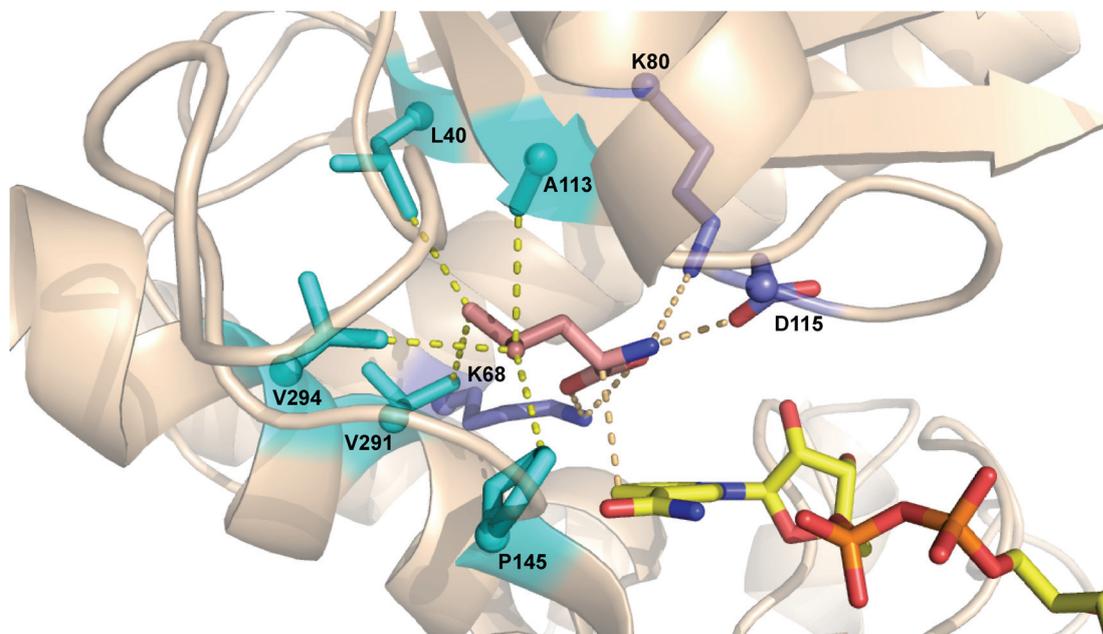


Abbildung 16. Homologie-Modell der LeuDH mit L-Leu und NADH. Das Modell basiert auf der PheDH aus *Rhodococcus sp* (PDB-ID: 1C1D), die 37 % Sequenzidentität zur LeuDH aus *L. sphaericus* aufweist. Der Cofaktor NADH (gelb) sowie die katalytischen Reste K68, K80 und D115 (blau) sowie deren Interaktion (beige gestrichelt) mit dem Substrat L-Leu (rosa) sind hervorgehoben. Seitenketten, die weniger als 4 Å von der terminalen Ethylgruppe entfernt sind und daher die Bindung größerer Substrate sterisch beeinflussen könnten (cyan), sind beschriftet.

Codon an der zu mutierenden Position trugen, randomisiert. Mit der entstandenen Plasmid-Bibliothek wurde *E. coli* BL21 transformiert, und 84 beliebig ausgewählte Klone wurden parallel mit sechs wtLeuDH- und drei LeuDH(A113G)-Klonen als Referenz bzw. Positivkontrolle im Mikromaßstab in einer 96-Well Platte kultiviert. Die Anzahl der gepickten Klone erlaubte eine statistische Abdeckung des Großteils der 20 theoretisch möglichen Varianten (Nov, 2012).

Die Produktion, Reinigung und Aktivitätsanalyse der Varianten im 96-Well Format erfolgte robotergestützt. Bei einer um die Hintergrundabsorption korrigierten $OD_{550} = 0,1 - 0,3$ wurde die Genexpression mit 0,2 mg/l aTc in TB-Medium für 3,5 h bei 30 °C und 180 rpm induziert. Bis zur Zellernte nahm die OD_{550} kaum zu. Zur Bestimmung der Aktivität der Varianten wurden die Zellen durch enzymatische Lyse mit 2 mg/ml Lysozym aufgeschlossen und der lösliche Zellextrakt mit Hilfe einer 96-Well Nickel-NTA-Platte gereinigt. Zunächst wurden mit 100 mM Imidazol/HCl Wirtszell-Proteine abgetrennt, um anschließend die LeuDH-Varianten mit 250 mM Imidazol/HCl zu eluieren. Die enzymatische Aktivität im Eluat mit 10 mM MTOB als Substrat wurde anschließend anhand des Verbrauchs des Cosubstrats NADH bei 340 nm photometrisch gemessen und auf die jeweilige OD_{550} der Kultur zum Zeitpunkt der Bakteriernte normalisiert (Abbildung 17).

Von den 84 untersuchten Varianten zeigten nur 20 eine höhere Aktivität als der Mittelwert des Wildtyps. Aufgrund der hohen Standardabweichung des Wildtyps, die auf eine signifikante Schwankung der Einfachmessungen hindeutete, wurden nur die fünf besten Varianten, deren

Umsatz höher als der Mittelwert des Wildtyps zuzüglich dessen Standardabweichung war, bezüglich ihrer Aminosäure an Position 40 analysiert. Zwei davon erwiesen sich als Wildtyp während das Leucin bei den anderen Varianten gegen Alanin, Cystein bzw. Isoleucin ausgetauscht war. Wegen der hohen Oxidationsempfindlichkeit eines dem Lösungsmittel zugänglichen Cysteins in der Substratbindetasche wurde die Variante L40C nicht weiter untersucht. Zur genaueren kinetischen Untersuchung der Varianten L40A und L40I wurden beide im 1 l- Maßstab wie zuvor die LeuDH(A113G) präparativ produziert und gereinigt.

Die Messung der Anfangsgeschwindigkeiten der gereinigten Enzyme mit dem Substrat MTOB und deren Anpassung mit der Michaelis/Menten-Gleichung (Johnson & Goody, 2011) ergab für den Austausch L40I $k_{cat} = 52,2 \text{ s}^{-1}$ und einen K_M -Wert von 9,22 mM, was leicht besser als der Wildtyp war (Tabelle 4). Die Variante L40A wurde nicht quantifiziert, da die getestete MTOB-Konzentration von bis zu 30 mM im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym zu keiner Substratsättigung führte (nicht gezeigt).

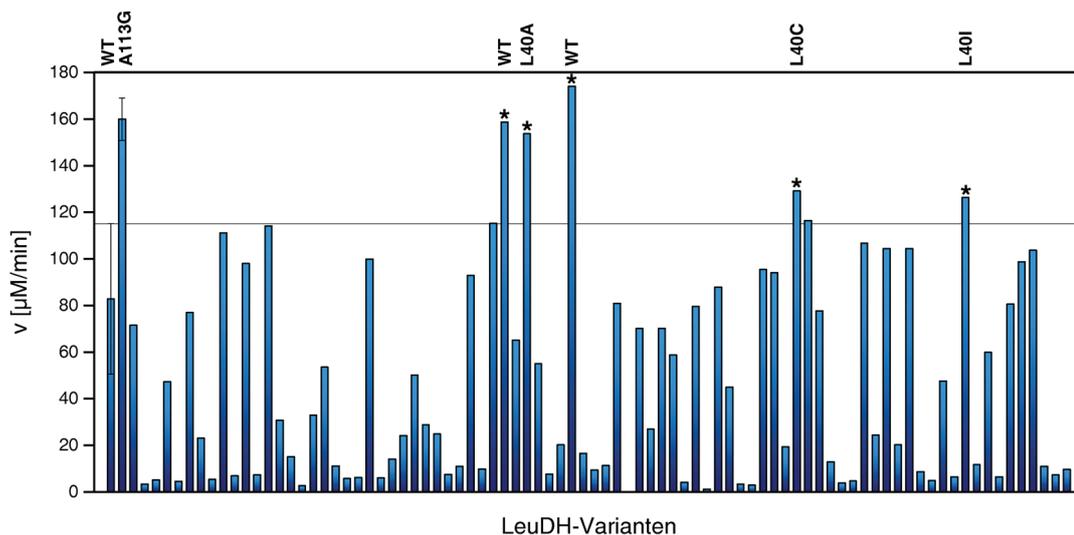


Abbildung 17. Aktivitätsanalyse von 84 Klonen der Bibliothek LeuDH(L40X). Neben 84 willkürlich gepickten Klonen wurde die Aktivität von sechs WT-Klonen und drei LeuDH(A113G)-Klonen mit 10 mM MTOB anhand der Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm photometrisch bestimmt und auf die Zelldichte bei der Ernte normalisiert. Der Mittelwert und die Standardabweichung des als Referenz verwendeten WT und der Positivkontrolle LeuDH(A113G) sind ganz links gezeigt. Die Aktivität der Varianten L40X wurde nur einfach gemessen. Die gefundenen Aminosäureaustausche an Position 40 der fünf besten Varianten (*) sind angegeben.

3.3.3 Kombination und Charakterisierung verbesserter LeuDH-Varianten

Abschließend wurde der rationale Aminosäureaustausch A113G mit dem durch semi-rationale Mutagenese identifizierten Austausch L40I durch ortsgerichtete Mutagenese kombiniert. Die erzeugte Doppelmutante L40I/A113G wurde wie zuvor das Enzym LeuDH(A113G) produziert, gereinigt und enzymkinetisch charakterisiert. Die bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten folgten einer einfachen Michaelis/Menten-Kinetik (Johnson & Goody, 2011) mit einem K_M -Wert von 0,897 mM und $k_{cat} = 66,2 \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 4, Abbildung 18).

Tabelle 4. Kinetische Parameter der LeuDh-Mutanten mit MTOB als Substrat. Die katalytische Aktivität wurde bei pH 9 und 30 °C anhand der Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm photometrisch bestimmt.

LeuDh-Variante	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]
WT	10,8	50,2	4,65
A113G	2,97	191,5	64,5
L40I	9,22	52,2	5,66
A113G/L40I	0,897	66,2	73,8

Verglichen mit dem Wildtyp-Enzym war der k_{cat} -Wert der Doppelmutante L40I/A113G um 32 % erhöht und der K_M -Wert sogar um den Faktor 12 reduziert. Dies spiegelte sich in einer knapp 16-fachen katalytischen Effizienz von $73,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dem höchsten in dieser Enzymreihe gemessenen Wert (vgl. Tabelle 4), wider. Neben dem positiven Effekt auf die Gesamtaktivität zeigte sich, dass durch die Synergie von A113G und L40I vor allem der K_M -Wert von 2,97 mM im Fall der Einfachvariante A113G weiter auf 0,897 mM verringert werden konnte. Die durch Enzym-Engineering erzeugte Mutante LeuDh(L40I/A113G) war bei doppelter katalytischer Effizienz auch bezüglich des K_M -Werts für MTOB mit der PheDH aus *T. intermedius* (siehe Abschnitt 3.2.1, Tabelle 3) vergleichbar. Damit versprach sie, durch schnelleren Entzug des Intermediats MTOB zu einer Erhöhung der Ausbeute an L-Met in der gekoppelten Reaktion mit der Carboxylase KdcA beizutragen.

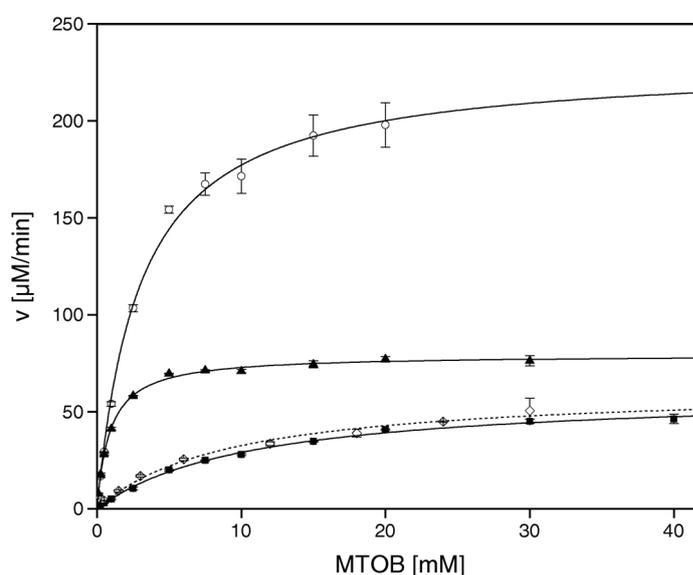


Abbildung 18. Kinetische Charakterisierung der optimierten LeuDh-Varianten. Neben der durch Kombination erhaltenen LeuDh-Doppelmutante L40I/A113G (▲) sind zum Vergleich der LeuDh-Wildtyp (■), sowie die Einfachmutanten A113G (○) und L40I (◇) abgebildet. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit je 20 nM der LeuDh-Mutante in Puffer (pH 7,5) bei 30 °C in Abhängigkeit von MTOB anhand der Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm photometrisch im Dreifachansatz bestimmt und mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung angepasst. Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 4 angegeben.

3.3.4 Vergleich der besten LeuDH-Varianten in der Methionin-Produktion

Um die Auswirkung der Mutationen in der LeuDH im Kontext der L-Met-Produktion zu testen, wurden die Einfachmutante A113G – mit dem mit Abstand besten Wert für k_{cat} – und die Doppelmutante L40I/A113G – mit dem besten K_M -Wert für MTOB – in der gekoppelten Reaktion mit der Carboxylase hinsichtlich der finalen Ausbeute miteinander verglichen. Dazu wurden 20 μM KdcA mit je 5 μM des LeuDH-Wildtyps, der Mutante A113G bzw. L40I/A113G und 4 mM NADH, 4 mM Methional sowie 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO_4 und 500 mM NH_4HCO_3 versetzt und unter 2 bar CO_2 für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die mit Hilfe von RP-HPLC ermittelte L-Met Ausbeute betrug für die Reaktion mit der wtLeuDH 8,6 %, mit der Variante A113G 20,0 % und mit der Doppelmutante sogar 28,3 % (Abbildung 19). Dieser Befund zeigt, dass eine erhöhte katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M), hauptsächlich bedingt durch einen erniedrigten K_M -Wert gegenüber dem Substrat MTOB, dazu führt, dass die optimierten LeuDH-Mutanten besser an die Bedingungen der Substratlimitierung angepasst sind. Folglich setzten sie während der gegebenen Reaktionszeit mehr MTOB um als das Wildtyp-Enzym, wodurch die gemessene Ausbeute an L-Met stieg.

Zur weiteren Optimierung der L-Met Synthese wurde die Konzentration der KdcA auf 30 μM und die der besten LeuDH-Mutante, L40I/A113G, auf 20 μM erhöht und die Inkubation um 8 h verlängert, wobei die Ausbeute nach 24 h letztlich 45 % betrug. Damit lag die Ausbeute an L-Met höher als zuvor mit der KdcA und YbdL unter gleichen molaren Enzymkonzentrationen

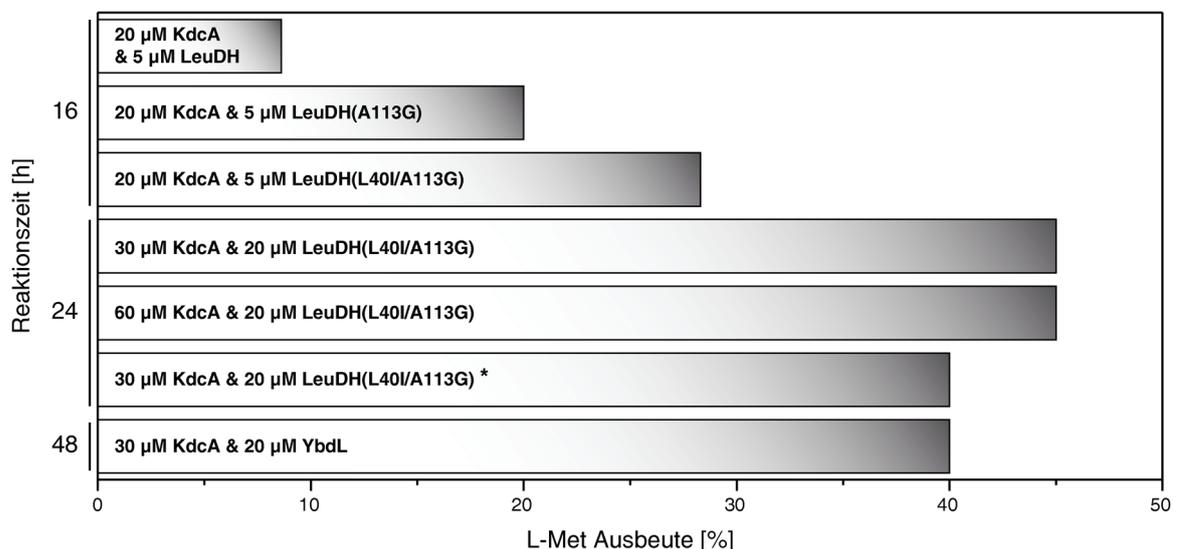


Abbildung 19. Carboxylierung & reduktive Aminierung von Methional mit der KdcA und den verbesserten LeuDH-Mutanten A113G bzw. L40I/A113G. Zunächst wurde durch Vergleich der L-Met-Ausbeute nach 16 h unter 2 bar CO_2 die LeuDH(L40I/A113G) als geeignetste LeuDH identifiziert. Eine Erhöhung der Reaktionszeit auf 24 h und der LeuDH(L40I/A113G)- bzw. KdcA-Konzentrationen steigerte die Ausbeute auf 45 %. Eine weitere Verdopplung der KdcA-Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Ausbeute. Dagegen führte die Reduktion des Cofaktors NADH von 4 mM auf 2 mM (*) zu einer Abnahme auf 40 %. Die höchste L-Met Ausbeute, die mit 30 μM KdcA und 20 μM der Transaminase YbdL nach 48 h unter 2 bar CO_2 erreicht wurde (40 %), ist als Vergleich ganz unten gezeigt. Die Bestimmung der prozentualen Ausbeute an L-Met erfolgte mittels RP-HPLC und bezieht sich auf die eingesetzte Methionalkonzentration (4 mM).

aber nach doppelter Reaktionszeit. Trotz weiterer Verdopplung der KdcA-Konzentration in Kombination mit der LeuDH(A113G/L40I) auf 60 μM stieg die Ausbeute nicht über 45 % an. Die Halbierung der NADH-Konzentration von 4 auf 2 mM bewirkte dagegen eine Reduktion auf 40 % (Abbildung 19). Dies lässt darauf schließen, dass unter diesen Bedingungen das thermodynamische Gleichgewicht angenähert erreicht wurde, d.h. dass die Ausbeute an L-Met durch Beeinflussung der Reaktionskinetik nicht weiter erhöht werden kann.

3.4 Optimierung der Decarboxylase durch Enzym-Engineering

Nach der Optimierung der zweiten Teilreaktion des gekoppelten Enzymsystems, die das Intermediat dem thermodynamisch ungünstigen Gleichgewicht entzieht, erschien es sinnvoll, auch die Carboxylase durch Enzym-Engineering zu verbessern. Vorherige L-Met Synthesen mit der LeuDH als Zweitenzym hatten unter den verwendeten Reaktionsbedingungen eine stärkere Aggregationstendenz der KdcA im Vergleich zur LeuDH gezeigt (vgl. Abbildung 12 B). Da sich dieser Effekt mit zunehmender Reaktionszeit limitierend auf die L-Met Synthese auswirkt, sollte die Stabilität der KdcA durch sequenzbasiertes Engineering erhöht werden. Eine weitere Rolle für die Ausbeute an L-Met spielte die relativ geringe Geschwindigkeit, mit der das Substrat Methional von der KdcA umgesetzt wurde (siehe Abschnitt 3.1.4). Smit *et al.* (2005) hatten durch Analyse der Decarboxylierung verschiedener α -Ketosäuren nachgewiesen, dass verzweigte aliphatische α -Ketosäuren von der KdcA gegenüber nicht verzweigten bevorzugt werden. Von den getesteten linearen Substraten wurde 2-Oxohexansäure am besten umgesetzt. Größere Substrate wie die zu L-Phenylalanin oder L-Tryptophan korrespondierenden α -Ketosäuren sowie kurzkettigere Substrate mit weniger als sechs C-Atomen wurden dagegen schlechter umgesetzt. Da MTOB sich nur durch ein etwas größeres Schwefelatom an Position des C₅ von der 2-Oxohexansäure unterscheidet, aber dennoch um den Faktor 2-3 schlechter umgesetzt wurde, sollte durch rationales Engineering der Substratbindetasche der KdcA einem erhöhten Platzbedarf des Aldehyd-Substrats Methional Rechnung getragen werden.

3.4.1 Stabilisierung der Decarboxylase KdcA

Zwecks Stabilisierung der Decarboxylase KdcA aus *L. lactis* wurden nicht konservierte Reste in der Primärstruktur mit Hilfe eines Multiplen Alignments homologer Sequenzen aus anderen Bakterien identifiziert und gegen die an dieser Position am häufigsten auftretenden Aminosäuren ausgetauscht. Das Einführen konservierter Reste in Proteine verspricht die Stabilität bei gleichbleibender Aktivität zu erhöhen (Steipe *et al.*, 1994; Davidson, 2006). Durch eine Suche mit der Aminosäuresequenz der KdcA (UniProt ID: Q6QB34) mittels PSI-Blast (Altschul *et al.*, 1990) in der NCBI-Datenbank wurden zunächst homologe Sequenzen ermittelt und anschließend zu kurze oder zu lange Sequenzen manuell ausgeschlossen. Nach Begrenzung

der Sequenz-Redundanz auf unter 90 % wurden die 40 verbliebenen nächstverwandten Sequenzen zusammen mit der KdcA für ein multiples Alignment verwendet (Abbildung 20 A).

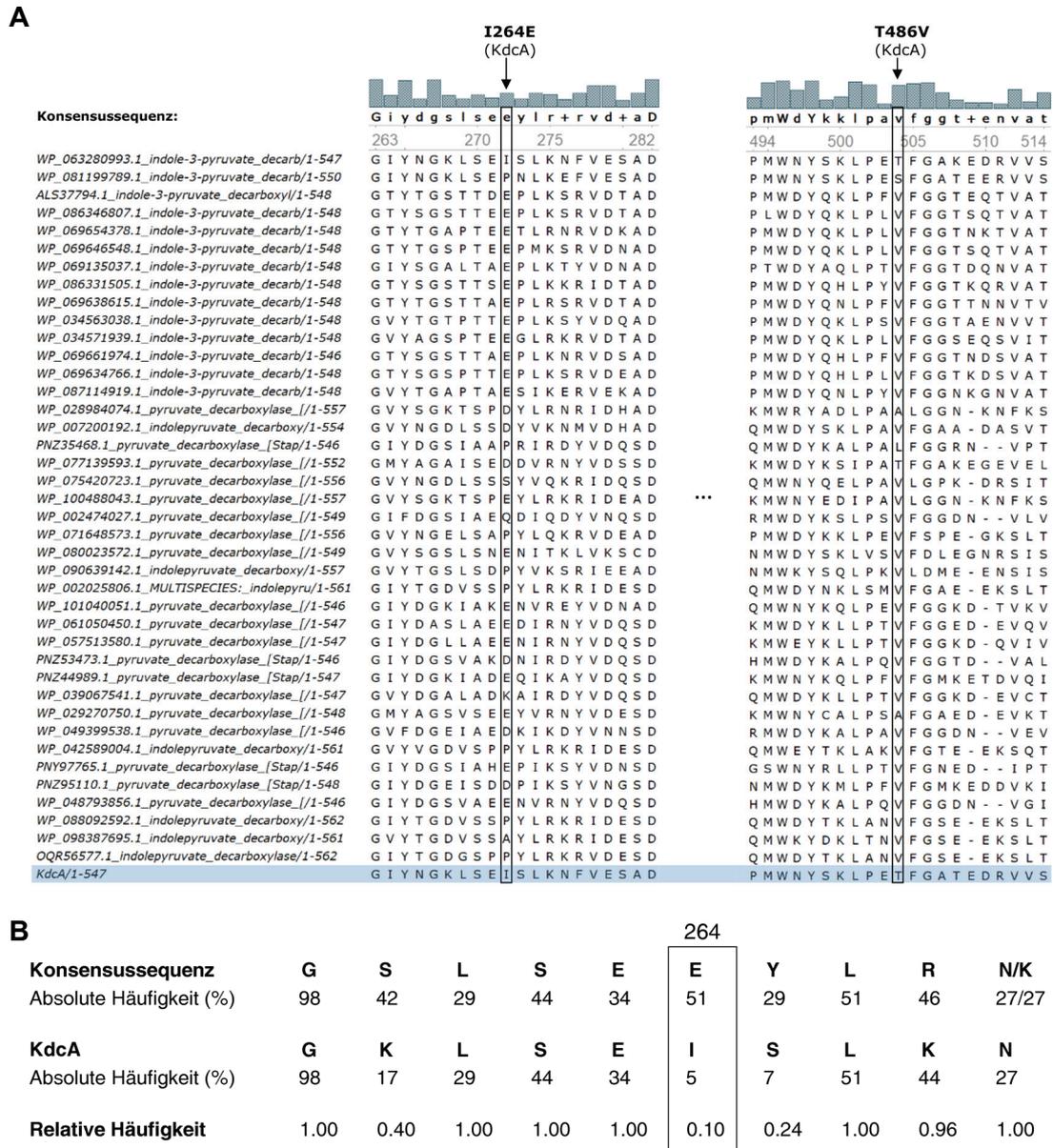


Abbildung 20. Identifizierung niedrig konservierter Aminosäurepositionen in der KdcA anhand eines Multiplen Alignments. (A) Ausschnitte aus dem Multiplen Alignment der KdcA mit 40 homologen Sequenzen, wobei die Sequenz der KdcA unten blau hinterlegt ist. Die Konsensussequenz ist oberhalb des Alignments dargestellt (Großbuchstaben: einzige Aminosäure an dieser Position; Kleinbuchstaben: häufigste Aminosäure an dieser Position; + zwei Aminosäuren an einer Position kommen gleich häufig vor). Zwei der zu mutierenden Positionen in der KdcA, I264E und T486V, sind durch einen Rahmen gekennzeichnet. (B) Auswahl der Aminosäuresubstitutionen anhand der relativen Häufigkeit. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz der KdcA (259-268) sowie der aus dem Alignment erhaltenen Konsensussequenz. Die absolute Häufigkeit, mit der eine Aminosäure an einer Position der KdcA bzw. an derselben Position der Konsensussequenz gegenüber allen 41 Sequenzen in dem Alignmenet vorkam, ist unterhalb der jeweiligen Sequenz angegeben. Die entsprechende relative Häufigkeit wurde aus dem Quotienten der beiden absoluten Häufigkeiten berechnet. Zur Selektion möglicher stabilisierender Aminosäuresubstitutionen wurden Positionen mit einer relativen Häufigkeit $\leq 0,10$ (schwarzer Rahmen, I264E) in der Kristallstruktur betrachtet.

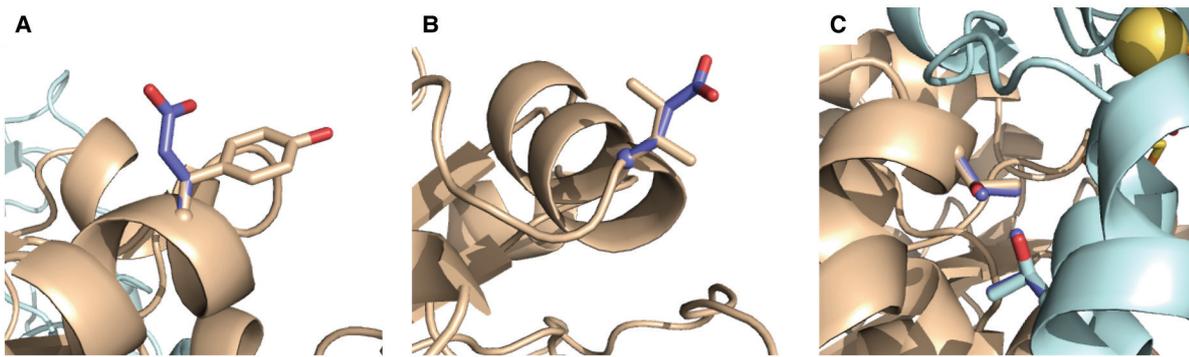


Abbildung 21. Ausschnitte aus der Kristallstruktur des Homodimers der KdcA (PDB-ID: 2VBG). Zur Unterscheidung der Monomere ist eines in Beige, das andere in Cyan abgebildet. Die vermutlich zur Stabilität beitragenden Substitutionen sind violett hervorgehoben; die ursprüngliche Aminosäure ist je in der Farbe des Monomers dargestellt: (A) Y144E; (B) I264E; (C) T486V. Die gelbe Kugel stellt das strukturelle Mg^{2+} -Ion dar.

Zur Identifizierung besonders niedrig konservierter Reste in der KdcA wurden zunächst die absoluten Häufigkeiten, mit der eine Aminosäure sowohl an einer Position der KdcA als auch an der entsprechenden Position der Konsensussequenz innerhalb aller 41 Sequenzen vorkam, berechnet. Anschließend wurde der Quotient aus den beiden absoluten Häufigkeiten gebildet (Abbildung 20 B). Daraufhin wurden gezielt niedrig konservierte Positionen mit einer relativen Häufigkeit $\leq 0,10$ in der Kristallstruktur der KdcA (PDB-ID 2VBG) betrachtet. Unter Berücksichtigung der chemisch-physikalischen Eigenschaften dieser Aminosäuren im Kontext ihrer Positionen in der Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur (siehe unten) wurden eher destabilisierende Reste gegen die jeweiligen Aminosäuren aus der Konsensussequenz mittels ortsgerechter Mutagenese des Plasmids pET21-KdcA ausgetauscht (siehe Abschnitt 2.3.8).

Darunter war das oberflächenexponierte und am N-terminalen Ende der siebten α -Helix lokalisierte Tyr144, dessen Austausch zu Glu das Makro-Dipolmoment der Helix stabilisieren sollte, wobei die höhere Helixpropensität von Glu einen zusätzlichen Beitrag leisten sollte (Abbildung 21 A). Die Substitution von Ile264 durch Glu könnte mit der Entfernung eines hydrophoben Rests von der Oberfläche bei gleichzeitiger Einführung eines negativen Rests am N-Terminus der elften α -Helix ebenfalls stabilisierend wirken (Abbildung 21 B). Durch den Austausch von Thr486 gegen Val an der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren sollte schließlich die Stabilität des Dimers durch verstärkte hydrophobe Wechselwirkung mit dem symmetrieverwandten Rest des anderen Monomers erhöht werden (Abbildung 21 C). Die Produktion und Reinigung der Varianten Y144E, I264E und T486V erfolgte wie beim Wildtyp (siehe Abschnitt 3.1.1). Die anschließende Messung der Decarboxylierung von MTOB zeigte, dass die Mutationen die Enzymaktivität kaum beeinflussten und die Varianten weiterhin eine typische Michaelis/Menten-Kinetik aufwiesen (Tabelle 5; Buschinger 2018).

Zur Analyse der Auswirkung der Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität wurden die Halbwertszeiten der KdcA-Varianten gemessen, indem je $20 \mu\text{M}$ des Enzyms in 20 mM PIPES/NaOH (pH 7), 500 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$ und $0,5 \text{ mM}$ TPP bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 rpm über bis zu 31 h inkubiert wurden. Währenddessen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten

Proben entnommen und zentrifugiert, um die verbliebene Enzymaktivität im löslichen Überstand über den gekoppelten Assay mit der ADH in Gegenwart von 3 mM MTOB zu bestimmen. Nach Normalisierung der Aktivitäten auf den Startwert vor Inkubation bei $t = 0$ h wurden die Daten, die einem exponentiellen Zerfall folgten, mit Hilfe einer exponentiellen Zerfallsfunktion angepasst und daraus die Halbwertszeiten des Aktivitätsabfalls bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.2, Gleichung 2 und 3; Abbildung 22 A). Mit 8,4 h war die Halbwertszeit der Variante I264E um den Faktor 6 größer als die des Wildtyp-Enzyms, welche nur 1,4 h betrug. Im Vergleich dazu führten die Austauschungen Y144E und T486V zu verkürzten Halbwertszeiten von 1,0 h bzw. 0,9 h.

Tabelle 5. Kinetische Parameter der KdcA-Varianten mit potentiell verbesserter Stabilität. Die katalytische Aktivität gegenüber MTOB wurde im gekoppelten Assay mit einer ADH bei pH 7 und 30 °C anhand der Konzentrationsabnahme des Cofaktors NADH bei 340 nm photometrisch bestimmt.

KdcA-Variante	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]
WT	1,04	12,3	11,8
Y144E	0,863	13,1	15,2
I264E	1,14	12,8	11,2
T486V	0,905	15,9	17,6

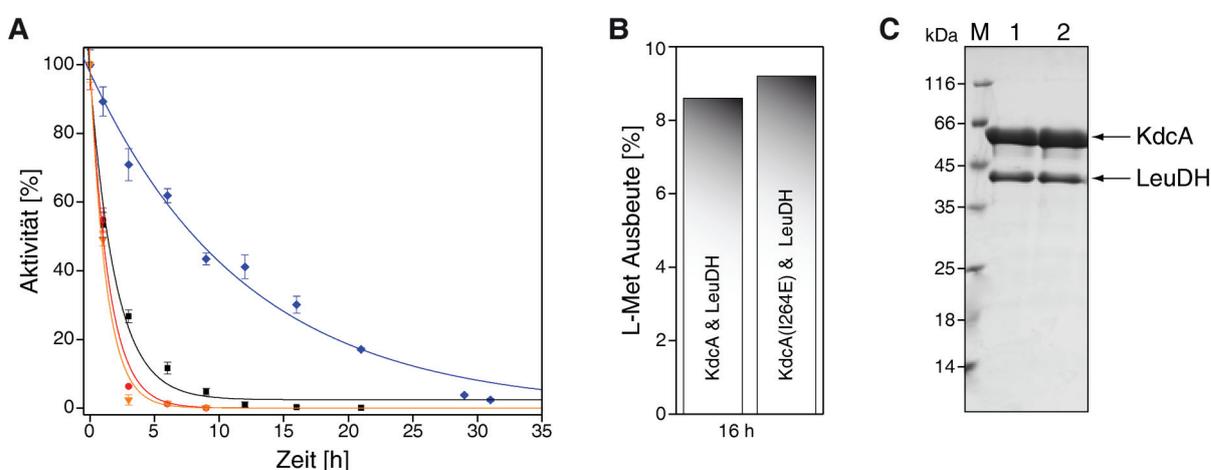


Abbildung 22. Charakterisierung der KdcA-Varianten bezüglich ihrer Stabilität. (A) Messung der Decarboxylierungsaktivität (Anfangsgeschwindigkeit) im löslichen Überstand mit 3 mM MTOB nach bis zu 31 h Inkubation bei 40 °C und 200 rpm von je 20 μ M Enzym in 20 mM PIPES/NaOH (pH 7), 500 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$ mit 0,5 mM TPP. Die Daten zeigten einen exponentiellen Aktivitätsabfall mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1,4$ h für den WT (schwarz) und $t_{1/2} = 1,0 / 8,4 / 0,9$ h für die Varianten Y144E (rot) / I264E (blau) / T486V (orange). (B) Carboxylierung & reduktive Aminierung mit 20 μ M der stabilisierten Variante KdcA(I264E) im Vergleich zum WT in Gegenwart von und je 5 μ M LeuDH für 16 h unter 2 bar CO_2 . Die Analyse der L-Met Ausbeute erfolgte mittels RP-HPLC. (C) SDS-PAGE des löslichen Überstands bei Ende der Reaktion. Spur 1: wtKdcA & LeuDH; Spur 2: KdcA(I264E) & LeuDH.

Die beste Variante KdcA(I264E) wurde schließlich in der gekoppelten Reaktion mit der wtLeuDH zur Synthese von L-Met verwendet. Wie zuvor wurden je 20 μ M der KdcA und 5 μ M der LeuDH mit 4 mM Methional und 2 mM NADH über 16 h unter 2 bar CO_2 inkubiert. Trotz verlängerter Halbwertszeit in dem beschriebenen Assay konnte keine signifikante Zunahme der

Ausbeute an L-Met beobachtet werden (Abbildung 22 B). Die Analyse der löslichen Enzym-Überstände nach 16 h durch SDS-PAGE zeigte zudem, dass die stabilisierte Variante KdcA(I264E) unter den Reaktionsbedingungen zur Synthese von L-Met das gleiche Aggregationsverhalten wie der Wildtyp aufwies (Abbildung 22 C). Letzteres deutete darauf hin, dass Reaktionskomponenten wie Methional oder CO₂, die in dem Assay zur Bestimmung der Halbwertszeit nicht enthalten waren, möglicherweise durch Reaktion mit oberflächenexponierten Lysinresten zur Aggregation beitragen könnten. Allerdings beeinflusste die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 2 bar CO₂ die Aggregation – unabhängig von der CO₂ induzierten pH-Änderung – nicht (Abbildung 23 A). Auch die Anwesenheit von 4 mM Methional wirkte sich nicht negativ aus, sondern erhöhte den löslichen Anteil der KdcA sogar leicht (Abbildung 23 B). Da der Aminosäureaustausch I264E letztlich nicht zu einer nennenswerten Zunahme der Ausbeute an L-Met führte, wurde in weiteren Versuchen das KdcA-Wildtyp-Enzym verwendet.

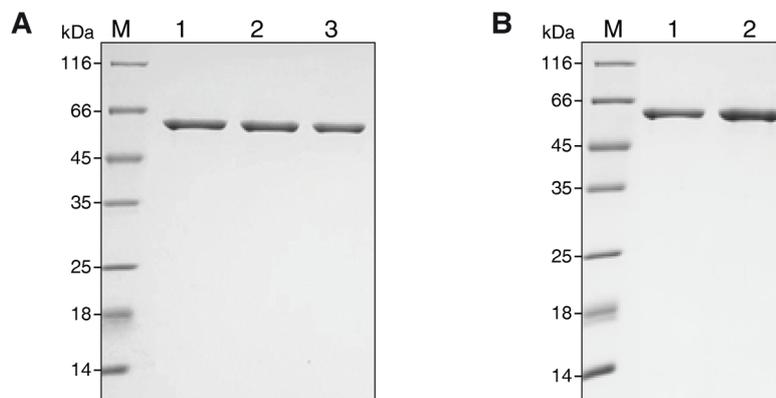


Abbildung 23. SDS-PAGE des löslichen Überstands zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der KdcA in Anwesenheit von CO₂ bzw. Methional. Abnehmende Bandenintensitäten deuten auf Proteinaggregation hin. (A) Dreistündige Inkubation von je 5 μ M KdcA in 200 mM PIPES/NaOH (pH 6,4 - 7), unter 0-2 bar CO₂. Spur 1: 2 bar CO₂ und sich dabei ergebende pH-Änderung auf pH 6,4; Spur 2: Inkubation ohne CO₂ bei pH 7; Spur 3: Inkubation ohne CO₂ bei pH 6,4. (B) Vierstündige Inkubation von je 5 μ M KdcA in 200 mM PIPES/NaOH (pH 6,4). Spur 1: Inkubation ohne Methional; Spur 2: Inkubation mit 4 mM Methional. Alle Ansätze enthielten 1 mM MgSO₄ und 0,5 mM TPP.

3.4.2 Substratspezifität der Decarboxylase KdcA

Um die Aktivität der KdcA gegenüber Methional bzw. der korrespondierenden α -Ketosäure MTOB zu erhöhen, sollte das aktive Zentrum auf den Platzbedarf des Substrats angepasst werden. Als Grundlage dafür diente die bereits publizierte Kristallstruktur der KdcA (2VBG), in der 2-[(R)-1-Hydroxyethyl]deazaTPP als Analogon des 2-[(R)-1-hydroxyethyl]TPP Intermediates, welches bei der Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, gebunden ist (Berthold *et al.*, 2007). Zur Vergrößerung der Substratbindetasche sollten die Aminosäureaustausche Phe382 zu Leu, Ile465 zu Val und Phe542 zu Leu durch QuikChange Mutagenese eingebracht werden (Abbildung 24). Die Substitution F542L am Eingang des Substratkanals könnte zudem die Substratdiffusion in das aktive Zentrum erleichtern (Berthold *et al.*, 2007).

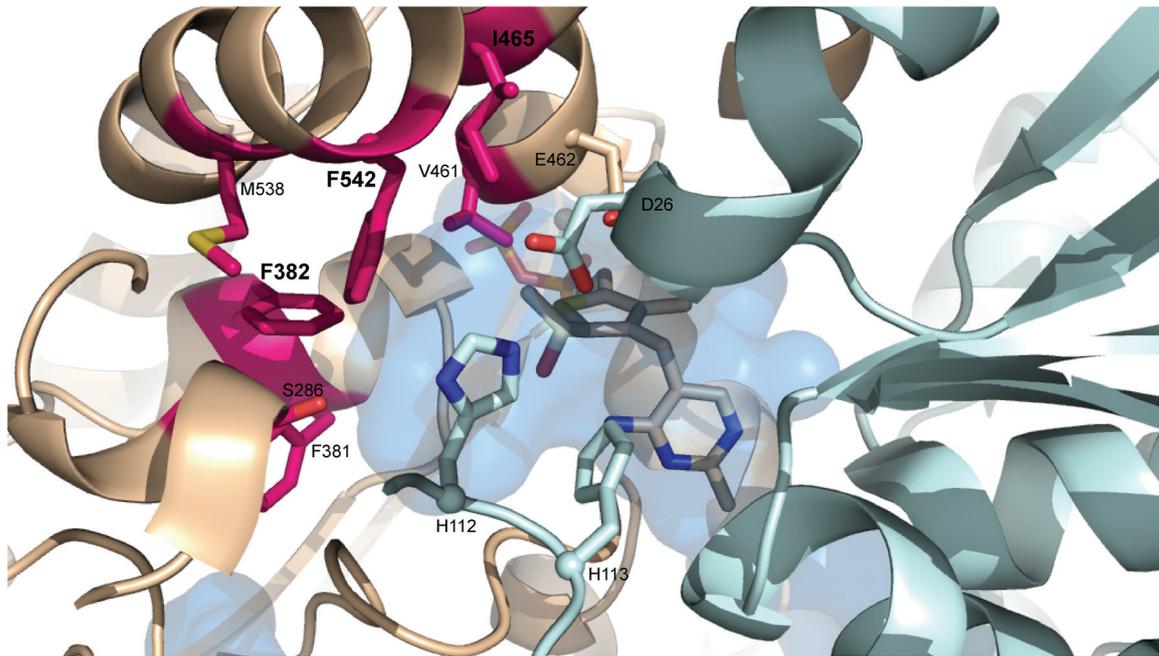


Abbildung 24. Substratbindetasche der KdcA aus *L. lactis* (PDB-ID: 2VBG). Das Homodimer wird unter Einfärbung der Monomere in Beige bzw. Cyan dargestellt. Aminosäuren, die die Substratbindetasche, in der 2-[(R)-1-Hydroxyethyl]deazaTPP als Analogon für das 2-[(R)-1-hydroxyethyl]TPP Intermediat gebunden ist, umgeben, sind als Sticks wiedergegeben. Reste, die die Größe der Bindetasche beeinflussen, sind pink hervorgehoben, katalytische Reste sind in der Farbe des jeweiligen Monomers dargestellt. Die blaue Oberfläche stellt die Substratbindetasche dar.

Die Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Aktivität der Varianten erfolgte wie zuvor beim KdcA-Wildtyp. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Decarboxylierung von MTOB folgten zwar einer Michaelis/Menten-Kinetik, allerdings waren die k_{cat} -Werte aller Varianten reduziert, wobei die Mutante F542L mit 76 % (bezogen auf k_{cat} des Wildtyps) bei nur leicht erhöhtem K_M -Wert noch die höchste katalytische Effizienz aufwies. Der Austausch I465V führte zwar zu einer leichten Verbesserung des K_M -Werts gegenüber dem Wildtypenzym um 25 %, allerdings nahm die katalytische Effizienz aufgrund des reduzierten k_{cat} -Werts stark ab. Die Substitution F382L wirkte sich in beiden Parametern negativ aus und resultierte in einer um 93 % reduzierten katalytischen Effizienz (Abbildung 25 A; Tabelle 6).

Die Messung der Carboxylierung von 30 mM Methional unter 4 bar CO_2 mit der im Überschuss vorliegenden YbdL zeigte den gleichen Trend. Mit 2,9 $\mu M/min$ betrug die Anfangsgeschwindigkeit der KdcA(F542L) bezogen auf den Wildtyp noch 47 %, die der anderen Varianten I465V und F382L nur 10 bzw. 5 % (Abbildung 25 B). Obwohl sich die Aminosäureaustausche negativ auf die katalytische Effizienz auswirkten, könnte die Position F542, deren Substitution zur geringsten Abnahme von k_{cat} und nur einem minimal erhöhten K_M -Wert führte, als Ausgangspunkt für weitere Mutagenesen zur Verbesserung der Substratspezifität gegenüber Methional dienen.

Tabelle 6. Kinetische Parameter der KdcA-Varianten zur Änderung der Substratspezifität. Die katalytische Aktivität gegenüber MTOB wurde im gekoppelten Assay mit einer ADH bei pH 7 und 30 °C anhand der Konzentrationsabnahme des Cofaktors NADH bei 340 nm photometrisch bestimmt.

KdcA-Variante	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]
WT	1,04	12,3	11,8
F382L	3,49	2,7	0,77
I465V	0,783	2,6	3,0
F542L	1,42	9,4	6,6

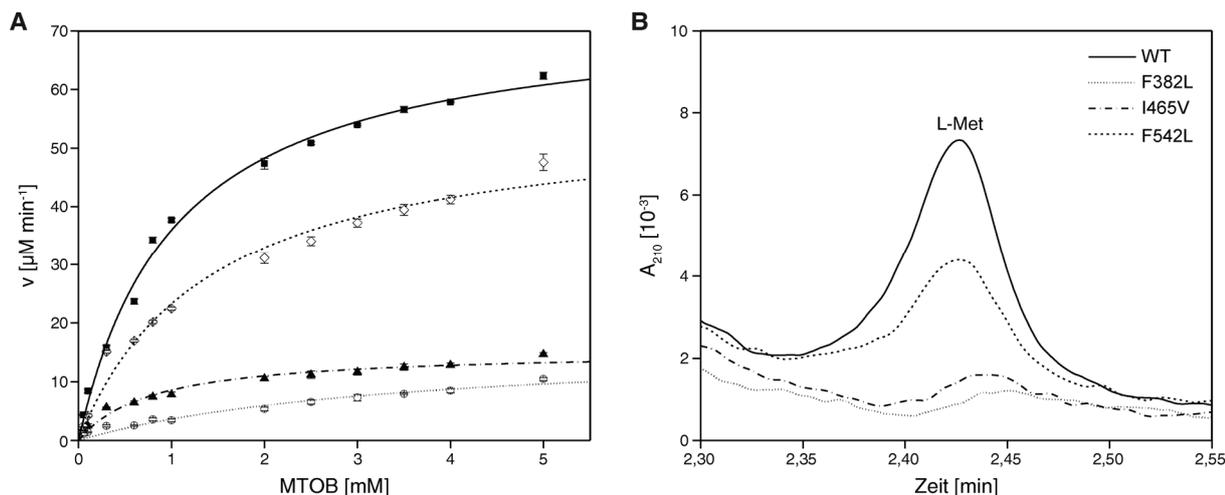


Abbildung 25. Aktivitätsbestimmung der KdcA-Mutanten zur Änderung der Substratspezifität. (A) Kinetische Charakterisierung der Decarboxylierung von MTOB durch je 0,1 μM der KdcA-Mutanten F382L (\circ), I465V (\blacktriangle) bzw. F542L (\diamond). Der KdcA-Wildtyp (\blacksquare) dient als Vergleich. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden im gekoppelten Assay mit einer im Überschuss vorliegenden ADH bei pH 7 und 30 °C anhand der Konzentrationsabnahme des Cofaktors NADH bei 340 nm photometrisch im Dreifachansatz bestimmt und mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung angepasst. Die enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 6 angegeben. (B) RP-HPLC Analyse der gekoppelten Carboxylierung und Aminierung von 30 mM Methional durch je 10 μM der KdcA-Mutanten und die im Überschuss vorliegende YbdL bei 4 bar CO_2 nach 10 min. Die Anfangsgeschwindigkeiten für die Mutanten und den Wildtyp betragen: F382L: 0,3 $\mu M \text{ min}^{-1}$; I465V: 0,6 $\mu M \text{ min}^{-1}$; F542L: 2,9 $\mu M \text{ min}^{-1}$; WT: 6,2 $\mu M \text{ min}^{-1}$.

3.5 Übertragbarkeit der Reaktion auf die Synthese von anderen Aminosäuren und Methionin-Derivaten

Nach der Optimierung der Carboxylierung und reduktiven Aminierung zur Synthese von L-Met unter Verwendung der Enzyme KdcA und LeuDh sollte die analoge Reaktionsabfolge auch für die biosynthetische Herstellung anderer Aminosäuren und Methionin-Derivate eingesetzt werden. Aufgrund der natürlichen Substratspezifitäten beider Enzyme (Smit *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009) für L-Leucin (L-Leu) und L-Isoleucin (L-Ile) erschien die Herstellung ebendieser Aminosäuren unter Einsatz der entsprechenden Aldehyde naheliegend. Darüber hinaus wurde das Carboxylierungsprodukt von Methional durch Austausch der LeuDh gegen die D-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (D-HicDH) aus *L. casei* (Hummel *et al.*, 1985) bzw. die L-HicDH aus *L. confusus* (Schütte *et al.*, 1984) alternativ zu dem etablierten Futtermitteladditiv D/L-Methionin-Hydroxy-Analogon (D/L-MHA; Payne *et al.*, 2006; Dilger *et al.*, 2007) umgesetzt.

3.5.1 Biokatalytische Produktion von L-Leucin und L-Isoleucin

Wie zuvor bei der Synthese von L-Met dienten die KdcA und LeuDh als Biokatalysatoren zur gekoppelten Carboxylierung und reduktiven Aminierung (siehe Abschnitt 3.2.1) mit dem Ziel der Herstellung von L-Leu und L-Ile. Als Substrate wurden dazu 3- bzw. 2-Methylbutanal eingesetzt. Für die Synthese wurden 30 μM KdcA und 20 μM LeuDh mit 4 mM des jeweiligen Aldehyds, d. h. 3- bzw. 2-Methylbutanal, sowie zum Vergleich Methional, und 4 mM NADH über 48 h unter 2 bar CO_2 in 500 mM NH_4HCO_3 , 0,5 mM TPP und 1 mM MgSO_4 inkubiert. Nach Abtrennung der Enzyme durch Ultrafiltration mit Hilfe einer 4 ml Zentrifugen-Filtereinheit (MWCO 10 kDa) wurde in diesem Fall die Methodik der LC-MS/MS zur Analytik der enthaltenen Reaktionsprodukte eingesetzt. Im Unterschied zur bisher verwendeten RP-HPLC Analyse, in der L-Met nur anhand der Retentionszeit und seiner Absorption bei 210 nm photometrisch bestimmt wurde, erlaubte die LC-MS/MS Messung mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM; Kondrat *et al.*, 1978) die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung anhand eines für Aminosäure spezifischen Massenfragments in Verbindung mit der Retentionszeit (siehe Abschnitt 2.6.10). Zudem war es auf diese Weise möglich, die im zugänglichen UV-Bereich nur schlecht absorbierenden Aminosäuren L-Leu und L-Ile nachzuweisen. Die mittels LC-MS/MS bestimmten Ausbeuten von L-Leu und L-Ile waren mit 26 % und 29 % annähernd doppelt so hoch als im Fall L-Met (15 %) (Abbildung 26). Dies war aufgrund der besseren Substratspezifitäten für L-Leu und L-Ile zu erwarten.

Diese Untersuchung bestätigte nicht nur die Übertragbarkeit der gezeigten biosynthetischen Route auf andere Aminosäuren, sondern sie verdeutlichte nochmals auch die Notwendigkeit hoher Substratspezifitäten der Enzyme, um dem ungünstigen Gleichgewicht der Carboxylierung nach dem Prinzip von Le Chatelier auch unter limitierenden Substratkonzentrationen entgegen wirken zu können.

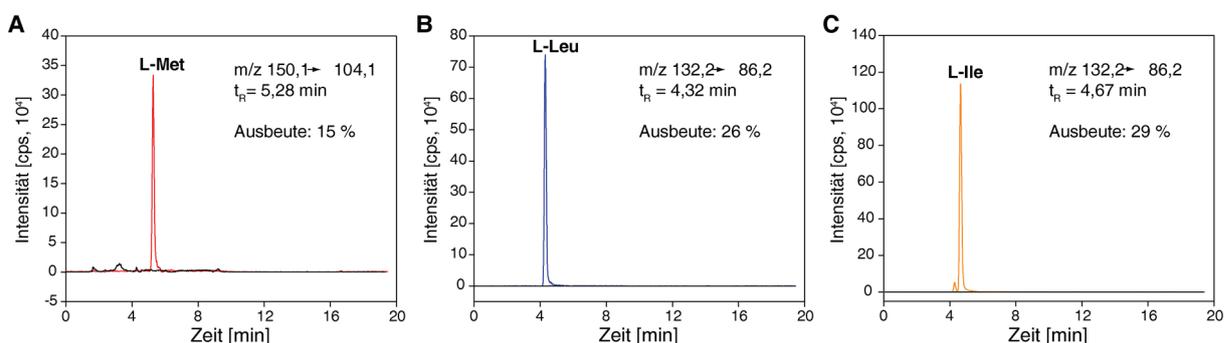


Abbildung 26. LC-MS/MS Analyse der enzymatischen Synthese von L-Methionin-, L-Leucin- und L-Isoleucin aus den entsprechenden Aldehyden. Methional, 3-Methylbutanal und 2-Methylbutanal (je 4 mM) wurden durch je 30 μM KdcA und 20 μM LeuDh unter 2 bar CO_2 in Gegenwart von 4 mM NADH und 500 mM NH_4HCO_3 durch Carboxylierung und reduktive Aminierung für 48 h zu L-Met (A, rot), L-Leu (B, blau) und L-Ile (C, orange) umgesetzt. Die Produkte wurden mittels LC-MS/MS durch *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) analysiert. Kontrollreaktionen ohne KdcA (schwarz) ließen keine der erwarteten Aminosäuren nachweisen. Für die Aminosäure spezifische Massenfragmentierungen und die Umsatzraten relativ zur eingesetzten Aldehydkonzentration sind in den Chromatogrammen (ESI⁺ MRM) angegeben. Die Quantifizierung erfolgte anhand separater Kalibrierung mit den Reinsubstanzen sowie isotopenmarkierten internen Standards.

3.5.2 Biokatalytische Produktion der D/L-Methionin-Hydroxy-Analoga

Für die biokatalytische Synthese von D- bzw. L-MHA sollte auf die Carboxylierung von Methional zu MTOB eine stereospezifische Hydrierung folgen. Aufgrund der bekannten Aktivität gegenüber 2-Ketoisocaproat und 2-Ketocaproat wurde einerseits die D-HicDH aus *L. casei*, für welche die Umsetzung von MTOB bereits gezeigt war (Hummel *et al.*, 1985), und andererseits die L-HicDH aus *L. confusus* (Schütte *et al.*, 1984) ausgewählt. Obwohl die Umsetzung von MTOB für die L-HicDH noch nicht beschrieben war, lag es nahe, dass sie MTOB, das sich nur durch ein etwas größeres Schwefelatom anstelle der Position C₅ von 2-Ketocaproat unterscheidet, als Substrat akzeptiert. Die kodierenden DNA-Sequenzen für beide Enzyme wurden für die rekombinante Expression in *E. coli* optimiert und als synthetische DNA bezogen. Das Strukturgen für die D-HicDH wurde über *KasI* und *HindIII* auf dem Expressionsplasmid pASK-IBA35(+), welches für ein N-terminales His₆-tag kodiert, kloniert. Da sich der N-Terminus der L-HicDH an der Kontaktfläche des Monomers im tetrameren Enzymkomplex befindet, schien sich der frei zugängliche C-Terminus besser für eine Fusion mit dem His₆-tag zu eignen (Chatterjee *et al.*, 2005). Deshalb wurde die L-HicDH über *NdeI/Eco47III* auf das Plasmid pASK75-T7RBS kloniert (Abbildung 27 A). Da sich die Plasmide nur durch die Lage des Affinitätstags unterschieden, standen beide Gene unter Kontrolle des tet-Promotor/Operatorsystems (Skerra, 1994).

Für die heterologe Proteinproduktion wurde *E. coli* BL21 mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und die Genexpression der L-HicDH bei OD₅₅₀ = 0,5 - 0,8 mit 0,2 mg/l aTc in LB-Medium für 5 h bei 30 °C und 180 rpm induziert. Aufgrund der Anfälligkeit zur Bildung von Einschlusskörpern (Lerch *et al.*, 1989) wurde die Temperatur zur Produktion der D-HicDH zuvor auf 22 °C reduziert. Bei der Bakterienernte betrug die OD₅₅₀ in beiden Fällen ca. 3, woraufhin die Enzyme nach dem Zellaufschluss mittels French Press anhand des His₆-Affinitätstags durch IMAC gereinigt wurden. Anschließend wurden jeweils die Fraktionen, die das Enzym in möglichst angereicherter Form enthielten, vereinigt und mit Hilfe einer präparativen SEC abschließend gereinigt, wobei auch die Oligomerisierung untersucht wurde. Wie in der Literatur beschrieben, eluierte die D-HicDH als Dimer (Dengler *et al.*, 1997), hier mit einer Ausbeute von ~2 mg/L für OD₅₅₀ = 1, und die L-HicDH eluierte überwiegend als Tetramer (Schütte *et al.*, 1984), und zwar mit deutlich höheren Ausbeuten von ~13 mg/L für OD₅₅₀ = 1 (Abbildung 27 B). Die Analyse der Produktion und der gereinigten Enzyme durch SDS-PAGE zeigte, dass der Unterschied in der Ausbeute vor allem auf die deutlich bessere Produktion der L-HicDH in *E. coli* zurückzuführen sein könnte (Abbildung 27 C-D), wohingegen die Effizienz der Proteinreinigung vergleichbar war.

Die Aktivität beider Enzyme wurde durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten der Umsetzung von 2-Ketoisocaproat- bzw. MTOB in 100 mM KP_i (pH 7) bei 30 °C bestimmt. Durch den Verbrauch des stöchiometrischen Cofaktors NADH konnte die Hydrierung direkt

photometrisch bei 340 nm detektiert werden. Die D-HicDH folgte bei beiden Substraten einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den in Tabelle 7 aufgeführten kinetischen Parametern (Abbildung 28 A-B). Die Werte entsprechen den von Hummel et al., (1985) publizierten Daten. Die L-HicDH zeigte bei beiden Substraten dagegen unkompetitive Substratinhibition (siehe Abschnitt 2.6.5, Gleichung 6) mit K_i -Werten von 4,5 mM und 5,6 mM für 2-Ketoisocaproat bzw. MTOB. Unter Berücksichtigung dieser Inhibition wurden die Anfangsgeschwindigkeiten anhand der Michaelis/Menten-Gleichung zur Ermittlung der kinetischen Parameter angepasst (Tabelle 7, Abbildung 28 C-D).

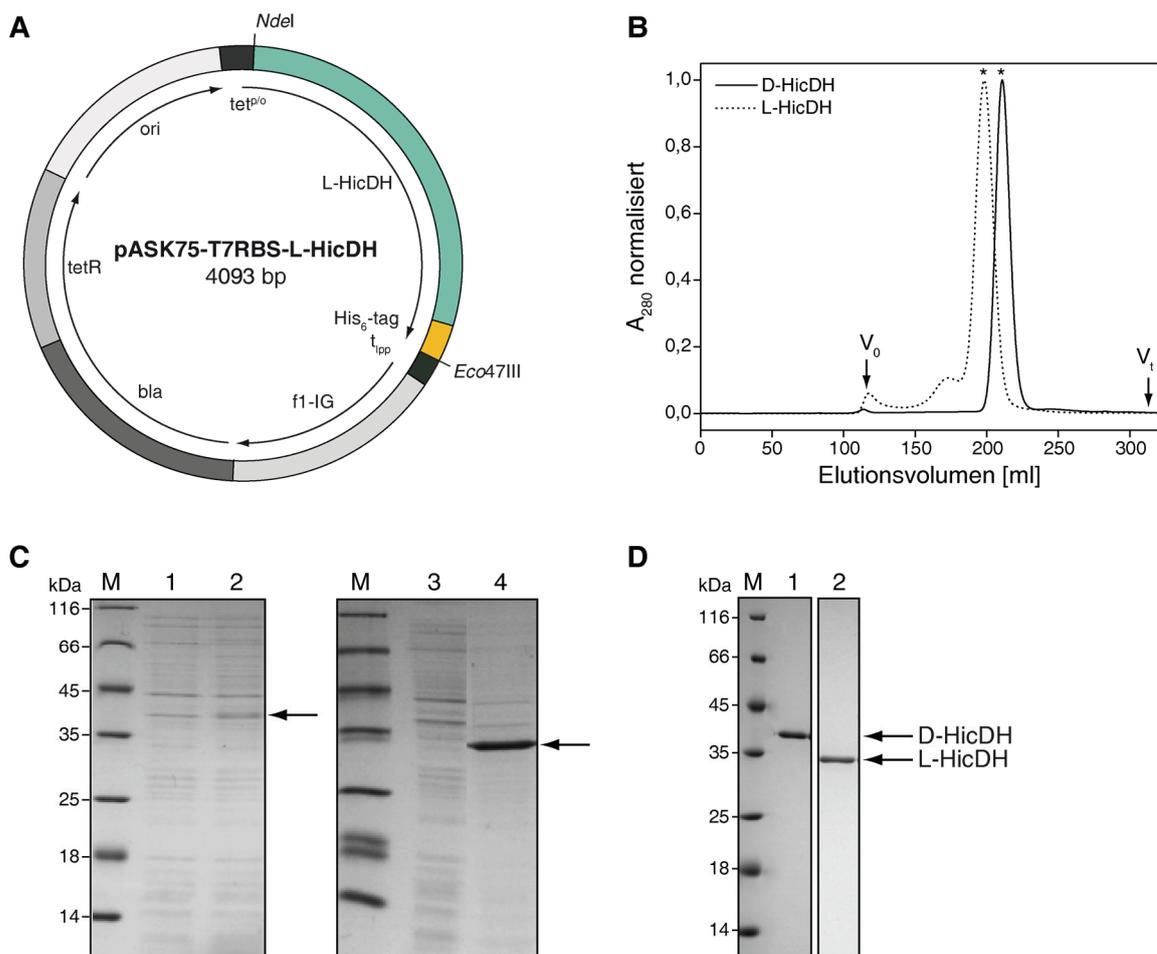


Abbildung 27. Produktion und Reinigung der D- und der L-HicDH. (A) Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsplasmids pASK75-T7RBS-L-HicDH. Die kodierende Sequenz für die L-HicDH steht unter Kontrolle des tet-Promotor/Operators (*tet^{po}*) und ist am 3'-Ende mit einem His₆-tag fusioniert; das Strukturgen endet mit dem Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*t_{pp}*). Zusätzliche Elemente sind der *tet*-Repressor (*tetR*), der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (*ori*), die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (*f1-IG*) und das Gen der β -Lactamase (*bla*). (B) Präparative Größenausschlusschromatographie der D-HicDH und der L-HicDH an einer Superdex S200 26/60 Säule nach der IMAC-Reinigung. Das Elutionsvolumen (*) der D-HicDH entsprach dem Molekulargewicht eines Dimers (apparente Molmasse: 91 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 38 kDa), das der L-HicDH dem eines Tetramers (apparente Molmasse: 134 kDa; berechnete Molmasse pro Monomer: 34 kDa). (C) Reduzierende 15%ige SDS-PAGE zur Analyse der Produktion beider Enzyme in *E. coli* BL21. Spur 1: Zellprotein vor Induktion; Spur 2: Zellprotein inklusive D-HicDH nach 5 h Induktion bei 22 °C; Spur 3: Zellprotein vor Induktion; Spur 4: Zellprotein inkl. L-HicDH nach 5 h Induktion bei 30 °C. (D) SEC-gereinigte Proteine. Spur 1: D-HicDH; Spur 2: L-HicDH.

Tabelle 7. Kinetische Parameter der D-HicDH und der L-HicDH für die Substrate 2-Ketoisocaproat und MTOB. Die katalytische Aktivität wurde bei pH 7 und 30 °C anhand der Abnahme der Konzentration von NADH photometrisch bei 340 nm bestimmt.

	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$]	K_i [mM]
D-HicDH				
2-Ketoisocaproat	107	85,9	803	-
MTOB	708	307,5	434	-
L-HicDH				
2-Ketoisocaproat	31,2	176,7	$5,66 \times 10^3$	4,5
MTOB	206	122,9	597	5,6

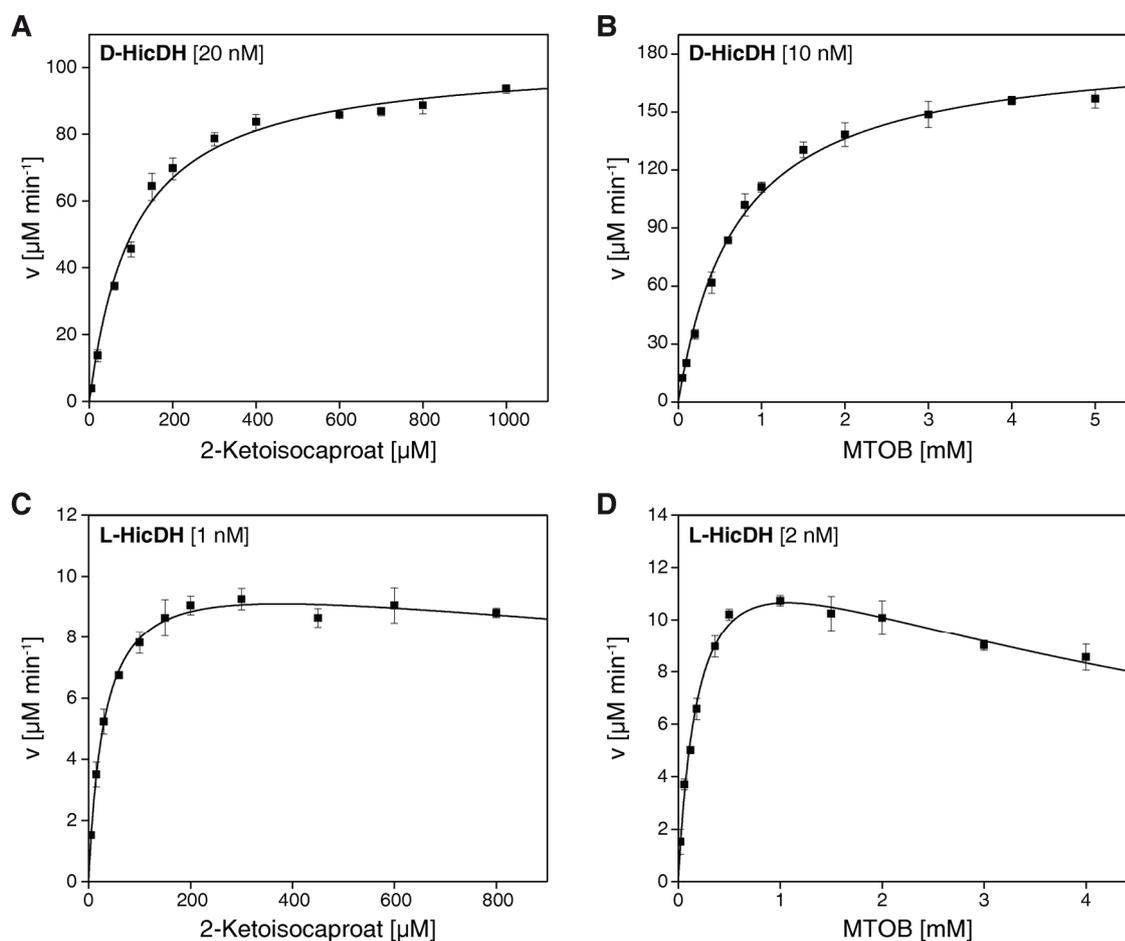


Abbildung 28. Kinetische Charakterisierung der D- und der L-HicDH. Die Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurden in 100 mM KPi pH 7 bei 30 °C photometrisch anhand der Konzentrationsabnahme des Cofaktors NADH bei 340 nm im Dreifachansatz bestimmt und mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung, sowie im Fall der L-HicDH unter Berücksichtigung unkompetitiver Substratinhibition, angepasst. Die verwendeten Enzymkonzentrationen sind jeweils oben links angegeben. Aktivität der D-HicDH gegenüber dem natürlichen Substrat 2-Ketoisocaproat (A) und gegenüber MTOB (B). Aktivität der L-HicDH gegenüber dem natürlichen Substrat 2-Ketoisocaproat (C) und gegenüber MTOB (D). Die ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 7 angegeben.

Bei beiden Enzymen war der K_M -Wert für MTOB im Vergleich zum natürlichen Substrat 2-Ketoisocaproat um den Faktor 7-8 erhöht. Allerdings war der k_{cat} -Wert der D-HicDH für MTOB im Vergleich zum natürlichen Substrat verdreifacht, wohingegen er bei der L-HicDH

fast gleich blieb. Mit $597 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ war die katalytische Effizienz der L-HicDH für MTOB schließlich nur geringfügig höher als die der D-HicDH mit $434 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Zur Synthese von D- bzw. L-MHA durch Kopplung der Hydrierung mit der Carboxylierung von Methional wurden je $2 \mu\text{M}$ D- bzw. L-HicDH mit $20 \mu\text{M}$ KdcA, 4 mM Methional und $600 \mu\text{M}$ NADH in 200 mM NaHCO_3 mit 1 mM MgCl_2 und $0,5 \text{ mM}$ TPP für 90 min unter 8 bar CO_2 (pH $\sim 6,4$) inkubiert. Nach Analyse der Reaktionskomponenten durch RP-HPLC (ähnlich wie im Fall von L-Met zuvor, vgl. Abschnitt 2.6.9) wurden unter diesen Bedingungen $233 \mu\text{M}$ D-MHA ($5,8 \%$ Ausbeute) und $222 \mu\text{M}$ L-MHA ($5,6 \%$ Ausbeute) gebildet. Die gleiche Reaktion in Anwesenheit von 140 mM Formiat, $5 \mu\text{M}$ CboFDH und $600 \mu\text{M}$ NAD^+ , wie bereits zur NADH-Regeneration bei der L-Met Synthese angewandt (siehe Abschnitt 3.2.2), führte zu einer leichten Steigerung der auf Methional bezogenen Ausbeute an D- bzw. L-MHA auf $6,3 \%$ (Abbildung 29). In Kontrollen ohne NAD^+/NADH wurde kein MHA gebildet. Durch Verlängerung der Reaktionszeit auf 8 h erhöhte sich die D-MHA Ausbeute trotz geringerer Konzentration der D-HicDH ($1 \mu\text{M}$) auf 23% (nicht gezeigt). Die Synthese von MHA durch Austausch der Aminosäuredehydrogenase mit einer Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase zur Reduktion der α -Carbonylgruppe von MTOB weist darauf hin, dass unter Einsatz entsprechender Biokatalysatoren auch Aminosäurederivate mit anderer Funktionalisierung wie z.B. einer Hydroxylierung gewonnen werden können.

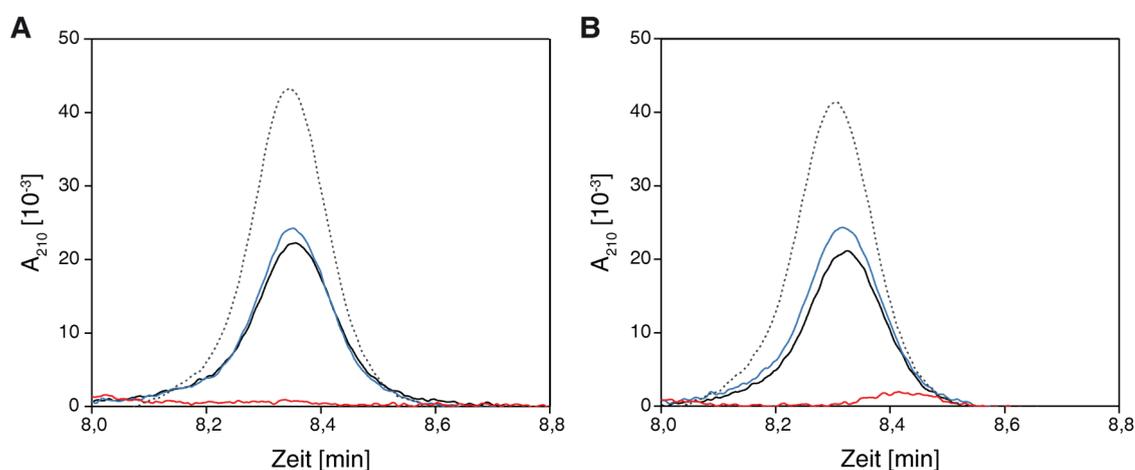


Abbildung 29. RP-HPLC Analyse der gekoppelten Reaktion der Decarboxylase KdcA mit der D- bzw. L-HicDH zur Synthese von D- bzw. L-MHA. Die verschiedenen Reaktionsansätze enthielten $20 \mu\text{M}$ KdcA, $2 \mu\text{M}$ D-HicDH (A) bzw. L-HicDH (B) und je 4 mM Methional in 200 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 und $0,5 \text{ mM}$ TPP und wurden für 90 min unter 8 bar CO_2 (pH $\sim 6,4$) inkubiert. In Anwesenheit von entweder $600 \mu\text{M}$ NADH (schwarze Linie) oder $600 \mu\text{M}$ NAD^+ zusammen mit $5 \mu\text{M}$ CboFDH(C23A/F285S) und $140 \mu\text{M}$ Formiat zur NADH Regeneration (blaue Linie), wurde D- bzw. L-MHA gebildet. Ohne NADH (rote Linie) konnte keine Bildung von MHA nachgewiesen werden. Als Referenz wurden $500 \mu\text{M}$ D/L-MHA verwendet (gestrichelte Linie). Aufgrund geringer Laufunterschiede wurden die Chromatogramme manuell auf den MHA-Peak justiert.

4. Diskussion

4.1 Biokatalytische CO₂-Fixierung entgegen des chemischen Gleichgewichts

Die erfolgreiche biokatalytische Synthese von L-Met durch Carboxylierung des Aldehyd-Substrats Methional schon unter 2 bar CO₂ zeigte, dass Decarboxylierungen in biologischen Stoffwechselwegen allein aufgrund des Ausgasens des Reaktionsprodukts CO₂ unter dem geringen atmosphärischen CO₂-Partialdruck als unumkehrbar erscheinen. In Anwesenheit eines geeigneten Katalysators wie der promiscuen KdcA aus *L. lactis* (Smit *et al.*, 2005) mit ihrem verhältnismäßig niedrigen K_M-Wert für CO₂ (3,3 bar) konnte hier sogar auf den zuvor in der Literatur empfohlenen, – jedoch in diesem Zusammenhang nie erprobten – Einsatz von superkritischem CO₂ für die biokatalytische Carboxylierung verzichtet werden (Miyazaki *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2008).

Die Bestimmung des chemischen Gleichgewichts mit Hilfe der Haldane Beziehung, welche die thermodynamische Gleichgewichtskonstante in Bezug zu den kinetischen Parametern der Hin- und Rückreaktion eines Enzyms mit bekanntem Reaktionsmechanismus setzt (Haldane, 1930), ergab für die Carboxylierung von Methional eine Gleichgewichtskonstante von $K_{eq} = 1/554 \text{ M}^{-1} = 1/16,5 \text{ kbar}^{-1}$ (pH 7,1). Trotz der wie erwartet starken Favorisierung der Decarboxylierung von MTOB (Glueck *et al.*, 2010) war die Carboxylierung des aliphatischen Aldehyd-Substrats Methional energetisch nicht weniger ungünstig als zum Beispiel die industriell durchgeführte Oxidation eines aliphatischen Alkohols mit NAD⁺ (Lerchner *et al.*, 2013). Geeignete Maßnahmen zur Verschiebung des Gleichgewichts nach dem Prinzip von Le Chatelier, wie das Anlegen einer reinen CO₂-Atmosphäre mit erhöhtem Druck (2-8 bar) und die Kopplung der Carboxylierung mit der anschließenden Aminierung zu L-Met als energetisch günstiger Folgereaktion, erlaubten die Umkehrung der thermodynamisch begünstigten und unter physiologischen Bedingungen als irreversibel geltenden Decarboxylierung (Hazelwood *et al.*, 2008).

Während die Carboxylierungsreaktion selbst primär durch Erhöhung der Substratkonzentration von Methional und CO₂ getrieben werden kann, lässt sich die gekoppelte Gesamtreaktion zudem über die Steigerung der Ammoniak- und NADH-Konzentration begünstigen. Außerdem könnte bei zunehmendem Umsatz das Gleichgewicht weiter verlagert bzw. aufrechterhalten werden, indem NADH durch Recycling des Cofaktors regeneriert (siehe Abschnitt 4.4) oder L-Met durch Extraktion der Reaktionsmischung entzogen wird. Die aus chemischer Sicht zunächst plausibel erscheinende starke Erhöhung des CO₂-Drucks ist angesichts des hier ermittelten Gleichgewichtsdrucks von 16,5 kbar völlig unrealistisch, da unter solchen Bedingungen CO₂ als Feststoff (Trockeneis) vorläge, dessen Dichte (1,56 g/cm³; 35,4 M) noch um mehr als eine Zehnerpotenz unter der erforderlichen Konzentration liegen würde.

Die erste biotechnologische Anwendung einer Carboxylase zur regioselektiven Synthese von p-Hydroxybenzoesäure aus Phenyl-Phosphat wurde 1998 als Alternative zur unselektiven Kolbe-Schmitt Reaktion mit Hilfe einer Phenyl-Phosphat-Carboxylase aus *Thauera aromatica* unter 1 bar CO₂ beschrieben (Aresta *et al.*, 1998). Kurz darauf wurde die Carboxylierung von Pyrrol mit Hilfe einer Pyrrol-2-Carboxylat Decarboxylase aus *Bacillus megaterium* in einer hochkonzentrierten KHCO₃-Lösung (bis zu 3 M) und später auch unter Verwendung von superkritischem CO₂ gezeigt (Wieser *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2001). Im Unterschied zu Methional handelte es sich in beiden Fällen um aromatische, d. h. elektronenreiche Verbindungen, was eine Carboxylierung erleichtert (Glueck *et al.*, 2010). Literaturbeispiele für die Carboxylierung von aliphatischen Substraten gibt es dagegen nur wenige. Eines davon ist die Umsetzung von Acetaldehyd mit CO₂ zu Pyruvat mit Hilfe einer Pyruvatcarboxylase aus *S. cerevisiae* in einer hochkonzentrierten Bicarbonatlösung (0,5 M) bei pH 11 (Miyazaki *et al.*, 2001). Die Anwendung derselben Reaktion wurde unter ähnlichen Bedingungen auch von Tong *et al.* (2011) beschrieben, um in einem dreistufigen Prozess Lactat zu gewinnen. Dazu wurde Ethanol von einer vorgeschalteten Alkohol-Dehydrogenase oxidiert, das Reaktionsprodukt Acetaldehyd von der Pyruvatcarboxylase carboxyliert und abschließend Pyruvat von einer nachgeschalteten Lactat-Dehydrogenase reduziert.

Durch den Entzug des Carboxylierungsprodukts aus dem Fließgleichgewicht ähnelt dieser Prozess der in dieser Arbeit verfolgten Herangehensweise. Allerdings führt ein wie in diesen Studien verwendeter basischer pH zum einen zur Abnahme der Konzentration an gelöstem CO₂, also der vermuteten reaktiven elektrophilen Spezies (siehe Supplement Martin *et al.*, 2018); zum anderen neigen Aldehyde und α -Ketosäuren wie Methional und MTOB im Basischen allgemein stark zu Additions- und Kondensationsreaktionen, was in dem hier beschriebenen Projekt zu chromatographisch nachweisbaren Abbauprodukten schon ab einem pH > 9,5 geführt hat (nicht gezeigt). Von daher sind die von Miyazaki *et al.* (2001) und Tong *et al.* (2011) publizierten Reaktionsbedingungen mit erheblichen Zweifeln behaftet, und deren Befunde konnten von dritter Seite tatsächlich bislang nicht reproduziert werden. Neben der besseren Stabilität der Substrate/Produkte im leicht sauren/neutralen Milieu (pH 6-7) entsprechen die in dieser Arbeit gewählten milden Reaktionsbedingungen auch dem pH-Optimum vieler Decarboxylasen des Ehrlich Pathways, wie insbesondere der KdcA aus *L. lactis* und der Pyruvatdecarboxylase aus Hefe (Gocke *et al.*, 2009).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die enzymatisch katalysierte Carboxylierung aliphatischer Substrate wie Methional mit anfänglichen Ausbeuten von 3-8 % schon unter 2 bar CO₂ gezeigt werden. Hierfür wurde die Decarboxylase KdcA aus *L. lactis* (Smit *et al.*, 2005) in Kombination mit der Transaminase YbdL aus *E. coli* (Dolzan *et al.*, 2004) bzw. der Aminosäuredehydrogenase LeuDh aus *L. sphaericus* (Li *et al.*, 2009) eingesetzt, um das Produkt aus der ersten Reaktionsstufe nach dem Prinzip von Le Chatelier zu entziehen.

4.2 Steigerung der L-Methionin-Ausbeute

4.2.1 Optimierung der Aminierung

Aufgrund des ungünstigen chemischen Gleichgewichts für die Carboxylierung ist die treibende Folgereaktion nach dem Prinzip von Le Chatelier für die Ausbeute der Gesamtreaktion essenziell. Je effizienter das Produkt der ersten Reaktion durch das zweite Enzym dem (Fließ-) Gleichgewicht entzogen wird, desto besser verläuft die Gesamtreaktion (Lerchner *et al.*, 2013). Unter nicht sättigender Substratkonzentration ($[S] \ll K_M$), die aufgrund des ungünstigen Carboxylierungsgleichgewichts gegeben ist, hängt die Umsatzgeschwindigkeit gerade für die Folgereaktion von der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) des Biokatalysators ab (Berg *et al.*, 2002).

Unter Einsatz der für Methionin spezifischen Transaminase YbdL aus *E. coli* gelang es, durch Steigerung der Enzymkonzentrationen der KdcA und YbdL sowie durch Verlängerung der Reaktionszeit die anfängliche L-Met Ausbeute von 3 % auf 40 % nach 48 h unter 2 bar CO₂ zu erhöhen. Die Verwendung eines moderaten Drucks von 2 bar (gegenüber 8 bar) wirkte sich dabei positiv aus, da die YbdL mit zunehmendem Druck schneller aggregierte. Trotz der unter geeigneten Bedingungen erfolgreichen enantioselektiven Synthese von L-Met machte der äquimolare Verbrauch der Donoraminosäure L-Gln den Einsatz dieser Transaminase in größerem Maßstab unattraktiv.

Alternativ wurden daher die Aminosäuredehydrogenasen LeuDh aus *L. sphaericus* und PheDH aus *T. intermedius*, die nur leicht regenerierbares NADH als Cofaktor benötigen, miteinander verglichen. Beide eigneten sich in Kombination mit der Decarboxylase KdcA zur Synthese von L-Met, unterschieden sich aber bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität gegenüber MTOB. Während die PheDH bei einem K_M -Wert von 0,637 mM eine katalytische Effizienz von 34,1 mM⁻¹ s⁻¹ aufwies, betrug die katalytische Effizienz der LeuDh, vor allem aufgrund des um den Faktor 17 höheren K_M -Werts (10,8 mM), nur 4,65 mM⁻¹ s⁻¹. Erwartungsgemäß äußerte sich der Vorteil der höheren katalytischen Effizienz nach einer kurzen Reaktionszeit von 1 h in einer ca. doppelt so hohen Ausbeute mit der PheDH. Allerdings überwog nach 20 h die Ausbeute mit der LeuDh (~8 %) die mit der PheDH (~6 %), da letztere mit zunehmender Reaktionszeit aggregierte.

Um eine höhere Ausbeute als zuvor mit der YbdL zu erreichen, sollte eine der Aminosäuredehydrogenasen durch Enzym-Engineering optimiert werden. Da für eine homologe LeuDh aus *Bacillus stearothermophilus* mit 78 % Sequenzidentität zu dem hier verwendeten Enzym bereits ein Aminosäureaustausch (A113G) im aktiven Zentrum zu einer deutlich erhöhten spezifischen Aktivität mit MTOB geführt hatte (Kataoka & Tanizawa, 2003), wurde die Verbesserung der Substratspezifität der stabileren LeuDh der Stabilitätsoptimierung der PheDH vorgezogen.

Schon der durch rationale Mutagenese eingebrachte Austausch A113G erhöhte die katalytische Effizienz der LeuDH aus *L. sphaericus* durch 3,6-fache Erniedrigung des K_M -Werts und Vervierfachung des k_{cat} um insgesamt den Faktor 14. Dies könnte, ähnlich wie von Britton *et al.* (1993) vermutet, auf die fehlende Seitenkette des Glycin und die dadurch wegfallende sterische Hinderung größerer Substrate durch die Methylgruppe von Alanin zurückzuführen sein. Neben der besseren Zugänglichkeit des aktiven Zentrums muss es aufgrund des erhöhten k_{cat} -Werts aber auch zu einer besseren Stabilisierung des Übergangszustands und dadurch zu einer Herabsetzung der Aktivierungsenergie oder einer schnelleren Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes kommen.

Dagegen beeinflusste die Substitution L40I im aktiven Zentrum, die das Ergebnis der Sättigungsmutagenese von Position 40 zur Verbesserung der enzymatischen Aktivität gegenüber MTOB darstellt, k_{cat} und k_{cat}/K_M bei einer leichten Verbesserung von K_M kaum. Die Synergie der beiden Substitutionen L40I und A113G bewirkte allerdings eine weitere Senkung des K_M -Werts auf 0,897 mM. Dadurch nahm die katalytische Effizienz gegenüber dem Wildtyp-Enzym um den Faktor 16 und gegenüber der PheDH sogar um den Faktor 2 zu. Die weitere Verbesserung des K_M -Werts deutet auf die beabsichtigte zusätzliche Vergrößerung der Substratbindetasche hin. Gleichzeitig führte die Kombination beider Substitutionen aber auch zur Abnahme von k_{cat} gegenüber der Variante LeuDH(A113G) um fast den Faktor 3. Vermutlich war es aufgrund der Doppelmutation zu kleineren konformationellen Änderungen im aktiven Zentrum gekommen, die die Senkung der Aktivierungsenergie durch die Mutation A113G allein teilweise zunichtemachten.

Der Einsatz der beiden besten Varianten LeuDH(A113G) und LeuDH(L40I/A113G), in der zweistufigen Reaktion zur Methioninsynthese aus Methional mit der KdcA führte im Fall der Variante A113G nach 16 h unter 2 bar CO₂ trotz des mit Abstand höchsten k_{cat} zu einer L-Met Ausbeute von nur 20 %. Dagegen wurde mit der Doppelmutante, die den niedrigsten K_M -Wert und die höchste katalytische Effizienz aufwies, eine Ausbeute von 28 % erreicht. Durch die 16-fach höhere katalytische Effizienz war die Doppelmutante der LeuDH also besser geeignet, das vermutlich gering konzentrierte Produkt MTOB der thermodynamisch ungünstigen ersten Reaktion zu entziehen.

Eine ähnliche Herangehensweise führte auch bei der enzymatischen Carboxylierung von Phenolen mit einer 2,6-Dihydroxybenzoesäure-Decarboxylase aus *Rhizobium* sp. zur Steigerung der Ausbeute (Ren *et al.*, 2016). Durch Zugabe von quartären Ammoniumsalzen wurde das Carboxylierungsprodukt präzipitiert und damit, allerdings auf andere Weise, ebenfalls dem Gleichgewicht entzogen.

Abschließend wurde die beste Enzym-Variante, LeuDH(L40I/A113G), zusammen mit der KdcA bei erhöhten Enzymkonzentrationen (20 bzw. 30 μ M) über 24 h zur Synthese von L-Met eingesetzt. Die damit erreichte Ausbeute von 45 % lag sogar über dem Wert von 40 %, der

zuvor bei gleichen Enzymkonzentrationen und doppelter Reaktionszeit (48 h) mit der Transaminase YbdL erreicht worden war. Mit einer weiteren Verdopplung der KdcA-Konzentration konnte die Ausbeute bei gleichbleibender Reaktionszeit jedoch nicht weiter erhöht werden. Eine Halbierung der NADH-Konzentration von 4 auf 2 mM führte dagegen zu einer leicht verminderten Ausbeute von 40 %. Dies könnte auf die Annäherung des Gleichgewichts für die Gesamtreaktion unter den gegebenen Eduktkonzentrationen hinweisen. Hierbei könnte vor allem die eingesetzte NADH-Konzentration von 4 mM bei zunehmendem Reaktionsfortschritt limitierend wirken. Eine weitere Erhöhung der NADH-Konzentration war aufgrund der Überlappung der Peaks für NAD^+ und L-Met bei mehr als 4 mM NADH mit der in dieser Arbeit etablierten HPLC-Analytik nicht möglich. Noch effizienter könnte die Ausbeute an L-Met aber auch durch den Entzug des entstehenden NAD^+ durch Recycling des Cofaktors (siehe Abschnitt 4.4) erhöht werden.

Insgesamt bewies die durch Engineering der Substratspezifität der LeuDh erreichte Ausbeute von 45 % innerhalb von 24 h, dass ein Enzym mit einem möglichst kleinen K_M -Wert, und einer damit verbundenen hohen katalytischen Effizienz unter Substratlimitation, besser für die Katalyse der Aminierung des Carboxylierungsprodukts in der gekoppelten Reaktion geeignet ist. Daher kann als zweites Enzym entweder die L-Gln abhängige YbdL oder, idealerweise, die NADH-abhängige LeuDh(L40I/A113G) verwendet werden.

4.2.2 Optimierung der Carboxylierung

Nachdem durch Optimierung der Folgereaktion die Ausbeute der Gesamtreaktion erhöht werden konnte, wurde eine Verbesserung der Carboxylierungsreaktion einerseits durch Stabilisierung der KdcA und andererseits durch deren Aktivitätserhöhung gegenüber Methional angestrebt.

Da die KdcA eine stärkere Aggregationstendenz als die LeuDh aufwies, nahm ihre aktive Konzentration im Verlauf der Reaktion ab. Um die KdcA bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität als lösliches Protein zu stabilisieren, wurden nicht konservierte Reste in der Primärstruktur an der Proteinoberfläche mit Hilfe eines Multiplen Alignments homologer Sequenzen gegen die an dieser Position am häufigsten auftretenden Aminosäuren ausgetauscht (Steipe *et al.*, 1994; Davidson, 2006). Tatsächlich beeinflussten die Substitutionen Y144E, I264E bzw. T486V die Michaelis/Menten-Parameter im Vergleich zum Wildtyp-Enzym nicht (Buschinger, 2018). Dennoch zeigte die Variante KdcA(Y144E) mit Einführung einer negativen Ladung am N-Terminus einer oberflächenexponierten α -Helix (# 7) zwecks Abschwächung ihres Makrodipolmoments eine verringerte Halbwertszeit als lösliches Protein. Ebenso führte die Substitution T486V, mit der die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten im Homodimer durch die hydrophobe Seitenkette an der Grenzfläche der beiden Monomere verstärkt werden sollte, zu einer verringerten Halbwertszeit. Dagegen verlängerte

der Austausch I264E die Halbwertszeit des Enzyms im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 6. Vermutlich wirkte sich die Eliminierung einer hydrophoben Ladung an der Proteinoberfläche bei gleichzeitiger elektrostatischer Kompensation des Makrodipolmoments einer α -Helix (# 11) stabilisierend aus. Obwohl von den hier untersuchten Aminosäuresubstitutionen also nur eine von drei zur Stabilisierung der KdcA beitrug, könnten durch Austausch anderer nicht konservierter Reste, die in dem multiplen Alignment offenbar wurden, weitere Stabilisationseffekte erzielt werden.

Trotz der verlängerten Halbwertszeit der Variante KdcA(I264E) als isoliertes lösliches Protein, konnte die L-Met Ausbeute bei Einsatz dieser stabilitätsoptimierten Variante zusammen mit der LeuDH (16 h, 2 bar CO₂, RT) kaum erhöht werden. Die Analyse der löslichen Proteinüberstände nach der Reaktion mittels SDS-PAGE wies im Reaktionsansatz auf ein vergleichbares Aggregationsverhalten der KdcA(I264E) mit dem Wildtyp-Enzym hin. Ein weiteres im Rahmen dieser Arbeit durchgeführtes Experiment (siehe Abschnitt 3.4.1) zur Ermittlung des potentiell denaturierenden Einflusses von CO₂ (Kamat *et al.*, 1995) oder von Methional (Sprung, 1940), die bei der Bestimmung der Halbwertszeiten nicht berücksichtigt wurden, lieferte keine Erklärung für das unter Bedingungen der Biokatalyse unveränderte Aggregationsverhalten. Allerdings könnte die im Versuch gewählte Inkubationszeit der KdcA unter CO₂ bzw. Methional (max. 4 h) zu kurz gewesen sein, um den Effekt beispielsweise einer geänderten Ladungsverteilung an der Proteinoberfläche durch Reaktion von CO₂ (als Carbaminsäure) bzw. Methional (als Schiff-Base) mit oberflächenexponierten Lysinseitenketten auf die Aggregation zu beobachten. Da sich derartige multiple Modifikationen an der Proteinoberfläche vermutlich stärker auswirken als eine einzelne stabilisierende Mutation, könnte dies das unveränderte Aggregationsverhalten der stabilisierten KdcA(I264E) erklären. Zur Vermeidung der genannten chemischen Modifikationen könnten oberflächenexponierte Lysinreste durch diesbezüglich relativ inerte, ebenfalls basische Argininreste substituiert werden (Meigh, 2015).

Da die Enzymstabilität bei der hier verwendeten begrenzten Reaktionszeit und ausreichend schneller Katalyse für die Ausbeute vernachlässigbar wird, wurde in dieser Arbeit auf weitere Anstrengungen zur Optimierung der Proteinstabilität verzichtet. Stattdessen wurde die Beschleunigung des Umsatzes durch Verbesserung der Substratspezifität der KdcA gegenüber Methional bzw. MTOB verfolgt.

Basierend auf dem Nachweis von Smit *et al.* (2005), dass die KdcA von den unverzweigten aliphatischen α -Ketosäuren 2-Oxohexansäure, von der sich MTOB nur durch ein etwas größeres Schwefelatom an Position C₅ unterscheidet, als Substrat bevorzugt, sollte die Substratbindetasche durch die anhand der Kristallstruktur geplanten Austausche F382L, I465V bzw. F542L vergrößert werden. Im Unterschied zu den ersten beiden Substitutionen beruhte der Austausch an Position 542 auch auf der Beobachtung, dass in der KdcA der Zugang zum

aktiven Zentrum durch ein Phenylalanin geregelt wird, während der Eingang in der verwandten Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* (41 % Sequenzidentität), die eher größere Substrate akzeptiert, durch einen Leucinrest an entsprechender Position leichter zugänglich ist (Berthold *et al.*, 2007).

Die Aktivitätsanalyse ergab, dass zwar alle Enzymmutanten der klassischen Michaelis/Menten-Kinetik folgten, aber jeweils der k_{cat} -Wert abgenommen hatte. Die Substitutionen mussten also zu Strukturänderungen in der Bindetasche geführt haben, die eine schlechtere Stabilisierung des Übergangszustands während der Katalyse nach sich zogen. Während die Substitution I465V den K_M -Wert im Vergleich zum Wildtyp leicht reduzierte, möglicherweise durch die Vergrößerung der Substratbindetasche, bewirkte der Austausch F382L mehr als eine Verdreifachung des K_M -Werts. Hier musste sich also auch die Substratbindung verschlechtert haben. Die Variante KdcA(F542L) zeigte bei dem geringsten Effekt auf k_{cat} nur einen minimal erhöhten K_M -Wert und stellt daher einen potentiellen Ausgangspunkt für weitere Mutagenesen dar.

In diesem Zusammenhang ist relevant, dass durch Einbringen größerer Reste an den Positionen V461, F381 und M538 der k_{cat} -Wert der KdcA für Pyruvat erhöht wurde (Yep *et al.*, 2006). Entsprechend könnte zukünftig an Position 461 Valin gegen Alanin, an Position 381 Phenylalanin gegen Leucin und an Position 538 Methionin gegen Leucin ausgetauscht werden (siehe Abschnitt 3.4.2, Abbildung 24). Damit oder mit Mutationen in der zweiten Schale bleibt Raum für eine Beschleunigung der Carboxylierungsreaktion und der Gesamtausbeute pro Zeit.

4.3 Potential der dargestellten Reaktion zur Synthese von L-Met

Ein wichtiges Kriterium zur Bewertung des Potentials der hier im 1 ml Maßstab gezeigten biokatalytischen Umsetzung von Methional zu L-Met für die industrielle Synthese ist die prozentuale Ausbeute bezogen auf die Stoffmenge des eingesetzten Substrats. Bei Betrachtung des hier erzielten maximalen Umsatzes von 45 % wäre die Ausbeute nach *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* eher schlecht bzw. knapp an der Grenze zu befriedigend (> 50 %, Vogel *et al.*, 1996). Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit die anfängliche Ausbeute von 3 % durch Änderung der Reaktionsbedingungen und Optimierung der Enzymkatalysatoren auf 45 % gesteigert werden. Da zum einen die Carboxylierungsreaktion noch Optimierungspotential aufweist und zum anderen eine Verbesserung der Folgereaktion unter Verwendung der LeuDH(L40I/A113G) durch Erhöhung der Enzym-, und Cofaktorkonzentrationen möglich sein sollte, ist eine weitere Erhöhung der Ausbeute vorstellbar.

Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass unter dem Aspekt der Entwicklung eines nachhaltigen chemischen Prozesses die Atomeffizienz neben der prozentualen Ausbeute eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt (Sheldon & Woodley, 2018; Trost, 1991). Letztere ist

ein theoretischer Wert, der es erlaubt, durch Bildung des Quotienten aus der Molmasse des Produkts und der Summe der Molmassen der Edukte abzuschätzen, wie effizient die Atome der Edukte in die Bildung des Produkts eingehen. Obwohl dieser Wert von einem Reaktionsumsatz von 100 % ausgeht, was in der Realität meist nicht erreicht wird, eignet er sich gerade zu Beginn der Etablierung eines Prozesses zur Einschätzung der Abfallproduktion und Ressourcenverwendung (Sheldon & Woodley, 2018). Bei der hier dargestellten Reaktion beträgt die maximale Atomeffizienz unter Annahme einer effizienten Regenerierung von NADH 89 %, wobei die überschüssigen Atome im unschädlichen Nebenprodukt Wasser enden.

Neben der Vermeidung unerwünschter Nebenprodukte verbraucht die gezeigte Synthese sogar das klimaschädliche Treibhausgas CO₂, sodass theoretisch pro gebildeter Tonne L-Met 295 kg CO₂ fixiert würden. Obwohl damit selbst bei der fiktiven Herstellung des gesamten Marktvolumens (1 Mio. Tonnen/Jahr) die fixierte Menge an CO₂ (~295 kt) gegenüber dem jährlichen CO₂ Ausstoß durch Verbrennung fossiler Brennstoffe (weltweit > 34 gt) verschwindend gering wäre (~0,001 %), wäre im Gegensatz zur chemischen Synthese von D/L-Met zumindest eine günstigere CO₂-Bilanz gegeben (Willke, 2014; Le Quéré *et al.*, 2018). Darüber hinaus könnten die hohen Sicherheitsmaßnahmen, die der Einsatz hochtoxischer Blausäure zur Synthese des Hydantoin-Derivats in der Bucherer-Bergs-Reaktion (siehe Abschnitt 1.2, Abbildung 1) verlangt, reduziert werden (National-Research-Council, 2002; Breuer *et al.*, 2004).

Aufgrund der im Vergleich zur chemischen Synthese geringen Ausbeuten, die mit der hier untersuchten enzymatischen Reaktion erreicht wurden, ist es kurz- bis mittelfristig schwierig, mit der gut etablierten chemischen Synthese von D/L-Met für den Markt der Futtermittel zu konkurrieren. Allerdings eröffnet die spezifische Synthese von L-Met ohne umständliche Racematspaltung die lukrative Möglichkeit, das reine Enantiomer für die Pharma- und Lebensmittelbranche anzubieten. In diesen Branchen kann im Vergleich zu D/L-Met auf dem Markt für Futtermittel der 5 bis 60-fache Preis pro kg L-Met erzielt werden (Willke, 2014). Daher könnte die hier gezeigte enzymatische Reaktion vor allem eine risikoärmere und klimaneutralere Alternative für die Gewinnung von L-Met gegenüber der Racematspaltung von D/L-Met darstellen (Drauz *et al.*, 2007).

Für die industrielle Anwendung der dargestellten Reaktion in einem biokatalytischen Prozess ist außerdem die Auswahl eines geeigneten Formats von großer Relevanz. Obwohl die Ganzzellbiokatalyse – unabhängig vom Zeitpunkt der Katalyse (während oder nach der Fermentation) – meist die kostengünstigste Variante ist, unterliegt sie gerade bei unnatürlichen Substraten aufgrund fehlender zellulärer Transportmechanismen oft einer Diffusionslimitierung für die Substrate und/oder Produkte (Woodley, 2015). Für die hier betrachtete Synthese von L-Met in Ganzzellbiokatalysatoren müsste eine Lösung für den Transport des reaktiven Aldehyds Methional in die Bakterienzelle gefunden werden. Alternativ könnten die

benötigten Enzyme isoliert verwendet werden (Sheldon & Woodley, 2018). Dazu müssten sie während der Fermentation sekretiert, oder nach der Fermentation durch Zellyse und Abtrennung der Zellsedimente gewonnen werden. Vorausgesetzt es wird ein proteasefreier Stamm verwendet, kann auf die anschließende Reinigung der Enzyme aus dem löslichen Lysat verzichtet werden. Dies hat den Vorteil, weitere Kosten zu vermeiden, und könnte zudem durch die Anwesenheit weiterer Zellproteine zur Stabilisierung der Zielproteine beitragen (Bommarius & Paye, 2013). Generell empfiehlt sich zur Kostendeckung für die Herstellung eines Biokatalysators dessen mehrmalige Verwendung durch Rückgewinnung aus dem Reaktionsansatz nach Reaktionsende. Dies kann durch Ultrafiltration oder effizienter durch Immobilisierung an einer Matrix und einfache Filtration erreicht werden (Woodley, 2015).

4.4 Betrachtung zur ökonomischen Regenerierung des Cofaktors

In der vorliegenden Arbeit wurde die FDH-Mutante C23A/F285S aus *C. boidinii* zur Regenerierung von NADH, das bei der Reduktion von MTOB zu L-Met bzw. D/L-MHA durch die verwendeten Dehydrogenasen verbraucht wird, ausgewählt, da Formiat einen günstigen Hydrid-Donor darstellt (Wichmann *et al.*, 1981). Zudem erschien die Freisetzung des dabei entstehenden CO₂ den geplanten Prozess gut zu komplementieren. Anders als üblich würde der Einsatz der FDH neben dem Vorteil einer leichten Produktisolierung aufgrund des ausgasenden Nebenprodukts (Wang *et al.*, 2017) gleichzeitig das Substrat für die Carboxylierung liefern. Die erfolgreiche Synthese von L-Met bzw. D/L-MHA in Anwesenheit der CboFDH(C23A/F285S) bei Vorlage des oxidierten Cofaktors NAD⁺ anstelle von NADH unter 8 bar CO₂ zeigte, dass die FDH bei einem Formiatüberschuss (140 mM, K_M = 14,3 mM) selbst unter einer CO₂-Atmosphäre als Regenerationssystem verwendet werden kann. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da die für die Carboxylierung erhöhte CO₂-Konzentration dazu führen könnte, dass das Ausgasen von CO₂ nicht länger als Triebkraft für die NADH-Regenerierung (Faber, 2018) fungiert, sodass die FDH auch die Reduktion von CO₂ zu Formiat unter NADH-Verbrauch katalysiert.

Da bei der Synthese von Phenylalanin mit Hilfe einer PheDH in Verbindung mit der CboFDH zum Zweck der NADH-Regenerierung bereits 1987 eine maximale Zykluszahl (*Total Turnover Number* = $n(\text{Produkt})/n(\text{Cofaktor})$) von 600.000 erzielt wurde (Hummel *et al.*, 1987), wobei ein Prozess mit mehr als 1000 Zyklen als ökonomisch gilt (Hollmann *et al.*, 2011), sollte ein wirtschaftlicher Einsatz der optimierten CboFDH(C23A/F285S) zur Synthese von L-Met ebenfalls möglich sein. Im Sinne der Rückführung des Treibhausgases CO₂ in die Wertschöpfungskette wäre jedoch die Verwendung eines Regenerationssystems ohne die Bildung von CO₂ als Nebenprodukt attraktiver. Eine klimafreundliche Alternative stellen durch H₂ getriebene NAD⁺-Hydrogenasen dar (Klibanov & Puglisi, 1980). Bei der Verwendung von H₂-Gas als leicht verfügbares und preiswertes Reduktionsmittel wird ein Hydrid-Ion auf NAD⁺

übertragen, während das zweite Wasserstoffatom als Proton in Lösung geht. In der gekoppelten Reaktion mit einer Oxidoreduktase wird letzteres im Prinzip zusammen mit dem in NADH gebundenen Hydrid-Ion von dem zu reduzierenden Substrat aufgenommen. Da alle für die Reduktion benötigten Wasserstoffatome und Elektronen aus H_2 stammen, kann eine Atomeffizienz von 100 % erzielt werden (Lauterbach *et al.*, 2013). Im Falle der hier vorliegenden reduktiven Aminierung von MTOB durch die LeuDh sind aufgrund der Freisetzung von H_2O maximal 89 % bei der Synthese von L-Met möglich (Abbildung 30).

Wegen ihrer höheren Toleranz gegenüber O_2 eignen sich [NiFe]-Hydrogenasen für solche Zwecke besser als die ebenfalls verfügbaren [FeFe]-Hydrogenasen (Fontecilla-Camps *et al.*, 2007). Ein vielversprechender Vertreter dieser Gruppe ist die lösliche NAD^+ -Hydrogenase aus dem Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* H16 (Burgdorf *et al.*, 2005). Obwohl sie die höchste Aktivität bei pH 8 und 30 °C in Abwesenheit von Na^+ zeigte (Schneider & Schlegel, 1976), wurde sie auch schon bei pH 7 und 30 °C unter 0,4 bar H_2 erfolgreich in Kombination mit einer Lactat-Dehydrogenase zur Synthese von Lactat aus Pyruvat eingesetzt (Nakada *et al.*, 1992). Da die hier optimierte biokatalytische Synthese von L-Met unter pH 6,4 bis 7 in 500 mM NH_4HCO_3 ablief, wäre eine NADH-Regeneration in situ mit Hilfe der löslichen NAD^+ -Hydrogenase aus *R. eutropha* H16 denkbar. Mögliche Probleme, wie eine limitierte Stabilität ($t_{1/2} \approx 5$ h), die momentan noch ein Hindernis für ihre biotechnologische Anwendung darstellt (Reeve *et al.*, 2017), könnten durch eine geeignete Immobilisierungsstrategie (Danielsson *et al.*, 1982) oder Enzyme Engineering überwunden werden. Wie weiter oben dargestellt, wäre ja auch für die KdcA noch eine Stabilitätsoptimierung erforderlich. Problematisch für den Einsatz des produzierten L-Met in Futtermitteln oder zu medizinischen Zwecken könnten sich allerdings Kontaminationen mit Nickel erweisen.

Substrate	Produkt	Nebenprodukt(e)	Atomeffizienz
MTOB + NH_3 + HCOOH $\xrightarrow[\text{FDH}]{\text{LeuDh}}$	L-Met + H_2O +	CO ₂	71 %
MTOB + NH_3 + H_2 $\xrightarrow[\text{Hydrogenase}]{\text{LeuDh}}$	L-Met + H_2O		89 %

Abbildung 30. Vergleich der Folgereaktion nach Carboxylierung von Methional anhand der Strategie zur NADH-Regenerierung. Die reduktive Aminierung von MTOB zu L-Met verlangt neben Ammoniak $NADH$ als Cofaktor. Zur Regenerierung von NAD^+ muss ein Hydrid-Ion auf $NADH$ übertragen werden. Dient Formiat als Hydrid-Donor und eine FDH als Katalysator, entsteht dabei CO_2 . Das zweite H-Atom aus Formiat wird als Proton zusammen mit dem Hydrid-Ion aus $NADH$ für die reduktive Aminierung (unter Freisetzung von H_2O) verwendet. Ähnlich verhält es sich mit H_2 -Gas als Hydrid-Donor unter Katalyse durch eine Hydrogenase. Allerdings entstehen dabei keine weiteren Nebenprodukte, wodurch eine maximale Atomeffizienz der hier gezeigten Reaktion von 89 % erreicht wird. Da $NADH$ und NAD^+ als katalytische Cofaktoren regeneriert werden, sind sie hier nicht explizit mit dargestellt.

4.5 Transfer der gezeigten Reaktion auf die Synthese weiterer Aminosäuren bzw. Derivate

Die hier demonstrierte katalytische Biosynthese von L-Leu, L-Ile wie auch D/L-MHA zeigt, dass sich die zweistufige Reaktion, ursprünglich zur Synthese von L-Met entwickelt, durch einfache Abwandlung auf andere Substrate bzw. Produkte übertragen lässt. Zum einen konnte mit den gleichen Enzymen, die zur Synthese von L-Met eingesetzt wurden, aufgrund ihrer natürlicherweise hohen Substratpräferenzen für 3- bzw. 2-Methylbutanal (Smit *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009) durch einfachen Einsatz dieser Substrate auch L-Leu und L-Ile gewonnen werden. Zum anderen gelang es unter Verwendung des Substrats Methional unter Einsatz der D- bzw. L-HicDH als Zweitenzym D- oder L-MHA, also Produkte mit Alkohol-Funktionalisierung, stereospezifisch zu erzeugen. In jedem Fall war es essenziell, das primäre Reaktionsprodukt der Carboxylierung durch eine energetisch günstige Folgereaktion aus dem ungünstigen vorgelagerten Gleichgewicht zu entziehen. Je besser die substratspezifische katalytische Effizienz, vor allem die des zweiten Enzyms, desto höher war die Ausbeute. Beispielhaft hierfür steht die fast zweifache Ausbeute von L-Leu und L-Ile im Vergleich zu L-Met.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es denkbar, CO₂ in weiteren Aminosäuren des Ehrlich Pathways oder in damit verwandten Derivaten zu fixieren (Tabelle 8). Zum Beispiel könnte 2-Methylpropanal unter Einsatz der KdcA und einer L-Valin-Dehydrogenase (L-ValDH, EC 1.4.1.23) zu L-Val umgesetzt werden, das zusammen mit L-Leu und L-Ile ein wichtiger Bestandteil von Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung ist. Durch Carboxylierung von Acetaldehyd mit Hilfe einer Pyruvat-Decarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1) ließe sich Pyruvat gewinnen, das mit einer L-Alanin-Dehydrogenase (L-AlaDH, EC 1.4.1.1) oder, wie bereits von Tong *et al.*, (2011) vorgeschlagen, einer L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27) weiter umgesetzt werden könnte. Während das Produkt der reduktiven Aminierung L-Alanin ebenfalls für die parenterale Ernährung eingesetzt wird (Drauz *et al.*, 2007), kann das Hydrierungsprodukt L-Lactat als Grundbaustein für die Synthese der biologisch abbaubaren und immunologisch inaktiven Polylactide (PLA) verwendet werden (Tong *et al.*, 2011; Murariu & Dubois, 2016).

Darüber hinaus wäre unter Einsatz entsprechender Aldehyde die Herstellung von L-Phe, L-Tyr und L-Trp mit Hilfe einer Phenylpyruvat-Decarboxylase (PPDC, EC 4.1.1.43) zusammen mit einer L-PheDH (EC 1.4.1.20) bzw. L-Tryptophan-Dehydrogenase (L-TrpDH, EC 1.4.1.19) für den pharmazeutischen Einsatz in Infusionen möglich. Zusammen mit L-Asp wird L-Phe auch für den Süßstoff Aspartam verwendet (Drauz *et al.*, 2007), während L-Tyr auch als Depotträger für Vakzine dient (Baldrick *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 1982). Schließlich findet sich die oft limitierende Aminosäure L-Trp ebenso wie L-Met als Zusatz in Futtermitteln wieder, um deren biologische Wertigkeit zu erhöhen (Drauz *et al.*, 2007).

Obwohl die Herstellung dieser Produkte – mit Ausnahme der Synthese von L-Lactat durch Tong *et al.* (2011) – durch die Umkehrung des Ehrlich Pathways noch nicht untersucht wurde, ist das Potential der genannten Enzymkombinationen aufgrund ihrer von Natur aus um Faktor 5 bis 120 höheren katalytischen Effizienzen für die jeweiligen Substrate im Vergleich zu L-Met groß (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8. Produkte, die mit Hilfe einer TPP-abhängigen Decarboxylase und einem hinsichtlich der Substratspezifität geeigneten Zweitezym durch Umkehrung des Ehrlich-Pathways in dieser Arbeit synthetisiert wurden (schwarz) oder deren Synthese naheliegend erscheint (grau). Die Decarboxylasen wurden aufgrund ihrer von Andrews and McLeish (2012) beschriebenen katalytischen Effizienzen (gemessen für die Decarboxylierung) ausgewählt. Genannt ist jeweils der Decarboxylase-Typ mit einem Beispielenzym. Die Dehydrogenasen wurden ebenso aufgrund der beschriebenen katalytischen Effizienzen (siehe d-j) für die Reduktionsreaktion ausgewählt. Beispiele für die Verwendung der Aminosäuren stammen, wenn nicht anders gekennzeichnet, aus dem Review von Drauz et al., (2012).

Produkt	Decarboxylase (EC Nummer)	Zweitezym (EC Nummer)	Verwendung
L-Met	BCKA DC, KdcA ^a (EC 4.1.1.72)	L-LeuDH ^d (EC 1.4.1.9)	parenterale Ernährung, Nahrungsergänzung, Futtermittelzusatzstoff
D/L-MHA	BCKA DC, KdcA ^a (EC 4.1.1.72)	D/L-HicDH ^e (EC 1.1.1.345/337)	Futtermittelzusatzstoff (Dilger <i>et al.</i> , 2007)
L-Leu	BCKA DC, KdcA ^a (EC 4.1.1.72)	L-LeuDH ^d (EC 1.4.1.9)	parenterale Ernährung, Nahrungsergänzung
L-Ile	BCKA DC, KdcA ^a (EC 4.1.1.72)	L-LeuDH ^d (EC 1.4.1.9)	parenterale Ernährung, Nahrungsergänzung
L-Val	BCKA DC, KdcA ^a (EC 4.1.1.72)	L-ValDH ^f (EC 1.4.1.23)	parenterale Ernährung, Nahrungsergänzung
L-Ala	PDC, ZmPdc ^b (EC 4.1.1.1)	L-AlaDH ^g (EC 1.4.1.1)	parenterale Ernährung
L-Lactat	PDC, ZmPdc ^b (EC 4.1.1.1)	L-LDH ^h (EC 1.1.1.27)	Synthese von Polylactiden (PLA) (Murariu & Dubois, 2016)
L-Phe	PPDC, Aro10 ^c (EC 4.1.1.43)	L-PheDH ⁱ (EC 1.4.1.20)	Aspartam (Süßstoff), parenterale Ernährung
L-Tyr	PPDC, Aro10 ^c (EC 4.1.1.43)	L-PheDH ⁱ (EC 1.4.1.20)	Depotträger für Vakzine (Wheeler <i>et al.</i> , 1982) parenterale Ernährung, Nahrungs-ergänzung
L-Trp	PPDC, Aro10 ^c (EC 4.1.1.43)	L-TrpDH ^j (EC 1.4.1.19)	Futtermittelzusatzstoff, parenterale Ernährung, Nahrungsergänzung

^a Branched-Chain-2-Ketoacid Decarboxylase, KdcA aus *L. lactis* (Yep et al., 2006)

^b Pyruvat-Decarboxylase, Pdc aus *Z. mobilis* (Siegert *et al.*, 2005)

^c Phenylpyruvat-Decarboxylase, Aro10 aus *S. cerevisiae* (Kneen *et al.*, 2011)

^d Leucin-Dehydrogenase, L-LeuDH aus *Bacillus sphaericus* (Li *et al.*, 2009)

^e Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase, D-HicDH aus *L. casei* (Hummel *et al.*, 1985),
L-HicDH aus *L. confusus* (Schütte et al., 1984)

^f Valin-Dehydrogenase, L-ValDH aus *Streptomyces cinnamonensis* (Priestley & Robinson, 1989)

^g Alanin-Dehydrogenase, L-AlaDH aus *Mycobacterium tuberculosis* (Ågren *et al.*, 2008)

^h Lactat-Dehydrogenase, L-LDH aus *Geobacillus stearothermophilus* (Yin & Kirsch, 2007)

ⁱ Phenylalanin-Dehydrogenase, L-PheDH aus *Bacillus sphaericus* (Seah *et al.*, 2002)

^j Tryptophan-Dehydrogenase, L-TrpDH aus *Nostoc punctiforme* (Ogura *et al.*, 2014)

5. Zusammenfassung

Auch wenn der Einsatz von CO₂ als Grundbaustein für die Synthese von Chemikalien in Anbetracht der steigenden CO₂-Konzentration allgemein als wünschenswert betrachtet wird, mangelt es insbesondere wegen der Komplexität und der ungünstigen Energiebilanz geeigneter konventioneller anaboler Biosyntheserouten an industriellen biotechnologischen Anwendungen zur CO₂-Fixierung. In dieser Arbeit wurde durch Umkehrung der vor allem aus Hefe bekannten Aminosäuregärung nach Felix Ehrlich, d.h. durch enzymatische Carboxylierung und Aminierung des industriell gut verfügbaren Vorläufer-Aldehyds Methional, die Aminosäure L-Methionin (L-Met) gewonnen.

Trotz des in dieser Arbeit mittels der Haldane-Beziehung bestimmten ungünstigen chemischen Gleichgewichts von 1/16,5 kbar⁻¹ zeigte die Decarboxylase KdcA aus *Lactococcus lactis* bei einem erstaunlich niedrigen CO₂ Druck von nur 3,3 bar halbmaximale Enzymaktivität für die Carboxylierung des aliphatischen Substrats Methional. Dies erlaubte bei Entzug des Carboxylierungsprodukts 4-Methylthio-2-oxobutansäure (MTOB) aus dem Gleichgewicht mit Hilfe der energetisch favorisierten Aminierung durch eine Transaminase oder eine Aminosäuredehydrogenase die Synthese von L-Met unter 2 bar CO₂.

Unter Verwendung der enantioselektiven Methionin-Aminotransferase YbdL aus *Escherichia coli* konnte die L-Met Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Methionalkonzentration durch Erhöhung der KdcA- und YbdL-Konzentration und Verlängerung der Reaktionszeit gegenüber Vorarbeiten von 12,5 % auf 40 % (48 h, 2 bar CO₂) gesteigert werden. Wegen des äquimolaren Verbrauchs der Donoraminosäure L-Gln, was den Einsatz der YbdL im technischen Maßstab unattraktiv macht, wurden die Aminosäuredehydrogenasen LeuDh aus *Bacillus sphaericus* und PheDH aus *Thermoactinomyces intermedius*, die nur das relativ einfach regenerierbare NADH als stöchiometrischen Cofaktor benötigten, miteinander verglichen. Im Prinzip eigneten sich beide für die Synthese von L-Met und unterschieden sich hauptsächlich bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität gegenüber MTOB und der Proteinstabilität.

Da nach dem Prinzip von Le Chatelier ein effizienter Entzug von MTOB aus dem Gleichgewicht der ersten Reaktion essenziell für die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Carboxylierung ist, aber mit nur einer niedrigen Konzentration des Intermediats MTOB zu rechnen war, spielte eine hohe katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) des Enzyms, das die Folgereaktion katalysiert, eine wichtige Rolle. Wegen der hohen Aggregationstendenz der aktiveren PheDH sollte die Spezifität der stabileren LeuDh bezüglich MTOB ausgehend von dem in der Literatur beschriebenen Aminosäureaustausch A113G durch Enzym-Engineering verbessert werden. Schon allein die Substitution des Alanins an Position 113 durch das kleinere Glycin führte zu einer 14-fach erhöhten katalytischen Effizienz gegenüber MTOB im Vergleich zur wtLeuDh. Die Kombination dieses Austausches mit der durch Sättigungsmutagenese identifizierten Substitution L40I steigerte die katalytische Effizienz sogar auf den 16-fachen

Wert bei gleichzeitig weiterer Erniedrigung des K_M -Werts für MTOB auf 0,9 mM. In der gekoppelten Reaktion mit der KdcA (16 h 2 bar CO₂) wurde eine Zunahme der L-Met Ausbeute von 8,6% mit der wtLeuDH auf 20 % mit der LeuDH(A113G) bzw. 28,3 % mit der LeuDH(L40I/A113G) beobachtet, was das hier verfolgte Konzept zur Verbesserung der Folgereaktion bestätigte.

Unter Einsatz der gleichen Enzymkonzentrationen, die zum Erreichen von 40 % Umsatz mit der KdcA und YbdL verwendet wurden, konnten mit der KdcA und der optimierten LeuDH-Variante (L40I/A113G) nach nur 24 h (statt 48 h) 45 % des eingesetzten Methionals zu L-Met umgewandelt werden. Zusammen mit dem Vorteil der einfacheren Cofaktor-Regenerierung machte dies die LeuDH(L40I/A113G) gegenüber der Transaminase YbdL zum besseren Kandidaten für die Biokatalyse der Folgereaktion.

Die Synthese von L-Met sowie die des Methionin-Hydroxy-Analogons (MHA) in Verbindung mit der modifizierten Formiat Dehydrogenase CboFDH(C23A/F285S) aus *Candida boidinii* und den Cosubstraten NAD⁺ und Formiat bestätigte die Realisierbarkeit der NADH-Regenerierung in situ. Darüber hinaus bewies die Synthese von D/L-MHA durch Austausch der LeuDH durch die D-HicDH aus *Lactobacillus casei* bzw. die L-HicDH aus *Lactobacillus confusus*, dass ausgehend von einer Carboxylierungsreaktion auch Produkte mit anderer Funktionalisierung gewonnen werden können. Dies wie auch die erfolgreiche Synthese von L-Leu und L-Ile aus 3- bzw. 2-Methylbutanal unter Einsatz der KdcA und LeuDH, welche von Natur aus hohe Präferenz für die entsprechenden Aldehyd-Substrate aufweisen, zeigten das Potential der ursprünglich für die Synthese von L-Met entwickelten Carboxylierungsreaktion zur Herstellung diverser industriell interessanter Produkte.

6. Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
aTc	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
bla	Gen der β -Lactamase
<i>C. boidinii</i>	<i>Candida boidinii</i>
CboFDH	Formiat-Dehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i>
CD	Circulardichroismus
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
D-HicDH	D-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus casei</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
f1-IG	Intergenische Region des Bakteriophagen f1
His ₆ -tag	Hexahistidinanhängsel
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
k_{cat}	Wechselzahl
KdcA	Decarboxylase aus <i>Lactococcus lactis</i>
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
K_i	Inhibitionskonstante
K_M	Michaelis/Menten-Konstante
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. confusus</i>	<i>Lactobacillus confusus</i>
L-HicDH	L-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus confusus</i>

LeuDH	Leucin-Dehydrogenase aus <i>Bacillus sphaericus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
MHA	Methionin-Hydroxy-Analogon
MTOB	4-Methylthio-2-oxobutansäure
M _w	Molekulargewicht
MWCO	Molecular Weight Cut-Off (Ausschlussgrenze)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PheDH	Phenylalanin-Dehydrogenase aus <i>Thermoactinomyces intermedius</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
RP-HPLC	Reverse Phase Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
<i>T. intermedius</i>	<i>Thermoactinomyces intermedius</i>
tet ^{p/o}	Tetracyclin Promotor/Operator
tetR	Tetracyclin-Repressor
t _{lpp}	Lipoprotein-Transkriptionsterminator
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TPP	Thiamindiphosphat
T7-lac ^{o/p}	T7-Promotor/lac-Operator
T7-t(Φ)	T7-Terminator
V ₀	Durchbruchvolumen einer SEC-Säule
V _t	Bettvolumen einer SEC-Säule
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
YbdL	Aminotransferase aus <i>Escherichia coli</i>

7. Literaturverzeichnis

- Ågren, D., Stehr, M., Berthold, C.L., Kapoor, S., Oehlmann, W., Singh, M. & Schneider, G. (2008) Three-Dimensional Structures of Apo- and Holo-l-Alanine Dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* Reveal Conformational Changes upon Coenzyme Binding. *J Mol Biol* 377, 1161-1173.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Andrews, F.H. & McLeish, M.J. (2012) Substrate specificity in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Bioorg Chem* 43, 26-36.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N. & Yeh, L.S.L. (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 32, D115-D119.
- Aresta, M., Quaranta, E., Liberio, R., Dileo, C. & Tommasi, I. (1998) Enzymatic synthesis of 4-OH-benzoic acid from phenol and CO₂: the first example of a biotechnological application of a Carboxylase enzyme. *Tetrahedron* 54, 8841-8846.
- Arkema (2015) Press release: Successful start-up of Arkema's thiochemicals platform in Malaysia. www.arkema.com/en/media/news/news-details/Successful-start-up-of-Arkemas-thiochemicals-platform-in-Malaysia/, 07.09.2019.
- Atkins, P., Atkins, P.W. & de Paula, J. (2014) *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, NY.
- Baker, P.J., Turnbull, A.P., Sedelnikova, S.E., Stillman, T.J. & Rice, D.W. (1995) A role for quaternary structure in the substrate specificity of leucine dehydrogenase. *Structure* 3, 693-705.
- Baldrick, P., Richardson, D. & Wheeler, A.W. (2002) Review of L-tyrosine confirming its safe human use as an adjuvant. *J Appl Toxicol* 22, 333-344.
- Barber, J. & Andersson, B. (1994) Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370, 31-34.
- Berg, I.A. (2011) Ecological Aspects of the Distribution of Different Autotrophic CO₂ Fixation Pathways. *Appl Environ Microbiol* 77, 1925.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2002) The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. IN BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. (Eds.) *Biochemistry*. 5th ed. WH Freeman, NY.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- Berthold, C.L., Gocke, D., Wood, M.D., Leeper, F.J., Pohl, M. & Schneider, G. (2007) Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carboligation reaction. *Acta Crystallogr D* 63, 1217-1224.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bommarius, A.S. & Paye, M.F. (2013) Stabilizing biocatalysts. *Chem Soc Rev* 42, 6534-6565.

- Bommarius, A.S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K. & Drauz, K. (1995) Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron-Asymmetr* **6**, 2851-2888.
- Brachet, P. & Puigserver, A. (1992) Regional differences for the d-amino acid oxidase-catalysed oxidation of d-methionine in chicken small intestine. *Comp Biochem Physiol B* **101**, 509-511.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., Stürmer, R. & Zelinski, T. (2004) Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. *Angew Chem Int Edit* **43**, 788-824.
- Britton, K.L., Baker, P.J., Engel, P.C., Rice, D.W. & Stillman, T.J. (1993) Evolution of Substrate Diversity in the Superfamily of Amino Acid Dehydrogenases: Prospects for Rational Chiral Synthesis. *J Mol Biol* **234**, 938-945.
- Brunke, S., Seider, K., Richter, M.E., Bremer-Streck, S., Ramachandra, S., Kiehntopf, M., Brock, M. & Hube, B. (2014) Histidine degradation via an aminotransferase increases the nutritional flexibility of *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **13**, 758-765.
- Bullock, W.O.e.a. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Tecchniques* **5**, 376-379.
- Burgdorf, T., van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q.Y., Back, J.W., Hartog, A.F., Muijsers, A.O., de Koster, C.G., Albracht, S.P.J. & Friedrich, B. (2005) The Soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia Eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *J Bacteriol* **187**, 3122-3132.
- Chatterjee, S., Schoepe, J., Lohmer, S. & Schomburg, D. (2005) High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged l-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set. *Protein Express Purif* **39**, 137-143.
- Cleland, W.W. (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochim Biophys Acta* **67**, 104-137.
- Danielsson, B., Winqvist, F., Malpote, J.Y. & Mosbach, K. (1982) Regeneration of NADH with immobilized systems of alanine dehydrogenase and hydrogen dehydrogenase. *Biotechnol Lett* **4**, 673-678.
- Davidson, A.R. (2006) *Multiple Sequence Alignment as a Guideline for Protein Engineering Strategies*, Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Delano Scientific. Palo Alto, CA, USA.
- Dengler, U., Niefind, K., Kieß, M. & Schomburg, D. (1997) Crystal structure of a ternary complex of d-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*, NAD⁺ and 2-oxoisocaproate at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **267**, 640-660.
- Dilger, R.N., Kobler, C., Weckbecker, C., Hoehler, D. & Baker, D.H. (2007) 2-Keto-4-(Methylthio)Butyric Acid (Keto Analog of Methionine) Is a Safe and Efficacious Precursor of l-Methionine in Chicks. *J Nutr* **137**, 1868-1873.
- Dischert, W. & Figge, R. (2013) Recombinant microorganism for the fermentative production of methionine. WO2013/190343(A1). Metabolic Explorer.
- Dischert, W., Vasseur, P. & Figge, R. (2018) Microorganism for methionine production with improved methionine synthase activity and methionine efflux EP3039153(B1). Evonik Degussa.

- Dolzan, M., Johansson, K., Roig-Zamboni, V., Campanacci, V., Tegoni, M., Schneider, G. & Cambillau, C. (2004) Crystal structure and reactivity of YbdL from *Escherichia coli* identify a methionine aminotransferase function. *FEBS Lett* 571, 141-146.
- Drauz, K., Grayson, I., Kleemann, A., Krimmer, H.P., Leuchtenberger, W. & Weckbecker, C. (2007) Amino Acids. IN ELVERS, B. (Ed.) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Ehrlich, F. (1907) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Ber Dtsch Chem Ges* 40, 1027-1047.
- Evans, M.C., Buchanan, B.B. & Arnon, D.I. (1966) A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55, 928-934.
- Faber, K. (2018) Biocatalytic Applications. IN FABER, K. (Ed.) *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. Cham, Springer International Publishing.
- Felber, S. (2001) Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. Dissertation, Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf.
- Ferla, M.P. & Patrick, W.M. (2014) Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology* 160, 1571-1584.
- Figge, R. & Dumon-Seignovert, L. (2019) A microorganism for methionine production with enhanced methionine efflux. EP3039120(B1). Evonik Degussa.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Fontecilla-Camps, J.C., Volbeda, A., Cavazza, C. & Nicolet, Y. (2007) Structure/Function Relationships of [NiFe]- and [FeFe]-Hydrogenases. *Chem Rev* 107, 4273-4303.
- Frank, R.A.W., Leeper, F.J. & Luisi, B.F. (2007) Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell Mol Life Sci* 64, 892.
- Fremy, G., Barre, P., Kim, S.-Y., Son, S. & Lee, S. (2013) Preparation process of L-methionine. WO2013/029690(A1). Arkema France-CJ CheilJedang.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- Gebauer, M. (2013) Kombinatorisches Design und funktionelle Charakterisierung von Anticalinen gegen die Extra-Domäne B in onkofetalem Fibronectin. Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Glueck, S.M., Gumus, S., Fabian, W.M.F. & Faber, K. (2010) Biocatalytic carboxylation. *Chem Soc Rev* 39, 313-328.
- Gocke, D., Graf, T., Brosi, H., Frindi-Wosch, I., Walter, L., Müller, M. & Pohl, M. (2009) Comparative characterisation of thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *J Mol Catal B-Enzym* 61, 30-35.

- Gocke, D., Nguyen, C.L., Pohl, M., Stillger, T., Walter, L. & Müller, M. (2007) Branched-Chain Keto Acid Decarboxylase from *Lactococcus lactis* (KdcA), a Valuable Thiamine Diphosphate-Dependent Enzyme for Asymmetric C-C Bond Formation. *Adv Synth Catal* 349, 1425-1435.
- Haldane, J.B.S. (1930) *Enzymes*, Longmans, Green and Co, London.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T. & Dickinson, J.R. (2008) The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74, 2259-2266.
- Hillmann, H. & Hofmann, T. (2016) Quantitation of Key Tastants and Re-engineering the Taste of Parmesan Cheese. *J Agric Food Chem* 64, 1794-1805.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Hoffman, J. & Flavo, M. (2004) Protein - Which is Best? *J Sports Sci Med* 3, 118-130.
- Hollmann, F., Arends, I.W.C.E. & Holtmann, D. (2011) Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chem* 13, 2285-2314.
- Hondorp, E. & Matthews, R. (2006) Methionine. *EcoSal Plus*.
- Hummel, W. & Kula, M.R. (1989) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem* 184, 1-13.
- Hummel, W., Schütte, H. & Kula, M.-R. (1985) D-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 21, 7-15.
- Hummel, W., Schütte, H., Schmidt, E., Wandrey, C. & Kula, M.-R. (1987) Isolation of l-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4 and its application for the production of l-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol* 26, 409-416.
- IPCC (2014) Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. *IPCC, Geneva, Switzerland*, 151 pp.
- Jitrapakdee, S., Maurice, M.S., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C. & Attwood, P.V. (2008) Structure, Mechanism and Regulation of Pyruvate Carboxylase. *The Biochemical journal* 413, 369-387.
- John, R.A. (1995) Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1248, 81-96.
- Johnson, K.A. & Goody, R.S. (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 50, 8264-8269.
- Kamat, S., Critchley, G., Beckman, E.J. & Russell, A.J. (1995) Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnol Bioeng* 46, 610-620.
- Kataoka, K., Takada, H., Tanizawa, K., Yoshimura, T., Esaki, N., Ohshima, T. & Soda, K. (1994a) Construction and Characterization of Chimeric Enzyme Consisting of an Amino-Terminal Domain of Phenylalanine Dehydrogenase and a Carboxy-Terminal Domain of Leucine Dehydrogenase. *J Biochem* 116, 931-936.
- Kataoka, K., Takada, H., Yoshimura, T., Furuyoshi, S., Esaki, N., Ohshima, T. & Soda, K. (1993) Site-Directed Mutagenesis of a Hexapeptide Segment Involved in Substrate

- Recognition of Phenylalanine Dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius*. *J Biochem* 114, 69-75.
- Kataoka, K. & Tanizawa, K. (2003) Alteration of substrate specificity of leucine dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *J Mol Catal B-Enzym* 23, 299-309.
- Kataoka, K., Tanizawa, K., Fukui, T., Ueno, H., Yoshimura, T., Esaki, N. & Soda, K. (1994b) Identification of Active Site Lysyl Residues of Phenylalanine Dehydrogenase by Chemical Modification with Methyl Acetyl Phosphate Combined with Site-Directed Mutagenesis. *J Biochem* 116, 1370-1376.
- Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. & Hübner, G. (1997) How Thiamine Diphosphate Is Activated in Enzymes. *Science* 275, 67-70.
- Kirchgeßner, M. (2014) *Tierernährung*, DLG-Verlag, Frankfurt.
- Kirmair, L. (2017) Charakterisierung und funktionelle Optimierung von Enzymen für die biotechnologische Synthese von Polyamid-12-Bausteinen. Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Klibanov, A.M. & Puglisi, A.V. (1980) The regeneration of coenzymes using immobilized hydrogenase. *Biotechnol Lett* 2, 445-450.
- Kneen, M.M., Stan, R., Yep, A., Tyler, R.P., Saehuan, C. & McLeish, M.J. (2011) Characterization of a thiamin diphosphate-dependent phenylpyruvate decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 278, 1842-1853.
- Kondrat, R.W., McClusky, G.A. & Cooks, R.G. (1978) Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. *Analytical Chemistry* 50, 2017-2021.
- Krömer, J.O., Wittmann, C., Schröder, H. & Heinzle, E. (2006) Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* 8, 353-369.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Lauterbach, L., Lenz, O. & Vincent, K.A. (2013) H₂-driven cofactor regeneration with NAD(P)⁺-reducing hydrogenases. *FEBS J* 280, 3058-3068.
- Le Quéré, C., Andrew, R.M., Friedlingstein, P., Sitch, S., Hauck, J., Pongratz, J., Pickers, P.A., Korsbakken, J.I., Peters, G.P., Canadell, J.G., Arneeth, A., Arora, V.K., Barbero, L., Bastos, A., Bopp, L., Chevallier, F., Chini, L.P., Ciais, P., Doney, S.C., Gkritzalis, T., Goll, D.S., Harris, I., Haverd, V., Hoffman, F.M., Hoppema, M., Houghton, R.A., Hurtt, G., Ilyina, T., Jain, A.K., Johannessen, T., Jones, C.D., Kato, E., Keeling, R.F., Goldewijk, K.K., Landschützer, P., Lefèvre, N., Lienert, S., Liu, Z., Lombardozi, D., Metzl, N., Munro, D.R., Nabel, J.E.M.S., Nakaoka, S.I., Neill, C., Olsen, A., Ono, T., Patra, P., Peregón, A., Peters, W., Peylin, P., Pfeil, B., Pierrot, D., Poulter, B., Rehder, G., Resplandy, L., Robertson, E., Rocher, M., Rödenbeck, C., Schuster, U., Schwinger, J., Séférian, R., Skjelvan, I., Steinhoff, T., Sutton, A., Tans, P.P., Tian, H., Tilbrook, B., Tubiello, F.N., van der Laan-Luijkx, I.T., van der Werf, G.R., Viovy, N., Walker, A.P., Wiltshire, A.J., Wright, R., Zaehle, S. & Zheng, B. (2018) Global Carbon Budget 2018. *Earth Syst Sci Data* 10, 2141-2194.

- Lerch, H.P., Frank, R. & Collins, J. (1989) Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene* 83, 263-270.
- Lerchner, A., Achatz, S., Rausch, C., Haas, T. & Skerra, A. (2013) Coupled Enzymatic Alcohol-to-Amine Conversion of Isosorbide using Engineered Transaminases and Dehydrogenases. *ChemCatChem* 5, 3374-3383.
- Li, H., Zhu, D., Hyatt, B., Malik, F., Biehl, E. & Hua, L. (2009) Cloning, Protein Sequence Clarification, and Substrate Specificity of a Leucine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus* ATCC4525. *Appl Biochem Biotechnol* 158, 343-351.
- Liu, M., Sergienko, E.A., Guo, F., Wang, J., Tittmann, K., Hübner, G., Furey, W. & Jordan, F. (2001) Catalytic Acid–Base Groups in Yeast Pyruvate Decarboxylase. 1. Site-Directed Mutagenesis and Steady-State Kinetic Studies on the Enzyme with the D28A, H114F, H115F, and E477Q Substitutions. *Biochemistry* 40, 7355-7368.
- Lorimer, G.H. & Andrews, T.J. (1973) Plant Photorespiration—An Inevitable Consequence of the Existence of Atmospheric Oxygen. *Nature* 243, 359-360.
- Luo, T., Ke, J., Xie, Y. & Dong, Y. (2017) Determination of underivatized amino acids to evaluate quality of beer by capillary electrophoresis with online sweeping technique. *J Food Drug Anal* 25, 789-797.
- Lussling, T., Müller, K.-P., Schreyer, G. & Theissen, F. (1981) Process for the recovery of methionine and potassium bicarbonate. US4303621(A). Deutsche Gold- und Silber-Scheideanstalt formerly Roessler (Degussa).
- Martin, J., Eisoldt, L. & Skerra, A. (2018) Fixation of gaseous CO₂ by reversing a decarboxylase for the biocatalytic synthesis of the essential amino acid l-methionine. *Nature Catalysis* 1, 555-561.
- Matsuda, T., Marukado, R., Koguchi, S., Nagasawa, T., Mukoyama, M., Harada, T. & Nakamura, K. (2008) Novel continuous carboxylation using pressurized carbon dioxide by immobilized decarboxylase. *Tetrahedron Lett* 49, 6019-6020.
- Matsuda, T., Ohashi, Y., Harada, T., Yanagihara, R., Nagasawa, T. & Nakamura, K. (2001) Conversion of pyrrole to pyrrole-2-carboxylate by cells of *Bacillus megaterium* in supercritical CO₂. *Chemical communications (Cambridge, England)* 21, 2194-2195.
- Meigh, L. (2015) CO₂ carbamylation of proteins as a mechanism in physiology. *Biochem Soc Trans* 43, 460.
- Metabolic-Explorer (2016) Press Release: Transfer of METEX technology for the fermentative production of methionine to Evonik. www.metabolic-explorer.com/2016/12/07/transfer-of-metex-technology-for-the-fermentative-production-of-methionine-to-evonik/, 07.09.2019.
- Miyazaki, M., Shibue, M., Ogino, K., Nakamura, H. & Maeda, H. (2001) Enzymatic synthesis of pyruvic acid from acetaldehyde and carbon dioxide. *Chem commun*, 1800-1801.
- Muller, Y.A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G.E., Jordan, F. & Schneider, G. (1993) A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* 1, 95-103.
- Murariu, M. & Dubois, P. (2016) PLA composites: From production to properties. *Adv Drug Del Rev* 107, 17-46.

- Nakada, N., Okura, I. & Hasumi, F. (1992) Hydrogenation of pyruvic acid by hydrogen with the combination of hydrogenase and lactate dehydrogenase. *J Mol Catal* 75, L23-L25.
- National-Research-Council (2002) Hydrogen Cyanide: Acute Exposure Guideline Levels. *Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals: Volume 2, Chapter 5*. The National Academies Press, Washington, DC.
- Niefind, K., Hecht, H.-J. & Dietmar (1995) Crystal Structure of l-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase from *Lactobacillus confusus* at 2.2 Å Resolution. An Example of Strong Asymmetry Between Subunits. *J Mol Biol* 251, 256-281.
- Nov, Y. (2012) When Second Best Is Good Enough: Another Probabilistic Look at Saturation Mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 78, 258-262.
- Obert, R. & Dave, B.C. (1999) Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide to Methanol: Enhanced Methanol Production in Silica Sol-Gel Matrices. *J Am Chem Soc* 121, 12192-12193.
- Ogura, R., Wakamatsu, T., Mutaguchi, Y., Doi, K. & Ohshima, T. (2014) Biochemical characterization of an l-tryptophan dehydrogenase from the photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Enzyme Microb Technol* 60, 40-46.
- Ohshima, T., Misono, H. & Soda, K. (1978) Properties of crystalline leucine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *J Biol Chem* 253, 5719-5725.
- Ohshima, T., Takada, H., Yoshimura, T., Esaki, N. & Soda, K. (1991) Distribution, purification, and characterization of thermostable phenylalanine dehydrogenase from *thermophilic actinomycetes*. *J Bacteriol* 173, 3943-3948.
- Okazaki, N., Hibino, Y., Asano, Y., Ohmori, M., Numao, N. & Kondo, K. (1988) Cloning and nucleotide sequencing of phenylalanine dehydrogenase gene of *Bacillus sphaericus*. *Gene* 63, 337-341.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & team, t.U. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166-1167.
- Payne, R.L., Lemme, A., Seko, H., Hashimoto, Y., Fujisaki, H., Koreleski, J., Swiatkiewicz, S., Szczurek, W. & Rostagno, H. (2006) Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. *Anim Sci J* 77, 427-439.
- Porath, J., Carlsson, J.A.N., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598.
- Priestley, N.D. & Robinson, J.A. (1989) Purification and catalytic properties of L-valine dehydrogenase from *Streptomyces cinnamonensis*. *Biochem J* 261, 853-861.
- Ragsdale, S.W. & Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO(2) fixation. *Biochimica et biophysica acta* 1784, 1873-1898.
- Reeve, H.A., Ash, P.A., Park, H., Huang, A., Posidias, M., Tomlinson, C., Lenz, O. & Vincent, K.A. (2017) Enzymes as modular catalysts for redox half-reactions in H₂-powered chemical synthesis: from biology to technology. *Biochem J* 474, 215.
- Ren, J., Yao, P., Yu, S., Dong, W., Chen, Q., Feng, J., Wu, Q. & Zhu, D. (2016) An Unprecedented Effective Enzymatic Carboxylation of Phenols. *ACS Catal* 6, 564-567.
- Sablé, S. & Cottenceau, G. (1999) Current Knowledge of Soft Cheeses Flavor and Related Compounds. *J Agric Food Chem* 47, 4825-4836.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487.
- Sakakura, T., Choi, J.-C. & Yasuda, H. (2007) Transformation of Carbon Dioxide. *Chem Rev* 107, 2365-2387.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sander, R. (2015) Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmos Chem Phys* 15, 4399-4981.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Schlapschy, M. (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Schneider, K. & Schlegel, H.G. (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 452, 66-80.
- Schomburg, I., Jeske, L., Ulbrich, M., Placzek, S., Chang, A. & Schomburg, D. (2017) The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. *J Biotechnol* 261, 194-206.
- Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. & Kula, M.-R. (1976) Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem* 62, 151-160.
- Schütte, H., Hummel, W. & Kula, M.-R. (1984) L-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase - A new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 19, 167-176.
- Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Burgener, S., Cortina, N.S. & Erb, T.J. (2016) A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science* 354, 900-904.
- Seah, S.Y.K., Britton, K.L., Rice, D.W., Asano, Y. & Engel, P.C. (2002) Single Amino Acid Substitution in *Bacillus sphaericus* Phenylalanine Dehydrogenase Dramatically Increases Its Discrimination between Phenylalanine and Tyrosine Substrates. *Biochemistry* 41, 11390-11397.
- Sekimoto, T., Matsuyama, T., Fukui, T. & Tanizawa, K. (1993) Evidence for lysine 80 as general base catalyst of leucine dehydrogenase. *J Biol Chem* 268, 27039-27045.
- Shafiee, S. & Topal, E. (2009) When will fossil fuel reserves be diminished? *Energ Policy* 37, 181-189.
- Sheldon, R.A. & Woodley, J.M. (2018) Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev* 118, 801-838.
- Siegert, P., McLeish, M.J., Baumann, M., Iding, H., Kneen, M.M., Kenyon, G.L. & Pohl, M. (2005) Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Protein Eng Des Sel* 18, 345-357.

- Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 20, 3551-3554.
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- Skerra, A. & Eisoldt, L. (2016) Process for producing l-methionine from methional. WO/2018/104143. Evonik Degussa.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The Functional Expression of Antibody Fv Fragments in *Escherichia coli*: Improved Vectors and a Generally Applicable Purification Technique. *Nat Biotechnol* 9, 273.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R. & Pohl, M. (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem* 267, 1280-1289.
- Smit, B.A., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Engels, W.J.M., Meijer, L., Wouters, J.T.M. & Smit, G. (2005) Identification, Cloning, and Characterization of a *Lactococcus lactis* Branched-Chain α -Keto Acid Decarboxylase Involved in Flavor Formation. *Appl Environ Microbiol* 71, 303-311.
- Sprung, M.A. (1940) A Summary of the Reactions of Aldehydes with Amines. *Chem Rev* 26, 297-338.
- Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A. & Steinbacher, S. (1994) Sequence Statistics Reliably Predict Stabilizing Mutations in a Protein Domain. *J Mol Biol* 240, 188-192.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Takada, H., Yoshimura, T., Ohshima, T., Esaki, N. & Soda, K. (1991) Thermostable Phenylalanine Dehydrogenase of *Thermoactinomyces intermedius*: Cloning, Expression, and Sequencing of Its Gene. *J Biochem* 109, 371-376.
- Tishkov, V.I. & Popov, V.O. (2006) Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol Eng* 23, 89-110.
- Tong, X., El-Zahab, B., Zhao, X., Liu, Y. & Wang, P. (2011) Enzymatic synthesis of L-lactic acid from carbon dioxide and ethanol with an inherent cofactor regeneration cycle. *Biotechnol Bioeng* 108, 465-469.
- Trost, B.M. (1991) The atom economy--a search for synthetic efficiency. *Science* 254, 1471.
- Turnbull, A.P., Ashford, S.R., Baker, P.J., Rice, D.W., Rodgers, F.H., Stillman, T.J. & Hanson, R.L. (1994) Crystallization and Quaternary Structure Analysis of the NAD⁺-dependent Leucine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *J Mol Biol* 236, 663-665.
- United Nations, D.o.E.a.S.A., Population Division (2019) World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423).
- Vogel, A.I., Tatchell, A.R., Furnis, B.S., Hannaford, A.J. & Smith, P.W.G. (1996) *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Prentice Hall, NJ.
- Wang, X., Saba, T., Yiu, H.H.P., Howe, R.F., Anderson, J.A. & Shi, J. (2017) Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem* 2, 621-654.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. & Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.

- Wei, J., Timler, J.G., Knutson, C.M. & Barney, B.M. (2013) Branched-chain 2-keto acid decarboxylases derived from *Psychrobacter*. *FEMS Microbiol Lett* 346, 105-112.
- Wheeler, A.W., Moran, D.M., Robins, B.E. & Driscoll, A. (1982) L-Tyrosine as an Immunological Adjuvant. *Int Arch Allergy Immunol* 69, 113-119.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Bückmann, A.F. & Kula, M.-r. (1981) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol Bioeng* 23, 2789-2802.
- Wieser, M., Fujii, N., Yoshida, T. & Nagasawa, T. (1998) Carbon dioxide fixation by reversible pyrrole-2-carboxylate decarboxylase from *Bacillus megaterium* PYR2910. *Eur J Biochem* 257, 495-499.
- Willke, T. (2014) Methionine production - a critical review. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 9893-9914.
- Woodley, J.M. (2015) Scale-Up and Development of Enzyme-Based Processes for Large-Scale Synthesis Applications. IN FABER, K., FESSNER, W. D. & TURNER, N. J. (Eds.) *Biocatalysis in Organic Synthesis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wu, H., Tian, C., Song, X., Liu, C., Yang, D. & Jiang, Z. (2013) Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chem* 15, 1773-1789.
- Yang, Z., Hasan, M.S., Htoo, J.K., Burnett, D.D., Feugang, J.M., Crenshaw, M.A. & Liao, S.F. (2018) Effects of dietary supplementation of l-methionine vs. dl-methionine on performance, plasma concentrations of free amino acids and other metabolites, and myogenesis gene expression in young growing pigs. *Transl Anim Sci* 3, 329-339.
- Yep, A., Kenyon, G.L. & McLeish, M.J. (2006) Determinants of substrate specificity in KdcA, a thiamin diphosphate-dependent decarboxylase. *Bioorg Chem* 34, 325-336.
- Yin, Y. & Kirsch, J.F. (2007) Identification of functional paralog shift mutations: conversion of *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 17353-17357.
- Yvon, M. & Rijnen, L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J* 11, 185-201.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.-L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* 32, e115-e115.