

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
TUM SCHOOL OF LIFE SCIENCES

**Semi-rationales Design der Saccharose-Isomerase  
SmuA und der Alkoholdehydrogenase EhADH1 für  
Anwendungen in der industriellen Biotechnologie**

Patrick Pilak

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dieter Langosch

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

Die Dissertation wurde am 10.06.2021 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 01.10.2021 angenommen.



*Meiner Familie*



## Danksagung

Ohne die große Unterstützung, die ich während der letzten Jahre erhalten habe, wäre das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich bei allen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen herzlichst bedanken.

Meinen größten Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Arne Skerra aussprechen. Ohne seine Expertise und die vielen konstruktiven Hilfestellungen während den zahlreichen Besprechungen, hätte dieses Projekt nicht erfolgreich abgeschlossen werden können. Vielen Dank dafür.

Bei Herrn Prof. Dr. XX bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes, ebenso bei Herrn Prof. Dr. XX für seine Bereitschaft, das Coreferat zu übernehmen.

Zudem möchte ich einige Kollegen aus der Arbeitsgruppe besonders hervorheben. Dies sind Elena Ilyukhina, Lea Nästle, Carina Sommer und Emanuel Peplau.

Danke Elena, dass du immer für mich da warst. Das hat mir mehr bedeutet, mehr als ich in Worte fassen kann.

Danke Lea für die gute Atmosphäre in „meinem“ Labor. Ich hoffe, du behältst deinen guten und warmen Charakter bei.

Danke Carina für deine einzigartige Art und Weise Menschen zum Lachen zu bringen.

Und zu guter Schluss, vielen Dank an Manu. Vor allem zu Beginn meiner Doktorarbeit hast du mir mit vielen kleinen Ratschlägen geholfen.

Großen Dank gilt zudem Resi und Martina für das Bereitstellen von qualitativ hochwertigen Kulturmedien und Agarplatten. Ihr habt mir sehr viel Last von meinen Schultern genommen.

Dr. Martin Dauner und Dr. Christopher Graf danke ich für die Hilfe in chemischen Fragestellungen und Stefan Achatz für die Bedienung des Massenspektrometers.

Bei Lun Li bedanke ich mich für deren Beiträge im Rahmen Ihrer Abschlussarbeit, sowie für das hervorragende Teamwork während des entsprechenden Projektabschnitts.

Außerdem war dieses Kooperationsprojekt nur möglich durch die Bereitstellung von Gerätschaften und Chemikalien durch die Evonik Industries. In dieser Hinsicht gebührt Herrn Dr. Öhrlein und Herrn Dr. Schaffer ein großes Dankeschön für die gute Kooperation.

Des Weiteren möchte ich meinen Jungs und Mädels vom Rugby Studentenstadt e.V. für all die schönen Momente und Erlebnisse danken, die ich in den letzten 3 Jahren mit euch erleben durfte. Ich hoffe, dass noch viele weitere dazu kommen werden. Einmal StuSta, immer StuSta!

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie für die unendlich große Hilfe bedanken. Worte können nicht beschreiben, wie viel ihr mir bedeutet und wie groß euer Anteil am Gelingen dieser Doktorarbeit ist.

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

**Pilak P., Skerra A., Ohrlein J.** (2018) *European Patent Application* EP3653708(A1)

**Pilak P., Schiefner A., Seiboth J., Ohrlein J. & Skerra A.** (2020) Engineering a Highly Active Sucrose Isomerase for Enhanced Product Specificity by Using a “Battleship” Strategy. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 2161-2169.

**Pilak P. & Skerra A.** (2021) „Schiffe Versenken“: Optimierung einer hochaktiven Saccharose-Isomerase. *Biospektrum* **2021**, *27*, 654-656.

---

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	10
1.1	Die industrielle Bedeutung der Disaccharide Saccharose und Isomaltulose.....	10
1.2	Die Saccharose-Isomerase SmuA aus <i>Serratia plymuthica</i> .....	12
1.3	Entwicklung eines effektiven Expressionssystems für SmuA in <i>E. coli</i> .....	16
1.4	Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von SmuA.....	18
1.5	Wege zur biotechnologischen Produktion von L-Lysin.....	19
1.6	Die Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus <i>Entamoeba histolytica</i> .....	22
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2.	Material und Methoden .....	25
2.1	Material .....	25
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide .....	25
2.1.2	Oligodesoxynukleotide.....	26
2.1.3	Enzyme und sonstige Proteine .....	30
2.1.4	Chemikalien und Standards.....	31
2.1.5	Nährmedien, Antibiotika, Puffer und allgemeine Lösungen.....	32
2.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.7	Verwendete Kits.....	36
2.1.8	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken .....	37
2.2	Molekularbiologischen Methoden.....	37
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	37
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA .....	38
2.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	38
2.2.4	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA .....	39
2.2.5	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	39
2.2.6	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA .....	40
2.2.7	Ligierung von DNA-Fragmenten .....	40
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen.....	40
2.2.9	Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange PCR .....	41

---

2.3	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	41
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> BL21 .....	41
2.3.2	Zellaufschluss mittels French Press .....	42
2.3.3	Periplasmatische Extraktion von Proteinen.....	42
2.3.4	Streptavidin-Affinitätschromatographie.....	42
2.3.5	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	43
2.3.7	Konzentrierung von Proteinen.....	43
2.3.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	43
2.3.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	45
2.4	Charakterisierung gentechnisch hergestellter Enzyme.....	46
2.4.1	Analyse des Oligomerisierungszustandes durch analytische SEC .....	46
2.4.2	Elektronensprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS).....	47
2.4.3	Bestimmung kinetischer Enzymparameter.....	47
2.4.4	Aktivitätsassay der Alkohol- und Acetaldehyd-Dehydrogenasen.....	48
2.4.5	Aktivitätsassay der Saccharose-Isomerasen SmuA und PadU.....	49
3.	Ergebnisse .....	51
3.1	Etablierung eines empfindlichen Messverfahrens zur Zuckeranalytik.....	51
3.2	Charakterisierung der Punktmutante SmuA(V465E).....	52
3.3	Charakterisierung der Saccharose-Isomerase PadU aus <i>Pantoea dispersa</i> UQ68J.....	53
3.4	Semi-rationales <i>Protein-Engineering</i> von SmuA.....	56
3.4.1	Entwicklung einer neuartigen Strategie für das evolutive Enzym-Engineering.....	56
3.4.2	Phase I: Fehlschüsse im aktiven Zentrum .....	58
3.4.3	Phase II: Die ersten Treffer .....	62
3.4.4	Phase III: Fast jeder Schuss ein Treffer.....	68
3.4.5	Kombination von SmuA-Punktmutanten .....	76
3.4.5.1	Phase I der Generierung der SmuA-Doppelmutanten.....	78
3.4.5.2	Phase II der Generierung von SmuA-Doppelmutanten.....	82
3.4.5.3	Tripelmutanten: Kombinationen von Y219L/D398G und Q181P/I269V mit weiteren Mutationen .....	87



---

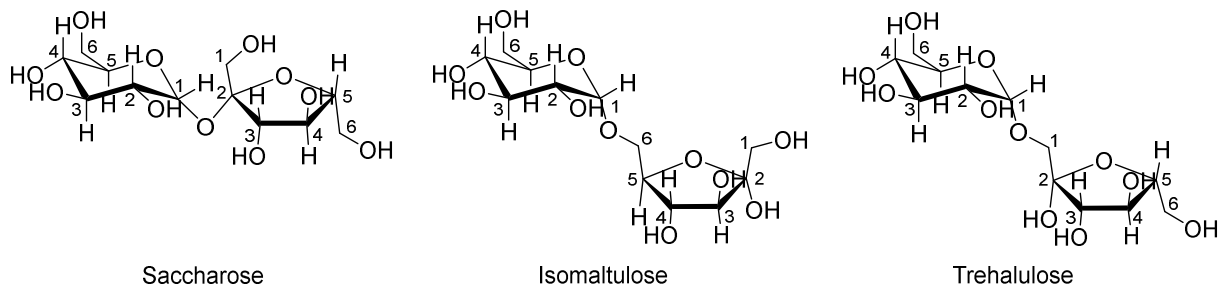
3.4.5.4	Tripelmutanten: Additionen zu Y219L/F453Y, Q181P/D398G und T369F/D398G.....	91
3.4.5.5	Generierung und Analyse von Quadrupelmutanten .....	94
3.4.6	Enzymkinetische Parameter .....	99
3.4.7	Analyse der Thermostabilität ausgewählter SmuA-Mutanten .....	101
3.5	Reinigung und Charakterisierung mikrobieller Acetaldehyd-Dehydrogenasen.....	103
3.5.1	Biotechnologische Produktion von L-Lysin.....	103
3.5.2	Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von CgALDH .....	103
3.5.3	Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von EcALDH.....	105
3.5.4	Enzymkinetische Parameter von CgALDH und EcALDH .....	106
3.6	Die Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus <i>Entamoeba histolytica</i> .....	109
3.6.1	Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von CgADH.....	109
3.6.2	Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von EhADH1 und EhADH3 .....	111
3.7	Semi-rationales <i>Protein-Engineering</i> von EhADH1.....	115
3.7.1	Phase I: Eingriffe in das aktive Zentrum.....	115
3.7.2	Phase II: Volltreffer mit Ansage .....	118
3.7.3	Doppelmutanten mit EhADH1(L268F) als Ausgangsvariante.....	121
4.	Diskussion .....	124
4.1	Anwendungspotential der SmuA-Mutanten für die biotechnologische Herstellung von Isomalt .....	124
4.2	Molekulare Optimierung der Saccharose-Isomerase SmuA .....	125
4.3	Die Rolle des NAD <sup>+</sup> und NADP <sup>+</sup> im bakteriellen Metabolismus .....	131
4.4	Die Acetaldehyddehydrogenase EcALDH aus <i>Escherichia coli</i> .....	132
4.5	Molekulare Optimierung der Alkoholdehydrogenase EhADH1 .....	133
5.	Zusammenfassung.....	136
6.	Abkürzungsverzeichnis .....	138
7.	Literaturverzeichnis.....	140

# 1. Einleitung

## 1.1 Die industrielle Bedeutung der Disaccharide Saccharose und Isomaltulose

Das Disaccharid Saccharose ( $\alpha$ -D-glucosylpyranosyl-1,2- $\beta$ -D-fructofuranosid) ist aus je einem Molekül Glucose und Fructose, die  $\alpha$ -1,2-glykosidisch verknüpft sind, zusammengesetzt. Natürlicherweise wird Saccharose aus UDP-Glucose und Fructose-6-Phosphat in der Pflanzenzelle synthetisiert und in bestimmten Kompartimenten, wie beispielsweise der Sprossachse oder Wurzel, angereichert (Nelson and Cox, 2009). Gemeinhin bekannt als „Rohrzucker“ oder „Haushaltszucker“, wird es industriell aus Zuckerrüben, Zuckerrohr und Zuckerpalmen gewonnen und vorwiegend als Süßungsmittel eingesetzt (Raven *et al.*, 2006).

Die günstige Produktion, und der damit verbundene umfangreiche Einsatz in der Lebensmittelindustrie, birgt jedoch einige Nachteile. Gesundheitliche Probleme wie Zahnkaries, Übergewicht, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen stehen in direktem Zusammenhang mit einem übermäßigen Verzehr dieses Süßungsmittels. Zahnkaries verursachende Bakterien sind in der Lage, Saccharose zu verstoffwechseln, was wiederum die Synthese von Glucanen fördert. Diese erleichtern eine Anhaftung der Mikroorganismen an den Zahnschmelz, mit der Folge verstärkter Kariesbildung (Hamada, 2002). Dieser Umstand wie auch die erhöhte Inzidenz von Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen, als direkte Folge von Übergewicht, schürten die Nachfrage nach alternativen Süßungsmitteln.



**Abbildung 1:** Chemische Struktur der Saccharose und ihrer Isomere Isomaltulose und Trehalulose.

Wohletablierte Alternativen sind die Saccharose-Isomere Isomaltulose (Palatinose,  $\alpha$ -D-glucosylpyranosyl-1,6-D-fructofuranose) und Trehalulose ( $\alpha$ -D-glucosyl-pyranosyl-1,1-D-fructofuranose) dar (Abb. 1). Mit einer 1,6-glykosidischen Bindung zwischen den Monomeren ist Isomaltulose in der Natur in Honig und Zuckerrohr zu finden (Lina *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu Saccharose erfolgt die hydrolytische Spaltung von Isomaltulose im Dünndarm deutlich langsamer. Dies führt sowohl zu einer verlängerten Glucose- und Energiebereitstellung als auch zu einer erniedrigten glykämischen und insulinämischen Antwort des Körpers. Des Weiteren sind Mundbakterien nicht in der Lage, Isomaltulose als Nährstoff zu verstoffwechseln, was wiederum die Plaque- und Kariesbildung signifikant reduziert (Hamada, 2002). Das Disaccharid ist weder mutagen oder toxisch, noch führt es zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen wie Magenschmerzen oder Diarrhoe (Lina *et al.*, 2002, Lina *et al.*,

1997). Zudem konnte eine gesteigerte Konzentrationsfähigkeit nach einem Verzehr von Palatinose festgestellt werden (Krastanov *et al.*, 2007).

Zwar kann Isomaltulose direkt als Zuckerersatzstoff eingesetzt werden, dennoch wird der Großteil der industriell gewonnenen Isomaltulose zur Produktion von Isomalt eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Zuckeralkohol, der zu gleichen Teilen aus 1-O- $\alpha$ -D-glycopyranosyl-D-sorbitol und 1-O- $\alpha$ -D-glycopyranosyl-D-mannitol zusammengesetzt ist (Schiweck *et al.*, 1990). Technisch wird Isomalt in einem Zwei-Stufen-Prozess hergestellt, beginnend mit der Umsetzung von Saccharose zu Isomaltulose und der anschließenden Hydrierung mit einem Raney-Nickel-Katalysator (Rose and Kunz, 2002). Isomalt zeigt im Vergleich zu Isomaltulose eine verringerte Hygroskopie bei gleichbleibender Süßkraft und ist mit der europäischen Zulassungsnummer E953 als Lebensmittelzusatzstoff deklariert (Mortensen, 2006).

Isomalt wird in Biermischgetränken (Dörr *et al.*, 2005), Sportlernahrung oder aber auch in Süßigkeiten wie Kaugummis oder Bonbons (Lee *et al.*, 1994) eingesetzt. Als niedrig-glykämischer Zuckerersatzstoff mit einer hohen Energielangzeitversorgung ist Isomaltulose ideal für Diabetiker geeignet. Die Anwendungsgebiete sind jedoch nicht nur auf die Lebensmittelindustrie beschränkt. Beispielsweise wird Isomalt auch als Bindemittel bei der Tablettenherstellung in der Pharmaindustrie eingesetzt (Sáska *et al.*, 2010).

Als reduzierender Zucker ist Isomaltulose im Gegensatz zu Saccharose von großem Interesse für die chemische Industrie bezüglich des Einsatzes als Bulkchemikalie (Schiweck *et al.*, 1990). Die katalytische (Parpot *et al.*, 2010) oder mikrobielle (Noll-Borchers and Kunz, 1994) Oxidation verwandelt Isomaltulose in einen reaktiven Ausgangsstoff. Zudem liefert eine reduktive Aminierung zu einem Diamin Bausteine für die Synthese von Polyharnstoffen (Noll-Borchers and Kunz, 1994). Derartige Polymere finden Einsatz in der Pharma- und Kosmetikindustrie, wegen ihrer biologischen Abbaubarkeit und Hautverträglichkeit, aber auch als Tenside in der Waschmittelindustrie (Cartarius *et al.*, 2003, Desai, 1990). Dies veranschaulicht die zunehmende Bedeutung von Isomaltulose in der grünen Chemie einhergehend mit einem gesteigerten Interesse an Saccharose als günstigem, nachhaltigem Rohstoff zu dessen Produktion.

Industriell wird Isomaltulose durch enzymatische Umwandlung von Saccharose zu Palatinose mit Hilfe von immobilisierten Zellen des Bakterienstamms *Serratia plymuthica* in einem Festbettreaktor gewonnen (Rose and Kunz, 2002). Das patentrechtlich geschützte Verfahren der Südzucker AG beginnt mit der Kultivierung der Zellen bei 30 °C bei einem pH-Wert von 7,2, gefolgt von der Immobilisierung in Calcium-Alginat und Transfer in den Reaktor. Die 40 %ige Saccharose-Substratlösung mit einem pH-Wert von 6,0 wird in den Reaktor geleitet und die gebildete Isomaltulose anschließend durch Evaporation und Kristallisation vom Medium getrennt (Rose and Kunz, 2002). Das durch die enzymatische Umsetzung von Saccharose erhaltene Zuckergemisch beinhaltet neben dem Hauptprodukt Isomaltulose (79 – 84,5 %) und Resten des Substrats Saccharose (0,5 – 1,0 %) als nennenswerte Nebenprodukte Trehalulose (9,0 – 11,0 %), Fructose (2,5 – 3,5 %), Glucose (2,0 – 2,5 %) sowie das

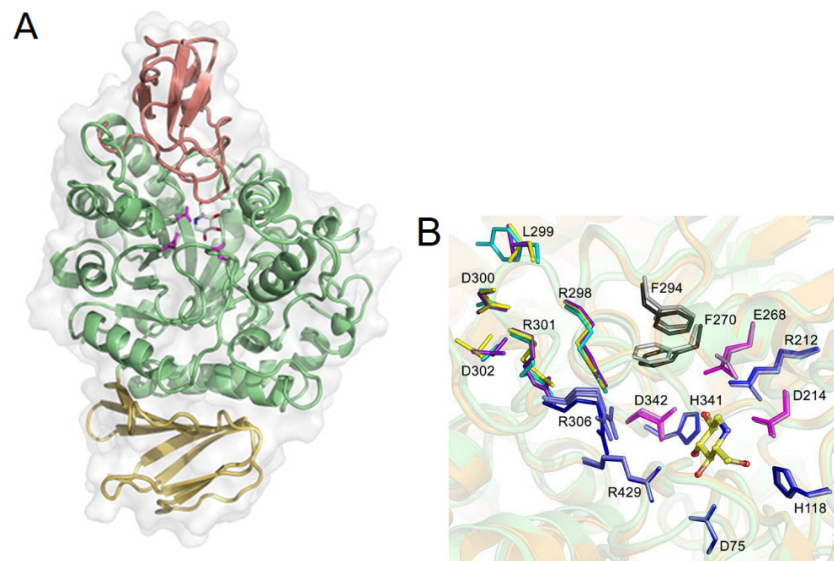
Trisaccharid Isomelezitose (0,5 %). Diese Verunreinigungen verteuern den Herstellungsprozess durch höheren Aufwand für Aufarbeitungsprozesse (Rhimi *et al.*, 2008, Rose and Kunz, 2002). Zudem weist Trehalulose aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften eine verringerte Rieselfähigkeit auf, was die Herstellung eines homogenen kristallinen Produkts vor allem an einem Standort mit hoher Luftfeuchtigkeit erschwert (Ooshima *et al.*, 1991). Die Fähigkeit des Bakteriums *Serratia plymuthica*, die Isomerisierung von Saccharose zu Isomaltulose zu katalysieren, beruht auf einem für diese Reaktion spezifischen Enzym: SmuA (Weidenhagen and Lorenz, 1957). SmuA stellt die erste isolierte Saccharose-Isomerase dar. Nach Jahren der Forschung wurden spezifische Saccharose-Isomerasen in weiteren Organismen identifiziert und charakterisiert: PadU aus *Pantoea dispersa* (Wu and Birch, 2004), MutB aus *Pseudomonas mesoacidophila* (Watzlawick and Mattes, 2009), NX-5 aus *Erwinia rhapontici* (Li *et al.*, 2011) und eine weitere aus *Klebsiella planticola* (Wu and Birch, 2005). Zudem konnte in *Trialeurodes vaporariorum* eine Saccharose-Isomerase gefunden werden, die ausschließlich Trehalulose produziert (Salvucci, 2003). Abhängig von Kulturmedium, pH-Wert und Temperatur weist jede analysierte Saccharose-Isomerase ein spezifisches Produktspektrum bestehend aus Isomaltulose, Trehalulose, Glucose und Fructose auf (Lipski *et al.*, 2010).

Bezüglich des biologischen Nutzens von Isomaltulose für die Bakterienzelle bestehen drei Hypothesen: (1) Da nur wenige Mikroorganismen in der Lage sind, eine Saccharose-Isomerase zu exprimieren, könnte Isomaltulose eine exklusive Reserve bei Nährstoffmangel bieten. (2) Außerdem ist denkbar, dass es bestimmten Mikroorganismen als Selektionsvorteil dient, Saccharose schnell in Isomaltulose und anschließend durch eine Isomaltase weiter verstoffwechseln zu können. Dadurch würden sie anderen Organismen Saccharose als Energiequelle entziehen (Börnke *et al.*, 2001, Cheetham *et al.*, 1982, Rhimi *et al.*, 2008). (3) Zudem wurde Isomaltulose als Osmoprotektant postuliert, welches *Sinorhizobium meliloti* hilft, osmotischem Stress unter hyperosmotischen Bedingungen zu widerstehen (Gouffi *et al.*, 1999).

## 1.2 Die Saccharose-Isomerase SmuA aus *Serratia plymuthica*

Das Enzym SmuA, auch als PalI oder  $\alpha$ -Glucosyltransferase bezeichnet, ist als Isomerase klassifiziert und taxonomisch der Glykosylhydrolase-Familie 13 zugeordnet. Diese Familie umfasst bekannte Enzyme wie die Speichel-Amylase oder die Cyclomaltodextrinase, welche die Spaltung von glykosidischen Bindungen katalysieren. SmuA gehört zur Unterklasse der intramolekularen Transferasen (5.4) mit Transfer anderer Gruppen (5.4.99) und schließlich zu der Unterklasse Isomaltulosesynthase (5.4.99.11) (Aghajari *et al.*, 2009). Die Bildung von Isomaltulose und Trehalulose verläuft in einem zweistufigen Reaktionsmechanismus (Abb. 3). Zunächst wird das Substrat Saccharose in die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose gespalten. Glucose bleibt in der Bindetasche von SmuA als O-glykosidisches Addukt mit Asp214 gebunden, wohingegen der Fructose-Rest eine Änderung seiner Orientierung durchläuft, worauf eine erneute glykosidische Bindung, in Form von  $\alpha$ -

1,6 für Isomaltulose und  $\alpha$ -1,1 für Trehalulose, gebildet wird. Alternativ kann die Freisetzung der Glucose erfolgen, was zu den Hydrolyseprodukten führt (Veronese and Perlot, 1998, Watzlawick and Mattes, 2009).

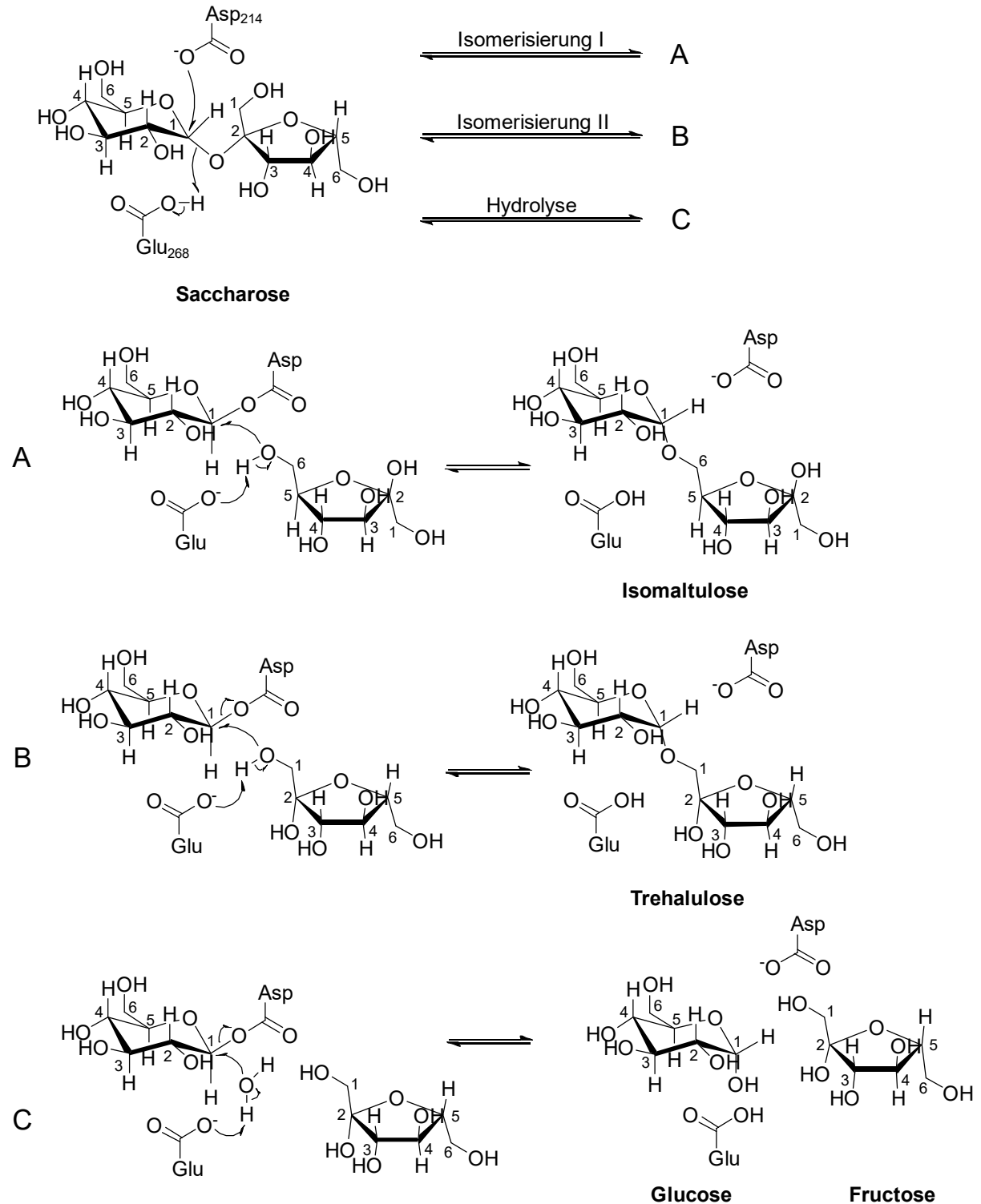


**Abbildung 2:** Struktur der Saccharose-Isomerase SmuA aus *Serratia plymuthica* (PDB-ID: 3GBE). (A) Struktur von SmuA mit der N-terminalen katalytischen Domäne in Grün, der Subdomäne in Rot und der C-terminalen Domäne in Gelb. (B) Überlagerung der wichtigsten strukturellen Determinanten im aktiven Zentrum von SmuA und MutB (PDB-ID: 2PWE) aus *Pseudomonas mesocacidophila* (Ravaud *et al.*, 2009).

Das Temperaturoptimum der bekannten Saccharose-Isomerasen liegt im Bereich zwischen 30 und 40 °C. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur steigert die hydrolytische Bildung der Monosaccharide, wohingegen eine Verringerung der Temperatur (< 25 °C) eine erhöhte Trehalulose-Produktion gegenüber der Isomaltulose zur Folge hat. Dies kann mit der erhöhten Beweglichkeit der Fructose begründet werden, die im Vergleich zu Glucose durch weniger Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen im aktiven Zentrum gebunden ist. Daher begünstigen höhere Temperaturen eine Diffusion der Fructose aus der Bindetasche. Des Weiteren ist die Produktspezifität durch Ladungsänderung um das katalytische Zentrum beeinflussbar. Höhere pH-Werte, über dem optimalen Bereich von pH 6 - 7 resultieren in einer erhöhten Trehalulose-Produktion, wohingegen niedrigere pH-Werte die Bildung der Monosaccharide begünstigen (Zhang *et al.*, 2003, Wu and Birch, 2005). Weitere Parameter wie die Substratkonzentration (Kawaguti *et al.*, 2010), die Immobilisierungsmethode (Krastanov and Yoshida, 2003) und die Glucose-Konzentration (Veronese and Perlot, 1998) spielen ebenfalls eine Rolle.

Bis dato weist die Saccharose-Isomerase PadU aus *Pantoea dispersa* UQ68J mit 91 % Isomaltulose und 3 % Trehalulose die höchste prozentuale Ausbeute an Isomaltulose auf (Wu and Birch, 2004). SmuA stellt mit 86 % Isomaltulose und 9 % Trehalulose den zweitbesten Produzenten dar (Nakajima, 1984). 1957 wurden das Enzym SmuA (GenBank ID: CQ765963) und sein Wirtsorganismus *Serratia plymuthica* zum ersten Mal isoliert (Weidenhagen and Lorenz, 1957). SmuA ist ein Protein mit 67,3 kDa, bestehend aus 573 Aminosäuren (UniProt ID: D0VX20) einschließlich einer 27 Aminosäuren

langen N-terminalen Signalsequenz zur periplasmatischen Sekretion (Lee *et al.*, 2008). Das Enzym besitzt keine Cysteinreste und daher auch keine Disulfidbrückenbindungen. Bezüglich des Oligomerisierungszustandes sind keine Informationen in der Literatur zu finden.



**Abbildung 3:** Reaktionsmechanismus der Saccharose-Isomerase SmuA. Das Schema zeigt die drei möglichen Reaktionspfade ausgehend von Saccharose als Substrat mit den resultierenden Endprodukten Isomaltulose (Isomerisierung I), Trehalulose (Isomerisierung II), Glucose und Fructose (Hydrolyse) (Veronese and Perlot, 1998).

Die Aufklärung der Kristallstruktur diverser Saccharose-Isomerasen unter anderem SmuA aus *Serratia plymuthica* (Ravaud *et al.*, 2006), MutB aus *Pseudomonas mesocacidophila* MX-45 (Ravaud *et al.*, 2007), Pall aus *Klebsiella sp.* LX3 (Zhang *et al.*, 2003) und NX-5 aus *Erwinia rhapontici* (Xu *et al.*, 2013), ermöglichte eine detaillierte Untersuchung sowohl der Enzym-Substrat-Bindung als auch des Reaktionsmechanismus. Diese Strukturhomologe weisen drei Domänen auf, eine katalytische ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-Domäne (TIM-Barrel-Domäne) am N-Terminus, eine Loop-reiche Subdomäne und eine  $\beta$ -Sandwich-Domäne am C-Terminus (Abb. 2) (Ravaud *et al.*, 2009). Die Kristallstruktur von SmuA wurde im nativen Zustand wie auch im Komplex mit dem kompetitiven Inhibitor Deoxynojirimycin, einem Glucose-Analogen, aufgeklärt (Ravaud *et al.*, 2006).

Die Aminosäuren His118, Asp214, Glu268, His341 und Asp342 sind in  $\alpha$ -Glukosidasen der Familie 13 hoch konserviert und für die Hydrolyse der glykosidischen Bindung zuständig (Schonert *et al.*, 1998). Wesentlich für den Ablauf des Reaktionsmechanismus ist die katalytische Triade bestehend aus zwei Asparaginsäureresten (Asp214, Asp342) und einer Glutaminsäure (Glu268). Dabei agiert Asp214 als Nucleophil, Asp342 ist an der Stabilisierung des Übergangszustands beteiligt und Glu268 dient als Protonendonator und -akzeptor (Veronese and Perlot, 1998). Asp214 und Asp342 interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen mit N-5 und O-2 des Inhibitors Deoxynojirimycin. Der Protonendonator Glu268 wechselwirkt in der vorliegenden Kristallstruktur hingegen nur mit einem Wassermolekül (Ravaud *et al.*, 2007).

Das in der Nähe des aktiven Zentrums befindliche Motiv <sup>298</sup>RLDRD<sup>302</sup> ist von entscheidender Bedeutung für die Saccharose-Isomerisierung und wird daher als „Isomerisierungsmotiv“ bezeichnet (Thompson *et al.*, 2001). Die in diesem Motiv vorhandenen Reste Arg298 und Arg301 sind durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Fructose an der Stabilität des Enzym-Substrat-Intermediats maßgeblich beteiligt (Lee *et al.*, 2008).

Weitere bedeutsame strukturelle Determinanten innerhalb des aktiven Zentrums sind die beiden Phenylalaninreste Phe270 und Phe294. Die sogenannte *Aromatic Clamp* ist in ihrer Funktion als „Gate Keeper“ für die Kontrolle der Substrataufnahme und Produktfreisetzung verantwortlich (Ravaud *et al.*, 2009). Ein Vergleich der nativen mit der inhibitor gebundenen Kristallstruktur von SmuA zeigt, dass die Bindung des Substratinhibitor die Enzymstruktur nicht wesentlich verändern sollte.

Bisherige Versuche, das Produktspektrum von SmuA zu Gunsten von Isomaltulose zu verschieben, beschränken sich auf Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum und führten zu signifikanten Verlusten an Enzymaktivität wie auch zu erhöhter Trehalulose- und Monosaccharid-Produktion (Aroonual *et al.*, 2007). Mehrere Forschergruppen konzentrierten sich auf das „Isomerisierungsmotiv“ <sup>298</sup>RLDRD<sup>302</sup>, sowohl in SmuA als auch in anderen Saccharose-Isomerasen. Substitution der Argininreste gegen Aspartat, Alanin, Lysin und Glutamin führten zu deutlichen Verlusten der Enzymaktivität und Isomaltulose-Produktion (Lee *et al.*, 2008, Aroonual *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2013). Auch die *Aromatic Clamp* war Ziel von Mutagenesestudien. Ein Austausch einer oder beider Phenylalaninreste gegen Alanin bewirkte einen vollständigen Verlust der Isomerisierungsaktivität (Ravaud *et al.*, 2007, Xu *et al.*,

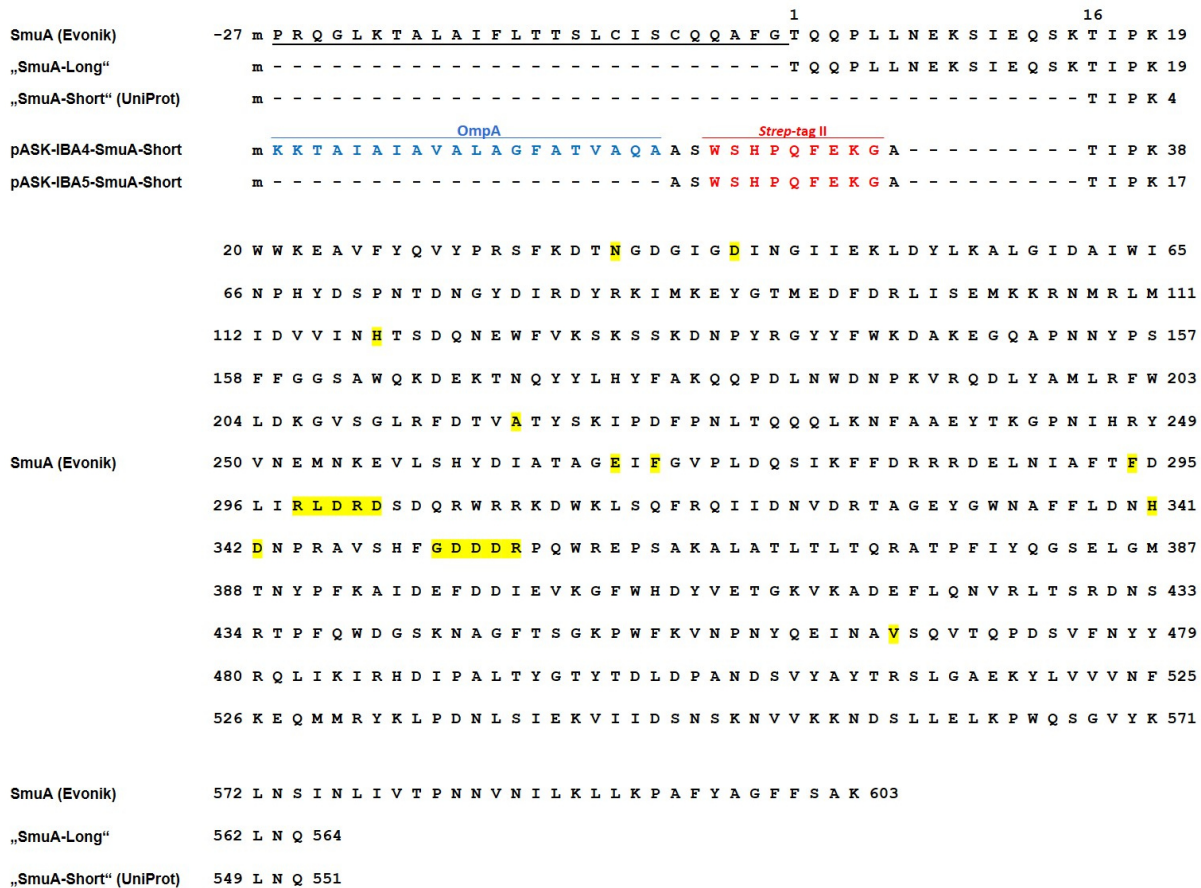
2013). Ebenso blieben Optimierungsversuche mit der Trehalulose-Synthase MutB erfolglos, da verschiedene Substitutionen in der ersten und zweiten Schale um die Bindetasche eine gesteigerte Isomaltulose-Produktion bewirkten (Watzlawick and Mattes, 2009). Demnach ist bis zur vorliegenden Arbeit keine SmuA-Variante mit einem hinsichtlich der Isomaltulose verbesserten Produktspektrum beschrieben worden.

### 1.3 Entwicklung eines effektiven Expressionssystems für SmuA in *E. coli*

Die Charakterisierung der Saccharose-Isomerase SmuA am Lehrstuhl für Biologische Chemie begann im Jahr 2012 im Rahmen eines Praktikums von Herrn Andreas Kratzert (Kratzert, 2012) und der Bachelorarbeit von Frau Theresa Bäcker (Bäcker, 2012) unter Betreuung von Herrn Dr. Stefan Gilch. SmuA konnte bei dem Kooperationspartner von Evonik Industries zuvor nicht in funktioneller Form in *E. coli* exprimiert werden. Eine genauere Analyse der Aminosäuresequenz legte einige Unterschiede zwischen der von Evonik veranlassten Gensynthese und der in der PDB- und UniProt-Datenbank (ID: 3GBE bzw. D0VX20) hinterlegten Aminosäuresequenzen offen. Die Aminosäuresequenz von Evonik Industries wies im Vergleich zur maturen Sequenz (UniRef Cluster ID: A0A3S4FIF3) eine Verlängerung am N-Terminus von 42 Aminosäuren und am C-Terminus von 28 Aminosäuren auf (Abb. 4). Des Weiteren war ein zusätzlicher Aspartatrest an Position 353 inseriert: <sup>351</sup>GDDDR<sup>355</sup> (US-Patent: US8790900B2). Bei den ersten 27 N-terminalen Aminosäuren handelte es sich um die natürliche Signalsequenz zur periplasmatischen Genexpression in *S. plymuthica*. Diese und die nachfolgenden 15 Aminosäuren wurden zunächst in der Variante „SmuA-Short“ entfernt, um die gleiche Aminosäuresequenz zu generieren, wie sie in der UniProt-Datenbank zu finden ist. Ungewöhnlicherweise wurde im Falle von SmuA dort nicht die mature Aminosäuresequenz hinterlegt, sondern eine mit <sup>16</sup>TIPK<sup>19</sup> beginnende Sequenz, welche wiederum der Sequenz der gelösten Kristallstruktur in PDB entspricht (Abb. 4).

Das entsprechende Strukturgen wurde auf dem Vektor pASK-IBA5(+) mit N-terminalem *Strep*-tag II kloniert mit dem Ziel der cytoplasmatischen Genexpression in *E. coli* und Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC) (Schmidt and Skerra, 2007). Die höchste Ausbeute an löslichem Protein wurde bei einer Genexpression bei 16 °C für 22 h mit einer Induktorkonzentration von 20 mg/L Anhydrotetracyclin (aTc) erzielt. Aufgrund des relativ geringen Anteils an löslichem Protein in Höhe von nur 50 % wurde der Versuch unternommen die Löslichkeit durch Konstruktion der Variante „SmuA-Long“ zu erhöhen. Da die Aminosäuresequenz der kristallisierten Struktur (PDB-ID: 3GBE) am N-Terminus mit Aminosäure 16 beginnt (Ravaud *et al.*, 2006), wurde ursprünglich eine flexible Struktur des vorrausgehenden Sequenzabschnitts vermutet. Mit der Konstruktion der um 15 Aminosäuren verlängerten Mutante „SmuA-Long“ sollte die Rolle des kompletten nativen N-Terminus untersucht werden (Abb. 4). Nachfolgend wurde in beiden Eingangsversionen der Effekt des inserierten Asp353 in der Oberflächenschleife <sup>351</sup>GDDDR<sup>355</sup> studiert (Bäcker, 2012).





**Abbildung 4:** Alignment der Sequenzen von SmuA (Uniprot ID: D0VX20) für verschiedene Konstrukte aus den Vorarbeiten (siehe Text). Unterstrichen wurde die Signalsequenz zum periplasmatischen Transport der natürlichen Aminosäuresequenz aus *S. plymuthica* (UniRef Cluster ID: A0A3S4FIF3) nach Analyse mittels SignalP. Gelb: Literaturbekannte Aminosäurereste von katalytischer oder proteinbiochemischer Bedeutung. Blau: OmpA-Sequenz des Plasmids pASK-IBA4(+). Rot: *Strep*-tag II.

Die beschriebenen SmuA-Versionen wurden in Bezug auf Proteinausbeute, Löslichkeit und Enzymaktivität charakterisiert. Die höchste Ausbeute an löslichem Protein konnte mit „SmuA-Short“ und „SmuA-Long“ ohne das zusätzliche Asp353 erzielt werden. Überraschenderweise verringerte die Insertion von Asp353 den löslichen Anteil des Enzyms auf unter 5 % und eliminierte die Enzymaktivität vollständig.

Ausgehend von den Ergebnissen von Frau Theresa Bäcker bestand das Ziel der nachfolgenden Masterarbeit von Frau Judith Seiboth (Seiboth, 2013) in der Löslichkeitsverbesserung von SmuA. Da das rekombinante Protein „SmuA-Long“ ein signifikant schlechteres Genexpressionsverhalten zeigte, wurde „SmuA-Short“ als Grundlage für die Mutagenese-Strategie gewählt. Durch Analyse der publizierten Kristallstruktur (Ravaud *et al.*, 2005) wurden oberflächenexponierte hydrolytische aliphatische Aminosäureseitenketten identifiziert und gegen geladene Reste ausgetauscht. Dadurch konnte der Anteil an löslichem Protein bei cytoplasmatischer Genexpression mit der Mutante V465E auf 73 % erhöht werden. Zudem zeigte diese Variante mit 19,5 mg/L die höchste Ausbeute an rekombinantem Protein (Seiboth, 2013).

Obwohl SmuA in der Vergangenheit schon Gegenstand von Untersuchungen durch mehrere Forschergruppen war (Ravaud *et al.*, 2009, Rhimi *et al.*, 2008), konnte bis zum aktuellen Zeitpunkt eine

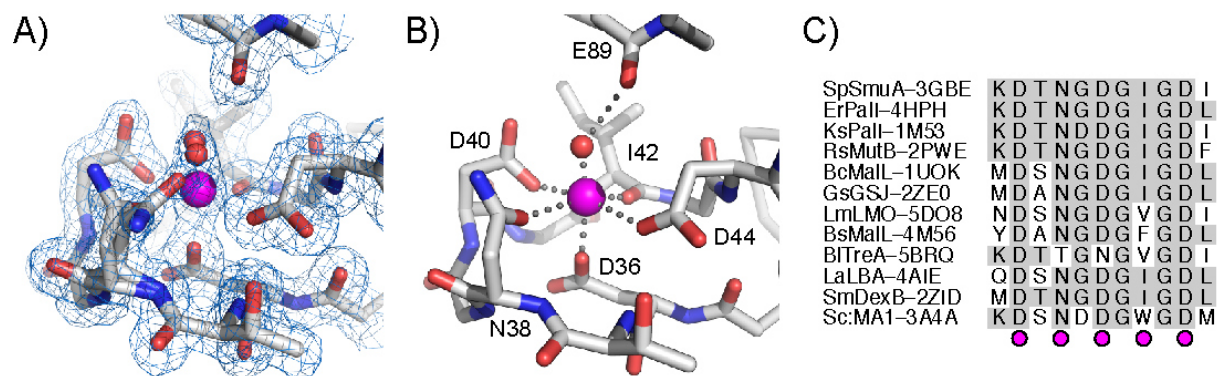
derartige Erhöhung der Löslichkeit durch einen einzelnen Aminosäureaustausch nicht erreicht werden. Dank dieser Verbesserungen an der Gen- und Aminosäuresequenz in Bezug auf Proteinausbeute und -löslichkeit war es nun möglich, den Fokus auf die Optimierung des Produktspektrums zu lenken, ausgehend von der Version „SmuA-Short“(V465E).

## 1.4 Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von SmuA

Nach der cytoplasmatischen Genexpression in *E. coli* lag der Hauptanteil an SmuA als Dimer vor und nur ein geringer Anteil als Monomer. Hinweise auf die Existenz eines SmuA-Dimers waren bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur nicht zu finden. Auch die in der PDB hinterlegte Kristallstruktur wurde als Monomer aufgeklärt (Ravaud *et al.*, 2006), wobei das verwendete Expressionssystem nicht klar dokumentiert ist.

Bemerkenswerterweise unterschied sich das Dimerisierungsverhalten von „SmuA-Short“(V465E) und „SmuA-Short“ nicht. Im Falle der entsprechend dem murenen N-Terminus um 15 Aminosäuren längere Variante „SmuA-Long“ konnte keine klare Trennung beider Spezies in der SEC erreicht werden. Veränderungen der Laufpufferzusammensetzung der SEC zeigten keinen Einfluss auf das Monomer-Dimer-Verhältnis. Nach Untersuchung von Faktoren wie pH-Wert, Salzgehalt und Art der Puffersubstanz wurde geschlussfolgert, dass sich das Verhältnis zwischen Monomer und Dimer bereits während der Genexpression einstellt und anschließend nicht verändert. Eine genauere Betrachtung und erneute Verfeinerung der Kristallstruktur von SmuA durch Herrn Dr. André Schiefner am Lehrstuhl für Biologische Chemie offenbarte die Existenz einer bislang nicht beschriebenen Calciumbindestelle, wie sie typischerweise in anderen Enzymen der Glykosylhydrolase-Familie 13 zu finden ist (Abb. 5), beispielsweise bei den Saccharose Isomerasen MutB und PadU (Wu and Birch, 2005). In der von Ravaud *et al.* (2006) publizierten Kristallstruktur von SmuA war anstelle des Metallions ein Wassermolekül modelliert. Mutationen an den für die Ausbildung dieser Bindestelle verantwortlichen Aminosäuren, Asp44 zu Lysin und Asn38 zu Aspartat, verringerten die Löslichkeit des Enzyms auf 8 %, was die Bedeutung dieser in einer Schleifenregion angesiedelten Calciumbindestelle für die korrekte Proteinfaltung nahe legte (Seiboth, 2013).

Zugabe von Calcium in das Kulturmedium hatte keinen Einfluss auf das Dimerisierungsverhalten. Das Monomer/Dimer-Verhältnis betrug weiterhin 1:3. Dies ist wenig überraschend, denn aufgrund eines streng regulierten Imports liegt die Calciumkonzentration im Cytoplasma von *E. coli* bei nur 90 nM (Gangola and Rosen, 1987). Daher wurde „SmuA-Short“ zur periplasmatischen Genexpression auf dem Vektor pASK-IBA4(+) mit der N-terminalen OmpA-Signalsequenz kloniert. Die darauffolgende Biosynthese im Periplasma unter Zugabe von 1 mM Calciumacetat zum Kulturmedium veränderte den Oligomerisierungszustand erheblich zu Gunsten des Monomers. Das Verhältnis Monomer:Dimer verlagerte sich auf 10:1 bei Calcium-Zugabe. Dies bestätigte die zuvor aufgestellte Hypothese der essentiellen Rolle des Calcium-Ions für die korrekte Faltung von SmuA.

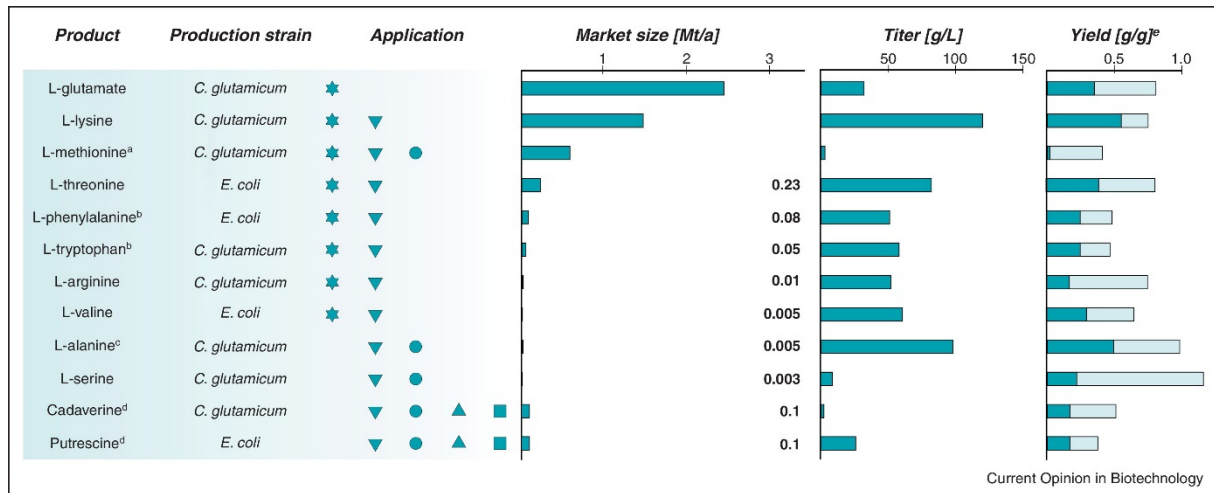


**Abbildung 5:** Calcium-Bindestelle in SmuA. (A) Proteinkristallographische Verfeinerung der Calciumbindestelle basierend auf den in der PDB hinterlegten Strukturfaktoren (PDB ID: 3GBE). Die  $2F_o - F_c$  Elektronendichtekarte (blaues Gitter) ist bei  $1 \sigma$  konturiert. Diese deutet auf eine 50 %-ige Besetzung des gebundenen Calcium-Ions (magenta) hin sowie auf zwei alternative Konformationen von Asn38 bzw. Positionen des Wassermoleküls (rot), abhängig von der An- bzw. Abwesenheit des Calcium-Ions. (B) Koordinationssphäre der Calciumbindestelle, in der Asn38 und das Wassermolekül jeweils eine besondere Konformation/Position einnehmen. (C) Alignment der Aminosäuresequenzen der Calciumbindestelle von SmuA mit strukturell verwandten Enzym-Sequenzen aus der PDB. Die Sphären (magenta) markieren die für die Koordination des Metallions verantwortlichen Aminosäurereste. Asp36, Gly41, Gly43 und Asp44 sind hochkonserviert, wohingegen Asn38, Asp40 und Ile42 durch Thr oder Asn substituiert sein können.

Zur weiteren Untersuchung des Effekts von Calcium-Ionen auf den Oligomerisierungszustand von SmuA wurde Calciumacetat auch dem Laufpuffer der Größenausschlusschromatographie zugegeben, wobei allerdings keine Veränderung des Monomer/Dimer-Verhältnisses mehr zu beobachten war. (Seiboth, 2013). Nachdem der Dimerisierungszustand von SmuA offenbar im Verlauf der Proteinfaltung festgelegt wurde, war kein weiterer Einfluss von Calcium-Ionen auf die Löslichkeit oder Enzymaktivität zu beobachten. Hinsichtlich der enzymatischen Aktivität und des Produktspektrums wurde kein Unterschied zwischen Monomer und Dimer beobachtet. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine ausreichende Konzentration an Calcium-Ionen für eine korrekte Proteinfaltung und Ausbildung der offenbar physiologisch aktiven Monomerform essentiell ist. Für die Entschlüsselung der Ursachen und der Stabilität der Dimer-Bildung sowie -aktivität bei unzureichender Calcium-Konzentration sind weiterführende Faltungsstudien von Nöten.

## 1.5 Wege zur biotechnologischen Produktion von L-Lysin

Mit der Zunahme der Weltbevölkerung steigt neben Kohlenhydraten auch der Bedarf an proteinreichen Nahrungsmitteln. Aufgrund der begrenzten landwirtschaftlichen Nutzfläche ist eine Versorgung durch konventionellen Ackerbau in Zukunft nicht garantiert, was die Nachfrage nach alternativen Produktionsmethoden erhöht. Bereits heute erfolgt die Herstellung der meisten Aminosäuren biotechnologisch durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen. Dies hat gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, dass selektiv die biologisch aktiven L-Aminosäuren gewonnen werden können (Becker and Wittmann, 2012). Den größten Marktanteil haben in dieser Hinsicht die in *Corynebacterium glutamicum* produzierten Aminosäuren L-Glutamat (2,4 Mt/a), L-Lysin (1,5 Mt/a) und L-Methionin (0,5 Mt/a) mit einem mittleren Marktwachstum von 6-8 % pro Jahr (Abb. 6).



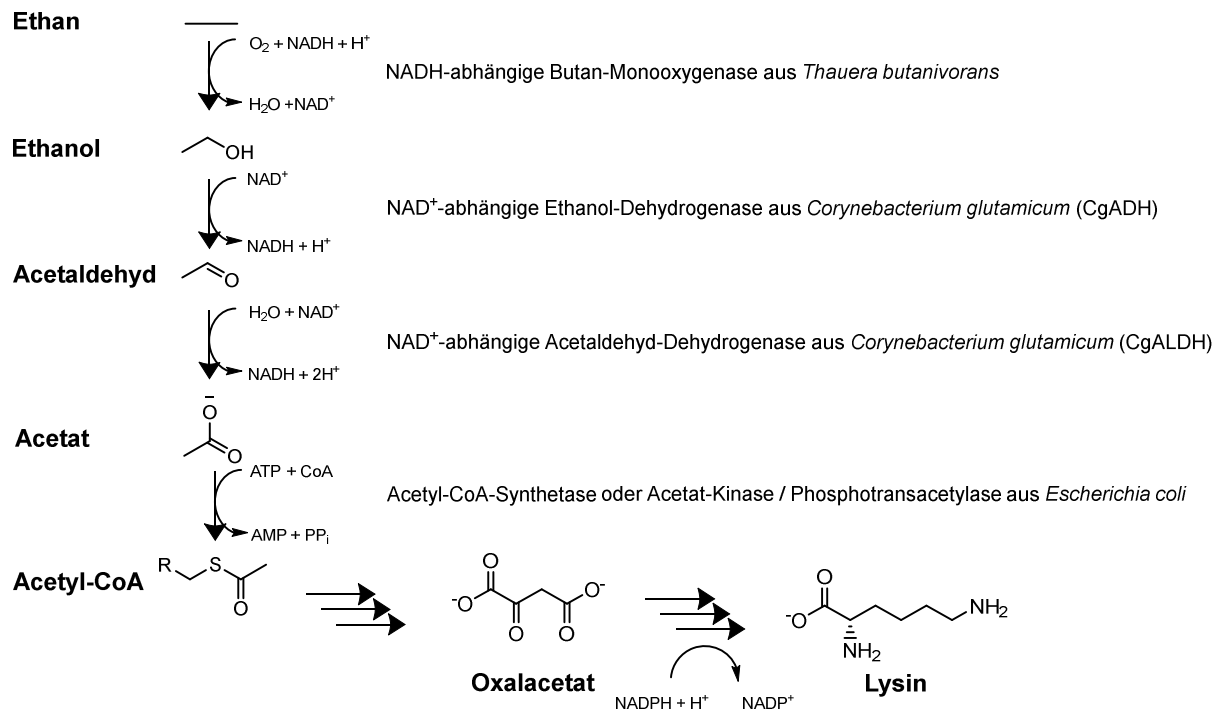
**Abbildung 6:** Übersicht über die mit *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* hergestellten Aminosäuren und chemisch verwandten Verbindungen und Anwendungsfelder der Produkte in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie ★; Gesundheits- und Hygienebereich ▼; Ackerbau ●; Textil- und Verpackungsindustrie ▲; Transport- und Energieindustrie ■. Angegeben sind zudem das Marktvolumen in Mt/a, der Titer in g/L und die Ausbeute in g/g pro eingesetztem Substrat eines jeden Produktes.

*Corynebacterium glutamicum* ist ein nicht-pathogenes, fakultativ anaerobes, Gram-positives Bodenbakterium, das verbreitet in der biotechnologischen Industrie eingesetzt und zudem als Modellorganismus für das Studium verwandter und klinisch relevanter Bakterien dient, wie pathogene Corynebakterien oder Mykobakterien (Auchter *et al.*, 2011). Die industrielle Produktion basiert auf Fermentationsprozessen, in denen vorwiegend Glucose als Energiequelle genutzt wird. Wesentlich für die effiziente Nutzung dieses Mikroorganismus ist die maßgeschneiderte Optimierung auf ein spezifisches Produkt. Dabei werden heute Methoden des *Systems Metabolic Engineering* und der Synthetischen Biotechnologie eingesetzt (Sawada *et al.*, 2010, Becker *et al.*, 2011, Bolten *et al.*, 2010). *C. glutamicum* ist in der Lage, auf einer Vielzahl von Zuckern und organischen Säuren zu wachsen, unter anderem auf Ethanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (Kotrbova-Kozak *et al.*, 2007). Dennoch beeinträchtigt eine zu hohe Ethanol-Konzentration die Zellvitalität durch Schädigung der Zellmembran und dem damit verbundenen Verlust von Ionen, Nukleotiden oder Proteinen. Eine Permeabilisierung der Zellmembran ist bereits ab 10 % Ethanol zu beobachten (Ingram, 1989).

Bei niedrigen Ethanol-Konzentrationen wird dessen Verstoffwechslung durch zwei Enzyme ermöglicht. *C. glutamicum* besitzt hierfür eine Alkohol-Dehydrogenase (CgADH), welche die NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation ( $K_M = 250 \mu\text{M}$ ) von Ethanol ( $K_M = 160 \mu\text{M}$ ) zu Acetaldehyd katalysiert. Das Produkt wird anschließend in einer weiteren NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion zu Acetat oxidiert, welches in den Citratzyklus Eingang findet. Das hierfür zuständige Enzym ist die Acetaldehyd-Dehydrogenase (CgALDH), die einzige funktionelle ALDH ( $K_M$  für Acetaldehyd =  $360 \mu\text{M}$ ) in *C. glutamicum* (Auchter *et al.*, 2011). Als Kofaktor präferiert es NAD<sup>+</sup> ( $K_M = 180 \mu\text{M}$ ) gegenüber NADP<sup>+</sup> ( $K_M = 1,8 \text{ mM}$ ) (Arndt *et al.*, 2008). Dementsprechend stellen die CgADH und CgALDH zwei Dehydrogenasen von hohem Interesse hinsichtlich der biotechnologischen Umwandlung von Ethanol zu Acetat dar. Mit solchen Enzymen ist es im Prinzip möglich das Erdölbegleitgas Ethan als günstige Energie- und

Kohlenstoffquelle zur Synthese von profitableren Produkten, wie beispielsweise L-Lysin oder Fettsäuren, nutzbar zu machen (Abb. 7). Dementsprechend stellt diese zweistufige Biokatalyse einen Teil der biotechnologischen Produktion im Ganzzellkatalysator *E. coli* von Evonik Industries dar.

Das derzeitige Konzept dieses Ganzzellkatalysators nutzt die beiden Dehydrogenasen CgADH und CgALDH mit der Folge, dass zwar Ethanol zu Acetaldehyd und anschließend zu Acetat effizient umgesetzt wird, jedoch das für die Synthese von L-Lysin erforderliche NADPH nicht ausreichend zur Verfügung steht. Die Ausbeute an L-Lysin kann vermutlich durch erhöhte NADPH-Synthese gesteigert werden, beispielsweise indem die Kofaktorspezifität von CgADH und CgALDH von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  durch *Protein-Engineering* geändert wird. Eine weitere Möglichkeit besteht im Austausch der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Dehydrogenasen gegen  $\text{NADP}^+$ -spezifische Enzyme aus anderen Mikroorganismen. Analysen des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Verhältnisses in *E. coli* ergaben eine Konzentration für  $\text{NAD}^+$  von 0,64 mM und für NADH von 0,24 mM (Zhou *et al.*, 2013). Demgegenüber wurde eine niedrigere Konzentration von NADPH (0,19 mM) in *C. glutamicum* ermittelt (Goldbeck *et al.*, 2018). In den meisten Bakterienstämmen ist die Gesamtkonzentration an  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  im Cytoplasma größer als die von  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  (Blacker and Duchon, 2016). Als Elektronendonator für anabolische Prozesse ist es für die Zelle von essentieller Bedeutung, den  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Pool in einem reduzierten Zustand zu halten, um kontinuierlich NADPH bereitzustellen (Pollak *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu bedingt die Rolle des  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor im Katabolismus, dass mehr  $\text{NAD}^+$  als NADH zur Verfügung stehen muss (Sun *et al.*, 2012). Während die Konzentration an  $\text{NAD}^+$  um ein Vielfaches höher sein kann als die von  $\text{NADP}^+$ , liegen die Konzentrationen der reduzierten Formen, NADH und NADPH, üblicherweise in ähnlichem Bereich (Ronchi *et al.*, 2013). Damit erscheint es plausibel, dass sowohl CgADH als auch CgALDH mit den  $K_M$  Werten für  $\text{NAD}^+$  von 250  $\mu\text{M}$  bzw. 180  $\mu\text{M}$  für den Stoffwechsel in *C. glutamicum* geeignet sind, aber nicht das für die Synthese von L-Lysin in einem heterologen System notwendige NADPH bilden können.



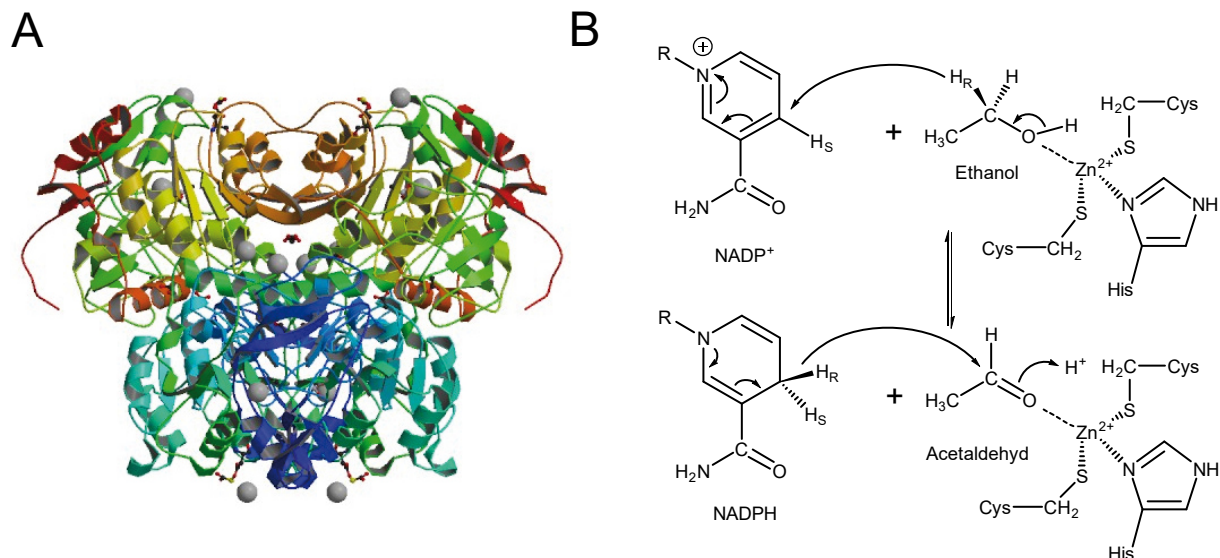
**Abbildung 7:** Reaktionsschema der biotechnologischen Herstellung von L-Lysin aus Ethan in einem Ganzzellkatalysator basierend auf *E. coli*. Ethan wird zunächst durch die NADH-abhängige Butan-Monooxygenase aus *T. butanivorans* oxidiert. Das entstehende Ethanol wird mittels zweier NAD<sup>+</sup>-abhängiger Ethanol- und Acetaldehyd-Dehydrogenasen aus *C. glutamicum* zu Acetat oxidiert. Eine Acetyl-CoA-Synthetase aus *E. coli* bildet Acetyl-CoA. Dieses wird in mehreren Reaktionsschritten zu Oxalacetat umgewandelt. Anschließend wird Oxalacetat in weiteren Reaktionsschritten unter Verbrauch von NADPH zum Endprodukt L-Lysin umgesetzt. Die Ausbeute an L-Lysin kann durch eine erhöhte NADPH-Synthese möglicherweise gesteigert werden, indem entweder durch *Protein-Engineering* die Kofaktorspezifität von CgADH und CgALDH von NAD<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> geändert wird oder NADP<sup>+</sup>-spezifische Enzyme aus anderen Organismen genutzt werden.

## 1.6 Die Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus *Entamoeba histolytica*

Bei dem 1883 entdeckten Parasiten *Entamoeba histolytica* handelt es sich um einen einzelligen Mikroorganismus der Gattung *Entamoebidae* und den Verursacher der Amöbenruhr. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehen von 500 Millionen Infizierten pro Jahr aus, von denen etwa 40 bis 50 Millionen erkranken und zwischen 50.000 und 100.000 der Infektion zum Opfer fallen (Gunther *et al.*, 2011). Die Krankheitserreger gelangen als Zysten in den menschlichen Dünndarm und vermehren sich im Nahrungsbrei des Dickdarms. Das eigentliche Krankheitsbild der Dysenterie entwickelt sich erst, sobald die Parasiten die Darmwand befallen. Hauptursache für die Verbreitung sind mangelnde Hygiene bei Trinkwasser und Lebensmitteln, vorwiegend in Entwicklungsländern. Nach Stuhlprobe und Bluttest erfolgt üblicherweise eine Antibiotika-Therapie. Aus diesen Gründen war *Entamoeba histolytica* das Ziel zahlreicher Forschungsstudien mit der Absicht, Ziele für neue Antibiotikatherapien zu entdecken und passende Behandlungsstrategien zu entwickeln (Loftus *et al.*, 2005, Sargeant *et al.*, 1978, Diamond and Clark, 1993, Haque *et al.*, 1995).

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit sind die biochemischen Studien an der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Alkoholdehydrogenase EhADH1 (EC 1.1.1.2). Dabei handelt es sich um ein Protein, mit

360 Aminosäuren und einer Masse von 38 kDa. Von Lo und Chang (1982) wurde dieses Enzym zum ersten Mal kloniert, exprimiert und charakterisiert mit dem weiterführenden Ziel einen Inhibitor zu entwickeln. Durch Unterdrückung der von EhADH1 katalysierten anabolischen Reaktion, sollte das mikrobielle Wachstum gehemmt werden (Samuelson *et al.*, 1992, Kumar *et al.*, 1992). So wie die Mehrzahl der bekannten  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Alkoholdehydrogenasen, liegt auch dieses  $\text{NADP}^+$ -abhängige Enzym in seiner biologisch aktiven Form als Homotetramer vor. Dessen Kristallstruktur (Abb. 8) wurde 2006 aufgeklärt und zeigt neben der Quartärstruktur auch die Bindung des katalytisch relevanten  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions im aktiven Zentrum (Shimon *et al.*, 2002). Weiterführende Analysen des Substratspektrums von EhADH1 belegen eine Präferenz für mittelkettige sekundäre Alkohole, wie beispielsweise 2-Butanol und Isopropanol ( $K_M \approx 240 \mu\text{M}$ ), aber eine geringere Affinität zu Ethanol ( $K_M = 4 \text{ mM}$ ). Bezüglich des Kofaktors nutzt diese Dehydrogenase ausschließlich  $\text{NADP}^+$  ( $K_M = 3,5 \mu\text{M}$ ) und zeigt keine detektierbare Aktivität gegenüber  $\text{NAD}^+$  (Lo and Chang, 1982).



**Abbildung 8:** Überblick über Struktur und Reaktionsmechanismus der EhADH1. (A) Struktur der Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus *Entamoeba histolytica* als Tetramer (PDB: 1Y9A). (B) Reaktionsmechanismus der Katalyse von Acetaldehyd zu Ethanol. Das von zwei Thiolat- und einer Imidazol-Gruppe komplexierte  $\text{Zn}^{2+}$ -Kation im aktiven Zentrum erhöht die Polarisierung der Carbonylfunktion und erleichtert den nukleophilen Angriff des Hydrid-Anions (Shimon *et al.*, 2002).

Der Ablauf der Reaktion entspricht dem allgemeinen Mechanismus der Alkoholdehydrogenasen (Abb. 8 B). Dabei erfolgt die stereospezifische Übertragung des Hydrid-Anions von Ethanol auf das C-4-Atom des oxidierten Nicotinamidrings. Das von zwei Cys- und einem His-Rest komplexierte  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum erhöht die Polarisierung der Hydroxylfunktion des Ethanols, ist jedoch selbst nicht direkt an der Redoxreaktion beteiligt (Voet D. *et al.*, 2002).

Aufgrund der vorhandenen Kristallstruktur, des bekannten Reaktionsmechanismus und der Kofaktorspezifität für  $\text{NADP}^+$  bietet EhADH1 einen alternativen Kandidaten gegenüber CgADH, wobei es dessen Aktivität für Ethanol noch zu verbessern gilt.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Angesichts der im Vergleich zu den meisten bislang charakterisierten Saccharose-Isomerasen ausgeprägten Präferenz für die Produktion von Isomaltulose bei besonders hoher katalytischer Effizienz stellt SmuA einen für die industrielle Biotechnologie hochattraktiven Biokatalysator dar (Goulter *et al.*, 2012, Aghajari *et al.*, 2009). Allerdings ist neben Isomaltulose auch Trehalulose, Glucose und Fructose im Produktgemisch detektierbar (Ravaud *et al.*, 2009), so dass eine SmuA-Variante mit höherer Produktselektivität und gleichbleibend hoher Enzymaktivität wünschenswert ist. Gemäß diesem Anforderungsprofil sollten in der vorliegenden Arbeit die enzymatischen Eigenschaften von SmuA durch rationales *Protein-Engineering* für eine selektivere Produktion von Isomaltulose und vor allem verringerte Bildung des Nebenprodukts Trehalulose optimiert werden.

Zudem sollte die NADP<sup>+</sup>-abhängige Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus *Entamoeba histolytica* (Kumar *et al.*, 1992) entsprechend den Anwendungsanforderungen in der industriellen Biotechnologie hinsichtlich des Substrats Ethanol optimiert werden. Dessen Anwendung in einem Gesamtzellkatalysator (s. Abschnitt 1.5) sollte einen Anstieg der Ausbeute an L-Lysin zur Folge haben. Um diesen Effekt noch zu verstärken, wurde im Anschluss der Fokus auf den folgenden Schritt im Gesamtreaktionspfad gelegt: die NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat durch die Acetaldehyddehydrogenase CgALDH aus *Corynebacterium glutamicum* (Arndt *et al.*, 2008). Dahingehend sollte die Acetaldehyddehydrogenase EcALDH aus *E. coli* charakterisiert und in den Gesamtreaktionspfad implementiert werden.

In beiden Teilprojekten wurden Erkenntnisse zum weiteren Verständnis der jeweiligen Reaktionsmechanismen erwartet, sowie hinsichtlich der Einsatzmöglichkeiten für die biotechnologische Herstellung von Isomalt und L-Lysin.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

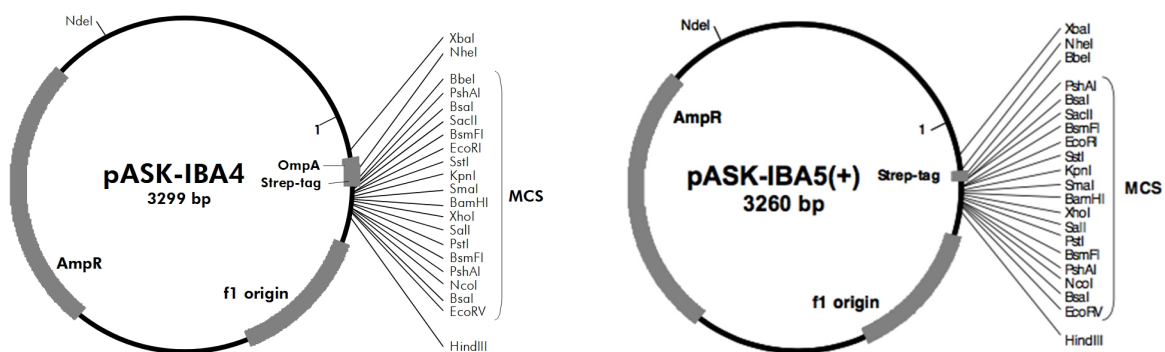
**Tabelle 1:** Eigenschaften und Quelle des Genexpressionsstamms

Stamm	Eigenschaften
BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i>
KS272	F <sup>-</sup> , $\Delta(lacIPOZY)X74$ , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL</i> , <i>ΔphoA</i>
XL1Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169$ [F <sup>+</sup> : <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> ZΔM15, Tn10( <i>tet<sup>r</sup></i> )]

Alle verwendeten Mikroorganismen entstammten der Sammlung von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München.

**Tabelle 2:** Eigenschaften und Quelle des Plasmids

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pASK-IBA4(+)	tet <sup>P<sup>o</sup></sup> , <i>Strep</i> -tag II (N-terminal), t <sub>IPP</sub> , f1- <i>IG</i> , Amp <sup>R</sup> (bla), <i>tetR</i> , ColE1 ori, <i>OmpA</i>	Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pASK-IBA5(+)	tet <sup>P<sup>o</sup></sup> , <i>Strep</i> -tag II (N-terminal), t <sub>IPP</sub> , f1- <i>IG</i> , Amp <sup>R</sup> (bla), <i>tetR</i> , ColE1 ori	Prof. Dr. A. Skerra, TU München



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Expressionsplasmide pASK-IBA4(+) und pASK-IBA5(+) mit Angabe der Restriktionsschnittstellen im Bereich der Multiple Cloning Site (MCS) von IBA Lifesciences.

Der Vektor pASK-IBA5(+) wurde zur cytoplasmatischen Genexpression eingesetzt. Er trägt als Selektionsmarker das Ampicillin-Resistenzgen *amp<sup>R</sup>* und kodiert stromaufwärts der MCS für das *Strep*-tag II, welches so mit dem N-Terminus des klonierten Proteins fusioniert wird. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des *tet*-Promotors (Skerra, 1994). Das Plasmid pASK-IBA4(+) kodiert zusätzlich für eine N-terminale *OmpA*-Signalsequenz zum Zwecke der periplasmatischen Genexpression (Abb. 9).

## 2.1.2 Oligodesoxynukleotide

**Tabelle 3:** Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotid	Sequenz (5'-3')
D20	CCACTCCCTATCAGTGAT
PR1	CGTTTACCGCTACTGCG
SmuA_P67S_For	ATCTGGATCAACTCGCACTACGACTCC
SmuA_P67S_Rev	GGAGTCGTAGTGCGAGTTGATCCAGAT
SmuA_Y78W_For	ACCGACAACGGTTGGGACATCCGTGAC
SmuA_Y78W_Rev	GTCACGGATGTCCCAACCGTTGTTCGGT
SmuA_A179V_For	CTGCACTACTTTCGTTAAACAGCAGCCG
SmuA_A179V_Rev	CGGCTGCTGTTTTAACGAAGTAGTGCG
SmuA_K180G_For	GCACTACTTCGCTGGACAGCAGCCGGACC
SmuA_K180G_Rev	GGTCCGGCTGCTGTCCAGCGAAGTAGTGC
SmuA_K180V_For	GCACTACTTCGCTGTACAGCAGCCGGACC
SmuA_K180V_Rev	GGTCCGGCTGCTGTACAGCGAAGTAGTGC
SmuA_Q181P_For	TACTTCGCTAAACCGCAGCCGGACCTG
SmuA_Q181P_Rev	CAGGTCCGGCTGCGGTTTTAGCGAAGTA
SmuA_F213L_For	TTCCGGTCTGCGTCTCGACACCGTTGC
SmuA_F213L_Rev	GCAACGGTGTGCGAGACGCAGACCCGGAA
SmuA_V216A_For	CGTTTCGACACCGCTGCTACCTACTCC
SmuA_V216A_Rev	GGAGTAGGTAGCAGCGGTGTCGAAACG
SmuA_A217V_For	GTTTCGACACCGTTGTTACCTACTCC
SmuA_A217V_Rev	GGAGTAGGTAACAACGGTGTGCGAAAC
SmuA_Y219L_For	ACCGTTGCTACCTTGTCCAAAATCCCG
SmuA_Y219L_Rev	CGGGATTTTGGACAAGGTAGCAACGGT
SmuA_F236Y_For	GCAGCTGAAAACTACGCTGCTGAATACAC
SmuA_F236Y_Rev	GTGTATTTCAGCAGCGTAGTTTTTTCAGCTGC
SmuA_I269A_For	CTACCGCTGGTGAAGCCTTCGGTGTTCGCG
SmuA_I269A_Rev	GCGGAACACCGAAGGCTTCACCAGCGGTAG
SmuA_I269L_For	CTACCGCTGGTGAAGTCTTCGGTGTTCGCG
SmuA_I269L_Rev	GCGGAACACCGAAGAGTTCACCAGCGGTAG
SmuA_I269V_For	CTACCGCTGGTGAAGTCTTCGGTGTTCGCG
SmuA_I269V_Rev	GCGGAACACCGAAGACTTCACCAGCGGTAG
SmuA_F270Y_For	GCTGGTGAAATCTACGGTGTTCGCTG
SmuA_F270Y_Rev	CAGCGGAACACCGTAGATTTTCACCAGC
SmuA_S277M_For	CCGCTGGACCAGATGATCAAATTCTTCG
SmuA_S277M_Rev	CGAAGAATTTGATCATCTGGTCCAGCGG
SmuA_S277Q_For	CCGCTGGACCAGCAGATCAAATTCTTCG
SmuA_S277Q_Rev	CGAAGAATTTGATCTGCTGGTCCAGCGG
SmuA_S277T_For	CCGCTGGACCAGACCATCAAATTCTTCG

SmuA\_S277T\_Rev CGAAGAATTTGATGGTCTGGTCCAGCGG  
SmuA\_R284P\_For TTCTTCGACCGTCCGCGTGACGAACTG  
SmuA\_R284P\_Rev CAGTTCGTACGCGGACGGTCGAAGAA  
SmuA\_F294Y\_For TCGCTTTCACCTACGACCTGATCCGTC  
SmuA\_F294Y\_Rev GACGGATCAGGTCGTAGGTGAAAGCGA  
SmuA\_I297G\_For TTCGACCTGGGCCGTCTGGACCGTGAC  
SmuA\_I297G\_Rev GTCACGGTCCAGACGGCCCAGGTGCGAA  
SmuA\_L299G\_For ACCTGATCCGTGGGGACCGTGACTCCG  
SmuA\_L299G\_Rev CGGAGTCACGGTCCCCACGGATCAGGT  
SmuA\_D311P\_For GTTGGCGTCGTAAACCGTGGAAACTGTCCC  
SmuA\_D311P\_Rev GGGACAGTTTCCACGGTTTACGACGCCAAC  
SmuA\_H341F\_For TCCTGGACAACCTTCGACAACCCGCGTG  
SmuA\_H341F\_Rev CACGCGGGTTGTGCGAAGTTGTCCAGGA  
SmuA\_T369F\_For TGGCTACCCTGTTCCCTGACCCAGCGTG  
SmuA\_T369F\_Rev CACGCTGGGTCAGGAACAGGGTAGCCA  
SmuA\_T369W\_For TGGCTACCCTGTGGCTGACCCAGCGTG  
SmuA\_T369W\_Rev CACGCTGGGTCAGCCACAGGGTAGCCA  
SmuA\_D398G\_For CTATCGACGAATTCGGCGACATCGAAG  
SmuA\_D398G\_Rev CTTTCGATGTCCCGAATTCGTTCGATAG  
SmuA\_D398P\_For CTATCGACGAATTCGGCGACATCGAAG  
SmuA\_D398P\_Rev CTTTCGATGTCCCGAATTCGTTCGATAG  
SmuA\_D399E\_For ACGAATTCGACGAAATCGAGGTTAAAG  
SmuA\_D399E\_Rev CTTTAACCTCGATTTTCGTGCAATTCGT  
SmuA\_D399N\_For CGACGAATTCGACAACATCGAAGTTAAAGG  
SmuA\_D399N\_Rev CCTTTAACTTCGATGTTGTGCGAATTCGTGC  
SmuA\_D399S\_For ACGAATTCGACAGCATCGAGGTTAAAG  
SmuA\_D399S\_Rev CTTTAACCTCGATGCTGTGCGAATTCGT  
SmuA\_I400A\_For GACGAATTCGACGACGCCGAAGTTAAAGG  
SmuA\_I400A\_Rev CCTTTAACTTCGGCGTCGTGCGAATTCGTG  
SmuA\_I400V\_For GACGAATTCGACGACGTGCGAAGTTAAAGG  
SmuA\_I400V\_Rev CCTTTAACTTCGACGTCGTGCGAATTCGTG  
SmuA\_I400Y\_For CGAATTCGACGACTATGAAGTTAAAGG  
SmuA\_I400Y\_Rev CCTTTAACTTCATAGTCGTGCGAATTCG  
SmuA\_E401D\_For TTCGACGACATCGATGTTAAAGGTTTC  
SmuA\_E401D\_Rev GAAACCTTTAACATCGATGTCGTGCGAA  
SmuA\_E401Q\_For TTCGACGACATCCAAGTTAAAGGTTTC  
SmuA\_E401Q\_Rev GAAACCTTTAACTTGGATGTCGTGCGAA  
SmuA\_L426V\_For CAGAACGTTTCGTGTGACCTCCCCTGAC  
SmuA\_L426V\_Rev GTCACGGGAGGTCACACGAACGTTCTG  
SmuA\_L426Y\_For CAGAACGTTTCGTTACACCTCCCCTGAC

---

SmuA_L426Y_Rev	GTCACGGGAGGTGTAACGAACGTTCTG
SmuA_T427I_For	GAACGTTTCGTCTGATCTCCGTGACAACT
SmuA_T427I_Rev	AGTTGTCACGGGAGATCAGACGAACGTTTC
SmuA_T427S_For	GAACGTTTCGTCTGAGCTCCCGTGACAACT
SmuA_T427S_Rev	AGTTGTCACGGGAGCTCAGACGAACGTTTC
SmuA_T427V_For	GAACGTTTCGTCTGGTCTCCCGTGACAACT
SmuA_T427V_Rev	AGTTGTCACGGGAGACCAGACGAACGTTTC
SmuA_S428A_For	CGTTCGTCTGACCGCCCGTGACAACTCCCG
SmuA_S428A_Rev	CGGGAGTTGTCACGGGCGGTGACACGAACG
SmuA_S428T_For	CGTTCGTCTGACCACCCGTGACAACTCCCG
SmuA_S428T_Rev	CGGGAGTTGTCACGGGTGGTCAGACGAACG
SmuA_D430A_For	GTCTGACCTCCCGTGCCAACTCCCGTACC
SmuA_D430A_Rev	GGTACGGGAGTTGGCACGGGAGGTCAGAC
SmuA_D430E_For	GTCTGACCTCCCGTGAGAACTCCCGTACC
SmuA_D430E_Rev	GGTACGGGAGTTCTCACGGGAGGTCAGAC
SmuA_D430L_For	GTCTGACCTCCCGTCTGAACTCCCGTACC
SmuA_D430L_Rev	GGTACGGGAGTTTCAGACGGGAGGTCAGAC
SmuA_D430N_For	GTCTGACCTCCCGTAACAACTCCCGTACC
SmuA_D430N_Rev	GGTACGGGAGTTGTTACGGGAGGTCAGAC
SmuA_D430Q_For	GTCTGACCTCCCGTCAGAACTCCCGTACC
SmuA_D430Q_Rev	GGTACGGGAGTTCTGACGGGAGGTCAGAC
SmuA_D430S_For	GTCTGACCTCCCGTAGCAACTCCCGTACC
SmuA_D430S_Rev	GGTACGGGAGTTGCTACGGGAGGTCAGAC
SmuA_D430T_For	GTCTGACCTCCCGTACCAACTCCCGTACC
SmuA_D430T_Rev	GGTACGGGAGTTGGTACGGGAGGTCAGAC
SmuA_N431Q_For	ACCTCCCGTGACCAATCCCGTACCCCG
SmuA_N431Q_Rev	CGGGGTACGGGATTGGTCACGGGAGGT
SmuA_N431S_For	ACCTCCCGTGACAGCTCCCGTACCCCG
SmuA_N431S_Rev	CGGGGTACGGGAGCTGTCACGGGAGGT
SmuA_F453L_For	GGTAAACCGTGGTTGAAAGTTAACCCG
SmuA_F453L_Rev	CGGGTAACTTTCAACCACGTTTTACC
SmuA_F453W_For	GGTAAACCGTGGTGGAAAGTTAACCCG
SmuA_F453W_Rev	CGGGTAACTTTCCACCACGTTTTACC
SmuA_F453Y_For	GGTAAACCGTGGTACAAAGTTAACCCG
SmuA_F453Y_Rev	CGGGTAACTTTGTACCACGTTTTACC
EhADH1_S39L_For	GCACCGTGTACCCTCGATAACCCATAACC
EhADH1_S39L_Rev	GGTATGGGTATCGAGGGTACACGGTGC
EhADH1_S39T_For	GCACCGTGTACCACCGATAACCCATAACC
EhADH1_S39T_Rev	GGTATGGGTATCGGTGGTACACGGTGC
EhADH1_S39V_For	GCACCGTGTACCCTCGATAACCCATAACC

EhADH1\_S39V\_Rev GGTATGGGTATCGACGGTACACGGTGC  
EhADH1\_T43I\_For AGCGATACCCATATCGTTTGGGCAGGC  
EhADH1\_T43I\_Rev GCCTGCCCAAACGATATGGGTATCGCT  
EhADH1\_T43V\_For AGCGATACCCATGTCTGTTTGGGCAGGC  
EhADH1\_T43V\_Rev GCCTGCCCAAACGACATGGGTATCGCT  
EhADH1\_A48V\_For GTTTGGGCAGGCCTTATTGGTGATCGTC  
EhADH1\_A48V\_Rev GACGATCACCAATAACGCCTGCCCAAAC  
EhADH1\_G50P\_For GGGCAGGCGCAATTCCGGATCGTCATG  
EhADH1\_G50P\_Rev CATGACGATCCGGAATTGCGCCTGCC  
EhADH1\_A85L\_For GTTATCGTTCCGCTAATTACACCGGATTG  
EhADH1\_A85L\_Rev CAATCCGGTGTAATTAGCGGAACGATAAC  
EhADH1\_A85F\_For GTTATCGTTCCGTTTATTACACCGGATTG  
EhADH1\_A85F\_Rev CAATCCGGTGTAATGAACGGAACGATAAC  
EhADH1\_I86M\_For ATCGTTCGGCAATGACACCGGATTGG  
EhADH1\_I86M\_Rev CCAATCCGGTGTCATTGCCGGAACGAT  
EhADH1\_N114Q\_For TGGAAATTTAGCCAGTTTTAAAGATGGC  
EhADH1\_N114Q\_Rev GCCATCTTTAAACTGGCTAAATTTCCA  
EhADH1\_Y267F\_For GGCAACGTGAATTTCTTTGGTGAAGGC  
EhADH1\_Y267F\_Rev GCCTTCACCAAGGAAATTCACGTTGCC  
EhADH1\_Y267L\_For GGCAACGTGAATCTGCTTGGTGAAGGC  
EhADH1\_Y267L\_Rev GCCTTCACCAAGCAGATTCACGTTGCC  
EhADH1\_Y267W\_For GGCAACGTGAATTGGCTTGGTGAAGGC  
EhADH1\_Y267W\_Rev GCCTTCACCAAGCCAATTCACGTTGCC  
EhADH1\_L268F\_For GCAACGTGAATTATTTTGGTGAAGGCG  
EhADH1\_L268F\_Rev CGCCTTCACCAAAATAATTCACGTTGC  
EhADH1\_L268R\_For GCAACGTGAATTATCGTGGTGAAGGCG  
EhADH1\_L268R\_Rev CGCCTTCACCACGATAATTCACGTTGC  
EhADH1\_L268Y\_For GCAACGTGAATTATGGGGTGAAGGCG  
EhADH1\_L268Y\_Rev CGCCTTCACCCAATAATTCACGTTGC  
EhADH1\_L268W\_For GCAACGTGAATTATTTATGGTGAAGGCG  
EhADH1\_L268W\_Rev CGCCTTCACCATAATAATTCACGTTGC  
EhADH1\_G269A\_For GAATTATCTTGCTGAAGGCGATAATATTG  
EhADH1\_G269A\_Rev CAATATTATCGCCTTCAGCAAGATAATTC  
EhADH1\_G269P\_For GAATTATCTTCTGAAGGCGATAATATTG  
EhADH1\_G269P\_Rev CAATATTATCGCCTTCAGGAAGATAATTC  
EhADH1\_L268F\_I241L\_For ATAAAGTGGTTCTGGCCGGTGGTGATG  
EhADH1\_L268F\_I241L\_Rev CATCACCACCGGCCAGAACCCTTTAT  
EhADH1\_L268F\_F249L\_For GATGTTTCATACCTTAGCACAGGCAGTG  
EhADH1\_L268F\_F249L\_Rev CACTGCCTGTGCTAAGGTATGAACATC  
EhADH1\_L268F\_F249V\_For GATGTTTCATACCGTTGCACAGGCAGTG

---

EhADH1_L268F_F249V_Rev	CACTGCCTGTGCAACGGTATGAACATC
EhADH1_L268F_F249Y_For	GATGTTTCATACCTATGCACAGGCAGTG
EhADH1_L268F_F249Y_Rev	CACTGCCTGTGCATAGGTATGAACATC
EhADH1_L268F_N264I_For	GCGATATTGGCATCGTGAATTATTTTG
EhADH1_L268F_N264I_Rev	CAAAATAATTCACGATGCCAATATCGC
EhADH1_L268F_N264L_For	GCGATATTGGCCTCGTGAATTATTTTG
EhADH1_L268F_N264L_Rev	CAAAATAATTCACGAGGCCAATATCGC
EhADH1_L268F_N264Q_For	GCGATATTGGCCAGGTGAATTATTTTG
EhADH1_L268F_N264Q_Rev	CAAAATAATTCACCTGGCCAATATCGC
EhADH1_L268F_N264S_For	GCGATATTGGCAGCGTGAATTATTTTG
EhADH1_L268F_N264S_Rev	CAAAATAATTCACGCTGCCAATATCGC
EhADH1_L268F_V265L_For	CGATATTGGCAACATTAATTATTTTGG
EhADH1_L268F_V265L_Rev	CCAAAATAATTAATGTTGCCAATATCG

---

### 2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

**Tabelle 4:** Verwendete Enzyme und Proteine

<b>Enzyme/Protein</b>	<b>Hersteller</b>
Alkalische Phosphatase (aus Garnele)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Alkohol-Dehydrogenase (aus Pferdeleber)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\alpha$ -Amylase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Apoferritin	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
Pfu 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/ $\mu$ L und 4 U/ $\mu$ L)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Thyroglobulin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

---

## 2.1.4 Chemikalien und Standards

**Tabelle 5:** Verwendete Chemikalien und Hersteller

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acetaldehyd, HPLC grade	Acros Organics, New Jersey, USA
Aceton, HPLC grade	Acros Organics, New Jersey, USA
Acetonitril, p.a.	VWR International, Darmstadt
Acetonitril, HPLC grade (ACN)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-Stammlösung 30 % w/v mit 0,8 % v/v	SERVA, Heidelberg
Bisacrylamid	
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	E. Merck, Darmstadt
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem, Darmstadt
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	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
Fructose, 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin, 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose, 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
2'-(4-Hydrophenylazo)-benzoesäure (HABA)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Isomaltulose	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, technisch	CLN Laborgroßhandel, Niederhummel
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie, Deisenhofen

---

NAD <sup>+</sup> (Nicotinamidadeninukleotid)	Carl Roth, Karlsruhe
NADH (Nicotinamidadeninukleotid, (reduzierte Form), Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
NADP <sup>+</sup> (Nicotinamidadeninukleotidphosphat)	Carl Roth, Karlsruhe
NADPH (Nicotinamidadeninukleotidphosphat), (reduzierte Form), Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva electrophoresis, Heidelberg
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose, 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	E. Merck, Darmstadt
Strep-Tactin	IBA Lifesciences, Göttingen
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
1 kb GeneRuler	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

---

### 2.1.5 Nährmedien, Antibiotika, Puffer und allgemeine Lösungen

Luria-Bertani-Medium	10 g/L Bacto Trypton
pH 7,5	5 g/L Bacto Yeast Extract
	5 g/L NaCl
Ampicillin	100 mg/mL in dH <sub>2</sub> O
	Lagerung bei -20 °C
Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/mL in DMF
	Lagerung bei -20 °C
SA-Puffer	100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA



---

Periplasma-Aufschlusspuffer	500 mM Saccharose 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
PBS-Puffer (pH 7,4)	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 115 mM NaCl
Elutionspuffer SAC	2,5 mM D-Desthiobiotin in SA-Puffer
Regenerierungspuffer SAC	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 5 mM HABA
HPLC-Laufpuffer	57,8 % Acetonitril 26,1 % Aceton 16,1 % H <sub>2</sub> O
Arndt-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7.5) 0.5 mM Dithiothreitol 10 % Glycerol 10 mM KCl

#### **Puffer und Lösungen für SDS-PAGE**

Trenngel	5 mL 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid 2,5 mL 4× Lower Tris 2,5 mL Wasser 120 µL APS (10 %) 10 µL TEMED
----------	---

---

Sammelgel	1 mL 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid 1,5 mL 4× Upper Tris 3,5 mL Wasser 40 µL APS 4 µL TEMED
SDS-Laufpuffer (pH 8,8)	50 mM Tris 190 mM Glycin 1 g/L SDS
4× Lower Tris (pH 8.85)	3 M Tris/HCl 4 g/L SDS
5× Auftragspuffer (reduzierend, pH 8)	250 mM Tris/HCl 2,5 % (w/v) SDS 25 % Glycerin 0,25 mg/mL Bromphenolblau 12,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
4× Upper Tris (pH 6,8) Färbelösung	0,5 M Tris/HCl 4 g/L SDS 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250
Entfärbelösung I	10 % (v/v) Essigsäure 25 % (v/v) Isopropanol
Entfärbelösung II	10 % (v/v) Essigsäure

## 2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6:** Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav Typ 500	H & P Labortechnik, Oberschleißheim
Elektrophoresekammer SDS-PAGE	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
Brechungsindexdetektor	Smartline RI Detector S2300	Knauer, Berlin
Chromatographieanlage	Äktapurifier	GE Healthcare Europe, Freiburg
Durchflussdetektoren	UVICORD SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Elektrophoresekammer	Standard Power Pack P25	Biometra Göttingen
Fraktionssammler	Frac-920	GE Healthcare Europe, Freiburg
Heizblock	Eppendorf Thermostat C	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
HPLC	Agilent 1200 HPLC	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Konzentrator	Amicon Ultra Centrifugal Filter Units 15 mL, 30 kDa	Millipore, Billerica, MA, USA
Kunststoffröhrchen	PP-Röhrchen, 15 mL PP-Röhrchen, 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Küvetten	Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroplatten Reader	Synergy 2	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
pH-Meter	pH 720	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Biochrom, Massachusetts, USA
Pipetten	Abimed-Pipetten (20/200/1000 µL)	Abimed, Lnagenfel
	Eppendorf Research (0,5-10 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfen	accu-jet	Brand, Wertheim
Pumpe (Chromatographie)	Peristaltic Pump P1	Pharma Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Rotatoren	Rollenmischer SRT 1	Stuart Scientific, Chelmsford, United Kingdom
Reaktionsgefäße		Eppendorf, Hamburg
Säulen	Superdex 26/60 GL Superdex S200 10/300	GE Healthcare Europe, Freiburg
Signalschreiber	BBC Goerz Metawatt SE 120	ABB, Mannheim

Schüttelinkubatoren	Celltron	Infors HT, Bottmingen
	Innova 43 incubator shaker series	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey
	Multitron II	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spektrophotometer	Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Bonn
Sterilfilter	Filtropur S (0,45 µm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Vortexer	Vortex® Genie 2	Fisher Scientific, Schwerte
Waagen	PAG Oerlikon PJ	Wolfinger, Straubenhardt
	Precisa XB 2200C	
	PAG Oerlikon Precisa 125 A	Wolfinger, Straubenhardt Robert Bosch, Stuttgart
	Bosch PE 620	
Wasserfilter- und Destillationsanlagen	Purelab Ultra	ELGA LabWater, Celle
	Bi-Destillierapparat aus Glas Typ 2304	Gesellschaft für Labortechnik
Zellaufschluss	French Pressure Cell Press	SLM AMINCO Spectronic Instruments Inc. Rochester, NY, USA
Zentrifugen und Rotoren	Sigma 4-16K	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
	Sorvall: SS-34	Kendro Laboratory Products, München
	RC 6 Plus	
	RC 12 BP Plus	Eppendorf AG, Hamburg
	4K15C	
	Eppendorf Minispin	

### 2.1.7 Verwendete Kits

Verwendete Kits der Firma Qiagen, Hilden:

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit

QIAprep Plasmid Midi Kit

QIAprep Gel Extraction

QIAprep PCR Cleanup

## 2.1.8 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

**Tabelle 7:** Verwendete Computerprogramme und Datenbanken und Hersteller

Computerprogramm/Datenbank	Hersteller
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 ( <a href="http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov</a> )	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
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 ( <a href="http://web.expasy.org/protparam">http://web.expasy.org/protparam</a> )	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
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 ( <a href="http://www.rcsb.org/pdb">http://www.rcsb.org/pdb</a> )	(Berman <i>et al.</i> , 2000)
PyMol 1.3	(DeLano, 2002)
TotalLab Quant	TotalLab, Newcastle upon Tyne, UK
UniProt ( <a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a> )	(Apweiler <i>et al.</i> , 2004)

## 2.2 Molekularbiologischen Methoden

Alle molekularbiologischen und proteinbiochemischen Arbeiten wurden entsprechend den im Labor von Prof. Dr. Skerra entwickelten Standardmethoden durchgeführt. Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsvorschriften sind in aktualisierter und ergänzter Form an frühere Abschlussarbeiten der Arbeitsgruppe angelehnt (Schlapschy, 2002, Gebauer, 2013, Kirmair, 2017, Eggenstein, 2017, Seiboth, 2013, Bäcker, 2012, Li, 2018).

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

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf plasmidtragende Zellen erfolgte durch Zusatz des geeigneten Antibiotikums zum Nährmedium (siehe Abschnitt 2.1.9). Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und bis zu 2 Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Flüssigkulturen wurden typischerweise mit LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angesetzt. Dafür wurden 13 mL-Kulturröhrchen für kleine Volumina (4-5 mL) bzw. 100 mL-Kulturkolben mit Verschluss aus Aluminiumfolie für größere Volumina (50 mL)

verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 mL wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator über Nacht. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm ( $OD_{550}$ ) mit Hilfe eines UV/Vis-Spektralphotometers bestimmt. Ab  $OD_{550} > 1$  wurden geeignete Verdünnungen der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium korrigiert.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen oder ihrer Transformanden wurde 0,5 mL einer stationären Übernachtskultur bei niedriger Drehzahl (5000 rpm) sedimentiert, der Überstand abgezogen und die Zellen in 1 mL hitzesterilisiertem 50 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Lagerung erfolgte daraufhin bei -80 °C.

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

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen in einen transformationskompetenten Zustand überführt. Durch die hier verwendete  $CaCl_2$ -Methode (Sambrook *et al.*, 1989) können in Abhängigkeit vom *E. coli*-Stamm  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanden pro  $\mu g$  Plasmid erhalten werden. Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde 50 mL LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{550} = 0,5$  wurde die Kultur in ein steriles 50 mL-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma 4K15, 4416 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde abgezogen, das Zellsediment in 40 mL eiskalter 100 mM  $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 20 mL eiskalter 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2 mL 50 mM  $CaCl_2$ , 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 50  $\mu L$  Aliquots entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder bei -80 °C eingefroren. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert und vor der Verwendung abgekühlt.

Zur Transformation wurde 50  $\mu L$  der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 1  $\mu L$  Plasmid-DNA oder 5-10  $\mu L$  eines Ligierungsansatzes gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf 37 °C erwärmt und die Zellen nach Zugabe von 1 mL LB-Medium für 45 min bei 37 °C und 200 rpm in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß inkubiert. Die Kultur wurde zentrifugiert (Sigma 4K15, 3000 g, 4 °C, 1 min), 800  $\mu L$  des Überstandes abgezogen, die Zellen in der verbleibenden Kulturflüssigkeit resuspendiert und davon sowohl 30  $\mu L$  als auch die übrige Zellsuspension separat jeweils auf einem das geeignete Antibiotikum enthaltenen LB-Agar ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firma Qiagen verwendet. Diese beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim and Doly, 1979), gefolgt von der reversiblen Adsorption der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial

(Anionenaustauscher oder Silicagel). Für die Analyse von Transformanden nach Gen-Klonierungen erfolgte die Plasmidisolierung mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kits. Dazu wurde eine stationäre 3 mL-Übernachtskultur verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt in 50  $\mu$ L TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA betrug bei diesem Präparationsverfahren 5 bis 15  $\mu$ g DNA, ermittelt via Nanodrop. Für die präparative Plasmid-Isolierung wurde eine stationäre 50 ml Übernachtskultur verwendet und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kits nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Hierbei betrug die Ausbeute an Plasmid-DNA gewöhnlich ca. 100  $\mu$ g in 100  $\mu$ L TE-Puffer. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert und ohne weitere Aufarbeitung zur Spaltung mit Restriktionsenzymen eingesetzt.

#### **2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA**

Für die Agarose-Gelelektrophorese im analytischen oder präparativen Maßstab wurden im Allgemeinen Gele mit 1 % (w/v) Agarose verwendet. Dazu wurde 0,5 g Agarose in 50 mL TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Die entstandene klare Lösung wurde anschließend zum Abkühlen stehengelassen. Zu der noch gut handwarmen Lösung wurde 1/10000 Volumen (1 % [w/v]) Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Die Flüssigkeit wurde zum Durchmischen kurz geschwenkt und 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. Nach dem Erstarren wurde das Agarose-Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Geltaschenformer entfernt. Die Beladung der Taschen erfolgte mit geeigneten Volumina der jeweiligen DNA-Lösung, welche vorher mit 6 $\times$  DNA-Auftragspuffer versetzt wurde. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 bis 90 V betrieben. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm 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 bei 312 nm sichtbar gemacht. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde unter Verwendung des Qiagen Gel and PCR *Clean-up* Kits nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. DNA-Konzentrationen wurden im Anschluss durch Messungen am NanoDrop Photometer bestimmt und die gereinigten DNA-Fragmente bei 4 °C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Mix2Seq Kit von Eurofins Genomics nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 15  $\mu$ L der Plasmid-Probe mit 2  $\mu$ L des Sequenzierprimers der Konzentration 10 pmol/ $\mu$ L vermischt.

#### **2.2.5 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie die Präparation von DNA-Fragmenten wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Wahl des Puffersystems sowie der Temperatur für

die enzymatische Hydrolyse erfolgten nach den jeweiligen Empfehlungen des Herstellers. Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab wurde üblicherweise mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und 1 bis 2 U einer oder von je zwei Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 10 µL durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug typischerweise 1 bis 2 h bei der für die jeweiligen Endonukleasen empfohlenen Temperatur. Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in ähnlicher Weise durchgeführt, jedoch in Reaktionsvolumina von bis zu 75 µL mit bis zu 15 µg Plasmid-DNA und geeigneten Mengen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, sowie des Puffers gemäß Herstellervorgaben.

### 2.2.6 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden wurde zur Vermeidung intramolekularer Rezirkularisierung und Bildung von Konkameren das Vektorfragment dephosphoryliert und das zu inserierende PCR-Fragment phosphoryliert. Die Dephosphorylierung des Vektorfragments wurde mit der Alkalischen Phosphatase (AP) aus arktischen Garnelen durchgeführt, welche sich durch Hitze leicht inaktivieren lässt. Hierzu wurden zum Verdau des Vektors bei 37 °C 5 U AP zugegeben. Das Enzym wurde anschließend durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und das dephosphorylierte Vektorfragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Das zu klonierende PCR-Fragment wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) an den beiden 5'-Enden phosphoryliert. Dazu wurde das isolierte Genfragment in einem Gesamtvolumen von 30 µL mit 3 µL 10× T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer (Fertiglösung des Herstellers), 3 µL 10 mM ATP sowie 5 U T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die PNK durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und das DNA-Fragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

### 2.2.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die durch Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder durch PCR-Amplifizierung erzeugten und durch Agarose-Gelelektrophorese 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 bei 4 °C für 2 bis 20 h durchgeführt. Für einen Standardansatz wurden dazu 2 µL 10× Ligasepuffer (Fertiglösung des Herstellers), 1 µL T4 DNA-Ligase (1 bis 4 Weiss U/µL) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. 5 µL des Ligierungsansatzes wurde anschließend für die Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

### 2.2.8 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.

### 2.2.9 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*<sup>+</sup> *E. coli*-Stamm (z.B. XL1-Blue) isoliert wurde. Die Matrize wurde in 20 Zyklen, wie in Abschnitt 2.2.8 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 *CaCl*<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet.

## 2.3 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

### 2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* BL21

Zunächst wurde eine Vorkultur mit der kryokonservierten Kultur angeimpft, indem eine Pipettenspitze der gefrorenen Kultur in 100 mL LB-Medium mit Ampicillin gegeben wurde. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zur Herstellung der Hauptkultur wurde 20 mL der Übernachtskultur in 2 L LB-Medium mit Ampicillin überführt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und 180

rpm. Bei einer OD<sub>550</sub> von 0,5 wurde mit 0,2 µg/mL aTc induziert und die Kolben in den 30 °C Inkubator bei 160 rpm gestellt. Drei Stunden später erfolgte die Ernte durch 10-minütige Zentrifugation (4X1L LEX, 4500 rpm, 4 °C). Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellsedimente in 20 mL SA-Puffer resuspendiert und in 50 mL Falcons überführt. Diese wurden für 30 min bei 4.500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgezogen und die Zellmasse bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

### 2.3.2 Zellaufschluss mittels French Press

Der Zellaufschluss fand durch mechanische Lyse in einer French Press statt. Hierfür wird die Zellsuspension unter hohem Druck durch ein enges Ventil gepresst, wobei Zellwand und Plasmamembran fragmentiert werden. Die Zellsedimente wurden dafür in 20 mL 1× SA-Puffer ohne EDTA auf einem Rollmischer resuspendiert. Vor dem Zellaufschluss wurde 300 µL 1 mM PMSF zur Inhibierung von Serinproteasen zu der Suspension gegeben. Die Zellen wurden bei 1000 psi in vier Passagen aufgeschlossen und anschließend für 30 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Sorvall SS-34). Der Überstand wurde anschließend kurzfristig bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.3.3 Periplasmatische Extraktion von Proteinen

Zur Präparation der periplasmatischen Zellfraktion von *E. coli* wurde das Bakteriensediment in 20 mL (nach Induktion bei OD<sub>550</sub> = 0,5) bzw. 40 mL (nach Induktion bei OD<sub>550</sub> = 2,5) eiskaltem Periplasma-Aufschlusspuffer zügig resuspendiert und für 30 min bei 4 °C rollend inkubiert, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Sigma 4K15, 4420 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (SS-34, 15.000 rpm, 4 °C, 15 min), woraufhin der nun geklärte Periplasma-Extrakt über Nacht bei 4 °C gegen das 100-fache Volumen SA-Puffer dialysiert wurde. Unmittelbar vor der Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie wurde der Extrakt sterilfiltriert (0,45 µm).

### 2.3.4 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Das *Strep*-tag II ist ein synthetisches Peptid, welches mit dem N-Terminus der hier rekombinant hergestellten Proteine fusioniert war. Das *Strep*-tag bindet an das immobilisierte *Strep*-Tactin der Chromatographiesäule und ermöglicht somit im Einschrittverfahren die Reinigung des Proteins aus dem Wirtszellextrakt (Schmidt and Skerra, 2007).

Das in 2.3.3 filtrierte Zellysate wurde mit 2 nmol/L/OD<sub>550</sub> Wildtyp-Streptavidin (exprimiert und gereinigt am Lehrstuhl für biologische Chemie) versetzt, um wirtszelleigenes Biotin und biotinhaltige Proteine in dem Rohextrakt zu komplexieren. Eine Sepharose-Säule mit der kovalent immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (*Strep*-Tactin Superflow), wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie (A<sub>280</sub>) mit Chromatographiepuffer gespült. Dabei kamen, abhängig von der erwarteten Menge an rekombinantem Protein, Säulen mit Bettvolumina von 5 ml oder 8 ml zur Anwendung, welche mit Flussraten von 50 mL/h bzw. 100 mL/h betrieben wurden. Nach Auftragen des Rohextraktes auf die Säule wurde diese mit Puffer gespült, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5

mM Lösung von D-Desthiobiotin in Chromatographiepuffer kompetitiv eluiert. Zur Regenerierung der Säule wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, welche das Zielprotein in ausreichender Reinheit enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und bei 4 °C gelagert.

### 2.3.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Mittels Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*; SEC) können Moleküle nach ihrer Größe und Form aufgetrennt und analysiert werden. Daher diente dieses Verfahren hauptsächlich zur Abtrennung der rekombinanten Zielproteine von proteinogenen und niedermolekularen Kontaminationen, Proteinaggregaten, zur Untersuchung ihrer Oligomerisierungseigenschaften, sowie zum effektiven Pufferwechsel.

Die Größenausschlusschromatographie wurde in der vorliegenden Arbeit analytisch zur Bestimmung der Quartärstruktur von Proteinen sowie präparativ zum Pufferwechsel verwendet. Sämtliche Chromatographiepuffer wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (0,45 µm) und durch Anlegen von Vakuum für 30 min unter Rühren entgast. Im ersten Fall wurde eine präparative Superdex 200 26/60 *prep grade* Säule (Bettvolumen 317 mL) mit einen Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa eingesetzt. Vor Auftragen der Proteinprobe wurde die Säule bei einer Flussrate von 3 mL/min mit zwei Säulenvolumen Chromatographiepuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mittels einer 10 mL-Probenschleife auf die Säule appliziert, und in einem Fraktionskollektor wurden Fraktionen von 3 mL gesammelt. Die Reinheit der gesammelten Fraktionen wurde mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurde die Säule durch Spülen mit einem Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge regeneriert, mit Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert.

Im zweiten Fall wurde eine analytische Superdex 200 10/300 GL Säule (Bettvolumen 24 ml) mit einem Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa eingesetzt. Der prozessuale Ablauf entsprach dem bei einer Reinigung mittels Superdex 200 26/60 mit dem Unterschied, dass die Flussrate auf 0,5 mL/min und die Probenschleife auf 1 mL reduziert wurde.

### 2.3.7 Konzentrierung von Proteinen

Zur Herstellung konzentrierter Proteinlösungen wurde das Verfahren der Ultrafiltration eingesetzt. Dazu wurde das Volumen der Proteinlösung durch Zentrifugation (Sigma 4K15, 3000 g, 4 °C) in einer Konzentratoreinheit mit geeigneter Ausschlussgröße (10 kDa oder 30 kDa) bis zum Erreichen der benötigten Konzentration eingeengt. Um Proteinaggregation an der Membran zu vermeiden, wurde das Konzentrat zwischen den 5-10-minütigen Zentrifugationsschritten durch Schwenken oder Auf- und Abpipettieren durchmischt.

### 2.3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche reduzierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) wurde unter Verwendung des Puffersystems von Fling und Gregerson (1986) durchgeführt. Die

elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine, wird dabei durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels gebremst und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine fixiert und mit Coomassie Brilliantblau R250 angefärbt. Die 15 %-igen Polyacrylamid-Gele waren 0,8 mm dick, wobei das Trenngel ein Format von 5,5 cm × 8,5 cm aufwies. Zur Herstellung der Gele wurden zwei sorgfältig gesäuberte Glasplatten (10 cm × 8 cm) mit Abstandshaltern zusammengesetzt und mit Hilfe von Klammern fixiert. Die Polymerisation der Trenngelmischung, bestehend aus 5 mL einer 30 %-igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 2,5 ml 4× Lower Tris und 2,5 mL Wasser, wurde durch Zugabe von 2,5 µL TEMED und 50 µL 10 % (w/v) APS-Lösung gestartet. 4,5 mL dieser Mischung wurde zügig in die vertikale Gelkammer pipettiert und zwecks Luftabschlusses mit 0,5 mL Wasser sorgsam überschichtet, um später eine gleichmäßige Grenzfläche zum Trenngel zu erhalten. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Wasser vollständig entfernt und die Sammelgelmischung, zusammengesetzt aus 1 mL einer 30 %-igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 1,5 mL 4× Upper Tris und 3,5 mL Wasser, hergestellt. Durch Zugabe von 3 µL TEMED und 36 µL 10 % (w/v) APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet, die Sammelgelmischung wurde in die Gelkammer pipettiert und ein Taschenformer eingesetzt. Nach Erstarren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Gelkammer gespannt, die mit Laufpuffer befüllt wurde.

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 µl aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit 5 µL Marker befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140 V für ca. 100 min. Das Gel wurde 20 min mit Coomassie Brilliantblau R-250 gefärbt, dessen Nachweisgrenze bei 0,1 µg Protein pro Bande liegt. Es folgte eine zwanzigminütige Entfärbung mit Entfärbelösung 1 und eine weitere Entfärbung über Nacht mit Entfärbelösung 2.

Um den Gehalt an rekombinantem Protein innerhalb der jeweiligen Fraktion durch Densitometrie abzuschätzen, wurde das mit Coomassie-Brilliantblau gefärbte Polyacrylamidgel mit Hilfe eines Flachbett-Fotoscanners digitalisiert und der Anteil der relevanten Proteinbande innerhalb der Gesamtproteinfraktion mit Hilfe der Software TotalLab Quant bestimmt.

**Tabelle 8:** Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Trenngel		Sammelgel	
Acrylamid/Bisacrylamid-	5 mL	Acrylamid/Bisacrylamid-	1 mL
Stammlösung		Stammlösung	
4× Lower Tris	2,5 mL	4× Upper Tris	1,5 mL
Wasser	2,5 mL	Wasser	3,5 mL
10 % APS	120 µL	10 % APS	40 µL
TEMED	10 µL	TEMED	4 µL

### 2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mittels der Absorptions-Spektroskopie und beruht im Wesentlichen auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie den Disulfidbrücken (Cysteinrest), welche UV-Licht im Bereich von 240 bis 340 nm absorbieren. Die Aminosäuresequenz erlaubt die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ). Bei bekannter Molmasse, erfolgt darauf basierend die Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten ( $^{0,1\%}\epsilon_{280}$ ) nach (Pace *et al.*, 1995).

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot N_{\text{Trp}} + 1490 \cdot N_{\text{Tyr}} + 125 \cdot N_{\text{Cys}}$$

$\epsilon_{280}$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$$\epsilon_{280}^* = \epsilon_{280} \times M_{\text{R}}$$

$\epsilon_{280}^*$  = spezifischer Absorptionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ]

$M_{\text{R}}$  = Molmasse [ $\text{g/mol}$ ]

Durch Einsetzen in das Lambert-Beer'sche Gesetz kann die Proteinkonzentration berechnet werden.

$$c = A_{280} / \epsilon_{280}^* \cdot d$$

$c$  = Proteinkonzentration [ $\text{mg/mL}$ ]

$d$  = Schichtdicke der Küvette [ $\text{cm}$ ]

$A_{280}$  = Absorption bei 280 nm

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-Beer'schen Gesetzes ( $A_{280} = \epsilon \times c \times d$ ) ermittelt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  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.

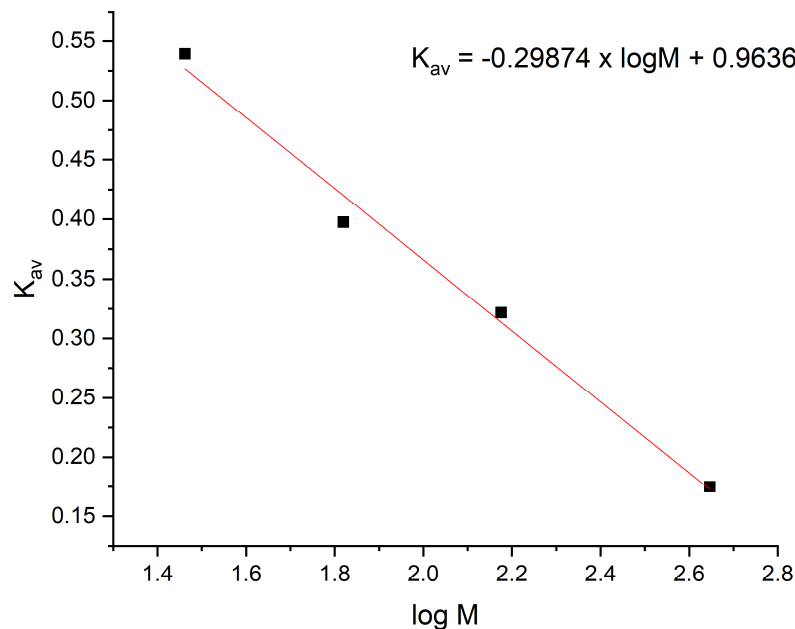
## 2.4 Charakterisierung gentechnisch hergestellter Enzyme

### 2.4.1 Analyse des Oligomerisierungszustandes durch analytische SEC

Zur Abschätzung der Molekülmasse der Proteine anhand ihres Elutionsvolumens erfolgte die Kalibrierung einer Säule mit Hilfe von Standardproteinen nach Angaben des Herstellers. Die Kalibrierung der Säule erfolgte unter Verwendung der Proteine Apoferritin, ADH, Ovalbumin und Carboanhydrase und des Farbstoffs Blue Dextran. Dazu wurde 0,5 mL Proteinlösung auf die Säule Superdex S200 10/300 GL (Säulenvolumen: 23 mL) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min appliziert (Abb. 10, Tabelle 9). Die weitere Berechnung und Auswertung erfolgte gemäß den Herstellerangaben der Superdex S200 10/300 GL.

**Tabelle 9:** Verwendete Proteinkalibrierung-Standards

Protein	Molekulare Masse [kDa]
Blue Dextran	2000
Apoferritin	443
ADH	150
Ovalbulmin	66
Carboanhydrase	29



**Abbildung 10:** Kalibriergerade der analytischen SEC. Aufgetragen wurde  $K_{av}$  gegen  $\log M$

### 2.4.2 Elektronensprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS)

Zur Analyse der Molekülmassen wurden die gereinigten Proteine mit einer Konzentration von 5-10 µM dreimal gegen das 10.000-fache Volumen 10 mM Ammoniumacetat pH 6,7 (in der Regel ca. 50-100 µL Probe gegen 500 mL Puffer) über Nacht in einer Dialysemembran dialysiert und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm). Kurz vor der Messung wurde die Probe mit 20 % (v/v) Acetonitril (LC-MS grade) und 0,1 % Ameisensäure (LC-MS grade) versetzt und mit Ammoniumacetat-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 200 µL aufgefüllt. Die Massenanalyse erfolgte im positiven Ionisierungsmodus in einem Bruker Daltonics maXis Q-TOF (*Quadrupol-Time of Flight*) Massenspektrometer ausgestattet mit einer ESI (*Electrospray Ionization*)-Quelle unter folgenden Bedingungen: Capillary Voltage: 4,5 kV, End Plate Offset: -500 V, Nebulizer Pressure: 0,4 bar, Dry Gas Flow: 4,0 L/min, Dry Temperature: 180 °C, Flow Rate: 180 µL/h. Die Dekonvolution der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des geräteeigenen Programms Compass Data Analysis v4.0 und des Algorithmus MaxEnt (Bruker Daltonics, Bremen).

### 2.4.3 Bestimmung kinetischer Enzymparameter

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der Saccharose-Isomerasen und Alkohol-Dehydrogenasen erfolgte anhand enzymatischer Aktivitätstests, welche auf der Michaelis-Menten-Kinetik basieren.

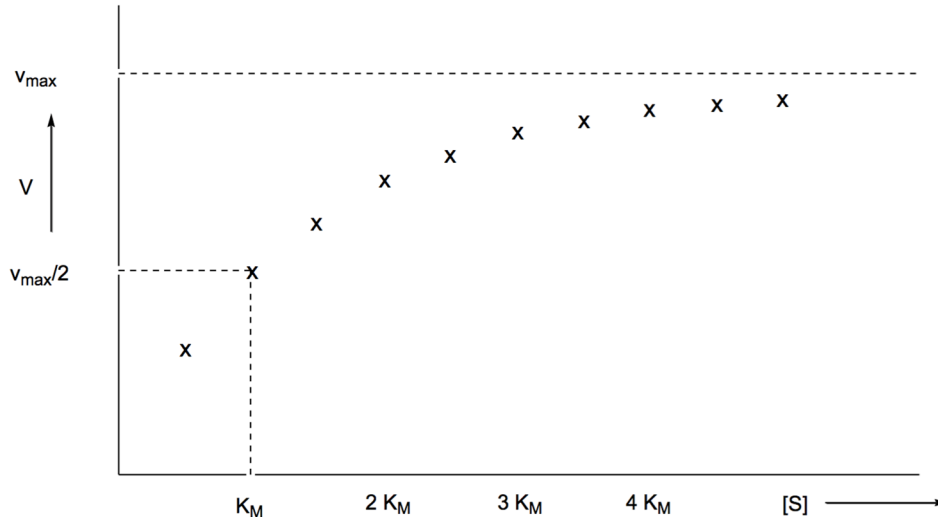
$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S]+K_M}$$

$v_{\max}$  = Maximalgeschwindigkeit bei Substratsättigung

[S] = Gesamt-Substratkonzentration

$K_M$  = Michaelis-Konstante [mol/L]

Der  $K_M$ -Wert entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktion bei halbmaximaler ( $v = v_{\max}/2$ ) Geschwindigkeit erfolgt. Es stellt ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$  nach Michaelis und Menten (1913).

Die katalytische Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  gibt an, wie viele Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit in das Produkt umgesetzt werden:

$$v_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]_{\text{T}}$$

$k_{\text{cat}}$  = katalytische Wechselzahl [ $\text{s}^{-1}$ ]

$[E]_{\text{T}}$  = eingesetzte Enzymkonzentration [ $\mu\text{mol}$ ]

Aus dem Quotienten der katalytischen Wechselzahl und der Michaelis-Menten-Konstante kann die katalytische Effizienz eines Enzyms  $k_{\text{cat}}/K_M$  ermittelt werden.

#### 2.4.4 Aktivitätsassay der Alkohol- und Acetaldehyd-Dehydrogenasen

Gegenstand der Aktivitätsassays war die Ermittlung der  $K_M$ - und  $k_{\text{cat}}$ -Werte für Acetaldehyd/Ethanol sowie für  $\text{NAD(P)}^+$  nach Michaelis und Menten. Abhängig von der Variante wurde 0,01 bis 5  $\mu\text{M}$  gereinigtes Enzym eingesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Substrat zu 200  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Enzymlösung, bestehend aus Reaktionspuffer, Cosubstrat und Puffer. Die Absorption wurde kontinuierlich bei 340 nm und 25 °C 10 min im Mikroplate Reader Synergy 2 gemessen. Die Messung beruht auf der Bildung von  $\text{NAD(P)H}$  aus der Oxidationsreaktion, welches anders als  $\text{NAD(P)}^+$  photometrisch bei 340 nm detektierbar ist. Über die Absorption wurde die Produktkonzentration pro Zeitabschnitt bestimmt. Aus dem anfänglich linearen Bereich wurde die Steigung ermittelt, die der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion entspricht. Als Berechnungsgrundlage wurde der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von  $\text{NADH}$  (sowie auch  $\text{NADPH}$ ) bei 340 nm  $\epsilon = 6300 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$  verwendet.

Die spektrophotometrische Verfolgung der Enzymaktivität *in vitro* basierte in dieser Arbeit auf der Bildung von  $\text{NAD(P)H}$ , welches bei der enzymatischen Oxidationsreaktion von Acetaldehyd bzw. Ethanol mit dem Coenzym  $\text{NAD(P)}^+$  freigesetzt wird.



### 2.4.5 Aktivitätsassay der Saccharose-Isomerasen SmuA und PadU

Zur funktionellen Charakterisierung der verschiedenen SmuA-Varianten wurden Enzymassays unter verschiedenen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Pufferzusammensetzung, Reaktionstemperatur und Enzymkonzentration durchgeführt. Zur Bestimmung des Substratumsatzes und der Produktverteilung für die einzelnen SmuA-Varianten wurde ein Ansatz bestehend aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 (eingestellt mit HCl) mit einem Gesamtvolumen von 500 µL und bei 20 °C für 16 h inkubiert. Das Enzym wurde danach für 10 min bei 95 °C inaktiviert. Die katalytischen Parameter nach Michaelis/Menten wurden dagegen unter Einsatz verschiedener Substratkonzentrationen (300 mM, 250 mM, 200 mM, 100 mM und 50 mM) und unterschiedlicher Inkubationszeiten (je Substratkonzentration 10, 20 und 30 min) unter ansonsten gleichen Bedingungen bestimmt. Dazu wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 2 mL vorbereitet, um nach jeweils 10, 20 und 30 min 200 µL Proben zu entnehmen.

Zur Analyse der Aktivitätsassays der Saccharose-Isomerasen und deren Varianten bzw. zur Auftrennung der Zuckergemische wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) eingesetzt. Hierfür verwendet wurde eine Waters XBridge Amide Säule, 3,5 µm, 4,6 × 250 mm. Begründet wurde die Wahl dieser Säule damit, dass eine Bildung von Schiff'schen Basen zwischen den Amid-Gruppen der Säule und den Hydroxygruppen der zu analysierenden Zuckerresten ausgeschlossen sind.

Die mobile Phase bestand aus 57,8 % v/v Acetonitril, 26,1 % v/v Aceton und 16,1 % didestilliertem Wasser. Die Zucker wurden anhand der unterschiedlich starken Wechselwirkung der Hydroxygruppen mit der Säulenmatrix in ihrer Laufgeschwindigkeit beeinflusst, aufgetrennt und in Verbindung mit dem Smartline RI Detector S2300 detektiert.

Die Messungen wurden nach einer Analysevorschrift (SOP) von EVONIK Industries durchgeführt. Demnach wurde die Säule zuerst auf 30 °C vorgeheizt und in Laufpuffer äquilibriert, bis sich eine stabile Basislinie einstellte. Es wurde je 20 µL des hitzebehandelten Reaktionsgemisches injiziert bei einer Flussrate von 2 mL/min und einer Laufzeit von 20 min. Die Regenerierung der Säule erfolgte durch 20-minütiges Spülen mit Acetonitril bei einer Flussrate von 2 mL/min.

Um eine quantitative Analyse der Katalyseprodukte von SmuA (Isomaltulose, Trehalulose, Fructose und Glucose) sowie des eingesetzten Substrats (Saccharose) zu ermöglichen, erfolgte zunächst eine Kalibrierung mit den einzelnen Zuckern. Dazu wurden Lösungen bekannter Konzentrationen in Höhe von 50, 100, 150, 200, 300 und 400 mM vermessen. Zur Quantifizierung von Trehalulose wurde die Kalibrierungsdaten der Isomaltulose verwendet, da dieser Zucker nicht als Standardsubstanz verfügbar war. Alle Zucker wurden in Reinstwasser gelöst und wie zuvor beschrieben analysiert. Mit Hilfe der ermittelten Kalibrierungsgerade und des Programms OriginPro wurden die Peak Integrale der Elutionsprofile quantifiziert und ausgewertet.

## 2.4.6 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

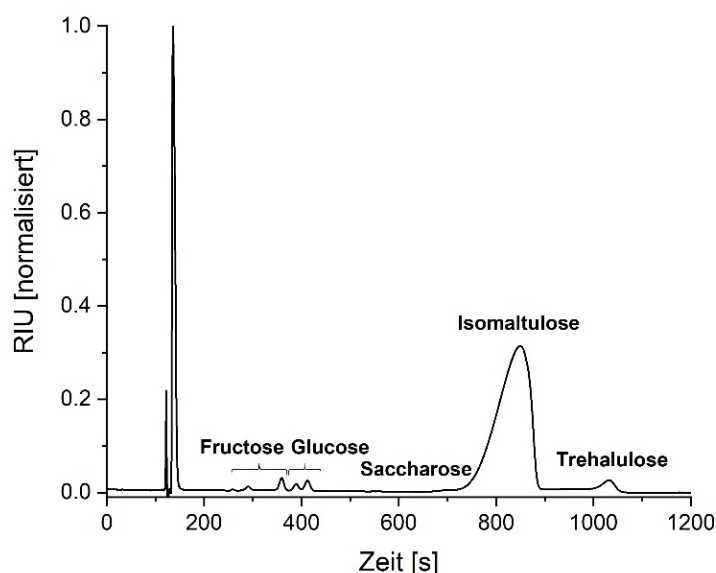
Die thermische Stabilität von SmuA und dessen Mutanten sowie deren Entfaltungsübergänge wurden durch CD-Spektroskopie analysiert. Dazu wurden die temperaturabhängigen Konformationsänderungen in den Sekundärstrukturelementen der Proteine im Wellenlängenbereich zwischen 190 und 250 nm verfolgt. Dies ist möglich, da sich die Absorptionseigenschaften der Peptidbindung in Bezug auf das rechts- und linkshändig zirkular-polarisierte Licht in Folge der Entfaltung differenziell ändern (Elliptizität).

Zunächst wurde diejenige Wellenlänge bestimmt, bei der die maximale CD-Signaldifferenz zwischen dem nativen und dem vollständig entfalteten Protein zu beobachten war. Dazu wurden in einem Jasco Spektropolarimeter J-810 mit Peltier-Element PT-423S CD-Spektren von einer gereinigten 1,5  $\mu\text{M}$ -Proteinlösung ( $V = 200 \mu\text{L}$ ) in CD-Puffer (50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 20 mM  $\text{KPi}$  pH 7,5) zwischen 190 und 250 nm bei jeweils 25 °C und 90 °C aufgenommen. Folgende Messparameter wurden dazu eingestellt: Response: 4 s, Band Width: 1 nm, Data Pitch: 0,1 nm, Scan Speed: 100 nm/min, Akkumulation von 10 Einzelspektren. Die CD-Spektren wurden in dem Steuerungs- und Analyseprogramm Spectra Manager v1.53.05 (Jasco) jeweils um das Pufferspektrum korrigiert und voneinander subtrahiert, wodurch sich ein Differenzmaximum bei 210 nm ergab. Bei dieser Wellenlänge wurde mit einer frischen Proteinlösung die Schmelztemperatur  $T_m$  bestimmt, indem die Temperatur von 25 °C bis 90 °C mit einem Gradienten von 60 K/h erhöht und die Rohdaten gemäß dem Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung (Schlehuber and Skerra, 2002) ausgewertet wurden. Dabei wurden lineare Signaländerungen im prä- und postransitionellen Bereich mit dem Programm Graphpad Prism 6 (GraphPad Software) korrigiert. Um die Denaturierungsübergänge der verschiedenen Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven anschließend auf den Anteil an ungefaltetem Protein  $f(u)$  umgerechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines empfindlichen Messverfahrens zur Zuckeranalytik

Zur Analyse der Enzymaktivität und Spezifität der Saccharose-Isomerase SmuA erfolgte die Auftrennung des Produktgemisches mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). In vorangegangenen Arbeiten wurde eine Waters Spherisorb 5  $\mu\text{m}$   $\text{NH}_2$ ; 4.6 x 250 mm Analytic Column (Seiboth, 2013) verwendet mit einer stationären Phase aus an Silica gebundenen trifunktionalen Aminopropylsilanen (mobile Phase: 57,8 % Acetonitril, 26,1 % Aceton in 16,1 % didestilliertem Wasser). Die Zucker wurden anhand der Wechselwirkung ihrer Hydroxygruppen mit den Aminogruppen der Säulenmatrix, aufgetrennt und mit Hilfe eines Brechungsindex-Detektors nachgewiesen. Diese Methode erlaubte jedoch erfahrungsgemäß eine zuverlässige Auftrennung von nur etwa 50 Proben, da die Bildung von Schiff'schen Basen zu einer schrittweisen Verschlechterung der Trennleistung der  $\text{NH}_2$ -Säule und einer instabilen Basislinie führte.



**Abbildung 12:** HPLC-Analyse als Teil des Enzymaktivitätsassays von SmuA zur Auftrennung der verschiedenen Isomerisierungs- und Hydrolyseprodukte. Verwendet wurde die XBridge Amide Column und der Smartline RI Detektor 2300. Der Ansatz wurde mit 1,16 M Saccharose und 74,4 nM Enzym in 25 mM Calciumacetat pH 5,5 bei 20 °C für 16 h inkubiert. Mobile Phase: 57,8 % Acetonitril, 26,1 % Aceton in 16,1 % didestilliertem Wasser ohne Gradient.

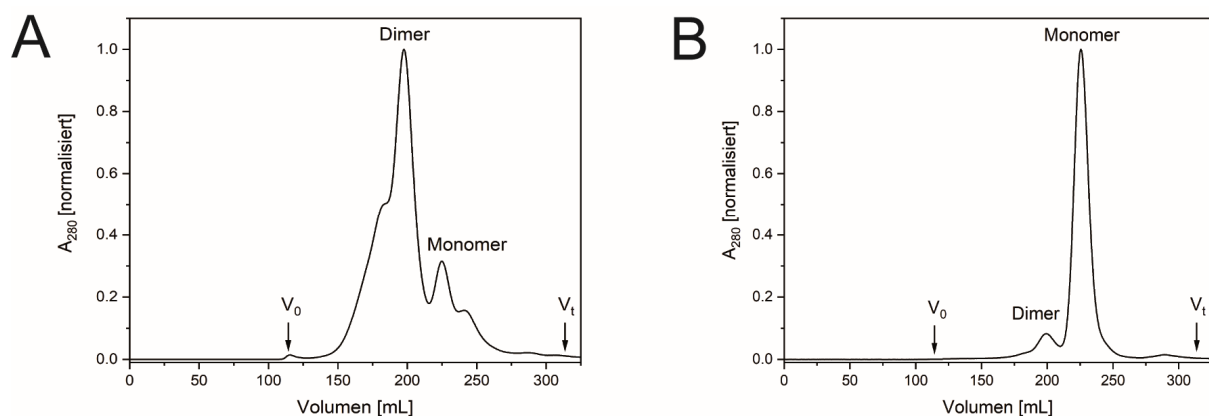
Für die verlässliche Durchführung von mehreren hundert Messungen zur Analyse der SmuA-Punktmutanten bestand Bedarf an einem robusteren analytischen Messverfahren. Dies wurde durch die Umstellung der Säulenmatrix von Aminogruppen auf Amidgruppen mit der XBridge Amide Column erreicht. Tatsächlich wurden damit am Ende des Projekts nach über 500 Durchläufen weiterhin exzellente Trennleistungen beobachtet. Weiterhin wurde die Trennleistung hinsichtlich der beiden aus der Hydrolyse von Saccharose resultierenden Monomere sogar gesteigert. Im Fall von D-Fructose konnten die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere der jeweiligen Ringformen getrennt werden, welche gemäß Literaturangaben zu 76 % der  $\beta$ -Pyranoseform, zu 20 % der  $\beta$ -Furanoseform und zu 4 % der  $\alpha$ -

Furanoseform entsprachen (Belitz *et al.*, 2008). Glucose wurde zu 36 % als  $\alpha$ -D-Glucose und zu 64 % als  $\beta$ -D-Glucose detektiert (Abb. 12).

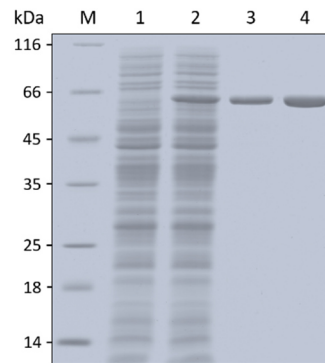
Diese Optimierung führte gemäß den bisherigen Literaturangaben sowohl zu der besten Trennleistung eines SI-Produktgemisches als auch zur stabilsten Methodik (Goulter *et al.*, 2012, Jung *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2016). Damit wurde zu Beginn dieser Arbeit die Charakterisierung von SmuA(V465E) und PadU vorgenommen und darauf aufbauend das semi-rationale Engineering von SmuA(V465E) durchgeführt.

### 3.2 Charakterisierung der Punktmutante SmuA(V465E)

Am Beginn dieser Arbeit stand die Etablierung einer leicht zu handhabenden und reproduzierbaren Reinigungsstrategie für die von Frau Judith Seiboth entwickelte SmuA-Punktmutante V465E im Fokus, die nachfolgend als SmuA\* bezeichnet wird. Diese zeichnete sich durch eine Optimierung in Bezug auf Proteinausbeute und -löslichkeit aus (siehe 1.3). Natürlicherweise stellt das Monomer – und das als Nebenprodukt der rekombinanten Proteinproduktion auftretende Dimer - die funktionell aktive Form von SmuA dar. Daher war es im Hinblick auf die spätere industrielle Anwendung dieser Variante im Wirtsorganismus *S. plymuthica* von Bedeutung, die Mutanten in reiner monomerer Form zu analysieren. Hierzu wurde die sekretorische Expressionsstrategie in *E. coli* gewählt mit den Expressionsplasmiden pASK-IBA4(+) zur periplasmatischen Expression und pASK-IBA5(+) zur cytoplasmatischen Expression. Die Reinigung von SmuA\* erfolgte aus dem periplasmatischen Zellextrakt mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC) und anschließender Größenausschlusschromatographie (*Size-exclusion Chromatography*; SEC) (Abb. 14). Nur im Fall der periplasmatischen Genexpression in einem für die Ausbildung des Monomers vorteilhaften calciumreichen Milieu (siehe 1.4), wurde eine klare Abtrennung des Monomers erreicht. Nach cytoplasmatischer Genexpression war es dagegen nicht möglich, mittels SEC das dominierende Dimer vom Monomer vollständig zu trennen (Abb. 13).



**Abbildung 13:** SEC-Profile von SmuA\* auf einer präparativen Superdex S200 Säule nach vorhergehender SAC-Reinigung. (A) SmuA erhalten durch cytoplasmatische Genexpression in *E. coli* liegt hauptsächlich als Dimer vor. (B) Deutliche Veränderung des Oligomerisierungszustandes zu Gunsten des Monomers durch periplasmatische Genexpression unter Zugabe von 1 mM Calciumacetat zum Kulturmedium. Monomer bzw. Dimer enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und anschließend mittels SDS-PAGE und analytischer SEC analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Monomerfraktion für Aktivitätsassays verwendet.

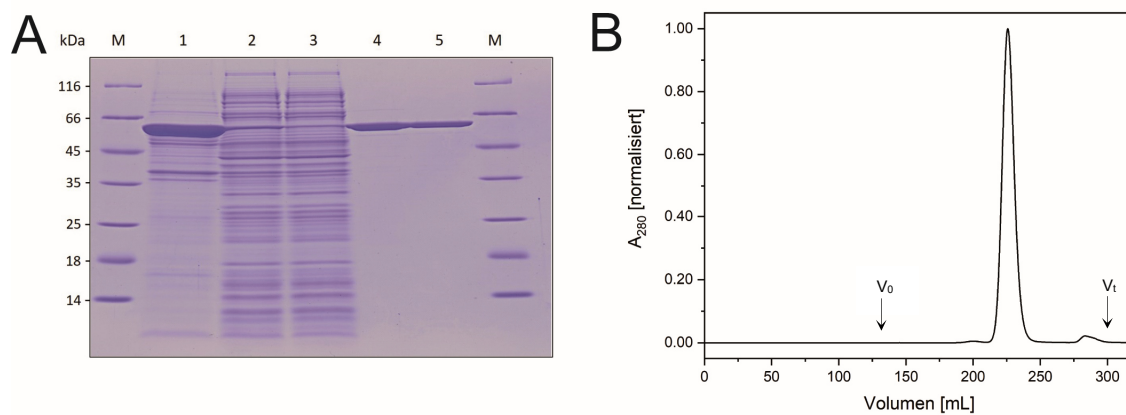


**Abbildung 14:** SDS-PAGE zur Analyse der sekretorischen Produktion und Reinigung der rekombinanten Enzymmutante SmuA\*. M = Größenstandard; 1 = Zell-Lysat von *E. coli* BL21 transformiert mit pASK-IBA5(+)-SmuA vor Induktion; 2 = Zell-Lysat 22 h nach Induktion; 3 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SAC; 4 = Vereinigte monomere Elutionsfraktionen nach der SEC.

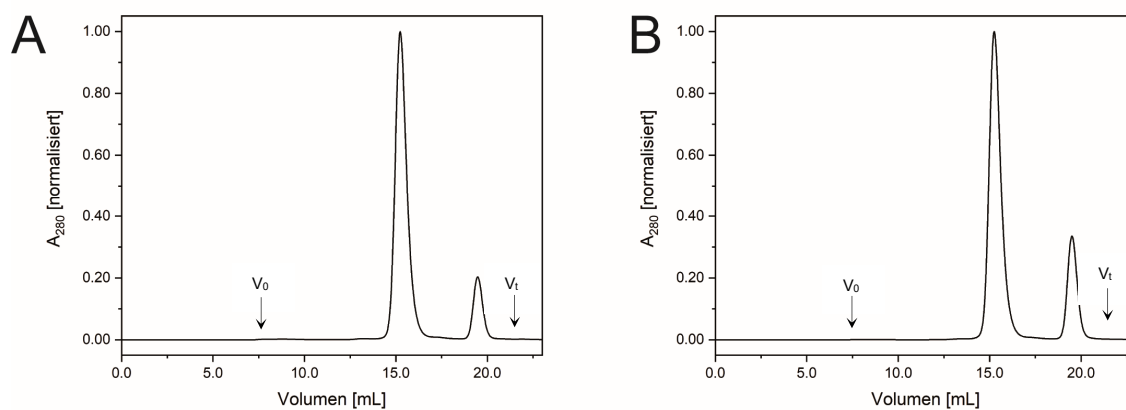
Diese Methodik wurde zunächst in größerem, präparativem Maßstab mit Hilfe einer Superdex S200 26/60 erprobt und im Anschluss auf die kleinere S200 300 GL übertragen. Aufgrund des geringeren zeitlichen und materiellen Verbrauchs ermöglichte dies die Reinigung des Monomers bis zur gewünschten Homogenität, verbunden in höherer Stückzahl. Zusätzlich gewährte die vollständige Abtrennung des Monomers keine nachteilige Beeinflussung des Assays durch das Dimer in den nachfolgenden Aktivitätsassays.

### 3.3 Charakterisierung der Saccharose-Isomerase PadU aus *Pantoea dispersa* UQ68J

Bis heute weist die Saccharose-Isomerase PadU aus *Pantoea dispersa* UQ68J mit 91 % Isomaltulose und 3 % Trehalulose laut Literaturangaben die höchste prozentuale Ausbeute an Isomaltulose auf (Wu and Birch, 2004). SmuA stellt mit 86 % Isomaltulose und 9 % Trehalulose den zweitbesten Biokatalysator dar (Nakajima, 1984). Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurde das für PadU synthetisierte Gen auf den Plasmiden pASK-IBA4(+) und pASK-IBA5(+) kloniert. Genexpression und Reinigung erfolgten äquivalent zu SmuA mittels SAC und SEC (Abb. 15). Sowohl nach periplasmatischer als auch nach cytoplasmatischer Genexpression lag PadU ausschließlich als Monomer vor (Abb. 15 und Abb. 16). Selbst im calciumarmen Milieu des Cytoplasmas war keinerlei Dimerisierung - wie bei SmuA - festzustellen. Zugabe von 1 mM Calciumacetat zum Kulturmedium zeigte ebenfalls keinen Effekt auf den Oligomerisierungszustand (Abb. 16). Zwar besitzt PadU, wie SmuA, ebenfalls eine hochkonservierte Calciumbindestelle, jedoch scheint in diesem Fall eine Besetzung mit Calcium für die korrekte Quartärstruktur nicht kritisch. Allerdings bleibt festzustellen, dass der überwiegende Teil des rekombinanten PadU-Proteins nach der cytoplasmatischen Genexpression in *E. coli* in unlöslicher Form vorlag (Abb. 15 A).



**Abbildung 15:** SDS-PAGE und SEC-Profil von PadU nach cytoplasmatischer Genexpression in *E. coli*. (A) SDS-PAGE der Produktion und Reinigung von rekombinantem PadU. M = Größenstandard; 1 = Sedimentierter Zellextrakt von *E. coli* BL21 mit pASK-IBA5(+)-SmuA nach French Press; 2 = Löslicher Überstand nach French Press; 3 = Durchfluss der SAC; 4 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SAC; 5 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SEC. (B) SEC Elutionsprofil von PadU aus der SEC an einer präparativen Superdex S200 Säule (nach vorhergehender SAC-Reinigung).

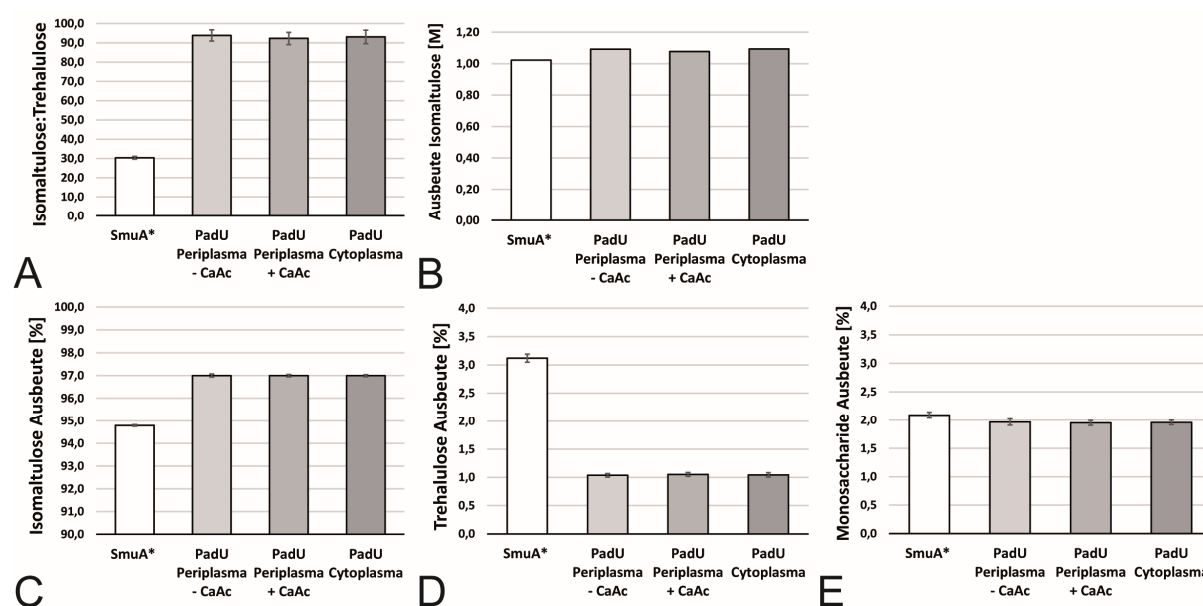


**Abbildung 16:** SEC-Profil von PadU nach periplasmatischer Genexpression in *E. coli* an einer analytischen Superdex 200 Säule. (A) Zugabe von 1 mM Calciumacetat zum Kulturmedium. (B) Normales Kulturmedium LB.

Für das zur Homogenität gereinigte PadU wurde im direkten Vergleich mit SmuA\* die enzymatische Aktivität und das Produktspektrum analysiert. Mit einem Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von 93:1 und einer 97 %-igen Ausbeute an Isomaltulose stellte PadU tatsächlich den deutlich besseren Isomaltulose-Produzenten dar. Zudem wurden lediglich 1,0 % Trehalulose und 2,0 % Monosaccharide detektiert, wohingegen im Produktspektrum von SmuA\* 3,1 % Trehalulose und 2,1 % Monosaccharide zu finden waren. Auch hinsichtlich der Ausbeute an Isomaltulose lag PadU mit 1,09 M um 0,07 M etwas höher als SmuA\* (Abb. 17). In Anbetracht dieser Messwerte ist die in der Literatur oftmals anzutreffende Bezeichnung von PadU als „bester Isomaltulose-Produzent“ (Ravaud *et al.*, 2009) nachvollziehbar.

Die enzymatischen Parameter von PadU wurden nach drei verschiedenen Expressionsstrategien studiert: (1) unter Calciummangel im Cytoplasma, (2) periplasmatisch ohne Zugabe von Calciumacetat und (3) periplasmatisch mit Zugabe von 1 mM Calciumacetat zum Kulturmedium, wie bei der vorherigen

Analyse des Oligomerisierungszustandes. Interessanterweise beeinflusste die Expressionsstrategie weder Aktivität noch Produktspektrum (Abb. 17). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Anwesenheit von Calcium in der konservierten Bindestelle auch für die katalytische Aktivität weniger bedeutsam ist. Insgesamt lassen diese Beobachtungen drei maßgebliche Schlussfolgerungen zu: Erstens, dass die Calciumkonzentration bei der Biosynthese oder Faltung bei PadU weniger bedeutsam ist als bei SmuA. Zweitens, dass allerdings nicht analysiert wurde, zu welchem Grad die Calciumbindestelle der gereinigten PadU mit Calciumionen besetzt ist und drittens, dass daher unklar bleibt, ob die Bedeutung der Bindestelle im Falle der PadU gleichermaßen strukturell bedeutsam ist, wie bei SmuA.



**Abbildung 17:** Enzymatische Analyse von PadU nach verschiedenen Expressionsbedingungen im Vergleich zu SmuA\*. PadU wurde zum einen cytoplasmatisch exprimiert und zum anderen periplasmatisch unter An- oder Abwesenheit von 1 mM Calciumacetat im Kulturmedium. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose (C), Trehalulose (D) und den Monosacchariden (E), das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose (A) und die Ausbeute an Isomaltulose in M (B). Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µg/mL (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % w/v Saccharose in 10 mM Calciumacetat/HCl pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500 µL. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet, gefolgt von der Produktanalytik mittels HPLC.

## 3.4 Semi-rationales *Protein-Engineering* von SmuA

### 3.4.1 Entwicklung einer neuartigen Strategie für das evolutive Enzym-Engineering

Das Arbeitsfeld des *Protein-Engineering* kann in zwei Methoden gegliedert werden: die gerichtete Evolution und das rationale Design. Die gerichtete Evolution basiert auf der lokal eingeschränkten zufälligen Mutagenese der codierenden Nukleotidsequenz eines Proteins und anschließendem Screening der Mutantenbibliothek hinsichtlich des aufgestellten Anforderungsprofils, also katalytische Aktivität, Substrat-/Produktspezifität sowie Proteinstabilität. Bei dieser Methode werden in der Regel mehrere iterative Mutationszyklen durchlaufen, wobei die verbesserte Variante des vorherigen Zyklus den Ausgangspunkt für den nächsten Zyklus darstellt. Die Generierung der Mutantenbibliothek kann durch nicht-rekombinante Methoden wie der *Error-Prone* PCR (Pritchard *et al.*, 2005) oder durch rekombinante Methoden wie dem *DNA-Shuffling* (Stemmer, 1994) erfolgen. Voraussetzung für die gerichtete Evolution ist die vorherige Etablierung eines Screening Systems, das einen möglichst hohen Durchsatz erlaubt. Vorteil neben der schnellen Analyse einer großen Anzahl von Varianten ist, dass Informationen über die 3D-Struktur hilfreich, aber nicht notwendig, sind. Jedes Enzym, dessen Sequenz bekannt ist, steht somit der gerichteten Evolution offen (Arnold, 2018, Bornscheuer and Pohl, 2001).

Das rationale Design von Proteinen stellt die alternative Strategie des *Protein-Engineerings* dar und unterscheidet sich in vielen Punkten von der gerichteten Evolution. So ist eine Kristallstruktur oder zumindest ein gutes Homologie-Modell des Zielproteins Grundvoraussetzung. Die größte Herausforderung dieser Methode liegt in der Vorhersage der zu mutierenden Aminosäuren. Dies erfolgt anhand von Sequenzvergleichen mit homologen Strukturen und unter Zuhilfenahme von Kenntnissen über den Mechanismus des Enzyms. Die Kunst dabei liegt in einem cleveren Design der in diesem Fall relativ beschränkten Zahl an Mutanten, die sich schnell experimentell generieren und untersuchen lässt. Eine Vielzahl von bioinformatischen Methoden steht dem Experimentator dabei zur Verfügung (Tylar Seiya *et al.*, 2018, Tiwari *et al.*, 2012).

An der Schnittstelle dieser beiden Strategien liegt das semi-rationale Design von Proteinen, das auch als *Smart Library* oder *Knowledge-Based Library Design* bezeichnet wird (Lutz and Patrick, 2004). Diese etwas speziellere Methodik versucht die Vorteile der gerichteten Evolution mit denen des rationalen Designs zu vereinen. In diesem Fall, liegt aufgrund von Informationen über Sequenz, Struktur und Funktion des Proteins die Konzentration auf wenigen Aminosäurepositionen. Diese werden randomisiert und die daraus resultierende Bibliothek wird dann mit den Methoden der gerichteten Evolution untersucht (Lutz, 2010, Notonier *et al.*, 2016).

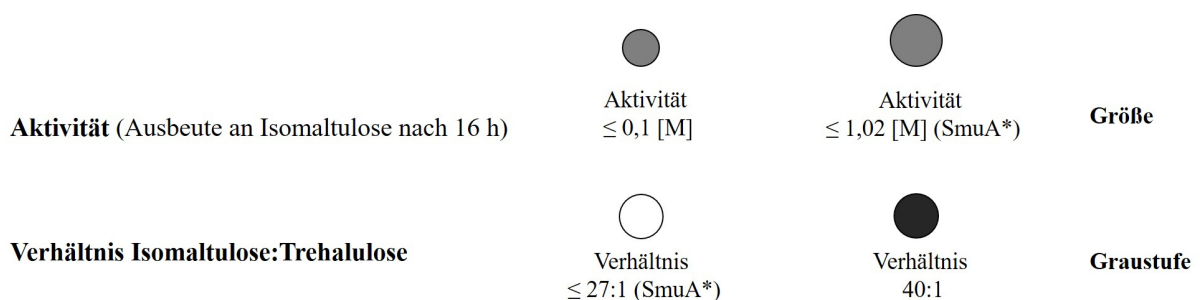
Vor dem Hintergrund dieser etablierten Ansätze und inspiriert durch das Spiel „*Schiffe versenken*“ wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Verfahren zum semi-rationalen Design von SmuA entwickelt, etabliert und eingesetzt. Die Regeln dieses weltbekannten Strategiespiels beruhen auf einem abwechselnden Abfeuern von Schüssen der beiden beteiligten Spieler auf die gegnerische Flotte. Landet ein Schuss im Wasser, so wird das Raster an dieser Stelle mit einem Punkt markiert. Wird jedoch ein



Schiff getroffen, so wird dieses Feld mit einem Kreuz markiert. Ein solcher Treffer weist auf die Anwesenheit eines größeren Schiffs in diesem Bereich hin, was die Erfolgchancen weiterer Schüsse in dem entsprechenden Koordinatenbereich erhöht, bis zum Versenken des Schiffs, das sich über mehrere Felder erstrecken kann. Das daraus resultierende Treffermuster erzeugt ein Bild über die Gesamtlage der gegnerischen Flotte. Mit jedem abgefeuerten Schuss sei es ein Treffer oder Fehlschuss gewinnt man also neue Informationen über das schrittweise deutlicher werdende Gesamtbild.

Überträgt man diese Spielidee und die dabei angewandte Strategie auf die Biochemie, so lassen sich auch in einem 3D-Modell eines Proteins mutierte Aminosäurepositionen markieren. Abhängig von den geforderten phänotypischen Parametern erfolgt eine entsprechende farbliche Markierung dieser Position. Dadurch entsteht schrittweise mit jeder analysierten Mutation ein charakteristisches Gesamtbild, das neue Erkenntnisse über den Mechanismus und die Funktion des Proteins liefert.

Die in der PDB hinterlegte Kristallstruktur (PDB: 3GBE) von SmuA zeigt ein Monomer mit dem Glucose-Analogon Deoxynojirimycin als Inhibitor. Die Struktur der Trehalulose Synthase MutB (PDB: 2PWE) hingegen wurde mit dem Substrat Saccharose im aktiven Zentrum aufgeklärt. Da beide Strukturen eine 65,7 %-ige Sequenzidentität aufweisen, war es möglich, ein *Pair Fit* Alignment mit dem Grafikprogramm PyMOL durchzuführen. Im Anschluss wurden sowohl MutB als auch Deoxynojirimycin aus dem Modell entfernt. Dies resultierte in einem Modell von SmuA mit seinem Substrat Saccharose im aktiven Zentrum. Für die Markierung der Eigenschaften einer Mutante wurde das  $\alpha$ -C-Atom der entsprechenden Aminosäure als Sphäre dargestellt. Mit jeder Sphäre wurden zwei Parameter abgebildet. Zum einen die Aktivität der Mutanten anhand der Größe der Sphäre und zum anderen das Produktverhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose mit Hilfe der Graustufe (Abb. 18).



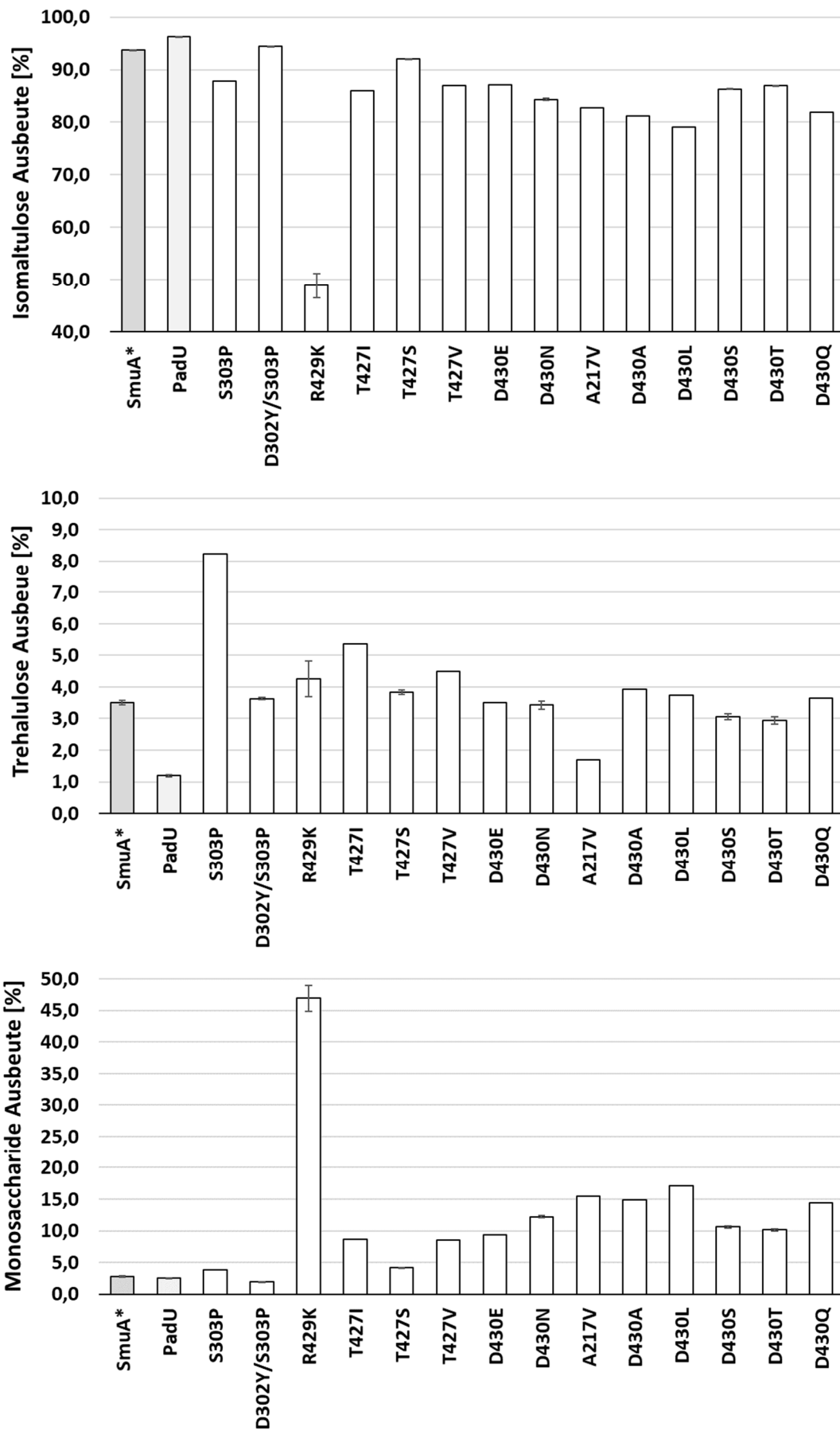
**Abbildung 18:** Darstellung enzymatischer Parameter mit PyMOL. Das  $\alpha$ -Atom der mutierten Aminosäurepositionen wird als Sphäre dargestellt. Die Größe der Sphäre zeigte die Aktivität der Mutante an, wobei 1,02 M der Ausgangsvariante SmuA\* entspricht. Mutationen, die zu einer Verringerung der Aktivität führten, wurden mit einer kleineren Sphäre dargestellt. Das Produktverhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose wurde über die Graustufe der Sphäre abgebildet. Dabei steht eine weiße Sphäre für SmuA\* und einem Verhältnis 27:1. Mutanten mit einer erhöhten Isomaltulose-Produktion erhielten einen dunkleren Grauton.

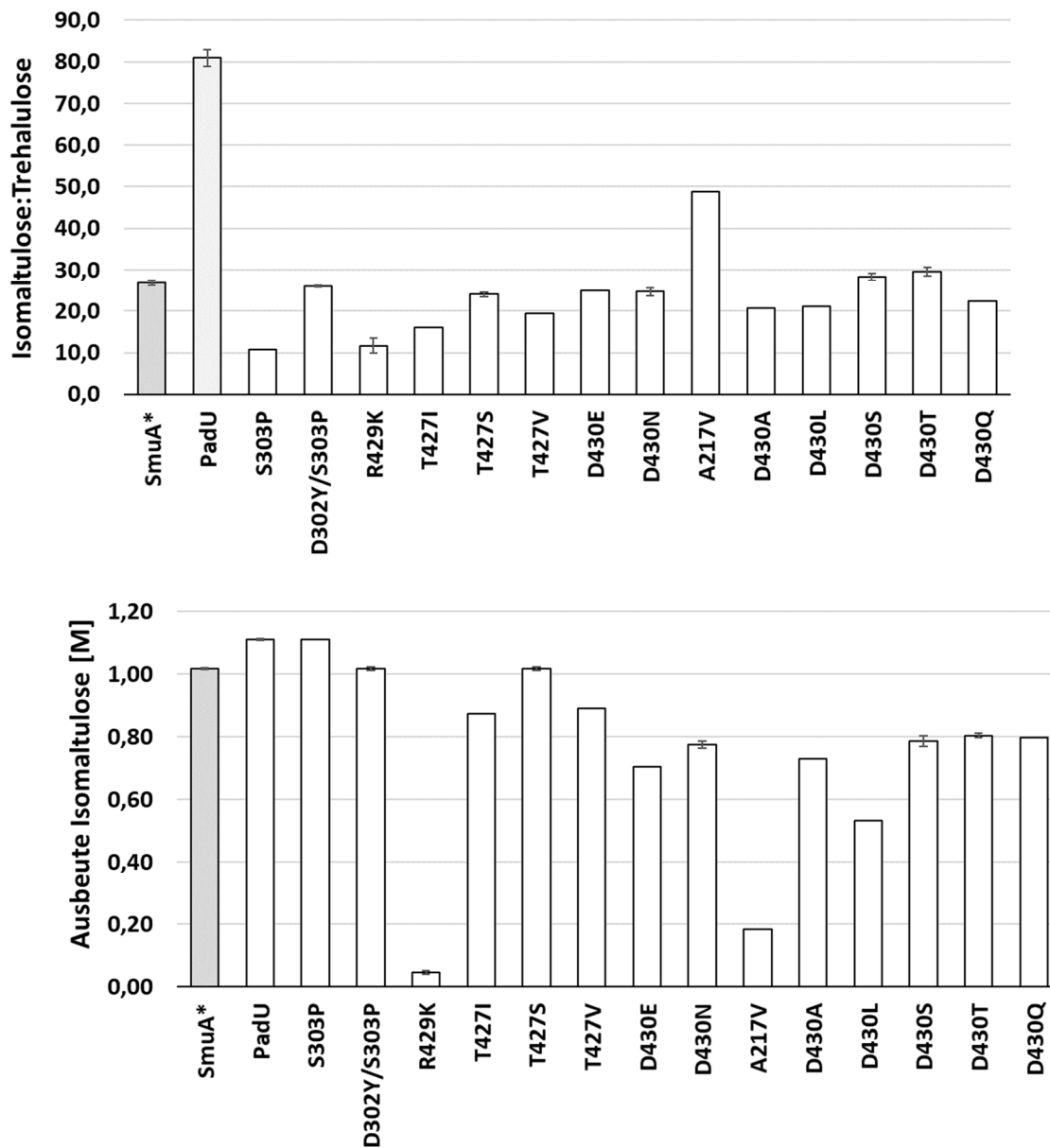
Die dadurch entstandene *Heatmap* zeigte mit zunehmender Zahl an untersuchten Mutanten ein charakteristisches Treffermuster, welches einen Überblick über die mutierten Positionen gewährte und die Planung des jeweils nächsten Mutationszyklus dirigierte. Zudem lieferte sie Aufschlüsse über die

Sensitivität gegenüber Aminosäuresubstitutionen. Als Ausgangsvariante für den ersten Zyklus diente die Variante „SmuA-Short“ (V465E), die durch periplasmatische Sekretion in *E. coli* produziert wurde.

### 3.4.2 Phase I: Fehlschüsse im aktiven Zentrum

Das semi-rationale *Protein-Engineering* von SmuA umfasste die Konstruktion von insgesamt 56 Einzelmutanten, die im Rahmen dieser Arbeit unter identischen Bedingungen exprimiert, gereinigt und analysiert wurden. Diese wurden in drei Hauptphasen mit sieben Zyklen generiert. Die Daten des jeweils abgeschlossenen Mutationszyklus lieferten neue Erkenntnisse und inspirierten neue Hypothesen, die in die Planung des darauffolgenden Zyklus einfließen. In der Methodik des rationalen Designs eines Enzyms mit dem Ziel der Beeinflussung der katalytischen Aktivität können mitunter wenige Substitutionen im aktiven Zentrum ausreichen, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Beispielsweise konnte SmuA durch die Punktmutation R306K oder die Doppelmutante F292A/F294A in einen Trisaccharid-Produzenten verwandelt werden, der Saccharose zu 70% in Isomelezitose umwandelt (Görl *et al.*, 2012). Daher ist es ratsam, die Planung der ersten Mutationszyklen auf das aktive Zentrum zu konzentrieren, da bereits geringfügige Seitenkettenaustausche einen signifikanten Unterschied bewirken können. Mit dem Ziel, die Trehalulose-Produktion von SmuA\* zu reduzieren, wurden deshalb zunächst relevante Aminosäurereste innerhalb des aktiven Zentrums für die Mutagenese ausgewählt. Dies beinhaltete die Positionen Ala217, Ser303, Arg429 und vor allem Thr427 und Asp430 (Abb. 20). Die Substitution des in direkter Nachbarschaft zum „Isomerisierungsmotiv“ <sup>298</sup>RLDRD<sup>302</sup> (Thompson *et al.*, 2001) stehenden Ser303 durch Prolin erhöhte die Trehalulose-Produktion von 3,5 auf 8,2 %. Ein Austausch von Arg429 gegen Lys reduzierte die Isomaltulose-Produktion auf 48,8 % und erhöhte die Trehalulose-Produktion auf 4,3 %, einhergehend mit 46,9 % Monosacchariden im Produktspektrum. Zudem reduzierte diese Punktmutation die Ausbeute an Isomaltulose drastisch (0,04 M) (Tabelle 10). Nur mit der Punktmutation A217V in der zweiten Schale von Aminosäureresten um das aktive Zentrum konnte ein deutlicher Rückgang der Trehalulose-Produktion auf 1,7 % erzielt werden. Zusammen mit einer 82,8 %-igen Isomaltulose-Produktion und einer auf 0,18 M verringerten Isomaltulose-Ausbeute (Tabelle 10) war dieser Austausch lediglich als Teilerfolg zu verbuchen, jedoch ein erster Hinweis auf eine erhöhte Trefferwahrscheinlichkeit in der zweiten Schale. Mit den Erkenntnissen aus Zyklus 1 wurde auf weitere Mutationen an der Position Arg429 verzichtet. Stattdessen wurde der Fokus auf die benachbarten Positionen Thr427 und Asp430 gelenkt. Mutationen des Threonins zu Isoleucin, Serin und Valin resultierten in erhöhten Trehalulose-Ausbeuten von 5,4 %, 3,8 % bzw. 4,5 % (Abb. 19). Die insgesamt sieben Substitutionen des Asp430 durch aliphatische (Alanin, Leucin), polare (Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin) und saure (Glutaminsäure) Aminosäuren führten in jedem Fall zu einem signifikanten Aktivitätsverlust hinsichtlich der Ausbeute an Isomaltulose. Mit den Austauschen Asp430S und Asp430T konnte die Trehalulose-Produktion geringfügig auf 3,1 % und 2,9 % reduziert werden, wohingegen die restlichen Mutanten eine nahezu gleichbleibende Ausbeute an Trehalulose zeigten (Abb. 19, Tabelle 10).

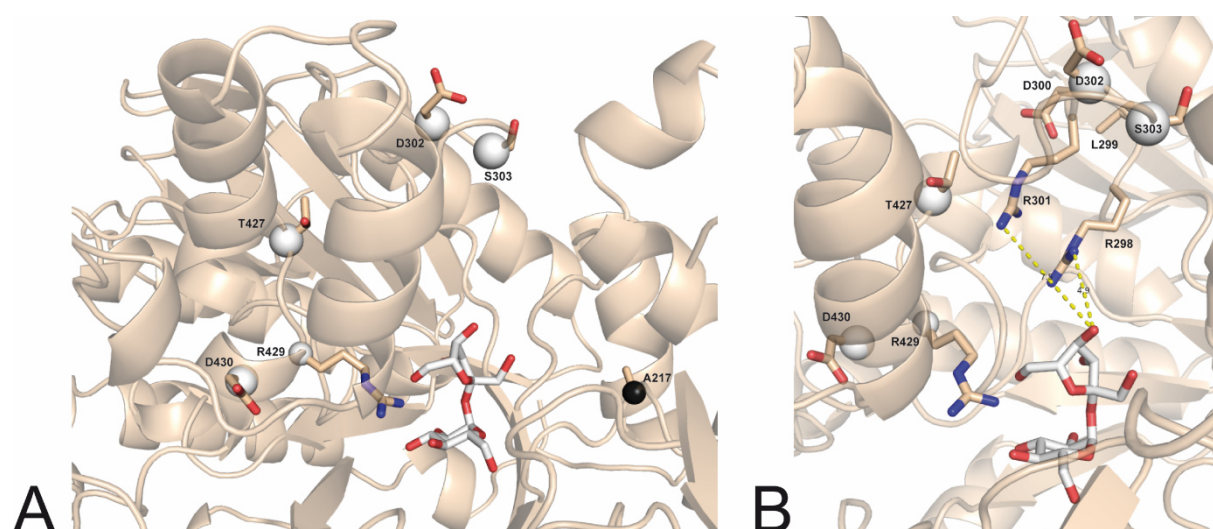




**Abbildung 19:** Analyse der ersten 14 SmuA-Punktmutanten an sechs Positionen aus Phase I bestehend aus den Zyklen 1 bis 3. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet.

**Tabelle 10:** Zusammenstellung der ersten 14 SmuA-Punktmutanten an insgesamt sechs Aminosäurepositionen aus Phase I untergliedert in die Zyklen 1 bis 3. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M.

	Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose	Ausbeute [M] Isomaltulose
		Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide		
	SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
	PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
Zyklus 1	S303P	87,9	8,2	3,9	10,7	1,11
	D302Y/S303P	94,5	3,6	1,9	26,0	1,02
	R429K	48,8	4,3	46,9	11,6	0,04
Zyklus 2	A217V	82,8	1,7	15,5	48,9	0,18
	T427I	85,9	5,4	8,7	16,0	0,87
	T427S	92,0	3,8	4,2	24,0	1,02
	T427V	87,0	4,5	8,5	19,3	0,89
	D430E	87,1	3,5	9,4	24,9	0,70
	D430N	84,4	3,4	12,2	24,6	0,78
Zyklus 3	D430A	81,1	3,9	14,9	20,6	0,73
	D430L	79,1	3,7	17,2	21,1	0,53
	D430Q	81,9	3,7	14,4	28,3	0,79
	D430S	86,3	3,1	10,6	29,6	0,80
	D430T	86,9	2,9	10,1	22,4	0,80



**Abbildung 20:** Räumliche Anordnung der ersten sechs mutierten Aminosäurepositionen aus Phase I. (A) Mutanten mit einer Veränderung des Verhältnisses von Isomaltulose:Trehalulose zu Gunsten von Isomaltulose sind in Grautönen oder schwarz (Treffer) dargestellt, wohingegen Mutanten mit einer erhöhten Trehalulose-Produktion als weiße Sphären (Fehlschüsse) dargestellt wurden. (B) Positionierung des „Isomerisierungsmotivs“ <sup>298</sup>RLDRD<sup>302</sup> gegenüber dem Substrat Saccharose. Der räumliche Abstand der beiden Argininreste zu O-6 des Fructoserestes von Saccharose ist jeweils als gelbe gestrichelte Linien dargestellt.

Gemäß Literaturangaben ist der Loop <sup>298</sup>RLDRD<sup>302</sup> in der Nähe des aktiven Zentrums von entscheidender Bedeutung für die Saccharose-Isomerisierung und wird daher als „Isomerisierungsmotiv“ bezeichnet (Thompson *et al.*, 2001). Die in diesem Motiv beinhalteten Argininreste Arg298 und Arg301 sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit O-6 der Fructose an der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes maßgeblich beteiligt (Lee *et al.*, 2008) (Abb. 20). In dem in dieser Arbeit generierten Modell beträgt der Abstand der Aminogruppen zu O-6 der Fructose 4,9 und 7,5 Å (Abb. 20). In der Vergangenheit diente PadU als Vorlage für die Entwicklung für Mutanten verschiedener Saccharose-Isomerasen mit dem Ziel der Verminderung der Trehalulose-Produktion. Eine Hypothese ging davon aus, dass die geringe Produktion von Trehalulose durch PadU im benachbarten Pro303 begründet ist. Durch eine konformationelle Änderung der Position beider Argininreste gegenüber dem Fructoserest - bedingt durch die starre Natur des besagten Prolins - wird der katalytische Mechanismus zu Lasten von Trehalulose verändert (Ravaud *et al.*, 2009, Görl *et al.*, 2012).

Demgemäß wurden hier die beiden SmuA-Mutanten S303P und D302Y/S303P produziert und analysiert (Abb. 20). Während die Doppelmutante keinen Effekt auf die enzymatischen Parameter zeigte, erhöhte S303P die Trehalulose-Produktion von 3,5 auf 8,2 % (Tabelle 10). Dementsprechend muss dieser Region zwar eine Rolle für die Isomerisierung von Saccharose zugesprochen werden, aber die postulierte Sonderstellung als „Isomerisierungsmotiv“ konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dennoch gilt es zu betonen, dass es der von den beiden Argininresten stabilisierte O-6 der Fructose ist, der das Enzym-Glucose-Intermediat nucleophil angreift, was zur Bildung der 1,6-glycosidischen Bindung führt.

Angesichts dieser wichtigen Funktion wurde in dieser Mutagenesestudie auf eine weitere Mutation des Motivs <sup>298</sup>RLDRD<sup>302</sup> verzichtet.

### 3.4.3 Phase II: Die ersten Treffer

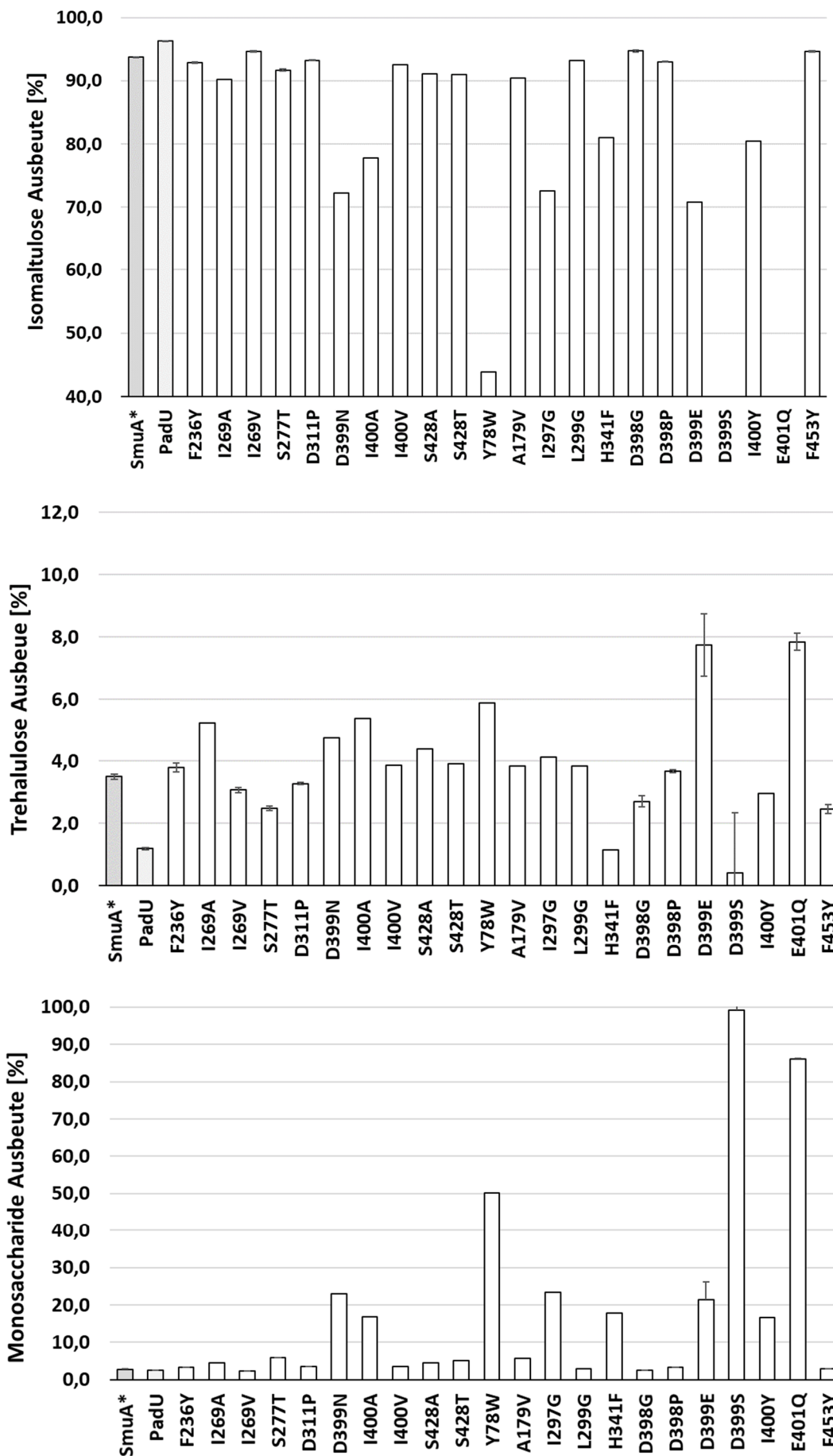
Aus den Ergebnissen aus Phase I ergab sich die Erkenntnis, dass Veränderungen der Aminosäurereste innerhalb eines Radius von 4 Å um den Liganden Saccharose einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, Mutanten mit drastisch verringerter enzymatischer Aktivität und erhöhter Trehalulose-Produktion zu generieren. Aufgrund dessen wurde für die Phase II, bestehend aus den Zyklen 4 und 5. Auf Mutationen in der ersten Schale größtenteils verzichtet und die Präferenz auf die zweite und dritte Schale gelegt. Während in der gesamten Phase I keine vielversprechende Mutante zu finden war, wurden in Phase II aus 22 Mutanten insgesamt fünf Treffer verbucht: I269V, S277T, D311P, D398G und F453Y. Die zuletzt genannte Variante stellte mit einer 2,5 %-igen Trehalulose-Produktion, einem gesteigerten Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von 38,5:1 ohne Verlust der enzymatischen Aktivität die beste Mutante aus dieser Phase dar (Tabelle 11). Dies konnte durch eine geringe biochemische Abwandlung des in der dritten Schale befindlichen Phe453 zu Tyrosin erreicht werden (Abb. 22). Ebenfalls nur leicht verändert wurde Ile269. Durch Austausch gegen Valin und die damit verbundene

Verkürzung der aliphatischen Seitenkette um eine Methylgruppe wurde lediglich 3,1 % Trehalulose produziert. Die parallel dazu analysierte Mutation I269A erhöhte die Produktion dagegen auf 5,3 %. Im Falle vom S277T wurde ebenfalls eine moderate Abwandlung der Seitenkette vorgenommen. Das polare Threonin weist im Vergleich zu Serin eine zusätzlich Methylgruppe am  $\beta$ -C-Atom auf. Dadurch wurde die Trehalulose-Produktion auf 2,5 % gesenkt und das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose auf 36,8 erhöht, jedoch auf Kosten eines leichten Aktivitätsverlusts um 10 % (Tabelle 11). Zusätzlich wurde ein signifikanter Anstieg der Hydrolyse-Aktivität von SmuA festgestellt (5,8 % Monosaccharide).

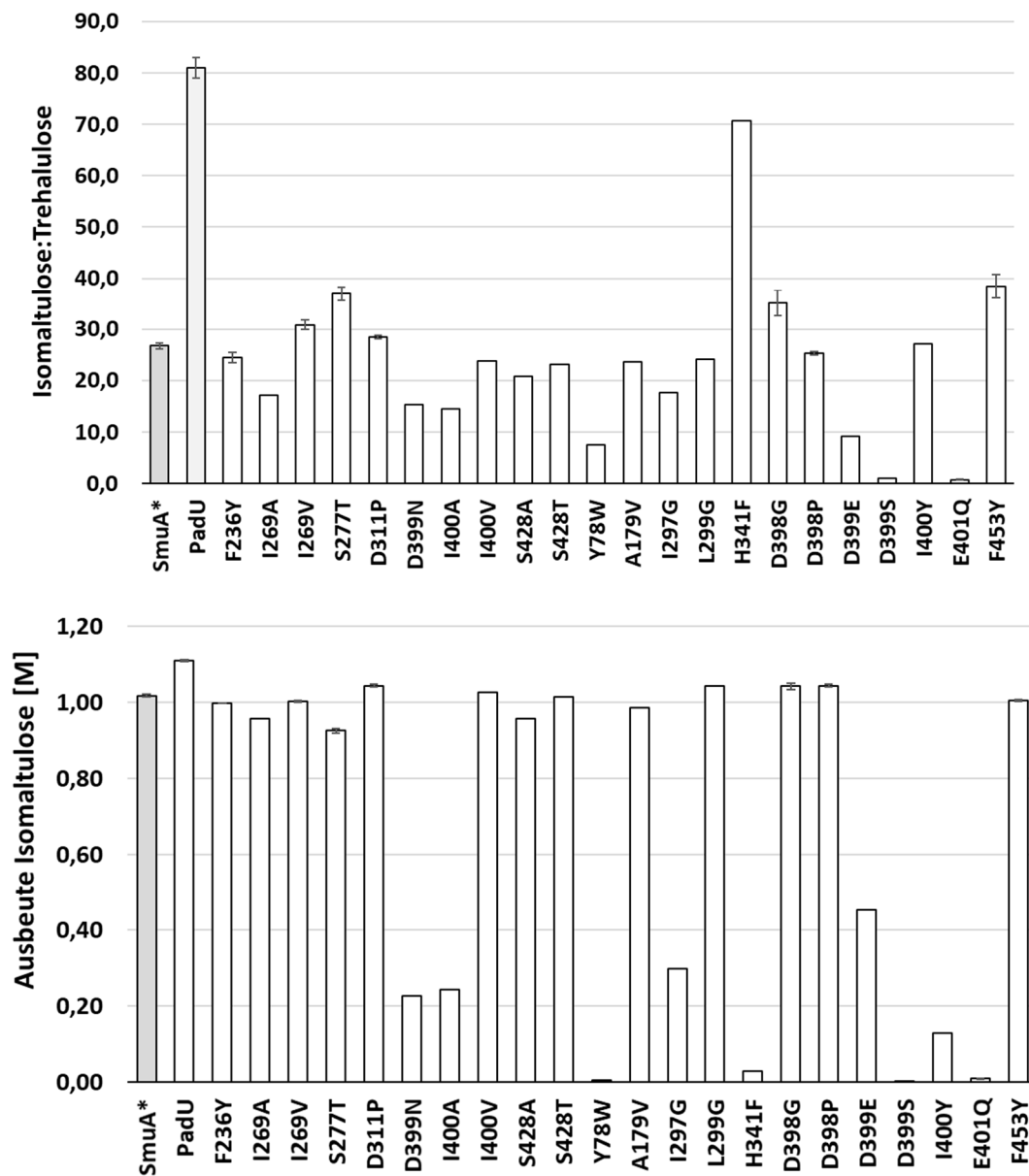
Ausgehend von den fehlgeschlagenen Austausch von Thr427 in Phase I wurde das benachbarte und weiter von der Bindetasche entfernte Ser428 durch Alanin und Threonin substituiert. Auch in diesen beiden Fällen wurde vermehrt Trehalulose produziert (Abb. 21).

Mit besonderem Interesse wurde in dieser Phase die Region <sup>398</sup>DDIE<sup>401</sup> untersucht. Das in der ersten Schale befindliche, aber nicht in das aktive Zentrum zeigende Ile400 (Abb. 22 C) wurde mit drei unterschiedlichen aliphatischen Substitutionen analysiert. Während ein Austausch gegen das ebenfalls verzweigte Valin nahezu keine Veränderung hervorrief, verringerten die Mutationen zu Alanin und Tyrosin die Ausbeute an Isomaltulose auf 0,24 bzw. 0,13 M (Tabelle 11). Das benachbarte Asp399 wurde durch die polaren Aminosäuren Asparagin und Serin sowie das saure Glutamat ersetzt. Die Verkürzung der Seitenkette zu Serin verursachte einen Totalverlust der enzymatischen Aktivität. Bei D399N und D399E wurden verringerte Aktivitäten beobachtet, entweder mit unveränderter Produktspezifität oder Anstieg der Trehalulose-Produktion auf 4,8 %. Das in der zweiten Schale zu findende Asp398 wurde mit dem Ziel mutiert, die Konformation der dortigen Aminosäurekette zu verändern, insbesondere die sich von Ile400 bis Val410 erstreckende  $\alpha$ -Helix (Abb. 22). Dazu wurde ein Austausch gegen das starre Prolin bzw. flexible Glycin gewählt. Die Substitution D398P zeigte keinen Effekt, wohingegen das neu eingefügte Glycin eine Reduktion der Trehalulose-Produktion auf 2,7 % bewirkte - bei vollständigem Erhalt der enzymatischen Aktivität (Abb. 21).

Erwartungsgemäß resultierten die letzten Versuche von Mutationen im aktiven Zentrum in Form von Y78W, H341F und E401Q in einem Kompletterlust der enzymatischen Aktivität (Tabelle 11), was erneut die Sensibilität des Enzyms für Substitutionen in diesem Bereich bestätigte.





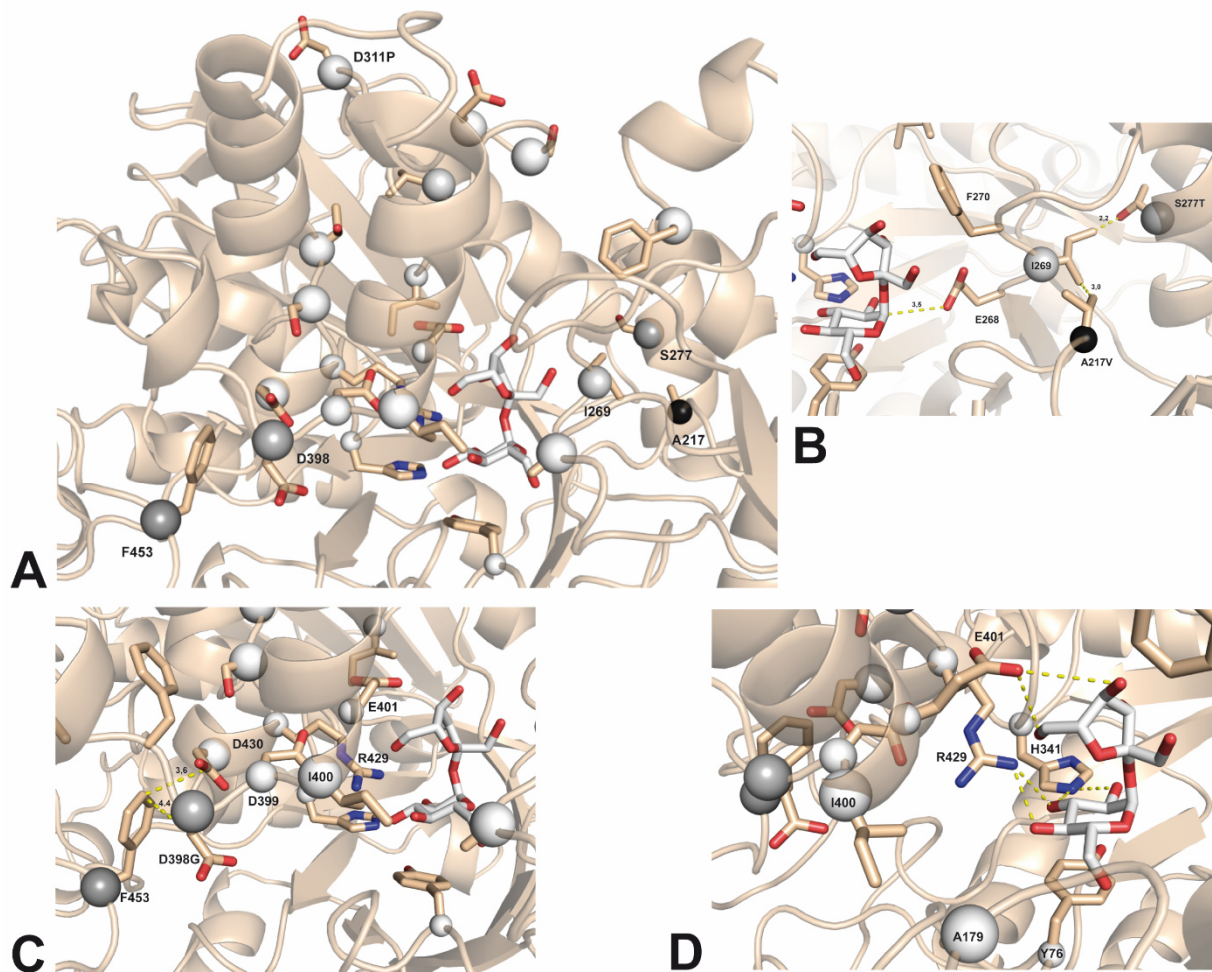


**Abbildung 21:** Analyse der 22 SmuA-Punktmutanten aus Phase II untergliedert in die Zyklen 4 und 5. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet.

**Tabelle 11:** Zusammenstellung der 22 SmuA-Punktmutanten aus Phase II untergliedert in die Zyklen 4 und 5. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M.

	Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis	Ausbeute [M]
		Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	Isomaltulose:Trehalulose	Isomaltulose
	SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
	PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
Zyklus 4	F236Y	92,9	3,8	3,3	24,5	1,00
	I269A	90,2	5,3	4,5	17,2	0,96
	<b>I269V</b>	<b>94,6</b>	<b>3,1</b>	<b>2,3</b>	<b>30,8</b>	<b>1,00</b>
	<b>S277T</b>	<b>91,7</b>	<b>2,5</b>	<b>5,8</b>	<b>36,9</b>	<b>0,93</b>
	<b>D311P</b>	<b>93,2</b>	<b>3,3</b>	<b>3,5</b>	<b>28,4</b>	<b>1,04</b>
	D399N	93,0	3,7	3,3	15,2	0,23
	I400A	77,8	5,4	16,8	14,5	0,24
	I400V	92,5	3,9	3,6	23,9	1,03
	S428A	91,1	4,4	4,5	20,7	0,96
	S428T	90,9	3,9	5,1	23,2	1,01
Zyklus 5	Y78W	43,9	5,9	50,2	7,5	0,01
	A179V	90,4	3,8	5,8	23,6	0,98
	I297G	72,6	4,1	23,3	17,6	0,30
	L299G	93,1	3,9	3,0	24,2	1,04
	H341F	81,0	1,1	17,9	70,7	0,03
	<b>D398G</b>	<b>94,7</b>	<b>2,7</b>	<b>2,6</b>	<b>35,1</b>	<b>1,04</b>
	D398P	93,0	3,7	3,3	25,3	1,04
	D399E	72,2	4,8	23,0	9,1	0,45
	D399S	0,42	0,42	99,2	1,0	0,01
	I400Y	80,4	3,0	16,6	27,1	0,13
	E401Q	6,1	7,8	86,1	0,78	0,01
<b>F453Y</b>	<b>94,6</b>	<b>2,5</b>	<b>2,9</b>	<b>38,5</b>	<b>1,00</b>	

Durch die bildliche Darstellung der bisher mutierten Aminosäurepositionen als Sphären mit gleichzeitiger Visualisierung der ermittelten Enzym-Parameter anhand von Größe und Grauton, zeichnete sich bereits nach fünf Mutationszyklen ein charakteristisches Gesamtbild ab (Abb. 22). Mutationen innerhalb der ersten Schale um das aktive Zentrum waren in keinem Fall erfolgreich. Im Gegenteil, Austausche wie Y76W, R429K oder H341F wiesen die geringste enzymatische Aktivität zusammen mit einer drastisch erhöhten Produktion von Trehalulose auf. Treffer mit günstigen Eigenschaften wie F453Y, D398G und S277T, waren hingegen in der zweiten beziehungsweise dritten Schale zu finden. Am Beispiel von S277T wird ersichtlich, dass es nur leichte Veränderungen der Seitenketten in der dritten Schale bedarf, um das Produktspektrum von SmuA zu beeinflussen. Die geringfügige Vergrößerung der Seitenkette an Position 277 um eine Methylgruppe führte vermutlich zu einer Kollision mit dem nahegelegenen Ile269 (Abb. 22 B). Es ist anzunehmen, dass dieser Loop zusammen mit dem benachbarten Phe270 und dem katalytisch aktiven Rest Glu268 eine konformationelle Änderung durchlief. Wahrscheinlich war es die damit verbundene Einwirkung auf die Lage des Fructoserestes während der Isomerisierung, die die Bildung von Trehalulose beeinträchtigte (Abb. 22 B).



**Abbildung 22:** Räumliche Anordnung der 15 mutierten Aminosäurepositionen in Phase II inklusive derjenigen aus Phase I. (A) *Heatmap* (B) Positionierung der Aminosäuren I269, A217 und S277. Mit Hilfe des PyMOL Tools Mutagenesis Wizard wurden die Seitenkettenaustausche A217V und S277T modelliert und ihre wahrscheinlichsten Konformere dargestellt. Der Abstand zwischen der Carboxylat von E268 und dem anomeren C-Atom der Saccharose ist als gestrichelte Linie dargestellt. (C) Darstellung der Position F453 und des Motivs <sup>398</sup>GDIE<sup>401</sup>. (D) Ansicht des aktiven Zentrums mit Blick auf die zahlreichen Fehlschüsse (weiße Sphären) in direkter Reichweite zum Substrat Saccharose.

Ein ähnlicher Dominoeffekt ist auch im Falle der Mutanten F453Y und D398G zu beobachten. Durch die Vergrößerung der Seitenkette um eine Hydroxylgruppe war mit einem sterischen Zusammenstoß mit Asp430 oder Asp398 zu rechnen. Dies hatte vermutlich einen Einfluss auf die benachbarten Reste Arg429 und Glu401 mit der Folge einer veränderten Positionierung des Glucoserestes in der Bindetasche (Abb. 22 C). Der Helix-Brecher Glycin nimmt unter den proteinogenen Aminosäuren eine Sonderstellung ein. Durch die fehlende Seitenkette handelt es sich hierbei um eine sehr flexible Aminosäure, die fast alle Dieder Winkel im Ramachandran-Plot einnehmen kann. In globulären Proteinen führt diese Eigenschaft häufig dazu, dass Helices unterbrochen werden (Yan and Sun, 1997). Durch die Substitution D398G kann davon ausgegangen werden, dass die Flexibilität der Region <sup>398</sup>GDIE<sup>401</sup> erhöht worden ist. Da Glu401 über Wasserstoffbrücken mit der Fructose in Kontakt steht, sind auch in diesem Fall konformationelle Änderungen im aktiven Zentrum in Höhe von wenigen Zehntel Ångström vermutlich entscheidend (Abb. 22 A).

### 3.4.4 Phase III: Fast jeder Schuss ein Treffer

Die aus den ersten beiden Phasen mit insgesamt fünf Zyklen gewonnenen Erkenntnisse wurden für die abschließenden Mutationszyklen zusammengetragen und für die Planung der letzten 22 Einzelmutanten genutzt. Mehrmals konnten weitere acht Treffer gezählt werden. Die Trefferquote erreichte dabei einen neuen Maximalwert von 55 % (6 von 11 Mutanten) im abschließenden Zyklus 7.

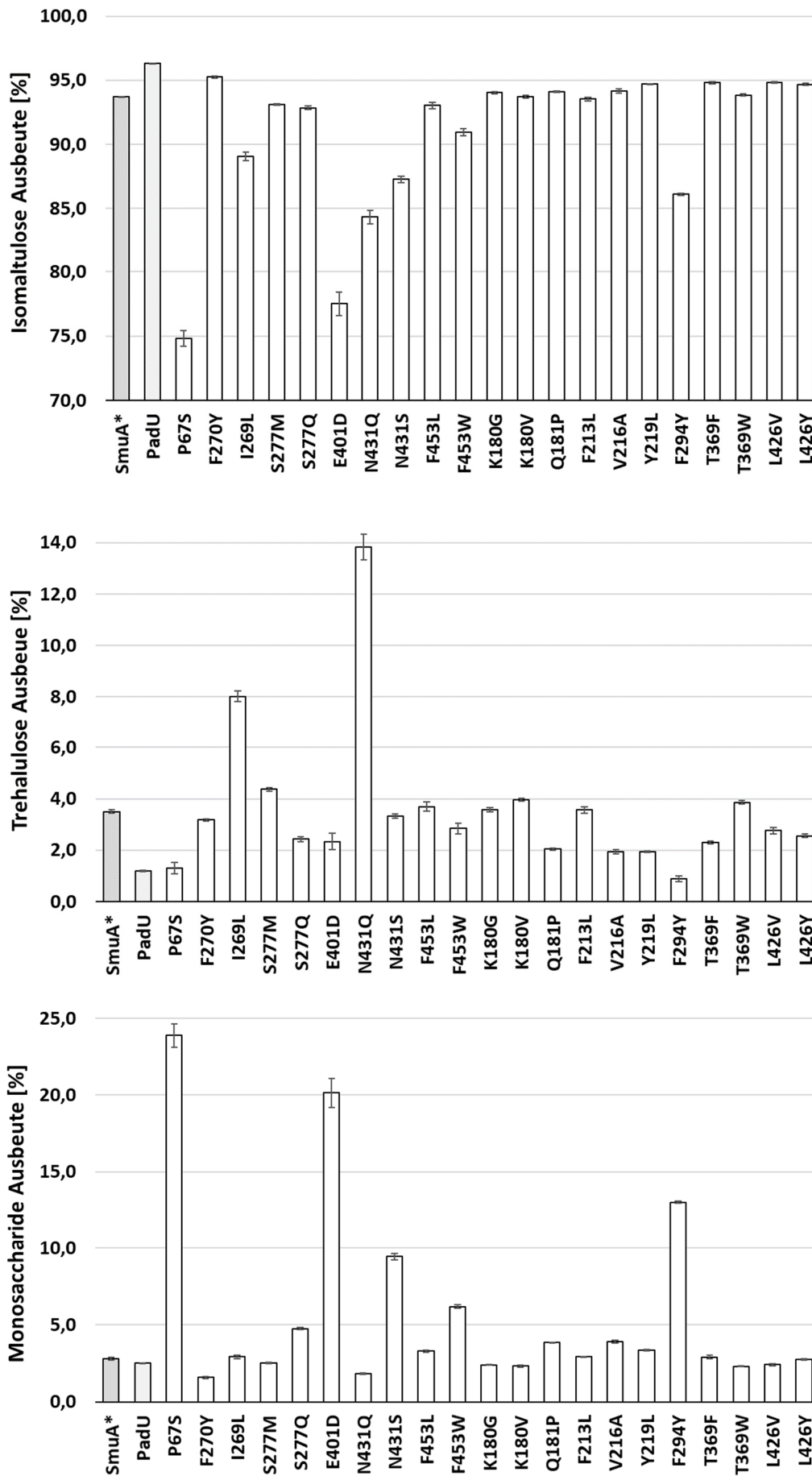
Die beste Punktmutation des gesamten semi-rationalen *Protein-Engineerings* wurde in Zyklus 7 generiert. Die Mutante Y219L produzierte 94,8 % Isomaltulose, nur 1,9 % Trehalulose und 3,4 % Monosaccharide bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität und einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 48,8:1 (Tabelle 12). Eine derartige Veränderung des Produktspektrums zu Lasten der Trehalulose-Produktion war bis dahin nicht bekannt und bestätigte den Nutzen der Mutagenese-Strategie des „*Schiffe versenkens*“. Durch nur eine Punktmutation konnte die Variante SmuA\*(Y219L) somit das niedrige Niveau von PadU hinsichtlich der prozentualen Menge an Trehalulose (1,2 %) beinahe erreichen. Auch die Verkleinerung der Seitenkette des in Nachbarschaft gelegenen Val216 durch Alanin hatte einen günstigen Effekt mit einer prozentualen Ausbeute von 94,1 %, 2,0 % Trehalulose und 3,9 % Monosacchariden (Abb. 23).

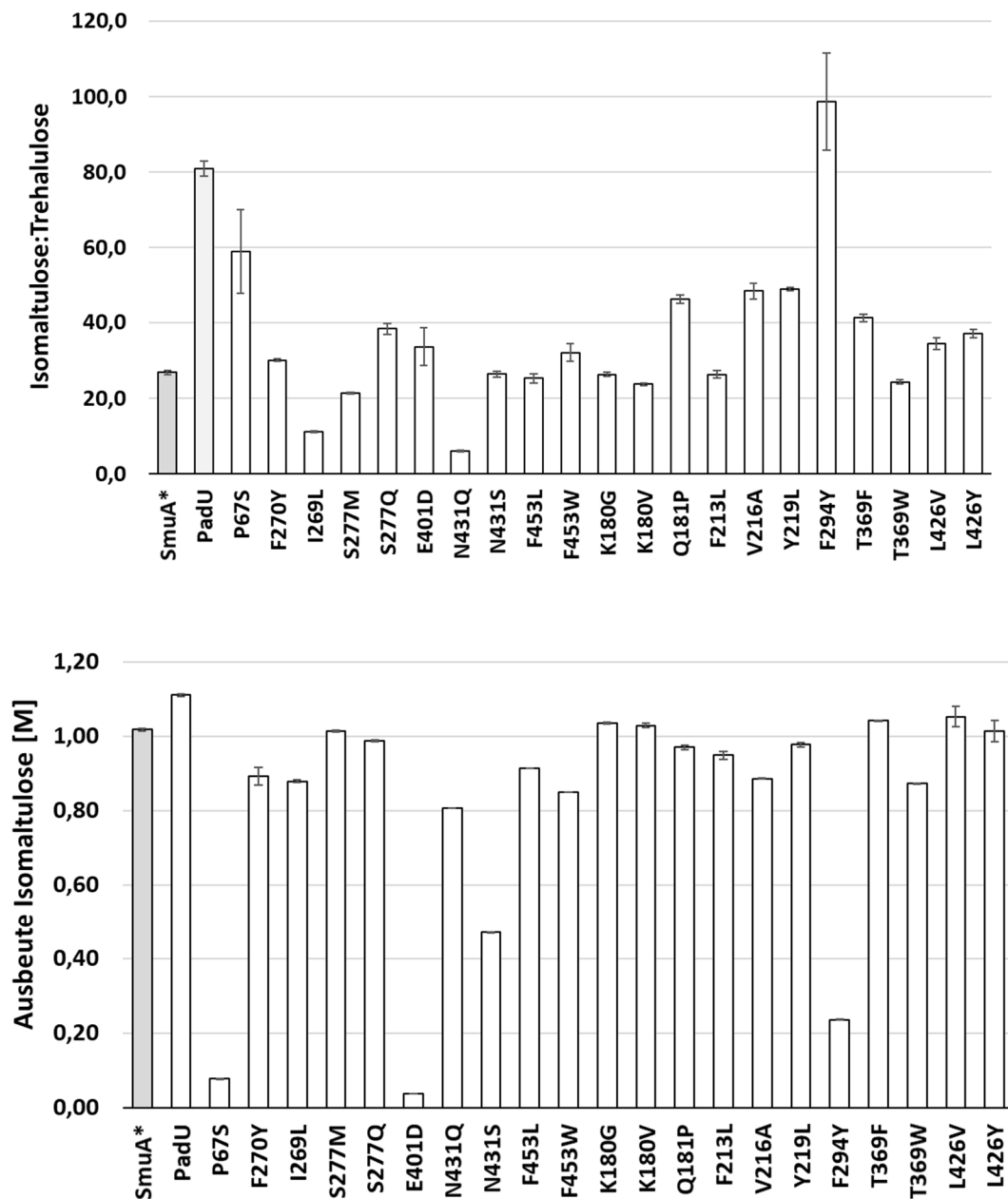
Besonderes Augenmerk wurde auf die beiden Phenylalaninreste des *Aromatic Clamp* gelegt. In der Literatur beschriebene Mutationen zu Alanin resultierten in einem nahezu vollkommenen Verlust der Isomerisierungsaktivität von SmuA (Xu *et al.*, 2013, Ravaud *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit analysierte Verlängerung der Seitenketten von Phe270 zu Tyrosin reduzierte interessanterweise die Hydrolyseaktivität auf 1,6 %. Die prozentuale Ausbeute an Isomaltulose erhöhte sich leicht auf 95,2 % und die von Trehalulose verringerte sich geringfügig auf 3,2 %. In dieser Hinsicht konnte die Rolle von Phe270 als *Gate Keeper* der Bindetasche (Abb. 24) bestätigt werden: der mit dem Enzym nicht kovalent verbundene Fructoserest wird nach dem ersten Schritt des katalytischen Mechanismus durch Phe270 daran gehindert das aktive Zentrum zu verlassen. Dieser Effekt wurde durch die Mutation F270Y verstärkt. Mit einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 98,7:1 sticht F294Y zwar hervor, jedoch korreliert der starke Abfall der Produktion an Trehalulose auf 0,9 % mit einer drastischen Reduktion an Isomaltulose im Produktspektrum (86,1 %) und einem massiven Anstieg der Produktion von Glucose und Fructose auf 13,0 % (Tabelle 12). Zusätzlich wies diese Mutante eine vierfach niedrigere Ausbeute an Isomaltulose auf.

Zwecks Verzicht auf eine Mutation des in der ersten Schale gelegenen Rests Phe178 wurden Mutationen in direkter Nachbarschaft analysiert: K180G, K180V und Q181P (Abb. 24 A). Während Substitutionen von Lys180 nicht den gewünschten Effekt erzielten, wurde mit Q181P eine Mutante mit einem Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von 46,1:1 erhalten. Das direkt im aktiven Zentrum befindliche Phe178 wurde somit beibehalten, die Konformation des Loops hingegen durch das neu eingefügte Prolin verändert.

Der in Abschnitt 3.4.3 beschriebene Effekt der Mutation S277T wurde in Zyklus 6 durch Substitutionen gegen die polaren Aminosäuren Methionin und Glutamin versucht zu verstärken. Mit S277Q wurde die

Trehalulose-Produktion auf 2,4 % gesenkt, jedoch mit S277M auf 4,4 % erhöht (Tabelle 12). Zudem wurde versucht, den Effekt der Mutante F453Y durch Einbau des im Vergleich zu Tyrosin noch größeren Tryptophan zu intensivieren. Dies schlug fehl, da die generierte Mutante nur noch 91 % Isomaltulose produzierte. Erwartungsgemäß resultierte eine Verkleinerung dieser Seitenkette zu Leucin in einem Anstieg der Trehalulose-Produktion auf 4,4 % (Abb. 23). Dagegen führte die Substitution des in der dritten Schale gelegenen Thr369 durch Phenylalanin zu einem Volltreffer: 94,8 % Isomaltulose, 2,3 % Trehalulose, 2,9 % Monosaccharide bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität (Tabelle 12). Im Verlauf der bisherigen Mutationszyklen wurde die Teilregion einer  $\alpha$ -Helix bestehend auf Thr427, Ser428, Arg 429, Asp430, Asn431 mehrfach mutiert und dabei ausschließlich „Fehlschüsse“ notiert. Im letzten Anlauf wurde daher das noch weiter vom aktiven Zentrum entfernte und innerhalb dieser  $\alpha$ -Helix lokalisierte Leu426 zu Valin und Tyrosin mutiert (Abb. 24 D). Auch hier bestätigte sich die erhöhte Trefferwahrscheinlichkeit in der dritten Schale. So wurde die prozentuale Ausbeute an Trehalulose auf 2,8 % bzw. 2,6 % gesenkt, mit einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 34,4:1 bzw. 37,0:1, ohne die enzymatische Aktivität zu verringern (Abb. 23, Tabelle 12).





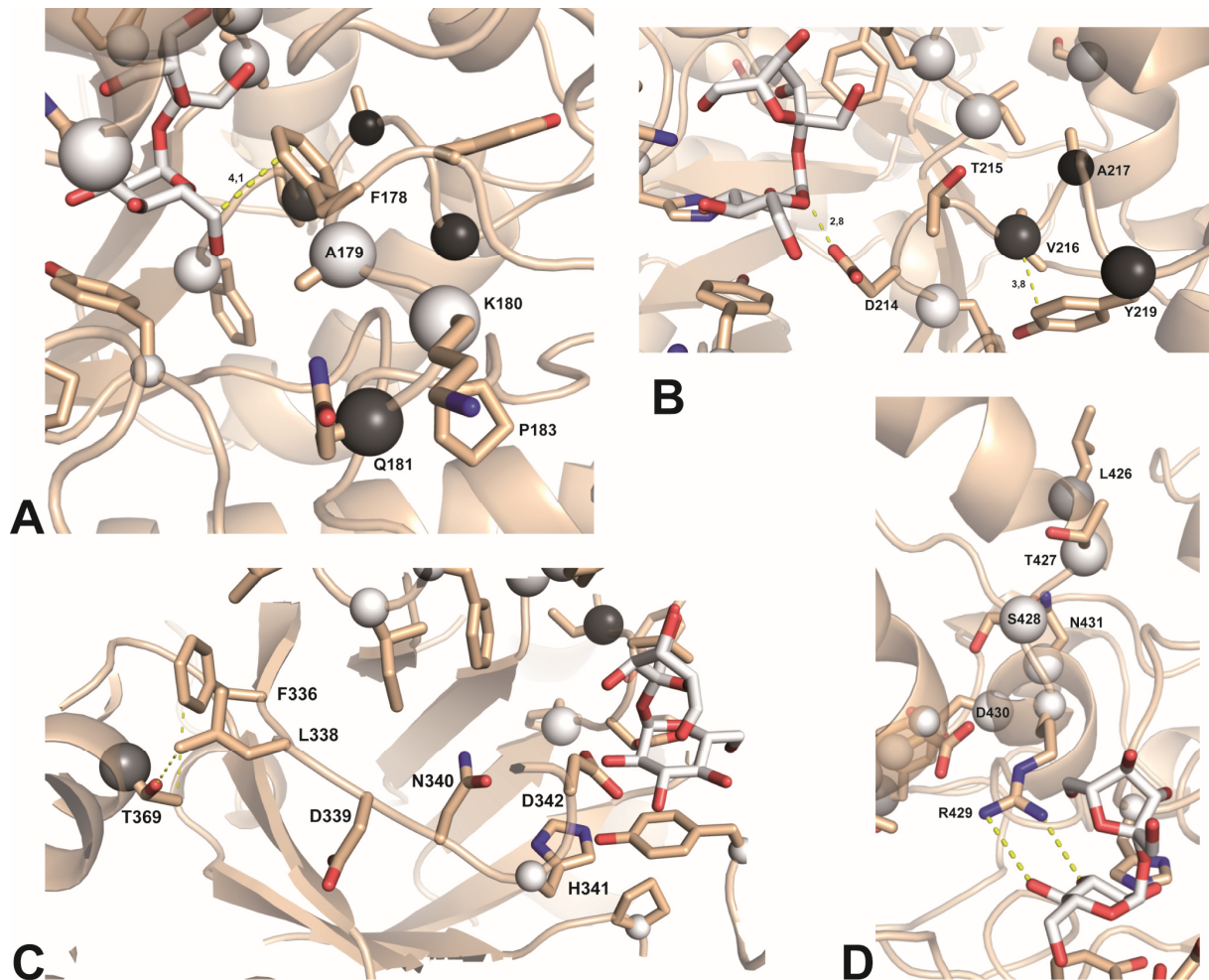
**Abbildung 23:** Analyse der 22 SmuA-Punktmutanten aus Phase III untergliedert in die Zyklen 6 und 7. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet.

**Tabelle 12:** Zusammenstellung der 22 SmuA-Punktmutanten aus Phase III untergliedert in die Zyklen 6 und 7. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M.

Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis	Ausbeute [M]	
	Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	Isomaltulose:Trehalulose	Isomaltulose	
SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02	
PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11	
Zyklus 6	P67S	74,4	1,3	23,9	58,9	0,08
	<b>F270Y</b>	<b>95,2</b>	<b>3,2</b>	<b>1,6</b>	<b>30,0</b>	<b>0,89</b>
	I269L	89,1	8,0	2,9	11,1	0,88
	S277M	93,1	4,4	2,5	21,3	1,01
	<b>S277Q</b>	<b>92,8</b>	<b>2,4</b>	<b>4,8</b>	<b>38,3</b>	<b>0,99</b>
	E401D	77,5	2,3	20,2	33,6	0,04
	N431Q	84,4	13,8	1,8	6,1	0,81
	N431S	87,3	3,3	9,4	26,3	0,47
	F453L	93,0	3,7	3,3	25,2	0,91
	F453W	91,0	2,8	6,2	32,1	0,85
Zyklus 7	K180G	94,0	3,6	2,4	26,3	1,04
	K180V	93,7	4,0	2,3	23,7	1,03
	<b>Q181P</b>	<b>94,1</b>	<b>2,0</b>	<b>3,8</b>	<b>46,1</b>	<b>0,97</b>
	F213L	93,5	3,6	2,9	26,2	0,95
	<b>V216A</b>	<b>94,1</b>	<b>2,0</b>	<b>3,9</b>	<b>48,4</b>	<b>0,89</b>
	<b>Y219L</b>	<b>94,7</b>	<b>1,9</b>	<b>3,4</b>	<b>48,8</b>	<b>0,98</b>
	F294Y	86,1	0,9	13,0	98,7	0,24
	<b>T369F</b>	<b>94,8</b>	<b>2,3</b>	<b>2,9</b>	<b>41,2</b>	<b>1,04</b>
	T369W	93,8	3,9	2,3	24,3	0,87
	<b>L426V</b>	<b>94,8</b>	<b>2,8</b>	<b>2,4</b>	<b>34,4</b>	<b>1,05</b>
<b>L426Y</b>	<b>94,7</b>	<b>2,6</b>	<b>2,7</b>	<b>37,0</b>	<b>1,01</b>	

Aufgrund der geringen Erfolgschancen von Mutationen innerhalb der ersten Schale um das aktive Zentrum wurde auf eine Vergrößerung der Seitenkette von Phe178 grundsätzlich verzichtet (Abb. 24 A). Dennoch war diese Position aufgrund des in die Bindetasche zeigenden Rests von besonderem Interesse. Um die Konformation des Phe178 beinhaltenden Loops dennoch zu verändern, wurde die angrenzende Region <sup>179</sup>AKQQP<sup>183</sup> ausgewählt. In Anbetracht des vorhandenen natürlichen Pro183 wurde geschlussfolgert, dass eine weiter erhöhte Starrheit in diesem Motiv die Bildung von Trehalulose benachteiligen könnte. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Mutanten K180G: Denn durch den Wegfall der Seitenkette des Lysinrests und die damit verbundene zusätzliche Flexibilität (Abb. 24 A) stagnierte die prozentuale Ausbeute an Trehalulose im Vergleich zur Ausgangsvariante SmuA\*. Diese Sachlage führte zur Generierung der zu Beginn des Abschnitts 3.4.4 beschriebenen Punktmutante Q181P.





**Abbildung 24:** Räumliche Anordnung ausgewählter Regionen mit SmuA-Mutanten aus der Phase III. (A) Lokalisation der Region  $^{178}\text{FAKQP}^{183}$  mit der Mutation Q181P. Dargestellt ist die Distanz von 4,1 Å zwischen Phe178 und dem C-6 des Glucoserestes. (B) Räumliche Anordnung des Motivs  $^{214}\text{DTVATY}^{219}$  mit den besten Einzelmutanten Y219L und V216A. Dargestellt ist die Distanz von 3,8 Å zwischen Tyr219 und dem C- $\alpha$  von Val216. (C) Fokus auf die Position Thr369 und den durch die Mutation zu Phenylalanin beeinflussten Loop  $^{336}\text{FFLDNHD}^{342}$ . (D) Lage der vielfach mutierten  $\alpha$ -Helix der Reste 426 bis 431 mit Augenmerk auf das oberflächenexponierte Leu426 und das im aktiven Zentrum befindliche Arg429.

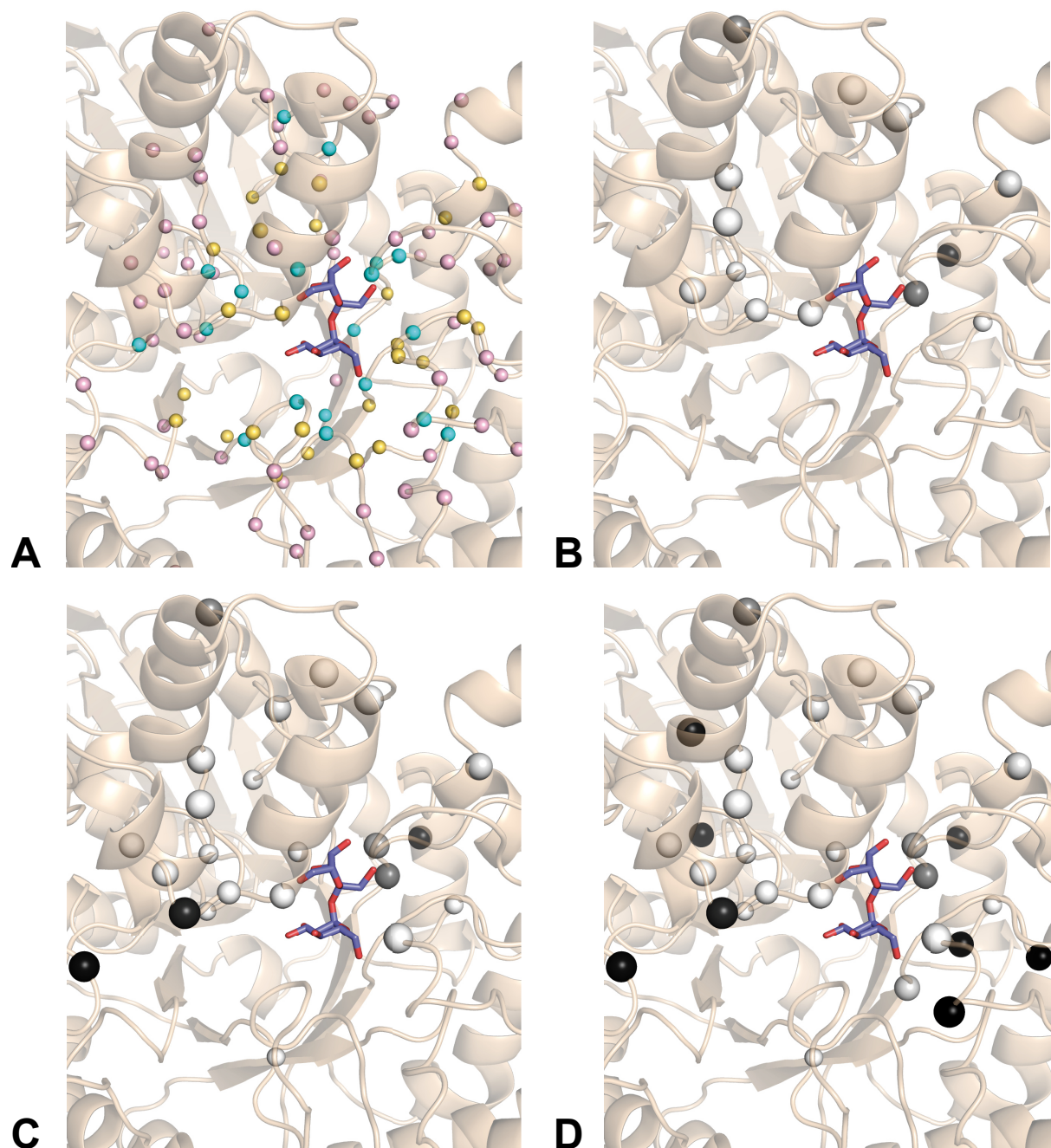
Mit drei günstigen Mutationen stellte das Motiv  $^{214}\text{DTVATY}^{219}$  die Region mit der höchsten Trefferdichte dar. So sind sowohl die beste Einzelmutante Y219L dort zu finden als auch die Zweitbeste V216A (Abb. 24 B). Beide Substitutionen zeichnen sich durch eine Verkleinerung der Aminosäureseitenkette aus. Der Austausch von Tyrosin zu Leucin schaffte vermutlich einen Raumgewinn für das 3,8 Å entfernte Val216. Dies hatte wahrscheinlich eine erhöhte Flexibilität des Loops zur Folge und beeinflusste die Lage des katalytisch aktiven Asp214, welches bei der Katalyse als Protonendonator und -akzeptor wirkt. Dies wirkte sich im Produktspektrum zu Lasten der Produktion von Trehalulose aus. Die Eliminierung beider Methylgruppen der aliphatischen Seitenkette bei der Variante V216A hatte vermutlich einen ähnlichen Effekt.

Der zuvor beschriebene Dominoeffekt wurde anhand der Mutante T369F besonders deutlich. Durch den Austausch zu Phenylalanin wurde die Seitenkette des in der dritten Schale gelegenen Thr369 deutlich vergrößert. Da ursprünglich nur ein Abstand von 3,5 bzw. 4,3 Å zu den benachbarten Phe336 und

Leu338 gegeben war, müsste diese Mutation zu einer sterischen Kollision geführt haben. Dies verschob vermutlich den Loop bestehend aus Asp339, Asn340, His341 und dem katalytisch aktiven Asp342 (Abb. 24 C). Somit wurde auch in diesem Fall die Lage einer der katalytisch aktiven Aminosäurereste nicht durch eine Mutation im direkten Umfeld verändert, sondern durch eine weiter entfernte Substitution.

Ein weiteres Beispiel für den Erfolg dieser Mutagenesestrategie und die Sensitivität von SmuA gegenüber Punktmutationen ist die Entwicklung der Mutante L246Y. Analog zu den Sprossen einer Leiter wurden die in einer  $\alpha$ -Helix positionierten Reste Asn431, Asp430, Arg429, Ser428 und Thr427 mutiert, mit dem Resultat einer erhöhten Trehalulose-Produktion, jedoch verbunden mit einem Abfall der enzymatischen Aktivität. Erst die auf einer „höheren Sprosse“ gelegene Mutante L426Y erzielte den gewünschten Effekt. Dabei wäre das oberflächenexponierte Leucin nicht die erste Wahl für Mutationen gewesen, um das aktive Zentrum umzugestalten. Auch hierbei resultierte ein Austausch zu Tyrosin oder Valin offenbar in einer leicht veränderten Lage der  $\alpha$ -Helix. Dies hatte letztendlich Auswirkungen auf Arg429 im aktiven Zentrum, dessen Seitenkette über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Glucoserest in Kontakt steht (Abb. 24 D).

Wie Abbildung 24 verdeutlicht, beruht der Erfolg der in dieser Arbeit etablierten Methode des semi-rationalen *Protein-Engineering* nicht auf der wahllosen Generierung von Mutanten, sondern darauf, mit Hilfe gegebener Informationen Hypothesen über das Enzym selbst und in einzelnen Regionen aufzustellen und diese zu überprüfen. Fehlschüsse wurden dabei nicht als Rückschläge gewertet, sondern leisteten einen ebenso wichtigen Erfahrungsgewinn wie Treffer. Basierend auf dieser Strategie war es möglich, neue Erkenntnisse über SmuA und die für den Ablauf des katalytischen Mechanismus verantwortlichen strukturellen Regionen zu gewinnen. Bis dato ist in der Literatur keine SmuA-Mutante beschrieben, die eine signifikant verringerte Trehalulose-Produktion aufweist. In der vorliegenden Studie konnten nicht nur eben solche Mutanten identifiziert werden, sondern es wurde sogar eine generische Strategie etabliert, die eine Alternative zu bisher bekannten Mutagenese Methoden darstellt (Abb. 25).



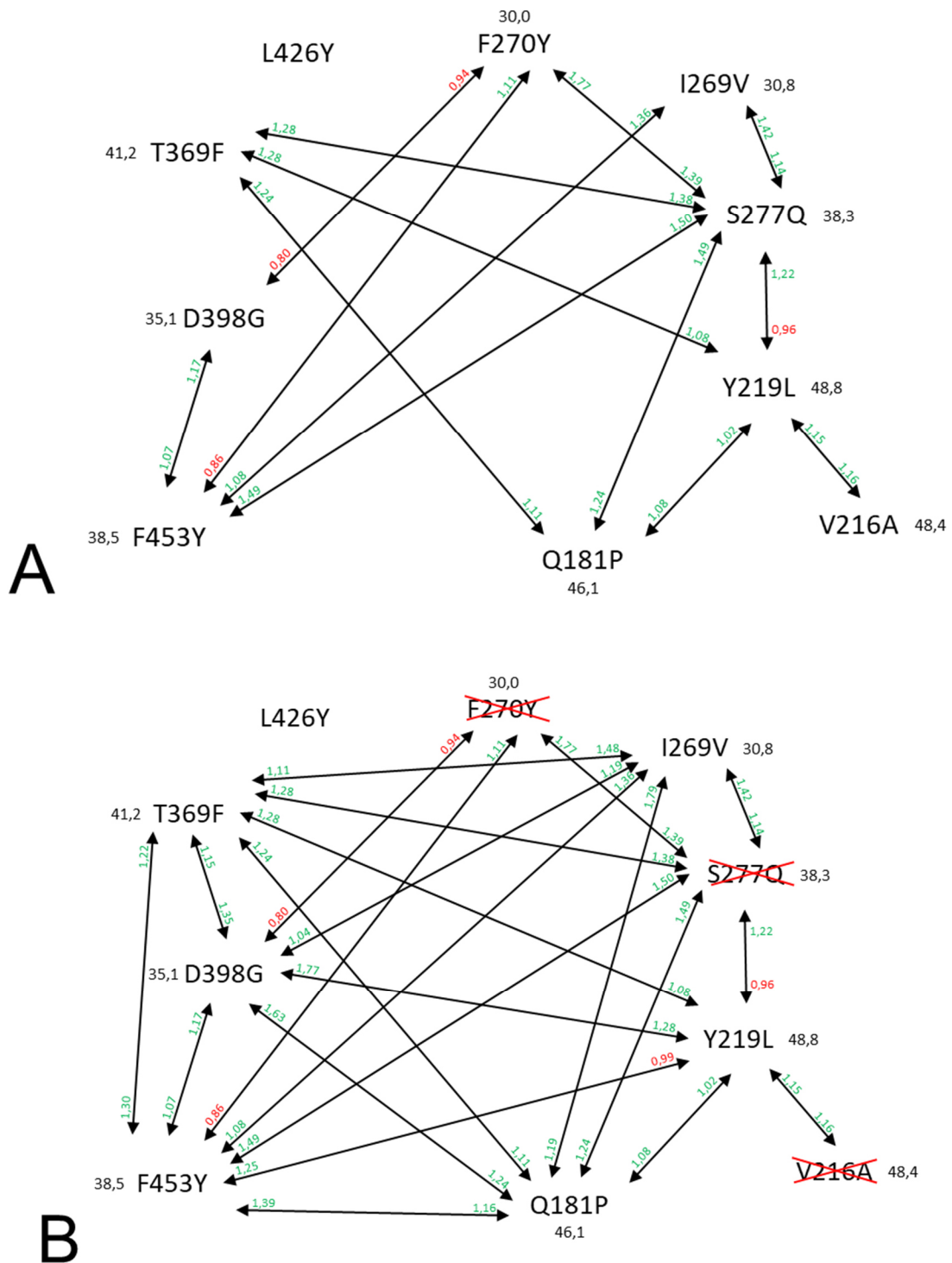
**Abbildung 25:** Zusammenfassende Darstellung des Fortschritts der Mutagenese von SmuA im Verlauf der Phasen I bis III. (A) Überblick über die drei Schalen im Umkreis des Substrats Saccharose. Alle Aminosäurereste in einer Entfernung von Saccharose von bis zu 4 Å wurden als erste Schale definiert zusätzlich zu den Argininresten Arg298 und Arg301 (cyan); diejenigen im Abstand von 4 bis 8 Å wurden der zweiten Schale zugeordnet (gelb) und alle weiteren von 8 bis 12 Å der dritten Schale (rosa). (B) Phase I bestehend aus den Zyklen 1 bis 3. (C) Phase II bestehend aus den Zyklen 4 und 5. (D) Phase III bestehend aus den Zyklen 6 und 7.

### 3.4.5 Kombination von SmuA-Punktmutanten

Mit der für neu etablierten Strategie konnten zahlreiche Punktmutanten der SmuA identifiziert werden, die dem gewünschten Anforderungsprofil entsprachen: eine verringerte prozentuale Ausbeute an Trehalulose bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität. Jedoch lag die maximale Reduzierung der Trehalulose-Produktion, die durch eine einzige Mutation bewirkt werden konnte, bei 1,9 %. Aus diesem Grund bestand der nächste Schritt darin, ausgewählte SmuA-Varianten zu kombinieren. Dadurch sollte nicht nur eine noch bessere Variante generiert, sondern auch die grundlegende Frage beantwortet werden, ob die entsprechenden Effekte der verschiedenen Punktmutationen additiv sind.

Die Anzahl aller möglicher Kombinationen an zu testenden Doppelmutanten war jedoch praktisch nicht umzusetzen. Daher wurden nur die zehn erfolgversprechendsten Kandidaten ausgewählt: Q181P, V216A, Y219L, I269V, F270Y, S277Q, T369F, D398G, F453Y und L426Y.

Die Kombination zur Generierung der Doppelmutanten wurde in zwei Phasen gegliedert. Überraschenderweise wurden bereits zu Beginn überwiegend additive Effekte beobachtet, da fast alle Doppelmutanten verringerte prozentuale Ausbeuten an Trehalulose im Vergleich zu den einzelnen Ausgangsvarianten zeigten. Nach Analyse der ersten 14 Doppelmutanten, wurden die Mutanten V216A, F270Y und S277Q für weitere Ansätze eliminiert (Abb. 26). So führte beispielsweise der Einsatz von S277Q zu deutlichen Erhöhungen des Verhältnisses von Isomaltulose:Trehalulose, jedoch auch zu nicht hinnehmbaren Aktivitätsverlusten. Die Mutante F270Y hingegen leistete den geringsten Zugewinn und galt daher als nicht additiv, auch wenn ihre Eigenschaft verringerter Hydrolyseaktivität in der Doppelmutante SmuA(F270Y/D398G) erhalten blieb. Die Doppelmutante der beiden besten Mutanten V216A und Y219L lieferte entgegen den Erwartungen die geringste enzymatische Aktivität. Aus diesem Grund wurde V216A angesichts seiner direkten Nähe zu der besten Variante Y219L nicht mehr berücksichtigt. In Phase II wurden anschließend zehn weitere Doppelmutanten aus den verbliebenen Punktmutanten analysiert. Auch hierbei wurden fast ausschließlich additive Effekte beobachtet (Abb. 26 B).



**Abbildung 26:** Übersicht über die Kombination der Einzelmutanten. Untergliedert wurde dies in Phase I (A) und Phase II (B). Ausgewählt wurden die zehn erfolversprechendsten Punktmutationen aus der gesamten Mutagenesestudie. Bewertet wurde das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose, welches in schwarz neben jeder Mutante abgebildet ist. Zudem wurde der Quotient aus dem Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose der entsprechenden Doppelmutante und dem Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose der jeweiligen Einzelmutanten berechnet. Dieser gibt an, wie sich das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose für die jeweilige Einzelmutante durch Kombination mit einer anderen Einzelmutante verändert hat. Werte über 1,0 zeigen, dass sich das Verhältnis durch die jeweilige Kombination erhöht hat. Werte unter 1,0 zeigen, dass es sich verringert hat.

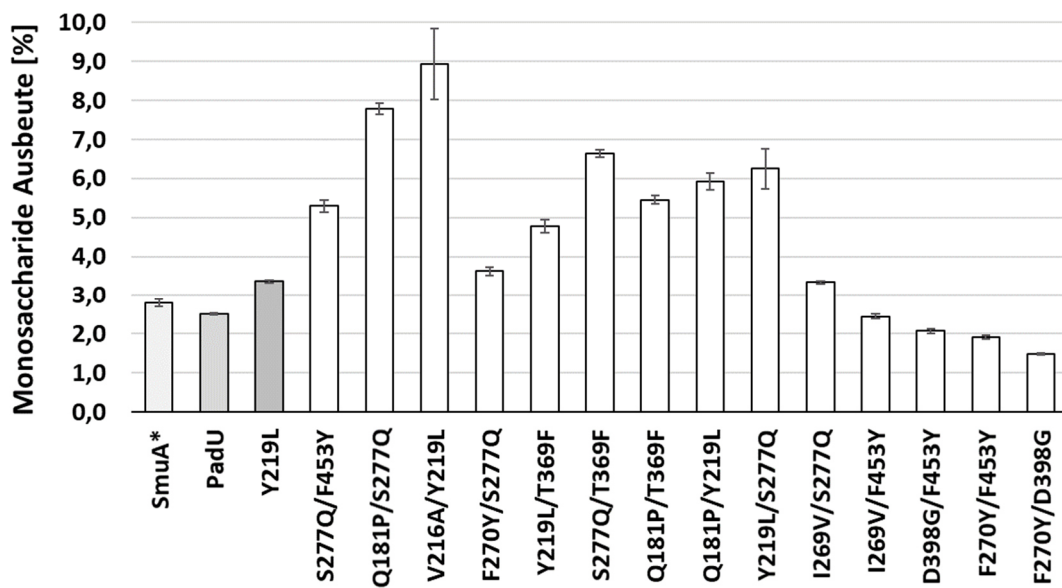
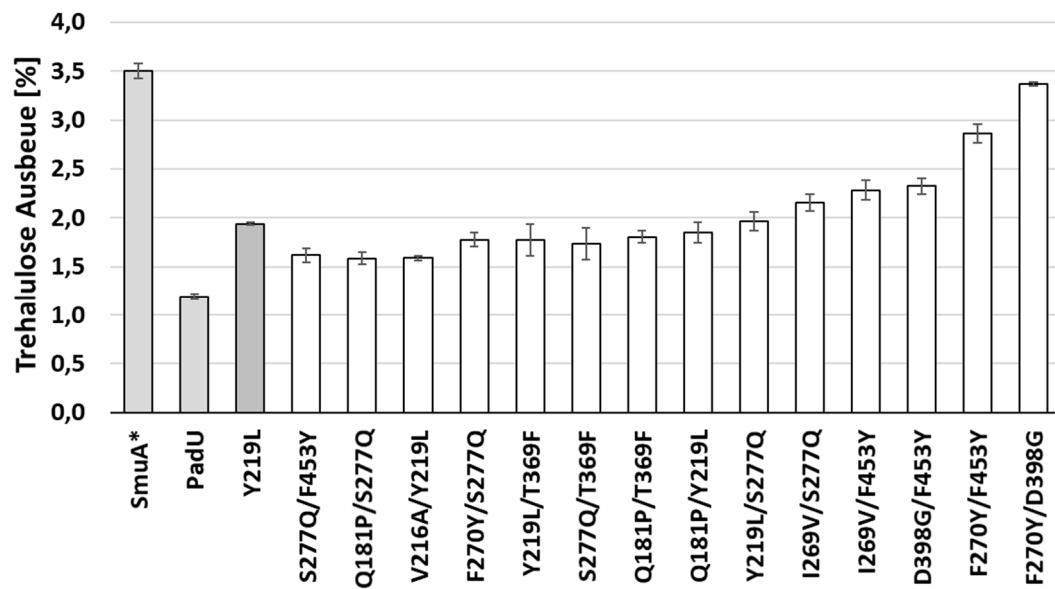
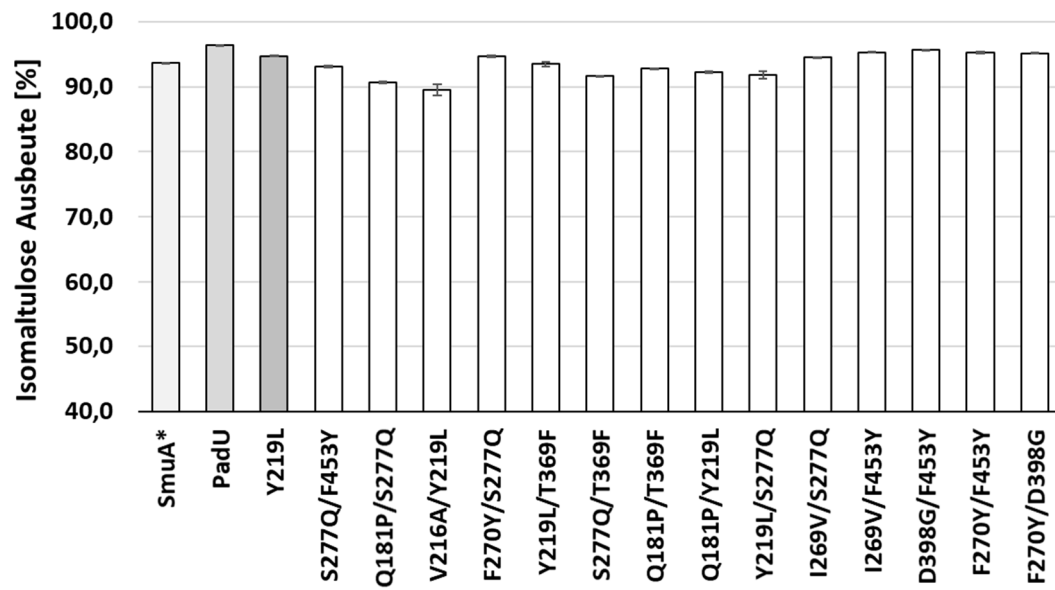
### 3.4.5.1 Phase I der Generierung der SmuA-Doppelmutanten

Als Maßstab für die Bewertung der SmuA-Doppelmutanten galt die Mutante Y219L, welche 94,7 % Isomaltulose, 1,9 % Trehalulose und 3,4 % Monosaccharide produzierte, bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität und einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 48,8:1. Entgegen den Erwartungen führte fast jede untersuchte Doppelmutante zu einer verringerten Trehalulose-Produktion im Vergleich zu den jeweiligen Punktmutanten, jedoch oftmals in Verbindung mit einer drastischen Reduktion der enzymatischen Aktivität. So erzielte die Variante S277Q/F453Y das höchste Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von 57,7:1, jedoch auch eine um 38 % niedrigere Aktivität bezüglich der Isomaltulose-Ausbeute in Höhe von 0,64 M. In diesem Fall wurden 93,1 % Isomaltulose, 1,6 % Trehalulose und 5,3 % Glucose und Fructose detektiert (Tabelle 13). Ähnliche Parameter wurden auch für Q181P/S277Q ermittelt: 57,2:1 und 0,55 M. S277Q wurde in Phase I in vier weiteren Doppelmutanten eingeführt und stellte damit die häufigste untersuchte Substitution dar. In Verbindung mit F270Y wurden 94,6 % Isomaltulose, 1,8 % Trehalulose und 3,6 % Monosaccharide detektiert, allerdings bei lediglich 0,46 M Isomaltulose. Auch in Verbindung mit T369F resultierte diese Substitution in einem signifikanten Anstieg der Hydrolyseaktivität auf 6,6 % Glucose und Fructose bei erneutem Abfall der Aktivität auf 0,50 M Isomaltulose. Bei den Doppelmutanten Y219L/S277Q und I269V/S277Q war nur ein geringer Aktivitätsverlust zu verzeichnen aber auch eine im Vergleich zu den Ausgangsvarianten leicht erhöhte Produktion von Trehalulose festzustellen (Abb. 27). Aufgrund des in vier von sechs Fällen beobachteten deutlichen Aktivitätsverlusts wurde auf die Substitution S277Q in den weiteren Analysen verzichtet.

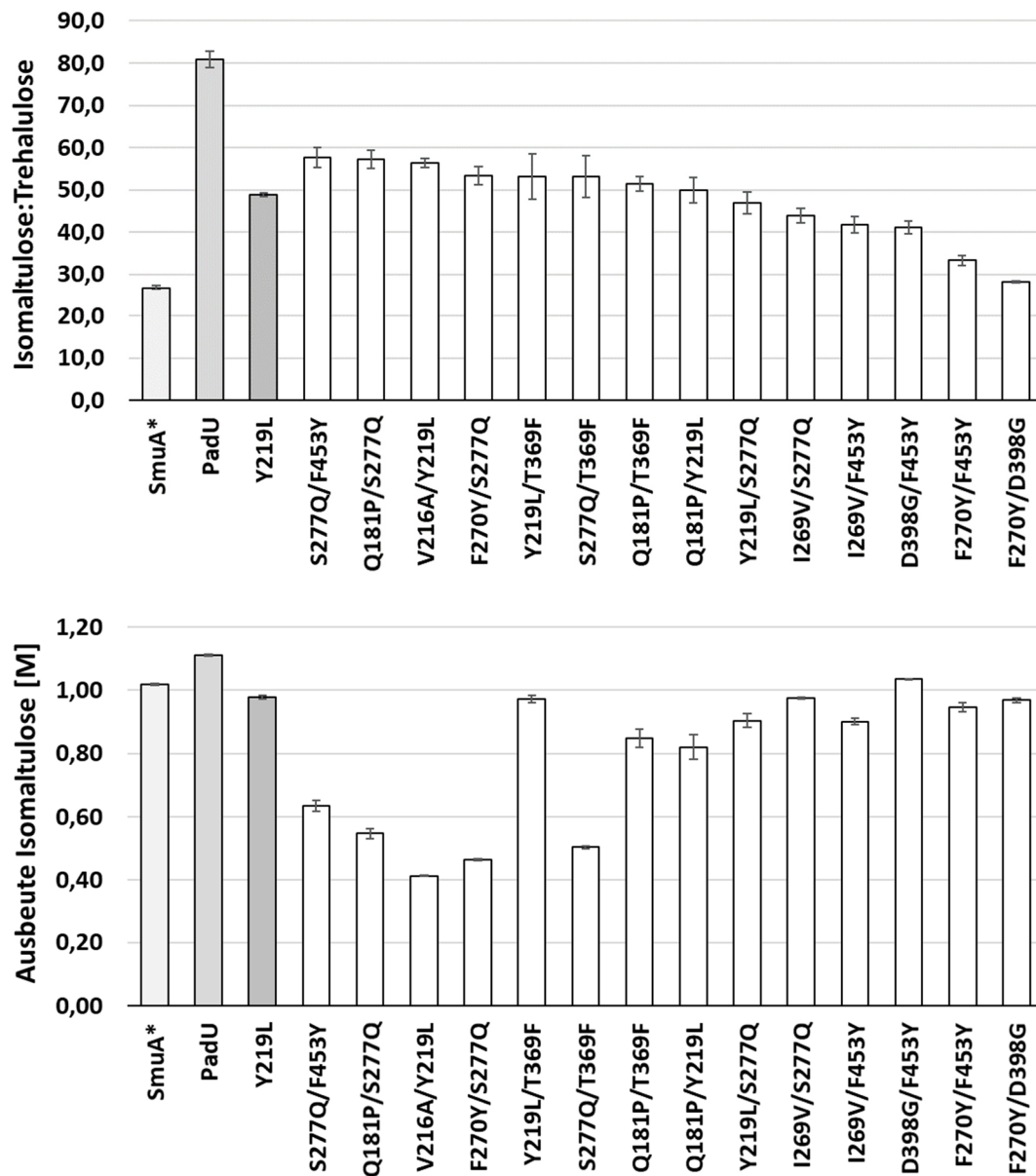
Eine Sonderrolle unter den analysierten Mutanten nahm F270Y mit der durch diesen Austausch verminderten Hydrolyseaktivität von SmuA ein. Daher wurde dieser Aminosäureaustausch in drei Kombinationen eingesetzt, mit dem Ziel, diesen Effekt an die Doppelmutante weiterzugeben. Die für F270Y ermittelten Werte (Tabelle 11) betragen: 95,2 % Isomaltulose, 3,2 % Trehalulose und 1,6 % Glucose und Fructose. In dieser Hinsicht ähnelten die beiden Doppelmutanten F270Y/F453Y und F270Y/D398G (Tabelle 13) zwar in der niedrigen Hydrolyseaktivität, jedoch nicht D398G und F453Y in der niedrigen Trehalulose-Produktion. Beide Punktmutationen wurden auch in der Verbindung I269V/F453Y bzw. D398G/F453Y analysiert. Beide Varianten gehörten mit einem Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von respektive 41,8:1 und 41,2:1 zu den schlechtesten Kombinationen aus dieser Phase. Obgleich die enzymatische Aktivität erhalten blieb, waren diese Werte deutlich unter dem Niveau der besten Punktmutante SmuA\*(Y219L) mit einem Verhältnis von 48,8:1 (Abb. 27).

Die Einzelmutante Q181P wurde sowohl in der bereits beschriebenen Variante Q181P/S277Q verwendet als auch in Q181P/T369F und Q181P/Y219L. In beiden Fällen lag ein hohes Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 51,4:1 und 50,0:1 vor, verbunden mit einem leichten Abfall der Ausbeute von Isomaltulose auf 0,82 M. Mit 1,8 und 1,9 % Trehalulose erzielten beide Doppelmutanten zwar ein ähnlich niedriges Niveau wie SmuA\*(Y219L), produzierten jedoch mit 5,5 und 5,9 % auch deutlich mehr Glucose und Fructose (Tabelle 13). Entgegen den Erwartungen wurde mit der Kombination der

beiden besten Einzelmutanten V216A und Y219L die geringste enzymatische Aktivität und die höchste Ausbeute an Monosacchariden in Höhe von 8,9 % gemessen. Auch wenn das Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose 56,4:1 betrug, wurde im weiteren Verlauf der Analyse auf diese Variante verzichtet. Erklärt werden kann der unerwartete Effekt durch die räumliche Nähe der beiden Substitutionen, welche so vermutlich nicht mehr synergistisch wirken (Abb. 24 B). Die Mutante, die dem Anforderungsprofil am besten entsprach, war Y219L/T369F. Bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität produzierte diese Variante 93,5 % Isomaltulose, 1,8 % Trehalulose und 4,8 % Glucose und Fructose, was einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 53,1:1 entsprach (Abb. 27, Tabelle 13).







**Abbildung 27:** Analyse der 14 SmuA-Doppelmutanten aus Phase I. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20  $^{\circ}$ C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95  $^{\circ}$ C beendet.

**Tabelle 13:** Zusammenstellung der 14 SmuA-Doppelmutanten aus Phase I. Dargestellt sind die prozentuale Ausbeute an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M.

Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis	Ausbeute [M]
	Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	Isomaltulose:Trehalulose	Isomaltulose
SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
Y219L	94,8	1,9	3,4	48,8	0,98
S277Q/F453Y	93,1	1,6	5,3	57,7	0,64
Q181P/S277Q	90,6	1,6	7,8	57,2	0,55
V216A/Y219L	89,5	1,6	8,9	56,4	0,41
F270Y/S277Q	94,6	1,8	3,6	53,3	0,46
Y219L/T369F	93,5	1,8	4,8	53,1	0,97
S277Q/T369F	91,6	1,7	6,6	53,1	0,50
Q181P/T369F	92,7	1,8	5,5	51,4	0,85
Q181P/Y219L	92,2	1,9	5,9	50,0	0,82
Y219L/S277Q	91,8	2,0	6,3	46,9	0,90
I269V/S277Q	94,5	2,2	3,3	43,9	0,98
I269V/F453Y	95,3	2,3	2,4	41,8	0,90
D398G/F453Y	95,6	2,3	2,1	41,2	1,03
F270Y/F453Y	95,2	2,9	1,9	33,3	0,95
F270Y/D398G	95,1	3,4	1,5	28,2	0,97

### 3.4.5.2 Phase II der Generierung von SmuA-Doppelmutanten

Die zweite Phase der Analyse von Doppelmutanten beschäftigte sich größtenteils mit den Punktmutationen Q181P, Y219L, I269V und F453Y. In Form der Doppelmutante Y219L/D398G konnte hierbei die bis zu diesem Zeitpunkt beste Variante identifiziert werden. Diese erreichte bei unveränderter enzymatischer Aktivität eine prozentuale Ausbeute von 95,0 % Isomaltulose, 1,6 % Trehalulose und 3,4 % Glucose und Fructose (Tabelle 14). Damit wurde die Produktion an Trehalulose im Vergleich zur besten Einzelvariante Y219L um 0,3 Prozentpunkte verringert und lag nur noch 0,4 % über der Bestmarke von PadU. Auch das Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose betrug bemerkenswerte 60,8:1. Die Verbindung von I269V mit Y219L zeigte ebenfalls einen deutlichen Zugewinn der Produktion von Isomaltulose. So stieg das Verhältnis auf 59,6:1 und die prozentuale Ausbeute an Trehalulose verringerte sich auf 1,6 %, jedoch zusammen mit einer Reduktion der molaren Ausbeute von Isomaltulose auf 0,91 M. Y219L war allerdings nicht mit jeder Einzelmutante kompatibel, was an der bereits beschriebenen Mutante V216A/Y219L aus der vorherigen Phase I und auch an Y219L/F453Y der Phase II deutlich wurde. Letztere wies mit einer 1,9 %-igen Trehalulose-Produktion

und einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 48,3:1 nahezu die gleichen Werte wie die Ausgangsvariante Y219L auf (Abb. 28).

Neben dieser Doppelmutante wurde F453Y in dieser Phase zwei weitere Male eingesetzt. Zusammen mit Q181P wurde eine prozentuale Ausbeute von 1,7 % Trehalulose erzielt, jedoch auch die Ausbeute an Isomaltulose halbiert. Die Doppelmutante T369F/F453Y erwies sich zwar als deutlich aktivere Variante, allerdings resultierte diese Kombination in einem nur geringfügig höheren Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 50,1:1 im Vergleich zur besten Punktmutante Y219L (Tabelle 14).

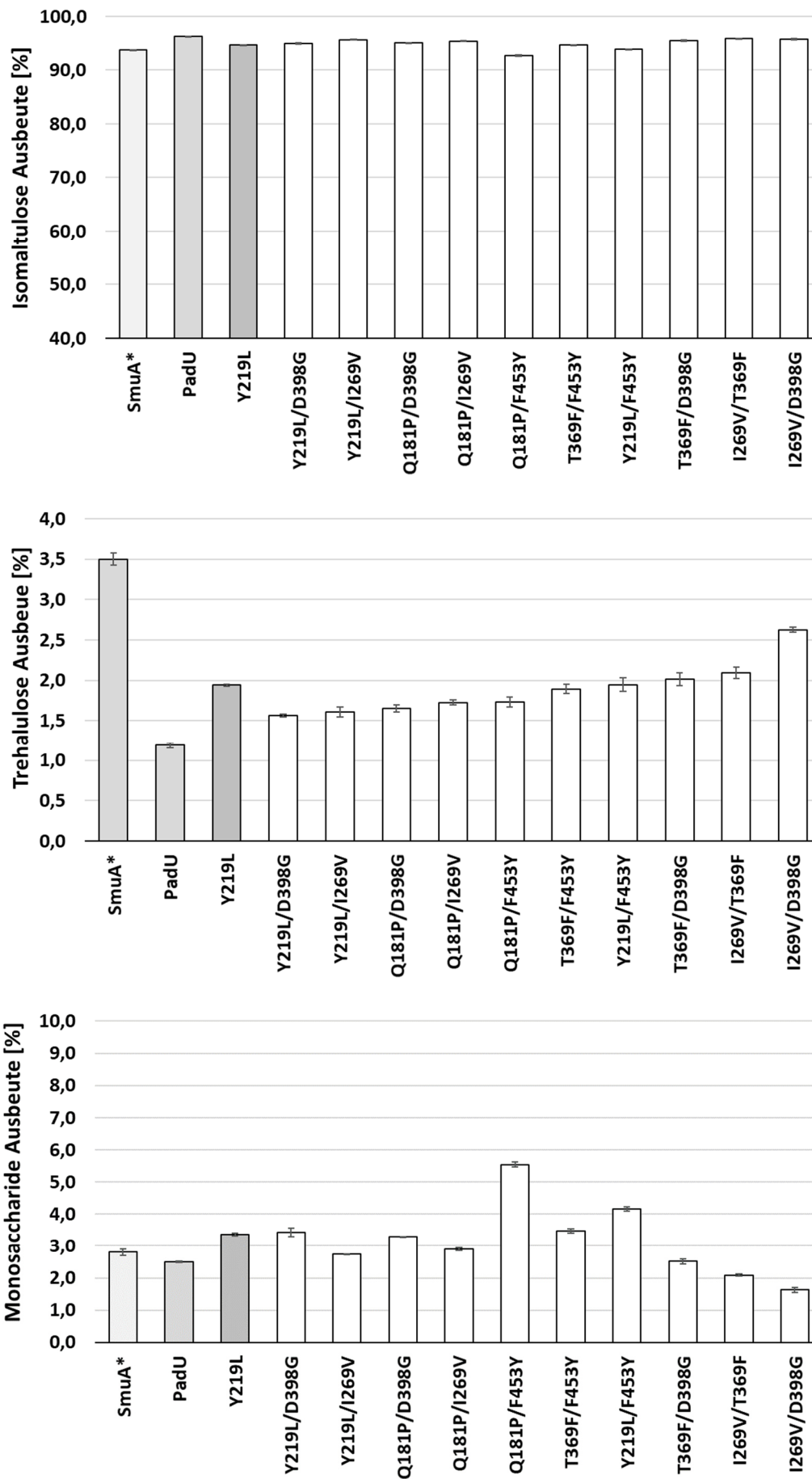
Mit der Einführung eines Prolins an Position 181 wurde im Laufe des initialen Screenings die insgesamt drittbeste Mutante generiert (Tabelle 12). Deren niedrige Produktion von 2,0 % Trehalulose konnte mit der zusätzlichen Einbringung der Substitutionen D398G und I269V nochmals um 0,2 Prozentpunkte reduziert werden. Zusammen mit einer Isomaltulose-Ausbeute von 0,97 M und einem Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von 57,5:1 stellte dies die drittbeste Doppelmutante (Q181P/D398G) der gesamten Studie dar (Abb. 28). Die Kombination mit I269V wies im Vergleich dazu eine höhere molare Ausbeute an Isomaltulose auf und ein geringeres Verhältnis der Disaccharide in Höhe von 55,3:1.

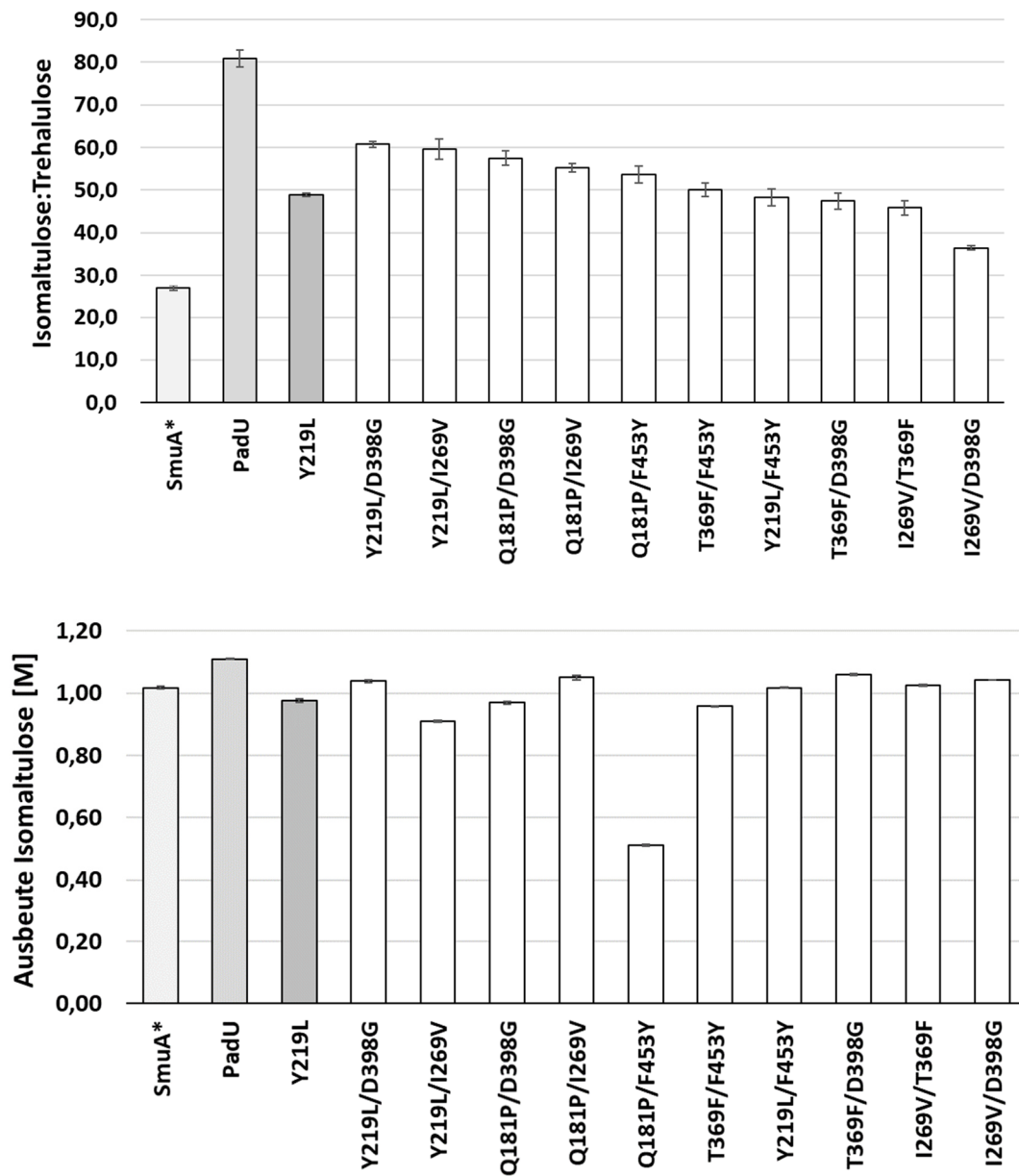
In Anbetracht der Werte aus Phase II wurde der Erfahrungsgewinn aus Phase I deutlich sichtbar. Während in der ersten Phase fünf Doppelmutanten eine verringerte enzymatische Aktivität von nur 0,5 M Isomaltulose oder weniger aufzeigten, war es in Phase II nur eine (Abb. 27 und Abb. 28). Auch die bis zu diesem Zeitpunkt des Projekts beste aller SmuA-Varianten Y219L/D398G wurde erst im zweiten Durchgang identifiziert. Bei den Kombinationen waren somit im ersten Versuch ebenfalls mehr Fehlschüsse als Treffer zu verzeichnen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse konnten jedoch anschließend in die Entwicklung der drei Doppelmutanten Y219L/D398G, Y219L/I269V und Q181P/D398G umgesetzt werden. Aufgrund dieser Strategie mussten lediglich 24 Doppelmutanten, aus insgesamt 44 mathematisch möglichen Kombinationen, analysiert werden, um Doppelmutanten mit dem gewünschten Anforderungsprofil zu identifizieren.

**Tabelle 14:** Zusammenstellung der 10 SmuA-Doppelmutanten aus Phase II. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M.

Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis	Ausbeute [M]
	Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	Isomaltulose:Trehalulose	Isomaltulose
SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
Y219L	94,8	1,9	3,4	48,8	0,98
<b>Y219L/D398G</b>	<b>95,0</b>	<b>1,6</b>	<b>3,4</b>	<b>60,8</b>	<b>1,04</b>
Y219L/I269V	95,7	1,6	2,7	59,6	0,91
Q181P/D398G	95,1	1,7	3,3	57,5	0,97
<b>Q181P/I269V</b>	<b>95,4</b>	<b>1,7</b>	<b>2,9</b>	<b>55,3</b>	<b>1,05</b>
Q181P/F453Y	92,7	1,7	5,5	53,7	0,51
T369F/F453Y	94,6	1,9	3,5	50,1	0,96
Y219L/F453Y	93,9	1,9	4,2	48,3	1,02
T369F/D398G	95,5	2,0	2,5	47,5	1,06
I269V/T369F	95,8	2,1	2,1	45,8	1,02
I269V/D398G	95,7	2,6	1,6	36,5	1,04

Phase II





**Abbildung 28:** Analyse der 10 SmuA-Doppelmutanten aus Phase II. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet.

### 3.4.5.3 Tripelmutanten: Kombinationen von Y219L/D398G und Q181P/I269V mit weiteren Mutationen

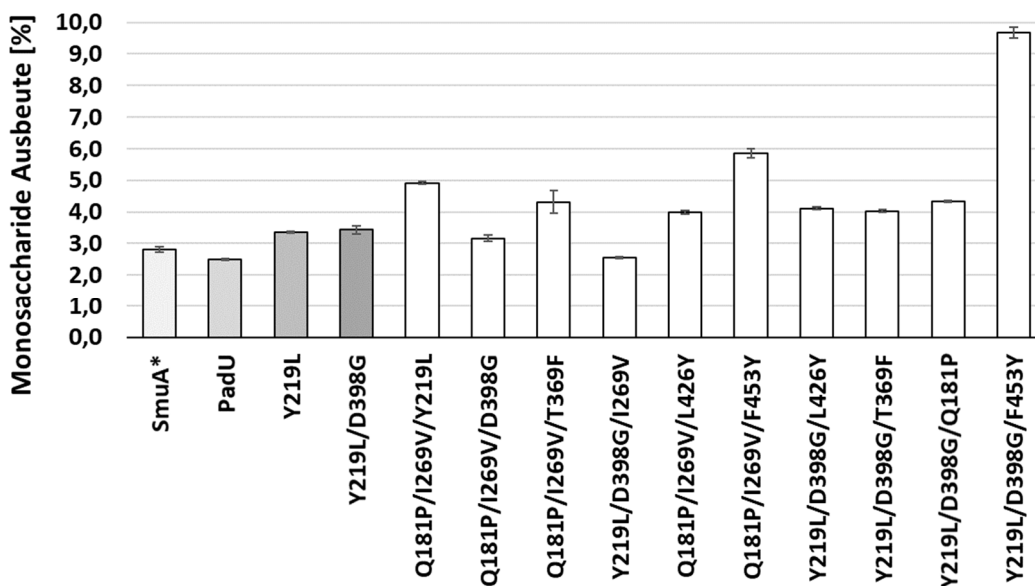
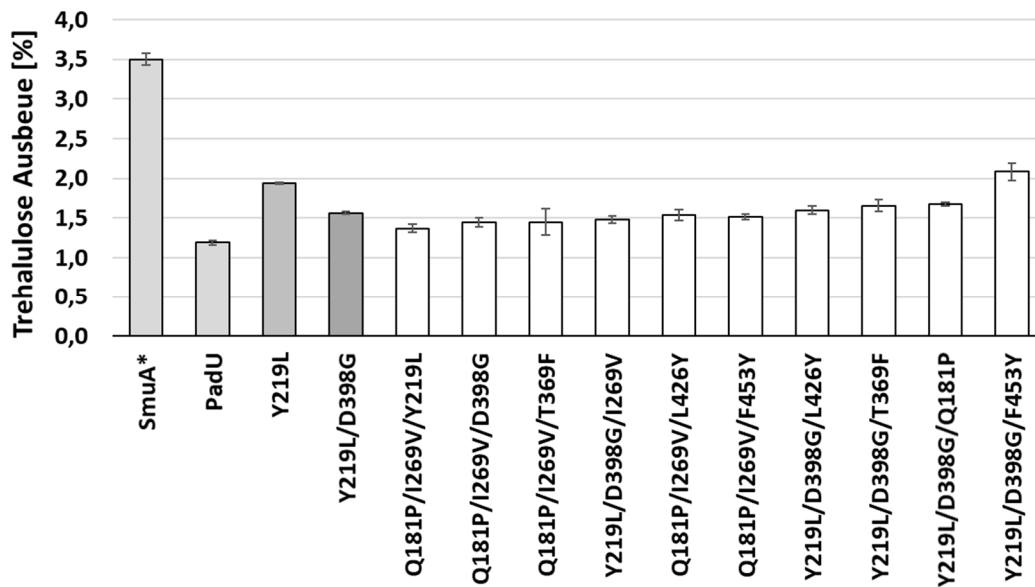
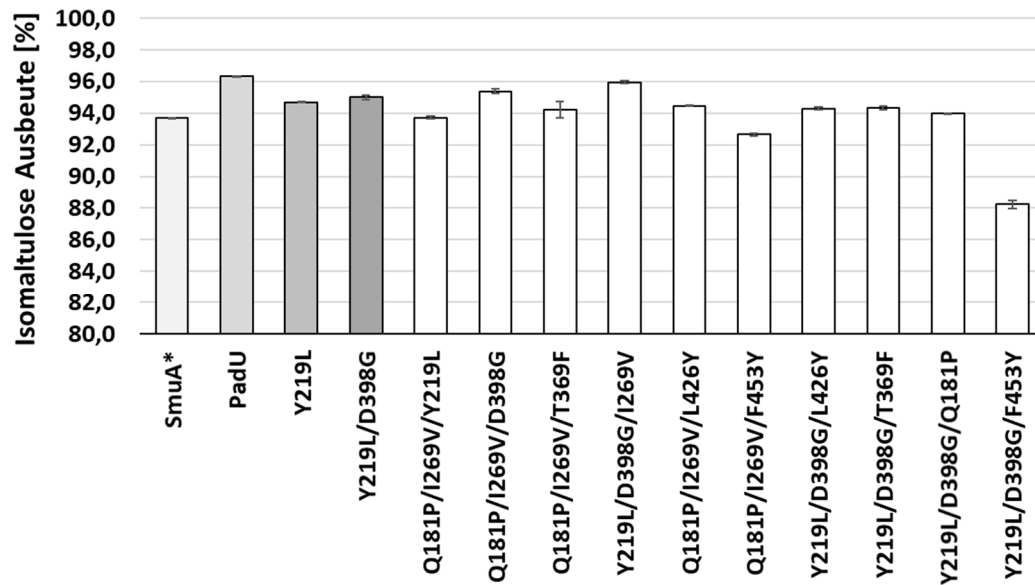
Um die durch Kombination zweier Einzelmutationen erzielten additiven Effekte weiter zu verstärken, wurden im nächsten Schritt die zwei vielversprechendsten Kandidaten Y219L/D398G und Q181P/I269V (Tabelle 14) zusätzlich mutiert. Ausgewählt wurden diese beiden Doppelmutanten aufgrund ihres erhöhten Verhältnisses von Isomaltulose zu Trehalulose und der im Vergleich zur Ausgangsvariante SmuA\* praktisch unveränderten enzymatischen Aktivität. Entgegen den Erwartungen konnte die beste Variante Y219L/D398G nur durch die weitere Mutation I269V verbessert werden. In diesem Fall stieg das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose leicht auf 64,7:1, bei einer unveränderten prozentualen Ausbeute von 1,5 % Trehalulose. Allerdings wurde eine Reduktion der Aktivität auf 0,91 M Isomaltulose festgestellt (Tabelle 15). Die Kombinationen mit Q181P, T369F und L426Y lieferten zwar Tripelmutanten mit einer niedrigen prozentualen Produktion von Trehalulose von 1,6 bzw. 1,7 %, jedoch ohne Verringerung im Vergleich zur ursprünglichen Doppelmutante (Tabelle 14). Die absoluten Ausbeuten dieser drei Tripelmutanten stellten mit 0,93 bis 1,02 M Isomaltulose die höchsten Werte aller untersuchten Varianten dieser Reihe dar (Abb. 29). Auch die vierte Tripelmutante basierend auf Y219L/D398G lieferte nicht die gewünschten Ergebnisse: Die Einführung von F453Y führte zu einem deutlichen Verlust der enzymatischen Aktivität auf 0,52 M Isomaltulose und einer Steigerung der Trehalulose-Produktion auf 2,1 % (Tabelle 15). Diese Werte blieben somit nicht nur unter denen der Doppelmutante Y219L/D398G, sondern auch dem der besten Einzelmutante Y219L.

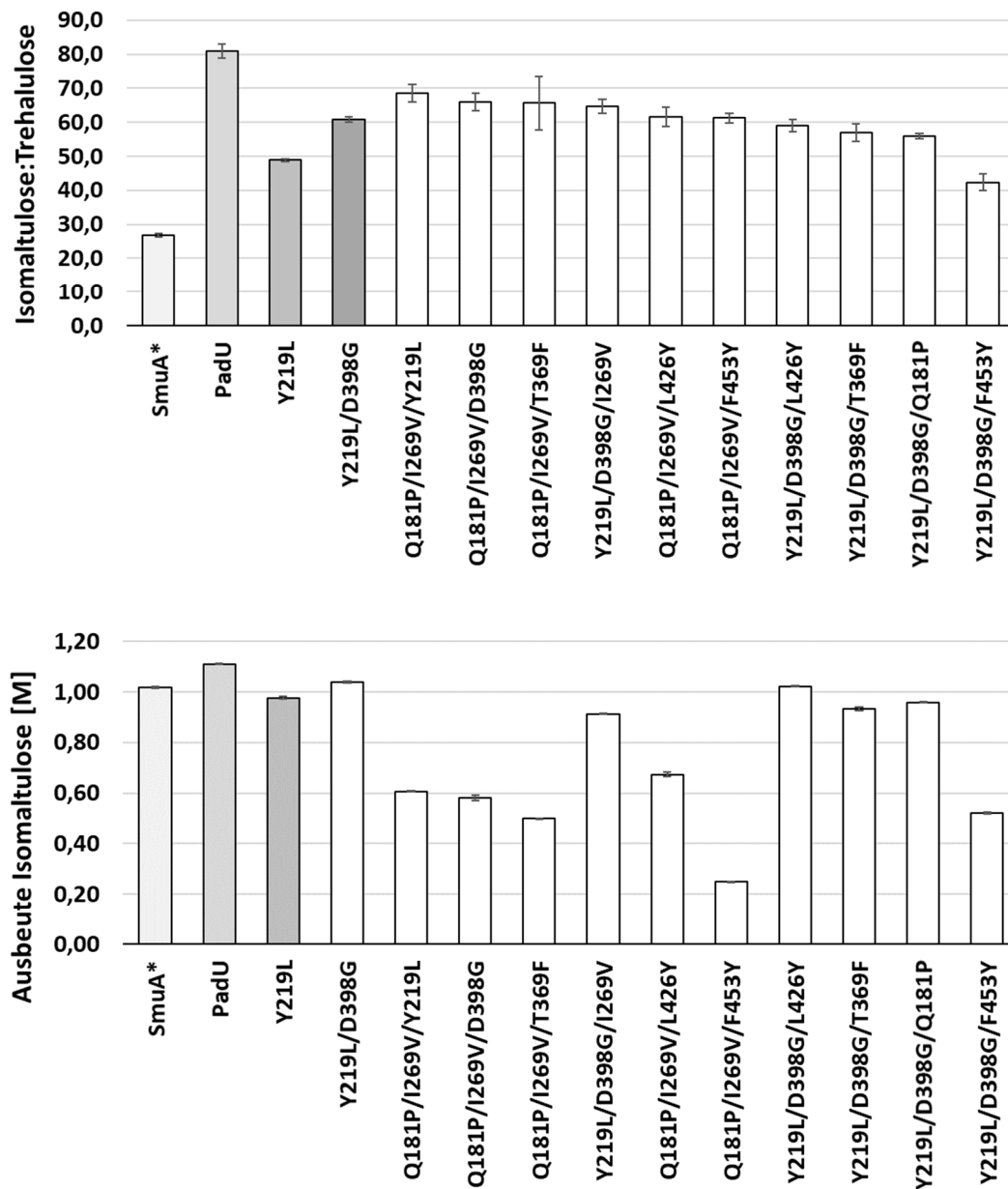
**Tabelle 15:** Zusammenstellung der 10 SmuA-Tripelmutanten aus Phase I. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M.

	Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose	Ausbeute [M] Isomaltulose
		Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide		
	SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
	PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
	Y219L	94,8	1,9	3,4	48,8	0,98
	Y219L/D398G	95,0	1,6	3,4	60,8	1,04
Phase I	Q181P/I269V/Y219L	93,7	1,4	4,9	68,5	0,61
	Q181P/I269V/D398G	95,4	1,4	3,2	66,0	0,58
	Q181P/I269V/T369F	94,2	1,4	4,3	65,6	0,50
	Y219L/D398G/I269V	96,0	1,5	2,6	64,7	0,91
	Q181P/I269V/L426Y	94,5	1,5	4,0	61,5	0,67
	Q181P/I269V/F453Y	92,6	1,5	5,8	61,3	0,25
	Y219L/D398G/L426Y	94,3	1,6	4,1	59,0	1,02
	Y219L/D398G/T369F	94,3	1,7	4,0	57,0	0,93
	Y219L/D398G/Q181P	94,0	1,7	4,3	56,0	0,96
	Y219L/D398G/F453Y	88,2	2,1	9,7	42,4	0,52

Als zweite Vorlage der Tripelmutanten diente die Doppelmutante Q181P/I269V. In allen fünf hier analysierten Fällen wurde das Produktspektrum zu Lasten von Trehalulose verändert und somit das Verhältnis der beiden Disaccharide zu Isomaltulose hin verschoben (Tabelle 15). Die drei besten Varianten wurden durch Kombinationen mit Y219L, D398G bzw. T369F erzielt. Das Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose betrug 65,6:1, 66,0:1 und 68,5:1, einhergehend mit einer Reduktion der prozentualen Ausbeute an Trehalulose auf 1,4 %. Dies stellt zwar eine Verringerung um 0,3 Prozentpunkte im Vergleich zur Doppelmutante dar, jedoch resultierten diese Kombinationen auch in nahezu halbierten Isomaltulose-Ausbeuten von 0,50 bis 0,61 M (Abb. 29). Dieser Nachteil wurde zudem bei den zusätzlichen Mutationen L426Y und F453Y detektiert. Mit 0,25 M Isomaltulose bot die Tripelmutante Q181P/I269V/F453Y die geringste aller enzymatischen Aktivitäten. Dennoch war auch in diesem Fall eine Reduktion der prozentualen Ausbeute von Trehalulose auf 1,5 % zu verzeichnen. Ebenso bei der zusätzlichen Mutation L426Y, die jedoch eine im Vergleich zur letztgenannten Variante höhere Aktivität von 0,67 M Isomaltulose zeigte (Abb. 29, Tabelle 15). Damit konnte bereits in der ersten Reihe von Tripelmutanten die Additivität der SmuA-Mutanten erneut unter Beweis gestellt werden, jedoch unter erheblichen Verlusten an enzymatischer Aktivität, demgemäß beide Varianten Y219L/D398G und Q181P/I269V als nicht weiter interessant eingestuft wurden.







**Abbildung 29:** Analyse der 10 SmuA-Tripelmutanten aus Phase I. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet.

#### 3.4.5.4 Tripelmutanten: Additionen zu Y219L/F453Y, Q181P/D398G und T369F/D398G

In der zweiten Phase der Generierung der Tripelmutanten wurde auf die zuvor genutzten Doppelmutanten Y219L/D398G und Q181P/I269V verzichtet und stattdessen die Kombinationen Y219L/F453Y, Q181P/D398G und T369F/D398G weiterverfolgt. Wie in der Reihe zuvor zeichnete sich auch die Auswahl durch niedrige Produktion an Trehalulose aus, zusammen mit einer im Vergleich zu SmuA\* nahezu identischen enzymatischen Aktivität (Tabelle 14).

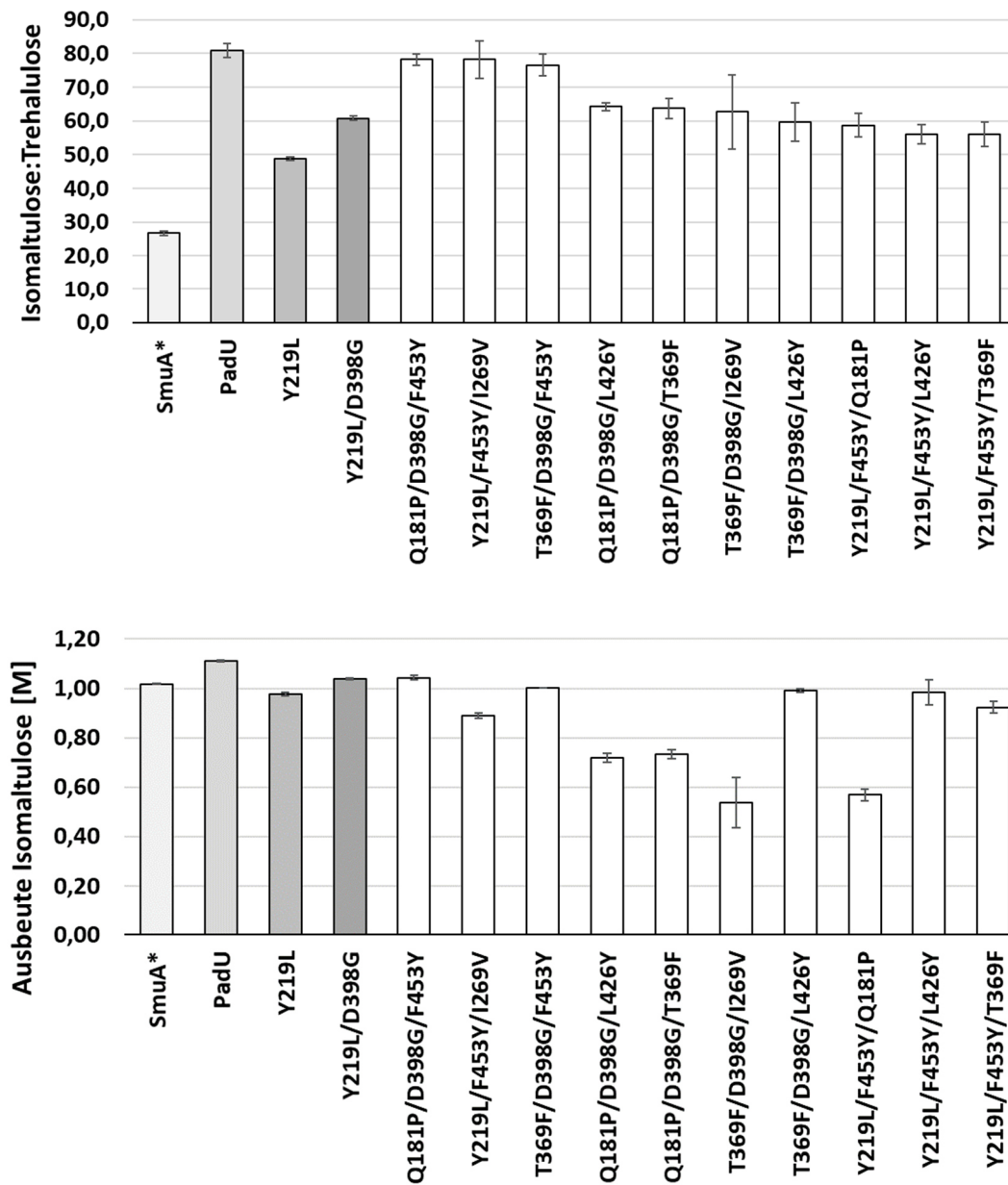
Die in dieser Phase eingesetzten Doppelmutanten zeigten jedoch mehr Potential als die in Phase I. Mit der zusätzlichen Mutation F453Y gegenüber Q181P/D398G konnten neue Spitzenwerte erreicht werden. So lag das Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose im Produktspektrum dieser Tripelmutante bei einem bislang unerreichten Wert von 78,2:1. Zudem erreichte die prozentuale Ausbeute an Trehalulose das niedrige Niveau von PadU in Höhe von 1,2 % (Abb. 30). Die unveränderte Ausbeute an Isomaltulose von 1,04 M rundete die vorteilhaften Eigenschaften dieser Dreifachmutante ab (Tabelle 16). Damit wurden durch nur eine weitere Substitution die Werte der besten SmuA-Doppelmutante Y219L/D398G übertroffen und die von PadU nahezu erreicht. Die zusätzlichen Mutationen L426Y und T369F konnten die Werte der Template Variante diesbezüglich ebenfalls untertreffen, bewirkten jedoch ebenfalls einen Abfall der Aktivität auf 0,72 und 0,73 M (Abb. 30).

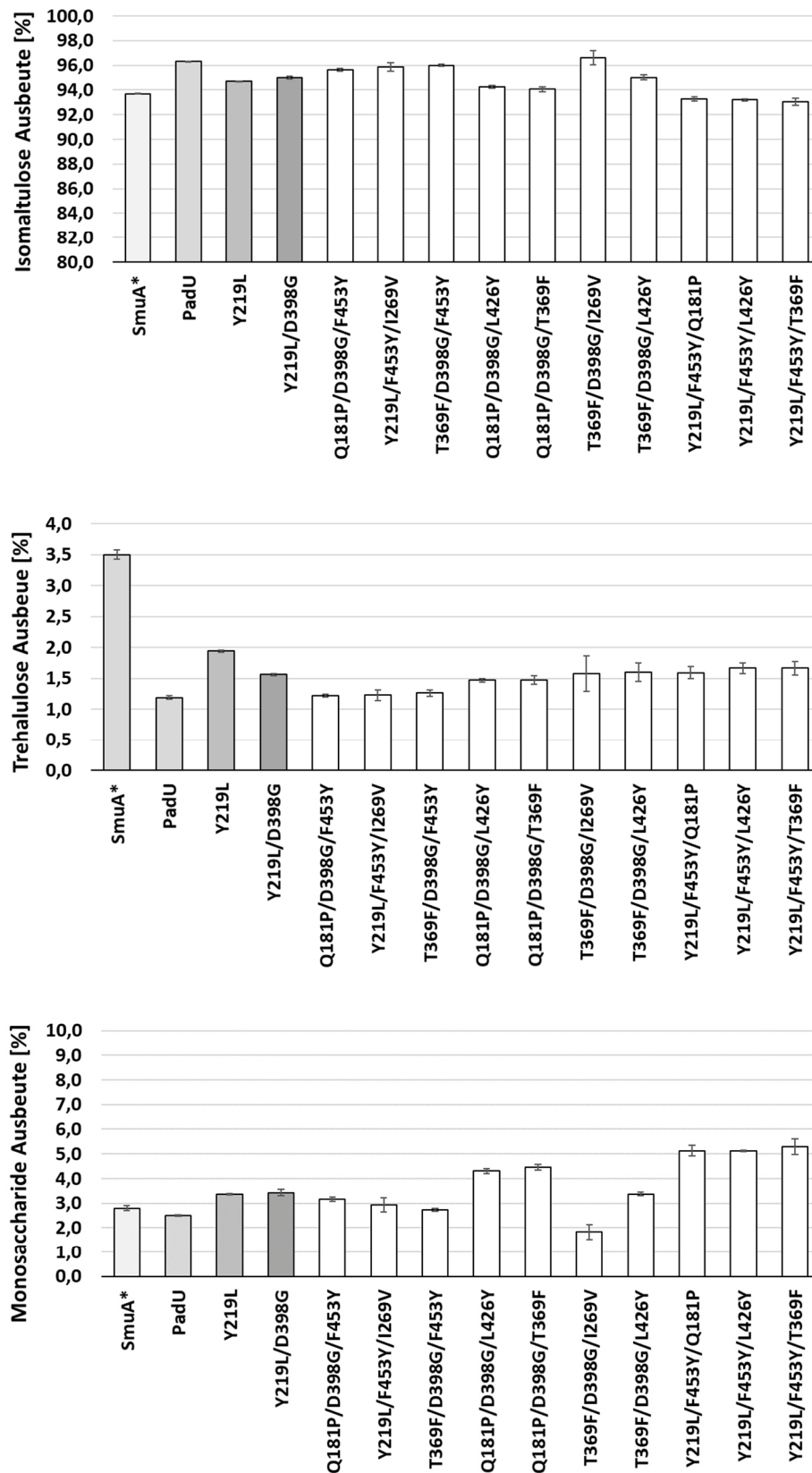
Die zweitbeste Tripelmutante dieser Reihe wurde durch die zusätzliche Substitution von I269V in der Kombination mit Y219L/F453Y erreicht. Hierbei wurden 95,8 % Isomaltulose, 1,2 % Trehalulose und 2,9 % Glucose und Fructose bei einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 78,2:1 detektiert, allerdings auch ein geringer Abfall der enzymatischen Aktivität auf 0,89 M Isomaltulose. Auch mit den zusätzlichen Substitutionen Q181P, T369F und L426Y wurde die Trehalulose-Produktion der Ausgangsvariante Y219L/F453Y unterschritten, jedoch nicht der Wert von 1,2 % Trehalulose der besten Tripelmutante erreicht. Während die Substitutionen T369F und L426Y zu nur geringen Veränderungen der enzymatischen Aktivität führten, resultierte die zusätzliche Mutation Q181P in einem deutlich höheren Verlust der Isomaltulose-Ausbeute (Tabelle 16).

Die dritte verwendete Vorlage stellte die Zweifachmutante T369F/D398G dar, welche mit den Substitutionen I269V, L426Y und F453Y kombiniert wurde. Letztere führte zu einer prozentualen Ausbeute der Trehalulose von 1,3 % und folglich zu einem Verhältnis von Isomaltulose zu Trehalulose von 76,6:1 (Abb. 30). Mit einer enzymatischen Aktivität von 1,00 M Isomaltulose war diese Tripelmutante somit als zweitbeste Variante in dieser Phase einzustufen. Die Tripelmutante T369F/D398G/I269V hingegen zeigte eine niedrigere Aktivität 0,54 M Isomaltulose, aber interessanterweise auch die niedrigste Ausbeute an Monosacchariden (1,8 %) aller untersuchten Dreifachmutanten. T369F/D398G/L426Y stellte aufgrund seiner hohen enzymatischen Aktivität ebenfalls einen potentiell interessanten Kandidaten dar, konnte aber die Bestwerte von Q181P/D398G/F453Y nicht erreichen (Abb. 30, Tabelle 16).

Somit konnte in Phase II der Generierung der Tripelmutanten durch die richtige Wahl der Doppelmutanten und entsprechende Kombinationen die Bestwerte von PadU nahezu erreicht werden,

wobei die Tripelmutanten Q181P/D398G/F453Y und Y219L/F453Y/I269V am vielversprechendsten erschienen.





**Abbildung 30:** Analyse der 10 SmuA-Tripelmutanten aus Phase II. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95 °C beendet.

**Tabelle 16:** Zusammenstellung der 10 SmuA-Tripelmutanten aus Phase II. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Die vielversprechendsten Tripelmutanten wurden fett markiert.

Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis	Ausbeute [M]
	Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	Isomaltulose:Trehalulose	Isomaltulose
SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
Y219L	94,8	1,9	3,4	48,8	0,98
Y219L/D398G	95,0	1,6	3,4	60,8	1,04
<b>Q181P/D398G/F453Y</b>	<b>95,6</b>	<b>1,2</b>	<b>3,2</b>	<b>78,2</b>	<b>1,04</b>
Y219L/F453Y/I269V	95,8	1,2	2,9	78,2	0,89
<b>T369F/D398G/F453Y</b>	<b>96,0</b>	<b>1,3</b>	<b>2,7</b>	<b>76,6</b>	<b>1,00</b>
Q181P/D398G/L426Y	94,2	1,5	4,3	64,2	0,72
Q181P/D398G/T369F	94,1	1,5	4,5	63,8	0,73
T369F/D398G/I269V	96,6	1,6	1,8	62,7	0,54
<b>T369F/D398G/L426Y</b>	<b>95,0</b>	<b>1,6</b>	<b>3,4</b>	<b>59,6</b>	<b>0,99</b>
Y219L/F453Y/Q181P	93,3	1,6	5,1	58,8	0,57
Y219L/F453Y/L426Y	93,2	1,7	5,1	56,1	0,98
Y219L/F453Y/T369F	93,0	1,7	5,3	56,0	0,92

### 3.4.5.5 Generierung und Analyse von Quadrupelmutanten

Zum Abschluss der Mutagenesestudie von SmuA wurde eine Kombination der vielversprechendsten Dreifachmutanten mit den verbliebenen Punktmutationen durchgeführt mit dem Ziel, die Trehalulose-Produktion ein weiteres Mal zu verringern. Als Grundlage dafür diente zum einen die bisher beste Dreifachmutante Q181P/D398G/F453Y wie auch die Varianten T369F/D398G/F453Y und T369F/D398G/L426Y (Tabelle 16). Diese Kandidaten zeichneten sich in der vorangegangenen Analyse durch eine besonders niedrige prozentuale Ausbeute an Trehalulose aus und eine enzymatische Aktivität über 0,95 M Isomaltulose (Tabelle 16).

Im Verlauf des 12 Mutanten umfassenden Zyklus wurde jede dieser Tripelmutanten mit vier weiteren Punktmutationen kombiniert. Durch die Einbringung der Substitution Q181P in T369F/D398G/F453Y wurde die niedrigste Produktion an Trehalulose in Höhe von 1,0 % und das höchste Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose (91,9:1) ermittelt. Der Nachteil dieser Vierfachmutante bestand jedoch im deutlichen Verlust der enzymatischen Aktivität um den Faktor 3,5 auf 0,30 M Isomaltulose und dem starken Anstieg der Ausbeute der Monosaccharide auf 7,1 % (Abb. 31). Die Kombination von T369F/D398G/F453Y mit der besten Einzelmutante Y219L hingegen resultierte in der besten SmuA-Variante dieser Mutagenesestudie. Das Produktspektrum umfasste 96,2 % Isomaltulose, 1,1 % Trehalulose und 2,7 % Glucose und Fructose bei einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 85,6:1 und einer molaren Ausbeute an Isomaltulose von 0,95 M (Tabelle 17). Somit konnten die hier

relevanten enzymatischen Parameter durch lediglich vier Substitutionen im Vergleich zu SmuA\* um ein Vielfaches verbessert werden und die als Maßstab geltenden Werte von PadU übertroffen werden. Die zusätzlichen Substitutionen I269V und L426Y konnten die Werte dieser Template-Variante nicht verbessern, sondern führten zu einem Abfall der enzymatischen Aktivität (Abb. 31).

Die bislang beste Dreifachmutante Q181P/D398G/F453Y wurde in diesem Zyklus mit Substitutionen Y219L, I269V, T369F und L426Y kombiniert. Alle Varianten wiesen eine niedrige Ausbeute an Trehalulose auf, allerdings wurden auch erheblich reduzierte Enzymaktivitäten zwischen 0,28 und 0,53 M Isomaltulose detektiert. Obwohl die Ausgangsvariante also die beste aller Dreifachmutanten darstellte, war diese nicht mit weiteren Mutanten vorteilhaft kombinierbar.

Ähnlich zur Vierfachmutante T369F/D398G/F453Y/Q181P bewirkte die zusätzliche Substitution Q181P in Tripelmutanten T369F/D398G/L426Y einen deutlichen Anstieg der Ausbeute an Monosacchariden (7,9 %) einhergehend mit einem Abfall der enzymatischen Aktivität. Weitere Punktmutationen Y219L, I269V und F453Y führten nur zu geringfügigen additiven Effekten und steigerten das Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose auf maximal 65,9:1 (Abb. 31, Tabelle 17).

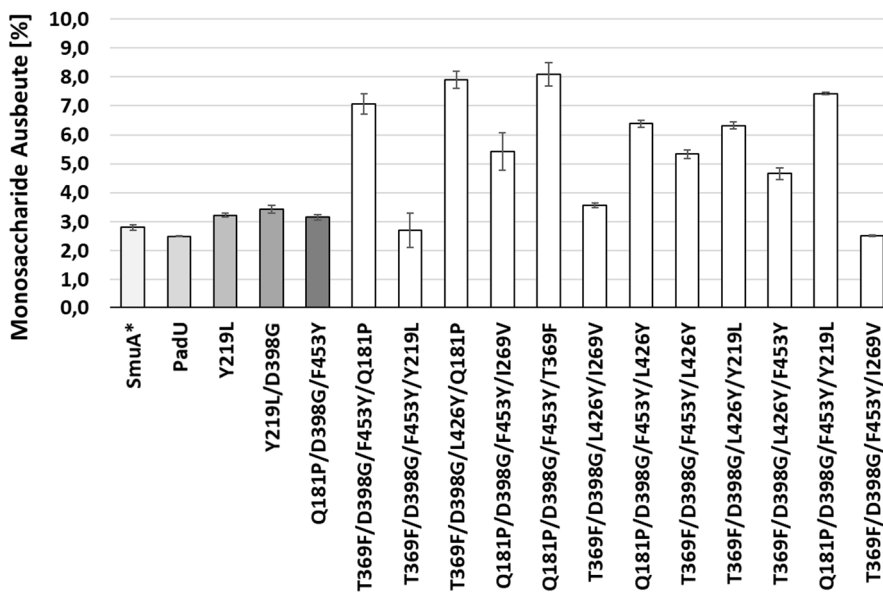
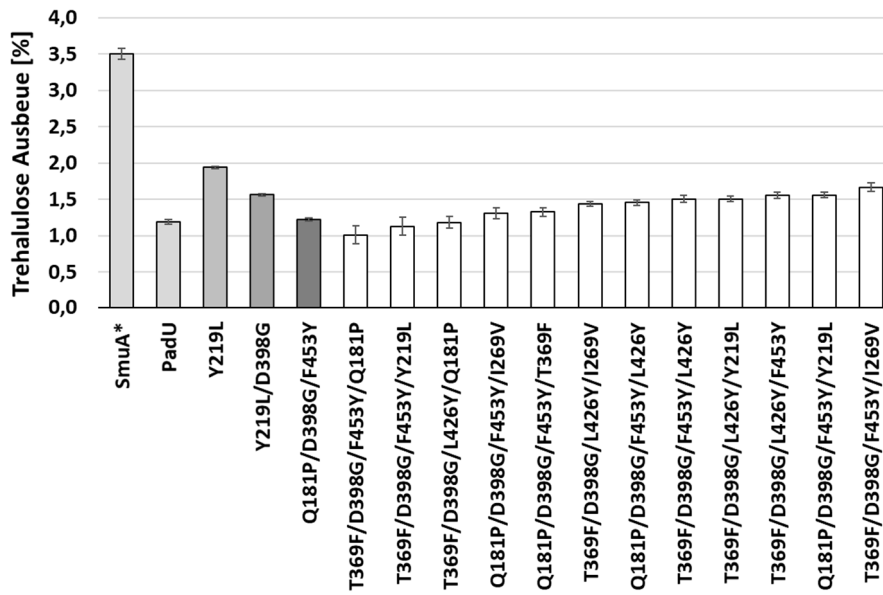
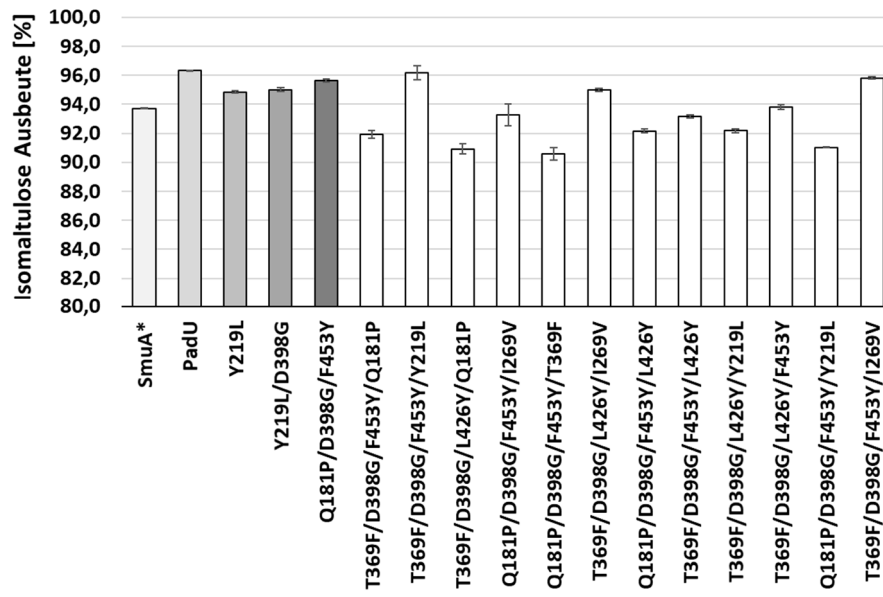
Mit dem Erreichen der Bestwerte von PadU hinsichtlich des Produktspektrums durch die Quadrupelmutante T369F/D398G/F453Y/Y219L wurde das zu Beginn der Mutagenesestudie aufgestellte Ziel erreicht. Anschließend wurden diese einer detaillierten Charakterisierung der enzymkinetischen und proteinbiochemischen Eigenschaften unterzogen.

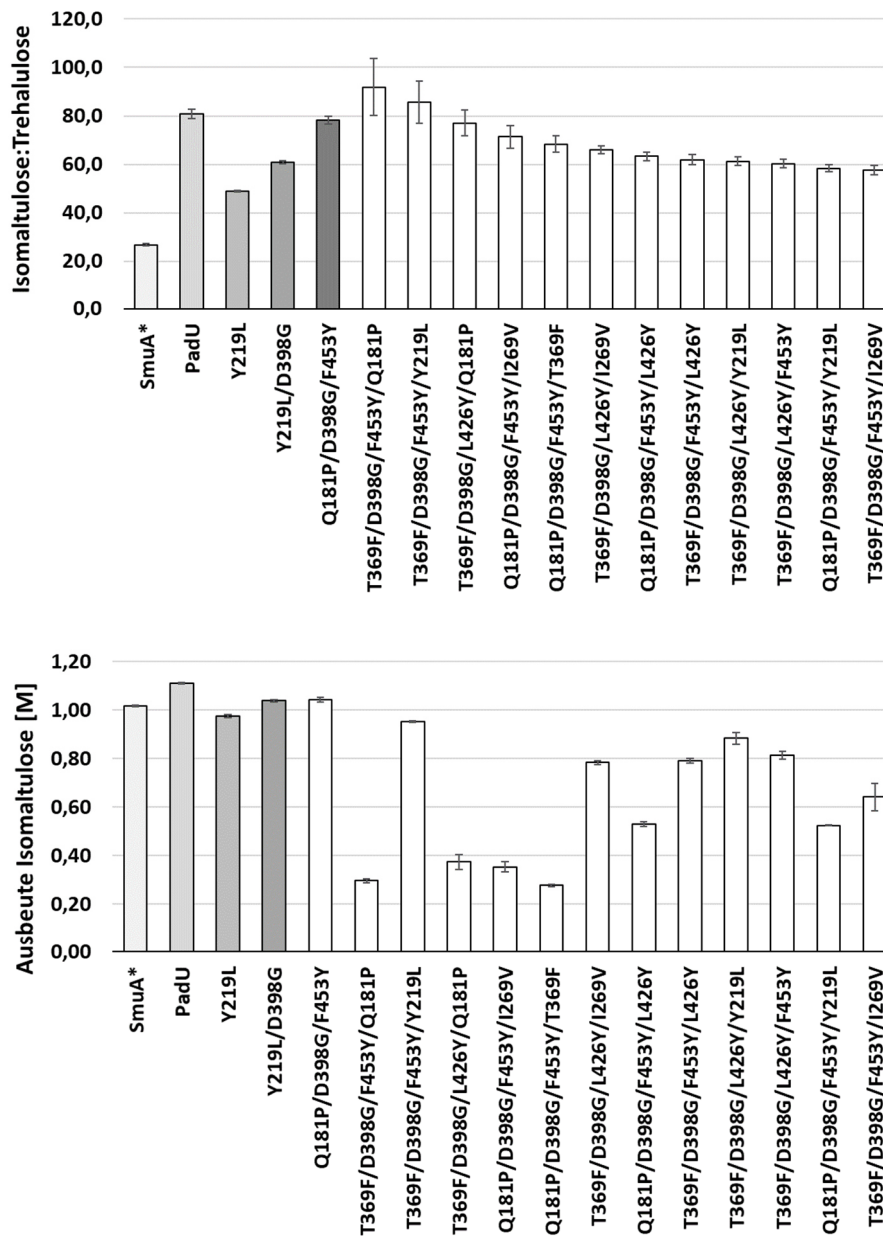
**Tabelle 17:** Zusammenstellung der 12 SmuA-Quadrupelmutanten. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Die vielversprechendsten Tripelmutanten wurden fett markiert.

Variante	Ausbeute [%]			Verhältnis	Ausbeute[M]
	Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	Isomaltulose:Trehalulose	Isomaltulose
SmuA*	93,7	3,5	2,8	26,8	1,02
PadU	96,3	1,2	2,5	80,9	1,11
Y219L	94,8	1,9	3,4	48,8	0,98
Y219L/D398G	95,0	1,6	3,4	60,8	1,04
Q181P/D398G/F453Y	95,6	1,2	3,2	78,2	1,04
T369F/D398G/F453Y/Q181P	91,9	1,0	7,1	91,9	0,30
<b>T369F/D398G/F453Y/Y219L</b>	<b>96,2</b>	<b>1,1</b>	<b>2,7</b>	<b>85,6</b>	<b>0,95</b>
T369F/D398G/L426Y/Q181P	90,9	1,2	7,9	77,1	0,37
Q181P/D398G/F453Y/I269V	93,3	1,3	5,4	71,4	0,35
Q181P/D398G/F453Y/T369F	90,6	1,3	8,1	68,4	0,28
T369F/D398G/L426Y/I269V	95,0	1,4	3,6	65,9	0,78
Q181P/D398G/F453Y/L426Y	92,2	1,5	6,4	63,2	0,53
T369F/D398G/F453Y/L426Y	93,2	1,5	5,3	61,9	0,79
T369F/D398G/L426Y/Y219L	92,2	1,5	6,3	61,2	0,88
T369F/D398G/L426Y/F453Y	93,8	1,6	4,7	60,3	0,81
Q181P/D398G/F453Y/Y219L	91,0	1,6	7,4	58,3	0,52
T369F/D398G/F453Y/I269V	95,8	1,7	2,5	57,5	0,64

Phase I







**Abbildung 31:** Darstellung der 12 SmuA-Quadrupelmutanten. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, das Verhältnis Isomaltulose:Trehalulose und die Ausbeute an Isomaltulose in M. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 mg/L (ca. 74,4 nM) des Enzyms und 40 % Saccharose in 10 mM Calciumacetat pH 5,5 mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L. Die Inkubation erfolgte bei 20  $^{\circ}$ C für 16 h. Die Reaktion wurde durch thermische Inaktivierung für 10 min bei 95  $^{\circ}$ C beendet.

### 3.4.6 Enzymkinetische Parameter

Für die mittels SEC isolierte rekombinanten Enzyme SmuA\*, PadU sowie die vielversprechendsten Varianten Y219L, Y219L/D398G, Q181P/D398G/F453Y und Y219L/T369F/D398G/F453Y wurden die enzymkinetischen Konstanten gegenüber dem Substrat Saccharose hinsichtlich der Produktion von Isomaltulose bestimmt (Abb. 32). Die Messungen für die Berechnung der Michaelis-Konstante  $K_M$  sowie der Wechselzahl  $k_{cat}$ , wurden mit verschiedenen Substratkonzentrationen bei der für spätere industrielle Fermentationen ausgewählten Reaktionstemperatur von 20 °C durchgeführt. Die rekombinante Ausgangsvariante SmuA\* zeigte gegenüber Saccharose einen  $K_M$ -Wert von 55,3 mM bei einem  $k_{cat}$ -Wert von 965 s<sup>-1</sup>, was einer katalytischen Effizienz von 17,5 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> entsprach (Tabelle 18). Bemerkenswerterweise wies PadU eine 2,8-fach höhere Michaelis-Konstante von 157 mM auf, gepaart mit  $k_{cat} = 567$  s<sup>-1</sup> und einer katalytischen Effizienz von lediglich 3,6 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Bezüglich der enzymatischen Aktivität wurde hier im Gegensatz zu den vorangegangenen Messungen ein deutlicher Unterschied zwischen den Varianten verzeichnet. Begründet wurde dies damit, dass es sich bei den in diesem Kapitel dargestellten enzymatischen Aktivitäten um die initialen 40 Minuten der Reaktion bei Substratkonzentrationen zwischen 50 und 400 mM handelte gemäß der Zielsetzung der Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik. In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Reaktionsgeschwindigkeit über einen Gesamtzeitraum von 16 Stunden und einer Substratkonzentration von 1,16 M Saccharose gemessen.

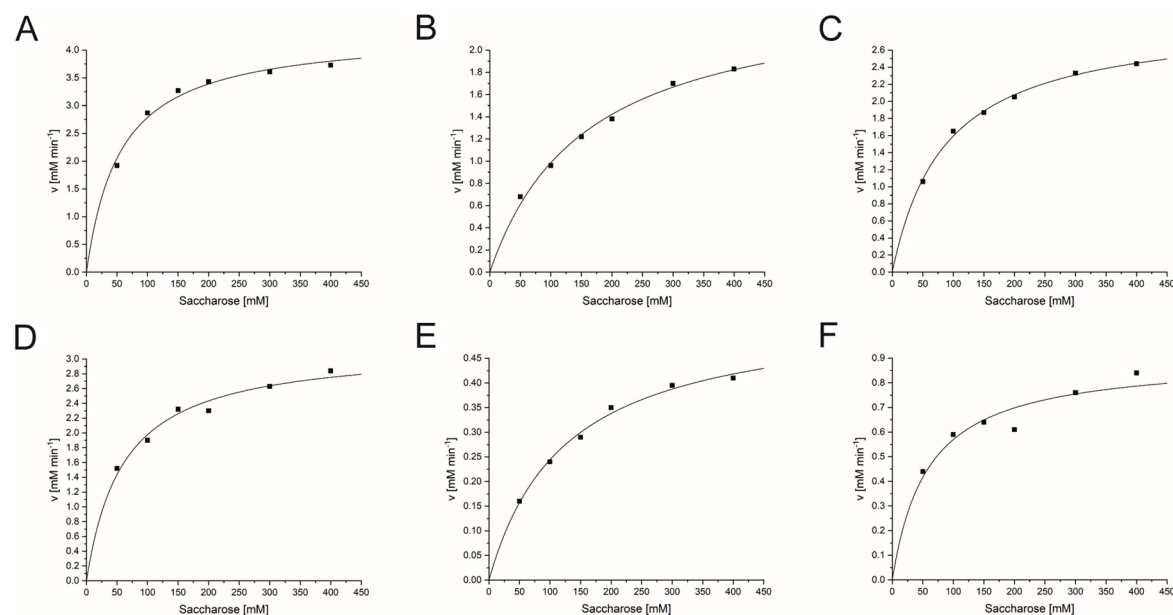
**Tabelle 18:** Auflistung Analyse der kinetischen Parameter von PadU, SmuA\* und dessen besten Varianten aus den vorangegangenen Kombinationen. Angegeben sind die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$ .

Variante	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
SmuA*	55,3	965	17,5
PadU	157	567	3,6
Y219L	86,6	665	7,7
<b>Y219L/D398G</b>	<b>60,2</b>	<b>708</b>	<b>11,8</b>
Q181P/D398G/F453Y	124	122	1,0
Y219L/T369F/D398G/F453Y	58,2	201	3,5

Für die beste Einzelmutante Y219L wurde ein im Vergleich zu SmuA\* erhöhter  $K_M$ -Wert in Höhe von 86,6 mM gemessen, zudem eine 42 %-ige Reduktion des  $k_{cat}$ -Werts auf 665 s<sup>-1</sup>. Der Quotient aus  $k_{cat}$  und  $K_M$  betrug in diesem Fall 7,7 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Mit der zusätzlichen Mutation D398G wurde in dieser Arbeit die beste Doppelmutante generiert. Diese wies einen ähnlichen  $K_M$ -Wert auf wie SmuA\* (60,2 mM), zusammen mit einer Wechselzahl von 708 s<sup>-1</sup> und einer im Vergleich zu Y219L höheren katalytischen Effizienz von 11,8 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Die beste gefundene Tripelmutante Q181P/D398G/F453Y zeigte einen erhöhten  $K_M$ -Wert von 124 mM und den niedrigsten  $k_{cat}$  aller Varianten ( $122 \text{ s}^{-1}$ ), was einer katalytischen Effizienz von nur  $0,99 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entsprach. Für die beste Vierfachmutante Y219L/T369F/D398G/F453Y dagegen wurde eine Michaelis-Konstante von 58,2 mM, eine Wechselzahl von  $201 \text{ s}^{-1}$  und eine katalytische Effizienz von  $3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt.

Mit einer 4,8-fach höheren katalytischen Aktivität gegenüber PadU erwies sich SmuA\* als das katalytisch schnellere Enzym. Die besten Dreifach- und Vierfachmutanten produzierten zwar weniger Trehalulose, jedoch führten die eingeführten Substitutionen zu teils erheblichen Verlusten der katalytischen Effizienz. Einen Kompromiss zwischen effizienter Isomerisierung von Saccharose und einer möglichst geringen prozentualen Ausbeute an Trehalulose hat dagegen die Doppelvariante Y219L/D398G, welche als die Varianten mit den günstigsten Eigenschaften aus dieser Mutagenesestudie hervorging.



**Abbildung 32:** Michaelis-Menten Kinetiken für die Produktion von Isomaltulose durch SmuA, dessen besten Mutanten sowie zum Vergleich PadU. (A) SmuA\*. (B) PadU. (C) SmuA(Y219L). (D) SmuA(Y219L/D398G). (E) SmuA(Q181P/D398G/F453Y). (F) SmuA(Y219L/T369F/D398G/F453Y). Die Michaelis-Konstante ( $K_M$ ), die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) wurden für Isomaltulose bestimmt, anhand von Messungen bei Saccharose-Konzentrationen in Höhe von 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM in einem Reaktionsvolumen von 2 mL. 500  $\mu\text{L}$  Proben wurden nach 10 min, 20 min, 30 min und 40 min entnommen und die Reaktion durch Erhitzen bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min gestoppt. Um die initialen Geschwindigkeiten bei diesen Substratkonzentrationen zu bestimmen, wurde die Isomaltulose-Ausbeute jeweils mittels HPLC analysiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgerade entsprach der Anfangsgeschwindigkeit. Die Messergebnisse wurden mit Origin anhand der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet.

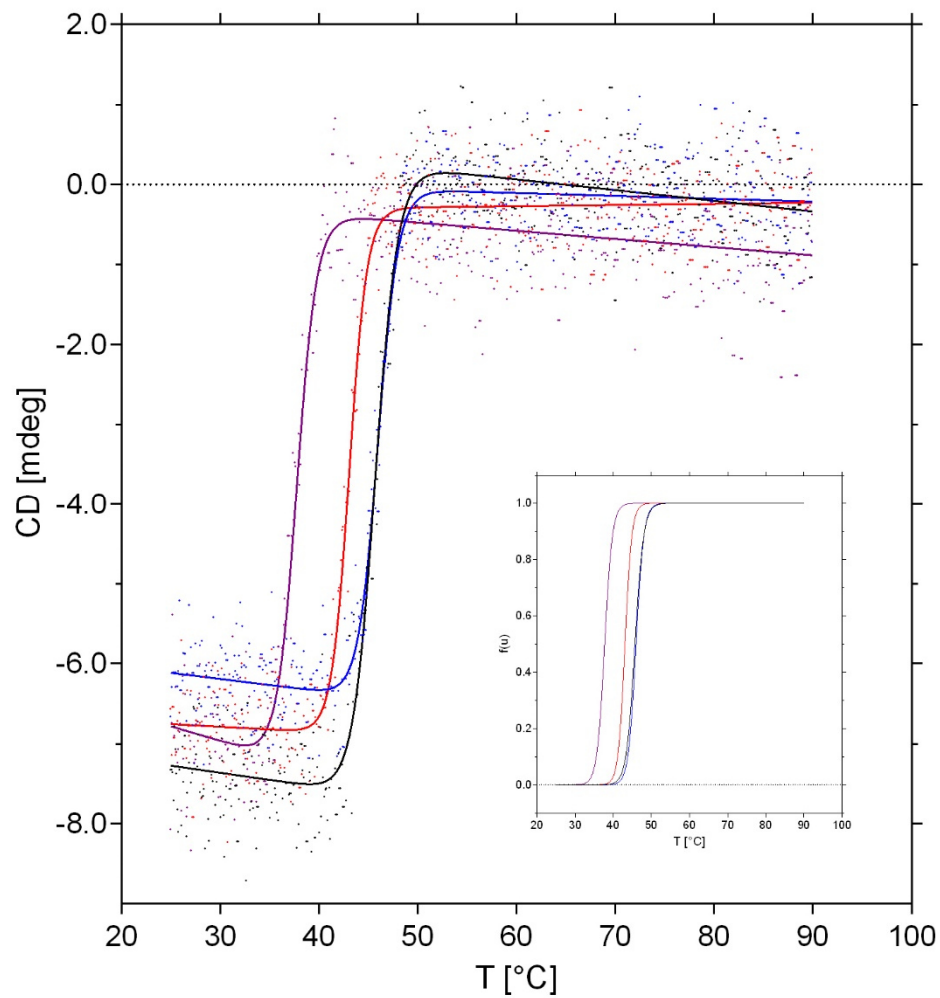
### 3.4.7 Analyse der Thermostabilität ausgewählter SmuA-Mutanten

Zur Einschätzung der industriellen Anwendbarkeit der generierten Mutanten wurden die vielversprechendsten Varianten von SmuA in Bezug auf ihre Thermostabilität untersucht mit dem Ziel, den Einfluss der eingeführten Aminosäureaustausche zu bestimmen. Für diese Faltungsstudien wurde das CD Signal bei 210 nm des Wildtyp-Enzyms SmuA mit SmuA(V465E), SmuA(Y219L/D398G/V465E) und SmuA(Y219L/T369F/D398G/F453Y/V465E) verglichen. Dabei zeigten SmuA und SmuA(V465E), bekannt als SmuA\*, nahezu identische  $T_m$ -Werte von jeweils 45,7 und 46,0 °C.

Die Einführung der zusätzlichen Mutationen Y219L und D398G resultierten bei der Dreifachmutante in einer niedrigeren Schmelztemperatur von 43,0 °C. Dagegen fiel dieser Wert im Fall der Fünffachmutante Y219L/T369F/D398G/F453Y/V465E auf 37,7 °C (Abb. 33 und Tabelle 19). Die Kooperativität der Entfaltung ( $\Delta H_m$ ) lag im Bereich von 750 bis 927 kJ/mol für alle Varianten. Dieses Experiment bestätigte die Eigenschaft der Tripelmutante Y219L/D398G/V465E als vielversprechendem Kandidaten für die industrielle Nutzung, in Gesamtschau der zuvor beschriebenen katalytischen Effizienz in Höhe von 11,8 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (siehe Abschnitt 3.4.6), der effizienten Produktion in *E. coli* und einer Schmelztemperatur weit über dem industriell geplanten Temperaturbereich von 20 bis 25 °C.

**Tabelle 19:** Schmelztemperaturen und Stabilitätsparameter von SmuA und ausgewählten Mutanten, abgeleitet von CD Entfaltungskurven (Abb. 33).

	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [kJ/mol]	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$ [kJ/mol]
SmuA	45,7 ± 0,05	750 ± 30,0	48,6 ± 1,9
SmuA(V465E)	46,0 ± 0,05	842 ± 39,9	55,3 ± 2,6
SmuA(Y219L/D398G/V465E)	43,0 ± 0,05	927 ± 44,7	52,9 ± 2,5
SmuA(Y219L/T369F/D398G/F453Y/V465E)	37,7 ± 0,06	794 ± 41,2	32,4 ± 1,7



**Abbildung 33:** CD-Schmelzkurven der vielversprechendsten Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym SmuA (schwarz), SmuA(V465E) in blau, SmuA(Y219L/D398G/V465E) in rot und SmuA(Y219L/T369F/D398G/F453Y/V465E) in violett. Dazu wurden Proteinlösungen (1,5  $\mu$ M) von SmuA und den Varianten in thermostatisierten Küvetten gefüllt und mit einem Teflon Deckel verschlossen. Die Proben wurden von 25 °C auf 90 °C erhitzt bei einem konstanten Temperaturgradient von 60 K/h. Das CD-Signal bei 210 nm wurde gegen die Temperatur aufgetragen. Die eingesetzte Grafik stellt die normalisierten Kurven der *Fraction Unfolded*  $f(u)$  gegen die Temperatur dar (mit identischer Farbgebung).

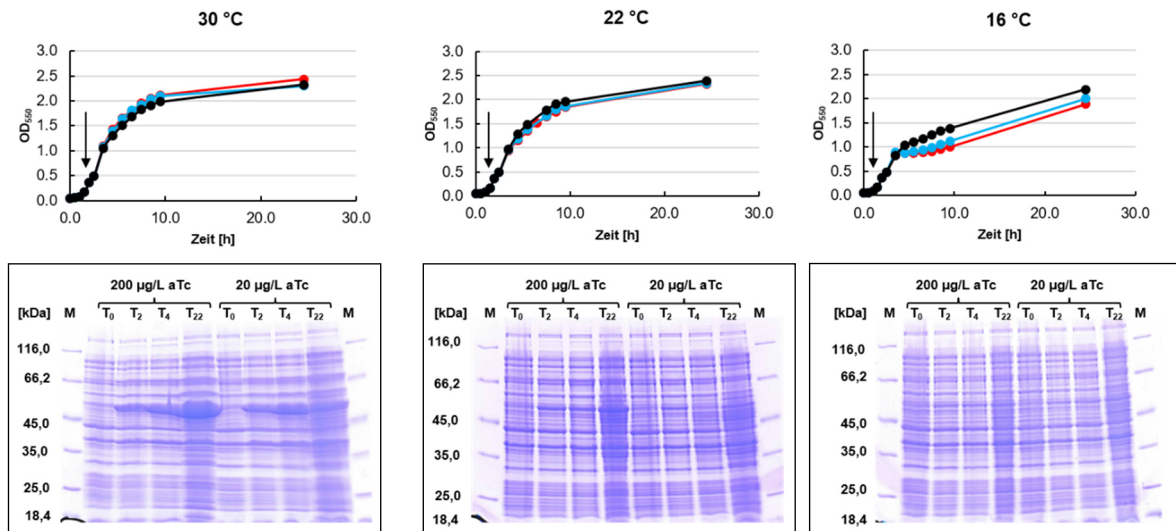
## 3.5 Reinigung und Charakterisierung mikrobieller Acetaldehyd-Dehydrogenasen

### 3.5.1 Biotechnologische Produktion von L-Lysin

Das Konzept des Ganzzellkatalysators basierend auf *E. coli* zur biotechnologischen Produktion von L-Lysin beinhaltete die beiden Dehydrogenasen CgADH und CgALDH, welche Ethanol zu Acetaldehyd und anschließend zu Acetat umsetzen. Diese Enzyme beheben jedoch aufgrund ihrer Kofaktorspezifität nicht den Umstand, dass das für die Synthese von L-Lysin essentielle NADPH in der Zelle nicht ausreichend zur Verfügung steht. Eine Lösung dafür bestand im Austausch der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Dehydrogenasen gegen NADP<sup>+</sup>-spezifische Enzyme. Dazu wurde die von Ho & Weiner (2005) beschriebene Acetaldehyd-Dehydrogenase EcALDH ausgewählt. Neben den niedrigen K<sub>M</sub>-Werten für NADP (65 µM) und Ethanol (3,5 µM) bestand ein weiterer Vorteil darin, dass es sich bei diesem Enzym um ein natürlicherweise in *E. coli* vorkommendes Protein handelte, welches jedoch vorzugsweise in der frühen stationären Wachstumsphase exprimiert wird (Ho and Weiner, 2005).

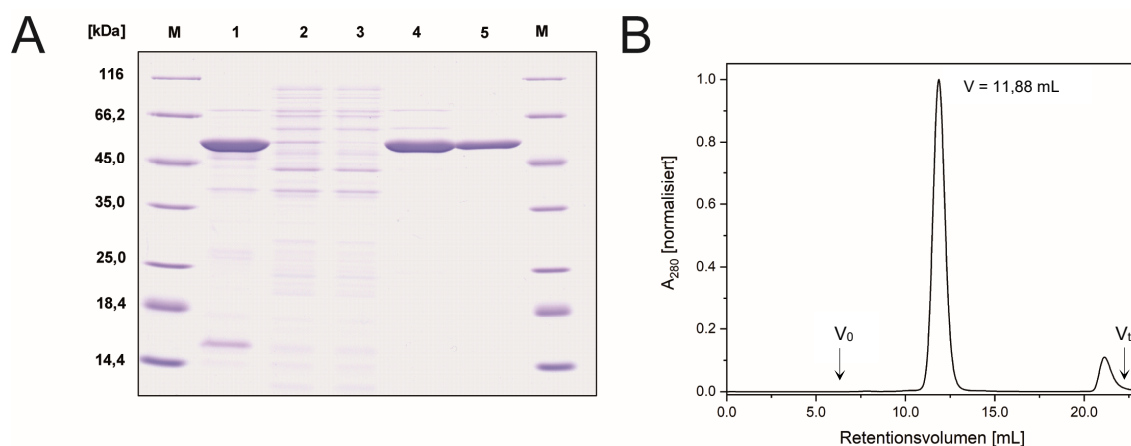
### 3.5.2 Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von CgALDH

Die codonoptimierte DNA-Sequenz von CgALDH (UniProt ID: Q8NLZ0) wurde vom Kooperationspartner Evonik Industries kloniert und auf dem Expressionsvektor AH-p-125 zur Verfügung gestellt. Für die Biosynthese in *E. coli* und anschließende Affinitätsreinigung wurden mittels geeigneter PCR Primer Schnittstellen für *KasI* (5') sowie *HindIII* (3') angefügt. Über diese Schnittstellen wurde das CgALDH-Strukturgen auf dem bakteriellen Genexpressionsvektor pASK-IBA5(+) kloniert, welcher für ein N-terminales *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra, 2007) kodierte. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit Hilfe des Tetracyclin-Promotors/Operators (Skerra, 1994). Für die Proteinproduktion wurde der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet, welcher nach Induktion der Genexpression für 3 h bei 30 °C inkubiert wurde. Diese optimierten Parameter wurden mittels einer Genexpressionsstudie ermittelt, die die Untersuchung verschiedener Induktorkonzentrationen von 20 µg/L aTc und 200 µg/L aTc bei 16, 22 und 30 °C beinhaltete (Abb. 34). Dabei wurde das stärkste bakterielle Wachstum und die höchste Proteinausbeute bei 30 °C und 200 µg/L aTc ermittelt. Zudem konnte keine maßgebliche Reduktion des bakteriellen Wachstums nach Zugabe des Induktors beobachtet werden. Analog zum cytoplasmatisch exprimierten Enzym SmuA erfolgte der Aufschluss des Zellpellets mittels French Press, gefolgt von einer Streptavidin-Affinitätschromatographie. Den Abschluss der Reinigung bildete die Größenausschluss-chromatographie an einer präparativen Superdex S200 Säule.



**Abbildung 34:** Genexpressionsstudie für CgALDH in *E. coli* BL21. Die gentechnische Produktion der mikrobiellen Acetaldehyd-Dehydrogenase erfolgte im Stamm BL21 mit Hilfe des Vektors pASK-IBA5(+). Nach dreistündiger Inkubation der Hauptkultur erfolgte die Zugabe verschiedener Induktorkonzentrationen: rot = 200 µg/L aTc, blau = 20 µg/L aTc, schwarz = 0 µg/L. Des Weiteren wurde der Einfluss der Temperatur (16 °C, 22 °C und 30 °C) nach Zugabe des Induktors untersucht. Eine Probenentnahme erfolgte nach 0, 2, 4 und 22 Stunden. Der Zeitpunkt der Induktion wurde mit einem schwarzen Pfeil verbildlicht.

Gemäß den Literaturangaben sollte überprüft werden, ob CgALDH tatsächlich als Homotetramer vorliegt. Zunächst konnte mittels SDS-PAGE im Gesamtzellextrakt eine Bande bei 56 kDa beobachtet werden (Abb. 34). Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde durch SEC eine apparente molekulare Masse von 225 kDa ermittelt (Abb. 35), was exakt dem Vierfachen eines CgALDH-Monomers entsprach. Demnach lag das rekombinante Enzym erwartungsgemäß als Homotetramer vor, der typischen Quartärstruktur von Alkohol- und Acetaldehyddehydrogenasen (Arndt *et al.*, 2008). Die Etablierung dieser effizienten Produktions- und Reinigungsstrategie erlaubte im Anschluss die Untersuchung der enzymkinetischen Parameter.

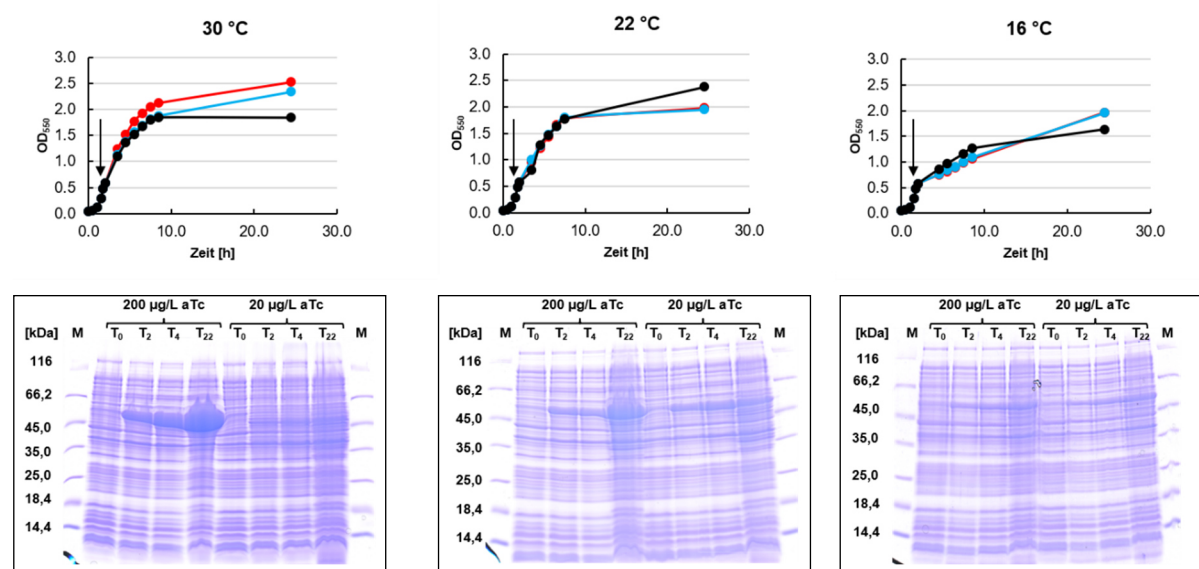


**Abbildung 35:** SDS-PAGE und SEC-Profil von CgALDH nach cytoplasmatischer Produktion in *E. coli*. (A) SDS-PAGE der Produktion und Reinigung von rekombinantem CgALDH. M = Größenstandard; 1 = Zellextrakt von *E. coli* BL21 mit pASK-IBA5(+)-CgALDH nach French Press; 2 = Überstand nach French Press; 3 = Durchfluss der SAC; 4 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SAC; 5 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SEC. (B) SEC Elutionsprofil von CgALDH an einer analytischen Superdex S200 Säule nach vorhergehender SAC-Reinigung. Die Kalibrierung der Säule erfolgte gemäß Abschnitt 2.4.1.



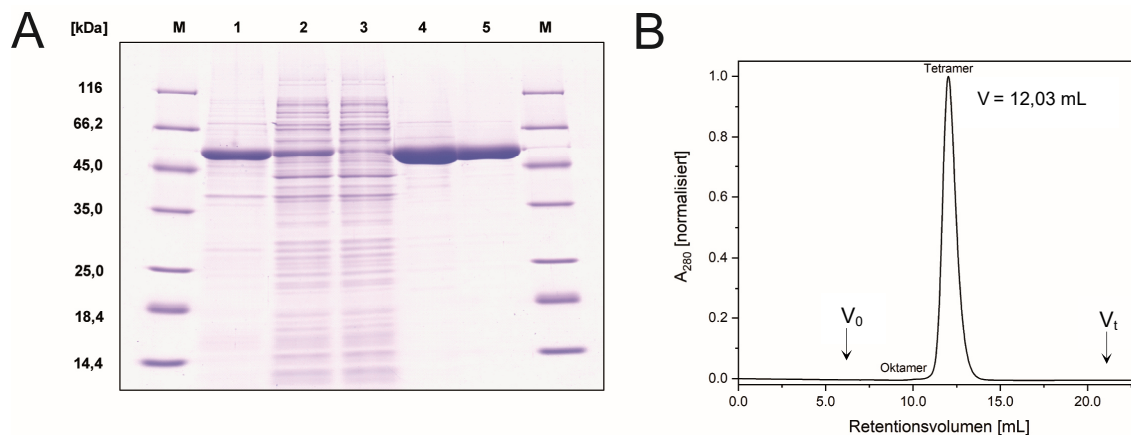
### 3.5.3 Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von EcALDH

Das von Xu & Johnson (1995) charakterisierte Gen *aldB* codiert für ein 56,3 kDa großes Protein, welches aus 512 Aminosäuren besteht (UniProt ID: P37685) und auf der physikalischen Karte von *E. coli* DH5 $\alpha$  bei 3776 kb zu finden ist. Da hier *E. coli* als natürlicher Wirtsorganismus der EcALDH auch als Biokatalysator für die Produktion von L-Lysin fungieren soll, wurde auf eine codonoptimierte Gensynthese von *aldB* verzichtet. Für die Genexpression in *E. coli* BL21 mit anschließender Affinitätsreinigung wurden durch eine genomische PCR aus *E. coli* DH5 $\alpha$  mit Hilfe flankierender Primer Schnittstellen für *KasI* (5') sowie *HindIII* (3') angefügt. Analog zu CgALDH wurde das EcALDH-Strukturgen über diese Schnittstellen auf dem bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA5(+) kloniert, welcher die Biosynthese des Proteins mit dem N-terminalen *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra, 2007) ermöglichte. In der nachfolgenden Sequenzanalyse konnten keine Differenzen zwischen der publizierten Sequenz (Gene ID: 948104) und der in dieser Arbeit aus *E. coli* DH5 $\alpha$  (Stammsammlung von Herrn Professor Skerra) festgestellt werden. Die Induktion der Genexpression erfolgte wiederum mit Hilfe des Tetracyclin-Promotors/Operators (Skerra, 1994). Für die Proteinproduktion wurde nicht der vorwiegend für Klonierungen ausgelegte *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  eingesetzt, sondern *E. coli* BL21, welcher nach Induktion der Genexpression für 3 h bei 30 °C inkubiert wurde. Erneut wurden die Genexpressionsbedingungen optimiert. Auch in diesem Fall wurde das stärkste bakterielle Wachstum und die höchste Proteinausbeute bei 30 °C und 200  $\mu\text{g/L}$  aTc beobachtet. Erwartungsgemäß beeinflusste weder die Zugabe des Induktors noch die Genexpression der EcALDH das bakterielle Wachstum, da dieses Enzym ohnehin (in geringeren Mengen) in der frühen stationären Phase des bakteriellen Wachstums exprimiert wird, was eine mögliche Toxizität ausschließt.



**Abbildung 36:** Genexpressionsstudie für EcALDH in *E. coli* BL21. Die rekombinante Produktion der mikrobiellen Acetaldehyd-Dehydrogenase erfolgte im Stamm BL21 mit Hilfe des Expressionsvektors pASK-IBA5(+). Nach dreistündiger Inkubation der Hauptkultur erfolgte die Zugabe verschiedener Induktorkonzentrationen: rot = 200  $\mu\text{g/L}$  aTc, blau = 20  $\mu\text{g/L}$  aTc, schwarz = 0  $\mu\text{g/L}$ . Des Weiteren wurde der Einfluss der Temperaturen 16 °C, 22 °C und 30 °C nach Zugabe des Induktors untersucht. Eine Probenentnahme erfolgte nach 0, 2, 4 und 22 Stunden. Erwartete Bandengröße: 56 kDa. Der Zeitpunkt der Induktion wurde mit einem schwarzen Pfeil verbildlicht.

Im ersten Schritt bestätigte die SDS-PAGE die berechnete molekulare Masse eines EcALDH-Monomers in Höhe von 57,5 kDa (Abb. 36). Anschließend galt es den Oligomerisierungszustand des mittels SEC zur Homogenität gereinigten EcALDHs zu bestimmen. Dazu wurde ein Teil der vereinigten Fraktionen mit Hilfe einer analytischen S200 Säule aufgetrennt. Dadurch wurde eine apparente molekulare Masse von 209 kDa ermittelt (Abb. 37) und damit nur 21 kDa Abweichung von der berechneten Masse (230 kDa) eines EcALDH-Tetramers. Erwartungsgemäß lag EcALDH somit vorwiegend als Homotetramer vor (Ho and Weiner, 2005). Zusätzlich wurde ein weiterer kleinerer Peak in der analytischen SEC detektiert, welcher dem EcALDH-Oktamer zuzuordnen war. Dabei wich die apparente molekulare Masse um 26 kDa bzw. 9,5 % von der berechneten Masse des Oktamers (460 kDa) ab.



**Abbildung 37:** SDS-PAGE und SEC-Profil von EcALDH nach cytoplasmatischer Genexpression. (A) SDS-PAGE der Produktion und Reinigung von rekombinantem EcALDH. M = Größenstandard; 1 = Zellextrakt von *E. coli* BL21 mit pASK-IBA5(+)-EcALDH nach French Press; 2 = Überstand nach French Press; 3 = Durchfluss der SAC; 4 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SAC; 5 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SEC. (B) SEC Elutionsprofil von EcALDH nach vorhergehender SAC-Reinigung an einer analytischen Superdex 200 Säule. Die Kalibrierung der Säule erfolgte gemäß Abschnitt 2.4.1.

### 3.5.4 Enzymkinetische Parameter von CgALDH und EcALDH

Aufgrund ihrer Eigenschaft, neben Acetaldehyd als bevorzugtem Substrat auch Chloracetaldehyd, Propionaldehyd und Benzaldehyd umzusetzen, ist die Acetaldehyd-Dehydrogenase EcALDH nicht als substratspezifisch einzustufen. Zudem ist ein Anstieg der enzymatischen Aktivität durch Zugabe von 0,5 - 2 % Ethanol in der Literatur beschrieben (Ho and Weiner, 2005). EcALDH weist eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 62 % mit CgALDH auf, nutzt aber im Gegensatz dazu NADP<sup>+</sup> als Kofaktor. Mit NAD<sup>+</sup> als Kofaktor wird von EcALDH nur 1 % der Aktivität erreicht, welche mit NADP<sup>+</sup> möglich ist. Interessanterweise zeigt EcALDH zahlreiche Gemeinsamkeiten mit der mitochondrialen Leber-ALDH2 des Menschen: beide liegen als Homotetramer vor, haben eine stärkere Präferenz für Acetaldehyd als CgALDH und zeigen höhere enzymatische Aktivität in Gegenwart von Magnesiumionen. Des Weiteren sind Ähnlichkeiten in der Coenzym-Binderegion und im aktiven Zentrum festzustellen (Ho and Weiner, 2005).

Für die mittels SEC gereinigten Enzyme CgALDH und EcALDH wurden die enzymkinetischen Parameter gegenüber dem Substrat Acetaldehyd bestimmt (Abb. 38).

**Tabelle 20:** Analyse der kinetischen Parameter von CgALDH und EcALDH. Dargestellt sind die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$ . n.d. = nicht detektiert.

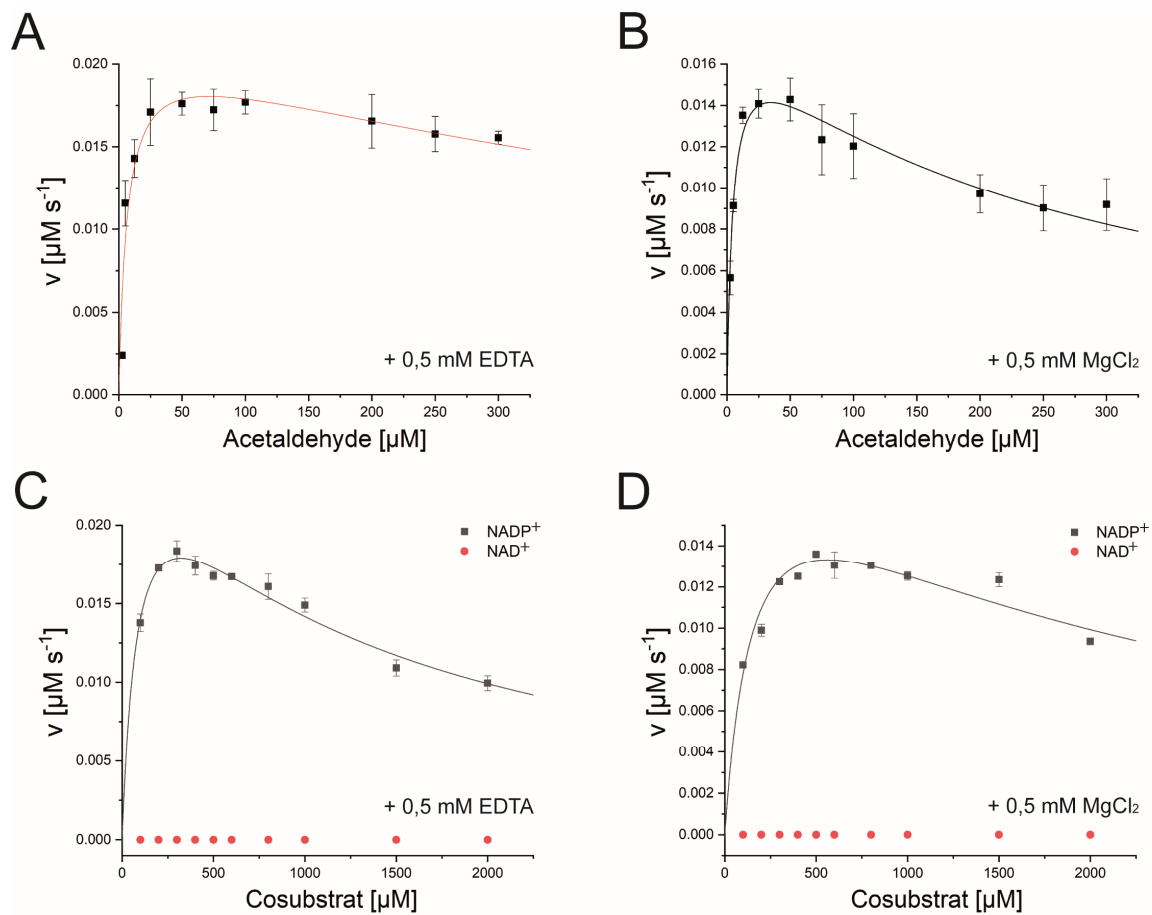
Variante	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>CgALDH</b>				
Acetaldehyd ( $\text{NAD}^+$ )	10,3	2,1	0,20	
$\text{NAD}^+$	34,4	2,0	0,06	
$\text{NADP}^+$	21.331	3,1	$1,5 \times 10^{-4}$	
<b>EcALDH</b>				
Acetaldehyd + EDTA ( $\text{NADP}^+$ )	6,6	0,21	$3,2 \times 10^{-2}$	770
Acetaldehyd + $\text{MgCl}_2$	4,7	0,18	$3,8 \times 10^{-2}$	258
$\text{NADP}^+$ + EDTA	92,3	0,14	$1,5 \times 10^{-3}$	1.107
$\text{NADP}^+$ + $\text{MgCl}_2$	166	0,11	$6,6 \times 10^{-4}$	1.896
$\text{NAD}^+$	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Ähnlich den in der Literatur beschriebenen Werten wies CgALDH einen  $K_M$ -Wert für Acetaldehyd von 10,3  $\mu\text{M}$  und  $k_{cat}$  in Höhe von 2,1  $\text{s}^{-1}$  auf, was einer katalytischen Effizienz von 0,2  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  entspricht (Arndt *et al.*, 2008). Erwartungsgemäß betrug der  $k_{cat}$ -Wert für  $\text{NAD}^+$  als Substrat bei einem Überschuss an Acetaldehyd 2,0  $\text{s}^{-1}$ , zusammen mit einem  $K_M$ -Wert in Höhe von 34,4  $\mu\text{M}$  und einer daraus resultierenden katalytischen Effizienz von 0,06  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Um die Katalyse von Acetaldehyd zu Acetat mit  $\text{NADP}^+$  als Cosubstrat detektieren zu können, musste die Konzentration dieses Cosubstrats deutlich erhöht werden, um letztendlich den um den Faktor 640 höhere  $K_M$  Wert von 21,3 mM zu bestimmen. Aufgrund der Wechselzahl von 3,1  $\text{s}^{-1}$  und der katalytischen Effizienz von nur  $1,5 \times 10^{-4}$  bezüglich  $\text{NADP}^+$  (Tabelle 20), wurde  $\text{NAD}^+$  den Vorzug in der Wahl des Kofaktors gegeben. In dieser Hinsicht wäre ein Kofaktor-Engineering, mit dem Ziel eines  $K_M$ -Werts für  $\text{NADP}^+$  im mikromolaren Bereich, zwar möglich, aber von einem erheblichen Aufwand verbunden.

Eine nahegelegene Alternative bot dagegen die Acetaldehyd-Dehydrogenase EcALDH in ihrer natürlichen Form. Mit einem niedrigen  $K_M$ -Wert für  $\text{NADP}^+$  von 92,3  $\mu\text{M}$ , einem akzeptablen  $k_{cat}$  in Höhe von 0,14  $\text{s}^{-1}$  und einer katalytischen Effizienz von  $1,5 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  erfüllte EcALDH ohne weitere Aminosäureaustausche das gewünschte Anforderungsprofil. Ergänzt wurde dies durch einen überraschend niedrigen  $K_M$ -Wert für Acetaldehyd von 6,6  $\mu\text{M}$ , bei einem  $k_{cat}$  von 0,21  $\text{s}^{-1}$  und einer sich ergebenden katalytischen Effizienz von  $3,2 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Zudem konnte mit  $\text{NAD}^+$  als Cosubstrat selbst im höheren millimolaren Bereich keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Das Phänomen der Substratinhibierung war sowohl für  $\text{NADP}^+$  ( $K_I = 1.107 \mu\text{M}$ ) als auch für Acetaldehyd

( $K_1 = 770 \mu\text{M}$ ) zu beobachten, jedoch im Ausmaß nicht nachteilig für eine effiziente Umsetzung von Acetaldehyd zu Acetat im Gesamtzellkatalysator *E. coli* (Abb. 38).

Die Bestimmung der genannten Werte fand unter Zugabe von EDTA statt, da laut Literatur die Anwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  die Substrataffinität beeinflusst (Ho and Weiner, 2005). Dies konnte in dieser Studie bestätigt werden. So verringerte die Zugabe von  $0,5 \text{ mM MgCl}_2$  die Michaelis-Konstante für Acetaldehyd von  $6,6$  auf  $4,7 \mu\text{M}$  und erhöhte jene für  $\text{NADP}^+$  von  $92,6$  auf  $166 \mu\text{M}$ . Dies resultierte in Wechselzahlen von  $0,18$  bzw.  $0,11 \text{ s}^{-1}$  und katalytischen Effizienzen von  $3,8 \times 10^{-2}$  bzw.  $6,6 \times 10^{-4}$  (Tabelle 20, Abb. 38).



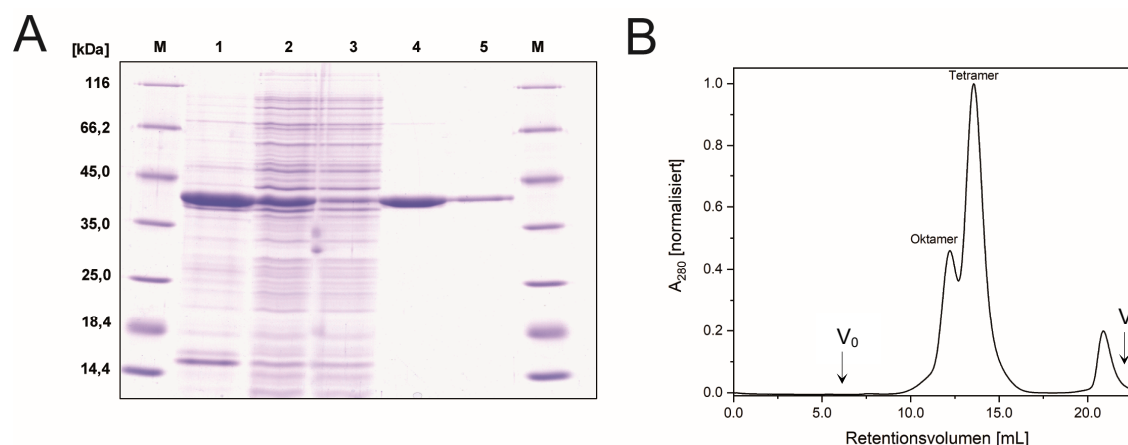
**Abbildung 38:** Michaelis-Menten Kinetiken für EcALDH gegenüber Acetaldehyd und  $\text{NADP}^+$ . (A) Substrat Acetaldehyd mit  $0,5 \text{ mM EDTA}$ . (B) Substrat Acetaldehyd mit  $0,5 \text{ mM MgCl}_2$ . (C) Substrat  $\text{NADP}^+$  mit  $0,5 \text{ mM EDTA}$ . (D) Substrat  $\text{NADP}^+$  mit  $0,5 \text{ mM MgCl}_2$ . Abhängig von der Assay-Variante wurde  $0,01$  bis  $5 \mu\text{M}$  Enzym eingesetzt und entweder Acetaldehyd oder das Cosubstrat ( $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ) im Überschuss zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von  $50 \mu\text{L}$  des jeweiligen Substrats (Stammlösung in fünffacher Konzentration gegenüber der Endkonzentration) zu  $200 \mu\text{L}$  der vorbereiteten Enzymlösung. Die Absorption wurde kontinuierlich bei  $340 \text{ nm}$  und  $25 \text{ }^\circ\text{C}$   $10 \text{ min}$  gemessen, um die Bildung von  $\text{NAD(P)H}$  aus der Oxidationsreaktion zu verfolgen.

### 3.6 Die Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus *Entamoeba histolytica*

Das *Engineering* einer Dehydrogenase hinsichtlich geänderter Kofaktor-Spezifität von NADP<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup>, oder umgekehrt, stellt im Allgemeinen eine Möglichkeit dar, einen Reaktionspfad dem zuvor aufgestellten Anforderungsprofil entsprechend zu optimieren. In dieser Arbeit bestand das Ziel darin den Ganzzellkatalysator *E. coli* mit ausreichend NADPH zu versorgen, um die Lysin-Produktion zu steigern. Allerdings birgt jeder Eingriff in die Kofaktorbindestelle auch das Risiko einer Verminderung der enzymatischen Aktivität (Lerchner *et al.*, 2016). Die weitaus einfachere Lösung besteht im Austausch des entsprechenden Enzyms durch eines mit der benötigten Spezifität. Dazu ist es allerdings nötig, vielversprechende Kandidaten entweder durch Screening von Genomen bzw. Proteomen zu identifizieren oder in der Literatur fündig zu werden. Letzteres konnte durch die Identifikation der EcALDH hinsichtlich der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Katalyse von Acetaldehyd zu Acetat verwirklicht werden. Bereits dieser Eingriff in das gegenwärtige Konzept des Gesamtzellkatalysators sollte, aufgrund der erhöhten intrazellulären Konzentration an NADPH, einen Anstieg der Ausbeute an L-Lysin zur Folge haben (Abb. 7). Um diesen Effekt noch weiter zu verstärken, wurde im Anschluss der Fokus auf den zuvor geschalteten Schritt im Gesamtreaktionspfad gelegt: die NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd durch die Alkoholdehydrogenase CgADH aus *Corynebacterium glutamicum* (Arndt *et al.*, 2008).

#### 3.6.1 Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von CgADH

Bei dieser Alkoholdehydrogenase handelt es sich um ein 37 kDa Protein, zusammengesetzt aus 344 Aminosäuren. Zum ersten Mal in der Literatur beschrieben wurde es von Arndt im Jahre 2008, jedoch weder kloniert noch in rekombinanter Form produziert. Die beschriebenen Aktivitätsassays fanden lediglich durch Zugabe von zellfreien Rohextrakten aus dem natürlichen Wirtsorganismus *C. glutamicum* statt. Dabei wurden  $K_M$ -Werte für Ethanol von 160  $\mu$ M und für NAD<sup>+</sup> von 250  $\mu$ M ermittelt, während keine enzymatische Aktivität mit NADP<sup>+</sup> als Cosubstrat beobachtet wurde (Arndt *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gen für die codonoptimierte DNA-Sequenz von CgADH (UniProt ID: Q8NLX9) vom Kooperationspartner Evonik Industries auf dem Expressionsvektor AH-p-125 zur Verfügung gestellt. Für die Genexpression in *E. coli* mit anschließender Affinitätsreinigung wurden zunächst durch PCR die Schnittstellen für *KasI* (5') sowie *HindIII* (3') angefügt. Über diese Schnittstellen wurde das CgADH-Strukturgen auf dem bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA5(+) subkloniert, welcher die kodierende Region für ein N-terminales *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra, 2007) trug. Die Induktion der Genexpression erfolgt wie auch sonst in dieser Arbeit mit Hilfe des Tetracyclin-Promotor/Operators (Skerra, 1994). Für die Proteinproduktion wurde der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet, welcher nach Induktion der Genexpression für 3 h bei 30 °C inkubiert wurde. Dem Aufschluss des Zellsedimente mittels French Press folgte eine Streptavidin-Affinitätschromatographie und eine Größenausschlusschromatographie.



**Abbildung 39:** SDS-PAGE und SEC-Profil von CgADH nach cytoplasmatischer Produktion in *E. coli*. (A) SDS-PAGE der Produktion und Reinigung von rekombinantem CgADH. M = Größenstandard; 1 = Zellpellet von *E. coli* BL21 mit pASK-IBA5(+)-CgADH nach French Press; 2 = Überstand nach French Press; 3 = Durchfluss der SAC; 4 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SAC; 5 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SEC. (B) SEC von CgADH an einer analytischen Superdex S200 Säule nach vorhergehender SAC-Reinigung.

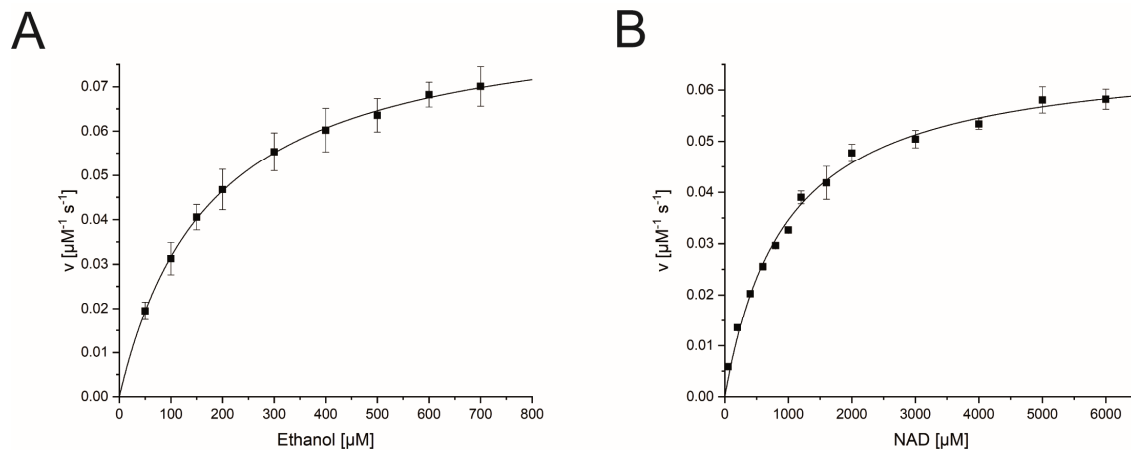
Zur Überprüfung des Oligomerisierungszustandes wurde ein Teil der vereinigten Fraktionen der SAC mit Hilfe einer analytischen S200-Säule analysiert. Die entsprechende SDS-PAGE (Abb. 39 A) zeigte die berechnete molekulare Masse eines CgADH-Monomers von 38,0 kDa. Mittels SEC wurden sowohl Tetramer als auch Oktamer detektiert, im Einklang mit dem erwarteten typischen Oligomerisierungszustand für Alkohol- und Acetaldehyddehydrogenasen: überwiegend als Tetramer und anteilig als Oktamer (Ho and Weiner, 2005, Arndt *et al.*, 2008). Für die durch SEC gereinigte CgADH wurden anschließend die enzymkinetischen Parameter gegenüber Ethanol und dem Kofaktor  $\text{NAD}^+$  bestimmt (Abb. 40, Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Analyse der kinetischen Parameter von CgADH. Angegeben sind die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  und die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M$ . Zusätzlich die Literaturangaben basierend auf Messungen mit dem zellfreien Rohextrakt aus *C. glutamicum*. n.d. = nicht detektiert.

Variante	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
<b>CgADH in dieser Arbeit</b>			
Ethanol	175	1,8	0,01
$\text{NAD}^+$	957	0,68	$7,1 \times 10^{-4}$
$\text{NADP}^+$	n.d.	n.d.	n.d.
<b>CgADH in (Arndt <i>et al.</i>, 2008)</b>			
Ethanol	160	Nicht angegeben	Nicht angegeben
$\text{NAD}^+$	250	Nicht angegeben	Nicht angegeben
$\text{NADP}^+$	n.d.	n.d.	n.d.

Ähnlich zu den in der Literatur beschriebenen Werten wies CgADH einen  $K_M$ -Wert für Ethanol von 175  $\mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}$  von 1,8  $\text{s}^{-1}$  auf, was einer katalytischen Effizienz von 0,01  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  entsprach (Arndt *et al.*, 2008). Mit 957 mM lag der  $K_M$ -Wert für  $\text{NAD}^+$  über den Erwartungen, ebenso wie der  $k_{\text{cat}}$  von 0,68  $\text{s}^{-1}$

und die damit verbundene enzymatische Aktivität ( $7,1 \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Die Diskrepanz zwischen beiden Wechselzahlen ist vermutlich auf eine Substratinhibierung zurückzuführen, was jedoch nicht untersucht wurde. Hinsichtlich der Nutzung von  $\text{NADP}^+$  als Kofaktor war CgADH auch bei höheren Substrat- und Enzymkonzentrationen nicht in der Lage, die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd umzusetzen (Tabelle 21).



**Abbildung 40:** Michaelis-Menten Kinetiken für CgADH gegenüber Ethanol und  $\text{NAD}^+$ . (A) Variationen des Substrats Ethanol. (B) Variationen des Kosubstrats  $\text{NAD}^+$ . Abhängig von der Assayvariante wurde 0,01 bis 5  $\mu\text{M}$  Enzym eingesetzt und entweder Ethanol (1 mM) oder  $\text{NAD}^+$  (10 mM) im Überschuss zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Substrat oder Kosubstrat (Stammlösung in fünffacher Konzentration gegenüber der Endkonzentration) in 200  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Enzymlösung. Die Absorption wurde kontinuierlich bei 340 nm und 25 °C 10 min.

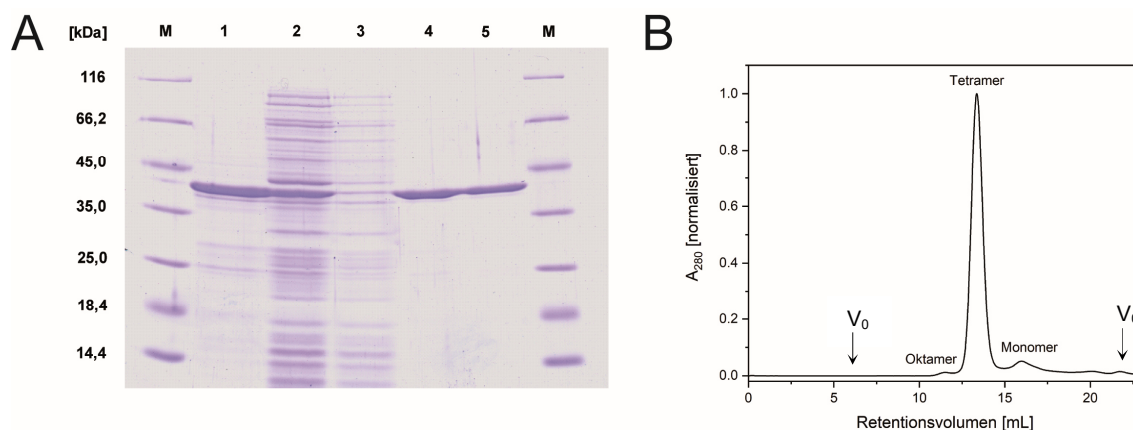
### 3.6.2 Gentechnische Herstellung und Charakterisierung von EhADH1 und EhADH3

Die Suche nach  $\text{NADP}^+$ -abhängigen Alkoholdehydrogenasen mit einer Präferenz für kurzkettinge Substrate gestaltete sich zu Beginn schwierig. Durch eine tiefgehende Literatursuche wurde eine Korrelation zwischen thermophilen Organismen und  $\text{NADP}^+$ -abhängigen Alkoholdehydrogenasen erkennbar. Beispielsweise ist die  $\text{NADP}^+$ -abhängige bifunktionelle Aldehyde-Alkohol-Dehydrogenase für die Ethanol-Produktion in *Thermoanaerobacter mathranii* zuständig, weist aber ein recht hohes Temperaturoptimum bei 70 °C auf (Yao and Mikkelsen, 2010). Auch die Butanol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* nutzt zwar ausschließlich  $\text{NADP}^+$ , wäre aber bezüglich der Substratspezifität und Temperaturspezifität zu optimieren gewesen (Korkhin *et al.*, 1998). Weitere Kandidaten waren die adhE aus *Clostridium thermocellum* und *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. In diesem Fall wäre nur ein Protein für die zweistufige Katalyse von Ethanol zu Acetaldehyd nötig gewesen; der Einsatz jedoch auf eine sauerstofffreie Atmosphäre limitiert (85 %  $\text{N}_2$ , 10 %  $\text{CO}_2$  und 5 %  $\text{H}_2$  und 55 °C), begründet durch die Sauerstoffsensitivität dieses bifunktionellen Enzyms. (Lo *et al.*, 2015).

Eine Alternative eröffneten die publizierten Studien über den Parasiten *Entamoeba histolytica*. Diese einzellige Amöbe aus der Familie der *Entamoebidae*, ist Hauptverursacher der Amöbenruhr, unter der

vorwiegend Menschen und andere Primaten leiden. Neben der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Acetaldehyd-Dehydrogenase EhALDH1 (Samuelson *et al.*, 1992) wurden noch zwei NADP<sup>+</sup>-abhängige Alkoholdehydrogenasen entdeckt: EhADH1 (Lo and Chang, 1982) und EhADH3 (Rodriguez *et al.*, 1996).

Bei EhADH1 handelt es sich um ein 39 kDa Protein aus 360 Aminosäuren. Im Jahr 1982 wurde dieses Enzym zum ersten Mal kloniert, exprimiert und charakterisiert (Lo and Chang, 1982) mit dem weiterführenden Ziel, einen potentiellen Inhibitor zu entwickeln. Durch Hemmung der von EhADH1 katalysierten anabolischen Reaktion sollte das mikrobielle Wachstum drastisch gebremst werden (Samuelson *et al.*, 1992, Kumar *et al.*, 1992). So wie die Mehrzahl der bekannten Alkoholdehydrogenasen, liegt auch dieses NADP<sup>+</sup>-abhängige Enzym in seiner biologisch aktiven Form als Homotetramer vor. Die dazugehörige Kristallstruktur (Abb. 8 A) wurde 2006 aufgeklärt und zeigt neben der Quartärstruktur auch die Bindung des katalytisch relevanten Zn<sup>2+</sup>-Kations in der Bindetasche (Shimon *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gen für die codonoptimierte Sequenz von EhADH1 (UniProt ID: P35630) in synthetischer Form geplant. Die nachfolgende Klonierung und Genexpression verlief analog zu CgADH (s. 3.6.1).



**Abbildung 41:** SDS-PAGE und SEC-Profil von EhADH1 nach cytoplasmatischer Produktion in *E. coli*. (A) SDS-PAGE der Produktion und Reinigung von rekombinantem EhADH1. M = Größenstandard; 1 = Zellpellet von *E. coli* BL21 mit pASK-IBA5(+)-EhADH1 nach French Press; 2 = Überstand nach French Press; 3 = Durchfluss der SAC; 4 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SAC; 5 = Vereinigte Elutionsfraktionen nach der SEC. (B) SEC Elutionsprofil von EhADH1 an einer analytischen Superdex S200 Säule nach vorhergehender SAC-Reinigung.

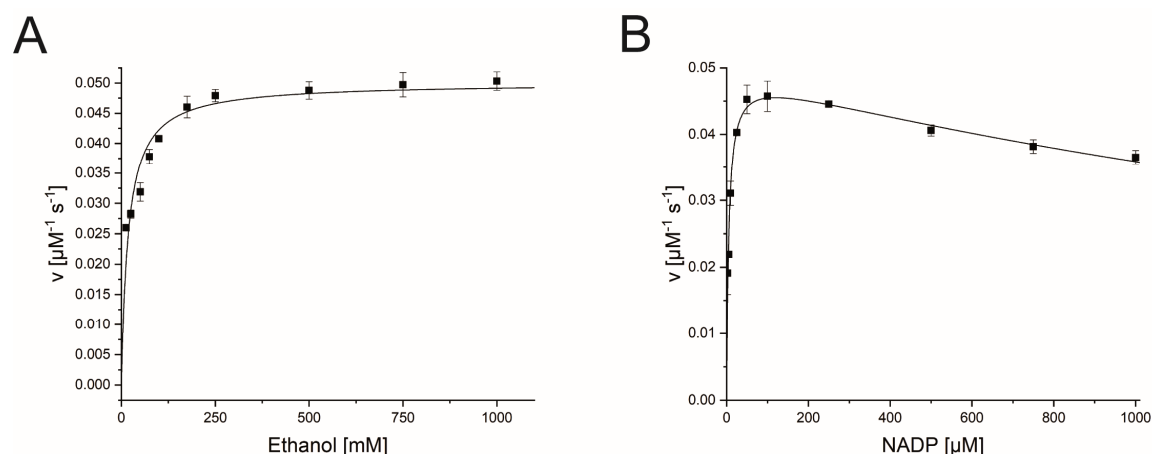
Zur Überprüfung, ob auch EhADH1 als Homotetramer vorlag, wurde ein Teil der vereinigten Fraktion aus der SAC mit Hilfe einer analytischen S200-Säule untersucht. Die nachfolgende SDS-PAGE zeigte die berechnete molekulare Masse des Monomers von 39,8 kDa (Abb. 41). Erwartungsgemäß bestätigte die analytische SEC die homotetramere Quartärstruktur, zeigte zum kleineren Teil jedoch auch Oktamer und Monomer im Elutionsprofil (Abb. 41 B).

Ähnlich den in der Literatur beschriebenen Werten wies EhADH1 einen  $K_M$ -Wert für Ethanol von 19,2 mM und einen  $k_{cat}$  von  $0,68 \text{ s}^{-1}$  sowie einer katalytischen Effizienz von  $3,5 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auf (Kumar *et al.*, 1992). Mit  $5,3 \mu\text{M}$  lag der  $K_M$ -Wert für NADP<sup>+</sup> unter den Erwartungen, ebenso wie der  $k_{cat}$  von  $0,92 \text{ s}^{-1}$  und die damit verbundene enzymatische Aktivität ( $0,17 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Abb. 42, Tabelle 22).



**Tabelle 22:** Analyse der kinetischen Parameter von CgADH und EhADH1. Angegeben sind die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$ . Als Sättigungskonzentrationen wurden 1 mM Ethanol und 200  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup> bzw. 10 mM NAD<sup>+</sup> eingesetzt. n.d. = nicht detektiert.

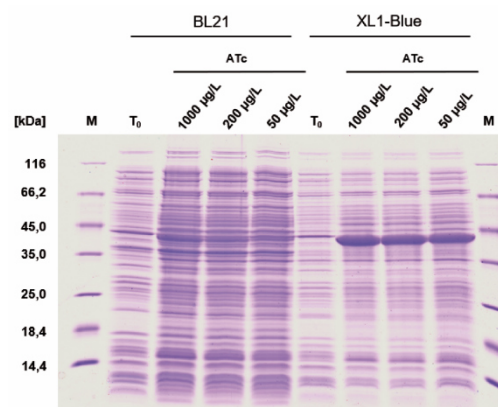
Variante	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>CgADH in dieser Arbeit</b>				
Ethanol	175	1,75	0,01	
NAD <sup>+</sup>	957	0,68	$7,1 \times 10^{-4}$	
NADP <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>CgADH in (Arndt <i>et al.</i>, 2008)</b>				
Ethanol	160	Nicht angegeben	Nicht angegeben	
NAD <sup>+</sup>	250	Nicht angegeben	Nicht angegeben	
NADP <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>EhADH1 in dieser Arbeit</b>				
Ethanol	$19,2 \times 10^3$	0,68	$3,5 \times 10^{-5}$	
NAD <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	
NADP <sup>+</sup>	5,3	0,92	0,17	2.648
<b>EhADH1 in (Kumar <i>et al.</i>, 1992)</b>				
Ethanol	$4 \times 10^3$	Nicht angegeben	Nicht angegeben	
NAD <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	
NADP <sup>+</sup>	3,5	Nicht angegeben	Nicht angegeben	



**Abbildung 42:** Michaelis-Menten Kinetiken von EhADH1 gegenüber (A) Ethanol und (B) NADP<sup>+</sup>. Die Enzymkonzentration betrug 0,5  $\mu\text{M}$  Enzym und es wurde entweder Ethanol (1 M) oder NADP<sup>+</sup> (200  $\mu\text{M}$ ) im Überschuss zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Substratlösung (Stammlösung in fünffacher Konzentration gegenüber der Endkonzentration) zu 200  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Enzymlösung. Die Absorption wurde für 10 min kontinuierlich bei 340 nm und 25 °C gemessen.

Im direkten Vergleich mit CgADH lag der Vorteil von EhADH1 in dem niedrigeren  $K_M$ -Wert für  $NADP^+$ , welcher dem gewünschten Anforderungsprofil entsprach. Nichtsdestotrotz bestand Handlungsbedarf hinsichtlich der Umsetzung von Ethanol, da die Präferenz dieses Enzyms für länger-kettige Alkohol-Substrate einzuordnen war. CgADH zeigte diesbezüglich eine Michaelis-Konstante von nur 175  $\mu M$ , konnte jedoch  $NADP^+$  nicht nutzen. Dementsprechend wäre in diesem Fall ein *Engineering* hinsichtlich dieses Kofaktors von Nöten gewesen, mit dem Ziel die Bindung von  $NAD^+$  gänzlich zu unterbinden und exklusiv  $NADP^+$  als Cosubstrat zu nutzen. Ausschlaggebend für die Entscheidung zu Gunsten des Substrat-*Engineerings* von EhADH1 war zudem das Vorhandensein der Kristallstruktur, was die Entwicklung und Planung von Mutanten deutlich erleichterte.

Zur Vervollständigung der Suche nach alternativen  $NADP^+$ -spezifischen Alkoholdehydrogenasen mit einer Präferenz für kurz-kettige Substrate wurde EhADH3 aus *Entamoeba histolytica* exprimiert und charakterisiert. Diese Dehydrogenase stellt ein 42,3 kDa Protein als Homotetramer dar mit einem katalytisch aktiven Eisenatom im aktiven Zentrum. Die erste Studie im Jahre 1996 beinhaltete die Klonierung, Genexpression und Reinigung. Bemerkenswerterweise wurde dabei eine Präferenz für mittel-kettige sekundäre Alkohole wie 1-Butanol und 1-Propanol festgestellt, mit niedrigerer Aktivität für Ethanol und Butanol (Rodriguez *et al.*, 1996). Eine Kristallstruktur wurde bis dato nicht aufgeklärt. Das Gen für die codonoptimierte Sequenz von EhADH3 (UniProt ID: Q24857) wurde durch Synthese erhalten. Dessen Klonierung und Expression verlief analog zu EhADH1 und CgADH (s. Abschnitt 3.6.1). Allerdings konnte mit pASK-IBA5(+)-EhADH3 in *E. coli* BL21, BL21(DE3), Origami B und W3110 keine Genexpression beobachtet werden (Abb. 43). Erst in dem eher für Klonierungsarbeiten genutzten Wirtsorganismus XL1-Blue gelang die Überexpression unter Nachweis einer Bande bei ca. 42 kDa (Abb. 43 B). Eine Verlagerung des *Strep*-tag II an dem C-Terminus lieferte die gleichen Ergebnisse. Trotz der gelungenen Überexpression lag EhADH3 nach dem Zellaufschluss mittels French Press vollständig im unlöslichen Proteinpräzipitat vor. Deshalb wurde die Reinigung und Charakterisierung von EhADH3 an diesem Punkt abgebrochen, zumal mit EhADH1 ein geeigneter Kandidat für das *Protein-Engineering* zu Verfügung stand.



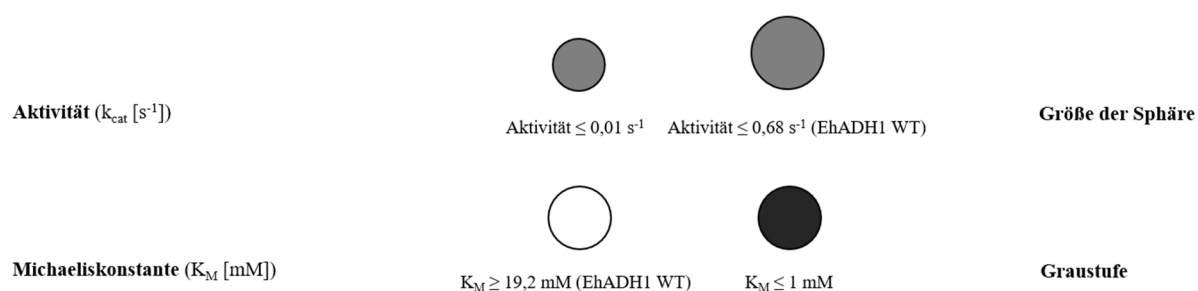
**Abbildung 43:** Überblick der Expressionsversuche mit von EhADH3 nach cytoplasmatischer Genexpression in diversen *E. coli* Stämmen. SDS-PAGE für die Produktion von rekombinantem EhADH3 in BL21 und XL1-Blue. M = Größenstandard;  $T_0$  = Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21 mit pASK-IBA5(+)-EhADH3.

### 3.7 Semi-rationales *Protein-Engineering* von EhADH1

Im Gegensatz zum semi-rationalem Design von SmuA lag der Fokus des *Protein-Engineerings* von EhADH1 nicht auf der Veränderung des Produktspektrums, sondern auf der Optimierung des Substratspektrums. Hinsichtlich der natürlicherweise vorhandenen Kofaktorspezifität für NADP<sup>+</sup> wäre EhADH1 bereits hervorragend als Teil des Reaktionswegs für die biotechnologische Produktion von L-Lysin geeignet gewesen (Abb. 7), jedoch bleibt ein Flaschenhals, aufgrund des hohen  $K_M$ -Werts von 19,2 mM für Ethanol. Natürlicherweise ist das aktive Zentrum von EhADH1 auf die Bindung von länger-kettigen sekundären Alkoholen, wie beispielsweise 2-Butanol, ausgerichtet (Kumar *et al.*, 1992). Dementsprechend bestand das Ziel des semi-rationalem *Protein-Engineerings* von EhADH1 darin, die Substratelektivität durch Verkleinerung der Bindetasche zu Gunsten des kleineren Ethanol zu verbessern. Die folgende Mutagenesestudie stützte sich daher auf die Analyse der vorhandenen Kristallstruktur (Shimon *et al.*, 2002).

#### 3.7.1 Phase I: Eingriffe in das aktive Zentrum

Trotz des höheren apparativen Aufwandes, begründet durch die aufwendigere Analyse der notwendigen Michaelis-Menten Kinetiken und den damit verbundenen höheren Bedarf an Enzymmengen, wurde jede Mutante durch Affinitätschromatographie und präparative SEC gereinigt. Damit wurden insgesamt 20 Einzelmutanten an neun verschiedenen Positionen sowie sieben Doppelmutanten analysiert. Wiederum folgte die Darstellung der Effekte der mutierten Positionen in Form von getönten Sphären als *Heatmap* (Abb. 44).



**Abbildung 44:** Parameter der *Heatmap* in PyMOL für das evolutive *Engineering* der EhADH1. Das C-  $\alpha$ -Atom der mutierten Aminosäurepositionen wurde als Sphäre dargestellt. Die Größe der Sphäre zeigt die Aktivität der Mutante an, wobei  $0,68 s^{-1}$  der Ausgangsvariante (Wildtyp-EhADH1) entspricht. Mutationen, die zu einer Verringerung der Aktivität führten, wurden mit einer kleineren Sphäre dargestellt. Die Michaelis-Konstante wird anhand der Graustufe der Sphäre wiedergegeben. Dabei steht eine weiße Sphäre für WT-EhADH1 und einen Wert von 19,2 mM. Verbesserte Mutanten mit einer kleineren Michaelis-Konstante erhielten eine dunklere Sphäre.

Die in der PDB hinterlegte Kristallstruktur (PDB: 1Y9A) von EhADH1 zeigt ein Dimer mit dem Kristallisationsadditiv Dimethylarsinsäure im aktiven Zentrum. Die Struktur der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* wurde zweimal aufgeklärt; einerseits mit 2-Butanol (PDB: 1BXZ) und andererseits mit NADP<sup>+</sup> (PDB: 1YKF) im aktiven Zentrum (Bogin *et al.*, 1997). Da beide Enzyme eine

78 %-ige Aminosäuresequenzidentität ausweisen, war es möglich, ein *Pair Fit* Alignment mit PyMOL durchzuführen. Im Anschluss wurden sowohl die beiden TbADH-Strukturen als auch Dimethylarsinsäure aus dem Modell ausgeblendet. Dies resultierte in einem Modell von EhADH1 mit 2-Butanol im aktiven Zentrum und NADP<sup>+</sup> in der Kofaktorbindetasche (Abb. 45).

Mit der Absicht, die Bindetasche zu verkleinern und damit für größere Substrate wie 2-Butanol weniger zugänglich zu machen, ohne dabei die Bindung von NADP<sup>+</sup> oder des Zn<sup>2+</sup>-Ions zu beeinflussen, wurden zunächst die Positionen Ser39, Ala85 und Tyr267 untersucht. Dabei wurde jeweils darauf geachtet, die entsprechende Aminosäureseitenkette nur leicht zu vergrößern.

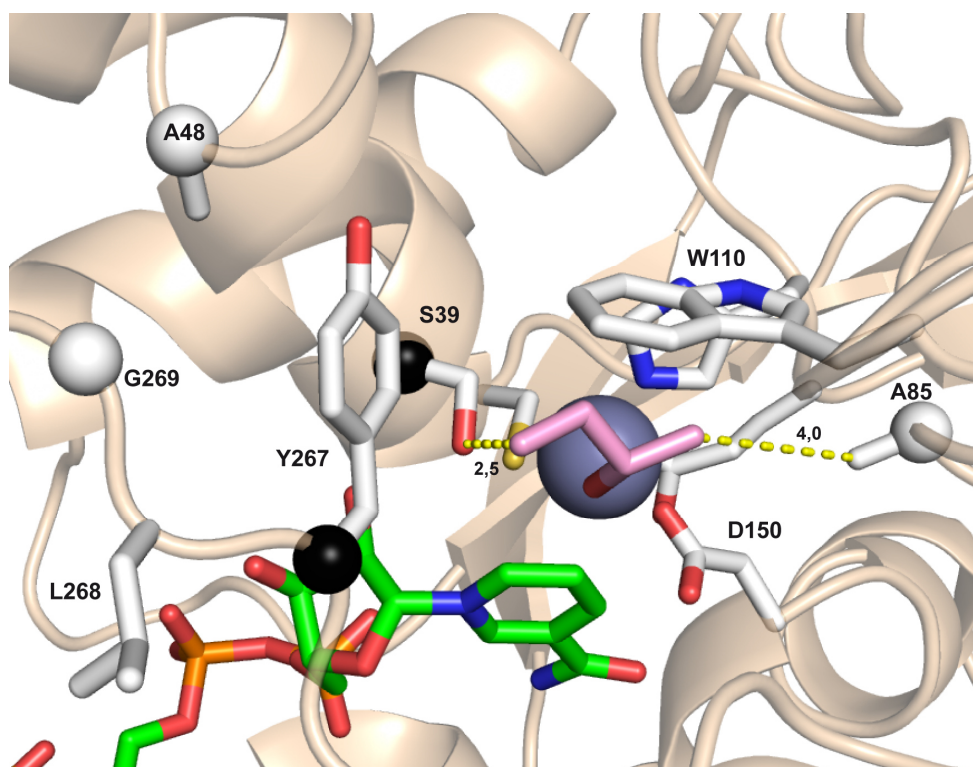
Die experimentell durchgeführte Substitution von Ala85 gegen Leucin oder Phenylalanin hatte überraschenderweise eine Veränderung des Oligomerisierungszustandes der EhADH1 zur Folge. Im Elutionsprofil der SEC konnte lediglich das Monomer detektiert werden, welches keine enzymatische Aktivität zeigte, im Einklang mit dem Umstand, dass die EhADH1 als Homotetramer funktionell ist. In dem oben beschriebenen Modell zeigte die Methylgruppe von Ala85 in Richtung des 5,7 Å entfernten Zn<sup>2+</sup>-Ions und des 4,0 Å entfernten 2-Butanols (Abb. 45). Aufgrund dieser Distanz hätte die Verlängerung zu Phenylalanin vermutlich einen zu starken Eingriff bedeutet, der Austausch gegen das kleinere Leucin jedoch nicht. Effekte auf den katalytischen Mechanismus konnten jedoch aufgrund der enzymatischen Inaktivität des Monomers nicht analysiert werden. Die Vergrößerung der Seitenkette von Ser39 zu Leucin resultierte in einer Verringerung der Michaelis-Konstante auf 9,6 mM, verbunden mit einem  $k_{\text{cat}}$  von nur  $1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; die katalytische Effizienz betrug damit  $1,2 \times 10^{-7} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Tabelle 23). Die Position Ser39 wurde aufgrund seiner räumlichen Nähe von nur 3,7 Å zu Zn<sup>2+</sup> und 2,5 Å zu 2-Butanol ausgewählt, was jedoch mit dem Risiko verbunden war, dass bereits kleine strukturelle Änderungen die katalytische Aktivität deutlich beeinträchtigen konnte.

**Tabelle 23:** Analyse der kinetischen Parameter der EhADH1-Mutanten aus Phase I für Ethanol. n.d. = nicht detektiert.

	$K_M$ [mM]	$k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]
EhADH1	19,2	0,68	$3,5 \times 10^{-5}$	
S39L	9,6	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-7}$	
A85L	n.d.	n.d.	n.d.	
A85F	n.d.	n.d.	n.d.	
Y267W	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^2$
S39T	7,7	$8,2 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-5}$	500
S39V	2,2	$1,1 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^{-8}$	
A48V	24,7	$1,7 \times 10^{-2}$	$7,0 \times 10^{-7}$	
<b>Y267F</b>	<b>7,2</b>	<b>0,04</b>	<b><math>5,9 \times 10^{-6}</math></b>	
G269A	25,2	0,08	$3,3 \times 10^{-6}$	
G269P	24,4	0,09	$3,9 \times 10^{-6}$	

Von besonderer Bedeutung war weiterhin die Position Tyr267. Die relativ freistehende und in Richtung der Bindetasche ausgerichtete Tyrosin-Seitenkette schien ein geeigneter Kandidat zu sein, um die Lage des Substrats zu beeinflussen, ohne dabei das  $Zn^{2+}$ -Ion zu berühren. Überraschenderweise verringerte die Substitution Y267W den  $K_M$ -Wert auf nur  $1,0 \mu\text{M}$ . Allerdings sank auch die Wechselzahl auf  $5,2 \times 10^{-6}$  und diese Mutante zeigte Substratinhibierung mit einer Inhibitionskonstante von  $130 \mu\text{M}$  (Tabelle 23).

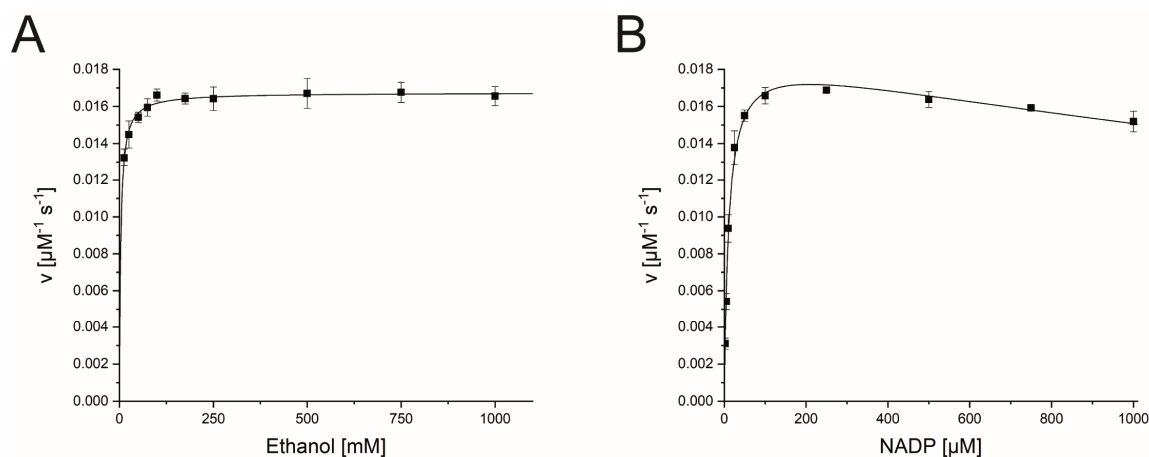
Im zweiten Zyklus der ersten Phase wurde Ser39 zu Threonin und Valin mutiert. In beiden Fällen war ein Abfall des  $K_M$ -Wertes auf  $7,7$  bzw.  $2,2 \text{ mM}$  zu beobachten. Die Wechselzahlen betragen entsprechend  $8,2 \times 10^{-2}$  und  $1,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Die katalytischen Effizienzen verringerten sich folglich auf  $1,1 \times 10^{-5}$  und  $5,2 \times 10^{-8} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Analog zu Y267W wurde auch im Falle der Mutante S39T eine Substratinhibierung mit einem  $K_I$  von  $500 \mu\text{M}$  gemessen (Tabelle 23). Daraufhin war die Position Tyr267 Ziel einer neuen Mutation. Da der Austausch zu Tryptophan zu einer drastisch verringerten Aktivität geführt hatte, wurde mit Phenylalanin eine weniger voluminöse Seitenkette gewählt. Dies resultierte in einer Michaelis-Konstante von  $7,2 \text{ mM}$ , zusammen mit einem  $k_{\text{cat}}$  von nur  $0,04 \text{ s}^{-1}$  und einer katalytischen Effizienz von  $5,9 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . In diesem Zusammenhang wurde das benachbarte Glycin zu Alanin sowie Prolin mutiert, mit dem Ziel die Konformation des Loops, der auch die Position Tyr267 beinhaltet, zu verändern. Entgegen vorherigen Annahmen wurde ein Anstieg der  $K_M$ -Werte auf  $25,2 \text{ mM}$  bzw.  $24,4 \text{ mM}$  beobachtet sowie eine Reduktion der Wechselzahlen auf  $0,08 \text{ s}^{-1}$  und  $0,09 \text{ s}^{-1}$ . Um die Position von Tyr267 auf andere Weise zu beeinflussen, wurde zudem Ala48 zu Valin mutiert, mit der Folge eines  $K_M$ -Wertes in Höhe von  $24,7 \text{ mM}$  und eines  $k_{\text{cat}}$  von  $1,7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Abb. 45).



**Abbildung 45:** Räumliche Anordnung ausgewählter Aminosäuren im aktiven Zentrum von EhADH1 und der Effekt von Mutationen aus Phase I: Ser39, Ala48, Ala85, Tyr267 und Gly269. Hervorgehoben sind die Abstände zwischen Ser39 sowie A85 und 2-Butanol. NADP<sup>+</sup> ist grün und 2-Butanol pink gefärbt. Die enge räumliche Nähe zwischen 2-Butanol und NADP<sup>+</sup> ist mit der Konstruktion des Modells durch Überlagerung von zwei verschiedenen Kristallstrukturen zu begründen.

### 3.7.2 Phase II: Volltreffer mit Ansage

Aufgrund des Teilerfolgs mit der Mutante Y267F wurde der Fokus in Phase II auf die Region um Tyr267 gelenkt. Eine Verkleinerung dieser Seitenkette zu Leucin führte zu einem leichten Anstieg des  $K_M$ -Wertes auf 20,5 mM, und zu einem 30-fachen Verlust der Aktivität auf einen  $k_{cat}$  von 0,02 s<sup>-1</sup>, entsprechend einem Quotienten  $k_{cat}/K_M$  von  $8,4 \times 10^{-7} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Bei genauerer Analyse der benachbarten Positionen wurde ersichtlich, dass die Aminosäureabfolge der Region <sup>265</sup>VNYLGEG<sup>271</sup> mit dem von TbADH übereinstimmte, abgesehen von Leu268. Entsprechend des an dieser Position in TbADH vorkommenden Phenylalaninrests wurde folglich die Substitution L268F analysiert. Diese Mutante zeigte eine 5,5-fach verringerte Michaelis-Konstante von 3,5 mM bei Halbierung der Wechselzahl auf 0,33 s<sup>-1</sup>. Somit konnte eine Verdreifachung der katalytischen Effizienz von  $3,5 \times 10^{-5}$  auf  $9,6 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  mit nur einer Punktmutation erreicht werden (Abb. 46, Tabelle 24). Hinsichtlich der Nutzung von NADP<sup>+</sup> als Kofaktor betrug der  $K_M$ -Wert 10,9  $\mu\text{M}$ , bei einem  $k_{cat}$  von 0,34 s<sup>-1</sup>. Innerhalb eines Radius von 5 Å um Leu268 sind die Aminosäuren Val246, Phe249, Asn264 und Ile274 lokalisiert. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Verlängerung der Seitenkette zu Phenylalanin zu einer sterischen Überfrachtung führt, was den Rest Tyr267 weiter in Richtung des aktiven Zentrums bewegt, zu Gunsten der Affinität für Ethanol (Abb. 47).



**Abbildung 46:** Michaelis-Menten Kinetiken für EhADH1(L268F) gegenüber (A) Ethanol und (B) NADP<sup>+</sup>. Die Enzymkonzentration betrug 0,05  $\mu\text{M}$  Enzym und es wurde entweder Ethanol (1 M) oder NADP<sup>+</sup> (200  $\mu\text{M}$ ) im Überschuss zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Substratlösung in 200  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Enzymlösung. Die Absorption wurde für 10 min kontinuierlich bei 340 nm und 25 °C gemessen.

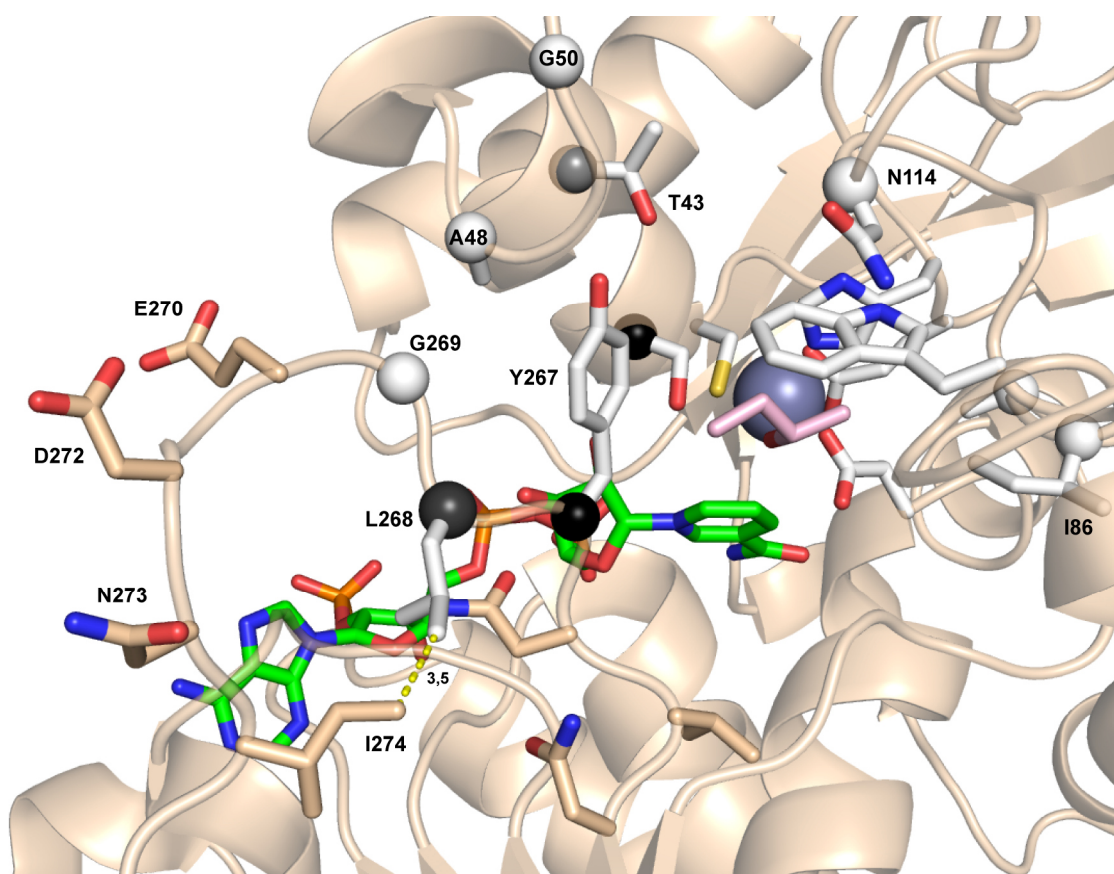
Da eine direkte Modifizierung von Tyr267 in Phase I nicht zu dem gewünschten Erfolg geführt hatte, wurde der Versuch unternommen, die Konformation des Tyrosins indirekt zu beeinflussen: zum einen durch den Austausch des in der Nähe gelegenen Thr43 gegen Isoleucin oder Valin und zum anderen durch die Einführung des starren Prolins anstelle des flexiblen Gly50. Allerdings führte letztere Mutation zu einem zu starken Eingriff in die Tertiärstruktur und zur Inhibierung der Ausbildung des Tetramers. Folglich konnte ausschließlich die katalytisch inaktive monomere Form gereinigt werden. Gleiches wurde auch bei der Mutation I86M beobachtet.

Die Messungen der Mutationen T43I und T43V lieferten  $K_M$ -Werte von 10,1 und 10,6 mM und Wechselzahlen von  $1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $2,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Tabelle 24). Aus dem hier verwendeten Modell ist ein Abstand von nur 2,7 Å zwischen den beiden Hydroxylgruppen von Tyr267 und Thr43 abzuleiten. Aufgrund der räumlich gesehen kleineren Mutationen zu den aliphatischen Aminosäuren Isoleucin und Valin war ursprünglich nicht von einer sterischen Kollision auszugehen, sondern vielmehr von einem Eingriff in die polaren Wechselwirkungen in diesem Bereich, aufgrund des Wegfalls der Hydroxylgruppe (Abb. 47). Eine weitere Möglichkeit zur Verkleinerung der Substratbindetasche bestand in der Substitution von durch Glutamin. Asn114 ist zwar innerhalb der Bindetasche lokalisiert, aber seine Seitenkette weist nicht in Richtung des 2-Butanols oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions. Entgegen den Erwartungen erhöhte sich der  $K_M$ -Wert auf 32,3 mM, zusammen mit einem Verlust der katalytischen Aktivität auf  $4,2 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Um den Effekt der Substitution L268F zu verstärken, wurden im nächsten Zyklus längere Seitenketten eingeführt. Die Mutation L268Y hatte dabei nur leichte Effekte auf die kinetischen Parameter:  $K_M = 18,3 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{cat}} = 0,24 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{\text{cat}}/K_M = 1,3 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Mutante L268W zeigte dagegen eine erhöhte Michaelis-Konstante von 23,3 mM gepaart mit einer deutlich erniedrigten Wechselzahl von  $0,08 \text{ s}^{-1}$ . Die Einführung der Punktmutation L268R verringerte den  $K_M$ -Wert auf 5,9 mM, reduzierte jedoch die Aktivität noch weiter auf  $0,02 \text{ s}^{-1}$  (Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Analyse der kinetischen Parameter der EhADH1-Mutanten aus Phase II für Ethanol. n.d. = nicht detektiert.

	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $\mu M^{-1} s^{-1}$ ]	$K_I$ [ $\mu M$ ]
EhADH1	19,2	0,68	$3,5 \times 10^{-5}$	
T43I	10,1	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-7}$	
T43V	10,6	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^6$
G50P	n.d.	n.d.	n.d.	
N114Q	32,3	0,13	$4,2 \times 10^{-6}$	
Y267L	20,5	0,02	$8,4 \times 10^{-7}$	
<b>L268F</b>	<b>3,5</b>	<b>0,33</b>	<b><math>9,6 \times 10^{-5}</math></b>	
I86M	n.d.	n.d.	n.d.	
L268R	5,9	0,02	$2,8 \times 10^{-6}$	
L268W	23,3	0,08	$3,5 \times 10^{-6}$	
L268Y	18,3	0,24	$1,3 \times 10^{-5}$	



**Abbildung 47:** Räumliche Anordnung ausgewählter Aminosäuren im aktiven Zentrum von EhADH1-Mutationen aus Phase II: T43, G50, I86, N114, Y267 und L268. Innerhalb eines Radius von 5 Å um L268 sind die Aminosäuren E270, D272, N273 lokalisiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Verlängerung der Seitenkette zu Phenylalanin zu einer sterischen Überfrachtung führt, was Tyr267 weiter in Richtung des aktiven Zentrum bewegt, zu Gunsten der Bindung von Ethanol. Dargestellt ist zudem der Abstand zwischen L268 und I274. NADP<sup>+</sup> ist grün und 2-Butanol pink gefärbt. Die enge räumliche Nähe zwischen 2-Butanol und NADP<sup>+</sup> ist mit der Konstruktion des Modells durch Überlagerung von zwei verschiedenen Kristallstrukturen zu begründen.



### 3.7.3 Doppelmutanten mit EhADH1(L268F) als Ausgangsvariante

Da im Laufe der Mutagenesestudie nur eine Punktmutante mit verbesserten Eigenschaften identifiziert werden konnte, waren unterschiedliche Kombinationen von Seitenkettenaustauschen wie bei SmuA nicht möglich. Stattdessen wurde der Versuch unternommen, EhADH1(L268F) durch Einführung weiterer, noch nicht untersuchter Mutationen zu verbessern. Die Grundidee dabei war es, den Loop <sup>264</sup>NVNYLGEGDN<sup>273</sup>, welcher die Positionen L268 und Tyr267 beinhaltet, konformationell so zu verändern, dass Tyr267 weiter in das aktive Zentrum vorrückt und die Substratbindetasche dementsprechend verkleinert (Abb. 48).

Zu diesem Zweck wurde im ersten Zyklus der Doppelmutanten der 4,0 Å von Leu268 entfernte Rest Phe249 zu Leucin und Tyrosin mutiert. Dies resultierte in erhöhten  $K_M$ -Werten von 8,0 und 15,6 mM mit Wechselzahlen von 0,13 bzw. 0,03 s<sup>-1</sup>. Dementsprechend wirkte sich weder eine Verkleinerung der Seitenkette zu Leucin noch eine Verlängerung um eine Hydroxylgruppe zu Gunsten der Substratspezifität für Ethanol aus (Tabelle 25).

Die anschließend untersuchte Substitution N264L brachte zwar die gewünschte Verringerung der Michaelis-Konstante, und zwar auf den sehr niedrigen Wert von 1 µM, allerdings ging dies mit einem deutlichen Abfall der katalytischen Aktivität auf  $5,0 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup> einher. Asn264 war aufgrund seiner Lage zu Beginn des Loops <sup>264</sup>NVNYLGEGDN<sup>273</sup> und seiner räumlichen Nähe zu Leu268 (4,8 Å) ausgewählt worden (Abb. 48).

In der zweiten Runde war diese Position daher das Ziel weiterer Mutationen zu Isoleucin, Serin und Glutamin. Die Doppelmutanten L268F/N264I führte erneut zur Beeinträchtigung der Oligomerisierung, so dass lediglich das inaktive Monomer gereinigt werden konnte. Daraus war zu schließen, dass an dieser Stelle eine geladene Aminosäure (ASN) zur Ausbildung des Tetramers vermutlich essentiell ist. Während die Zweitmutation N264S den  $K_M$ -Wert auf die Höhe des Wildtyps an hob, wurde mit N264Q eine leichte Verringerung auf 3,3 mM beobachtet. Disqualifiziert wurde diese Mutante jedoch aufgrund des geringen  $k_{cat}$  von  $2,7 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>. Mit der Einführung des Austausches des benachbarten Val265 gegen die ebenfalls aliphatische Seitenkette des Isoleucins wurde der  $K_M$ -Wert erheblich auf 66,1 mM erhöht. Die moderate Modifizierung von Ile241 zu Leucin führte dagegen über zu einer Michaelis-Konstante von 21,0 mM (Tabelle 25).

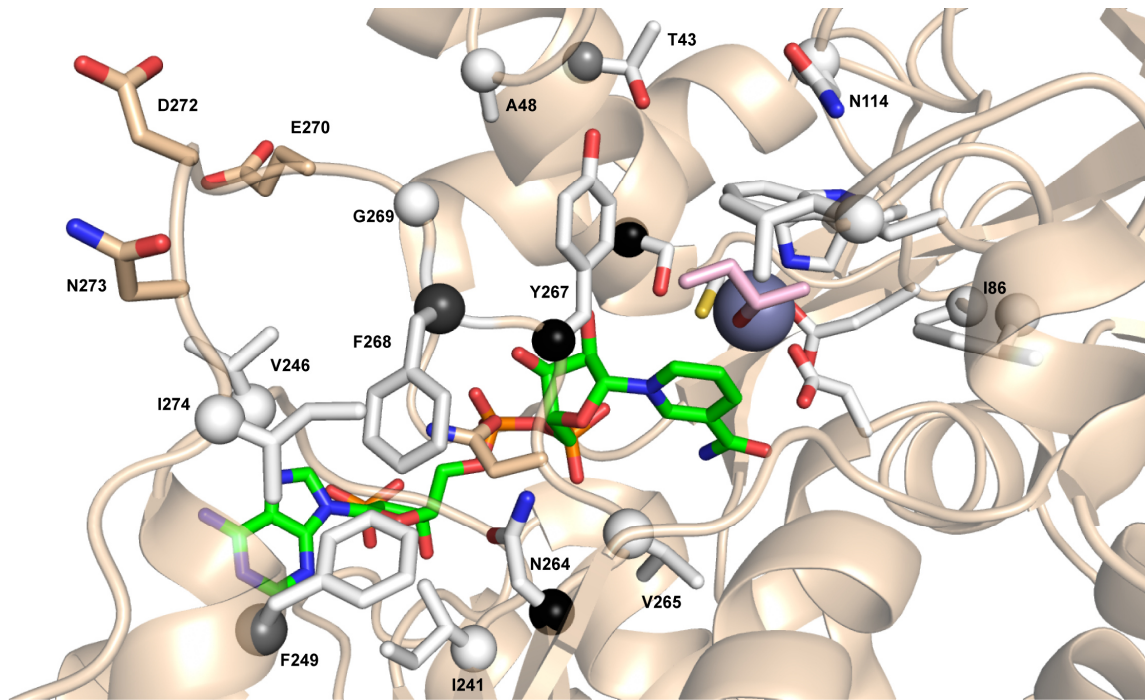
**Tabelle 25:** Analyse der kinetischen Parameter der EhADH1-Doppelmutanten mit L268F als Template für Ethanol. n.d. = nicht detektiert.

	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $\mu M^{-1} s^{-1}$ ]	$K_I$ [ $\mu M$ ]
EhADH1	19,2	0,68	$3,5 \times 10^{-5}$	
<b>L268F</b>	<b>3,5</b>	<b>0,33</b>	<b><math>9,6 \times 10^{-5}</math></b>	
L268F/F249L	8,0	0,13	$1,7 \times 10^{-5}$	
L268F/F249Y	15,6	0,03	$2,0 \times 10^{-6}$	
L268F/N264L	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	
L268F/I241L	21,0	0,10	$4,8 \times 10^{-6}$	
L268F/F249V	19,5	0,14	$7,1 \times 10^{-6}$	
L268F/N264I	n.d.	n.d.	n.d.	
L268F/N264S	19,6	0,19	$9,8 \times 10^{-6}$	
L268F/N264Q	3,3	$2,7 \times 10^{-3}$	$8,1 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^3$
L268F/V265I	66,1	0,22	$3,4 \times 10^{-6}$	
L268F/L107F	30,7	0,02	$5,8 \times 10^{-7}$	835
L268F/V246L	25,5	0,11	$4,5 \times 10^{-6}$	
L268F/I274F	98,7	0,13	$1,4 \times 10^{-6}$	

Im dritten und letzten Zyklus wurden die noch nicht untersuchten Positionen Leu107, Val246 und Ile274 mutiert. Da Leu107 sowohl in Richtung des aktiven Zentrums als auch von Tyr267 zeigt, sollte mit einer Verlängerung zu Phenylalanin eine räumliche Änderung erzwungen werden. Jedoch resultierte dies in einer Steigerung des  $K_M$ -Wertes auf 30,7 mM und einem  $k_{cat}$  von  $0,02 s^{-1}$ .

Der nur 4,4 Å von Leu268 entfernte Rest Val246 wurde durch die Mutation zu Leucin um eine Methylengruppe verlängert, was zu einer Michaelis-Konstante von 25,5 mM und einer Wechselzahl von  $0,11 s^{-1}$  führte.

Es ist anzunehmen, dass das neu eingeführte Phe268 bereits mit dem 3,5 Å entfernten Ile274 kollidierte. Daher resultierte die Mutation I274F vermutlich in einer zu starken sterischen Überfrachtung der beiden neu eingeführten Phenylalanin-Seitenkette, was sich mit dem höchsten gemessenen  $K_M$ -Wert von 98,7 mM bemerkbar machte. Anhand dieser Befunde wurde die Mutagenesestudie von EhADH1 an diesem Punkt beendet und EhADH1(L268F) als die bislang beste Mutante für den biotechnologischen Einsatz im Ganzzellkatalysator *E. coli* ausgewählt (Abb. 7).



**Abbildung 48:** Übersicht über die Doppelmutanten basierend auf EhADH1(L268F). Dargestellt ist die räumliche Anordnung der zusätzlich mutierten Aminosäuren I241, F249, N264, V265. Zunächst wurde L268 mit Hilfe des Programms PyMOL gegen Phenylalanin mutiert und dabei die Ausrichtung des Phenylrings mit der geringsten sterischen Kollision gewählt. NADP<sup>+</sup> ist grün und 2-Butanol pink gefärbt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Anwendungspotential der SmuA-Mutanten für die biotechnologische Herstellung von Isomalt

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche SmuA-Punktmutanten und deren Kombinationen im Hinblick auf die selektive Erzeugung von Isomaltulose ausgehend von Saccharose als Substrat untersucht, vor allem unter dem Aspekt einer verringerten Ausbeute an Trehalulose. Als Ausgangspunkt diente die Variante SmuA(V465E), die im Vergleich zum Wildtyp Enzym eine verbesserte Löslichkeit aufwies. Nachfolgend wurde diese Mutante als SmuA\* bezeichnet. Von den generierten Varianten des Enzyms SmuA\* wies insbesondere die Doppelmutante Y219L/D398G verbesserte Eigenschaften gegenüber dem Wildtyp auf. So wurden in Messungen mit einer 40 %-igen Saccharose-Substratlösung eine von 3,5 auf 1,6 % reduzierte prozentuale Ausbeute an dem Nebenprodukt Trehalulose bei nur moderater Verringerung der katalytischen Effizienz von  $17,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auf  $11,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bezüglich der Bildung von Isomaltulose beobachtet. Zwar ist anhand dieser Ergebnisse im semiquantitativen Labormaßstab noch keine skalierbare Prognose hinsichtlich der Produktbildung unter Prozessbedingungen möglich, jedoch kann die hier beobachtete verbesserte Produktspezifität dazu beitragen das *Downstream Processing* zur Gewinnung von Isomalt zu vereinfachen.

Bereits einige Zehntelprozent weniger des hygroskopischen Nebenprodukts Trehalulose verbessern die Rieselfähigkeit des Fermentationsprodukts mit der Hauptkomponente Isomaltulose und vereinfachen die Handhabung, den Transport und die Weiterverarbeitung des getrockneten Zuckers. Dies sollte sich vorteilhaft auf die gesamte Prozessökonomie auswirken, vor allem um die Herausforderung der Produktion in warmen Standorten mit hoher Luftfeuchtigkeit zu bewältigen (Evonik, 2017). Zudem ist die hier entwickelte SmuA-Doppelmutante dem bislang propagierten Enzym PadU vorzuziehen, da letzteres zwar mit 1,2 % die niedrigste Produktion an Trehalulose unter allen bekannten Saccharose-Isomerasen aufweist, jedoch bemerkenswerterweise auch eine 2,8-fache höhere Michaelis-Konstante von 157 mM zusammen mit einer katalytischen Effizienz von lediglich  $3,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Industriell wird Isomaltulose derzeit durch enzymatische Umwandlung von Saccharose zu Isomaltulose mit Hilfe von intakten immobilisierten Zellen des Bakterienstammes *Serratia plymuthica* in einem Festbettreaktor gewonnen. Das patentrechtlich geschützte Verfahren der Südzucker AG (Munir, 1983) beginnt mit der Kultivierung der Bakterien bei 30 °C und einem pH-Wert von 7,2, gefolgt von der Immobilisierung in Calcium-Alginat und des Transfers in den Reaktor. Die 40 %-ige Saccharose-Lösung mit einem pH-Wert von 6,0 wird in den Reaktor geleitet und die synthetisierte Isomaltulose aus dem Kulturüberstand durch Evaporation und Kristallisation vom Medium getrennt (Rose and Kunz, 2002). Anschließend kann die so gewonnene Isomaltulose quasi als Reinsubstanz auf den Markt gebracht werden, wobei der Großteil des Zuckers jedoch zu Isomalt weiterverarbeitet wird und seinen Weg in den Verkauf findet. Dazu wird Isomaltulose über einen Raney-Nickel-Katalysator in ein

äquimolares Gemisch der beiden Diastereomere 6-*O*- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-glucit (GPS, Isomaltit) und 1-*O*- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-mannitol (GPM) hydriert. Dabei liegt GPS als Anhydrid und GPM als Dihydrat vor (Cammenga and Zielasko, 1996).

Da im Rahmen dieser Arbeit SmuA und seine Varianten keine Anzeichen begrenzter Lagerstabilität erkennen ließen, wäre die Produktion damit nicht auf rekombinante Ganzzellbiokatalysatoren beschränkt, sondern der Einsatz von immobilisierten gereinigten Enzymvarianten erscheint denkbar. Jedoch bedarf dies weiterführender Untersuchungen zur Immobilisierung, wie auch zur Temperatur- und Lösungsmittelstabilität. In dieser Hinsicht wären potenzielle Defizite durch weiteres *Protein-Engineering* mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Mutagenese-strategie behebbar.

Die Verwendung von Isomaltulose mit seiner natürlichen Süße ist sowohl zur Vorbeugung von kardiovaskulären- und Zahnerkrankungen als auch in Verbindung mit der Behandlung von bereits bestehenden Krankheitsbildern eine vielsprechende Alternative zum gewöhnlichen Haushaltszucker Saccharose oder anderen Süßungsmitteln (Lina *et al.*, 2002). Als natürlich vorkommender Süßstoff beworben, gilt Stevia mit seiner 300-fach höheren Süße im Vergleich zu Glucose als ideales Süßungsmittel. Ohne nennenswerte Kalorien und Auswirkungen auf den Blutzuckerspiegel stellt es keine gesundheitliche Gefahr für Zähne oder Diabetiker da. Der Nachteil besteht jedoch in seinem leicht bitteren Geschmack und dem Auslösen eines verstärkten Verlangens nach Süßigkeiten (Goyal *et al.*, 2010). Zuckeralkohole wie Sorbit, Mannitol, Malitol, Lactit, Xylit, Erythrit und Isomalt weisen zwar einen dem Zucker sehr ähnlichen Geschmack auf, haben aber nicht die selben nachteiligen körperlichen Effekte. Dennoch sind diese Stoffe in der Lage, bei empfindlichen Menschen Bauchkrämpfe zu verursachen und bei Mengen von mehr als 20 g pro Tag abführend zu wirken (Makinen, 2011, Kandelman, 1997, Grembecka, 2015). Isomalt kann nicht nur bezüglich des Geschmacks und der Süße mit Stevia in Konkurrenz treten, auch liegt sein Verkaufspreis mit 8 € pro Kilogramm bereits heute deutlich unter dem Verkaufspreis von Stevia in Höhe von 20 € pro Kilogramm (Kamarulzaman *et al.*, 2014). In dieser Hinsicht sollten die Erkenntnisse dieser Arbeit einen Teil dazu beitragen, Diabetiker-Lebensmittel kostengünstiger zu gestalten und bei entsprechendem Einsatz durch die Lebensmittelindustrie die Anzahl von Neuerkrankungen an Diabetes oder Zahnkaries zu reduzieren.

## 4.2 Molekulare Optimierung der Saccharose-Isomerase SmuA

Bisher sind die meisten charakterisierten Saccharose-Isomerasen nur bedingt für eine industrielle Verwendung als Biokatalysatoren geeignet, wobei hier oftmals deren unvorteilhafte Produktspezifität (Xu *et al.*, 2013, Ren *et al.*, 2011) und ein Temperaturoptimum von über 30 °C (Goulter *et al.*, 2012) nachteilig sind. Bei der biotechnologischen Herstellung von Isomalt ist insbesondere die Bildung der hygroskopischen Trehalulose als Nachteil in der Prozessökonomie zu nennen. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Erhöhung der Produktspezifität von SmuA durch *Protein-Engineering* angestrebt.

Als dieses Projekt am Lehrstuhl für Biologische Chemie im Rahmen einer Kooperation mit Evonik Industries aufgenommen wurde, ergaben sich verschiedene Schwierigkeiten, was die physiologische Zusammensetzung, wie auch die aus gentechnischer Sicht geeignete Form der Primärsequenz von SmuA betrifft. Beispielsweise wurde ein um 42 Aminosäuren verlängerter N-Terminus festgestellt, da die natürliche Signalsequenz als solche nicht erkannt worden war. Zudem wurde eine zusätzlicher Aspartatrest an Position 338 identifiziert. Folglich fand eine Anpassung an die von Ravaud *et al.* 2005 experimentell aufgeklärte und in der PDB-Datenbank (*Protein Data Base*, ID: 3GBE) hinterlegte Aminosäuresequenz statt, welche als Ausgangspunkt für anschließenden experimentellen Arbeiten am Lehrstuhl für Biologische Chemie diente. Die nachfolgende Genexpressionsstudie ergab, dass es sich um eine natürlicherweise periplasmatisch lokalisierte Isomerase handelte mit einem dementsprechenden Signalpeptid. In diesem Zusammenhang ist für die korrekte Faltung des Monomers eine ausreichende Menge an Calcium erforderlich. Andernfalls resultierte die Expression in einer fast ausschließlichen Bildung eines nicht literaturbeschriebenen Dimers, das überraschenderweise dennoch katalytisch aktiv ist. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Existenz eines Dimers weder für SmuA (Ravaud *et al.*, 2005) noch für andere Saccharose Isomerasen in der Literatur beschrieben (Goulter *et al.*, 2012). Die Existenz des Dimers korrelierte mit einer ebenfalls zuvor unbekanntenen Abhängigkeit der SmuA von Calcium. Eine genauere Betrachtung und Verfeinerung der Kristallstruktur durch Herrn Dr. André Schiefner in unserer Arbeitsgruppe offenbarte die Existenz einer Calciumbindestelle, wie sie typischerweise in Enzymen der Glykosylhydrolase Familie 13 zu finden ist (Boel *et al.*, 1990). Mutationen innerhalb dieses Motivs untermauerten die essentielle Rolle dieser Aminosäuren und der Calcium-Bindungsstelle für die korrekte Faltung von SmuA (Seiboth, 2013).

Beeinflussbar war das Verhältnis Monomer zu Dimer vor allem durch die Wahl der Expressionsstrategie. Während die cytoplasmatische Genexpression mit pASK-IBA5(+) zur Dominanz des Dimers führte, vermutlich aufgrund der zu geringen Calciumkonzentration im Cytoplasma in Höhe von 90 nM (Gangola and Rosen, 1987), wurde mittels periplasmatischer Genexpression mit pASK-IBA4(+) hauptsächlich das Monomer produziert. Bemühungen, das Dimer zu dissoziieren oder Monomer zu dimerisieren, scheiterten wahrscheinlich an dem bereits während der Faltung festgelegten Oligomerisierungszustand, abhängig von der Calcium-Konzentration im umgebenden Milieu. Aufgrund der natürlichen sekretorischen Signalsequenz ist davon auszugehen, dass das Monomer die natürliche, biologisch aktive Form von SmuA in *Serratia plymuthica* darstellt und die Ausbildung des Dimers ein unter Calciummangel auftretender Nebeneffekt ist. Die damit nahegelegte Natur der Saccharose-Isomerase als sekretiertes extrazelluläres Enzym wirft zudem auch ein neues Licht auf den industriell eingesetzten Ganzzellkatalysator und die Verkapselung im Prozess. Um Verfälschungen der Messungen durch Mischungen beider Spezies vorzubeugen, fiel hier die Wahl auf das Monomer zur Analyse der nachfolgenden Mutagenesestudie.

Zu Beginn des Enzym-Engineerings musste ein geeignetes Konzept bezüglich der Generierung von Mutanten und deren Analyse entwickelt werden. In der Biotechnologie stehen dahingehend im Prinzip

eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Die gerichtete Evolution begründet sich auf der zufälligen Mutation der kodierenden Nukleotidsequenz für das Zielprotein und dem anschließenden Screening der Mutantenbibliothek gemäß einem zuvor aufgestellten Eigenschaftsprofil. Die Anforderungen an ein Screening System sind in der heutigen Zeit klar formuliert: Hochdurchsatz, Automatisierung und Präzision (Arnold, 2018, Bornscheuer and Pohl, 2001). Der Einsatz einer solchen Methode in Verbindung mit der Mutagenese von SmuA scheiterte jedoch an den mangelnden Möglichkeiten eines Hochdurchsatz-Screenings. So sind weder die Produkte Isomaltulose oder Trehalulose über einen kalorimetrischen Test quantifizierbar, noch ist ein detektierbarer Kofaktor, wie beispielsweise NAD(P)H, Teil des Reaktionsmechanismus. Nur zeitaufwendige Analysen via HPLC erlaubten präzise Messungen der enzymatischen Aktivitäten. Eine weitere Möglichkeit stellte das rationale Design von SmuA dar. Voraussetzung hierfür sind tiefgehende Erkenntnisse über den Ablauf des Mechanismus und im Idealfall Sequenzvergleiche mit homologen Strukturen von Proteinen, die die gewünschten Charakteristika bereits besitzen (Tylar Seiya *et al.*, 2018).

Zur Umsetzung des *Protein Engineerings* von SmuA wurde ein neuartiges Hybrid-Modell entwickelt und etabliert. Diese Strategie beinhaltet drei Faktoren aus seit Jahrzehnten angewandten Verfahren: (1) eine gerichtete Zufallsmutagenese aus dem semi-rationalen *Protein Engineering*; (2) den Aspekt der Rationalität aus dem rationalen Design von Proteinen und (3) die Durchführung in iterativen Zyklen bekannt aus der gerichteten Evolution. Aufgrund der Analogie dieser Strategie zu dem Regelwerk des weltbekannten Brettspiels „*Schiffe versenken*“, wurde die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Verfahrensweise dementsprechend bezeichnet.

Basierend auf der SmuA Kristallstruktur (PDB ID: 3GBE) wurde in iterativen Zyklen eine *Smart Library* erstellt (Lutz, 2010), die auf die Analyse von maximal 12 Varianten begrenzt war. Dies gestattete es zwar nicht, hunderte von Punktmutanten zu analysieren, lieferte aber hochpräzise Messergebnisse, was in einem automatisierten Hochdurch-Screening meist nicht möglich ist. Wie im gleichnamigen Brettspiel wurden rundenbasiert Mutanten (Schüsse) generiert und das Resultat der eingeführten Mutation anschließend in einer *Heatmap* (strategische Trefferkarte) festgehalten. Mutanten mit einer verringerten Trehalulose-Produktion (Treffer) wurden hierbei mit einer dunklen Sphäre dargestellt, wohingegen eine erhöhte Ausbeute an Trehalulose (Fehlschuss) mit einer weißen Sphäre markiert wurde.

Der Vorteil dieser Strategie lag darin, dass nur eine praktikable Anzahl an Mutanten analysiert werden musste, dank den in jeder Runde neu gewonnenen Erkenntnissen über die Sensitivität bestimmter Regionen des Enzyms. Hilfreich war dabei die Modellierung von Saccharose in das aktive Zentrum von SmuA, um die jeweiligen Auswirkungen der geplanten Substitutionen auf die Produktspezifität abzuwägen. Das so entstandene Treffermuster glich dabei dem Spielfeld von „*Schiffe versenken*“. Somit nutzte dieses Konzept die zielgerichtete Planung von Mutationen durch rationales Design und kombinierte dies mit dem Screening einer Mutantenbibliothek bei geringer Stückzahl.

Häufig beinhaltet die Vorgehensweise beim rationalen Design einen multiplen Sequenzvergleich des Zielproteins mit homologen Strukturen mit bekannten Eigenschaften. In dieser Arbeit stand allerdings nur ein Enzym mit einer niedrigeren Produktspezifität für Trehalulose zur Verfügung: PadU. Mit seiner in der Literatur oftmals genannten Bezeichnung als „bester Isomaltulose-Produzent“ (*Watzlawick and Mattes, 2009, Lipski et al., 2010*) konnten jedoch keine Inspirationen für neue Mutanten durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen gewonnen werden. Aufgrund der hohen Konservierung des aktiven Zentrums wurde geschlussfolgert, dass die Bereiche der zweiten und dritten Schale von Bedeutung für das Ausmaß der Isomerisierung zu Isomaltulose oder Trehalulose sein mussten. Überraschenderweise war das Sequenzmotiv der Calciumbindestelle bei SmuA und PadU identisch, jedoch lag PadU sowohl im calciumarmen Cytoplasma als auch im Periplasma bei mit Calciumacetat supplementierten Kulturmedium ausschließlich als Monomer vor. Zwar besitzt PadU, wie SmuA, ebenfalls eine hochkonservierte Calciumbindestelle, jedoch scheint in diesem Fall eine Besetzung mit Calcium für die korrekte Quartärstruktur nicht kritisch. Allerdings bleibt festzustellen, dass der überwiegende Teil des rekombinanten PadU-Proteins nach der cytoplasmatischen Genexpression in *E. coli* in unlöslicher Form vorlag (Abb. 15 A).

Das *Protein-Engineering* von SmuA beinhaltete die schrittweise Generierung von 56 Punktmutanten, die unter analogen Bedingungen exprimiert, gereinigt und analysiert wurden. Dieser Prozess lässt sich in drei Hauptphasen und sieben einzelnen Zyklen unterteilen. In jeder konsekutiven Phase flossen die Erkenntnisse der vorherigen Zyklen ein, woraus Hypothesen über relevante Regionen in und um das aktive Zentrum abgeleitet wurden.

Die ersten Mutagenesen konzentrierten sich auf Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum, welche über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat Saccharose in Kontakt stehen. Diese Methodik hatte bei anderen Fragestellungen in der Vergangenheit Erfolg, als SmuA durch die Punktmutation R306K in einen Trisaccharid-Produzenten transformiert wurde, der in der Lage ist, Saccharose zu 70% in Isomelezitose umzuwandeln (*Görl et al., 2012*). Diese Vorgehensweise scheiterte hier jedoch bereits in den ersten Zyklen an Mutanten, die eine erhöhte Ausbeute an Trehalulose wie auch einen erheblichen Einbruch der enzymatischen Aktivität zeigten. Dabei waren insbesondere die Positionen Thr427, Arg429 und Asp430 mehrfach das Ziel von Substitutionen innerhalb der ersten drei Zyklen (Tabelle 10).

Die aus diesen Daten gezogenen Lehren über die Sensibilität von SmuA gegenüber Modifikationen der Aminosäurepositionen in der ersten Schale um das gebundene Substrat, lieferten den Ausgangspunkt für verschiedene Punktmutationen mit einer verringerten Ausbeute an Trehalulose in den darauffolgenden Zyklen. Durch die Entscheidung, nur noch Aminosäurepositionen der zweiten und dritten Schale zu substituieren, gelang es in Phase II, fünf Treffer mit einer reduzierten Trehalulose-Produktion zu verbuchen, was einer Quote von 23 % entsprach. Mit den Aminosäureaustauschen I269V, S277T, D311P, D398G und F453Y wurden gleich mehrere Mutationen identifiziert, die für eine



präparative Anwendung geeignet schienen. Mit der angepassten Strategie gelang es, die Trefferquote in Zyklus 7 auf 55 % zu erhöhen. Dabei wurde die Mutante Y219L identifiziert, welche 94,8 % Isomaltulose, 1,9 % Trehalulose und 3,4 % Monosaccharide produzierte, dies bei einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 48,8:1 bei gleichbleibend hoher enzymatischer Aktivität (Abb. 23). Eine derartige Veränderung des Produktspektrums zu Lasten der Trehalulose-Bildung aufgrund nur einer einzigen Punktmutation ist bis dato nicht in der Literatur zu finden und bestätigte den Erfolg der Mutagenese-Strategie des „*Schiffe versenkens*“. Mit drei Volltreffern stellte dabei das Motiv <sup>214</sup>DTVATY<sup>219</sup> die Region mit der höchsten Trefferdichte dar (Abb. 24), was im gleichnamigen Spiel die Versenkung eines gegnerischen Schiffes bedeutet.

In Zyklus 7 konnte zudem die bedeutende Rolle der beiden Phenylalaninreste an den Positionen 270 und 294 als *Gate Keeper* bestätigt werden. Aus der Literatur bekannte Substitutionen gegen Alanin eliminierten nahezu vollkommen die Isomerisierungsaktivität der SmuA (Xu *et al.*, 2013, Ravaud *et al.*, 2007). Die Mutation von Phe270 zu Tyrosin dagegen verringerte interessanterweise hier die Hydrolyseaktivität auf nur 1,6 %. Die prozentuale Ausbeute an Isomaltulose erhöhte sich zugleich leicht auf 95,2 % und die von Trehalulose reduzierte sich geringfügig auf 3,2 % (Tabelle 11). Dieser Befund untermauerte die Hypothese, dass der an das Enzym nicht kovalent gebundene Fructoserest als Intermediat nach dem ersten Schritt des katalytischen Mechanismus durch Phe270 daran gehindert wird, das aktive Zentrum zu verlassen. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Hydroxylgruppe des Tyrosinrests nochmals verstärkt werden. Mit einem Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 98,7:1 erwies sich die benachbarte Mutation F294Y zwar als noch effizienter, jedoch war der starke Abfall der Produktion an Trehalulose auf 0,9 % begleitet von einer drastischen Reduktion an Isomaltulose auf 86,1 % und einem erheblichen Anstieg der Produktion von Glucose und Fructose auf 13,0 % im Produktspektrum. Des Weiteren war ein Verlust der enzymatischen Aktivität auf ein Fünftel zu verzeichnen (Tabelle 11).

Durch die hier verfolgte neue Strategie konnten zahlreiche Punktmutationen identifiziert werden, die dem gewünschten Anforderungsprofil entsprachen: eine verringerte prozentuale Ausbeute an Trehalulose bei einer nahezu gleichbleibenden enzymatischen Aktivität. Jedoch schien die verringerte Trehalulose-Produktion, die durch eine einzige Mutation bewirkt werden konnte, bei 1,9 % ihr Minimum erreicht zu haben. Folglich bestand der nächste Schritt darin, ausgewählte SmuA-Varianten gezielt zu kombinieren, synergistische Effekte zu erzielen. Dahingehend war die Mehrzahl der SmuA-Punktmutanten für derartige kombinatorische Anwendungen als kompatibel einzustufen. Nur wenige Ausnahmen, wie F270Y und S277T, führten zu deutlichen Verlusten der enzymatischen Aktivität der jeweiligen Doppelmutanten (Abb. 26).

**Tabelle 26:** Analyse der besten Einzel-, Doppel-, Tripel- und Quadrupelmutanten der SmuA. Dargestellt sind die prozentualen Ausbeuten an Isomaltulose, Trehalulose und den Monosacchariden, die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$ .

Variante	Ausbeute [%]			Kinetische Parameter		
	Isomaltulose	Trehalulose	Monosaccharide	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
SmuA*	93,7	3,5	2,8	55,3	965	17,5
PadU	96,3	1,2	2,5	157	567	3,6
Y219L	94,3	1,8	3,9	86,6	665	7,7
Y219L/D398G	94,7	1,5	3,8	60,2	708	11,8
Q181P/D398G/F453Y	93,2	1,5	5,3	124	122	0,99
Y219L/T369F/D398G/F453Y	92,0	1,4	6,6	58,2	201	3,5

Durch die nachfolgende Erweiterung der Doppelmутanten zu Dreifach- und Vierfachvarianten, jeweils basierend auf dem vielversprechendsten Kandidaten des vorangegangenen Zyklus, konnte die Trehalulose-Produktion schrittweise auf 1,4 % reduziert werden, bei einer prozentualen Reduktion der Isomaltulose-Ausbeute auf 92,0 % (Tabelle 26). Der schrittweise Anstieg der Bildung von Monosacchariden auf 6,6 % legt die Hypothese nahe, dass die eingeführten Mutationen weniger die Produktion der Isomaltulose begünstigen, sondern vielmehr die Isomerisierung zu Trehalulose behindern. Ohne die Bildung der  $\alpha$ -1,1-glycosidischen Bindung (Veronese and Perlot, 1998) diffundieren vermutlich Glucose und Fructose aus dem aktiven Zentrum, mit der Folge einer erhöhten prozentualen Ausbeute beider Nebenprodukte. Nichtsdestotrotz sollte sich der geringere Anteil an der besonders hygroskopischen Trehalulose positiv auf die Rieselfähigkeit des getrockneten Produktgemisches auswirken.

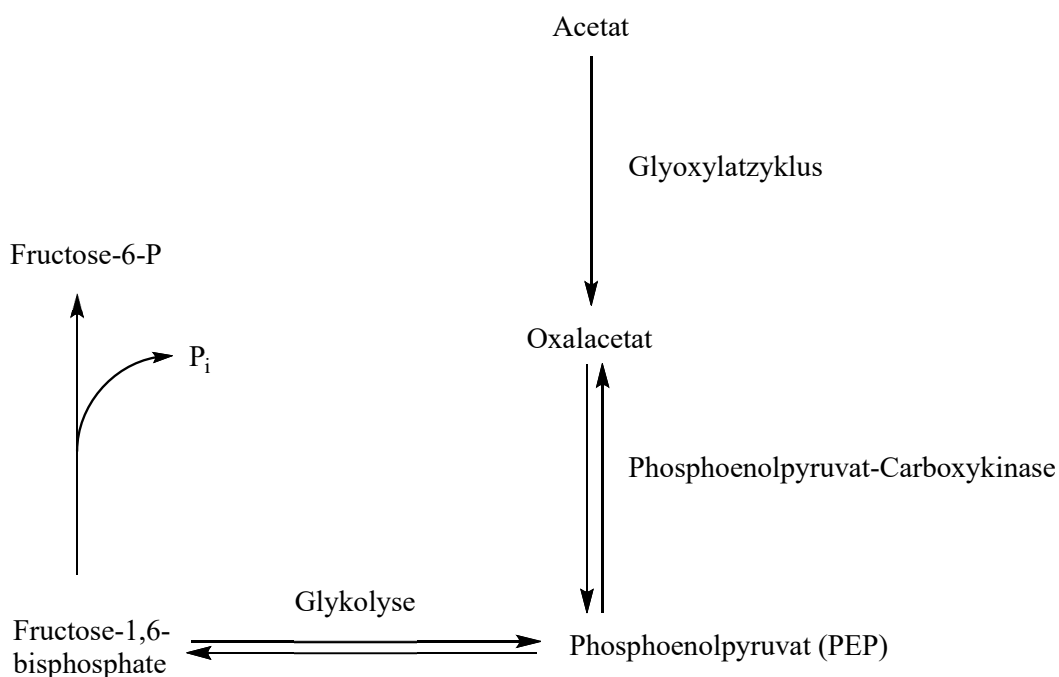
Mit der zunehmenden Trefferwahrscheinlichkeit und der Identifizierung weiterer vielversprechender Mehrfachmutanten konnte nicht nur das Ziel dieser Arbeit hinsichtlich der Optimierung von SmuA erfüllt werden. Daneben belegte dies die Umsetzbarkeit der anfangs entwickelten Hybrid-Strategie. Vielversprechend erscheint damit die Anwendbarkeit dieser Methodik auf andere Projekte, wo ein Hochdurchsatz-Screening nicht umsetzbar ist.

Ein mögliches Anwendungsfeld wäre das *Engineering* von Cytochrom P450 Enzymen, deren Produkte oftmals nicht mittels kolorimetrischer Tests nachweisbar sind, sondern erhöhtem analytischen Aufwand erfordern. Eingesetzt wird diese Enzymklasse häufig zur Produktion von Pharmazeutika und Grundchemikalien, aufgrund ihrer Eigenschaft, die regio- and stereoselektive Oxidation von C-H-Bindung zu katalysieren (Li *et al.*, 2020). Ein anderes Beispiel ist die Verbesserung der Stabilität der Aminosäure-Racemase aus *Pseudomonas putida* DSM 3263 gegenüber Methanol und Acetonitril, was ebenfalls mittels semi-rationalem *Protein Engineering* gelang (Femmer *et al.*, 2020).

### 4.3 Die Rolle des $\text{NAD}^+$ und $\text{NADP}^+$ im bakteriellen Metabolismus

Zu Beginn des Projekts zur Bildung von L-Lysin aus dem Erdölbegleitgas Ethan beinhaltete das Konzept des Ganzzellkatalysators *E. coli* die Bildung von NADH innerhalb des vierstufigen Abbaus von Ethan zu Acetaldehyd. Die dazu eingesetzten Enzyme waren zwar jeweils auf einen spezifischen Schritt spezialisiert, nämlich der der Katalyse von Ethanol zu Acetaldehyd und von Acetaldehyd zu Acetat, lieferten aber nicht das in den nachfolgenden Schritten so dringend benötigte NADPH, was wiederum essentiell für die Biosynthese von L-Lysin ist. Aus diesem Grund bildete die Verfügbarkeit von NADPH für die nachfolgenden Reaktionsschritte einen Flaschenhals der gesamten Biokatalysekette. Deshalb wurde das Ziel formuliert beide  $\text{NAD}^+$ -spezifischen Dehydrogenasen durch NADPH-bildende Enzyme zu ersetzen.

Grundsätzlich unterscheiden sich NAD(H) und NADP(H) in ihrer Verwendung im zellulären Energiemetabolismus. Während Oxidoreduktasen  $\text{NAD}^+$  für katabole Prozesse nutzen, findet NADP(H) im Anabolismus Verwendung (Takase *et al.*, 2014). Beispielsweise dient  $\text{NAD}^+$  der Acetaldehyd-Dehydrogenase aldB (CgALDH) im Ethanol-Stoffwechsel als Oxidationsmittel, denn ohne diesen Kofaktor wäre ein Wachstum auf Ethanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nicht möglich (Arndt *et al.*, 2008). In diesem besagten Fall findet die Umwandlung von Acetaldehyd zu Acetat statt, welches anschließend als Acetyl-CoA über den Citratzyklus und Glyoxylat-Zyklus zu Oxalacetat metabolisiert wird. Unter ATP-Verbrauch katalysiert die PEP-Carboxykinase dies zu Phosphoenolpyruvat (PEP). In dem Embden-Meyerhof-Parnas-Weg kann aus PEP Fructose-1,6-Bisphosphat synthetisiert werden, welches durch quasi irreversible Hydrolyse durch die Fructose-1,6-Bisphosphatase dem Gleichgewicht entzogen wird (Abb. 49) (Klingenberg, 1987).



**Abbildung 49:** Umwandlung von Acetat zu Fructose-6-Phosphat in *C. glutamicum* (Klingenberg, 1987).

In der Glykolyse dient  $\text{NAD}^+$  als Cosubstrat der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH). In dieser Reaktion wird Glycerinaldehyd-3-Phosphat unter Bildung von NADH zu 1,3-Bisphosphoglycerat oxidiert, wobei für jedes Glucosemolekül zwei  $\text{NAD}^+$  verbraucht werden. Um einen Stillstand der Glykolyse zu verhindern, dient Sauerstoff während des aeroben Wachstums letztlich als Hydridionen-Akzeptor. Da es sich bei *E. coli* um ein fakultativ anaerobes Bakterium handelt, wird auch bereits unter aeroben Bedingungen ein Teil der Glucose über den fermentativen Weg katabolisiert. Für die gemischte Säurefermentation werden die Hexosen über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg zu Pyruvat abgebaut. Eines der Endprodukte der Fermentation stellt Ethanol dar, welches aus Acetyl-CoA über zwei Reaktionsschritte gebildet wird. Beide Schritte werden durch das multifunktionelle Genprodukt der *AldE* katalysiert, welches bei der Reduktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd und weiter zu Ethanol zwei  $\text{NAD}^+$  generiert (Membrillo-Hernandez *et al.*, 2000).

#### 4.4 Die Acetaldehyddehydrogenase EcALDH aus *Escherichia coli*

Eine Möglichkeit zur Beseitigung des Flaschenhalses bietet die Nutzung der  $\text{NADP}^+$ -abhängigen Acetaldehyd-Dehydrogenase EcALDH, die in der frühen stationären Phase des bakteriellen Wachstums exprimiert wird und durch eine Datenbankrecherche identifiziert werden konnte. Mit einem  $K_M$ -Wert für  $\text{NADP}^+$  von  $92,3 \mu\text{M}$ , einem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0,14 \text{ s}^{-1}$  bzw. einer katalytischen Effizienz von  $1,5 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , erfüllt bereits das Wildtyp-Enzym das gewünschte Anforderungsprofil. Der  $K_M$ -Wert für Acetaldehyd wurde bei  $6,6 \mu\text{M}$  bestimmt, bei einem  $k_{\text{cat}}$  von  $0,21 \text{ s}^{-1}$  und einer katalytischen Effizienz von  $3,2 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Zudem war mit  $\text{NAD}^+$  als Cosubstrat auch im höheren millimolaren Bereich keine enzymatische Aktivität nachweisbar. Eine Substratinhibierung war zwar sowohl für  $\text{NADP}^+$  ( $K_I = 1.107 \mu\text{M}$ ) als auch für Acetaldehyd ( $K_I = 770 \mu\text{M}$ ) zu beobachten, wurde jedoch mit diesen relativ hohen Werten nicht als nachteilig für eine effiziente Umsetzung von Acetaldehyd zu Acetat im Gesamtzellkatalysator (Abb. 38) bewertet.

In der frühen stationären Wachstumsphase in einer Kultur werden die Nährstoffe im Medium zunehmend verbraucht mit der Folge, dass die Bakterienzelle Endprodukte ihres Stoffwechsels in das umgebende Milieu abgibt. Das *aldB*-Gen von *E. coli* kodiert für eine  $\text{NADP}^+$ -spezifische Acetaldehyd-Dehydrogenase EcALDH, die unter Generierung von NADPH Acetaldehyd zu Acetat oxidiert. Die Verwendung von  $\text{NADP}^+$  ist in diesem Schritt physiologisch von Vorteil, um nicht den  $\text{NAD}^+$ -Pool zu verringern und dennoch die Zelle von den toxischen Verbindungen Ethanol und Acetaldehyd zu schützen. Eine hohe Substrataffinität zu letzterem ist wesentlich, um das reaktive Acetaldehyd abzufangen und chemische Modifikationen zellulärer Bestandteile zu verhindern (Ho and Weiner, 2005). Das *aldB*-Gen steht unter der Kontrolle des Hauptregulators der bakteriellen Stressantwort RpoS (Xu and Johnson, 1995), welcher in der frühen stationären Phase exprimiert wird.

Des Weiteren spielt NADPH eine wichtige Rolle in der zellulären Antioxidation. So erfordern alle bekannten antioxidativen Abwehrsysteme NADPH als Reduktionsmittel, wie insbesondere die Regeneration von GSH aus GSSG durch die Glutathionreduktase. Das gebildete GSH wiederum ist essentiell für die Funktion mehrerer Antioxidationsenzyme, einschließlich der Glutathionperoxidasen und Glutathion-S-Transferasen (Ying, 2008, Agedal *et al.*, 2010).

#### 4.5 Molekulare Optimierung der Alkoholdehydrogenase EhADH1

Für die Umwandlung von Acetaldehyd zu Acetat wurde mit EcALDH die vielversprechendste Lösung gefunden, da bereits die natürliche Form der Dehydrogenase keinem weiteren *Protein-Engineering* bedurfte. Für den vorherigen Schritt in der Enzymkaskade hinsichtlich der Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd wurde kein schon passendes NADP<sup>+</sup>-abhängiges Enzym in *E. coli* gefunden. Ein durchaus vielversprechender Kandidat stellte die EhADH1 aus *Entamoeba histolytica* dar. Mit einer Michaelis-Konstante von 5,3 µM für NADP<sup>+</sup> wäre mit EhADH1 anstelle der gegenwärtig verwendeten CgADH eine effiziente Reduktion von NADP<sup>+</sup> möglich gewesen. Einschränkend war jedoch die Substratspezifität für längererkettige sekundäre Alkohole, insbesondere 2-Butanol, was sich an dem hohen K<sub>M</sub>-Wert von 19,2 mM für Ethanol widerspiegelte. Dementsprechend galt es, durch rationales *Protein-Engineering* die Substratelektivität unter Verkleinerung der Bindetasche zu Gunsten von Ethanol zu optimieren.

Dazu wurde wiederum die hier etablierte Strategie des „*Schiffe versenkens*“ eingesetzt. Dabei wurden 20 Einzelmutanten an neun verschiedenen Positionen, gefolgt von sieben Doppelmутanten, analysiert und diesmal also nur ein Viertel der Anzahl der Mutanten des oben beschriebenen SmuA-Projekts. Zu Beginn wurde ein Modell mit NADP<sup>+</sup> in der Kofaktorbindestelle und 2-Butanol im aktiven Zentrum erstellt. Dies erlaubte es Vorhersagen darüber zu treffen, welche Aminosäureaustausche eine Verkleinerung der Substratbindestelle zur Folge haben könnten. In dieser Hinsicht musste die Lage des NADP<sup>+</sup> gegenüber dem Zn<sup>2+</sup> im aktiven Zentrum beachtet werden, um den Ablauf der Hydridionenübertragung nicht zu beeinträchtigen. Die ersten Mutagenesen konzentrierten sich auf Positionen in der ersten Schale um das aktive Zentrum. Dies resultierte jedoch entweder in Komplikationen mit der Ausbildung der Quartärstruktur, sodass lediglich das inaktive Monomer mittels SEC gereinigt wurde, oder in homotetrameren Mutanten mit deutlich verringerten Aktivitäten.

Bereits strukturell moderate Mutationen, wie die Verlängerung aliphatischer Seitenketten, führten zu den geschilderten Komplikationen. Erst als der Fokus auf Aminosäurepositionen der zweiten und dritten Schale gelenkt wurde, gelang es, die erste Mutante Y267F zu identifizieren, welche einen Rückgang des K<sub>M</sub>-Werts für Ethanol auf 7,2 mM zeigte, begleitet von einer akzeptablen Verringerung der enzymatischen Aktivität. Basierend auf diesem ersten Teilerfolg konzentrierte sich Phase II auf die Region um den Rest Tyr267. Bei genauerer Analyse der benachbarten Positionen wurde ersichtlich, dass die Aminosäureabfolge der Region <sup>265</sup>VNYLGEG<sup>271</sup> mit der von TbADH übereinstimmte (Bogin *et al.*, 1997), abgesehen von Leu268. Entsprechend des an dieser Position in TbADH vorkommenden

Phenylalaninrests wurde folglich die Substitution L268F analysiert (Tabelle 27), basierend auf der Vermutung, dass eine Vergrößerung der Aminosäureseitenkette 268 das Volumen der Bindetasche verringern könnte. Die Mutante L268F zeigte eine insgesamt 5,5-fach niedrigere Michaelis-Konstante von 3,5 mM bei halbiertes Wechselzahl auf 0,33 s<sup>-1</sup>. Dies verdreifachte die katalytische Effizienz von 3,5 × 10<sup>-5</sup> auf 9,6 × 10<sup>-5</sup> μM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> gegenüber Ethanol im Vergleich zum Wildtyp Enzym. Hinsichtlich der Nutzung von NADP<sup>+</sup> als Kofaktor betrug der K<sub>M</sub>-Wert 10,9 μM, zusammen mit einem k<sub>cat</sub>-Wert von 0,34 s<sup>-1</sup>, was einer katalytischen Effizienz von 0,03 μM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> entspricht.

**Tabelle 27:** Analyse der kinetischen Parameter von EhADH1 und deren Punktmutante L268F. Entweder Ethanol (1 M) oder NADP<sup>+</sup> (200 μM) wurden jeweils als Cosubstrat im Überschuss zugegeben. n.d. = nicht detektiert.

Variante	K <sub>M</sub> [μM]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K <sub>I</sub> [μM]
<b>EhADH1</b>				
Ethanol	19,2	0,68	3,5 × 10 <sup>-5</sup>	
NAD <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	
NADP <sup>+</sup>	5,3	0,92	0,17	2.648
<b>EhADH1(L268F)</b>				
Ethanol	3,5 × 10 <sup>3</sup>	0,33	9,6 × 10 <sup>-5</sup>	
NAD <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	
NADP <sup>+</sup>	10,9	0,34	0,03	4.054

Darüber hinaus können die Erkenntnisse aus dieser Arbeit dazu beitragen, die Möglichkeiten der industriellen Verwertbarkeit des Erdölbegleitgases Ethan zu erweitern. Neben dem Einsatz als Heizgas im Erdgas dient es in der chemischen Industrie zur Gewinnung von Ethen durch thermisches Cracken oberhalb von 1.000 °C (Bhasin, 2003). Die wichtigsten Folgeprodukte des Ethens sind Polyethylen (56 %), Ethylendichlorid zur Herstellung von PVC (14 %), Ethylenoxid (11 %) und Ethylbenzol (7 %) zur Herstellung von Polystyrol. Mit Ausnahme des Ethylenoxids, das zur Herstellung von nichtionischen Tensiden verwendet wird, findet mehr als 75 % des Ethens zur Herstellung von Kunststoffen Verwendung (Keim, 2006).

Die in diesem Projekt entwickelten Enzyme zielen auf einen Gesamtprozess in *E. coli* für das Endprodukt L-Lysin ab (Abb. 7). Aber auch eine Umleitung des Reaktionspfads ausgehend von Ethan auf die Produktion anderer Aminosäuren ist vorstellbar. Beispielsweise könnte das in den Citratzyklus eingeschleuste Acetyl-CoA nicht zur Abzweigung von Oxalacetat sondern von α-Ketoglutarat dienen, welches wiederum durch die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) unter NADPH-Verbrauch zu L-Glutamat umgesetzt werden kann (Sakamoto *et al.*, 1975), dessen wachsendes Marktvolumen voraussichtlich 4 Millionen Tonnen im Jahr 2023 erreichen wird (Singh *et al.*, 2017). In Verbindung mit Oxalacetat wäre auch die Bildung von L-Aspartat von Interesse. Die Aspartat-Aminotransferase (ALT)

katalysiert die Übertragung der L-Aminogruppe von Glutamat auf Oxalacetat resultierend in der Bildung von L-Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat (Bergmeyer and Bernt, 1965). L-Aspartat kann entweder selbst als Endprodukt gereinigt und vermarktet werden oder in weiterführenden Reaktionsschritten zur Biosynthese von Methionin eingesetzt werden, wobei ebenfalls NADPH als Kofaktor eine entscheidende Rolle spielt (Li *et al.*, 2016). Diese Szenarien zeigen nicht nur die vielseitige Einsetzbarkeit eines solchen Ganzzellkatalysators, sondern auch die grundsätzlichen Vorteile, wenn wichtige Kofaktoren in initialen Reaktionsschritten synthetisiert werden und somit auf spätere kostenintensive Supplementierungen verzichtet werden kann.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene industriell relevante Enzyme für die biokatalytische Erzeugung von Isomalt und Lysin untersucht und dem Ziel *Protein Engineering* zur Optimierung der Produktspezifität unterworfen: die Saccharose-Isomerase SmuA aus *Serratia plymuthica* und die Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus *Entamoeba histolytica*.

Im Vergleich mit den meisten bislang charakterisierten Saccharose-Isomerasen stellt SmuA einen für die industrielle Biotechnologie hochattraktiven Biokatalysator dar hinsichtlich der ausgeprägten Präferenz für das Produkt Isomaltulose bei hoher katalytischer Effizienz (Goulter *et al.*, 2012, Aghajari *et al.*, 2009). Nachteilig ist jedoch die Bildung der Nebenprodukte Trehalulose, Glucose und Fructose im Produktgemisch. Grund dafür ist die verringerte Rieselfähigkeit des getrockneten Produkts bedingt durch die Hygroskopie der Trehalulose, was den Bedarf an einer SmuA-Variante mit höherer Produktelektivität bei gleichbleibend hoher Enzymaktivität begründet.

Die NADP<sup>+</sup>-abhängige Alkoholdehydrogenase EhADH1 aus *Entamoeba histolytica* (Kumar *et al.*, 1992) wurde hinsichtlich des Substrats Ethanol systematisch optimiert, um deren Anwendung in einem Gesamtzellkatalysator zur Herstellung von L-Lysin aus dem Erdölbegleitgas Ethan zu ermöglichen. Im Hinblick auf die erhöhte intrazelluläre Konzentration an NADPH, welche für die Biosynthese von L-Lysin essentiell ist, wurde zudem die NADP<sup>+</sup>-abhängige Acetaldehyddehydrogenase EcALDH aus *E. coli* charakterisiert, was die optimierte EhADH1 im Gesamtreaktionspfad komplementiert.

Zum *Enzyme Engineering* von SmuA und EhADH1 fand ein neuartiges Hybrid-Konzept Anwendung. Dieses verknüpfte drei wohletablierte Verfahren: (1) die gerichtete Zufallsmutagenese, bekannt aus dem konventionellen semi-rationalen *Protein Engineering*, (2) die rationale Vorhersage von Mutationen anhand der bekannten Kristallstruktur eines Proteins und (3) iterative Zyklen von Mutagenese und funktioneller Bewertung, bekannt aus der gerichteten Evolution. Aufgrund der Analogie dieser Strategie zu dem weltbekannten Brettspiel „*Schiffe versenken*“ wurde die hier verfolgte Vorgehensweise dementsprechend benannt.

Die aus *S. plymuthica* stammende Saccharose Isomerase SmuA wurde in *E. coli* produziert und charakterisiert. Dabei wurde schrittweise deutlicher, dass die in Vorarbeiten vernachlässigte N-terminale Signalsequenz für die Rolle als periplasmatisch lokalisiertes Enzym und dessen korrekte Faltung als Monomer in Gegenwart von Calcium essentiell ist. Dagegen resultierte die cytoplasmatische Expression in der fast ausschließlichen Bildung eines aus der publizierten Kristallstruktur nicht ersichtlichen Dimers, das überraschenderweise dennoch katalytisch aktiv ist. Folglich wurde für die Mutagenesestudie eine Sekretionsstrategie in *E. coli* gewählt, wobei die Überexpression des Monomers in mit Calcium supplementiertem Nährmedium erreicht werden konnte.

Mit der beschriebenen Hybrid-Strategie wurden insgesamt 56 Punktmutanten hergestellt, gereinigt und enzymatisch analysiert. Dabei gelang es, die Mutante Y219L zu identifizieren, welche 94,8 % Isomaltulose, nur noch 1,9 % Trehalulose und 3,4 % Monosaccharide produzierte, bei gleichbleibender



enzymatischer Aktivität und einem deutlich gesteigerten Verhältnis von Isomaltulose:Trehalulose von 48,8:1. Jedoch schien die verringerte Trehalulose-Produktion, die durch eine einzelne Mutation bewirkt werden konnte, bei 1,9 % ihr Minimum erreicht zu haben. Folglich wurden ausgewählte SmuA-Varianten gezielt kombiniert und analysiert. Mit der Konstruktion von Doppel-, Dreifach- und Vierfachvarianten, jeweils basierend auf dem vielversprechendsten Kandidaten der vorangegangenen Mutagenese-Zyklen, konnte die Trehalulose-Produktion mit der Mutante Y219L/T369F/D398G/F453Y auf 1,4 % reduziert werden. Der parallele schrittweise Anstieg der Produktion der Monosaccharide auf 6,6 % legte die Vermutung nahe, dass die eingeführten Mutationen nicht die Bildung von Isomaltulose begünstigen, sondern vielmehr die Isomerisierung zu Trehalulose behindern.

Hinsichtlich der Produktion von L-Lysin ausgehend von Ethanol wurde zunächst der Reaktionsschritt von Acetaldehyd zu Acetat verbessert. Aufgrund einer ausgedehnten Datenbankrecherche wurde das NADP<sup>+</sup>-abhängige Enzym EcALDH aus *E. coli* identifiziert, welches die zuvor verwendete NAD<sup>+</sup>-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* vorteilhaft ersetzen konnte. Mit einem K<sub>M</sub>-Wert für NADP<sup>+</sup> von 92,3 μM, einem k<sub>cat</sub> von 0,14 s<sup>-1</sup> bzw. einer katalytischen Effizienz von 1,5 × 10<sup>-3</sup> μM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> und einem K<sub>M</sub>-Wert für Acetaldehyd von 6,6 μM, einem k<sub>cat</sub> von 0,21 s<sup>-1</sup> sowie einer katalytischen Effizienz von 3,2 × 10<sup>-2</sup> μM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> erschien EcALDH ohne weiteren Aminosäureaustausch als geeignet für einen Ganzzellkatalysator. Interessanterweise wurde damit ein Enzym gewählt, das zwar im Genom des verwendeten Wirtsstamms schon kodiert war, aber nicht unter den gegebenen Bedingungen überexprimiert wurde.

Zur Optimierung des vorgelagerten Reaktionsschritts von Ethanol zu Acetaldehyd fand erneut das Konzept des „*Schiffe versenkens*“ Anwendung, diesmal an dem Enzym EhADH1. Dabei wurde der Aminosäureaustausch L268F als die beste Punktmutation identifiziert. EhADH1(L268F) zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine 5,5-fach niedrigere Michaelis-Konstante von 3,5 mM bei nur halbiertes Wechselzahl von 0,33 s<sup>-1</sup>. Dies verdreifachte die katalytische Effizienz von 3,5 × 10<sup>-5</sup> auf 9,6 × 10<sup>-5</sup> μM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Hinsichtlich des gewünschten Cosubstrats NADP<sup>+</sup> betrug der K<sub>M</sub>-Wert 10,9 μM, zusammen mit einem k<sub>cat</sub> von 0,34 s<sup>-1</sup>, was zu einer beachtlichen katalytischen Effizienz von 0,03 μM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> führte.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AS	Aminosäure
aTc	Anhydrotetracyclin
bla	Gen für die $\beta$ -Lactamase
bp	Base pair, Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI-MS	Elektrospray Ionisierung-Massenspektrometrie
$E_x$	Extinktion bei x nm
$\epsilon_x$	Extinktionskoeffizient bei x nm
g	Erdbeschleunigung
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mt	Metrische Tonnen
OD <sub>550</sub>	Optische Dichte bei 550 nm
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
RIU	<i>Refractive Index Unit</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SAC	Streptavidin-Affinitätschromatographie
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

## 7. Literaturverzeichnis

- AGHAJARI, N., LIPSKI, A., RAVAUD, S., EACUTE, PHANIE, ROBERT, X., WATZLAWICK, H., MATTES, R. & HASER, R. 2009. Structure/Function relationships of sucrose isomerases with different product specificity. *Journal of Applied Glycoscience Supplement*, 2009, 137-137.
- AGLEDAL, L., NIERE, M. & ZIEGLER, M. 2010. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Rep*, 15, 2-10.
- ARNDT, A., AUCHTER, M., ISHIGE, T., WENDISCH, V. F. & EIKMANNNS, B. J. 2008. Ethanol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 15, 222-33.
- ARNOLD, F. H. 2018. Directed evolution: bringing new chemistry to life. *Angewandte Chemie International Edition*, 57, 4143-4148.
- AROONNUAL, A., NIHIRA, T., SEKI, T. & PANBANGRED, W. 2007. Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1221-1227.
- AUCHTER, M., CRAMER, A., HUSER, A., RUCKERT, C., EMER, D., SCHWARZ, P., ARNDT, A., LANGE, C., KALINOWSKI, J., WENDISCH, V. F. & EIKMANNNS, B. J. 2011. RamA and RamB are global transcriptional regulators in *Corynebacterium glutamicum* and control genes for enzymes of the central metabolism. *J Biotechnol*, 154, 126-39.
- BÄCKER, T. 2012. *Verbesserung der Löslichkeit und kinetische Charakterisierung eines bakteriellen Enzyms*. Bachelorthesis, Technische Universität München.
- BECKER, J. & WITTMANN, C. 2012. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production - the heartbeat of industrial strain development. *Curr Opin Biotechnol*, 23, 718-26.
- BECKER, J., ZELDER, O., HAFNER, S., SCHRODER, H. & WITTMANN, C. 2011. From zero to hero - design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab Eng*, 13, 159-68.
- BELITZ, H., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. 2008. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer, Berlin*, 259.
- BERGMEYER, H.-U. & BERNT, E. 1965. Glutamate-Oxaloacetate Transaminase. In: BERGMEYER, H.-U. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press.
- BHASIN, M. M. 2003. Is True Ethane Oxydehydrogenation Feasible? *Topics in Catalysis*, 23, 145-149.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- BLACKER, T. S. & DUCHEN, M. R. 2016. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med*, 100, 53-65.
- BOEL, E., BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z., DODSON, G. G., JENSEN, V. J., PETERSEN, S. B., SWIFT, H., THIM, L. & WOLDIKE, H. F. 1990. Calcium binding in .alpha.-amylases: an x-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, 29, 6244-6249.
- BOGIN, O., PERETZ, M. & BURSTEIN, Y. 1997. Thermoanaerobacter brockii alcohol dehydrogenase: characterization of the active site metal and its ligand amino acids. *Protein Sci*, 6, 450-8.
- BOLTEN, C. J., SCHRODER, H., DICKSCHAT, J. & WITTMANN, C. 2010. Towards methionine overproduction in *Corynebacterium glutamicum* methanethiol and dimethylsulfide as reduced sulfur sources. *J Microbiol Biotechnol*, 20, 1196-203.
- BÖRNKE, F., HAJIREZAEI, M. & SONNEWALD, U. 2001. Cloning and Characterization of the Gene Cluster for Palatinose Metabolism from the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia rhapontici*. *Journal of Bacteriology*, 183, 2425-2430.
- BORNSCHEUER, U. T. & POHL, M. 2001. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 137-143.
- CAMMENGA, H. K. & ZIELASKO, B. 1996. Thermal behaviour of isomalt. *Thermochimica Acta*, 271, 149-153.
- CARTARIUS, R., KRAUSE, T. & VOGEL, H. 2003. Catalyst Development for the Reductive Amination of Isomaltulose. *Engineering in Life Sciences*, 3, 327-333.

- CHEETHAM, P. S. J., IMBER, C. E. & ISHERWOOD, J. 1982. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. *Nature*, 299, 628-631.
- DESAI, N. B. 1990. Esters of sucrose and glucose as cosmetic materials. As renewable natural resources, carbohydrates are gaining importance as chemical raw materials. *Cosmetics & Toiletries*, 105, 99-100, 102-107.
- DIAMOND, L. S. & CLARK, C. G. 1993. A Redescription of *Entamoeba Histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It From *Entamoeba Dispar* Brumpt, 19251. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40, 340-344.
- DÖRR, EVERS H., GUDERJAHN LDR, KOWALCZYK JDR & J-K., N. 2005. *Alkoholarme Biere oder bierähnliche Erfrischungsgetränke mit Palatinose*.
- EGGENSTEIN, E. 2017. *Konstruktion von bifunktionellen Anticalin-Fusionsproteinen für die gerichtete Diagnostik/Therapie*. Dissertation.
- EVONIK 2017. Pressemitteilung. <https://corporate.evonik.de/de/presse/pressemitteilungen/nutrition-und-care/premiere-fuer-risumalt-auf-der-fi-asia-in-thailand-105517.html>.
- FEMMER, C., BECHTOLD, M. & PANKE, S. 2020. Semi-rational engineering of an amino acid racemase that is stabilized in aqueous/organic solvent mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, 117, 2683-2693.
- GANGOLA, P. & ROSEN, B. P. 1987. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 262, 12570-4.
- GEBAUER, M. 2013. *Kombinatorisches Design und funktionelle Charakterisierung von Anticalinen gegen die Extra-Domäne B in onkofetalem Fibronectin*. Dissertation.
- GOLDBECK, O., ECK, A. W. & SEIBOLD, G. M. 2018. Real Time Monitoring of NADPH Concentrations in *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* via the Genetically Encoded Sensor mBFP. *Frontiers in microbiology*, 9, 2564-2564.
- GÖRL, J., TIMM, M. & SEIBEL, J. 2012. Mechanism-oriented redesign of an isomaltulose synthase to an isomelezitose synthase by site-directed mutagenesis. *ChemBioChem*, 13, 149-156.
- GOUFFI, K., PICA, N., PICHEREAU, V. & BLANCO, C. 1999. Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and environmental microbiology*, 65, 1491-1500.
- GOULTER, K. C., HASHIMI, S. M. & BIRCH, R. G. 2012. Microbial sucrose isomerases: producing organisms, genes and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 57-64.
- GOYAL, S. K., SAMSHER & GOYAL, R. K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr*, 61, 1-10.
- GREMBECKA, M. 2015. Sugar alcohols: their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, 241, 1-14.
- GUNTHER, J., SHAFIR, S., BRISTOW, B. & SORVILLO, F. 2011. Short report: Amebiasis-related mortality among United States residents, 1990-2007. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85, 1038-1040.
- HAMADA, S. 2002. Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries. *Pure and Applied Chemistry*.
- HAQUE, R., NEVILLE, L. M., HAHN, P. & PETRI, W. A. 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2558.
- HO, K. K. & WEINER, H. 2005. Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 187, 1067-1073.
- INGRAM, L. O. 1989. Ethanol Tolerance in Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9, 305-319.
- JUNG, J. H., KIM, M. J., JEONG, W. S., SEO, D. H., HA, S. J., KIM, Y. W. & PARK, C. S. 2017. Characterization of divergent pseudo-sucrose isomerase from *Azotobacter vinelandii*: Deciphering the absence of sucrose isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 483, 115-121.
- KAMARULZAMAN, N. H., JAMAL, K., VIJAYAN, G. & AB. JALIL, S. M. 2014. Will Consumers Purchase Stevia as a Sugar Substitute?: An Exploratory Study on Consumer Acceptance. *Journal of Food Products Marketing*, 20, 122-139.
- KANDELMAN, D. 1997. Sugar, alternative sweeteners and meal frequency in relation to caries prevention: new perspectives. *Br J Nutr*, 77 Suppl 1, S121-8.

- KAWAGUTI, H. Y., CELESTINO, É. M., MORAES, A. L. L., YIM, D. K., YAMAMOTO, L. K. & SATO, H. H. 2010. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia sp.* D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 211-217.
- KEIM, W. 2006. Herstellung der wichtigsten Kunststoffe. *Kunststoffe*.
- KIRMAIR, L. 2017. *Charakterisierung und funktionelle Optimierung von Enzymen für die biotechnologische Synthese von Polyamid-12-Bausteinen*. Dissertation.
- KLINGENBERG, P. 1987. G. Gottschalk: Bacterial Metabolism. 2. Aufl. 359 Seiten, 204 Abb. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1986. Preis: 98,— DM. *Food / Nahrung*, 31, 448-448.
- KORKHIN, Y., KALB, A. J., PERETZ, M., BOGIN, O., BURSTEIN, Y. & FROLOW, F. 1998. NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J Mol Biol*, 278, 967-81.
- KOTRBOVA-KOZAK, A., KOTRBA, P., INUI, M., SAJDOK, J. & YUKAWA, H. 2007. Transcriptionally regulated adhA gene encodes alcohol dehydrogenase required for ethanol and n-propanol utilization in *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 1347-56.
- KRASTANOV, A., BLAZHEVA, D. & STANCHEV, V. 2007. *Sucrose conversion into palatinose with immobilized Serratia plymuthica cells in a hollow-fibre bioreactor*.
- KRASTANOV, A. & YOSHIDA, T. 2003. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 593-8.
- KRATZERT, A. 2012. *Expression and characterization of the sucrose isomerase SmuA from Protaminobacter rubrum*. Praktikumsbericht, Technische Universität München.
- KUMAR, A., SHEN, P. S., DESCOTEAUX, S., POHL, J., BAILEY, G. & SAMUELSON, J. 1992. Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10188-92.
- LEE, A., ZUMBE, A. & STOREY, D. 1994. Breath hydrogen after ingestion of the bulk sweeteners sorbitol, isomalt and sucrose in chocolate. *British Journal of Nutrition*, 71, 731-737.
- LEE, H. C., KIM, J. H., KIM, S. Y. & LEE, J. K. 2008. Isomaltose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from *Protaminobacter rubrum*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5183-94.
- LERCHNER, A., JARASCH, A. & SKERRA, A. 2016. Engineering of alanine dehydrogenase from *Bacillus subtilis* for novel cofactor specificity. *Biotechnol Appl Biochem*, 63, 616-624.
- LI, L. 2018. *Gentechnische Herstellung und Charakterisierung mikrobieller Acetaldehyd-Dehydrogenasen*. Technische Universität München.
- LI, S., CAI, H., QING, Y., REN, B., XU, H., ZHU, H. & YAO, J. 2011. Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for isomaltulose hyperproduction. *Appl Biochem Biotechnol*, 163, 52-63.
- LI, Y., CONG, H., LIU, B., SONG, J., SUN, X., ZHANG, J. & YANG, Q. 2016. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109, 1185-1197.
- LI, Z., JIANG, Y., GUENGERICH, F. P., MA, L., LI, S. & ZHANG, W. 2020. Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *J Biol Chem*, 295, 833-849.
- LINA, B. A., JONKER, D. & KOZIANOWSKI, G. 2002. Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies. *Food Chem Toxicol*, 40, 1375-81.
- LINA, B. A., SMITS-VAN PROOIJJE, A. E. & WAALKENS-BERENDSEN, D. H. 1997. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (Palatinose) in rats. *Food Chem Toxicol*, 35, 309-14.
- LIPSKI, A., RHIMI, M., HASER, R. & AGHAJARI, N. 2010. Structure/Function Relationships of Sucrose Isomerases with Different Product Specificity. *Journal of Applied Glycoscience*, 57, 219-228.
- LIU, J., WU, J. & CHEN, S. 2016. [Expression and production optimization of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* in *Escherichia coli*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 32, 1070-1080.

- LO, H. S. & CHANG, C. J. 1982. Purification and properties of NADP-linked, alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol*, 68, 372-7.
- LO, J., ZHENG, T., HON, S., OLSON, D. G. & LYND, L. R. 2015. The bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase gene, adhE, is necessary for ethanol production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *J Bacteriol*, 197, 1386-93.
- LOFTUS, B., ANDERSON, I., DAVIES, R., ALSMARK, U. C. M., SAMUELSON, J., AMEDEO, P., RONCAGLIA, P., BERRIMAN, M., HIRT, R. P., MANN, B. J., NOZAKI, T., SUH, B., POP, M., DUCHENE, M., ACKERS, J., TANNICH, E., LEIPPE, M., HOFER, M., BRUCHHAUS, I., WILLHOEFT, U., BHATTACHARYA, A., CHILLINGWORTH, T., CHURCHER, C., HANCE, Z., HARRIS, B., HARRIS, D., JAGELS, K., MOULE, S., MUNGALL, K., ORMOND, D., SQUARES, R., WHITEHEAD, S., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., NORBERTCZAK, H., PRICE, C., WANG, Z., GUILLÉN, N., GILCHRIST, C., STROUP, S. E., BHATTACHARYA, S., LOHIA, A., FOSTER, P. G., SICHERITZ-PONTEN, T., WEBER, C., SINGH, U., MUKHERJEE, C., EL-SAYED, N. M., PETRI, W. A., CLARK, C. G., EMBLEY, T. M., BARRELL, B., FRASER, C. M. & HALL, N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433, 865-868.
- LUTZ, S. 2010. Beyond directed evolution: semi-rational protein engineering and design. *Current opinion in biotechnology*, 21, 734-743.
- LUTZ, S. & PATRICK, W. M. 2004. Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr Opin Biotechnol*, 15, 291-7.
- MAKINEN, K. K. 2011. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. *Med Princ Pract*, 20, 303-20.
- MEMBRILLO-HERNANDEZ, J., ECHAVE, P., CABISCOL, E., TAMARIT, J., ROS, J. & LIN, E. C. 2000. Evolution of the adhE gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J Biol Chem*, 275, 33869-75.
- MORTENSEN, A. 2006. Sweeteners permitted in the European Union, Safety aspects. *Food & Nutrition Research*, 50, 104-116.
- MUNIR, M. 1983. Verfahren zur Herstellung von Isomaltulose (6-0-alpha-D-Glucopyranosido-D-fructose) mit Hilfe von immobilisierten Bakterienzellen. *European Patent Office* EP0091063A2.
- NAKAJIMA, Y. 1984. Palatinose production by immobilized  $\alpha$ -glucosyltransferase. *Proc. Res. Soc. Sugar Ref. Technol.*, 33, 55-63.
- NELSON, D. & COX, M. 2009. *Lehninger Biochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- NOLL-BORCHERS, M. & KUNZ, M. 1994. From 3'-Keto-Isomaltulose to Polymers. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 13, 1215-1223.
- NOTONIER, S., GRICMAN, Ł., PLEISS, J. & HAUER, B. 2016. Semirational Protein Engineering of CYP153AM.aq.-CPRBM3 for Efficient Terminal Hydroxylation of Short- to Long-Chain Fatty Acids. *ChemBioChem*, 17, 1550-1557.
- OOSHIMA, T., IZUMITANI, A., MINAMI, T., FUJIWARA, T., NAKAJIMA, Y. & HAMADA, S. 1991. Trehalulose Does Not Induce Dental Caries in Rats Infected with *Mutans Streptococci*. *Caries Research*, 25, 277-282.
- PACE, C. N., VAJDOS, F., FEE, L., GRIMSLEY, G. & GRAY, T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, 4, 2411-23.
- PARPOT, P., MUIUANE, V. P., DEFONTAINE, V. & BETTENCOURT, A. P. 2010. Electrocatalytic oxidation of readily available disaccharides in alkaline medium at gold electrode. *Electrochimica Acta*, 55, 3157-3163.
- POLLAK, N., DOLLE, C. & ZIEGLER, M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem J*, 402, 205-18.
- PRITCHARD, L., CORNE, D., KELL, D., ROWLAND, J. & WINSON, M. 2005. A general model of error-prone PCR. *Journal of Theoretical Biology*, 234, 497-509.
- RAVAUD, S., ROBERT, X., WATZLAWICK, H., HASER, R., MATTES, R. & AGHAJARI, N. 2007. Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization. *J Biol Chem*, 282, 28126-36.

- RAVAUD, S., ROBERT, X., WATZLAWICK, H., HASER, R., MATTES, R. & AGHAJARI, N. 2009. Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS Letters*, 583, 1964-1968.
- RAVAUD, S., WATZLAWICK, H., HASER, R., MATTES, R. & AGHAJARI, N. 2005. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Acta Crystallogr Sect F*, 61, 100-103.
- RAVAUD, S., WATZLAWICK, H., HASER, R., MATTES, R. & AGHAJARI, N. 2006. Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 62, 74-6.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. 2006. *Biologie der Pflanzen*, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- REN, B., LI, S., XU, H., FENG, X. H., CAI, H. & YE, Q. 2011. Purification and characterization of a highly selective sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34, 629-37.
- RHIMI, M., HASER, R. & N., A. 2008. Bacterial sucrose isomerases: properties and structural studies. *Biologia*, 63, 1020-1027.
- RODRIGUEZ, M. A., BAEZ-CAMARGO, M., DELGADILLO, D. M. & OROZCO, E. 1996. Cloning and expression of an *Entamoeba histolytica* NAPD+(-)dependent alcohol dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta*, 1306, 23-6.
- RONCHI, J. A., FIGUEIRA, T. R., RAVAGNANI, F. G., OLIVEIRA, H. C., VERCESI, A. E. & CASTILHO, R. F. 2013. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med*, 63, 446-56.
- ROSE & KUNZ 2002. Production of Isomalt. *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft*, 241, 75-80.
- SAKAMOTO, N., KOTRE, A. M. & SAVAGEAU, M. A. 1975. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology*, 124, 775-783.
- SALVUCCI, M. E. 2003. Distinct sucrose isomerases catalyze trehalulose synthesis in whiteflies, *Bemisia argentifolii*, and *Erwinia rhapontici*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135, 385-95.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATI, S. T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMUELSON, J., ZHANG, W. W., KUMAR, A., DESCOTEAUX, S., SHEN, P. S. & BAILEY, G. 1992. Primary structures of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 23, 31-3.
- SARGEAUNT, P. G., WILLIAMS, J. E. & GRENE, J. D. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 519-521.
- SÁSKA, Z., DREDÁN, J., BALOGH, E., LUHN, O., SHAFIR, G. & ANTAL, I. 2010. Effect of isomalt as novel binding agent on compressibility of poorly compactable paracetamol evaluated by factorial design. *Powder Technology*, 201, 123-129.
- SAWADA, K., ZEN-IN, S., WADA, M. & YOKOTA, A. 2010. Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Metab Eng*, 12, 401-7.
- SCHIWECK, H., MUNIR, M., RAPP, K., SCHNEIDER, B. & VOGEL, M. 1990. New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Zuckerindustrie*, 115, 555-565.
- SCHLAPSCHY, M. 2002. *Konstruktion eines bispezifischen F(ab)2-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms*. Dissertation.
- SCHLEHUBER, S. & SKERRA, A. 2002. Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem*, 96, 213-28.
- SCHMIDT, T. G. & SKERRA, A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, 2, 1528-35.



- SCHONERT, S., BUDER, T. & DAHL, M. K. 1998. Identification and enzymatic characterization of the maltose-inducible alpha-glucosidase MalL (sucrase-isomaltase-maltase) of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 180, 2574-8.
- SEIBOTH, J. 2013. *Löslichkeitsoptimierung einer Saccharose-Isomerase*. Masterthesis, Technische Universität München.
- SHIMON, L. J., PERETZ, M., GOIHERBERG, E., BURSTEIN, Y. & FROLOW, F. 2002. Thermophilic alcohol dehydrogenase from the mesophile *Entamoeba histolytica*: crystallization and preliminary X-ray characterization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58, 546-8.
- SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A. & MEHTA, P. K. 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, 7, 15.
- SKERRA, A. 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, 151, 131-5.
- STEMMER, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370, 389-391.
- SUN, F., DAI, C., XIE, J. & HU, X. 2012. Biochemical issues in estimation of cytosolic free NAD/NADH ratio. *PloS one*, 7, e34525-e34525.
- TAKASE, R., MIKAMI, B., KAWAI, S., MURATA, K. & HASHIMOTO, W. 2014. Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 289, 33198-33214.
- THOMPSON, J., ROBRISH, S. A., IMMEL, S., LICHTENTHALER, F. W., HALL, B. G. & PIKIS, A. 2001. Metabolism of sucrose and its five linkage-isomeric alpha-D-glucosyl-D-fructoses by *Klebsiella pneumoniae*. Participation and properties of sucrose-6-phosphate hydrolase and phospho-alpha-glucosidase. *J Biol Chem*, 276, 37415-25.
- TIWARI, M. K., SINGH, R., SINGH, R. K., KIM, I.-W. & LEE, J.-K. 2012. Computational approaches for rational Design of Proteins with novel Functionalities *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, e201204002.
- TYLAR SEIYA, F., PATRICK, B. & DIANNE, K. 2018. Rational Design Protein Engineering Through Crowdsourcing. *Journal of Student Research*, 6.
- VERONESE, T. & PERLOT, P. 1998. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS Lett*, 441, 348-52.
- VOET D., VOET J. G. & PRATT C.W. 2002. *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH.
- WATZLAWICK, H. & MATTES, R. 2009. Gene cloning, protein characterization, and alteration of product selectivity for the trehalulose hydrolase and trehalulose synthase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7026-7036.
- WEIDENHAGEN, R. & LORENZ, S. 1957. Ein neues bakterielles Umwandlungsprodukt der Saccharose. *Angewandte Chemie*, 69, 641-641.
- WU, L. & BIRCH, R. G. 2004. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *J Appl Microbiol*, 97, 93-103.
- WU, L. & BIRCH, R. G. 2005. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1581-90.
- XU, J. & JOHNSON, R. C. 1995. aldB, an RpoS-dependent gene in *Escherichia coli* encoding an aldehyde dehydrogenase that is repressed by Fis and activated by Crp. *J Bacteriol*, 177, 3166-75.
- XU, Z., LI, S., LI, J., LI, Y., FENG, X., WANG, R., XU, H. & ZHOU, J. 2013. The structural basis of *Erwinia rhapsodica* isomaltulose synthase. *PLoS One*, 8, e74788.
- YAN, B. X. & SUN, Y. Q. 1997. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J Biol Chem*, 272, 3190-4.
- YAO, S. & MIKKELSEN, M. J. 2010. Identification and overexpression of a bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for ethanol production in *Thermoanaerobacter mathranii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 19, 123-33.
- YING, W. 2008. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, 10, 179-206.
- ZHANG, D., LI, N., SWAMINATHAN, K. & ZHANG, L.-H. 2003. A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase. *FEBS Letters*, 534, 151-155.

ZHOU, Y. J., YANG, W., WANG, L., ZHU, Z., ZHANG, S. & ZHAO, Z. K. 2013. Engineering NAD(+) availability for *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis: a case study for dihydroxyacetone production. *Microbial cell factories*, 12, 103-103.