

Biochemische und strukturelle Charakterisierung nicht
klassifizierter Glykosidhydrolasen aus anaeroben, thermophilen
Bakterien

Melanie Julia Baudrexl

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität
München zur Erlangung einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Wilfried Schwab

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Prof. Dr. J. Philipp Benz

Die Dissertation wurde am 30.05.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 25.09.2023 angenommen

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Zusammenfassung	VI
III.	Abstract	VIII
IV.	Veröffentlichungen	X
V.	Integration betreuter studentischer Arbeiten.....	XII
VI.	Abbildungsverzeichnis.....	XIII
VII.	Tabellenverzeichnis.....	XVI
VIII.	Abkürzungsverzeichnis.....	XVIII
1	Einleitung.....	1
1.1	Biomasse – Einteilung der Polysaccharide	1
1.2	Biomasse abbauende Enzyme und ihre Klassifizierung	6
1.2.1	Katalytische Mechanismen von Glykosidhydrolasen.....	7
1.2.2	Klassifizierung von Glykosidhydrolasen	8
1.2.3	Aktivitäten bestimmter Glykosidhydrolasen.....	10
1.3	Industrielle Anwendung von Glykosidhydrolasen	12
1.4	Charakterisierungsmethoden von Kohlenhydraten und Hydrolyseprodukten von CAZymes	14
1.5	Einflüsse auf die Spezifität eines Enzyms	16
1.6	Ursprungsorganismen der in dieser Arbeit untersuchten, neuen Glykosidhydrolasen.....	16
1.6.1	Ausgewählte mesophile Bakterien	17
1.6.2	Ausgewählte thermophile und hyperthermophile Bakterien	17
1.7	Identifizierung neuer Glykosidhydrolasen und Auffinden neuer Aktivitäten.....	19
1.8	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte, Software und spezielle Gebrauchsmaterialien und Chemikalien	23
2.1.2	Nährmedien, Zusätze, Enzyme, Puffer und Lösungen	26
2.1.3	Bakterienstämme.....	32
2.1.4	Oligonukleotide	34
2.1.5	Plasmide.....	36
2.1.6	Substrate für Aktivitätstests	37

2.2	Bioinformatische Methoden und Web-Tools	39
2.2.1	Phylogenetische Analyse von Proteinen	40
2.2.2	Identifizierung möglicher katalytischer Aminosäuren durch strukturelles Alignment ..	40
2.3	Gentechnische Methoden	40
2.3.1	Isolation und Reinigung von DNA	40
2.3.2	Agarosegelelektrophorese	42
2.3.3	Spezifische Spaltung von DNA - Restriktionsverdau	42
2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	43
2.3.5	Ortsgerichtete Mutagenese via PCR	45
2.3.6	Assemblierung von komplementärer dsDNA mittels Gibson Assembly	45
2.3.7	Klonierungsstrategie für <i>Ts_Axh43A</i> -Enzymvarianten.....	45
2.4	Mikrobiologische Methoden	47
2.4.1	Kultivierung von anaeroben <i>Caldicellulosiruptor</i> Stämmen.....	47
2.4.2	Erstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	47
2.4.3	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	48
2.4.4	Heterologe Produktion von Proteinen.....	48
2.4.4.1	Verwendung von <i>E. coli</i> BL21 Star und ZY-5052-Autoinduktionsmedium	48
2.4.4.2	Verwendung von <i>E. coli</i> Arctic Express und Induktion mit IPTG.....	48
2.4.5	Gewinnung des Zellextraktes	49
2.4.6	Nickel-Affinitätschromatographie zur Proteinreinigung.....	49
2.5	Proteinbiochemische Methoden	51
2.5.1	SDS-PAGE.....	51
2.5.2	Westernblot.....	52
2.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	52
2.5.4	Gelfiltration	53
2.5.5	Schmelztemperaturbestimmung mittels <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF)	53
2.5.6	Sekundärstrukturanalyse mittels Zirkulardichroismus Spektroskopie	54
2.5.7	Aktivitätstest mit Arylglykosiden – <i>pNP</i> -Assay	54

2.5.8	Enzymatische Hydrolyse von Oligosacchariden, Polysacchariden und anderen natürlichen Substraten	58
2.5.9	Quantifizierung reduzierender Zucker in einer Lösung mittels DNSA	58
2.5.10	Visualisierung und Identifizierung von Sacchariden mittels Dünnschichtchromatographie	59
2.5.11	Identifizierung und Quantifizierung von Kohlenhydraten mittels HPAEC-PAD.....	59
2.5.12	Kristallstrukturanalyse	60
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Auswahl der zu charakterisierenden putativen Glykosidhydrolasen.....	63
3.2	Klonierung von Glykosidhydrolasen, Mutanten und ausgewählten Modulen in pET24c	65
3.3	Produktion von löslichen Glykosidhydrolasen.....	66
3.4	Screening nach Glykosidhydrolaseaktivitäten	69
3.4.1	Screening von <i>Tm_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> und <i>Re_Xyl</i> produzierenden <i>E. coli</i> BL21 Überständen gegenüber verschiedenen Polysacchariden	70
3.4.2	Screening von <i>Tm_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> , <i>Re_Xyl</i> und <i>Me_Xyl</i> gegenüber <i>pNP</i> -Glykosiden	72
3.4.3	Enzymatisch vorverdautes Stroh, Arabinoxylan und Xylan als mögliche Substrate für <i>Tm_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> und <i>Re_Xyl</i>	73
3.5	Rhamnosidaseaktivität neuer GH106-Enzyme: <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> , <i>Ts_Ram106B</i>	75
3.5.1	Sequenzähnlichkeiten der gewählten GH106-ähnlichen Enzyme mit und ohne Aktivität gegenüber <i>pNPR</i>	75
3.5.2	Charakterisierung der α -Rhamnosidaseaktivitäten mit <i>pNPR</i>	78
3.5.3	Charakterisierung der α -Rhamnosidasen in Anwesenheit von 1 mM CoCl_2	81
3.5.4	Aktivität gegenüber dem natürlichen Glykoflavonon Naringin.....	86
3.6	GH159 Galaktofuranosidasen mit Arabinofuranosidaseaktivität	89
3.6.1	Aktivität gegenüber <i>pNP</i> - β -D-Galaktofuranosid	89
3.6.2	Biochemische Charakterisierung als Arabinofuranosidase mit <i>pNPA</i> als Substrat.....	92
3.6.3	Aktivität gegenüber AXOS	96
3.6.4	Untersuchung der Aktivität gegenüber Arabinogalaktan und anderen Arabinose enthaltenden Polysacchariden	96

3.6.5	Gezielte Mutagenese bestätigt D19, D142 und E190 als katalytische Aminosäuren	97
3.6.6	Aktivitätsverlust durch Substitution von D19, D142 und E190 in <i>Ch_Gaf159A</i> mit Alanin ist nicht auf inkorrekte Faltung zurückzuführen.....	99
3.6.7	Kristallisierung von <i>Ch_Gaf159A</i>	101
3.6.7.1	Aufklärung der Apostruktur von <i>Ch_Gaf159A</i>	101
3.6.7.2	Versuch der Ligandierung von <i>Ch_Gaf159A</i> mit E190Q und H244N Mutanten	104
3.7	Multimodulare GH43 Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase <i>Ts_Axh43A</i> und enzymatischer Synergismus.....	106
3.7.1	Stabilität der heterolog produzierter <i>Ts_Axh43A</i> -Derivate mit <i>Axh43A</i> Modulen	106
3.7.1.1	Instabilität der Enzymvarianten, die die GH43_C2 Domäne enthalten.	106
3.7.1.2	Schmelztemperaturen der einzeln exprimierten Module und Varianten von <i>Ts_Axh43A</i>	109
3.7.2	α -Arabinosidaseaktivität der <i>Ts_Axh43A</i> -Varianten und -Modulkombinationen.....	110
3.7.2.1	<i>p</i> NPAase Aktivität	110
3.7.2.2	Aktivität gegenüber dem Polysaccharid Arabinoxylan (AX) und Synergismus durch Kombination von <i>Ts_Axh43A</i> -Varianten	111
3.7.3	Spezifitäten von <i>Ts_Axh43A</i> und seinen einzelnen Modulen	114
3.7.3.1	Spezifität gegenüber Arabinoxylan- und Arabinan-abgeleiteten Oligosacchariden	114
3.7.3.2	Aufklärung der Spezifität gegenüber AX mit Hilfe der Xylanase <i>Ts_Xyn11A</i>	118
4	Diskussion.....	121
4.1	Einflussfaktoren auf den Erfolg von Aktivitätsscreenings	123
4.1.1	Heterologe Produktion.....	123
4.1.2	Substrate - Komplexität und Unzugänglichkeit der Biomasse erschwert das Finden geeigneter Substrate	124
4.1.3	Analytik der Hydrolyseprodukte.....	126
4.1.4	Extreme Spezifität.....	127
4.2	Die aktuell thermophilsten α -Rhamnosidasen in Familie GH106.....	129
4.2.1	Verwandtschaft der untersuchten Enzyme zu anderen GH106-Enzymen.....	129
4.2.2	Biochemische Charakterisierung	132
4.2.3	Katalytische Aminosäuren in GH106-Enzymen	134

4.3	Struktur und Aktivität von thermophilen GH159 Galaktofuranosidasen.....	135
4.4	Spezifitäten von GH43_10 und GH43_16 Modulen und deren Kombination im thermostabilen Enzym <i>Ts_Axh43A</i>	142
4.4.1	Spezifitäten der Axh43A-Enzymvarianten bei verschiedenen Temperaturen - Kombination stellt Axh-md2,3-Spezifität von <i>Ts_Axh43A</i> wieder her	145
4.4.2	GH43_C2 und CBM6-Domänen sorgen möglicherweise für: Aktivität, Stabilität und Spezifität	147
4.4.3	Arbeitsteilung innerhalb eines Enzyms beim Arabinoxylanabbau - Fazit	151
4.5	Erweiterung der Nomenklatur für Spezifitäten von Arabinofuranosidasen	152
5	Schlussfolgerungen	153
6	Literaturverzeichnis.....	155
7	Anhang	181
7.1	Ergebnisse der Sequenzierung von <i>Tn_gly</i> aus <i>T. neapolitana</i> Z2706-MC24.....	182
7.2	Gelbilder	183
7.3	Ähnlichkeitsanalyse und Produktionsbedingungen der Proteine.....	187
7.4	Ergebnisse zu Rhamnosidasen.....	189
7.5	Ergebnisse zu Galaktofuranosidasen und die Charakterisierung ihrer Arabinosidase Aktivität	192
7.6	Ergebnisse zu <i>Ts_Axh43A</i>	195
IX.	Eidesstattliche Erklärung.....	202
X.	Danksagung	203

II. Zusammenfassung

Glykosidhydrolasen (GH) stellen eine große Gruppe von Enzymen mit diversen physiologischen Funktionen und großem Anwendungspotenzial dar. Sie werden aufgrund von Aminosäuresequenz- und damit einhergehend von Strukturähnlichkeiten in GH-Familien eingeteilt. Die umfangreiche Sequenzierung von Genomen und Metagenomen durch die heute verfügbaren Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden führt zur Identifizierung zahlreicher neuer, uncharakterisierter GH-Gene. Diese könnten Enzyme mit neuen, möglicherweise für die biotechnologische Anwendung nützlichen Eigenschaften codieren. Die Vorhersagbarkeit der Substratspaltungs- und Produktbildungsspezifitäten von Glykosidhydrolasen allein auf Basis ihrer Aminosäuresequenzen bzw. der Nukleotidsequenzen ihrer Gene ist allerdings begrenzt. Deshalb ist es nötig, neben der sequenzbasierten Vorhersage von neuen GH-Genen auch die biochemischen Eigenschaften der davon codierten Enzyme zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation liegt in der Charakterisierung der Funktion putativer GH-Sequenzen aus Sequenzdatenbanken, die nur geringe Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen Enzymen hatten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 17 Proteine, die in der *Carbohydrate Active Enzyme* (CAZy; www.cazy.org) Datenbank in der Familienkategorie GHnc (*non-classified*) eingeteilt waren, bzw. Orthologe davon, zur heterologen Produktion in *Escherichia coli* und zur biochemischen und teils strukturellen Charakterisierung ausgewählt. Diese ließen aufgrund nur geringfügiger oder fehlender Übereinstimmung mit bereits charakterisierten Enzymen bisher unbekannte hydrolytische Aktivitäten vermuten. Dreizehn dieser Proteine waren, teils erst nach Optimierung der Expressionsbedingungen, heterolog in *E. coli* produzierbar und damit der weiteren Charakterisierung zugänglich. Durch die Nutzung von chromogenen *pNP*-Glykosiden und verschiedenen Polysacchariden als Substrate zur Charakterisierung ihrer Hydrolysespezifitäten zeigten drei Enzyme, die aktuell in GH106 klassifiziert sind, α -L-Rhamnosidaseaktivität (Ram; EC 3.2.1.40). Drei weitere Enzyme, die nun in GH159 – eine Familie, die erst während der hier vorgestellten Untersuchungen beschrieben worden ist – klassifiziert sind, zeigten β -D-Galaktofuranosidase- (Gaf; EC 3.2.1.146) und die für diese Familie neue, im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten erstmals entdeckte α -L-Arabinofuranosidaseaktivität (Abf; EC 3.2.1.55). Für eine mögliche Glykosidase des extrem thermophilen Bakteriums *Thermus thermophilus* (Tt_Gly) wurde bei 70 °C geringe Laminarinaseaktivität gemessen, während für zwei putative Glykosidasen von *Rhizobium etli* (Re_Xyl) und *Methylorubrum extorquens* (Me_Xyl), sowie eine Glykosidase des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* (Tm_Gly) unter den gewählten Bedingungen und mit den 35 eingesetzten Substraten bisher keine Funktion beschrieben werden konnte. Da jedoch Tt_Gly und Tm_Gly zwischenzeitlich in GH130 klassifiziert wurden, kann für diese nun Mannosylphosphorylaseaktivität vermutet werden.

Die Rhamnosidasen Ram106B aus den thermophilen bis hyperthermophilen Bakterien *T. maritima* (*Tm_Ram106B*), *Thermotoga neapolitana* (*Tn_Ram106B*), *Caldicellulosiruptor bescii* (*Cb_Ram106B*) und *Thermoclostridium stercorarium* (*Ts_Ram106B*) wurden als das natürliche Glykoflavonon Naringin spaltende, hitzeaktive und -beständige, metallionenabhängige, stark produktinhibierte Enzyme charakterisiert, welche im Vergleich zu anderen Rhamnosidasen ähnliche kinetische Parameter aufweisen. *Tm_Ram106B* und *Tn_Ram106B* stellen die bisher thermoaktivsten und thermostabilsten α -Rhamnosidasen der Enzymfamilie GH106 dar. Die Gaf159- β -Galaktofuranosidasen aus den *Caldicellulosiruptor*-Arten *C. saccharolyticus* (*Cs_Gaf159A*), *C. hydrothermalis* (*Ch_Gaf159A*) und *C. kronotskyensis* (*Ck_Gaf159A*) zeigten unter den gewählten Assaybedingungen Aktivitätsoptima zwischen 82 °C und 93 °C. Sie spalteten abhängig von zweiwertigen Metallionen *p*NP- β -D-Galaktofuranosid und *p*NP- α -L-Arabinofuranosid, sowie verschiedene Arabinoxyloligosaccharide. Gegenüber letzteren zeigten sie eine Spezifität gegenüber α -1,3-Bindungen zu Xyloseresten, die sich terminal am nicht reduzierenden Ende befanden. Zudem wurde α -L-Arabinofuranose auch in geringen Mengen aus Arabinogalaktan freigesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Groll (TU München) die Kristallisierung von *Ch_Gaf159A*, was die Aufklärung der ersten dreidimensionalen Struktur eines Vertreters der GH-Familie GH159 ermöglichte. Dabei ergab sich eine 5-fache β -Propeller-Faltung, die den Strukturen der GH-Clans GH-F und GH-J ähnelt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Modulstruktur der multimodularen Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase von *Thermoclostridium stercorarium* (*Ts_Axh43A*) und deren Substratspaltungsspezifität genauer untersucht. Durch Konstruktion verschiedener Mutanten bzw. rekombinant hergestellter Enzymderivate wurde aufgeklärt, dass die Axh-md2,3 Aktivität dieses Enzyms gegenüber Arabinoxyloligosacchariden und Arabinoxylan aus einer Kombination der Module GH43_10 + GH43_C2 mit Axh-d3-Arabinofuranosidaseaktivität und der Module GH43_16 + CBM6 mit Axh-m2,3-Arabinofuranosidaseaktivität entsteht.

Zusammenfassend haben die in der vorgelegten Dissertation beschriebenen experimentellen Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung bisher nicht näher untersuchter Enzyme verschiedener GH-Enzymfamilien, sowie zur Erweiterung der bekannten Spaltungsspezifitäten und erstmaligen Strukturaufklärung eines GH159-Enzyms beigetragen. Aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften und Robustheit könnten manche der untersuchten Enzyme für biotechnologische Anwendungen, z.B. beim Abbau von Polysacchariden aus pflanzlicher Biomasse, von Interesse sein. Außerdem könnten die gewonnenen Funktions-, Spezifitäts- und Strukturdaten für die gezielte Optimierung biotechnologisch relevanter Enzyme genutzt werden.

III. Abstract

Glycoside hydrolases (GH) represent a large group of enzymes with diverse physiological functions and great application potential. They are classified into GH families based on amino acid sequence and consequently structural similarities. Extensive sequencing of genomes and metagenomes by currently available high-throughput sequencing methods is leading to the identification of numerous new, uncharacterized GH genes. These genes could encode enzymes with novel properties potentially useful for biotechnological applications. However, the predictability of substrate cleavage and product formation specificities of glycoside hydrolases based solely on their amino acid sequences, or the nucleotide sequences of their genes is limited. Therefore, in addition to sequence-based prediction of novel GH genes, it is necessary to characterize the biochemical properties of the enzymes encoded by them. One focus of the present dissertation is to characterize the function of putative GH sequences from sequence databases that had low similarity to previously described enzymes.

In this work, 17 proteins, which were classified in the family category GHnc (non-classified) in the Carbohydrate Active Enzyme (CAZy; www.cazy.org) database, or orthologs thereof, were selected for heterologous production in *Escherichia coli* and for biochemical and partly structural characterization. They were suspected to have hitherto unknown hydrolytic activities due to only slight or missing similarities with already characterized enzymes. Thirteen of these proteins were heterologously producible in *E. coli*, in some cases only after optimization of the expression conditions and were thus amenable to further characterization. By using chromogenic *p*NP glycosides and various polysaccharides as substrates to characterize their hydrolysis specificities, three enzymes currently classified in GH106 showed α -L-rhamnosidase activity (Ram; EC 3.2.1.40). Three other enzymes now classified in GH159 – a family described during the studies presented here – showed β -D-galactofuranosidase (Gaf; EC 3.2.1.146) and α -L-arabinofuranosidase activity (Abf; EC 3.2.1.55), which is new for this family and was first discovered during the work presented here. Low laminarinase activity was measured at 70 °C for a possible glycosidase from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* (*Tt_Gly*), whereas no function has yet been described for two putative glycosidases from *Rhizobium etli* (*Re_Xyl*) and *Methylobacterium extorquens* (*Me_Xyl*), as well as a glycosidase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* (*Tm_Gly*), under the conditions selected and with the 35 substrates used. However, since *Tt_Gly* and *Tm_Gly* have since been classified in GH130, mannosyl phosphorylase activity can now be assumed for them.

The rhamnosidases Ram106B from the thermophilic to hyperthermophilic bacteria *T. maritima* (*Tm_Ram106B*), *Thermotoga neapolitana* (*Tn_Ram106B*), *Caldicellulosiruptor bescii* (*Cb_Ram106B*), and *Thermoclostridium stercorarium* (*Ts_Ram106B*) were characterized as heat-active and -stable metal ion-dependent enzymes that cleave the natural glycoflavone naringin and are strongly product-

inhibited, with similar kinetic parameters compared to other rhamnosidases. *Tm*_Ram106B and *Tn*_Ram106B represent the most thermoactive and thermostable α -rhamnosidases of the GH106 enzyme family to date. The β -galactofuranosidases Gaf159A from the *Caldicellulosiruptor* species *C. saccharolyticus* (*Cs*_Gaf159A), *C. hydrothermalis* (*Ch*_Gaf159A), and *C. kronotskyensis* (*Ck*_Gaf159A) showed activity optima between 82 °C and 93 °C under the selected assay conditions, cleaving *p*NP- β -D-galactofuranoside and *p*NP- α -L-arabinofuranoside, as well as various arabinoxyloligosaccharides, dependent on divalent metal ions. Regarding the latter, they showed specificity towards α -1,3-bonds to xylose residues terminally located at the nonreducing end. Moreover, α -L-arabinofuranose was also released in small amounts from arabinogalactan.

As part of this work, in collaboration with the group of Prof. Groll (TU Munich), the crystallization of *Ch*_Gaf159A was achieved, allowing the elucidation of the first three-dimensional structure of a representative of the GH family GH159. This resulted in a 5-fold β -propeller fold like for the structures of GH clans GH-F and GH-J.

In another part of this work, the relationship between the modular structure of the multimodular arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Thermoclostridium stercorarium* (*Ts*_Axx43A) and its substrate cleavage specificity was investigated in more detail. By constructing different mutants or recombinantly produced enzyme derivatives, it was elucidated that the Axx-md2,3 activity of this enzyme towards arabinoxyloligosaccharides and arabinoxylan arises from a combination of the modules GH43_10 + GH43_C2 with Axx-d3 arabinofuranosidase activity and the modules GH43_16 + CBM6 with Axx-m2,3 arabinofuranosidase activity.

In summary, the experimental work described in the presented dissertation has contributed to the biochemical characterization of previously unstudied enzymes of different GH enzyme families, as well as to the extension of known cleavage specificities and first-time structural elucidation of a GH159 enzyme. Due to their catalytic properties and robustness, some of the studied enzymes could be of interest for biotechnological applications, e.g., in the degradation of polysaccharides from plant biomass. Furthermore, the obtained functional, specificity, and structural data could be used for the targeted optimization of biotechnologically relevant enzym

IV. Veröffentlichungen

Publikationen mit direktem Bezug zur vorliegenden Dissertation

Broeker J., Mechelke M., **Baudrexl M.**, Mennerich D., Hornburg D., Mann M., Schwarz W.H., Liebl W., Zverlov V.V. (2018) The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. *Biotechnology for Biofuels* 11:229. doi.org/10.1186/s13068-018-1228-3

Baudrexl M., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Liebl W. (2019) Biochemical characterisation of four rhamnosidases from thermophilic bacteria of the genera *Thermotoga*, *Caldicellulosiruptor* and *Thermoclostridium*. *Scientific Reports* 9:15924. doi.org/10.1038/s41598-019-52251-0

Baudrexl, M., Fida, T., Berk, B., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Groll, M., & Liebl, W. (2022). Biochemical and Structural Characterization of Thermostable GH159 Glycoside Hydrolases Exhibiting α -L-Arabinofuranosidase Activity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 670. doi: 10.3389/fmolb.2022.907439

Weitere Publikationen

Frisch L.M., Mann M.A., Marek D.N., **Baudrexl M.**, Vogel R.F., Niessen L. (2021) Studies on the gushing potential of *Penicillium expansum*. *Food Research International* 139:109915. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109915

Berezina O.V., Rykov S.V., Polyakova A.K., Bozdaganyan M.E., Sidochenko A.V., **Baudrexl M.**, Schwarz W.H., Zverlov V.V., Yarotsky S.V. (2021) Strategic aromatic residues in the catalytic cleft of the xyloglucanase MtXgh74 modifying thermostability, mode of enzyme action and viscosity reduction ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi.org/10.1007/s00253-021-11106-3

Liu Y., Vanderhaeghen S., Feiler W., Angelov A., **Baudrexl M.**, Zverlov V.V., Liebl W. (2021) Characterization of two α -l-arabinofuranosidases from *Acetivibrio mesophilus* and their synergistic effect in degradation of arabinose-containing substrates. *Microorganisms* 9(7),1467, doi.org/10.3390/microorganisms9071467

Liu, Y., Angelov, A., Feiler, W., **Baudrexl, M.**, Zverlov, V., Liebl, W., & Vanderhaeghen, S. (2022). Arabinan saccharification by biogas reactor metagenome-derived arabinosyl hydrolases. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 1-20. doi.org/10.1186/s13068-022-02216-9

Konferenzbeiträge

Baudrexl M., Liebl W., Zverlov V. V. Heavy metals and extreme heat – that’s what these Rhamnosidases need. Gordon Research Conference, Carbohydrate-Active Enzymes for Glycan Conversions 2019 (Poster), Boston, MA, USA

Baudrexl M., Seidler A., Zverlov V. V., Liebl W. Modular specialized enzyme for biomass degradation from *Thermoclostridium stercorarium* – combination of modules creates thermostable enzyme that synergistically acts on arabinoxylan. Annual Conference of the Association for general and applied microbiology 2022 (VAAM), (Poster), eKonferenz

V. Integration betreuter studentischer Arbeiten

Ergebnisse aus nachfolgenden Abschlussarbeiten, die sich aus dem Thema dieser Doktorarbeit ergaben und am Lehrstuhl für Mikrobiologie durchgeführt und von mir co-betreut wurden, werden in dieser Arbeit mit Erlaubnis der jeweiligen Verfasser präsentiert und an gegebener Stelle zitiert.

Fida, Tarik, Masterarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, „Heterologe Produktion und Charakterisierung nicht klassifizierter Glycosidhydrolasen“, 2018

Hilberer, Lisa, Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, „Untersuchung putativer Glycosidhydrolasen unbekannter katalytischer Spezifität“, 2019

Seidler, Alexander, Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, „Eigenschaften der multimodularen Glykosidhydrolase Axx43A von *Thermoclostridium stercorarium*“, 2020

Berk, Berkay, Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, „Biochemische Charakterisierung von Glykosidhydrolase Familie 159 α -L-Arabinofuranosidasen aus *Caldicellulosiruptor* Stämmen“, 2020

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1	Ähnlichkeit bestimmter Monosaccharide.	2
Abbildung 1.2.1	Allgemeine Mechanismen zur Invertierung (A) oder Beibehaltung (B) der anomeren Konfiguration am Beispiel von β -Glukosidasen.....	8
Abbildung 2.3.1	Schematische Darstellung der Konstruktion von pET- <i>c1link</i> und pET- <i>c2link</i>	46
Abbildung 3.4.1	Polysaccharidabbau durch <i>Tm_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> und <i>Re_Xyl</i> in Kombination mit vorverdauenden Enzymen.....	74
Abbildung 3.5.1	Phylogenetische Analyse ausgewählter Enzyme mit der <i>Maximum-Likelihood</i> -Methode.	77
Abbildung 3.5.2	<i>pNP</i> - α -Rhamnosidaseaktivität von <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> und <i>Ts_Ram106B</i> bei verschiedenen Temperaturen.	78
Abbildung 3.5.3	Bestimmung der halbmaximalen Inhibitionskonzentration IC_{50} der α -Rhamnosidasen <i>Tm_Ram106B</i> und <i>Tn_Ram106B</i>	79
Abbildung 3.5.4	Resistenz von <i>Tm_Ram106B</i> gegenüber Hitzeinaktivierung bei 80 °C (A) und 90 °C (B)	83
Abbildung 3.5.5	Bestimmung der kinetischen und inhibitorischen Parameter der α -Rhamnosidasen <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> und <i>Ts_Ram106B</i>	84
Abbildung 3.5.6	Umsetzung von Naringin zu seinen Aglykonen – natürliche Substrate für Rhamnosidasen und Glukosidasen.....	86
Abbildung 3.5.7	Quantifizierung entstandener reduzierender Enden nach Naringin-Verdau durch α -Rhamnosidasen und die β -Glukosidase CgIT.	87
Abbildung 3.5.8	HPAEC-PAD Chromatogramme des Naringin-Abbaus durch α -Rhamnosidasen und β -Glukosidase CgIT.	88
Abbildung 3.5.9	Naringinabbau durch <i>Tm</i> -, <i>Tn</i> -, <i>Cb</i> - und <i>Ts_Ram106B</i> in Anwesenheit von $CoCl_2$	88
Abbildung 3.6.1	Vergleich von β -Galaktofuranosidase- und α -Arabinofuranosidaseaktivität von <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i> gegenüber <i>pNP</i> -Substraten bei 65 °C und 80 °C.....	90
Abbildung 3.6.2	Einfluss der Temperatur auf die <i>pNPGf</i> -ase- (A) und die <i>pNPA</i> ase- (B) Aktivitäten von <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i>	91
Abbildung 3.6.3	Bestimmung der kinetischen Parameter für die Hydrolyse von <i>pNPGf</i> durch <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i>	91
Abbildung 3.6.4	Reaktionen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>Gaf</i> gegenüber <i>pNPA</i>	93
Abbildung 3.6.5	Einfluss verschiedener Salzlösungen auf die <i>pNPA</i> ase-Aktivität von <i>Cs_Gaf159A</i> (bei 90 °C), <i>Ch_Gaf159A</i> (bei 82 °C) und <i>Ck_Gaf159A</i> (bei 93 °C).....	94
Abbildung 3.6.6	Temperatur-, oder Arabinose- induzierte Inaktivierung von <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i>	95
Abbildung 3.6.7	Schmelztemperaturbestimmung von <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> , <i>Ck_Gaf159A</i> und <i>Ch_Gaf159A</i> -Mutanten.....	96
Abbildung 3.6.8	HPAEC-PAD Chromatogramme von Arabinogalaktanabbau mit <i>Cs</i> -, <i>Ch</i> - und <i>Ck_Gaf159A</i>	97

Abbildung 3.6.9	HHpred-Alignment von <i>Ch_Gaf159A</i> (Query Q; ADQ06027.1) mit HoAraf43 (Target T; PDB: 4QQS).	98
Abbildung 3.6.10	Sekundärstrukturvergleich zwischen Wildtyp und mutierten <i>Ch_Gaf159A</i> -Derivaten durch Zirkulardichroismus (CD).	100
Abbildung 3.6.11	Kristalle und Diffraktionsmuster zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von <i>Ch_Gaf159A</i>	101
Abbildung 3.6.12	Dreidimensionale Struktur von <i>Ch_Gaf159A</i> (PDB: 7ZEI).....	103
Abbildung 3.6.13	HPAEC-PAD Chromatogramme der Produkte der Verdauung von AXOS mit <i>Ch_Gaf159A</i> und den E190Q und H244N „Kristallisationsmutanten“ des Enzyms.....	105
Abbildung 3.7.1	In dieser Arbeit produzierte <i>Ts_Axh43A</i> -Derivate.	106
Abbildung 3.7.2	Proteolyse von <i>Ts_Axh43A</i> und rekombinanten Enzymderivaten mit GH43_C2 (link) Domäne.....	108
Abbildung 3.7.3	Schmelztemperaturbestimmung von <i>Ts_Axh43A</i> im Vergleich zu rekombinant hergestellten <i>Ts_Axh43A</i> -Modulen und -Modulkombinationen durch DSF.	109
Abbildung 3.7.4	Spezifische Aktivitäten der <i>Ts_Axh43A</i> -Module gegenüber <i>pNPA</i> bei 30 °C und 60 °C.	111
Abbildung 3.7.5	HPAEC-PAD Chromatogramme von Reaktionen mit AOS und <i>Ts_Axh43A</i> , oder c1link und c2cbm.	117
Abbildung 3.7.6	Aufklärung der Spezifität der <i>Ts_Axh43A</i> -Module gegenüber AX bei 60 °C und 30 °C durch <i>Ts_Xyn11A</i>	120
Abbildung 7.1.1	Alignment von <i>Tn_Gly</i> aus <i>Thermotoga neapolitana</i> Z2706-MC24 (Query) mit CTN_1797 (ACM23973.1) von <i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359 (Sbjct).....	182
Abbildung 7.2.1	Beispielhaftes Agarosegel nach Restriktionsverdau von pET24c-Plasmiden.....	183
Abbildung 7.2.2	SDS-PAGE-Gele der Produktion von <i>Tm_Gly</i> , <i>Tn_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> , <i>Re_XylB</i> , <i>Bv_XylB</i> , <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> , <i>Ts_Ram106B</i> <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i> in <i>E. coli</i> BL21	184
Abbildung 7.2.3	SDS-PAGE-Gele der gereinigten Proteine <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> , <i>Ck_Gaf159A</i> , den Mutanten von <i>Ch_Gaf159A</i> und allen <i>Ts_Axh43A</i> Domänen-Varianten, die in <i>E. coli</i> BL21 produziert wurden.	185
Abbildung 7.2.4	SDS-PAGE-Gele und Westernblots der Produktion von <i>Tm_Gly</i> , <i>Tn_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> und <i>Re_XylB</i> in <i>E. coli</i> Arctic Express	185
Abbildung 7.2.5	SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von <i>Tm_Gly</i> , <i>Tn_Gly</i> , <i>Tt_Gly</i> und <i>Re_XylB</i> aus <i>E. coli</i> Arctic Express	186
Abbildung 7.2.6	SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von <i>Re_XylB</i> , <i>Me_XylB</i> , <i>Bv_XylB</i> aus <i>E. coli</i> Arctic Express	186
Abbildung 7.2.7	SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von <i>Me_XylB</i> aus <i>E. coli</i> BL21	186
Abbildung 7.4.1	Einfluss von Salzlösungen (A) und Ionenchelatoren (B) auf die <i>pNP-α-L-Rhamnosidase</i> Aktivität von <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> und <i>Ts_Ram106B</i>	190
Abbildung 7.4.2	Graphen zur Bestimmung der Inhibitionskinetiken der Rhamnosidasen <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> und <i>Ts_Ram106B</i> mit Rhamnose....	191

Abbildung 7.5.1	Einfluss des pH-Wertes auf die <i>p</i> NPAase-Aktivität von <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i>	192
Abbildung 7.5.2	HPAEC-PAD Chromatogramme von AXOS Verdaus mit <i>Cs_Gaf159A</i> , <i>Ch_Gaf159A</i> und <i>Ck_Gaf159A</i>	193
Abbildung 7.5.3	HPAEC-PAD Chromatogramme von AXOS Verdaus mit <i>Ch_Gaf159A</i> und dessen Mutanten.	194
Abbildung 7.5.4	HPAEC-PAD Chromatogramme von Arabinogalaktan Verdaus mit <i>Ch_Gaf159A</i> und dessen Mutanten.	194
Abbildung 7.6.1	HPAEC-PAD Chromatogramme vom AXOS Abbau durch <i>Ts_Axh43A</i> Module bei 30 °C oder 60 °C.	201

VII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1	Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 2.1.2	Verwendete Software	24
Tabelle 2.1.3	Gebrauchsmaterialien	25
Tabelle 2.1.4	Spezielle Chemikalien mit potenzieller Auswirkung auf durchgeführte Experimente.....	26
Tabelle 2.1.5	Medien und Medienzusätze	26
Tabelle 2.1.6	Zusammensetzung selbst hergestellter Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 2.1.7	Verwendete gekaufte Enzyme, Lösungen, Inhibitoren, Längenstandards und Kits.....	31
Tabelle 2.1.8	verwendete Bakterienstämme	32
Tabelle 2.1.9	verwendete Oligonukleotide	34
Tabelle 2.1.10	verwendete und erstellte Plasmide	36
Tabelle 2.1.11	Substrate für Aktivitätstests	38
Tabelle 2.3.1	Ansatz für präparativen Restriktionsverdau von pET24c mit NdeI und XhoI	42
Tabelle 2.3.2	Ansatz für analytischen Restriktionsverdau von pET24c basierten Plasmiden mit PvuII.....	43
Tabelle 2.3.3	PCR Mastermix für einen 25 µl Ansatz	43
Tabelle 2.3.4	Temperaturprogramm für Phusion-PCR.....	44
Tabelle 2.3.5	Ansatz für Kolonie-PCR mit MangoMix	44
Tabelle 2.3.6	Temperaturprogramm für Kolonie-PCR mit MangoMix.....	44
Tabelle 2.3.7	<i>Ts_Axh43A</i> -Enzymvarianten. Primerkombinationen zur Amplifizierung verschiedener Domänen, Aminosäureabschnitte im Volllängenenzym und Molekulargewichte der rekombinanten Enzymvarianten.....	46
Tabelle 2.4.1	Regenerationsprotokoll für HisTrap FF-Säulen (1 ml, oder 5 ml)	50
Tabelle 2.4.2	Standardprotokoll für His-Affinitätschromatographie mit HisTrap FF-Säulen an FPLC-Anlage	51
Tabelle 2.5.1	Zusammensetzung 12 % SDS-Trenngele.....	51
Tabelle 2.5.2	Zusammensetzung 4 % SDS-Sammelgele	51
Tabelle 2.5.3	Reaktionsansatz für Aktivitätstests mit <i>pNP</i> -Glykosiden	55
Tabelle 2.5.4	Reaktionsansatz zur enzymatischen Hydrolyse von Poly- und Oligosacchariden...58	
Tabelle 2.5.5	HPAEC-PAEC Gradienten in Chromleon 7.....	60
Tabelle 2.5.6	Verwendete Kristallisationslösungs-Kits.....	61
Tabelle 3.1.1	Zur Charakterisierung ausgewählte Proteine.	64
Tabelle 3.3.1	Produzierte Enzyme und Enzymvarianten dieser Arbeit; Proteinnamen, GH-Familien-Zugehörigkeit in CAZy	66
Tabelle 3.4.1	Saccharide, ihre Monosaccharide und Bindungstypen für das Screening von <i>Re_Xyl</i> , <i>Tm_Gly</i> und <i>Tt_Gly</i>	71

Tabelle 3.4.2	Screening mit <i>p</i> NP-Glykosiden und aus <i>E. coli</i> AE Zellen gereinigten Enzymen <i>Re_Xyl</i> , <i>Tm_Gly</i> und <i>Tt_Gly</i>	72
Tabelle 3.5.1	Einfluss verschiedener Salze (10 mM) und Chelatoren (5 mM) auf die α -Rhamnosidaseaktivität von <i>Tn_Ram106B</i>	80
Tabelle 3.5.2	Zusammenfassung verschiedener Eigenschaften der α -Rhamnosidasen.	82
Tabelle 3.5.3	Kinetik und Produktinhibitionsparameter von <i>Tm_Ram106B</i> , <i>Tn_Ram106B</i> , <i>Cb_Ram106B</i> und <i>Ts_Ram106B</i>	85
Tabelle 3.6.1	Abstände zwischen den drei putativ katalytischen Aminosäuren von <i>Ch_Gaf159A</i>	104
Tabelle 3.7.1	Arabinoxylan-Abbau mit <i>Ts_Axh43A</i> , einzelnen Modulen und Kombinationen, und Synergismus bei Kombination.....	113
Tabelle 3.7.2	Interpretation des Abbaus von AXOS (Abbildung 7.6.1) durch verschiedene <i>Ts_Axh43A</i> Derivate.	116
Tabelle 4.3.1	GH-Clans mit 5-facher β -Propeller Struktur.....	138
Tabelle 4.3.2	Distanzen zwischen den katalytischen Aminosäuren in <i>Ch_Gaf159A</i>	139
Tabelle 4.4.1	Übersicht über den Einfluss der assoziierten Domänen auf die katalytischen Domänen aus GH43_10 (c1) und GH43_16 (c2) in <i>Ts_Axh43A</i>	148
Tabelle 4.5.1	Enzyme Commission Nummern für β -D-Glukosyl-Bindungen spaltende Enzyme	181
Tabelle 7.2.1	Ähnlichkeitsanalyse aller ausgewählter Proteine mittels BLASTp. QC = query coverage in %, ID = identity in %.....	187
Tabelle 7.3.2	Bedingungen zur Produktion, zum Zellaufschluss und Reinigung von löslichen Proteinen.	188
Tabelle 7.4.1	Information zu Proteinen für ein Promal3DS Alignment für die Erstellung eines ML phylogenetischen Baumes	189
Tabelle 7.4.2	Änderung der Aktivität von <i>Tn_Ram106B</i> durch Zugabe von Salzlösungen.....	190
Tabelle 7.6.1	Einzelwerte der Replikate vom AX Abbau durch <i>Ts_Axh43A</i> , Modulen und Kombinationen.....	195

VIII. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff	Abkürzung	Begriff
%	Prozent	M	Molar (mol/l)
° C	Grad Celsius	min	Minute(n)
µg	Mikrogramm	ml	Milliliter
µl	Mikroliter	mM	Millimolar (mmol/l)
3D	dreidimensional	MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
A	Ampere	n.a.	<i>not available</i>
A ^{2,3} XX	2 ³ ,3 ³ -di- α -L-Arabinofuranosylxylotriöse	n.d.	<i>not detected</i>
A ² XX	2 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylotriöse	NaAc	Natriumacetat
A ³ X	3 ² - α -L-Arabinofuranosylxylobiose	NBT-BCIP	nitro-blue-tetrazolium-5-brom-4-chlor-3'-indolylphosphat
Abf	Arabinofuranosidase	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
AOS	Arabinooligosaccharide	Ni ²⁺ -TED	Ni ²⁺ -Triscarboxymethyl Ethylen Diamin
APS	Ammoniumperoxodisulfat	OD	Optische Dichte
Araf	Arabinofuranose	PCR	Polymerasekettenreaktion
AS	Aminosäure(n)	<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenol
Axh	Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase	<i>p</i> NPA	<i>para</i> -Nitrophenyl- α -L-Arabinofuranosid
AXOS	Arabinoxylan-Oligosaccharide	<i>p</i> NP <i>Gf</i>	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-Galaktofuranosid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<i>p</i> NPR	<i>para</i> -Nitrophenyl- α -L-Rhamnopyranosid
bp	Basenpaare	PVDF	Polycinylidenfluorid
c	Konzentration	QC	<i>Query Coverage</i> (BLAST <i>p</i>)
<i>C.</i>	<i>Caldicellulosiruptor</i>	RP	Reaktionspuffer
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzymes</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute
CBM	<i>carbohydrate binding module</i>	RT	Raumtemperatur
Da	Dalton	SD	<i>standard deviation</i> / Standardabweichung
DC	Dünnschichtchromatographie	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMF	N,N-Dimethylformamid	SOC	Super optimal broth with catabolite repression
DNA	Desoxyribonukleinsäure	t	Zeit
DNSA	3,5-Dinitrosalicylsäure	<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikoorganismen und Zellkulturen	<i>T. neapolitana</i>	<i>Thermotoga neapolitana</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>T. stercorarium</i>	<i>Thermoclostridium stercorarium</i>
EC	Enzyme Commission number	TAE	Tris-Acetat-EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TBS	Tris buffered saline
FPLC	Fast protein liquid chromatography	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
g	Gramm	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
gDNA	genomische DNA	U	Units ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
GH	Glykosidhydrolase(n)	ÜN	über Nacht
h	Stunde	UV	Ultraviolett
HPAEC-PAD	High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection	V	Volt
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration	v/v	volume per volume
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalaktopyranosyl	V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
Kan	Kanamycin	w/v	weight per volume
k _{cat}	Wechselzahl	XA ^{2,3} XX	2 ³ ,3 ³ -di- α -L-Arabinofuranosylxylo-tetraose
K _M	Michaelis-Menten-Konstante	XA ² XX	2 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylo-tetraose
LB	Luria-Bertani / Lysogenic Broth	XA ³ XX	3 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylo-tetraose

1 Einleitung

1.1 Biomasse – Einteilung der Polysaccharide

Der mengenmäßig größte Anteil der Biomasse und damit der organischen Kohlenstoffverbindungen auf der Erdoberfläche geht auf die Photosynthese der Pflanzen zurück (Bar-On et al. 2018). Dabei machen den Hauptanteil der Pflanzenbiomasse die Pflanzenzellwände aus (Pauly und Keegstra 2010). Pflanzenzellwände sind im Allgemeinen aus vier Hauptkomponenten zusammengesetzt. Dabei handelt es sich um Cellulose, nicht-Cellulose-Polysaccharide, Proteine (z.B. das Glykoprotein Extensin) und polyphenolische Verbindungen (z.B. Lignin, Suberin). Die verschiedenen Polymere besitzen beträchtliche strukturelle Vielfalt und haben damit ein enormes intrinsisches Potential für unterschiedliche Funktionen. Die verschiedenen, darin vorkommenden Monomere können jeweils in zwei Ringformen (Pyranose, Furanose) vorliegen und mit ihren funktionellen Gruppen (drei, vier, oder fünf) und ausgehend vom anomeren Kohlenstoff in jeweils zwei Orientierungen (α , β), glykosidische Bindungen eingehen. Daraus resultieren viele unterschiedliche Polysaccharide mit teilweise zusätzlichen Modifikationen (z.B. Acetyl- und Methylgruppen) und unterschiedlichen Struktureigenschaften, die wiederum unterschiedliche funktionelle Eigenschaften haben können (McDougall et al. 1996).

Abbildung 1.1.1 zeigt die Ähnlichkeit und auch die Unterschiede zwischen Zuckern am Beispiel von Glukose, Xylose, Arabinose und Galaktose auf. Sie zeigt die vier Monomere in der Fisher-Projektion und in jeweils einer der möglichen geschlossenen Ringformen (Sessel-Darstellung für die Hexosen, Haworth Projektion für die Pentosen). Die 4C_1 (C für *chair*) -Konformation der Hexosen ist die stabilste für D-Glukose; es existieren jedoch weitere Konformationen (Boysen 2018), die instabiler sind und z.B. während der Katalyse der Spaltung von Glykosiden innerhalb eines Enzymes vorkommen können (Rovira et al. 2020; Raich und Rovira 2015). Für Monosaccharide stellt sich in Lösung jeweils ein Gleichgewicht mit einem bestimmten Verhältnis zwischen offenkettiger und cyclischen Halbacetal-Formen ein. Bei β -D-Glukopyranose befinden sich alle Ring-Substituenten in äquatorialer Stellung, was zu großer Stabilität dieser Aldo-Hexose führt. Die β -D-Xylose ist die Pentose mit der gleichen Konfiguration; auch hier liegen in der Pyranose-Form alle Substituenten äquatorial vor. Dies ist der Grund, weshalb die häufigsten Polymere in der Natur meist aus Glukose oder Xylose aufgebaut sind. D-Glukose und D-Galaktose haben die gleiche Summenformel $C_6H_{12}O_6$ und die gleiche Reihenfolge der chiralen C-Atome; nur die Konfiguration der Substituenten am C4 unterscheidet sich, weshalb es sich bei den Hexosen D-Glukose und D-Galaktose um C4-Epimere handelt. Das C4-Epimer der Pentose D-Xylose stellt die Pentose L-Arabinose dar, was diese wiederum zur Pentose mit der gleichen Konfiguration wie die der Hexose D-Galaktose, macht. Diese Vergleiche lassen schon erahnen, dass Strukturen, die diese Zucker „spezifisch“ binden - wie Substrat-bindende Aminosäuren einer

Glykosidhydrolase -, eventuell nicht, oder nur schlecht, zwischen den Epimeren Xylose und Arabinose, oder den unterschiedlich langen C-Ketten, wie bei Arabinose und Galaktose, diskriminieren.

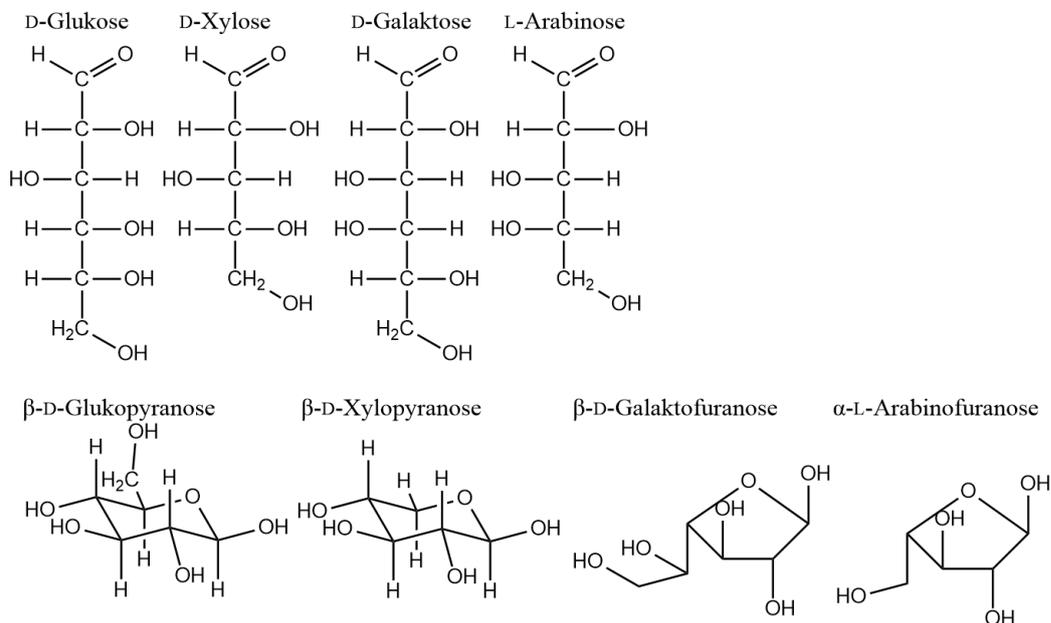


Abbildung 1.1.1 Ähnlichkeit bestimmter Monosaccharide. Strukturen wurden mit ChemDraw erstellt. Glukose und Xylose unterscheiden sich nur durch die Länge der Kohlenstoffkette (siehe Fisher-Projektion oben) und zeigen in der Sesselkonfiguration (unten) nur äquatoriale Substituenten, sind damit sehr stabil und stellen deshalb die in der Natur am häufigsten in Polysacchariden vorkommenden Monosaccharide dar. Galaktose und Arabinose stellen die jeweiligen C-4 Epimere der Glukose und Xylose dar. Die Arabinose (Haworth-Schreibweise) kommt sehr häufig, die Galaktose eher selten in der gezeigten Furanose-Form (Fünfer-Ring) anstatt der Pyranose-Form (Sechser-Ring) vor.

Cellulose ist ein β-(1,4)-verknüpftes, Wasser-unlösliches Homopolymer aus D-Glukopyranose-Einheiten. Obwohl sie also chemisch gesehen eine einfache Zusammensetzung hat, ist ihre dreidimensionale Kristallstruktur viel komplexer. Im Cellulose-Kristall ist jeder D-Glukoserest um ca. 180° zum nächsten Rest gedreht, so dass Cellobiose die sich wiederholende Einheit darstellt. Die bis zu 15.000 Monomere langen linearen Ketten, bilden hydrophobe Wechselwirkungen und teils Wasserstoffbrückenbindungen untereinander aus und gruppieren sich in unterschiedlich kristallinen Mikrofibrillen (Schwarz 2004), mit 30–100 Ketten im Durchmesser, die wie ein Skelett (Fry 2004) das strukturelle Gerüst der Pflanzenzellwand bilden. Für pflanzliche Cellulosemikrofibrillen wurden 18 Glukoseketten pro Mikrofibrille postuliert (Kubicki et al. 2018). Während sekundäre Zellwände hochkristalline Cellulose enthalten, besteht die primäre Zellwand eher aus amorpher Cellulose (McDougall et al. 1996). Neben amorpher Cellulose sind mindestens drei Polymorphe der Cellulose beschrieben, die sich in der Konformation der Hydroxymethylgruppe des C5, der Polarität der Glukoseketten und damit Orientierung der Glukanstränge und ihrem Wasserstoffbrücken-Netzwerk unterscheiden (Gong et al. 2017; Makarem et al. 2019). Die Synthese der Cellulose der Pflanzenzellwand erfolgt als Cellulose I_α, oder I_β Allomorphe (Schwarz 2004) in paralleler Ausrichtung.

Die Polymorphe können durch hohe Temperaturen und/oder alkalische Behandlung teils irreversibel ineinander überführt werden (Makarem et al. 2019).

Hemicellulosen sind mengenmäßig die größte Gruppe der nicht-Cellulose-Polysaccharide. Der Begriff Hemicellulose wurde ursprünglich vorgeschlagen, da vermutet wurde, dass es sich um einen Vorgänger der Cellulose handelt. Obwohl das bereits widerlegt wurde, wird der Begriff noch für nicht-Stärke-Polysaccharide verwendet, die in Pflanzenzellwänden mit Cellulose assoziiert vorliegen und durch alkalische Lösungen extrahiert werden können. Letzteres schließt somit pektische Polysaccharide aus, die durch heißes Wasser, schwache Säuren oder Chelatoren isoliert werden können (Ebringerova 2005). Die Anzahl der Monosaccharide ist mit 500–3000 Zuckereinheiten pro Polymer zwar geringer als in Cellulose (Thapa et al. 2020), jedoch ist der Aufbau viel komplexer. Um die große Vielfalt aufzuzeigen, sollen im Folgenden Beispiele für die verschiedenen Hemicellulose-Gruppen vorgestellt werden:

Je nachdem welche Grundelemente im Rückgrat des Polysaccharids vorhanden sind lassen sich vier allgemeine Gruppen unterscheiden: **1. Xylane, 2. Mannane, 3. β -Glukane** und **4. Xyloglukane**. Substituenten und Modifizierungen am Rückgrat und den Seitenketten bedingen natürlicherweise die Löslichkeit, Viskosität und die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Polysacchariden und Proteinen (Houston et al. 2016). Viele Polysaccharide werden sowohl zu den Hemicellulosen als auch zu den Gummiarten gezählt, da sie in manchen Pflanzengeweben mittels Wasser extrahiert werden können, in anderen jedoch sehr eng mit Cellulose verwoben sind. Beispiele sind Xyloglukane und auch β Glukane und manchmal Arabinogalaktane.

1. **Xylane** machen in den sekundären Pflanzenzellwand mit 20-30 % in Dikotyledonen und bis zu 50 % in Monokotylen einen erheblichen Teil der pflanzlichen Biomasse aus (Ebringerová und Heinze 2000). Die Vielzahl an unterschiedlich aufgebauten Xylanen in verschiedenen Pflanzengeweben bewirkte eine Einteilung in Homoxylan und verschiedene Arten von Heteroxylanen (Ebringerova 2005). Reine **Homoxylane** können entweder ausschließlich aus β -(1,3)-verknüpften Xylp (in Grünalgen) aufgebaut sein, oder aus β -(1,4) und β -(1,3) Bindungen bestehen (in Rotalgen). Das Xylan aller höheren Pflanzen besteht aus einem β -(1,4)-D-Xylp Rückgrat und ist in unterschiedlichem Maße mit verschiedenen Zuckern und teils Acetylgruppen oder Feruloylgruppen substituiert, weshalb es als **Heteroxylan** bezeichnet wird (Ebringerová und Heinze 2000). Die kurzen Kohlenhydratseitenketten bestehen aus teils 4-O-methylierter D-Glukuronsäure (MeGluUA), L-Araf, oder verschiedenen Oligosacchariden aus D-Xylp, L-Araf, D-Gal, L-Gal und D-Glup. Aufgrund unterschiedlicher Mengen, der Art der Substituenten und der Verhältnisse von Substituent zu Rückgrat-Xylp werden von Ebringerová et al. (2005) folgende Xylane unterschieden:

- a. **(4-O-Methyl)-Glukuronoxylan (MGX)**, das teils O-acetyliert die Haupt-Hemicellulose von Harthölzern darstellt
 - b. **(Arabino-)Glukurono-xylan (AGX)**
 - c. **(Glukurono-)Arabinoxylan (GAX)**
 - d. **Arabinoxylan (AX)**
 - e. **Komplexe Heteroxylane**
2. **Mannane** kommen in vielen kommerziell genutzten Pflanzen, wie Dattelpalmen, Guarbohnen und Johannisbrot, und vor allem als Hauptkomponenten von sekundären Pflanzenzellen in Weichhölzern vor und können in folgende zwei Typen eingeordnet werden.
- a. **(Galakto)mannane mit ausschließlich** β -(1,4)-verbundenen D-Manp-Resten und
 - b. **(Galakto)-Glukomannane mit einem Rückgrat aus** β -(1,4)-verbundenen D-Manp und D-Glup, das die Haupt-Hemicellulose in Weichhölzern darstellt.
- Die zwei Mannantypen unterscheiden sich zwar in den Monosacchariden, die im Rückgrat linear miteinander verbunden sind, jedoch sind beide, aber jeweils in unterschiedlichen Verhältnissen, mit α -D-Galp substituiert. Das Manp zu Galp Verhältnis trägt, neben Molekulargewicht, Molekulargewichtsverteilung, Verzweigungsgrad, Temperatur und pH zur Bildung der Charakteristika wie Wasserlöslichkeit, Dichte und Viskosität bei (Ebringerová et al. 2005).
3. **β -Glukane** sind die Haupt-Hemicellulosen in der Familie der Süßgräser (*Poaceae*, oder *Gramineae*) (McDougall et al. 1996). Sie sind unverzweigte Polymere aus β -(1,4)-Glup Tri- und Tetrameren (Cellotriose und Cellotetraose-Einheiten), teils auch längere Cellooligosaccharide bis DP 9–14, die β -(1,3)-verbunden sind (Ebringerová et al. 2005).
4. **Xyloglukan** kommt vor allem in wachsenden Pflanzenzellen, also eher in primären und kaum in sekundären Pflanzenzellwänden, vor und ist zumindest in der primären Zellwand von Dicotyledonen durch glykosidische Bindungen mit Pektin und GAX verbunden (Zavjalov et al. 2019). Das Rückgrat aus Cellotetraose Einheiten ist durch kurze Seitenketten bestehend aus Xylp, Galp, Ara, Fuc und andere Zucker substituiert (Zavjalov et al. 2019). Der Aufbau der Seitenketten ist dabei, wie allgemein fast alle pflanzliche Zellwandstrukturen (Houston et al. 2016), Spezies- und Wachstumsstadium- und Gewebstyp-spezifisch.

Laut Ebringerová et al. (2005) gibt es allgemein zwei Typen von Arabinogalaktanen, die beide in der Pflanzenzellwand vorkommen können. Typ I, mit β -(1,4)-Galp-Rückgrat, konnte z.B. aus Zitrusfrüchten, Äpfeln und Kartoffeln als Seitenketten in Pektin isoliert werden. Typ II, mit stark substituiertem β -(1,3)-Galp Rückgrat, kommt in Zellwänden von Cerealien sowie verschiedenen Dicotyledonen vor. Das durch Uronsäuregruppen substituierte, saure und wasserlösliche Arabinogalaktan wird zu den Gummiarten gezählt (Ebringerová et al. 2005). Lärchen-**Arabinogalaktan** kommt z.B. meist als Exopolysaccharid im

Lumen von Tracheen (Christian et al. 1998) und nicht in der Pflanzenzellwand vor, weshalb es definitionsgemäß auch deshalb nicht zu den Hemicellulosen gezählt wird (Whistler 1993).

Wie oben erwähnt stellt **Pektin** eine eigene Gruppe in der Klassifizierung der Polysaccharide dar. Pektische Polysaccharide sind die komplexesten und heterogensten der nicht-Cellulose-Polysaccharide und kommen aufgrund ihrer Funktionen bei der Zellexpansion, Stabilisierung, Porenbildung, Adhäsion und interzellulären Signalübertragung vorwiegend in der primären Pflanzenzellwand vor (Houston et al. 2016). Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Galakturonsäure (GalUA) enthalten. Es gibt verschiedene Arten pektischer Polysaccharide. **Homogalakturonan** (HG) ist unverzweigt und besteht aus α -1,4-verbundenen GalUA-Resten. Der Anteil an GalUA-Resten, die am C-6 methyliert, oder an O-2, oder O-3 acetyliert vorliegen, variiert mit dem Ursprung des Homogalakturonans (Ridley et al. 2001). Wenn mehr als zehn aufeinanderfolgende GalUA-Reste unmethyliert vorliegen, können sich die Stränge, über die Interaktion der negativ geladene Säuregruppen am C-6 mit Ca^{2+} Ionen, zusammenlagern und ein stabiles Gel bilden (Liners et al. 1989; Caffall und Mohnen 2009). Bereits in diesen glatten Bereichen (*smooth regions*) können einzelne 1,2-verbundene α -L-Rhamnosid-Reste die Homogalakturonankette nach 25 bis 100 GalUA-Resten unterbrechen (Mutter et al. 1994). Speziellere Homogalakturonane, wie beispielsweise ein teils stark mit D-Apiose substituiertes Galakturonan, oder ein mit Xylose substituiertes GalUA-Rückgrat wurde für Wasserpflanzen und für Sojabohnen, Erbsen, Äpfel und *Arabidopsis* beschrieben (Caffall und Mohnen 2009). Homogalakturonan ist über das Rückgrat kovalent mit anderen pektischen und Hemicellulose-Polysacchariden, wie **Rhamnogalakturonan I** (RG-I) und Xyloglukan, verbunden. Das Rückgrat von RG-I besteht aus dem sich wiederholenden Dimer α -(1,2)-L-Rham- α -(1,4)-D-GalUA (Mutter et al. 1994) und kann durch α -(1,5)-L-Arabinan, β -(1,4)-Galaktan und Arabinogalaktan verzweigt sein. **Rhamnogalakturonan II** (RG-II) bezeichnet bestimmte Abschnitte (7–9 Reste lang) im Homogalakturonan, die hochgradig, aber mit (zumindest in Landpflanzen) definierten Seitenketten, bestehend aus ca. 12 verschiedenen Zuckermonomeren, substituiert sind (Caffall und Mohnen 2009). Dass Pektin nur durch alkalische Behandlung oder die Unterstützung von Polygalakturonasen extrahiert werden kann, deutete schon 1996 darauf hin, dass Pektin entweder durch glykosidische Bindungen, oder über Ferulasäure-Ester stark vernetzt vorliegen muss (McDougall et al. 1996).

Das Pektin von primären Zellwänden hingegen hat einen großen Anteil an Seitenketten aus Arabinose und Galaktose, die jeweils hauptsächlich mit dem O-4 des Rhamnoserests im Rückgrat verbunden sind (Zykwinska et al. 2006).

Lignin ist ein **hydrophobes** Polymer aus Phenylpropanoiden (Zimtalkohol-Derivaten), das sowohl mit Zellwandproteinen, als auch mit den Polysacchariden verbunden ist. Lignin ist u.a. dadurch für die Festigkeit und Starrheit von Pflanzenzellwänden und damit für die Standfestigkeit von Landpflanzen verantwortlich. Weitere hydrophobe Moleküle, die die Zellwand wasserundurchlässig machen, sind

Suberin und Cutin, zwei Polyester aus Fettsäuren und die z.B. in Trauben und damit auch im Wein vorkommenden Tannine (McDougall et al. 1996).

1.2 Biomasse abbauende Enzyme und ihre Klassifizierung

Aus der beschriebenen Komplexität der verschiedenen Biomassen ergibt sich eine nicht mindere Vielfalt an Enzymen, die diese Strukturen aufbauen, abbauen oder umbauen können. Diese sogenannten Kohlenhydrat-aktiven Enzyme (*Carbohydrate-Active Enzymes*; CAZymes), die glykosidische Bindungen spalten, modifizieren oder erzeugen, werden in der CAZY-Datenbank unter www.cazy.org klassifiziert (Lombard et al. 2014; Drula et al. 2022). Die katalytischen Module dieser Enzyme werden in fünf funktionelle Gruppen eingeteilt: Glykosidhydrolasen (GH), Kohlenhydratesterasen (CE), Polysaccharidlyasen (PL), Glykosyltransferasen (GT) und Hilfsaktivitäten (AA). Auch nicht-katalytische Kohlenhydrat-Bindungsmodule (CBM), die unterschiedliche 3D-Strukturen und Affinitäten zu verschiedenen Substraten haben können und damit eine entscheidende Rolle bei der Katalyse durch die jeweiligen assoziierten Enzyme haben, werden dort klassifiziert. Basierend auf ihrer Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Faltung werden diese Module in Familien unterteilt (Lombard et al., 2014). Die Familie liefert Einblicke in die Strukturmerkmale, die evolutionäre Beziehung zu anderen Familienmitgliedern und dem Wirkmechanismus des Moduls (Himmel et al., 2010). Die Familien, die mindestens einen biochemisch charakterisierten Vertreter beinhalten, sind nummeriert und nicht etwa nach der Aktivität des erstbeschriebenen Enzyms benannt, da die Spezifitäten sich innerhalb einer Familie unterscheiden können (Drula et al. 2021). Jedoch existieren auch monospezifische Familien in der nur Enzyme mit einer bestimmten Aktivität klassifiziert sind (Li et al. 2022a), oder es werden Subfamilien erstellt, die zumindest ein engeres Substratspektrum aufweisen; jedoch sind oft nicht ausreichend viele Vertreter biochemisch charakterisiert, um dies zu bestätigen (Mewis et al. 2016).

Kohlenhydratesterasen katalysieren die Hydrolyse von Carbonsäureestern und sind neben den Glykosidhydrolasen die wichtigsten Enzyme für die Hydrolyse von acetylierten oder feruloylierten Zellwandpolysacchariden, wie z.B. Xylanen (Biely et al., 2016). Polysaccharidlyasen spalten glykosidische Bindungen im Unterschied zu den Hydrolasen in meist Uronsäure-haltigen Polysacchariden durch den Mechanismus der β -Eliminierung und produzieren auf der einen Seite der Spaltungsstelle einen ungesättigten Uronsäurerest sowie auf der anderen Seite ein neues reduzierendes Ende. Glykosyltransferasen erzeugen neue glykosidische Bindungen und katalysieren den Transfer eines Kohlenhydratrestes von einem aktivierten Donormolekül auf einen spezifischen Akzeptor. In der CAZY-Datenbank fasst die Gruppe der Hilfsaktivitäten ligninolytische Enzyme und lytische Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMO) zusammen. Ligninolytische Enzyme sind nicht an der

Spaltung von Kohlenhydraten beteiligt; da Lignin jedoch mit Zellwandpolysacchariden assoziiert ist, kooperieren ligninolytische und kohlenhydrataktive Enzyme miteinander (Lombard et al. 2014). Lytische Polysaccharid-Monooxygenasen unterstützen den Abbau von Polysacchariden durch die oxidative Spaltung von glykosidischen Bindungen (Horn et al. 2012).

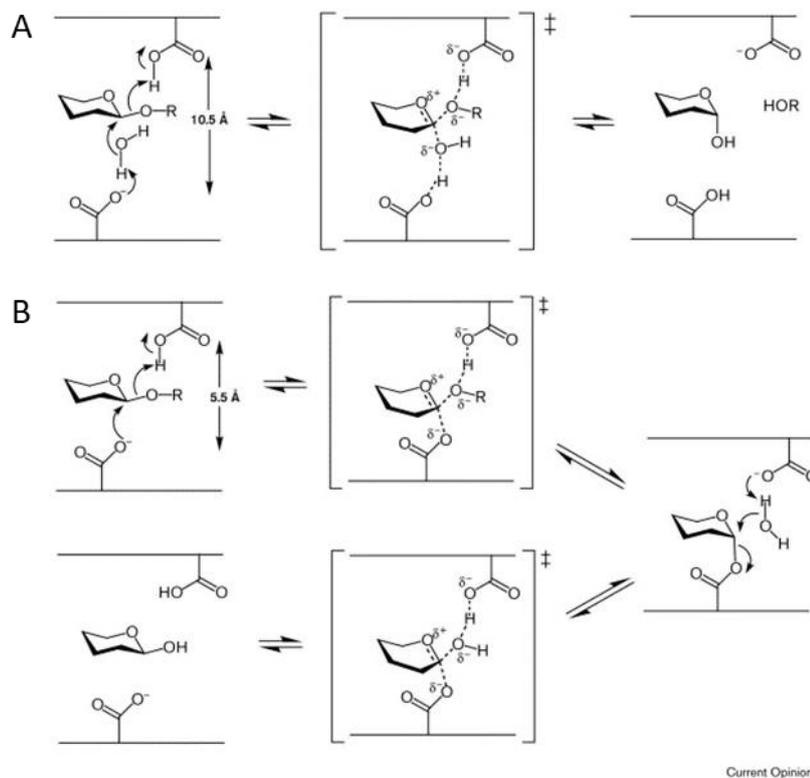
Die nicht-katalytischen Kohlenhydrat-Bindungsmodule sind häufig mit Glykosidhydrolasen assoziiert und erleichtern die Hydrolyse von unlöslichen Polysacchariden. Die CBMs binden selektiv an Oligo- oder Polysaccharide und fördern so die Assoziation des Enzyms an das Substrat (Boraston et al. 2004) und erhöhen die Verweildauer des Enzyms in der Umgebung eines einmal „aufgefundenen“ Substrats. So wird allgemein die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, da die Diffusion des Enzyms zum Substrat in einer Polymer-Umgebung den Geschwindigkeits-limitierenden Faktor darstellt.

1.2.1 Katalytische Mechanismen von Glykosidhydrolasen

Die Glykosidhydrolasen sind die größte Gruppe der kohlenhydrataktiven Module. GH-Module spalten die glykosidische Bindung zwischen zwei Kohlenhydraten, oder einem Kohlenhydrat und einem Nicht-Kohlenhydrat, meist durch eine säurekatalysierte Hydrolyse, wobei auch Acetamidogruppen- und Cofaktor-abhängige Mechanismen existieren (Terwisscha van Scheltinga et al. 1995; Rajan et al. 2004; Liu et al. 2007). Nach Spaltung einer glykosidischen Bindung bleibt die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms entweder wie im Ursprungsmolekül bestehen (*retaining*, retendierender Mechanismus), oder sie wird umgekehrt (*inverting*, invertierender Mechanismus). Im Gegensatz zur Substratspezifität ist der jeweilige Mechanismus innerhalb einer GH-Familie konserviert und ist deshalb gut vorherzusagen (Drula et al. 2021). Beiden Mechanismen ist gemeinsam, dass jeweils zwei Carboxylgruppen der zwei katalytischen Aminosäuren im aktiven Zentrum an der Hydrolyse beteiligt sind. Beim einstufigen (*single displacement*) invertierenden Mechanismus fungiert die untere Carboxylgruppe in Abbildung 1.2.1 (a) als Base und deprotoniert ein Wassermolekül. Das Hydroxidion reagiert darauf mit dem C1 des abzusplattendenden Zuckerrests, das hydroxyliert vom Rest des Moleküls abgeht. Das negative Sauerstoffatom des Rests wird gleichzeitig von der Säuregruppe (AS-Rest oben) protoniert. Beim zweistufigen (*double displacement*) retendierenden Mechanismus (Abbildung 1.2.1) wird dagegen zunächst ein Glykosyl-Enzym-Intermediat mit invertierter Konfiguration des Zuckers gebildet, indem der nukleophile Aminosäurerest (Abbildung 1.2.1 (b) unterer AS-Rest) das C1 des abzusplattendenden Zuckers bindet, während die als Säure fungierende zweite katalytische Aminosäure den Sauerstoff der glykosidischen Bindung protoniert und so der Rest des Zuckermoleküls (HOR - in (b) nicht als freies Molekül gezeigt) das aktive Zentrum verlässt. In einem zweiten Schritt regeneriert ein an die Stelle des Rests getretenes Wassermolekül die nun basisch wirkende Carboxylgruppe. Das dabei entstandene Hydroxidion hydroxyliert den Abgangszucker zurück zur ursprünglichen Konfiguration. Da sich beim invertierenden Mechanismus ein zusätzliches Wasseratom im aktiven Zentrum befindet,

sind die Abstände zwischen den katalytischen Aminosäuren in Enzymen dieses Typs weiter auseinander (ca. 6–11 Å) als beim retendierenden Typ (ca. 5,5 Å) (McCarter und Stephen Withers 1994). Jedoch wurden in einer neueren Studie, mit mehr Strukturen und Vertretern aus vielen GH Familien, andere Spannen für die Abstände zwischen den katalytischen Aminosäuren angegeben, die stark überlappen: retendierend: 4,2–7,7 Å (Mittelwert: $5,6 \pm 0,8$), invertierend: 4,8–12,6 Å (Mittelwert: $8,0 \pm 2,0$); weshalb der Mechanismus nicht durch die Distanzen allein aufgeklärt werden kann (Mhlongo et al. 2014).

Zusammengefasst wären Distanzen unter 4,8 Å jedoch ein Hinweis auf einen retendierenden Mechanismus, während Distanzen über 7,7 Å eher für den invertierenden Mechanismus sprächen.



Current Opinion in Chemical Biology

Abbildung 1.2.1 Allgemeine Mechanismen zur Invertierung (A) oder Beibehaltung (B) der anomeren Konfiguration am Beispiel von β-Glukosidasen. Aus Rye und Withers (2000).

1.2.2 Klassifizierung von Glykosidhydrolasen

Basierend auf der Position der Spaltung innerhalb eines Polysaccharids wird zwischen Endo-Glykosidhydrolasen, die Bindungen innerhalb der Polymerkette hydrolysieren, und Exo-Glykosidhydrolasen, die Kohlenhydrate ausschließlich vom reduzierenden oder nicht reduzierenden Ende eines Poly- oder Oligosaccharids abspalten, unterschieden (Henrissat und Davies 1997).

Die CAZy-Datenbank unterteilt die GH aktuell in 173 Familien (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>; am 11.10.2022). Jedoch gibt es aufgrund von Reklassifizierungen mindestens acht Familien, in denen keine Proteine mehr gelistet sind (GH21, GH40, GH41, GH60, GH61, GH69, GH145 und GH155). Nicht klassifizierte GH-Module (GHnc) können keiner Familie zugeordnet werden; neue Familien werden basierend auf der publizierten Aktivität von mindestens einem Enzym der Familie erstellt (Lombard et al. 2014). Die Grundidee von CAZy war, dass Proteine einer Familie eine ausreichend ähnliche Faltung aufweisen, um eine Homologiemodellierung zu ermöglichen (Davies und Henrissat 1995). Im Gegensatz zu den EC-Nummern (*Enzyme Commission number*) der EC-Klassifikation, die jeweils eindeutig die von dem Modul katalysierte Reaktion beschreibt, sind viele der sequenzbasierten GH-Familien polyspezifisch und enthalten Enzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Gleichzeitig sind Enzyme mit identischer Enzymaktivität in unterschiedlichen Familien zu finden (Henrissat und Davies 1997). Das kann unter anderem daran liegen, dass die Tertiärstruktur von GHn stärker konserviert ist als die Primärstruktur, sodass manche 3D Elemente von GHn in verschiedenen Familien vorkommen können (Naumoff 2011). So sind z.B. Endo-1,4- β -Xylanasen (EC 3.2.1.8) in insgesamt 16 Familien vertreten (GH3, 5, 8-12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62, 89 und 141), und Xylan 1,4- β -Xylosidasen (EC 3.2.1.37), die sukzessive Xylose vom nicht reduzierenden Ende von Xylan abspalten, in 13 Familien (GH 1-3, 5, 10, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 und 120).

Die Beschreibung einer Enzymaktivität durch eine EC-Nummer ist zudem nicht immer eindeutig. Im Gegensatz zu β -Glukosidasen, für die neben endo-1,4- β -D-Glukanasen = Cellulasen (EC 3.2.1.4.), endo-1,3(4)- β -Glukanasen (EC 3.2.1.6.) und β -D-Glukosidasen (EC 3.2.1.21) noch 21 weitere spezifische Nummern existieren (Anhang Tabelle 4.5.1), ist die EC-Nummer für manche Enzymklassen, wie α -L-Arabinosidasen (EC 3.2.1.55: *non-reducing end* α -L-Arabinofuranosidase, EC 3.2.1.99: Arabinan endo-1,5- α -L-Arabinanase und EC 3.2.1.215: Arabinogalaktan exo α -(1,3)- α -D-Galaktosyl-(1,3)-L-Arabinofuranosidase (*non-reducing end*)), noch nicht spezifisch genug. Hier fehlen beispielsweise Nummern für Arabinoxylan Arabinofuranohydrolasen (Axx), die das Xylan-Rückgrat dearabinosylieren können, oder solche die nur Aktivität gegenüber den Arabinoxylan-Oligosacchariden zeigen. Außerdem sollte auch die Fähigkeit, nur Monosubstituierungen oder Disubstituierungen zu spalten berücksichtigt werden (siehe nächsten Abschnitt 1.2.3). Da für einige Enzyme noch keine EC-Nummern existieren, wie aktuell z.B. noch im Falle von Carageenasen, ist es üblich in der CAZy-Datenbank auch bereits charakterisierte Enzyme mit „offener“ EC-Nummer zu listen, wie allgemein für O-glykosyl Hydrolasen (EC 3.2.1.-), bis für deren spezifische Aktivität eine EC-Nummer erstellt wird (Drula et al. 2021).

Die Analyse von 650 neu sequenzierten Organismen (sowohl Bakterien, als auch Eukaryoten und Archaeen) zeigte, dass ungefähr ein Prozent aller Gene für GHn codieren (Naumoff 2005; Henrissat et al. 2009). Durch Eliminierung von Genen oder durch Genduplikation (Parrent et al. 2009; Naumoff

2004; Turakainen et al. 1993), bei der Paraloge entstehen, können sich selbst Stämme derselben Spezies in ihrem GH-Profil unterscheiden; und durch horizontalen Gentransfer ähneln sich einige GH-Sequenzen teils auch in evolutionär entfernten Spezies. Jedoch unterscheiden sich auch evolutionär sehr eng verwandte GHn oft in ihrer Aktivität, da kleine Änderungen in der Primärstruktur bereits die Substratspezifität beeinflussen können.

Viele GHn haben Multidomänenstrukturen, die evolutionär unterschiedlich entstanden sein können. Bei den katalytischen und nicht-katalytischen CAZy-„Domänen“ spricht man hierbei von Modulen, da sie jeweils eine Faltungseinheit und Aktivitätseinheit bilden. Mehrere nicht-homologe, homologe, oder auch identische Module können in demselben Protein auftreten (Naumoff 2011; Dam et al. 2011). Nach dem Baukastenprinzip kommen verschiedene katalytische Module und CBMs miteinander kombiniert vor, oder werden artifiziell rekombiniert (Oliveira et al. 2015). Zwischen zwei Modulen befindet sich meist ein Linkerpeptid, das ausreichend lang und flexibel sein muss, damit sich die einzelnen Module korrekt orientieren und ihre jeweilige Funktion ausführen können (Carrard et al. 2000).

Die Familien, zu denen diese Module gehören, lassen sich teilweise weiterhin in CAZy-Clans zusammenfassen. Die Einteilung in einen Clan beruht auf Gemeinsamkeiten im evolutionären Ursprung, der 3D-Struktur, dem Arrangement der katalytischen Aminosäuren und dem Mechanismus der Spaltung der glykosidischen Bindung (Henrissat und Bairoch 1996). Li et al. (2021) beschreibt eine ähnliche Kategorisierung nach Faltungen: Die *CATH* (*class, architecture, topology/fold, homologous superfamilies*) Datenbank, die hierarchisch Protein-Domänen klassifiziert (Sillitoe et al. 2021). Dort existieren in etwa 27 Homologie-basierte Superfamilien für GHn, die zu 16 unterschiedlichen Faltungen gezählt werden können, die jeweils nicht komplett mit den jeweiligen CAZY-Clans übereinstimmen.

Einige der GH-Familien sind weiter in Subfamilien unterteilt. Diese Einteilung beruht teils auf den Ergebnissen phylogenetischer Analysen und weiteren Unterschieden in Sequenzmotiven (Wilkins et al. 2017), teils auf unterschiedlichen, zwar geringen, aber funktionell wichtigen Spezifitätsunterschieden (Stam et al. 2006), oder den Ergebnissen struktureller und biochemischer Studien (Mewis et al. 2016). Die Existenz von Proteinen mit mehreren GH43-Domänen, wie es auch für das in dieser Arbeit untersuchte *Ts_Axh43A* der Fall ist, wies schon früh auf funktionelle Unterschiede der einzelnen Subfamilien hin (Mewis et al. 2016).

1.2.3 Aktivitäten bestimmter Glykosidhydrolasen

α -L-Arabinofuranosidasen (Abf, EC 3.2.1.55) setzen monomere α -L-Arabinofuranose (L-Araf) von verschiedenen arabinosylierten Substraten frei. Abf, die vor allem Aktivität gegenüber dem Polysaccharid AX zeigen, werden auch als **Arabinoxylan Arabinofuranohydrolasen** (Axh; EC 3.2.1.-) bezeichnet. Es können unterschiedliche Spezifitäten unterschieden werden, die sich zum einen auf die

Position der Arabinofuranosylierung im sechser-Ring der D-Xylp und zum anderen auf die Anzahl der L-Araf-Substitutionen an dem jeweiligen D-Xylp beziehen. Diese Spezifitäten sind weder durch die Einteilung in GH-Familien, noch durch die zuvor beschriebene EC-Klassifizierung ersichtlich. Jedoch geben die meisten Autoren die Spezifität mittlerweile wie folgt im Namen des Enzyms an: Als A_{xh}-d3 bezeichnet man A_{xh}, die spezifisch die α -(1,3) verbundene L-Araf von doppelt-substituierten D-Xylp-Resten spalten (van Laere et al. 1997). Sie sind bisher in der Familien GH51 und in GH43 in den Subfamilien 10 (GH43_10) und 36 (GH43_36) beschrieben (van Laere et al. 1999; da Fonseca et al. 2018; Pouvreau et al. 2011; Sørensen et al. 2006; Lagaert et al. 2010). Enzyme, die ausschließlich L-Araf von monosubstituierten D-Xylp-Resten freisetzen können und entweder eine Präferenz gegenüber der O-(1,2)- oder der O-(1,3)-Bindung aufweisen, werden als A_{xh}-m2, beziehungsweise als A_{xh}-m3 bezeichnet. In GH62 sind ausschließlich Enzyme mit dieser Spezifität beschrieben (Wilkins et al. 2017; da Fonseca et al. 2018; Phuengmaung et al. 2018), wobei auch in GH51 und GH43_16 Abf-Enzyme mit A_{xh}-m Aktivität zu finden sind (Biely et al. 2016; Pouvreau et al. 2011; Sakka et al. 2012; Bourgois et al. 2007).

Einige Enzyme wurden bereits charakterisiert, die A_{xh}-d und A_{xh}-m Aktivität gegenüber AX vereinen (Sakamoto et al. 2013). Die Mehrheit konnte jedoch terminale Doppelsubstituierungen vom nicht-reduzierenden Ende effektiver hydrolysieren als die internen Doppelsubstituierungen (Borsenberger et al. 2014; Koutaniemi und Tenkanen 2016). Zudem wurde die Aktivität oft nur gegenüber AXOS beobachtet und nicht gegenüber dem Polysaccharid, was eher dafür spricht diese Spezifitäten als Abf-md anstatt A_{xh}-md anzugeben, da sich der Begriff „Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase“ auf das Polysaccharid Arabinoxylan beziehen sollte. Ein Beispiel hierfür ist *TsArf51B* von *Thermoclostridium stercorarium*, das sowohl A^{2,3}XX als auch XA^{2,3}XX vollständig de-arabinosylierte (Bröker 2019). Abfs tragen wesentlich zum vollständigen Abbau von Biomasse bei, da (1.) die Arabinosylierungen am Xylan-Rückgrat die endolytische Aktivität einiger Endo-Xylanasen verhindern würden, (2.) Arabinosereste über eine teilweise Acetylierung zur Quervernetzung von Polysacchariden in der Pflanzenzellwand beitragen, und (3.) Pektin verzweigte sowie nicht verzweigte Arabinane enthält (Mroueh et al. 2019).

Diese Spaltungsspezifitäten sind auf die Architektur im aktiven Zentrum des jeweiligen Enzyms zurückzuführen. Dort befindet sich z.B. eine Bindetasche nahe der -1 Position (Nomenklatur von Davies et al. (1997)), die eine zweite Arabinose aufnehmen kann (dos Santos et al. 2018). Ähnliches ist auch für Xyloglukanasen beschrieben, die das Glukan-Rückgrat trotz Xylosyl-Substitution an der -1 Position spalten können (dos Santos et al. 2015). Da jedoch beim Xyloglukan die Substitutionen der Glukose immer am O-6 verbunden sind, ergeben sich hier keine unterschiedlichen räumlichen Anordnungen, wie es bei den Arabinofuranosidasen der Fall ist, wo die Arabinofuranosylreste entweder am O-2 und am O-3 der Rückgrat-Xylosen verknüpft sein können, weshalb die vielen möglichen Spezifitäten der

Arabinofuranosidasen eine Sonderstellung in den GHn einnehmen. Arabinanasen (EC 3.2.1.99) als endo-hydrolytische Enzyme wurden hier nicht berücksichtigt.

1.3 Industrielle Anwendung von Glykosidhydrolasen

Der Einsatz von Biokatalysatoren kann Prozesse selektiver, effizienter und durch die Substitution von toxischen Stoffen, Lösungsmitteln und extremen Temperaturen z.B. auch deutlich nachhaltiger und weniger gefährlich machen (Atalah et al. 2019). Glykosidhydrolasen finden in den unterschiedlichsten Industrien Anwendung: In der Brau-, Wein- und Getränkeindustrie (Fruchtsaftherstellung) sowie in der Backwaren- Futtermittel-, Textil-, Bekleidungs-, Pharma- und Papierindustrie (Sathya und Khan 2014). Zum einen können glykosylierte Metabolite unerwünschten Einfluss auf den gustatorischen, visuellen, oder taktilen Eindruck eines Lebensmittels haben. In diesem Fall können GHn dazu beitragen den jeweiligen Stoff zu deglykosylieren. Zum anderen haben die Aglykone teilweise wünschenswerte Eigenschaften, wie antiinflammatorische, antioxidative und antimutagene Wirkungen (Mueller et al. 2018).

Als Beispiel sind die glykosylierten Flavonoide aus Zitruschalen zu nennen, die in der Saftherstellung zur Geschmacksverbesserung de-glykosyliert werden. Beim Backen können Hemicellulasen, z.B. Xylanasen, Teigeigenschaften wie Maschinengängigkeit, Krustenstabilität, Lagerfähigkeit und Konsistenz verbessern. In der industriellen Alkoholproduktion wird von Amylasen, Cellulasen und Hemicellulasen Gebrauch gemacht, um die Polysaccharide besser zugänglich zu machen, diese zu verzuckern und Trübungen zu reduzieren oder zu entfernen. Chitinasen können beim Entschuppen von Fischen bei der Filet-Aufbereitung eingesetzt werden (Spök und Proksch 2007). Andere Anwendungen von Glykosidhydrolasen wurden von Sathya und Khan (2014) zusammengefasst, wie beispielsweise auch die Verbesserung von Weinaroma durch α -L-Rhamnosidasen, Verzögerung der Teig-Alterung durch Erhöhung der Haltbarkeit und die Verbesserung der Knetbarkeit von Teigen, oder die Produktion von Cyclodextrinen für die Pharmaindustrie durch Cyclodextrin-Glykosyltransferasen (CGTasen), Polysaccharidabbau zur anschließenden Biokraftstoff- und Chemikalien-Erzeugung, oder die Verbesserung der Malzbereitung zur Bierherstellung. Zudem können durch enzymatische partielle Hydrolyse entstandene Oligosaccharide präbiotisch wirken, was sie interessant für die Lebensmittelindustrie macht (Vera et al. 2021; Karlsson et al. 2018). Da eine erhöhte Temperatur von über 50°C zum einen die Wahrscheinlichkeit für mikrobiologische Kontamination senkt (Hygienisierung), zum anderen die Löslichkeit von Substraten erhöht und die Viskosität erniedrigt, sowie Reaktionen schneller stattfinden, sind vor allem Enzyme aus thermophilen Mikroorganismen für die Biotechnologie von großem Interesse (Atalah et al. 2019).

Im Zuge des enormen Energiebedarfs einer globalisierten Welt, die Ausbeutung und Erschöpfung fossiler Brennstoffe und ansteigender Preise, der zunehmenden Umweltverschmutzung sowie des Klimawandels durch ansteigende CO₂-Emissionen, steigt der Wunsch nach sauberen und erneuerbaren Alternativen (Pandiyan et al. 2019) und einer funktionierenden Kreislaufwirtschaft. Eine Vision ist, fossile Brennstoffe durch umweltfreundlichere, nachhaltigere Alternativen, wie z.B. Biokraftstoffe mit besserer CO₂-Bilanz zu ersetzen (Sindhu et al. 2019). So ist aktuell, und seit fast 40 Jahren (Wiegel 1982), einer der Hauptgründe für die Erforschung von Glykosidhydrolasen der effiziente Abbau von Biomasse. Die durch den Abbau entstandenen Zucker sollen anschließend gewinnbringend zu biobasierten Produkten umgewandelt werden (Duque et al. 2018; Martín et al. 1988; Zverlov und Schwarz 2008). Hierfür sind nicht nur die Enzyme wichtig, die die Hauptkette der Polysaccharide spalten, sondern auch die oftmals vernachlässigten Enzyme, die Seitenketten, Monosaccharid-Dekorierungen, Acetylierungen und Quervernetzungen zu anderen Polysacchariden oder Peptiden abbauen können (Malgas et al. 2019).

Biokraftstoffe der ersten Generation, Bioethanol und Biodiesel, werden aus meist auch als Lebensmittel- oder Futtermittel verwendbaren Rohstoffen wie Zuckerrohr und Mais bereits in industriellem Maßstab hergestellt (Lee und Lavoie 2013). Dabei wird Biodiesel meist aus Rapsöl in einem chemischen Verfahren hergestellt und ist deshalb hier nicht von Interesse, wobei auch in Richtung mikrobiellen Biodiesels geforscht wird (Passoth und Sandgren 2019). Bei den „zuckerhaltigen“ Pflanzen, wie Zuckerrohr und Zuckerrüben, die hohe Anteile an Saccharose aufweisen, können die durch Wasser extrahierbaren Zucker auch ohne vorgeschaltete Hydrolyse von Hefen direkt zu Bioethanol fermentiert werden. Für stärkehaltiges Pflanzenmaterial wie Mais, Getreide oder Kartoffeln muss die Stärke nach der Verkleisterung durch Pflanzen-eigene oder zugegebene Amylasen in Glukose umgewandelt werden (Verband der Deutschen Biokraftstoffindustrie e.V. (VDB)).

Im Gegensatz zu Biokraftstoffen der ersten Generation, die mit der Nahrungs- und Futtermittelindustrie konkurrieren, verwenden Biokraftstoffe der zweiten Generation Lignocellulose-Biomassen, wie Getreide- und Maisstroh (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. 2014; Lee und Lavoie 2013). Diese fallen in großen Mengen als Nebenprodukte in der Lebensmittelindustrie und in der Land- und Forstwirtschaft an (Passoth und Sandgren 2019). Die Festigkeit von Lignocellulose macht eine intensive Vorbehandlung der Biomasse notwendig. Neben mechanischen, physikochemischen und thermischen Vorbehandlungen, die die Polymere im Stroh für Enzyme zugänglich machen, können auch cellulolytische und lignolytische Bakterien und Pilze, wie *Acetivibrio thermocellus* (*Clostridium thermocellum*) und *Trametes versicolor*, eingesetzt werden. Da diese jedoch die Monosaccharide verstoffwechseln, wäre der direkte Einsatz von Enzymen wie Cellulasen und Laccasen schon bei der Vorbehandlung vorteilhafter. Aus der vorbehandelten Biomasse sollen im Anschluss durch Cellulasen und Hemicellulasen fermentierbare Monosaccharide erzeugt werden (Passoth und Sandgren 2019).

Mittlerweile ist auch schon von einer dritten Generation die Rede, bei der als Rohstoff Algenbiomasse verwendet wird (Lee und Lavoie 2013). Die großen Vorteile liegen in der schnellen, einfachen und hohen Biomasseproduktion und die Möglichkeit den Kultivierungsprozess direkt mit CO₂-produzierenden Industrien zu verbinden. Jedoch ist die Notwendigkeit von großen Wasser-, Stickstoff- und Phosphormengen bisher der limitierende Faktor, weshalb die Produktion von Kraftstoffen oder Plattformchemikalien durch Algen bisher nicht wirtschaftlich ist (biofuel.org.uk 2022).

Für die Biokraftstoff-Produktion der zweiten Generation wurden Enzyme bereits separat, oder simultan für Hydrolyse und Fermentation eingesetzt, oder mittels Gentechnik in cellulolytische oder fermentative Mikroorganismen eingebracht (Ríos-Fránquez et al. 2019). Auch wenn die Funktionalität des Prozesses schon lange bewiesen ist, ist er aufgrund des nötigen hohen Enzymeinsatzes, von 10–100 g Cellulase pro Tonne Trockenmasse lignocellulosischer Biomasse (Ríos-Fránquez et al. 2019), und der unvollständigen Substratverzuckerung bisher noch unwirtschaftlich (Lee und Lavoie 2013). Obwohl bereits effiziente cellulolytische und hemicellulolytische Enzymmische, wie Cellic® CTec3 von Novozymes (Bagsvaerd, Dänemark), oder ACCELLERASE® TRIO™ von DuPont (Willmington, USA) kommerziell erhältlich sind, werden neue effizientere Enzyme vor allem für die noch energie- und kostenintensive Vorbehandlung benötigt (Passoth und Sandgren 2019).

1.4 Charakterisierungsmethoden von Kohlenhydraten und Hydrolyseprodukten von CAZymes

Für die vollständige Hydrolyse von Lignocellulose durch maßgeschneiderte Enzymcocktails müssen die Zusammensetzung der Monosaccharide und die genauen Bindungen in Lignocellulose-Biomasse unterschiedlichen Ursprungs und die genauen Spezifitäten der eingesetzten Enzyme bekannt sein. Damit soll eine wirtschaftliche Verwertung der Ausgangsprodukte und größtmögliche Ausbeuten an Brennstoffen, oder chemischen Vorläufern für die Herstellung höherwertiger Produkte, erreicht werden.

Die Aufklärung der Spezifität eines Enzymes ist nur durch den Einsatz definierter Substrate möglich. Denn nur wenn man genau weiß, welche Bindungen in dem Ausgangssubstrat vorhanden waren, kann man anhand der entstandenen Produkte auf die Spezifität eines Enzymes schließen.

Durch verschiedene Vorbehandlungen aus komplexen Rohstoffen, wie Abfall- und Nebenprodukten aus Agrar- und Forstwirtschaft können Polysaccharide mit mehr oder weniger bekanntem Aufbau extrahiert werden.

Für die genaue Bestimmung von Rückgrat- und Seitenketten-Sequenzen, anomeren Konfigurationen und Bindungspositionen in unterschiedlichen Kohlenhydratsubstraten können verschiedene

Methoden kombiniert werden: Flüssigkeitschromatographie (LC), Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (NMR), Kapillarelektrophorese und verschiedene massenspektrometrische Techniken (MALDI-TOF-MS, GC-MS, CID-MS-MS), und auch Hochdurchsatz-Methoden wie *glycome profiling* mittels Glycan-spezifischer monoklonaler Antikörper (Xue et al. 2021). Die durch diese Methoden charakterisierten Cellulosen und verschiedene Hemicellulosen, Gummiarten und Pektinfraktionen können für Screenings nach gewissen endo-lytischen, sowie einigen exo-lytischen Aktivitäten eingesetzt werden.

Durch eine endo-hydrolytische Spaltung von Polysacchariden können zudem Oligosaccharide produziert werden, die als Substrate für einige exo-hydrolytische Enzyme dienen, deren Aktivität gegenüber dem Polysaccharid nicht sichtbar wäre (Mechelke 2018). Die durch Xylanasen aus AX produzierten Oligosaccharide (AXOS, Arabinoxyloligosaccharide) können z.B. verwendet werden, um die verschiedenen, zuvor beschriebenen Axh-Spezifitäten (Kapitel 1.2.3) zu unterscheiden. In den von Fauré et al. (2009) vereinfachten Abkürzungen steht ein „X“ für eine unsubstituierte 1,4-verbundene Rückgrat-Xylose, während ein „A“ für eine Xylose steht, die entweder eine Arabinosylierung am O-2 (A^2), oder am O-3 (A^3), oder beide Substitutionen ($A^{2,3}$) trägt.

Passende Substrate für die Charakterisierung von enorm spezialisierten Enzymen können auch mit Mutanten hergestellt werden, in denen das zu untersuchende Enzym ausgeschaltet wurde. Die entstandenen Produkte können dann wiederum als Substrat für das zu charakterisierende Enzym eingesetzt werden (Ndeh et al. 2017).

Nach der Hydrolyse gewählter „definierter“ Substrate müssen die Produkte analysiert werden. Colorimetrisch können durch Hydrolyse entstandene reduzierende Zucker mittels Dinitrosalicylsäure-Reagenz (DNSA) quantifiziert werden (Miller 1959; Wood und Bhat 1988). Die Produkte können außerdem durch chromatographische Methoden aufgetrennt werden. Dünnschicht-Chromatographie stellt eine schnelle und einfache Methode dar, um einige unterschiedliche Monosaccharide zu unterscheiden und teilweise den Grad an Polymerisation festzustellen (Zverlov et al. 2002). Die *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD) kann zur Trennung und qualitativen sowie quantitativen Analysen von Kohlenhydraten in Hydrolysaten verwendet werden. Anhand von Standards können die Analyten teils sogar bis zu wenigen mg/L quantifiziert werden (Mechelke et al. 2017).

Zur einfachen Untersuchung von Glykosidasen haben sich zudem verschiedene Modellsubstrate mit Chromophoren, z.B. Methylumbelliferyl- oder para-Nitrophenyl-Glykosylkonjugate, etabliert, die bei Spaltung fluoreszieren und somit eine zeitsparende visuelle und photometrische Auswertung und Charakterisierung unter verschiedenen Bedingungen möglich machen. Jedoch muss beachtet werden, dass gemessene spezifische Aktivitäten nicht direkt auf natürliche Substrate übertragbar sind. In der Literatur finden sich Beispiele, in denen diese Modellsubstrate mit natürlichen Substraten verglichen

wurden. In manchen Fällen wird durch Verwendung von *p*NP-Substraten z.B. die Produktinhibition zu hoch bewertet, in anderen Fällen jedoch zu niedrig (Teugjas und Väljamäe 2013). Ihre breite Anwendung gewährleistet jedoch Vergleichbarkeit zwischen Enzymen.

1.5 Einflüsse auf die Spezifität eines Enzyms

Die Spaltungsart (endo/exo, invertierend/beibehaltend) und das Substrat eines Enzyms kann wie beschrieben sehr charakteristisch für ein Enzym sein. Viele intrinsische Faktoren im Enzym wirken zusammen und determinieren die Spezifität:

- Art, Anzahl und Entfernung katalytischer Aminosäuren.
- Verfügbarer Raum nahe den katalytischen Aminosäuren, bzw. die Größe des aktiven Zentrums
- Koordinierende Aminosäuren und Ionen im aktiven Zentrum.
- Aminosäuren mit Substratwechselwirkung (auch außerhalb des aktiven Zentrums).
- Oberflächenarchitektur der Substratbindestelle (gebogene Oberfläche mit Interaktion zu einem helikalen Substrat wie Arabinan, gerade Oberfläche mit Interaktion zu einem geradlinigeren Substrat wie Arabinoxylan (Goyal et al. 2016)).
- 3D-Strukturen (wie Peptidschleifen, die beispielsweise einen Kanal der Substratbindestelle an einem Ende schließen können und so den Unterschied von endo- zu exo-Aktivität gegenüber einem Polysaccharid, oder der Präferenz für Oligosaccharide, ausmachen können).
- Zusätzliche Domänen oder Enzymmodule (z.B. ein Substratbindungsmodul, oder eine Domäne, die allein durch sterische Hinderung den Zugang zum aktiven Zentrum verändert).

Ob man eine Spezifität identifizieren oder überhaupt entdecken kann, hängt neben den Eigenschaften des Enzyms auch von der Erwartungshaltung, also vor allem vom eingesetzten Substrat, ab. So lassen sich Spezifitäten, die sich beispielsweise auf die Lokalisierung einer Substituierung innerhalb eines Polysaccharids beziehen, nicht mittels eines Disaccharids messen. Dadurch bleiben mögliche Spezifitätsmerkmale bisher eventuell unentdeckt, da die verwendeten oder erhältlichen Substrate diese nicht zulassen (Mewis et al. 2016).

1.6 Ursprungsorganismen der in dieser Arbeit untersuchten, neuen Glykosidhydrolasen

Gene für potentielle GHn können in fast allen Organismen, mit Ausnahme von einigen Archaeen und einzelligen Parasiten, gefunden werden (Naumoff 2011). Eine besonders gute Quelle für neue Enzyme sind Bodenmikroorganismen (Verastegui et al. 2014). Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Organismen kurz beleuchtet werden.

1.6.1 Ausgewählte mesophile Bakterien

Das eigentlich nicht als cellulolytisch beschriebene, mesophile Bakterium *Rhizobium etli* ist ein aerober, gramnegativer, flagellierter Wurzelsymbiont von Leguminosen. Das zum Phylum *Pseudomonadota* (früher *Proteobacteria*) gehörende Bakterium kann molekularen Stickstoff assimilieren, den die Pflanze in Form von Ammonium verwerten kann. Die Rhizobien verwerten jedoch verschiedene Kohlenhydrate, die während der Symbiose von der Pflanze übernommen werden (Segovia et al. 1993), weshalb zahlreiche Gene für CAZymes in dessen Genom zu finden sind. Es wurde ausgewählt, da eine GH in seinem Genom in der CAZY-Datenbank als nicht klassifiziert (in Kategorie GHnc) gelistet war.

Das aus dem Boden isolierte, pink pigmentierte, fakultativ methylo trope, polar flagellierte, gramnegative, asporogene Stäbchen *Methylorubrum extorquens*, kann auf Methanol als einziger C-Quelle und bei 30 °C am besten wachsen (Green und Ardley 2018; Urakami und Komagata 1984). Nach seiner Erstbeschreibung mit dem Gattungsnamen *Protomonas* (1913) wurde es zu *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* und *Methylobacterium* gezählt, bevor die Gattung *Methylorubrum* vorgeschlagen wurde (Green und Ardley 2018). *Methylorubrum extorquens* wurde zur Typ-Spezies, der Stamm DSM1337^T zum Typ-Stamm der Gattung *Methylorubrum*, die wie die Gattung *Rhizobium* zu den Alphaproteobakterien gehört, jedoch keine Symbiose mit Leguminosen eingeht.

1.6.2 Ausgewählte thermophile und hyperthermophile Bakterien

Hydrolasen aus thermophilen Organismen sind besonders interessant, weil sie bei Temperaturen aktiv sind, bei denen herkömmliche Prozesse in der Industrie ablaufen (Blumer-Schuetz et al. 2014). Allgemein haben Enzyme aus thermophilen gegenüber ihren Gegenstücken aus mesophilen und psychrophilen Organismen einige Vorteile. Zum einen gestaltet sich die Reinigung der rekombinant synthetisierten Enzyme aus mesophilen Produktionsorganismen durch die Fällung vieler Wirtsproteine durch Hitzebehandlung einfacher. Zum anderen sind sie resistenter gegenüber Hitze, sowie oft auch gegenüber chemischen Substanzen, die bei mesophilen Enzymen schneller zu einer Denaturierung führen. Außerdem bringen die höheren Reaktionstemperaturen eine oft wünschenswerte Abnahme der Viskosität und schnellere Reaktionsgeschwindigkeiten in entsprechenden Prozessen mit sich (Amin et al. 2021). Auch sind diese sogenannten „Thermozymer“ allgemein stabiler und deshalb auch interessant für die klinische Diagnostik (Pantazaki et al. 2002).

Schon im frühen 20. Jahrhundert wurden die ersten Studien über thermophil wachsende Mikroorganismen veröffentlicht (Miehe 1907). Jedoch erhöhte die Beschreibung des ersten nicht sporenbildenden thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Brock und Freeze 1969) das Interesse an den thermoaktiven und thermostabilen Enzymen, und es begann die intensive Forschung zur biotechnologischen Anwendung derselben (Turner et al. 2007). Seit einiger Zeit wird die folgende

Einteilung von Mikroorganismen nach ihrer Wachstumstemperatur, bzw. ihrer Temperaturspanne (Wiegel 1990) akzeptiert (Turner et al. 2007), obwohl unterschiedliche Spannen eigentlich zeigen, dass keine wirklichen Grenzen existieren (Russell und Fukunaga 1990): Psychrophile, mit Wachstum bis 20 °C; Mesophile, die bei mäßigen Temperaturen zwischen 10–15 °C und 45 °C wachsen können; Thermophile, die ihr schnellstes Wachstum zwischen 40–45 °C und 70 °C zeigen; und Hyperthermophile, die bei Temperaturen zwischen 80 °C und 113 °C optimal wachsen können (Stetter 2009).

Thermus thermophilus, ein gelb pigmentiertes, nicht motiles, aerobes, nicht sporenbildendes, gramnegatives Stäbchen mit 69 % GC-Gehalt wurde aus einer heißen Quelle in Japan isoliert (Oshima und Imahori 1971). Es wächst im Temperaturbereich von 47–85 °C mit einem Optimum zwischen 65 °C und 72 °C, einer pH-Toleranz zwischen 5,1 (21 °C) und 9,6 (21 °C) mit einem Optimum bei pH 7,5 (21 °C; ≈ pH 7,0 bei 75 °C) (Oshima und Imahori 1974).

Die zwei thermophilen Phyla *Thermotogota* (früher *Thermotogae*) und *Aquificota* (früher *Aquificae*) gehören zu den evolutionär ältesten Zweigen im phylogenetischen Baum der Bakterien (Gupta 2021; Madigan et al. 2013). *Thermotoga maritima* und *Thermotoga neapolitana* sind beides strikt anaerobe, monotrich flagellierte, gramnegativ färbende, hyperthermophile Stäbchen, die bis 90 °C mit einem Optimum bei ungefähr 80 °C wachsen (Huber et al. 1986; Jannasch et al. 1988). Etwa 20 % der Gene von *T. maritima* sind wohl archaeellen Ursprungs und 7 % der Gene codieren für Kohlenhydrat-metabolisierende Proteine (Madigan et al. 2013). Bei der anaeroben chemoorganotrophen Gärung entstehen vor allem Milchsäure, Essigsäure, Kohlendioxid und Wasserstoff. Es wurden bereits sehr viele CAZymes von *T. neapolitana* (Zverlov et al. 1997b, 1997a; Duffaud et al. 1997) und *T. maritima* (Liebl et al. 1992; Liebl et al. 1998; Bronnenmeier et al. 1995) beschrieben.

Alle Spezies der zum Phylum *Bacillota* (früher *Firmicutes*) gehörigen Gattung *Caldicellulosiruptor* sind hyperthermophile, anaerobe, asporogene, cellulolytische Stäbchen mit grampositivem Zellwandtyp (Kim et al. 2021). *Caldicellulosiruptor bescii* wurde ursprünglich im Valley of Geysers in Kamchatka isoliert, als *Anaerocellum thermophilum* Z-1320 mit Wachstum bis 83 °C und optimalen Temperaturen zwischen 72 °C und 75 °C beschrieben und bei der DSMZ hinterlegt (Svetlichnyi 1990). Eine erneute Beschreibung des DSMZ-Stammes DSM 6725^T im Zuge der Reklassifizierung zu *C. bescii* ergab deutliche Unterschiede bezüglich der Wachstumstemperaturen und der verwendeten Polysaccharide im Vergleich mit dem Stamm Z-1320 (Yang et al. 2010). So wurde *C. bescii* 2010 mit Wachstum bis 90 °C und einem Optimum bei 78–80 °C als das bis dato thermophilste, als cellulolytisch charakterisiertes Bakterium beschrieben. Andere Arten der Gattung, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* und *C. kronotskyensis*, zeigen ein optimales Wachstum bei 70 °C, während *C. hydrothermalis* eine um 5 °C niedrigere Temperatur bevorzugt (Rainey et al. 1994; Miroshnichenko et al. 2008). *Aquifex* und

Thermotoga Spezies zeigen zwar Wachstum bei noch deutlich höheren Temperaturen, und es wurden von beiden auch Endoglukanasen bei Temperaturen bis zu 106 °C produziert (Kim et al. 2000; Thapa et al. 2020), jedoch werden diese zwei Gattungen nicht explizit als cellulolytisch angesehen, da der Celluloseabbau durch das Fehlen von für effiziente Celluloseabbauer charakteristischen Exo-Glukanasen eingeschränkt ist (Xu et al. 2015). Als wirklich cellulolytisch sollten nur Bakterien gelten, die starke Aktivität gegenüber natürlicher kristalliner Cellulose zeigen (Zverlov et al. 2010).

Thermoclostridium stercorarium (früher *Clostridium stercorarium*; Zhang et al. 2018), wurde mehrmals aus sich selbst aufheizenden Komposthaufen isoliert und ist ein auf Hemicellulose-Abbau spezialisiertes (Zverlov und Schwarz 2008), anaerobes, sporenbildendes, cellulolytisches, thermophiles Bakterium, das optimales Wachstum bei 65 °C zeigt (Madden 1983). Es zeigt zudem ein enormes cellulolytisches (Bronnenmeier et al. 1991; Riedel et al. 1997) und hemicellulolytisches Potenzial (Schwarz et al. 1990; Adelsberger et al. 2004; Bröker 2019). Viele seiner Enzyme wurden bereits im Detail beschrieben (Bronnenmeier et al. 1997; Schwarz et al. 1995; Zverlov et al. 2000), jedoch sind einige GHn von *T. stercorarium* noch gar nicht klassifiziert, oder die Spezifität einzelner Module noch nicht hinreichend aufgeklärt.

1.7 Identifizierung neuer Glykosidhydrolasen und Auffinden neuer Aktivitäten

Glykosidhydrolasen finden, wie bereits erwähnt, eine sehr breite Anwendung und bieten sehr wahrscheinlich noch viele bisher unbekannte Möglichkeiten im Hinblick auf pharmazeutische, lebensmitteltechnologische, sowie klimaneutralere und energietechnische Anwendungen. Deshalb ist es sinnvoll, nach neuen, sowie besseren, d.h. z.B. thermostabileren, aktiveren, und/oder kostengünstiger zu produzierenden GHn zu suchen.

Eine umfangreiche Quelle für weitere mögliche CAZymes-codierende Gensequenzen bilden neue Genome von hydrolytischen Mikroorganismen (Drula et al. 2021), aber auch Daten aus sogenannten OMICs-Ansätzen (Thapa et al. 2020), also Metagenome (Hess et al. 2011), Transkriptome, oder Proteome von Pflanzenzellwand-abbauenden Mikroorganismen-Gemeinschaften. Diese können aus verschiedensten, pflanzliche Biomasse enthaltenden Habitaten erhalten werden. Beispiele hierfür wären der Pansen von Rindern (Hess et al. 2011), der Verdauungstrakt von Termiten (Rashamuse et al. 2017), oder Biogasreaktoren (Rettenmaier et al. 2019). Zum Erhalt und der Erforschung von Enzymen aus unerschlossenen Quellen mit verbesserten biochemischen Eigenschaften und katalytischen Funktionen, können auch das Protein Engineering, die synthetische Biologie und Enzymologie, das rechnergestützte Modelling und verschiedene bioinformatische Tools beitragen. Dies revolutioniert seit einigen Jahren die Enzymforschung (Thapa et al. 2020). Andererseits erweitern im Umkehrschluss die Charakterisierungen neu aufgefundener Enzyme sowie charakterisierte

natürliche Enzyme die bioinformatischen Analyse- und Vorhersagemöglichkeiten und die Basis für die Entwicklung neuer Modelle.

Zur Identifizierung von GHn kann man zwei unterschiedliche Ansätze verfolgen:

1. **Bioinformatische, sequenzbasierte Methoden:** Sie nutzen Homologievergleiche zu bereits bekannten GHn oder CBMs, um GHn in neuen Genomdaten zu identifizieren (Drula et al. 2021). Metagenome als Datenquelle bergen dabei die Möglichkeit, auch spezialisierte GHn von extremophilen und auch von aus verschiedenen Gründen nicht kultivierbaren Organismen zu finden. In der CAZy-Datenbank sind einige putative GHn, die sich bisher nicht in die aktuellen GH-Familien einordnen lassen, unter „GHnc“ gelistet. Um auch Gene für Enzyme zu entdecken, bei denen weder die Primär-, die Sekundär-, noch die Tertiärstruktur bekannt sind, kann z.B. nach konservierten, putativ katalytischen Domänen ohne bekannter Funktion (*domain of unknown function*, DUF) gesucht werden, die sich auf Gen-Ebene in der Nachbarschaft von Domänen befinden, die bereits auf CAZymes schließen lassen, wie z.B. codierende Sequenzen für CBMs oder Dockerin-Module (Mroueh et al. 2019). Sucht man also z.B. nach einem Enzym, das Aktivität gegenüber Xylan zeigt, könnte es lohnend sein, nach einem Protein mit einer CBM6 zu suchen, da für CBMs dieser Familie die Affinität zu Xylan bereits gezeigt wurde. Bei diesem Ansatz müssen die ausgewählten Kandidaten rekombinant produziert und anschließend experimentell auf ihre Aktivität gegenüber den gewünschten Substraten getestet werden. Die Erfolgswahrscheinlichkeit ist jedoch aufgrund der variablen Modularchitektur der teilweise multimodularen Enzyme und auch unterschiedlicher Spezifitäten trotz relativ hoher Sequenzähnlichkeit zu bekannten Enzymen der gewünschten Aktivität nicht immer hoch.

2. **Funktionsbasierte Methoden:** Ein anderer Ansatz, um GHn mit gewisser Aktivität zu finden, ist das Screenen von Kulturüberständen von Reinkulturen, Mischkulturen, oder Anreicherungskulturen, oder von Genbibliotheken unter Verwendung von optisch oder anderweitig messbaren Aktivitätstests (Liu 2022). Dafür können z.B. chromogene Substrate oder Färbemethoden für Substrate oder Produkte dienen, die in Hochdurchsatz-Ansätzen eingesetzt werden (da Fonseca et al. 2020). Beispiele solcher Ansätze sind der Abbau von Substraten in Agar-Platten, oder in nativen SDS-PAGE-Gel-Zymogrammen, oder eine Farbbildung bei Umsatz eines Substrats in Mikrotiterplatten (Chuzel et al. 2018; Liu et al. 2022). Ein Nachteil dieser Methode ist die geringe Zahl der zur Verfügung stehenden Substrate. Die Identifizierung der für den Abbau verantwortlichen Enzyme oder Gene aus aufgefundenen aktiven Klonen aus der Durchforstung von Genbibliotheken erfolgt anschließend nach Sequenzanalyse der rekombinanten DNA z.B. durch Enzymreinigung oder Massenspektrometrie (MS) von Peptiden aus Proteinbanden von Zymogrammgelele.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Für Enzyme korrelieren die Primärsequenz, die daraus abgeleitete 3D-Struktur (durch Vergleich mit bekannten Kristallstrukturen) und die Funktion nur zum Teil. Bioinformatische Methoden können zwar erste Hinweise geben, aber erlauben nicht immer eine eindeutige Vorhersage der enzymatischen Aktivität. Deshalb ist die biochemische Charakterisierung neuer Enzyme, deren Gene in (Meta)Genomsequenzen identifiziert werden, notwendig. Die fortlaufend aus neu veröffentlichten GenBank Sequenzen abgeleiteten GHn werden aktuell z.B. nur automatisch in eine der bestehenden CAZY Familien eingeteilt, wenn deren Aminosäuresequenzähnlichkeit (mittels BLASTp) zu einer bereits charakterisierten GH extrem zuverlässig (E-Wert < 1e-50) über die Gesamtlänge der Sequenz übereinstimmt (Drula et al. 2021).

Die in der vorliegenden Arbeit verfolgte biochemische Charakterisierung neuer noch nicht klassifizierter Enzyme kann einerseits zur Identifizierung neuer, noch unbekannter Enzymaktivitäten führen, andererseits kann sie dazu dienen neue Datenbankreferenzen zu schaffen, die die Grundlage für die Funktions-orientierten BLASTp Suchen erweitern. Dabei sollten vor allem Enzyme charakterisiert werden, die möglichst geringe Sequenz- und Strukturähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Enzymen aufweisen, um die Basis für die automatisierte bioinformatische Klassifizierung möglichst breit zu fächern und zu erweitern (Helbert et al. 2019). Das Auffinden neuartiger Aktivitäten mit industriellem Anwendungspotential stand für diese Arbeit nicht im Vordergrund. Nach der Hypothese, dass Aminosäuresequenzen von Enzymen, die nicht oder nur geringfügig mit Sequenzen charakterisierter Enzyme übereinstimmen, das Potential für möglicherweise neuartige Aktivitäten aufweisen könnten, sollten zunächst einige bisher nicht klassifizierte putative Glykosidhydrolasen untersucht werden. So sollten Enzyme mit der konservierten Domäne DUF337 und einige mit der konservierten Domäne XynB2 kloniert, heterolog löslich produziert und auf ihre mögliche Aktivität hin untersucht werden.

In den letzten Jahren wurden viele Enzyme in neue GH-Familien eingeordnet. Oft geschah dies aufgrund der Übereinstimmung zu manchmal nur einem, zudem biochemisch nur unvollständig charakterisierten, Enzym (Helbert et al. 2019). Dies war der Fall für die Genprodukte von Tmari1078, CTN_1495, Athe_2581 und Cst_00400 aus *T. maritima*, *T. neapolitana*, *C. bescii* und *T. stercorarium*, die alle in die Familie GH106 aufgenommen wurden. Des Weiteren wurden 2019 die Enzyme, die durch Csac_0437, Calhy_0274 und Calkro_0290 aus *C. saccharolyticus*, *C. hydrothermalis* und *C. kronotskyensis* codiert werden, zu GH159 hinzugefügt. Diese sieben Enzyme sollten aufgrund der limitierten biochemischen Informationen im Vergleich zu verwandten Enzymen im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf ihr favorisiertes Substrat, ihre pH- und Temperaturoptima, kinetische Parameter und soweit möglich strukturell charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der multimodularen Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase *Ts_Axh43A* aus *Thermoclostridium stercorarium*, einem Enzym, welches wie die in dieser Arbeit charakterisierten GH159-Enzyme Arabinofuranosidaseaktivität besitzt. Das Enzym *Ts_Axh43A* besitzt eine ungewöhnliche Modularchitektur mit zwei katalytischen Modulen, zwischen denen sich ein weiteres Modul mit unklarer Funktion befindet. Beide katalytischen Module gehören zur selben GH-Familie, GH43, darum stellte sich die Frage, ob beide dieselbe oder unterschiedliche Spaltungsspezifität besitzen. Um den Zusammenhang zwischen der Modulstruktur und den katalytischen Eigenschaften von *Ts_Axh43A* aufzuklären, sollten unterschiedliche Deletionsderivate des Enzyms heterolog produziert und anschließend deren Spezifitäten gegenüber verschiedenen Substraten analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Software und spezielle Gebrauchsmaterialien und Chemikalien

Die für die Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.1.1, die teils zugehörigen Software-Pakete und Versionen in Tabelle 2.1.2 gelistet.

Tabelle 2.1.1 Verwendete Geräte

Name	Hersteller
2117 Multiphor II Electrophoresis Unit	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise™	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
ÄKTA Pure 25 L1 protein purification system	GE Healthcare Life Sciences (Marlborough, USA)
Alphalmager MINI	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Anaerobierzelt Type A Anaerobic Chamber	Coy Laboratory Products (Grass Lake, MI, USA)
AS40 Automated Sampler	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CFX 96 Real-Time System; C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
ChromaJet DS 20	Desaga/Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
EPS 600 Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Fraktionskollektor F9-R	Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC (Marlborough, MA USA)
Fresco 21	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Großer Rotor (250 ml) für Sorvall Lynx Zentrifuge: F14-6x250LE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
ICS 3000 Dionex Chromatographiesystem	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kendro function line T20 heating oven	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kleiner Rotor (50 ml) für die große Zentrifuge: A27-8x50y	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
LKB Bromma Macrodrive 5 Constant Power Supply	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co (Wertheim, Deutschland)
Mikro 200R Kühlzentrifuge	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Mitsubishi P93D Drucker	mitsubishi electric europe B.V. (Ratingen, Deutschland)
Multitemp III	Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway Township, NJ, USA)
New Brunswick™ Innova® 42/42R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
PTC-100 Programmable Thermal Controller	Marshall Scientific (Hampton, USA)
Rotina 420 R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Sorvall Lynx 6000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Systec VX-150	Systec GmbH (Linden, Deutschland)
Tadvanced 96 SG PCR Cycler 40 °C Gradientenspanne	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
UP200S Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonics (Teltow, Deutschland)

Name	Hersteller
Wasser Reinigungsanlage PureLab flex	ELGA LabWater (High Wycombe, UK)
BioSpektrometer® fluorescence	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Lichtmikroskop: Axio Scope.A1	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Magnetrührer Stuart® US152	Cole-Parmer (Wertheim, Deutschland)
Jasco-J710 CD Spektrometer CDNN2.1	JASCO Deutschland GmbH (Pfungstadt, Deutschland)
Mikrowelle privileg 8018E	Bauknecht Hausgeräte (Stuttgart, Deutschland)
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
mikrobiologische Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl, Deutschland)
pH-Meter 902	BerryTec (Harthausen, Deutschland)
Vortex Genie 2™	Bender&Hobein (München, Deutschland)
Labor-Spülautomat G7783 Multitronic MieLabor	Miele & Cie. KG (Gütersloh, Deutschland)
Waage 1204 MP	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Feinwaage Precisa 125 A SCS	Precisa Gravimetrics (Dietikon, Schweiz)
Varioklav Dampftopf	H + P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim, Deutschland)
Eismaschine Ch-e-350p	Manitowoc Foodservice Intern. S.A.S. (Welbilt, Inc., New Port Richey, FL, USA)

HPAEC-PAD Chromatogramme wurden aus Chromeleon (Tabelle 2.1.2) als Textdatei exportiert und ab Zeile 43 in Graphpad Prism 7.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) importiert. Die Daten der Wasser-Läufe, sowie die der Enzym-Kontroll-Läufe wurden manuell in Excel von den jeweiligen Daten der Proben abgezogen und erneut in Graphpad zur Visualisierung der um die Kontrollen korrigierten Chromatogramme importiert.

Tabelle 2.1.2 Verwendete Software

Programm	Herausgeber	Anwendung
Graphpad 7.0.0	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)	Graphiken erstellen, Interpolation an Standardgeraden,
Chromeleon 7.2 SR3 (7553)	Thermo Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	HPAEC-PAD Benutzeroberfläche
Unicorn 6.3.2.89	General Electric (Boston, MA, USA)	FPLC Benutzeroberfläche
Clone Manager 9.03 Professional Edition	Sci Ed Software LLC (Westminster, CO, USA)	Simulation von Klonierung und Restriktionen
Mega-X 10.0.5	Kumar 2018	phylogenetische Bäume
Microsoft Office Professional Plus 2016	Microsoft (Redmond, WA, USA)	Tabellenkalkulation, Dokumentenerstellung, Bildbearbeitung

Spezielle Gebrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.1.4 zu finden.

Tabelle 2.1.3 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
CarboPac PA1 Säule (4 x 250 mm)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CarboPac PA1 Vorsäule (4 x 50 mm)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
µCuvette G1.0	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vivaspin 500 Konzentrationssäulen	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
15, 50 ml konische Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Spritzenfilter 0,2 µm 0,45 µm	Merck Millipore (Tullagreen, Irland)
Point of Use-Biofilter ELGA LC197	ELGA LabWater (High Wycombe, UK)
Butyl-Gummistopfen	Glasgerätebau Ochs (Bovenden, Deutschland)
Faltenfilter 597 ½ Whatman™	GE Healthcare Life Science, UK
Kieselgelplatten TLC Silica Gel 60	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
MODEL DIONEX pH - Ag/AgCl Reference Electrode	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Dionex Gold Disposable Electrode on PEN, with Gaskets	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Whatman Filterpapier No. 1, 46x57 cm, Ref: 03 010 040 001	Cytiva (Marlborough, MA, Vereinigte Staaten)
Microseal B Adhesive Sealer MSB-1001, Cat No: 1001 917	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Foil Heat Seal, 125 x 78 mm	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
PolyVials 0,5 ml Plain Caps P/N 079797	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
PolyVials 0,5 ml Vials P/N 038010	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

Chemikalien wurden von verschiedenen Herstellern bezogen. Es wird angenommen, dass der Einsatz von standardmäßig in mikrobiologischen oder chemischen Laboratorien eingesetzten Chemikalien verschiedener Hersteller und deren jeweilige Chargen oder Reinheit für diese Doktorarbeit keine erhebliche Auswirkung auf das Gelingen der Experimente hatte. Deshalb sind in der folgenden Tabelle 2.1.4 nur spezielle Chemikalien gelistet, bei denen anzunehmen ist, dass sie Einfluss auf Experimente, wie z.B. auf das Trennverhalten von Chromatographien gehabt haben könnten. Imidazol wurde in verschiedenen Reinheitsgraden von verschiedenen Herstellern verwendet. Um eine möglichst geringe Absorption bei 280 nm zu gewährleisten wurde 1 l einer 1 M Imidazol-Lösung mit zwei Esslöffeln Aktivkohle versetzt, für 1 h bei 20 °C gerührt und zwei Mal durch Faltenfilter abfiltriert.

Spezielle Kohlenhydrate und Substrate für Aktivitätstests sind unter 2.1.6 gelistet.

Tabelle 2.1.4 Spezielle Chemikalien mit potenzieller Auswirkung auf durchgeführte Experimente

Chemikalie	Vertreiber	Nummer
Acrylamid 4 K Solution (30 %) - Mix 37,5:1	AppliChem	A1672
Natriumacetat ≥ 99 %, p.a., ACS, wasserfrei	Carl Roth GmbH	6773.2
Sodium hydroxide solution carbonate - free	VWR-Chemicals	87938.290

2.1.2 Nährmedien, Zusätze, Enzyme, Puffer und Lösungen

Um Sterilität zu gewährleisten, wurden alle Medien (Tabelle 2.1.5) und die hitzestabilen Zusätze und Gebrauchsgegenstände (Tabelle 2.1.3), die bei der Kultivierung in Kontakt mit Mikroorganismen kamen, bei 121 °C und einem Druck von ca. 1,5–4 bar dampfsterilisiert, wobei die Sterilisationszeit 20 min betrug. Dabei wurde die Temperatur in einem Referenzgefäß überwacht. Dabei markierte das Erreichen der Temperatur im jeweiligen Referenzgefäß den Start der Sterilisationszeit. Antibiotika und andere hitzelabile Zusätze wurden, wenn nötig, erst nach Abkühlen auf unter 50 °C zugegeben. Die pH-Werte wurden jeweils vor dem Autoklavieren auf die in der Tabelle angegebenen Werte justiert.

Die Zusammensetzung von in dieser Arbeit verwendeten, selbst hergestellten Puffern und Lösungen ist in Tabelle 2.1.6 aufgeführt.

Die kommerziell erhältlichen Enzyme, die nicht selbst produzierten Enzyme, Enzym-Puffer, Längenstandards und verschiedenen verwendeten Kits sind in Tabelle 2.1.7 zu finden; die in dieser Arbeit produzierten Enzyme sind im Ergebnisteil in Tabelle 3.3.1 gelistet.

Tabelle 2.1.5 Medien und Medienzusätze

Name	Komponenten	
SOC	Hefeextrakt	5 g/l
	Pepton	20 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	MgSO ₄	4,8 g/l
	KCl	0,19 g/l
	H ₂ O	auf 900 ml
	autoklavieren	
LB (Agar)	Glukose (36 g/l sterilfiltriert)	3,6 g/l
	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
ZY (1 l)	Agar	15 g/l
	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	pH 7,0	
	H ₂ O	auf 905 ml
50x 5052	je 181 ml in 1 l Kolben mit oder ohne Schikanen autoklavieren	
	Glycerin	250 g/l
	Glukose	25 g/l
	Laktose	100 g/l

Material und Methoden

Name	Komponenten	
	autoklavieren	
20x NPS	(NH ₄) ₂ SO ₄	66 g/l
	KH ₂ PO ₄	136 g/l
	Na ₂ HPO ₄	142 g/l
	pH 6,75	
	autoklavieren	
Autoinduktionsmedium nach Studier 2005 ZY-5052 (200 ml)		
	ZY in 1 l Kolben	181 ml
	50x 5052	4 ml
	20x NPS	10 ml
	1 M MgSO ₄	0,2 ml
	50 mg/ml Kanamycin	0,2 ml
	Vorkultur	5 ml
GS2-Grundmedium (1 l)	KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
	K ₂ HPO ₄	2,9 g/l
	Harnstoff	2,1 g/l
	L-Cystein	1 g/l
	MOPS	10 g/l
	Hefeextrakt	6 g/l
	Natriumcitrat	2,9 g/l
	Resazurin	0,002 g/l
	pH 7,2	
	H ₂ O	auf 900 ml
	in geschlossenen Rollrandfläschchen autoklavieren	
100x GS2-Salzlösung	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 g/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,5 g/l
	FeSO ₄ (1,25 %; w/v)	1 ml
	sterilfiltrieren	
GS2-Medium	GS2-Grundmedium in Rollrandfläschchen	99 %
	100x GS2-Salzlösung	1 %
<i>B. vignae</i> -Basismedium nach Grönemeyer et al. (2016) für 1 l		
	HEPES	1,13 g/l
	MES	1,13 g/l
	Hefeextrakt	1,08 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,28 g/l
	Na ₂ SO ₄	0,25 g/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g/l
	NH ₄ Cl	0,32 g/l
	H ₂ O	auf 880 ml
	autoklavieren	
Salzlösungen und Zucker für <i>B. vignae</i> -Medium		
	40x FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,24 g/l
	40x CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,52 g/l
	40x NiSO ₄ x 6 H ₂ O	0,052 g/l
	40x Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,388 g/l
	100x Arabinose	100 g/l
	100x Na-Glukonat	100 g/l
	einzelns sterilfiltriert	
<i>B. vignae</i> -Medium 250 ml	Bradyr.-Basismedium	220 ml
	40x FeCl ₃ x 6 H ₂ O	6,25 ml

Material und Methoden

Name	Komponenten	
	40x CaCl ₂ x 2 H ₂ O	6,25 ml
	40x NiSO ₄ x 6 H ₂ O	6,25 ml
	40x Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	6,25 ml
	100x Arabinose	2,5 ml
	100x Na-Glukonat	2,5 ml
DSMZ Medium 1	Pepton	5 g/l
	Fleischextrakt	3 g/l
	pH 7	
	H ₂ O	auf 990 ml
	autoklavieren	
<i>M. extorquens</i> -Medium	DSMZ Medium 1	990 ml
	Methanol	10 ml
Antibiotika		
	Kanamycin (50 mg/ml)	50 µg/ml
	Gentamycin (20 mg/ml)	20 µg/ml
	Ampicillin (100 mg/ml)	100 µg/ml
Kohlenstoffquellen		
	Glukose	
	Cellobiose (100 g/l)	1 g/l

Tabelle 2.1.6 Zusammensetzung selbst hergestellter Puffer und Lösungen

Name	Komponente	
Agarosegele		
50x TAE	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA (pH 8,0)	0,05 M
His-Tag-Affinitätschromatographie		
<i>Stripping</i> -Puffer	MOPS	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	50 mM
	pH 7,3	
Wasch-Lyse-Puffer	MOPS	50 mM
	NaCl	0,3 M
	CaCl ₂	20 mM
	Imidazol	0-20 mM
	pH 7,3	
Elutionspuffer	MOPS	50 mM
	NaCl	0,1 M
	CaCl ₂	20 mM
	Imidazol	0,5 M
	pH 7,3	
Gelfiltrationspuffer	MOPS	50 mM
	NaCl	0,5 M
	CaCl ₂	10 mM
	pH 7,0	
Kristallisationspuffer	MOPS	20 mM
	NaCl	150 mM

Material und Methoden

Name	Komponente	
	(Glycerin)	5 %
	pH 7	
SDS-PAGE-Gele		
4x Auftragspuffer	Tris	0,25 M
	Glycerol	40 % w/v
	SDS	8,4 % w/v
	β-Mercaptoethanol	0,57 M
	Bromphenolblau	0,02 % w/v
	pH auf 6,8	
10x SDS PAGE Laufpuffer	SDS	10 g/l
	Tris	30,3 g/l
	Glycin	144,1 g/l
Trenngelpuffer	SDS	4 g/l
	Tris	182 g/l
	pH auf 8,8	
Sammelgelpuffer	SDS	4 g/l
	Tris	61 g/l
	pH auf 6,8	
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau	0,05 %
	Essigsäure	10 %
	Isopropanol	25 %
Entfärbelösung	Essigsäure	10 %
10x PBS	NaCl	80 g/l
	KCl	2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	26,8 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,4 g/l
	pH 7,4 mit HCl	
	H ₂ O	auf 1 l
	autoklavieren	
Westernblots		
WB-Transfer Puffer (1 l)	Glycin	2,9 g
	Tris	5,8 g
	SDS	0,37 g
	Methanol	200 ml
	H ₂ O	auf 1 l
	Lagern bei +2-8 °C	
1x TBS (1 l)	Tris	6,08 g
	NaCl	8,76 g
	H ₂ O	auf 800 ml
	pH auf 7,5 mit HCl (ca. 9,5 ml)	
	H ₂ O	auf 1 l
	Stabil bis zu 3 Monaten bei +2-8 °C	
1x TBST (WB-Washpuffer; 1 l)	Tween20	1 ml
	1x TBS	auf 1 l
	Stabil bis zu 3 Monaten bei +2-8 °C	
WB-Blockierungslösung (100 ml)	Milchpulver	2,5-5 g
	1x TBS	auf 100 ml

Material und Methoden

Name	Komponente	
WB-1:3000 Antikörperlösung (10 ml)	Anti-His-Antikörper	3,3 µl
	WB-Blockierungslösung mit 2,5 % Milchpulver	auf 10 ml
WB-1:1000 Antikörperlösung (10 ml)	Anti-His-Antikörper	10 µl
	WB-Blockierungslösung mit 5,0 % Milchpulver	auf 10 ml
10x Reaktionspuffer (10xRP)	MOPS	1 M
	NaCl	0,5 M
	CaCl ₂	0,1 M
	pH 6,5	
5x Puffer für Reaktionen mit unterschiedlichen pH-Werten (bei 20 °C eingestellte pH-Werte in Klammern), jeweils mit 0,25 M NaCl, 0,05 M CaCl ₂		
	Succinat (4; 4,6; 5,2; 5,8)	0,125 M
	Malat (4; 4,6; 5,2; 5,8)	0,25 M
	Citrat (4; 4,6; 5,2; 5,8)	0,5 M
	MES (5,8; 6,4)	0,25 M
	PIPES (6,4; 7,0)	0,125 M
	MOPS (7,0; 7,6)	0,5 M
	HEPES (7,0; 7,6; 8,2)	0,5 M
DNSA-Reagenz	3,5-Dinitrosalicylsäure	10 g/l
	NaOH	10 g/l
	Kalium-Natrium-Tartrat	200 g/l
	Phenol	2 g/l
	Natriumsulfat	0,5 g/l
	lösen, durch Faltenfilter filtrieren, bei 4 °C lagern	
DC-Laufmittel für gute Trennung von Monosacchariden		
	Acetonitril	80 % v/v
	H ₂ O	20 % v/v
DC-Laufmittel für bessere Trennung von Oligosacchariden (140 ml)		
	Butanol	50 ml
	Ethanol	50 ml
	H ₂ O	40 ml
DC-Färbelösung-Basis	Diphenylamin	1 g
	Anilin	1 ml
	Aceton	100 ml
DC-Färbelösung für eine DC-Platte	DC-Färbelösung-Basis	4 ml
	85 % H ₃ PO ₄	0,4 ml
HPAEC-PAD		
Laufmittel A	NaOH	0,1 M
Laufmittel C	NaOH	0,1 M
	Natriumacetat (Roth)	1 M

Material und Methoden

Tabelle 2.1.7 Verwendete gekaufte Enzyme, Lösungen, Inhibitoren, Längenstandards und Kits

Enzym, Lösung, Inhibitor, Längenstandard oder Kit	Hersteller	ID
Proteinase K	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)	A3830
RNAse A 1 mg/ml	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A 3832.0250
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	F530L
Hifi Gibson-Assembly MM	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	E2621S
Lysozym	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)	9001-63-2
Proteaseinhibitor-Tablette Complete ULTRA, Mini, EASYpack	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)	11 836 153 001
cComplete ULTRA Tablets, Mini, Roche	Merck (Darmstadt, Deutschland)	5892970001
Mango MM	Meridian Bioscience (Cincinnati, OH, USA)	BIO-25033
Xyn11A, <i>Thermoclostridium stercorarium</i>	Bröker 2019	
CglT, <i>Thermoanaerobacter brockii</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Waldemar Hauf, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM	
Restriktionsenzyme		
FastDigest NdeI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	FD0585
FastDigest XhoI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	FD0694
FastDigest PvuII	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	FD0634
DpnI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	ER1701
Längenstandards		
Längenstandard DNA GeneRuler 1kb	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	SM0311
Längenstandard DNA GeneRuler 1kb plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	SM1333
Längenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	26616
Längenstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	26619
Puffer		
5x HF Phusion Puffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	F518L
5x GC Phusion Puffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	F519L
CutSmart	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	B7204S
6x Gel Loading Dye Purple	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	B7024S
SYPRO™ Orange Protein Gel Stain (5,000X Concentrate in DMSO)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	S5692-50 μl
10X FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	B72
10x Tango Puffer (Puffer Y, gelb)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	BY5
Kits		
DNA Soil	Roboklon (Berlin, Deutschland)	E3570-01
Monarch® Genomic DNA Purification	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	T3010S

Enzym, Lösung, Inhibitor, Längenstandard oder Kit	Hersteller	ID
NucleoSpin™ Gel and PCR Cleanup Kit	Macherey Nagel (Düren, Deutschland)	REF 740609.50
NucleoSpin™ Plasmid EasyPure	Macherey Nagel (Düren, Deutschland)	REF 740727.50
Cytiva PD-10 Entsalzungssäulen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	11768488
Antikörper und Substrat für Westernblot		
Novex Anti-His (C-term)/AP Ab	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	46-0284
Novex AP Chromogenic Substrat (BCIP/NBT)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	WP20001

2.1.3 Bakterienstämme

Verwendete Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1.8 aufgeführt. Bei der Kultivierung der Arctic Express Zellen wurde allen Medien Gentamycin zugesetzt, um Zellen zu selektieren, die die in diesem *E. coli* Stamm plasmidcodierten, psychrophilen Chaperone exprimieren.

Tabelle 2.1.8 verwendete Bakterienstämme

Organismus	Stamm	Merkmale/ Anmerkung	Vertreiber/ Referenz
<i>Escherichia coli</i>	DH10β	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> λ-	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>Escherichia coli</i>	BL21 Star™	<i>fhuA2</i> [lon] <i>ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ sBamHI Δ <i>EcoRIB</i> int::(<i>lacI</i> ::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ <i>nin5</i>	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>Escherichia coli</i>	Arctic Express (DE3)	<i>E. coli</i> B F' <i>ompT hsdS</i> (rB' mB') <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r]	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
<i>Thermotoga maritima</i>	MSB8	DNA wurde von Dr. Vladimir Zverlov (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM) zur Verfügung gestellt	Liebl et al. (1997)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Z2706-MC24	DNA wurde von Dr. Vladimir Zverlov (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM) zur Verfügung gestellt	Dakhova et al. (1993)
<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	DSM 6725	früher <i>Anaerocellum thermophilum</i> ; DNA wurde von Dr. Vladimir Zverlov (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM) zur Verfügung gestellt	DSMZ/ Zverlov et al. (1998)

Material und Methoden

Organismus	Stamm	Merkmale/ Anmerkung	Vertreiber/ Referenz
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	DSM 8903	GS2-Medium, DNA im Rahmen der Master Thesis von Tarik Fida isoliert	DSMZ/ Rainey et al. (1994)
<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i>	108 / DSM 18901	GS2-Medium, DNA im Rahmen der Master Thesis von Tarik Fida isoliert	DSMZ/ Miroshnichenko et al. (2008)
<i>Caldicellulosiruptor kronoskyensis</i>	2002 / DSM 18902	GS2-Medium, DNA im Rahmen der Master Thesis von Tarik Fida isoliert	DSMZ/Miroshnichenko et al. (2008)
<i>Thermoclostridium stercorarium</i> subsp. <i>stercorarium</i>	DSM 8532	Plasmide mit codierenden Sequenzen aus <i>T. stercorarium</i> wurden von Jannis Bröker (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM) zur Verfügung gestellt	DSMZ/ Madden (1983), Zhang et al. (2018)
<i>Bradyrhizobium vignae</i>	LMG 28791, DSM 100297	<i>B. vignae</i> -Medium abgeleitet aus Grönemeyer et al. (2016)	DSMZ
<i>Methylobacterium extorquens</i>	DSM 1337	Aerob bei 30 °C in DSMZ-Medium 1 + Methanol kultiviert	Stammsammlung Lehrstuhl Mikrobiologie (#301)
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	CFN42		Stammsammlung Lehrstuhl Mikrobiologie (#119; gDNA #138)
<i>Thermus thermophilus</i>	HB27	TB-Medium, aerob, 70°C	Stammsammlung Lehrstuhl Mikrobiologie [#977, gDNA präpariert durch Mörch (2019)]
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	DSM 31031		Stammsammlung Lehrstuhl Mikrobiologie (#278)

Genomische DNA von *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* und *Caldicellulosiruptor bescii* (früher *Anaerocellum thermophilum*) wurden von Dr. Vladimir Zverlov (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) zur Verfügung gestellt, die von *Rhizobium etli* befindet sich unter der Nummer #138 in der DNA-Sammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie und die von *Thermus thermophilus* wurde von Mörch (2019) isoliert und zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Oligonukleotide

Verschiedene Oligonukleotide wurden als Primer sowohl für die Sequenzierung als auch für die Amplifikation mittels PCR eingesetzt. Für die Abschätzung der Anlagerungstemperatur wurden 2 °C für jedes bindende Adenin (A), oder Thymin (T) und 4 °C für jedes Guanin (G), oder Cytosin (C) gerechnet. Für das Gibson-Assembly (Kapitel 2.3.6) wurden spezielle Primer-Paare, bei denen *forward* und *reverse* Primer jeweils einen 5'-Überhang von ca. 15–20 bp zum jeweiligen 3'-Ende des geschnittenen Vektors aufweisen. Sollte Oligonukleotid-vermittelt eine andere Base in ein Gen aus einem Vektor eingebaut werden (ortsgerichtete Mutagenese) wurden Primer verwendet, die sich an der gewünschten Position von der ursprünglichen Sequenz unterscheiden. Außerdem wurde zur Ermittlung der Anlagerungstemperatur der Temperatureffekt der zwei Basen neben der Mutation nicht mit einbezogen. Außerdem fungierten diese Primer auch als „Gibson-Primer“, da *forward* und *reverse* jeweils das *reverse complement* des anderen darstellten, sodass die ganze Sequenz des Vektors als lineares Fragment, mit der Mutation in der Überlappung an den Enden, amplifiziert wurden. Diese zunächst lineare DNA wurde dann nach Einbringung in *E. coli* als geschlossenen Plasmid repliziert. Alle Primer (Tabelle 2.1.9) wurden als *Custom DNA* Oligonukleotide salzfrei von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) im Auftrag synthetisiert. Zunächst wurde das Lyophilisat kurz zentrifugiert bevor das Volumen für 100 pmol/μl zugegeben wurde. Zum Lösen wurden die Röhrchen 10 min bei 60 °C inkubiert und für 15 sec mit einem Vortexmischer geschüttelt. Die Primer-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.1.9 verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	Alias
1	rv_pET	TCAAGACCCGTTTAGAGGCC	139
2	fw_pET	ACGACTCACTATAGGGGAAT	140
3	rv_pET_4905	ATATAGGCGCCAGCAACCG	M78
4	fw_pET_19	GCTTAATGCGCCGCTACAG	M79
5	fw_16S	AGAGTTTGATYMTGGCTC	616
6	rv_16S	CAKAAAGGAGGTGATCC	630
7	fw_Cb_ram106B	pET3'lang-ATGCTTGATTTAGAAAACTC	M4
8	rv_Cb_ram106B	pET5'-CATTGGATGTTAATATACTATAAG	M5
9	fw_Cb_x1_106	pET3'lang-ATGAATGAGAGTATAAAATTGAATT	M6
10	rv_Cb_x1_106	pET5'-TCTAAAGAAACAATAGCAACTG	M7
11	fw_Cb_x2_106	pET3'lang-ATGAACATCAACTTTAAAATAAAA	M8
12	rv_Cb_x2_106	pET5'-TATTGTCTTAATTTTATGTGTTATTG	M9
13	fw_Ch_Ck_gaf159A	pET3'lang-GTGCCAAGACCACCA	M28
14	rv_Ch_Ck_gaf159A	C-pET5'-GCAAATAAATCCGGAAGATAAA	M32
15	fw_ChAbf_D19A	CGGCAGCCCCACCATCA	M82
16	rv_ChAbf_D19A	TGATGGTGGGGGCTGCCG	M83
17	fw_ChAbf_D142A	GTTATCGCTGCATGCGTTTTTC	M84
18	rv_ChAbf_D142A	GAAAACGCATGCA GCGATAAC	M85
19	fw_ChAbf_E190A	TCAAGCGGGGCCAAACGTC	M86
20	rv_ChAbf_E190A	GACGTTTGGCCCCGCTTGA	M87

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	Alias
21	fw_ChAbf_E190Q	ACAGACCTCAACAGGGGCCAAACGTC	M97
22	rv_ChAbf_E190Q	GTTTGGCCCCTGTTGAGGTCTGTCAG	M98
23	fw_ChGaf_H244N	GGACATAATGCTGATGTTCTTG	M95
24	rv_ChGaf_H244N	CAAGAACATCAGCATTTATGTCC	M96
25	fw_Cs_gaf159A	pET3'lang-GTGCCAAAGCCACCA	M29
26	rv_Cs_gaf159A	C-pET5'-GCAAACAAATTAGGAAGAC	M33
27	rv_Ck_gaf159A	C-pET5'-GCAAATAGATCCGGAAGATA	M34
28	fw_Tm_ram106B	pET3'lang-GTGAACCTGAAGGATCTGGAAAA	M30
29	rv_Tm_ram106B	CTC-pET5'-CGTGAAGAAGAGCTGAGAAC	M31
30	fw_Tn_ram106B	pET3'lang-GTGAACCTGAAGGATCTGGAAAA	M35
31	rv_Tn_ram106B	CTC-pET5'-GGTGA AAAAGAACTGAGCACAG	M36
32	fw_SeqTn_ram5755-5775	GAAGAGCTATTTTTCAACACG	M64
33	fw_SeqTn_ram6294-6312	GATGACACAGGGAAAGAGA	M65
34	fw_SeqTn_ram6838-6856	GCGAACACGGACATCAACC	M67
35	rev_SeqTn_ram7635-7617	ACTCCGTGTGATATCCTTG	M68
36	fw_Tmgly_Tmari0783	pET3'lang-ATGGTGGAGAGCTCCTC	M42
37	fw_Tngly_CTN1797	pET3'lang-GTGAAGGGGCGAGATGC	M43
38	rv_TmGly+TnGly	C-pET5'-GTTGCTTCTTTTCAAATTCA	M44
39	fw_Ttgly_TTRS00700	pET3'lang-ATGACCATCTCCGAGCTG	M45
40	rv_Ttgly_TTRS00700	C-pET5'-AGGGGCACCAACCCGCT	M46
41	fw_MeXyl_SOR26692	pET3'lang-ATGATCGAAGCGGTCATGC	M47
42	rv_MeXyl_SOR26692	C-pET5'-AGAAACGGCATCTCCGGT	M48
43	fw_ReXyl_ABC91511	pET3'lang-ATGATCGAAGCTACGATGAT	M49
44	rv_ReXyl_ABC91511	C-pET5'-CCGTTCCGAGGGACG	M50
45	fw_BvXyl_RXH01209	pET3'lang-ATGATCGAGGCCGCAAG	M51
46	rv_BvXyl_RXH01209	C-pET5'-GGCACGCATGTCCGCTC	M52
47	fw_BjXyl_OSJ33904	pET3'-ATGATCGAAGCTGCCAAGAT	M57
48	rev_BjXyl_OSJ33904	TC-pET5'-GGCGGCATACTGGCC	M58
49	BjXyl_rv_777-794	TGTTCCGGCGTGAAGCAG	M59
50	fw_TsAxh_ohneSP	pET3'- ATG AATAAATACCGGGAAACATCC	M69
51	rv_TsAxh	TC-pET5'-TCGCTGAAATACCAAGTAATC	M70
52	fw_TsAxh_c1_abAS25	pET3'- ATG GCGAAAAACCCATAAT	M71
53	rv_TsAxh_c1	TC-pET5'-GC ATCGCCATAAACAGGCCAG	M72
54	fw_TsAxh_c2	pET3'- ATG GGGAACCCTCTGATTTCTC	M73
55	rv_TsAxh_c2	TC-pET5'-ACCTCCTGAATGGTTCCG	M74
56	fw_TsAxh_link	pET3'- ATG CCCTATACCAGAGTTGAGG	M75
57	rv_TsAxh_link_cbmÜH	AACTCTGGTATAGGG ATTCGGCGGGACTTCCCTA	M76
58	fw_TsAxh_cbm	CCCTATACCAGAGTTGAGG	M77
59	TsAxh_c1c2-6007	CGTGAATACGGGTTCTTTGG	M80
60	TsAxh_c1c2_6598	GGCGATGCGTTATACCATTC	M81
61	fw_TsAxh_c1,c2-link	GAAAGTCCC GCCGAAT CACCACCACCACCACCTG	M88
62	rv_TsAxh_link-HisÜH	C-pET5'-ATTCGGCGGGACTTCCCTAC	M89
63	fw_TsAxh_link-c2ÜH	GACGGAACCATT CAGGAGTT GAAGAAGGAAAAGTCCCCATC	M90
64	rv_TsAxh_c2-link	GATGGGGACTTTTCTTCTTC AACCTCCTGAATGGTTCCGTC	M91
65	rv_TsAxh_seq_link	CGGATACGTCATCGACATTC	M92

Sequenzen komplementär zum Vektorbackbone sind wie folgt abgekürzt: pET3'lang (CTTTAAGAAGGAGATATACA), pET3' (AGAAGGAGATATACA), pET5' (AGTGGTGGTGGTGGTGGTGC); rot markierte einzelne Basen stellen Punktmutationen im Vergleich zum DNA-Template dar; manuell zugefügte Startcodons sind fett markiert.

2.1.5 Plasmide

Die Vektoren, mit denen die Produktionsstämme zur Expression der enthaltenen Gensequenzen transformiert wurden, sind in Tabelle 2.1.10 gelistet.

Tabelle 2.1.10 verwendete und erstellte Plasmide

Plasmid	Größe (bp)	Beschreibung (codiert für...) ^{a)}	Vertreiber/Referenz
pET24c (+)	5308	KanR, C-terminal His ₆ -Tag [®]	Merck, Darmstadt, Germany
pET24c-Tst_ramB	8348	<i>Ts_Ram106B</i> (AGC67072.1) aus <i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM8532	Broeker et al. 2018
pET24c-Tma_ramB	8185	<i>Tm_Ram106B</i> (AGL50002.1) aus <i>Thermotoga maritima</i> MSB8	Baudrexel et al. 2019
pET24c-Tne_ramB	8179	Accession Plasmid: MT031856; codiert für <i>Tn_Ram106B</i> aus <i>Thermotoga neapolitana</i> Z2706-MC24 und ist homolog zu ACM23671.1 aus Stamm <i>T. neapolitana</i> DSM 4359	Baudrexel et al. 2019
pET24c-Cbe_ramB	8215	<i>Cb_Ram106B</i> (ACM61646.1) aus <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	Baudrexel et al. 2019
pET24c-Csa_gafA	6163	<i>Cs_Gaf159A</i> (ABP66075.1) aus <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	Fida 2018
pET24c-Chy_gafA	6163	<i>Ch_Gaf159A</i> (ADQ06027.1) aus <i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> 108	Fida 2018
pET24c-Chy_gafA_M1	6163	<i>Ch_Gaf159A</i> mit Mutation D19A	Baudrexel et al. 2022
pET24c-Chy_gafA_M2	6163	<i>Ch_Gaf159A</i> mit Mutation D142A	Baudrexel et al. 2022
pET24c-Chy_gafA_M3	6163	<i>Ch_Gaf159A</i> mit Mutation E190A	Baudrexel et al. 2022
pET24c-Chy_gafA_M4	6163	<i>Ch_Gaf159A</i> mit Mutation E190Q	diese Arbeit
pET24c-Chy_gafA_M5	6163	<i>Ch_Gaf159A</i> mit Mutation H244N	diese Arbeit
pET24c-Ckr_gafA	6163	<i>Ck_Gaf159A</i> (ADQ45201.1) aus <i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> 2002	Fida 2018
pET24c-Tst_axhA	8819	<i>Ts_Axh43A</i> (AGC67716.1) aus <i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM8532	Broeker et al. 2018
pET24c-Tst_axhA_c1	6046	GH43_10 Domäne in <i>Ts_Axh43A</i>	Seidler 2020
pET24c-Tst_axhA_c1link	7348	GH43_10+GH43_C2 Domänen in <i>Ts_Axh43A</i>	diese Arbeit
pET24c-Tst_axhA_c1linkcbm	7744	GH43_10+GH43_C2+CBM6 Domänen in <i>Ts_Axh43A</i>	Seidler 2020
pET24c-Tst_axhA_c2	6178	GH43_16 Domäne in <i>Ts_Axh43A</i>	Seidler 2020
pET24c-Tst_axhA_c2link	7483	GH43_16+GH43_C2 Domänen in <i>Ts_Axh43A</i>	diese Arbeit
pET24c-Tst_axhA_c2cbm	6616	GH43_16+CBM6 Domänen in <i>Ts_Axh43A</i>	Seidler 2020
pET24c-Tst_axhA_c1linkc2	8296	GH43_10+GH43_C2+GH43_16 Domänen in <i>Ts_Axh43A</i>	Seidler 2020

Plasmid	Größe (bp)	Beschreibung (codiert für...) ^{a)}	Vertreiber/Referenz
pET24c-Tma_gly	6229	"Glycosidase, PH1107-related protein"; putative Glykosidase mit DUF377 (AGL49708.1) aus <i>Thermotoga maritima</i> MSB8	diese Arbeit
pET24c-Tne_gly	6271	putative "Glycosidase" mit DUF377 (Homolog zu ACM23973.1 aus DSM 4359) aus <i>T. neapolitana</i> Z2706-MC24	diese Arbeit
pET24c-Tth_gly	9280	"hypothetical cytosolic protein"; (AAS80484.1) aus <i>Thermus thermophilus</i> HB27; Homolog zu putativen Glykosidasen mit DUF377	diese Arbeit
pET24c-Ret_xyl	6199	"hypothetical conserved protein"; Notiz in NCBI: "Glycosyl hydrolase family 1; cl23725" (ABC91511.1) aus <i>Rhizobium etli</i> CFN42	diese Arbeit
pET24c-Mex_xyl	6163	"conserved protein of unknown function"; Notiz in NCBI: "Glycosyl hydrolases; cl23725" aus <i>Methylobacterium extorquens</i> DSM 1337 T (Homolog zu WP_056500757.1 in Stamm TK 0001)	diese Arbeit
pET24c-Bvi_xyl	6172	"beta-xylosidase" Notiz in NCBI: "Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology." (RXH01209.1) von <i>Bradyrhizobium vignae</i> LMG 28791; SPP96295.1 von <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3257 ist in CAZy als GHnc	diese Arbeit
pET24c-Cbe_Athe2094_8445	7759	GH106-Enzym (ACM61171.1) aus <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	diese Arbeit
pET24c-Cbe_Athe2076_8430	8347	GH106-Enzym (ACM61153.1) aus <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	diese Arbeit
pET24c-Cst_c20590		GH106-Enzym (AGC69032.1) aus <i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM8532	Bröker 2019
pET24c-Ts_arfD		GH106-Enzym (AGC69275.1) aus <i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM8532	Bröker 2019

a) " " = Bezeichnung auf der NCBI Protein Webseite (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>)

2.1.6 Substrate für Aktivitätstests

Tabelle 2.1.11 zeigt die für Aktivitätstests verwendeten Substrate. Polysaccharide wurden, wenn nicht anders angegeben, 1 %ig (w/v) in Wasser gelöst, für die mikrobielle Stabilität mit 0,02 % NaN₃ versetzt und bei 4 °C gelagert. Die *para*-Nitrophenyl-Substrate wurden als Pulver, sowie gelöst in DMF (0,1 M), bei -20 °C gelagert. Von den Oligosacchariden, wie Arabinooligosaccharide (AOS), Arabinoxylanoliosaccharide (AXOS), Xyloglukanoligosaccharide (XGOS) und Xylooligosaccharide (XOS), wurden sowohl die Pulver als auch die Lösungen in Wasser (0,1 % w/v) bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.1.11 Substrate für Aktivitätstests

Substrat	Vertreiber
4-O-Methyl-D-Glukurono-D-xylan	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Apfelpektin	Golden Peanut (Garstedt, Deutschland)
Arabinan (Zuckerrübe)	Megazyme
Arabinogalaktan (Lärche)	Megazyme
Arabinose	Carl Roth GmbH
Arabinoxylan (Weizen, mittlere Viskosität)	Megazyme
Arabinoxylan RS (Weizen)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
AXOS-Substrat: : A2XX	Megazyme
AXOS-Substrat: A3X	Megazyme
AXOS-Substrat: XA3XX	Megazyme
Curdlan	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Galaktan (Kartoffel)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Galaktan (Lupine)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Galaktomannan (Guatbohne, mittlere Viskosität)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Glukomannan (Konjakwurzel, hohe Viskosität)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Gummi Arabicum (Akazie)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Gummi-Arabicum	Sigma-Aldrich
Inulin	Sigma-Aldrich
Inulin (Dahlienknolle)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Laminarin	Alfa Aesar (Kandel, Deutschland)
Lichenin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Mannan	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Mannan (Steinnuss)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Naringin no.: XN167836	Carbosynth (Berkshire, England)
Pachyman	Megazyme (Wicklow, Ireland)
pektisches Galaktan (Kartoffel)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
pektisches Galaktan (Lupine)	Megazyme (Wicklow, Ireland)
pNP- α -D-Galaktopyranosid	Sigma-Aldrich
pNP- α -D-Glukopyranosid	Megazyme (Wicklow, Ireland)
pNP- α -D-Mannosid	Megazyme (Wicklow, Ireland)
pNP- α -D-Xylosid	Carbosynth (Berkshire, England)
pNP- α -Glukuronsäure	TCI Deutschland GmbH
pNP- α -L-Arabinofuranosid	Megazyme
pNP- α -L-Fucopyranosid	Sigma-Aldrich
pNP- α -L-Rhamnopyranosid	Sigma-Aldrich
pNP- β -D-Galaktosid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
pNP- β -D-Glukopyranosid	Sigma-Aldrich
pNP- β -D-Mannopyranosid	Sigma-Aldrich
pNP- β -D-N-Acetylglukosamin	Megazyme (Wicklow, Ireland)
pNP- β -D-Xylopyranosid	Sigma-Aldrich

Substrat	Vertreiber
pNP-β-L-Fucopyranosid	Sigma-Aldrich
pNP-β-D-Xylobiosid	Megazyme
Polygalakturonsäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Prunin no.: FN65941	Carbosynth (Berkshire, England)
Pullulan	ICN Biomedicals (Cleveland, USA)
Rhamnogalakturonan	Megazyme (Wicklow, Ireland)
Sinistrin	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Stroh WS19-51	Bereitgestellt von Patricia Krähe (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM)
Xylan (Birke)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Xylan (Birke)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Xylan (Haferspelzen)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Xylan Pure oat-spelt	Serva Feinbiochemica GmbH & Co (Heidelberg, Deutschland)
β-Glukan (Gerste, mittlere Viskosität)	Megazyme (Wicklow, Ireland)

2.2 Bioinformatische Methoden und Web-Tools

Zur Identifizierung von möglichen Proteinkandidaten wurde die CAZy-Datenbank (www.cazy.org) manuell durchsucht (Drula et al. 2022). Homologien konnten mittels *Basic Local Alignment Search Tool* für Proteine (BLASTp¹) von NCBI unter Verwendung der Voreinstellungen ermittelt werden. Der Domänenaufbau eines Enzyms war entweder aus den Ergebnissen der BLASTp Suche ersichtlich, oder konnten direkt über *Conserved Domains*² abgerufen werden. Durch BLASTp und anschließendem Abgleich der *Genbank Accession* Nummern von *Identical Proteins* auf der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Web-Seite³ konnten die jeweiligen Proteine in anderen Organismen, bzw. den jeweiligen erwünschten Stämmen identifiziert werden. Hier konnten auch die FASTA Dateien aller Gene und zugehörigen Proteine geladen werden. Zum Downloaden aller FASTA Dateien ausgehend von einer Liste mit *Genbank* Nummern wurde *Batch Entrez*⁴ verwendet.

¹ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, zuletzt aufgerufen am 11.05.23

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, zuletzt aufgerufen am 11.05.23

³ www.ncbi.nlm.nih.gov, zuletzt aufgerufen am 11.05.23

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez>, zuletzt aufgerufen am 11.05.23

2.2.1 Phylogenetische Analyse von Proteinen

Um anhand von verschiedenen Sequenzen einen phylogenetischen Baum zu erstellen, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die Clustering basierte *Neighbor Joining* Methode wurde wie schon beschrieben durchgeführt (Baudrexel et al. 2019). Für Proteine weiter entfernter Spezies ist ein *Maximum-Likelihood*-Ansatz, der auf expliziten Evolutionsmodellen beruht, geeigneter (Kapli et al. 2020). Für die Analyse des multiplen Sequenzalignments und für die Wahl und Ausführung der passendsten Methode wurde mit dem alignierten FASTA-Datei der IQ-TREE *web server*⁵ (Trifinopoulos et al. 2016) verwendet. Der automatisch generierte IQ-Tree wurde im Newick-Format abgespeichert und in MEGA X (Kumar et al. 2018) importiert und visualisiert. Der resultierende Baum stellt eine Hypothese über die Entwicklungswege dar, die zu der bestehenden Vielfalt geführt haben. (Wang und Weber 2021)

2.2.2 Identifizierung möglicher katalytischer Aminosäuren durch strukturelles Alignment

Die Webseite MPI Bioinformatics Toolkit⁶ bietet eine Vielzahl an bioinformatischen Analysemethoden, darunter HHPred (Söding 2005; Steinegger et al. 2019; Gabler et al. 2020). Diese Methode basiert auf dem Vergleich von *Hidden Markov Models* (HMM) und kann damit konservierte Aminosäuren und Sekundärstrukturen besser alignieren als beispielsweise BLASTp. Als Ergebnis werden eine Liste mit Strukturhomologen, deren Strukturdaten jeweils in der PDB-Datenbank zu finden sind, und das jeweilige strukturelle Alignment ausgegeben. Sind die Positionen der katalytischen Aminosäuren im identifizierten Homolog bekannt, lässt sich so mittels diesen Alignments auf die möglicherweise katalytischen Aminosäuren der Suchsequenz schließen.

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Isolation und Reinigung von DNA

Die gDNA aus *Caldicellulosiruptor* Kulturen, die 5 Tage bei 65 °C in 10 ml (beimpft mit 100 µl der in 500 µl rehydrierten Zellen der DSMZ), oder in 50 ml GS2 (beimpft mit 250 µl) GS2 gewachsen waren, wurde mit dem Genra Puregene Kit (Quiagen) nach dem Hersteller-Protokoll isoliert. Dafür wurden 5 ml der Kultur pelletiert (1 min, 13.000 rpm) und in 300 µl der *cell suspension solution* resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 µl Lytic aK (730 U/ml) und mehrfachen Invertieren wurde die Suspension 30 min bei 37 °C inkubiert. Bevor die Zellen in 300 µl Zellysepuffer aufgenommen werden konnten und für 5 min bei 80 °C inkubiert wurden, wurde nochmals zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm) und der Überstand verworfen. Das auf ca. 20 °C abgekühlte Lysat wurde mit 1,5 µl RNase A (1 mg/ml) versetzt, 25x invertiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem die *protein precipitation solution* zugegeben

⁵ <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>, zuletzt aufgerufen am 11.05.23

⁶ <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/>, zuletzt aufgerufen am 11.05.23

und stark gemischt war, wurde die geklärte (3 min, 13.000 rpm) DNA-enhaltende Lösung zu 300 µl Isopropanol gegeben und das Gefäß 50 x invertiert. Nach erneutem Zentrifugieren (1 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand komplett entfernt und das fast durchsichtige Pellet zwei Mal mit Ethanol gewaschen. Nachdem das Ethanol durch Trocknen bei 65 °C komplett entfernt wurde, wurden 100 µl DNA Hydration Solution zugegeben und das Reaktionsgefäß zum Lösen der DNA für 1 h bei 65 °C inkubiert. Die gelöste DNA wurde direkt weiterverwendet, oder bei -20 °C gelagert.

Die **gDNA-Extraktion** wurde für *Methylobacterium extorquens*, *Bradyrhizobium japonicum* und *Bradyrhizobium vignae* mittels *Monarch Genomic DNA Purification Kit* durchgeführt. Dazu mussten die Zellen zunächst, wie im Folgenden beschrieben, jeweils geerntet und anschließend in 1x PBS Puffer resuspendiert werden. *M. extorquens* Zellen aus einer 30 ml Kultur wurden nach zwei Tagen bei 30 °C pelletiert (15 min, 4.000 rpm, 4 °C) und direkt mit 100 µl 1x PBS versetzt. Auch wurden pelletierte Zellen (1 min, 6.000 rpm) aus 1 ml einer gewachsenen (30 °C, 2 Tage in 5 ml) *B. vignae*-Kultur direkt in 100 µl PBS Puffer resuspendiert. *B. japonicum* hingegen wurde für 6 Tage bei 30 °C kultiviert, bevor die Zellen aus 30 ml bei 4.800 rpm für 15 min bei 4 °C pelletiert und in 500 µl des Überstandes resuspendiert wurden. Nach Überführen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde das Pellet nach Zentrifugation (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde es in 200 µl 1x PBS Puffer (pH 7,4) suspendiert. Davon wurden 100 µl für die folgenden Schritte verwendet. Unter Berücksichtigung der Herstellervorschläge des Kits wurde der Zellaufschluss und die anschließende DNA Isolation über die enthaltenen Reinigungssäulchen wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde je 1 µl Lysozym (100 mg/ml) zugegeben und für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert; anschließend wurden 1 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 3 µl RNase A (1 mg/ml) dazu pipettiert; nach dem Mischen wurden 100 µl *Cell Lysis Buffer* zugegeben und unter Schütteln 5 min bei 56 °C inkubiert; nach Zugabe von 400 µl *Binding Buffer* wurde 5–6 s pulsierend mit einem Vortexmischer geschüttelt; das Lysat wurde in die Säulchen transferiert und die Säulchen nach Zentrifugation (3 min, 6.000 rpm) zwei Mal mit 500 µl *Washing Buffer* gespült; die DNA wurde anschließend eluiert, indem 100 µl 60 °C warmes H₂O zugegeben wurde und nach 1 min (RT) für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde.

Plasmidisolation aus *E. coli* ÜN Kulturen erfolgte nach Herstellerangaben und unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid Kits (Macherey Nagel) wobei mit 2x 20 µl Reinstwasser anstatt Elutionspuffer eluiert wurde.

Die Reinigung der durch PCR amplifizierten Fragmente und von Fragmenten, die aus einem Agarosegel geschnitten wurden, erfolgte mittels NucleoSpin® PCR and Gel Clean-up Kit (Macherey Nagel) und nach Angaben des Herstellerprotokolls. So konnte die Ziel-DNA z.B. durch Verdünnen des NTI Puffers (meist

1:6) von kleineren Fragmenten, wie Primer, oder ausgeschnittene DNA, befreit werden. Die DNA wurde je nach erwarteter Menge in 2x 10 µl, oder einmal 15 µl Reinstwasser eluiert.

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung von DNA zur Kontrolle von DNA-Isolationen, PCR und Plasmid-Restriktionen wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst mit DNA-Auftragspuffer versetzt und gleichzeitig mit 3 µl eines DNA-Längenstandards auf ein mit 1xTAE überschichteten 1 % Agarosegel aufgetragen. Nachdem die DNA nach 40 min bei 100 V elektrophoretisch getrennt war, wurde das Gel für ca. 15 min in eine 1 mg/l Ethidiumbromid-Lösung (50 µl 1 % EtBr-Lösung von BioChemica, oder Roth in 500 ml H₂O) und anschließend kurz in Wasser gelegt und dann unter UV-Licht im Alphamager MINI dokumentiert. Durch Bandenvergleich mit dem Längenstandard konnte auf die in der Probe vorhandenen DNA-Fragmentlängen zurückgeschlossen werden. Sollten Banden nach der Gelelektrophorese ausgeschnitten werden, wurden teils dickere Gele mit größeren Taschen gegossen und dementsprechend mehr Probe und Längenstandard aufgetragen und die Zeit erhöht, bis die farbige Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

2.3.3 Spezifische Spaltung von DNA - Restriktionsverdau

Um DNA an spezifischen Stellen zu schneiden wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen mit unterschiedlichen Schnittstellen verwendet. Das Volumen der Reaktion, der geeignete Puffer für das jeweilige Enzym, oder die jeweilige Enzymkombination, die von der DNA-Menge abhängige Dauer der Reaktion und Inkubationstemperatur, sowie die Inaktivierungs-Temperatur und -Zeit wurden nach den Empfehlungen der Hersteller gewählt.

Für die Klonierung Mittels Gibson sollte der Vektor **pET24c mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI verdaut werden, um ihn für die Assemblierung mit dem gewünschten Gen vorzubereiten**. Dazu wurde die Reaktion (Beispiel in Tabelle 2.3.1) zunächst ohne XhoI pipettiert, für 1 h bei 37 °C inkubiert, NdeI anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Ob alle Plasmide verdaut wurden, wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Der verwendete FastDigest Green Buffer fungierte direkt als Probenauftragspuffer. Dann wurde XhoI zugegeben und erneut bei 37 °C verdaut und bei 65 °C inaktiviert. Der doppelt geschnittene Vektor wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel gereinigt.

Tabelle 2.3.1 Ansatz für präparativen Restriktionsverdau von pET24c mit NdeI und XhoI

Komponente	Volumen
pET24c (50 ng/µl)	20–50 µl
FastDigest NdeI (Thermo Fisher Scientific)	1,5 µl
FastDigest XhoI (Thermo Fisher Scientific)	1,5 µl
10x Fast Digest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific)	10 µl
ddH ₂ O	auf 100 µl

Um die **erfolgreiche Insertion des GOI in den pET24c Vektor zu überprüfen**, wurden isolierte Plasmide einem **analytischen Restriktionsverdau mit PvuII** unterzogen. Nach dem Verdau konnte mittels Agarosegel die Höhe der Bande für das größte Fragment mit der des Leervektors (4219 bp) verglichen werden. Lag sie höher, hat eine Integration vermutlich stattgefunden und das Plasmid konnte mittels Sequenzierung final verifiziert werden. Die Reaktionen aus Tabelle 2.3.2 wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert und direkt per Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 2.3.2 Ansatz für analytischen Restriktionsverdau von pET24c basierten Plasmiden mit PvuII

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (ca. 50 ng)	1 µl
10x Fast Digest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific)	1 µl
FastDigest PvuII (Thermo Fisher Scientific)	0,5 µl
ddH ₂ O	auf 10 µl

Nach der PCR für die **ortsgerichtete Mutagenese** (Abschnitt 2.3.5) wurde **methylierte Template-DNA mittels DpnI verdaut**. Dazu wurden 5,7 µl 10x Tango Puffer und 2 µl DpnI direkt in die PCR Tubes (49 µl) gegeben und für 3 h im Thermocycler bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 20 min bei 80 °C erhitzt. Die Amplifikate wurden durch Reinigung mit einem PCR-Reinigungskit für die Transformation von *E. coli* vorbereitet.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von gewünschten DNA Abschnitten wurden die Komponenten aus Tabelle 2.3.3 unter Verwendung der Primerpaare aus Tabelle 2.1.9, die spezifisch an die Enden der zu vervielfältigenden DNA binden, gut gemischt. Bei höherem GC Gehalt der Template-DNA wurde der GC-Puffer anstatt dem HF-Puffer verwendet. Jeweils 24 µl der Mischung wurden zu 1 µl Template DNA (25–100 ng gDNA, 1 pg–10 ng Plasmid) und als *non template control* (NTC) zu 1 µl ddH₂O gegeben.

Tabelle 2.3.3 PCR Mastermix für einen 25 µl Ansatz

Komponente (Konzentration)	Volumen für eine 25 µl Reaktion (µl)
<i>forward</i> (fw) Primer (10 µM)	1,25
<i>revers</i> (rv) Primer (10 µM)	1,25
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
5 x HF-Puffer	5
Phusion DNA-Polymerase	0,25
ddH ₂ O	15,75 µl

Das Temperaturprogramm (Tabelle 2.3.4) für die Phusion Polymerase wurde nach den Empfehlungen des Herstellers erstellt.

Tabelle 2.3.4 Temperaturprogramm für Phusion-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklus
initiale Denaturierung	98	30	1x
Denaturierung	98	10	
Anlagerung	errechnete Anlagerungstemperatur – 2 °C	30	30 x
Elongation	72	30 / kb + 30 s	
finale Elongation	72	120	1x

Sollte die PCR als analytisches Mittel zur Bewertung von Transformanten verwendet werden, wurde eine Kolonie-PCR mit MangoMix durchgeführt. Dazu wurde je 5 µl des Mixes (Tabelle 2.3.5) in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und etwas Zellmasse einer Kolonie mit einer sterilen Spitze darin resuspendiert. Das Temperaturprogramm (Tabelle 2.3.6) unterschied sich im Vergleich zur Phusion PCR durch eine niedrigere Denaturierungstemperatur, jedoch längere Denaturierungszeit, um Zellen zu zerstören und damit die DNA zugänglich zu machen.

Tabelle 2.3.5 Ansatz für Kolonie-PCR mit MangoMix

Komponente	Volumen für 1x Ansatz
2x MangoMix	2,5 µl
<i>forward</i> Primer	1,25 µl
<i>revers</i> Primer	1,25 µl

Tabelle 2.3.6 Temperaturprogramm für Kolonie-PCR mit MangoMix

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklus
initiale Denaturierung	95	300	1x
Denaturierung	95	30	
Anlagerung	errechnete Anlagerungstemperatur – 2 °C	30	30 x
Elongation	72	30 / kb + 30 s	
finale Elongation	72	240	1x

2.3.5 Ortsgerichtete Mutagenese via PCR

Um eine Punktmutation gezielt in einen Vektor einzubringen, wurden die in Abschnitt „Oligonukleotide“ beschriebenen Primer und der Vektor, mit dem zu mutierenden Insert als Template, für die PCR eingesetzt. Da sich nach der PCR auch unveränderte Template DNA in der Reaktion befindet, würde eine direkte Transformation von *E. coli* zu Klonen führen, die das nicht mutierte Plasmid enthalten. Aus diesem Grund wurde nach der PCR ein Restriktionsverdau mit dem Enzym DpnI durchgeführt, das die durch *E. coli* methylierte Template-DNA schneidet. Die mutierten und, da sie durch PCR generiert wurden, nicht methylierten Amplifikate konnten anschließend mittels PCR-Reinigungskit von der degradierten Template- und übrigen Primer-DNA befreit werden.

2.3.6 Assemblierung von komplementärer dsDNA mittels Gibson Assembly

Die Methode von Gibson et al. (2009) ermöglicht es, DNA Fragmente mit überlappenden Sequenzen isothermal zusammenzufügen und zu amplifizieren. Das kann zur Zeitersparnis beim Klonieren beitragen, denn so können Vektor-Rückgrat und ein oder mehrere GOI, die mit speziellen „Gibson-Primer-Paaren“ (Kapitel 0) amplifiziert wurden, ohne zusätzlichem Restriktionsverdau des Inserts zusammengefügt und direkt zur Transformation eingesetzt werden. Die Reaktionen wurden nach den Empfehlungen im Hersteller-Protokoll angesetzt. So wurden zwischen 50 ng und 100 ng geschnittener Vektor (Spezifische Spaltung von DNA - Restriktionsverdau 2.3.3) und zusammengerechnet insgesamt zwischen 0,02 pmol und 0,5 pmol DNA in einem Volumen von 5 µl (anstatt 10 µl) eingesetzt und mit 5 µl (anstatt 10 µl) Gibson Mastermix versetzt. Zur Berechnung der einzusetzenden Stoffmenge (in pmol) anhand des Gewichts und der Fragmentlänge wurde Formel (1) angewandt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 50 °C inkubiert und direkt für die Transformation von *E. coli* Klonierungsstamm DH10B, oder TOP10 eingesetzt.

$$pmol = \frac{Gewicht_{Fragment} (ng) * 1000}{Länge_{Fragment} (bp) * 650 Da} \quad (1)$$

2.3.7 Klonierungsstrategie für *Ts_Axh43A*-Enzymvarianten

Zur Konstruktion der Plasmide mit den unterschiedlichen Modulkombinationen der Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase *Ts_Axh43A* (siehe auch Abbildung 3.7.1 im Ergebnis-Teil) wurden die Primerkombinationen wie in Tabelle 2.3.7 verwendet. Der bereits klonierte Vektor pET24c-*Ts_Axh43A* (Bröker 2019) diente als Template. Wie in Abbildung 2.3.1 schematisch gezeigt wurde das c1link enthaltende Plasmid von dem erstellten Vektor pET24c-c1cbm amplifiziert, während für die Erstellung des c2link-Plasmids zwei Fragmente amplifiziert und mittels Gibson assembliert wurden: Die GH43_16-Domäne mit dem Vektor-Rückgrat von pET-c2cbm und die GH43_C2-Domäne (linker Region) aus pET-c1linkcbm (Abbildung 2.3.1 unten).

Material und Methoden

Tabelle 2.3.7 *Ts_Axh43A*-Enzymvarianten. Primerkombinationen zur Amplifizierung verschiedener Domänen, Aminosäureabschnitte im Volllängenzym und Molekulargewichte der rekombinanten Enzymvarianten

Name (konservierte Domäne)	Primernummern (0) für PCR um Gibson Fragmente zu erstellen	Template für die PCR	resultierende(r) translatierte(r) Sequenzabschnitt(e) des Präprotein <i>Ts_Axh43A</i>	Molekulargewicht des Proteins mit His-Tag
<i>Ts_Axh43A</i> (GH43_10, GH43_16, CBM6)			AA 30-1221	134.7 kDa
c1 (GH43_10)	52, 53	pET- <i>Ts_Axh43A</i>	AA 53-324	32.1 kDa
c2 (GH43_16)	54, 56	pET- <i>Ts_Axh43A</i>	AA 760-1075	35.6 kDa
c1linkcbm (GH43_10, GH43_C2, CBM6)	52, 57 und 58, 51	pET- <i>Ts_Axh43A</i>	AA 53-759 + AA 1090-1221	95.3 kDa
c2cbm (GH43_16, CBM6)	54, 51	pET- <i>Ts_Axh43A</i>	AA 760-1221	51.5 kDa
c1linkc2 (GH43_10, GH43_C2, GH43_16)	52, 55	pET- <i>Ts_Axh43A</i>	AA 53-1075	115.5 kDa
c1link (GH43_10, GH43_C2)	61, 62	pET-c1cbm	AA 53-759	80.9 kDa
c2link (GH43_16, GH43_C2)	61, 64 63, 62	pET-c2cbm pET-c1cbm	AA 760-1075 + AA 325-759	84.3 kDa

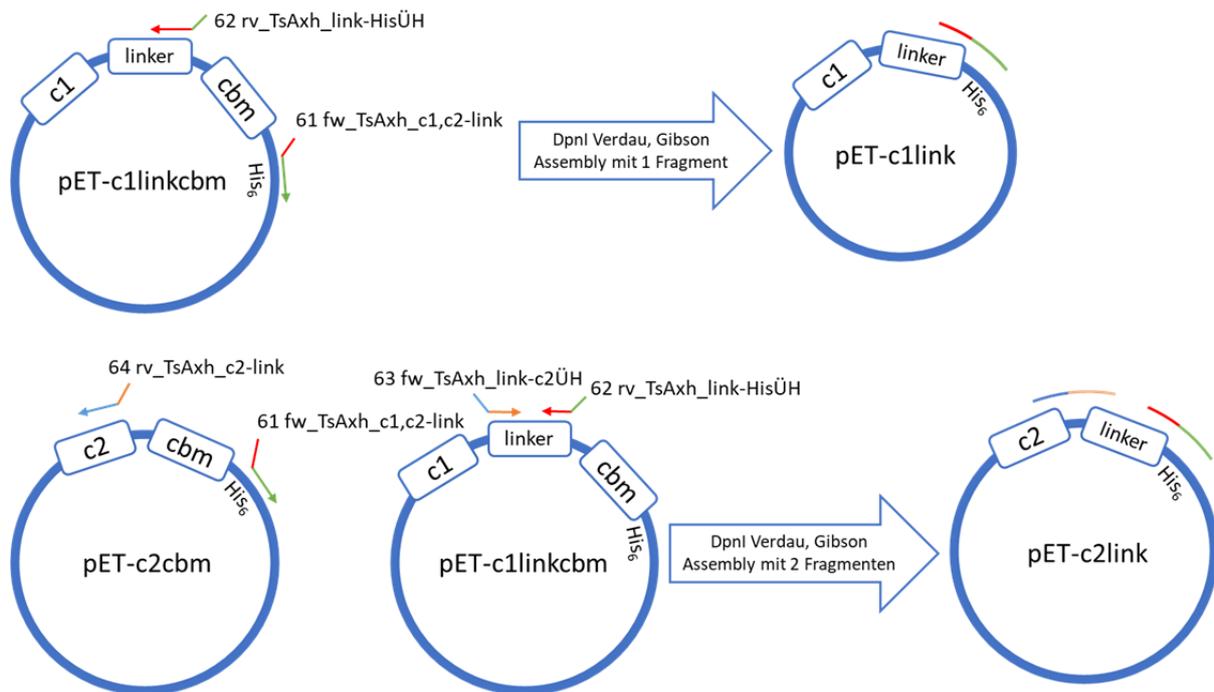


Abbildung 2.3.1 Schematische Darstellung der Konstruktion von *pET-c1link* und *pET-c2link* durch PCR mit den angegebenen Primern (0), anschließendem Restriktionsverdau mit DpnI und Gibson Assembly. Komplementäre Sequenzen sind in der gleichen Farbe dargestellt.

2.4 Mikrobiologische Methoden

Für alle aeroben Arbeiten wurde mit sterilen Gebrauchsgegenständen unter einer vertikalen *Laminar Flow* Sicherheitswerkbank gearbeitet, um das Risiko von Kontaminationen zu minimieren. *Escherichia coli* Zellen wurden jeweils ÜN bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei ca. 180 rpm schüttelnd inkubiert. Für Vorkulturen wurden 5 ml Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte inokuliert. Bei Transformanten wurden die jeweilig notwendigen Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: 50 µg/ml Kanamycin (Verwendung von pET24c) und 20 µg/ml Gentamycin (*E. coli* Arctic Express Zellen). *Bradyrhizobium japonicum* und *Methylobacterium extorquens* wurden jeweils direkt aus einem Glycerolstock in Flüssigmedium gegeben. *B. japonicum* wurde für 5 d in DSMZ-Medium 1 und *M. extorquens* für 2 d in *M. extorquens*-Medium, bestehend aus DSMZ Medium 1 mit 10 % Methanol, jeweils bei 30 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Lyophilisierte Zellen von *Bradyrhizobium vignae* wurden für 30 min in 500 µl *B. vignae*-Medium hydriert. Fünf ml Medium wurden mit 125 µl dieser Zellsuspension inokuliert und für 2 d bei 30 °C und 180 rpm inkubiert.

2.4.1 Kultivierung von anaeroben *Caldicellulosiruptor* Stämmen

Die anaeroben Arbeiten wurden unter sauerstofffreier Atmosphäre (N₂:H₂ 98:2 v/v) durchgeführt. GS2-Medium wurde in Hungate-Rollrand-Flaschen gefüllt und mit Butyl-Gummistopfen und Aluminium-Crimp verschlossen autoklaviert. Medienzusätze, zusätzliche Kohlenstoffquellen und Bakteriensuspensionen wurden mittels sterilen Spitzen zugegeben. Agarplatten wurden erst in festem Zustand in das Anaerobierzelt eingeschleust und durch eine 48 h Lagerung von Sauerstoff befreit. Zur Inkubation wurden die inokulierten Platten mit je einem Beutel Oxoid Anaerogen in Anaerobenbehältnisse gegeben. Die nach den Angaben der DSMZ rehydrierten lyophilisierten Zellen dienten als Inokulum von 10 ml anaerobem GS2-Medium. Jeweils 50 µl wurden zudem auch auf GS2-Agar ausgestrichen. Die Zellen wurden anaerob für 5 d bei 65 °C kultiviert. Alle drei Tage wurden die Kulturen mittels steriler Kanüle entgast.

2.4.2 Erstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zunächst wurde eine Hauptkultur (100 ml LB in 1 l-Kolben) mit 1 % einer gut gewachsenen Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,7 wachsen gelassen (37 °C, 180 rpm). Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen und alle Gefäße stets auf Eis gekühlt. Nachdem die Zellen pelletiert wurden (5000 rpm, 5 min, 4 °C), wurden sie vorsichtig in eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4 °C) wurden sie dieses Mal in 10 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach der Zugabe von 2 ml 100 % Glycerin und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden 50 µl Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente Zellen (50 µl Aliquot) wurden 10 min auf Eis aufgetaut, bevor die DNA (1 µl Plasmid, 5 µl Gibson-Ansatz) zugegeben wurde. Danach wurden sie 30 min auf Eis gestellt, anschließend für 60 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gestellt und nochmals kurz abgekühlt. Nach der Zugabe von 900 µl raumtemperiertes SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C schüttelnd ohne Selektionsdruck kultiviert. Zur Selektion der Transformanten wurden ausgewählte Volumina auf Selektionsplatten (Kan₅₀ für pET24c) aufgebracht und ÜN bei 37 °C kultiviert. Wurden geschlossene Plasmide zur Transformation verwendet, genügte ein Verdünnungsausstrich mit 50 µl Transformationsansatz um ausreichend Kolonien zu erhalten. Waren die Plasmide durch die Gibson Methode frisch assembliert, wurden je 100 µl, und nach Zentrifugation (2 min, 6000 rpm) der resuspendierte Rest, ausplattiert, da die Transformationseffizienz deutlich geringer war. Die Identifikation von korrekten Plasmiden erfolgte durch Isolation aus Flüssigkultur und anschließender Sequenzierung. Für eine erste Selektion, welche Plasmide ein Insert korrekter Größe trugen, konnte eine Kolonie-PCR (Kapitel 2.3.4) direkt mit etwas Zellmasse der gewachsenen Kolonien, oder ein analytischer Restriktionsverdau der isolierten Plasmide mit PvuII durchgeführt werden.

2.4.4 Heterologe Produktion von Proteinen

2.4.4.1 Verwendung von *E. coli* BL21 Star und ZY-5052-Autoinduktionsmedium

Das Prinzip der automatischen Induktion der T7-Polymerase Produktion und damit die Expression des *gene of interest* (GOI) basiert auf der Tatsache, dass *E. coli* Glukose vor Lactose in die Zellen aufnimmt. Zunächst wird die begrenzte Menge an Glukose im ZY-5052 Medium verstoffwechselt, bis die Zellen sich zirka am Ende der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Dann erst kann die aufgenommene Lactose, genauer gesagt die Isoform Allolactose, die Repression des lac Operons aufheben, indem sie an den Repressor, das Genprodukt des auf dem Vektor codierten LacI, bindet. Infolge dieser Bindung löst sich der Repressor vom Operator und die RNA-Polymerase kann an den lac-Promotor binden. Die anschließende Transkription und Translation der T7 Polymerase führt dann zur Expression des unter Regulation des T7 Promotors stehenden GOI. (Studier 2005; Briand et al. 2016) Vorkulturen der transformierten *E. coli* BL21 Star Zellen wurden 5–6 h inkubiert und vollständig in die vorbereiteten Kolben mit ZYP5052 gegeben und für ca. 18 h, wenn nicht anders angegeben, meist bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

2.4.4.2 Verwendung von *E. coli* Arctic Express und Induktion mit IPTG

Eine Möglichkeit, die Bildung unlöslicher Proteinaggregate während der Proteinproduktion zu erniedrigen, ist das Absenken der Temperatur, was folglich zu einer Verlangsamung des Translationsprozesses führt und überwiegend zur korrekten Faltung führt. Da jedoch bei niedrigeren Temperaturen die *E. coli* eigenen Chaperonine ihre Aktivität verlieren, wurde *E. coli* Arctic Express mit

psychrophilen Chaperoninen aus *Oleispira antarctica* ausgestattet, die ihr Proteinfaltungs-Optimum bei etwa 4–12 °C aufweisen (Instruction Manual Arctic Express Competent Cells, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Nach den Empfehlungen des Herstellers wurde eine ÜN-Kultur bei 37 °C inkubiert, die mit einer transformierten Kolonie inokuliert und mit Kanamycin sowie Gentamycin versetzt war. Die Hauptkultur (200 ml LB), die mit 4 ml der Vorkultur beimpft wurde und der zunächst keine Antibiotika zugegeben wurden, inkubierte 3 h bei 30 °C und 220 rpm, bevor sie für 10 min bei 10 °C und 220 rpm adaptiert wurde. Zur Induktion der Expression wurde 1 mM IPTG zugegeben. Die Kolben wurden ÜN weiter bei 10 °C inkubiert.

2.4.5 Gewinnung des Zellextraktes

Die Zellen wurden in 250 ml Zentrifugenbehältnissen für 10 min bei 4.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand bis auf 30 ml verworfen wurde, das Zellpellet resuspendiert und die Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde, konnte erneut zentrifugiert (15 min, 4.500 rpm, 4 °C) werden. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung, aber mindestens 1 h, tiefgefroren. Der Zellaufschluss erfolgte in dem jeweilig an den darauffolgenden Reinigungsschritt angepassten Puffer. Während der ganzen Prozedur wurden die Reaktionsgefäße, wenn möglich auf Eis und alternativ bei 4 °C gehalten. Das Zellpellet wurde, nach Zugabe von 1/3–1/2 einer Protease-Inhibitor-Tablette, in 10–20 ml Puffer resuspendiert. Versetzt mit 1 mg/ml Lysozym wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie sonifiziert wurde (2x 4 min, 60 % Amplitude, 0,25 Intervall mit 2 min Pause zwischen den Beschallungen). Eine Probe (Probe **1**, > 20 µl) wurde für die Analyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) zurückgehalten. Ein Zentrifugationsschritt (18.000 rpm, 20 min, 4 °C) klärte das Lysat und trennte das Zellwandbestandteilen enthaltenden Pellet (Probe **2**) vom Zellextrakt (Probe **3**) ab.

Da es sich bei einigen Proteinen dieser Arbeit um thermostabile Enzyme aus thermophilen Organismen handelte, konnte entweder der Zellextrakt direkt, oder die vereinten eluierten Fraktionen (nach der Affinitätschromatographie), durch Hitzebehandlung (standardmäßig für 15 min bei 60 °C, teils 70 °C, oder 55 °C, wenn angegeben) von einigen hitzelabilen *E. coli* Proteinen befreit werden. Denaturierte Proteine wurden abzentrifugiert (15 min, 15.000 rpm, 4 °C) und der Überstand weiterverwendet.

2.4.6 Nickel-Affinitätschromatographie zur Proteinreinigung

Für die Reinigung der His₆-markierten Proteine wurde die Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Entweder wurden Proteine über vorgepackte Protino Ni-TED-Säulen (Macherey-Nagel™) über das Schwerkraft-Protokoll und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer gereinigt, oder es wurde ein FPLC-System verwendet, um die Reinigung in größerem Maßstab wie folgt über HisTrap FF-Säulen (Cytiva Europe GmbH, Freiburg, Germany) durchzuführen. Puffer und Lösungen für

die Verwendung an der FPLC wurden zunächst über 0,2 µM Celluloseacetat filtriert und dann unter Vakuum und starkem Rühren auf einem Magnetrührer entgast, um bei Druckunterschieden in den Kapillaren Gasbläschenbildung zu verhindern. Zunächst wurden die Säulen vorbereitet, indem sie von Nickelionen befreit, alkalisch gereinigt und neu mit Nickelionen beladen wurden. Dazu wurden die Hinweise im Handbuch der Säulen berücksichtigt. Ein typisches Regenerationsprotokoll ist in Tabelle 2.4.1 gezeigt.

Tabelle 2.4.1 Regenerationsprotokoll für HisTrap FF-Säulen (1 ml, oder 5 ml)

Lösung	Säulenvolumen	Pause
H ₂ O	5	-
Stripping-Puffer	5	-
H ₂ O	5	-
1 M NaOH	2	12 h
1 M NaOH	3	-
H ₂ O	5	-
0,1 M NiSO ₄	0,5	-
Wasch-Lyse-Puffer	5	-

Das System wurde vor dem Einbau der Säule erst mit 20 % Ethanol gespült, dann wurden alle Schläuche zunächst in 20 % Ethanol, dann mit H₂O gespült. Anschließend wurden die jeweiligen Zufluss-Schläuche (in Klammern) in die folgenden Lösungen gegeben: Wasch-Lysepuffer (A1 und *Buffer*-Schlauch), Elutionspuffer (B1), Wasser (A2) und 20 % Ethanol (B2), Zellextrakt(e) (*Sample*-Schläuche S1–4). Alle Schläuche wurden durch Spülen mit 20 ml/min, bzw. 60 ml/min (für *Buffer*-Schlauch und S1–4) vorbereitet (=inlet prime). Währenddessen wurden die Pumpen mittels Spritze entgast. Es wurden jeweils die maximalen Flussraten (5 ml/min bei 5 ml Säule, 1 ml/min bei 1 ml Säule) verwendet. Das Standard Gradienten-Protokoll für Unicorn 6.3, das für Proteine verwendet wurde, wenn sie vorher noch nie mittels His-Aff.-Chrom. gereinigt wurden, kann Tabelle 2.4.2 entnommen werden. Sollte ein Protein erneut gereinigt werden, wurde meist ein Stufen-Elutions-Protokoll angewandt mit an die Retentionszeit angepasster Imidazolkonzentration. Während des Durchflusses des Zellextraktes durch die Säule (**Probe 4**) und des Waschschriffs (**Probe 5**) wurden teils manuell Proben an der Austritts-Kapillare entnommen, um den Verbleib des Proteins zu dokumentieren.

Tabelle 2.4.2 Standardprotokoll für His-Affinitätschromatographie mit HisTrap FF-Säulen an FPLC-Anlage

Schritt	Lösung	Inlet	Säulenvolumen
Equilibrierung	Wasch-Lyse-Puffer	A1	5
Probenauftragung	Zellextrakt	Sx	komplett, bis Luft detektiert wird
Waschen	Wasch-Lyse-Puffer	A1	10
Elution			
linearer Gradient	W.L.P. + Elutionspuffer	A1 mit 0–40 % B1	8
Stufe	W.L.P. + Elutionspuffer	100 % B1	5
Waschen	Wasch-Lyse-Puffer	A1	5
Waschen	H ₂ O	A2	
Waschen	20 % Ethanol	B2	

Sx bezeichnet den jeweiligen Probenschlauch S1-4

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 SDS-PAGE

Nachdem zunächst die gemischten Komponenten für das Trenngel (Tabelle 2.5.1) zwischen die Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet wurden und das Gel auspolymerisiert war, konnte nach Abgießen des Wassers die Sammelgel-Mischung (Tabelle 2.5.2) auf das Trenngel pipettiert werden und der Kamm mit den Probentaschen bis zum Erhärten des Gels eingesetzt werden. Die fertigen Gele wurden in die Laufkammern eingesetzt, die mit 1x SDS Puffer soweit aufgefüllt wurden, dass Innen- und Außerraum nur durch das Gel verbunden waren.

Tabelle 2.5.1 Zusammensetzung 12 % SDS-Trenngele

Komponente	Volumen (2 Mini-Gele)
Bis-Acrylamid	4 ml
SDS-Trenngelpuffer	2,5 ml
H ₂ O	3,5 ml
10 % APS	105 µl
TEMED	15 µl

Tabelle 2.5.2 Zusammensetzung 4 % SDS-Sammelgele

Komponente	Volumen (2 Mini-Gele)
Bis-Acrylamid	0,65 ml
SDS-Sammelgelpuffer	1,25 ml
H ₂ O	3,1 ml
10 % APS	75 µl
TEMED	9 µl

Proben wurden mit 4x SDS-Auftragspuffer versetzt (15 µl Probe + 5 µl 4x SDS-Auftragspuffer) und für 10 min bei 95 °C im Thermocycler denaturiert und danach kurz auf Eis abgekühlt. Je nach erwarteter Proteinmenge in der Probe wurden unterschiedliche Volumina auf die Gele aufgetragen: für Lysat, Pellet, Zellextrakt und Durchfluss meist 5 µl, und vom Waschschrift und den Proteinfractionen jeweils 10 µl; zudem wurde für jedes Gel eine Tasche mit 4 µl Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder) beladen. Pro Gel wurden je 15 mA Strom angelegt und das Gel so lange laufen lassen, bis die farblich markierte Lauffront das untere Ende des Gels erreichte (ca. 1,5 h). Zum Entfernen des SDS wurden die Gele kurz in Wasser geschwenkt. Zur Visualisierung der Proteine konnten die Gele entweder 30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, anschließend mit 10 % Essigsäure entfärbt werden und dann zur Digitalisierung gescannt werden, oder die ungefärbten Gele wurden für Westernblots verwendet.

2.5.2 Westernblot

Mittels spezifischer Antikörper und fusionierter alkaliner Phosphatase können Proteine mit bestimmten Epitopen auf einer Membran sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der spezifisch an die rekombinant fusionierten, C-terminalen Histidine der heterolog produzierten Proteine bindet. Zunächst wurden pro Blot 10 Whatman-Filterpapiere (Typ1) und eine PVDF-Membran passgenau ausgeschnitten (Standardgelgröße etwa 7 x 8 cm). Die Membran wurde vor Verwendung kurze Zeit in Methanol getaucht. Die Filterpapiere wurden in WB-Transfer Puffer getränkt. Nach Anfeuchten der Graphitplatten des Blotters mit demselben Puffer wurden 5 Whatman Filterpapiere aufeinander auf die positiv geladene Anode gelegt, gefolgt von der PVDF-Membran, darauf schließlich das SDS-PAGE-Gel und weitere 5 Whatman Filterpapiere. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde der aufgeschichtete Blotting-Aufbau unter leichtem Druck mit einem 50 ml-Reaktionsgefäß abgerollt. Nach Abdecken des Blotters mit der zweiten Graphitplatte (Kathode), wurde der Blot für 1 bis 1,5 h bei 70 mA/Blot laufen gelassen. Der Erfolg des Transfers wurde durch Übertragung der Markerbanden sichtbar. Nach dem Transfer auf die Membran wurde, unter Verwendung der WB-Puffer aus Tabelle 2.1.6, nach dem Protokoll des Substrat-Kits (Novex AP Chromogenic Substrate) verfahren. Um die Antikörper-Lösung möglichst effizient zu nutzen, wurde die blockierte und gewaschene Membran mit 10 ml der Antikörperlösung in einem 50 ml Reaktionsgefäß unter Rollen bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Alle anderen Wasch-, Blockierungs- und Detektionsschritte wurden in licht-undurchlässigen Plastikgefäßen durchgeführt.

2.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde das Bradford-Reagenz und die Methode nach Bradford 1976 verwendet. Dazu wurden 195 µl Reagenz mit 5 µl Probe in Triplikaten in einer Flat-bottom-96-Well-Mikrotiterplatte gemischt und 10 min bei ca. 20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und an einer BSA Standardkurve in GraphPad interpoliert (*one site*

total). Für gereinigte Proteine mit bekannter Sequenz wurde mittels des Expsy ProtParam Tools (Gasteiger et al. 2005) der oxidierte Extinktionskoeffizient ε in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt und mit Formel (2) (Lambert-Beer'sches Gesetz) von der Absorption bei 280 nm auf die Konzentration in μM , oder unter Einbeziehung des Molekulargewichts auf die Konzentration in mg/ml zurück gerechnet (Formel (3)). Die Absorption wurde mit 3 μl Proteinlösung in einer μVette (Eppendorf) mit einer Probenschichtdicke d von 0,1 cm gemessen.

$$c (\mu\text{M}) = \frac{A_{280 \text{ nm}}}{\varepsilon \times d} \times 1 * 10^{-6} \quad (2)$$

$$c \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{280 \text{ nm}}}{\varepsilon \times d} \times MW \quad (3)$$

Mit c = Konzentration; ε = Extinktionskoeffizient in $\frac{1}{M \times \text{cm}} = \frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}}$; d = Dicke in cm; MW = Molekulargewicht in $\text{Da} = \frac{\text{g}}{\text{mol}}$

2.5.4 Gelfiltration

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) kann zum einen zur Trennung von Proteinen aus einem Gemisch nach ihrem hydrodynamischen Volumen, grob also nach ihrem Molekulargewicht, aber auch zur Übertragung von Proteinen in einen anderen Puffer, genutzt werden. Mittels Einweg-PD-10 Entsalzungssäulen, gefüllt mit Sephadex®-G25 Medium, wurden die Proteine nach Herstellerangaben in den gewünschten Puffer überführt. Die SEC zur analytischen Auftrennung wurde an einer ÄKTApure 25L1 Anlage, ausgestattet mit einer Superdex 100 increase 10/300 GL (Cytiva, Säulenvolumen von 23,562 ml) und einem 100 μl Probenschlauch (sample loop), mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,75 ml/min, durchgeführt. Zunächst wurde, die Säule mit 0,75 CV mit dem zuvor filtrierten und entgasten gewünschten Puffer (0,1 M MOPS pH 6,5, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl_2) equilibriert. Mittels Spritze wurden ca. 200 μl der Probe injiziert, um den 100 μl Probenschlauch vollständig zu füllen, wobei die Spritze nicht entfernt wurde, um Gasbildung im System zu vermeiden. Die Elution erfolgte innerhalb von 1 CV in 1 ml Fraktionen mit Fraktionierungsstart nach 0,1 CV. Da der dekadische Logarithmus des Molekulargewichts proportional zum Elutionsvolumen ist, kann anhand der Steigung einer Standardgeraden vom Elutionsvolumen auf das Molekulargewicht geschlossen werden. Es wurden die Molekülgrößen-Standards Ferritin, Katalase, Aldolase, Albumin, Chymotrypsin und Cytochrom C zur Kalibrierung verwendet.

2.5.5 Schmelztemperaturbestimmung mittels *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF)

Der Farbstoff SyproOrange bindet an hydrophobe Bereiche von Proteinen, wodurch seine Fluoreszenz verstärkt wird. Bei hitzeinduzierter Entfaltung werden zusätzliche hydrophobe Bindestellen exponiert

und die relative Intensität der Fluoreszenz ist somit ein Maß für die Entfaltung. Der Wendepunkt der Sättigungskurve, die die Fluoreszenz über die Temperatur bildet, markiert die Temperatur, an dem die Proteine zur Hälfte denaturiert vorliegen, was als Schmelztemperatur T_m definiert ist.

Zunächst wurde 5000x SyproOrange 1:25 in 1x RP auf 200x verdünnt. In Triplikaten wurden zu je 45 μ l Enzymlösung (in 1xRP), mit definierter Konzentration zwischen 4 und 10 μ M, 5 μ l 200x SyproOrange in weißen qPCR-Platten gegeben, gemischt und mit durchsichtiger Folie verschlossen (Microseal B Adhesive Sealer). Im qPCR Cycler mit Voreinstellungen für das ROX Fluorophor wurde ein Programm eingestellt, das zunächst 5–15 min (15–25 °C) eine Anfangstemperatur hielt. Dann wurde die Fluoreszenz das erste Mal gemessen. Im Anschluss wurde die Temperatur 65-mal alle 15 s um 1 °C erhöht (80–90 °C) und jeweils die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzdaten über die Zeit wurden den jeweiligen Temperaturen zugeordnet. Um die Schmelztemperatur als Peak zu visualisieren, wurde von diesen Sättigungs-Kurven in Graphpad die erste Ableitung gebildet, während die Kurven gleichzeitig geglättet wurden (*Analyze Data* → *XY analyses* → *smooth, differentiate or integrate* → *first derivative, smooth*). Für T_s _Axl43A Messungen zwischen 65 und 90 °C wurde die Temperatur anfänglich 10 min bei 25 °C gehalten, während für die Messung zwischen 15 °C und 80 °C die anfänglichen 15 °C für 5 min gehalten wurden.

2.5.6 Sekundärstrukturanalyse mittels Zirkulardichroismus Spektroskopie

Sekundärstrukturelemente wie Helices und Faltblätter weisen spezifische Merkmale im Spektrum zwischen 190 und 260 nm auf. Deshalb kann die Zirkulardichroismus Spektroskopie (*circular dichroism spectroscopy*, CD) Aufschluss über die Sekundärstrukturmerkmale eines Proteins geben. Sind die Sekundärstrukturen identisch, kann auch davon ausgegangen werden, dass die 3D-Strukturordnung ähnlich ist, weshalb CD in dieser Arbeit dazu verwendet wurde, die Integrität der Faltung von Punktmutanten eines Proteins zu bewerten. Proteine wurden in 10 mM Tris pH 6.5 überführt (Cytiva PD-10 Entsalzungssäulen, Thermo Fisher Scientific). Die Spektren zwischen 195 und 260 nm wurden unter N_2 -Fluss (300 l/h) von 300 μ l einer 0,1 mg/ml Proteinprobe in einer 1 mM Küvette in einem Jasco-J710 CD Spectrometer bei 20 °C, oder 60 °C aufgenommen (Stelzer et al. 2008). Die Temperatur wurde mittels Wasserbad reguliert und an der Küvette mittels Infrarot-Thermometer vor der Messung überprüft. Der Mittelwert aus 10 Spektren wurde jeweils verwendet, um mit dem Programm CDNN die Sekundärstrukturanteile abzuschätzen (Poschner et al. 2007).

2.5.7 Aktivitätstest mit Arylglykosiden – pNP-Assay

Aufgrund der komfortablen photometrischen Quantifizierung des Hydrolyseprodukts *para*-Nitrophenol eignen sich *para*-Nitrophenyl-Glykoside für die biochemische Charakterisierung von Glykosidhydrolasen. Bei Spaltung der glykosidischen Bindung kommt es zur Freisetzung von *para*-Nitrophenol, das bei einem pH über seinem pK_s von 7,08 als Anion in der Lösung vorliegt und ein

Absorptionsmaximum von 405 nm (Molarer Extinktionskoeffizient: $18600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) hat (Pirillo et al. 2021). So ist die Absorption zur Bildung von *p*NP und damit zur Anzahl gespaltener Bindungen proportional. Reaktionen mit *p*NP-Glykosiden wurden zur Bestimmung der Substratpräferenz, optimalen Temperatur, pH-Wert, sowie zur Ermittlung der kinetischen Parameter verwendet. Die Komponenten für 1x Ansätze sind in Tabelle 2.5.3 gezeigt. Sie wurden in passenden, hochskalierten Volumina vorbereitet (z.B. jeweils ein Enzym-Master-Mix und ein Substrat-Mastermix), um das Pipettieren und Mischen von Volumina kleiner als 5 μl und damit höhere Standardabweichungen zu vermeiden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die jeweiligen Mastermixe dann in Triplikaten in PCR-Reaktionsgefäße oder PCR-Mikrotiterplatten auf Eis zusammengegeben, und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Platten wurden mit *Foil Heat Seal* Aluminiumfolien (Biozym) verschlossen und für die gewünschte Zeit bei der(den) gewünschten Temperatur(en) im Thermocycler inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden nach kurzem Abkühlen auf Eis je 100 μl 1 M Na_2CO_3 zugegeben, gemischt und 100 μl auf eine Messplatte transferiert, die im Plattenphotometer bei 405 nm gemessen wurde. Anhand der Steigung einer *p*NP-Standardgeraden (0,002; erstellt im Zuge der Doktorarbeit von Jannis Bröker 2019) und nach Abzug der Substratkontrolle konnte auf die gebildete *p*NP-Konzentration zurückgerechnet werden.

Tabelle 2.5.3 Reaktionsansatz für Aktivitätstests mit *p*NP-Glykosiden

Komponente	Volumen für 50 μl Reaktion
10 x RP	5 μl
0,1 M <i>p</i> NP-Glykosid in DMF	0,5 μl
Enzymlösung	x μl
dd- H_2O	44,5 – x μl

pH-Optima: Verschiedene pH-Werte wurden entweder mit 2x Citrat-Phosphatpuffer, wie in Herlet et al. 2017 beschrieben, oder mit den verschiedenen 5x Puffern mit unterschiedlichen Puffersubstanzen aus Tabelle 2.1.6 abgedeckt. Die Reaktionsansätze (Tabelle 2.5.3) wurden dementsprechend angepasst. Damit die Aussagen über die thermophileren Enzyme nicht durch die unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten der verschiedenen Puffersubstanzen verzerrt wurden, wurden die pH-Werte der eingestellten Puffer bei 80 °C in der Reaktionskonzentration gemessen.

Temperaturoptima: Um die optimale Temperatur nach einer bestimmten Zeit zu ermitteln, wurden unterschiedliche Temperaturgradienten mit Spannen bis zu 40 °C im TADvanced Thermocycler über die zwölf Spalten einer Mikrotiterplatte angelegt. In Spalten 1–12 wurden jeweils gleiche Reaktionen pipettiert mit Replikaten und den ohne-Enzym-Kontrollen in untereinanderliegenden Zeilen.

Aktivitätsbasierte Temperaturstabilität (Resistenz gegenüber Temperaturinaktivierung – oder die Reversibilität der Temperatur-induzierten Enzyminaktivierung): Reaktionen wurden zunächst ohne

pNP-Glykosid pipettiert, gemischt und für verschiedene Zeitspannen bei der gewünschten Zeit vorinkubiert. Entweder wurde ein hochskalierter Ansatz in einem Reaktionsgefäß im Wasserbad inkubiert, aus dem nach einer gewissen Zeit Aliquots in Triplikaten in ein PCR-Reaktionsgefäß entnommen wurden, oder der Mastermix wurde bereits auf PCR-Tubes aufgeteilt und im Thermocycler inkubiert. Analog wurden die Aliquots dann entweder jeweils zu der entsprechenden Menge an auf Eis vorgelegtem Substrat gegeben, oder zum gewünschten Zeitpunkt nach kurzem Abkühlen auf Eis das Substrat direkt in die PCR Tubes zugegeben. Die tatsächlichen Reaktionen wurden dann bei der zuvor ermittelten optimalen Temperatur für 10–20 min (je nach Enzyme) inkubiert.

Kinetische Parameter und Inhibitionskonstanten: Zur Ermittlung der kinetischen Parameter sollten die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt werden. Dazu wurde ein Mastermix ohne Enzym mit der höchsten zu testenden pNP-Glykosid-Konzentration (z.B. 4 mM, 10 mM oder 20 mM) in Deepwell-Mikrotiterplatten in ein Well in Zeile A pipettiert. In die Zeilen B bis H wurde jeweils ein Mastermix ohne pNP vorgelegt, und anschließend eine 1:1 Verdünnungsreihe von A bis G erstellt (H enthält kein pNP-Substrat, sondern H₂O). Mittels Mehrkanalpipette konnten dann die unterschiedlichen Substratkonzentrationen direkt in mehrere Spalten einer PCR-Mikrotiterplatte vorgelegt werden. Nach Enzymzugabe wurde 10–30 min bei der gewünschten Temperatur inkubiert und zur Auswertung die spezifische Aktivität auf die Substratkonzentration aufgetragen. Wenn es möglich war, eine geeignete niedrige Enzymkonzentration zu finden, bei der die Aktivität noch messbar war und gleichzeitig Substratsättigung zu erreichen war, konnten wie auch von Baudrexl et al. (2019) beschrieben in Graphpad durch das Fitten von geeigneten nichtlinearen Regressionsmethoden die Parameter V_{max} und K_M , bzw. V_{max} und $K_{half}^h = K_{prime}$ bestimmt werden.

Zur Beschreibung der [Substrat]-Geschwindigkeitskurven wurde entweder die Michaelis-Menten-Gleichung (4) oder die Hill-Gleichung, ein Modell der kooperativen allosterischen Wirkung (5), verwendet, die mit der erstgenannten identisch ist, wenn die Hill-Steigung 1,0 beträgt. K_{prime} stellt in diesem Modell ein Äquivalent zur Michaelis-Menten-Konstante (K_M) dar (6). Die katalytische Konstante (k_{cat}) wurden durch Anpassung von $E_t \times k_{cat}$ anstelle von V_{max} bestimmt (Formel (7)).

$$V_S = \frac{V_{max} \times c_{Substrat}}{K_M + c_{Substrat}} \quad (4)$$

$$V_S = \frac{V_{max} \times c_{Substrat}^h}{K_{half}^h + c_{Substrat}^h} \quad (5)$$

$$K_{half}^h = K_{prime} \quad (6)$$

$$V = \frac{E_t \times k_{cat} \times c_{Substrat}}{K_M + c_{Substrat}} \quad (7)$$

$$V_S = \frac{V_{max} \times C_{Substrat}}{K_M \times \frac{1 + C_{Inhibitor}}{k_i} + C_{Substrat}} \quad (8)$$

$$V_S = \frac{V_{max} / \left(1 + \frac{C_{Inhibitor}}{\alpha \times k_i}\right) \times C_{Substrat}}{\left(K_M \times \frac{1 + C_{Inhibitor}}{k_i}\right) / \left(1 + \frac{C_{Inhibitor}}{\alpha \times k_i}\right) + C_{Substrat}} \quad (9)$$

$$y = \frac{100}{\left(\frac{1 + C_{Inhibitor}}{IC_{50}}\right)} \quad (10)$$

Mit V_S = spezifische Aktivität bei jeweiliger Substratkonzentration (U/mg); V_{max} = maximale spezifische Reaktionsgeschwindigkeit (U/mg), $C_{Substrat}$ = Substratkonzentration (mM), K_M = Michaelis-Menten-Konstante, Konzentration, die die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erzeugt (mM), K_{prime} = ähnlich zu K_M , h = Hill Slope als Maß für Kooperation, V = Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{mol/s}$), k_{cat} = Wechselzahl (1/s), $C_{Inhibitor}$ = Inhibitorkonzentration (mM), k_i = Inhibitionskonstante (mM Inhibitor), y = relative Aktivität (in %) verglichen zu Reaktionen ohne Inhibitor, IC_{50} = halbmaximale Inhibitionskonzentration

Zur Beurteilung der Produkthemmung und zur Berechnung der k_i -Werte wurden die Kurven für Reaktionen aufgenommen, die unterschiedliche Produktkonzentrationen enthielten. Dann wurden entweder ein Modell für die kompetitive Bindung (8) oder ein Modell für gemischten Hemmung (9) an die Kurven angepasst. Der IC_{50} -Wert, der trotz seiner Substratabhängigkeit häufig zur Abschätzung der Hemmstärke eines Inhibitors verwendet wird, wurde unter Verwendung von Gleichung (10) bestimmt. Die Datenpunkte wurden mit Hilfe von Graphpad bei Substratkonzentrationen interpoliert, die dem jeweiligen K_M entsprechen, und auf Reaktionen ohne Inhibitor bezogen, um y zu erhalten.

Die Wechselzahl k_{cat} wurde anhand von Gleichung (11) bestimmt.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{n_{enzyme}} \text{ in } \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{s} * \mu\text{mol}} \right] \quad (11)$$

Eine Beispielberechnung für k_{cat} mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ C_s _Gaf159A (MW = 37723 g/mol) in 50 μl Endvolumen und $V_{max} = 2,7 \mu\text{mol}/(\text{min} * \text{mg})$ ist im Folgenden gezeigt:

$$V_{max} = 2,7 \frac{U}{\text{mg}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}} * \frac{\text{min}}{60 \text{ s}} * 0,1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} * 50 \mu\text{l} * \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} = 0,000225 \frac{\mu\text{mol}}{\text{s}}$$

$$n_{enzyme} = \frac{0,1 \frac{\text{g}}{\text{l}}}{37723 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 50 \mu\text{l} * 1 * 10^{-6} \frac{\text{l}}{\mu\text{l}} = 2,651 * 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} * 5 * 10^{-5} \text{l}$$

$$= 2,651 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} * 5 * 10^{-5} \text{l} = 1,325 * 10^{-4} \mu\text{mol}$$

$$k_{cat} = \frac{0,000225 \frac{\mu\text{mol}}{\text{s}}}{0,0001325 \mu\text{mol}} = 1,698 \text{ s}^{-1}$$

Die katalytische Effizienz wurde durch den Quotienten aus Wechselzahl und K_M gebildet.

2.5.8 Enzymatische Hydrolyse von Oligosacchariden, Polysacchariden und anderen natürlichen Substraten

Zur Enzymatischen Hydrolyse wurden Reaktionsansätze (Tabelle 2.5.4) in Mikrotiterplatten, PCR-Reaktionsgefäße, oder mit dem gewünschten hochskalierten Volumen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und für die gewünschte Zeit im Thermocycler, oder im Wasserbad inkubiert. Wenn nicht anders angegeben wurde die Reaktion nach 20 h auf Eis gestoppt und mittels DNSA (2.5.9), DC (0), oder HPAEC-PAD (2.5.11) analysiert.

Tabelle 2.5.4 Reaktionsansatz zur enzymatischen Hydrolyse von Poly- und Oligosacchariden

Komponente	Volumen für 100 µl Ansatz
10x Reaktionspuffer (Tabelle 2.1.6)	5 µl
1 % Polysaccharid / 0,02 % Oligosaccharid	50 µl
gewünschtes Enzym (z.B. 10 µM) / Zellextrakt	x µl
ddH ₂ O	45-x µl

2.5.9 Quantifizierung reduzierender Zucker in einer Lösung mittels DNSA

Da jede Spaltung innerhalb eines Polysaccharids ein neues reduzierendes Ende entstehen lässt, kann die Aktivität eines Enzyms durch die Quantifizierung von entstandenen reduzierenden Zuckern ermittelt werden. Die Farbentwicklung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) ist dabei auf die Reduzierung einer Nitrogruppe am Phenolring unter alkalischen Bedingungen zurückzuführen. Das Absorptionsmaximum von 3-Amino-5-nitrosalicylsäure bei 540 nm macht eine photometrische Messung möglich. Die Methode von Wood und Bhat 1988 wurde wie folgt angepasst: In Mikrotiterplatten wurden je 50 µl Probe zu 75 µl DNSA-Reagenz (Tabelle 2.1.6) gegeben, bei 95 °C für 10 min inkubiert und anschließend 100 µl in Flat-Bottom 96-Well-Mikrotiterplatten überführt um die Absorption bei 540 nm zu messen. Anhand von passenden Standardlösungen eines Vergleichssubstrats (Glukose, Rhamnose, Arabinose) konnten die Absorptionswerte anhand von Geradengleichungen, oder durch Interpolation an einer Standardkurve (in GraphPad Prism) in Konzentrationen zurückgerechnet werden. Die Enzymaktivität wurde in U/mg oder U/µmol angegeben, wobei eine Unit als die Enzymmenge definiert wurde, die in einer Minute 1 µmol Produkt freisetzt. Die Ergebnisse wurden entsprechend der verwendeten Standardlösungen als Glukose-, Rhamnose-, oder Arabinose-Äquivalente angegeben.

2.5.10 Visualisierung und Identifizierung von Sacchariden mittels Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde verwendet, um das Saccharidprofil mehrerer Proben gleichzeitig zu untersuchen. Durch den Vergleich mit Standards können Zucker, die unterschiedliche R_f -Werte aufweisen, identifiziert und anhand der Intensität der Färbung auch annähernd quantifiziert werden. Als ungefähre Annäherung wurde immer angenommen, dass ein Spot mit ca. 1 µg eines Saccharids gut sichtbar war. Als polare stationäre Phase wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten verwendet. Die Proben wurden 2 cm vom unteren Rand und von den seitlichen Rändern entfernt auf einer Linie im Abstand von mindestens 0,75 cm aufgetragen. Je nachdem, ob eher Monosaccharide (Acetonitril: Wasser 8: 2 v/v) voneinander getrennt werden sollten, oder eher Oligosaccharide (1-Butanol: Ethanol: Wasser 5: 5: 4 v/v) in der Probe erwartet wurden, wurden zwei unterschiedliche Laufmittel verwendet. Die Chromatographie wurde so lange laufen gelassen, bis sich die Lauffront ca. 1 cm unter dem oberen Rand der Platte befand. Nach einer Trocknung von minimal einer Stunde (vorzugsweise über Nacht) wurde die Färbelösung (ca. 4 ml der DC-Färbelösung-Basis aus Aceton, Anilin und Diphenylamin + 400 µl 85 % H_3PO_4) im ChromaJet auf die Platten gesprüht. Anschließend wurden sie entwickelt, indem sie mit der Aluminium-Seite nach unten, in Aluminiumfolie eingewickelt für ca. 10 min auf einer Metallplatte erhitzt wurden, die auf einem Magnet-Heiz-Rührer lag, welcher auf 200 °C eingestellt war.

2.5.11 Identifizierung und Quantifizierung von Kohlenhydraten mittels HPAEC-PAD

High Performance Anion Exchange Chromatographie (HPAEC) mit *Pulsed Amperometric Detection* (PAD) ist eine sehr sensitive, hoch spezifische, einfache, da automatisierte, und hochauflösende Methode um Mono- und Oligosaccharide voneinander zu trennen und anhand von Standards zu identifizieren und zu quantifizieren. Zudem ist keine Derivatisierung der Analyten notwendig (Mechelke et al. 2017). Der Geräteaufbau und die Software- und Betriebseinstellungen wurden bereits von Mechelke et al. 2017 beschrieben: ICS 3000 Dionex Chromatography System von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) mit CarboPac™ PA1-Säule (4× 250mm), PA1-Vorsäule (4 × 50 mm), PEEK Kapillaren (0,25 mm Innendurchmesser), GM-4 Gradientenmischer (2 mm), ED amperometrischer Zelle mit 0,25 µl Volumen, pH-Ag / AgCl Referenzelektrode, 0,05 mm (0,002 in) Dichtbeilage (*gasket*) und austauschbarer Goldelektrode.

Die Säule wurde auf 30 °C temperiert, das aufgetragene Probenvolumen betrug 25 µl und die Flussrate 1 ml/min. Proben, sowie auch die Standards mit definierten Konzentrationen (200 mg/l; 100 mg/l; 50 mg/l; 25 mg/l; 12,5 mg/l; 6,125 mg/l), wurden jeweils 1:10 in die Probenvials zu einem Endvolumen von 500 µl verdünnt. Zwischen zwei Proben wurde der Injektor mit ddH₂O aus einem Waschvial

(800 µl) gespült. Je nach erwarteten Analyten in den Proben wurden unterschiedliche Gradienten zur Elution verwendet (Tabelle 2.5.5).

Tabelle 2.5.5 HPAEC-PAEC Gradienten in Chromeleon 7.

Gradient 1 (87,5 min)		Gradient 2 (45 min)		Gradient 3 (50 min)		Gradient 4 (50 min)		Gradient 5 (80 min)		
Zeit (min)	mM NaOAc	Zeit (min)	mM NaOAc	Zeit (min)	mM NaOAc	Zeit (min)	mM NaOAc	Zeit (min)	mM NaOAc	mM NaOH
-2,3	0	-2,3	0	-2,3	0	-2,3	0	-2,3	0	20
0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	20
67,5	100	10	100	30	300	30	200	12,5	0	20
67,501	100	30	800	40	800	40	800	15	0	100
69,0	650	30,001	0	40,001	0	40,001	0	17,5	10	100
73,0	650	45	0	50	0	50	0	52	150	100
73,5	0							55	600	100
87,5	0							60	600	100
								62	0	100
								68	0	100
								71	0	20
								80	0	20

Wenn nicht anders angegeben betrug die NaOH Konzentration 0,1 M. Die Konzentrationsunterschiede zwischen zwei Zeitpunkten wurden jeweils durch einen linearen Gradienten erreicht.

2.5.12 Kristallstrukturanalyse

Für die Aufklärung der 3D-Struktur von Proteinen mittels Strahlenablenkung ist es nötig, Kristalle zu produzieren. Das bedeutet, die Proteine müssen sich, anstatt beim Ausfällen komplett zu entfalten und Aggregate zu bilden, strukturiert und in einem sich wiederholenden dreidimensionalen Muster anordnen. Um die Löslichkeit des Proteins zu erniedrigen, werden mehrere Ansätze kombiniert. Zum einen werden Proteinlösungen von hoher Konzentration eingesetzt; zudem werden Antisolventien (Präzipitanten) zugesetzt; und schließlich wird der Lösung durch Gasphasendiffusion langsam Wasser entzogen, wodurch sich die Konzentration langsam erhöht. Dafür eignen sich verschiedene Methoden, die entweder „hängende“ (*hanging drops*), oder „sitzende“ Tropfen (*sitting drops*) der Proteinlösung verwenden.

Durch Verwendung von Ultrafiltration wurden die Proteinlösungen konzentriert und mittels PD10-Entsalzungssäulen in „Kristallisationspuffer“ (20 mM MOPS, 150 mM NaCl, teils mit 5-10 % Glycerol, pH 7) transferiert und wenn nötig weiter konzentriert. Die Endkonzentrationen betragen zwischen 20 mg/ml und 40 mg/ml. Um verschiedene Präzipitanten in Kombination mit unterschiedlichen Puffersubstanzen und Additiven gleichzeitig zu testen, wurden spezielle Kristallisationslösungen verwendet (Tabelle 2.5.6).

Die Ansätze wurden am Lehrstuhl für Biochemie, Fakultät für Chemie, Technische Universität München in Garching von Astrid König unter Leitung von Professor Groll durchgeführt. Dabei wurden 0,2 µl, oder 0,3 µl Proteinlösung mit 0,2 µl, oder 0,1 µl der jeweiligen Pufferlösung in 96-Well-Mikrotiterplatten

gemischt und in der *sitting drop* Methode bei 4 °C, oder 20 °C inkubiert. Zur Vorbereitung auf die Messung wurden die Kristalle 30 Sekunden lang in eine Mischung aus Puffer und Glycerin (5:1, v/v) gegeben und in flüssigem Stickstoff konserviert. Ein nativer Beugungsdatensatz wurde mit Synchrotronstrahlung an der X06SA-Beamline, SLS, Schweiz, aufgenommen.

Die Interpretation des Diffraktionsmusters und Berechnung der Koordinaten wurde von Professor Groll durchgeführt. Die Reflexionsintensitäten wurden mit dem Programmpaket XDS ausgewertet und die Datenreduktion mit XSCALE (Kabsch 2010) durchgeführt (*supplementary Table S 4* Baudrexl et al. (2022)). Die Ausgangsphasen wurden durch *Patterson search calculations* mit PHASER (McCoy et al. 2007) unter Verwendung eines von *alphafold2* (Jumper et al. 2021) vorhergesagten Ausgangsmodells ermittelt. Sechs Monomere wurden in der asymmetrischen Einheit positioniert. Die Phasen wurden durch zyklische nichtkristallografische Mittelungsmethoden verbessert, was zu einer Elektronendichtekarte führte, die es ermöglichte, falsch ausgerichtete Sekundärstrukturelemente und Schleifenregionen zu korrigieren.

Die Struktur wurde in aufeinanderfolgenden Modellierungsrunden mit COOT (Emsley und Cowtan 2004) fertig gestellt und mit REFMAC5 (Vagin et al. 2004) verfeinert. Die Wassermoleküle wurden mit *ARP/wARP solvent* (Perrakis et al. 1997) platziert. Die ermittelte Kristallstruktur mit optimalen kristallographischen Werten ($R_{\text{crys}} = 0,128$ und $R_{\text{free}} = 0,153$) erfüllt nachweislich den Ramachandran-Plot (*supplementary Table* in Baudrexl et al. (2022)) und wurde mit MolProbity (Williams et al. 2018) ausgewertet. Interaktionsschnittstellen wurden mit PISA (*Protein interfaces, surfaces and assemblies service at the European Bioinformatics Institute*) berechnet (Krissinel und Henrick 2005). Koordinaten und Strukturfaktor-Amplituden wurden in der RCSB Protein Data Bank (PDB) hinterlegt.

Tabelle 2.5.6 Verwendete Kristallisationslösungs-Kits

interne Platten-Nummer	Bezeichnung
3	Classics Suite Refill-Hit Solutions (4x 12,5 ml tubes)
4	Classics II Suite Refill-Hit Solutions (4x 12,5 ml tubes)
8	PEGs Suite
9	PEGs II Suite

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl der zu charakterisierenden putativen Glykosidhydrolasen

Die Vielzahl an Gen- und Proteinsequenzen in Datenbanken und die Unterschiedlichkeit der Substratspezifitäten ähnlicher Sequenzen macht die experimentelle Verifizierung beziehungsweise die Bestimmung der tatsächlichen Aktivität unumgänglich; auch wenn die Funktion bereits bioinformatisch von Homologen abgeleitet wurde und deshalb von einer bestimmten Funktion ausgegangen werden kann (Helbert et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Gene für die heterologe Expression, mit C-terminalem His₆-tag, in *E. coli* und damit zur Charakterisierung bisher unbekannter Leserahmen ausgewählt (Tabelle 3.1.1). Da in einer früheren Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München Bröker (2019) bereits eine Rhamnosidase Aktivität für *Ts_Ram106B* (dort als RamB bezeichnet) gezeigt hatte, wurden insgesamt acht Proteine mit ähnlicher Primärstruktur zur experimentellen Untersuchung ausgewählt. Orthologe behalten im Laufe der Evolution ihre Funktion normalerweise bei (Wang et al. 2018) und unterschiedliche Ursprünge der Proteine erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Produktion durch *E. coli*. Deshalb wurden jeweils ein Enzym aus *Thermotoga martima* (*Tm_Ram106B*) und *Thermotoga neapolitana* (*Tn_Ram106B*) und jeweils drei aus *Thermoclostridium stercorarium* (*Ts_Ram106B* und *Cst_c20590* und *Ts_ArfD*) und *Caldicellulosiruptor bescii* (*Cb_Ram106B*, *Athe_2094* und *Athe_2076*) gewählt (Tabelle 3.1.1). Das Enzym *Ts_ArfD* aus *T. stercorarium* zeigte in einer früheren Studie bereits geringe *pNP*- α -L-Arabinosidase Aktivität, weshalb der Name ArfD übernommen wurde (Broeker et al. 2018).

Neben diesen acht Orthologen (einschließlich *Ts_Ram106B*) wurden drei „hypothetische Proteine“ aus GHnc von drei verschiedenen *Caldicellulosiruptor* Stämmen gewählt, da sie laut dbCAN-Annotation Ähnlichkeiten zu GH43, GH32 und GH130 zeigten, jedoch in keine der charakterisierten CAZy Familien eingegliedert werden konnten. Im Laufe dieser Arbeit wurden sie der GH159 zugewiesen und nach ihrer Aktivitätsaufklärung wurden sie *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* benannt.

Außerdem wurden drei als „putative Glykosidasen“ bezeichneten Proteine aus thermophilen Bakterien in Tabelle 3.1.1 (*Tm_Gly*, *Tn_Gly* und *Tt_Gly*) ausgewählt. Die Auswahl erfolgte durch Homologievergleich mit *Tm_Gly*, das in CAZy unter GHnc gelistet ist, und laut NCBI Annotation ein „PH1107-related protein“ mit der *domain of unknown function 377* (DUF377) ist.

Außerdem wurden zwei Proteine (*Me_Xyl*, *Bv_Xyl*) mit Ähnlichkeit zu einem Enzym in GHnc von *Rhizobium etli* (*Re_Xyl*) ausgewählt, deren nächste Homologe durch BLASTp als β -Xylosidasen annotiert werden. Die Suche nach konservierten Domänen resultiert für alle drei Enzyme in der

Glyco_hydro superfamily (cl23725), sowie dem nicht spezifischen Treffer XynB (COG3664; β -Xylosidase [Carbohydrate transport and metabolism]).

Neben den 17 bisher genannten Enzymen, deren Aktivität noch unbekannt war, sollte noch die multimodulare Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase (Axx) von *T. stercorarium*, die laut Mechelke (2018) und Bröker (2019) Axx-md2,3 Aktivität gegenüber AX und AXOS zeigt, auf die Spezifitäten seiner einzelnen Domänen, bzw. Module hin untersucht werden. In Tabelle 7.2.1 im Anhang finden sich die jeweiligen durch BLASTp ermittelten Ähnlichkeiten zwischen den ausgewählten Proteinen.

Tabelle 3.1.1 Zur Charakterisierung ausgewählte Proteine.

Proteinname in der vorliegenden Arbeit	Organismus	Genbank Nr.	Locus Tag	Uniprot Nr.	GO Funktion UniProt
ursprünglich GHnc, aktuell in GH106, Rhamnosidasen					
Ts_Ram106B	<i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM 5832	AGC67072.1	Cst_c00400	L7VK28	keine
	<i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM 5832	AGC69032.1 (AGI40007.1)	Cst_c20590	L7VQE8	H
Ts_ArfD	<i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM 5832	AGC69275.1	Cst_c23150	L7VM36	keine
Tm_Ram106B	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	AGL50002.1	Tmari_1078	R4P072	keine
Tn_Ram106B	<i>Thermotoga neapolitana</i> Z2706-MC24	QPI34914.1, ACM23671.1*	CTN_1495*	B9K9N8*	H
Cb_Ram106B	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	ACM61646.1	Athe_2581	B9MP87	keine
„8445“	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	ACM61171.1	Athe_2094	B9MLU8	H
„8430“	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	ACM61153.1	Athe_2076	B9MLG3	H
ursprünglich GHnc, aktuell in GH159, Galaktofuranosidasen					
Cs_Gaf159A	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	ABP66075.1	Csac_0437	A4XGPO	H
Ch_Gaf159A	<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> 108	ADQ06027.1	Calhy_0274	E4QB49	H
Ck_Gaf159A	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> 2002	ADQ45201.1	Calkro_0290	E4SDK8	H
putative Glykosidasen					
Tm_Gly	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	AGL49708.1	Tmari_0783	R4P1G4	T und H

Ergebnisse

Proteinname in der vorliegenden Arbeit	Organismus	Genbank Nr.	Locus Tag	Uniprot Nr.	GO Funktion UniProt
<i>Tn_Gly</i>	<i>Thermotoga neapolitana</i> Z2706-MC24	ACM23973.1*	CTN_1797*	B9KAJ0*	T und H
<i>Tt_Gly</i>	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	AAS80484.1	TT_C0136	Q72LC3	T

putative Xylosidase

<i>Re_Xyl</i>	<i>Rhizobium etli</i> CFN42	ABC91511.1	RHE_CH02741	Q2K6M5	keine
<i>Me_Xyl</i>	<i>Methyloburum extorquens</i> DSM 1337	SOR26692.1, WP_056500757.1	TK0001_0090, TK0001_RS00350	A0A2N9AHN0	keine
<i>Bv_Xyl</i>	<i>Bradyrhizobium vignae</i> LMG 28791	RXH01209.1	EAV90_18095	A0A2U3Q4F0	keine

multimodulare GH43 Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase

<i>Ts_Axh43A</i>	<i>Thermoclostridium stercorarium</i> DSM 5832	AGC67716.1	Cst_c07100	L7VMM8	H
------------------	--	------------	------------	--------	---

Die jeweiligen Proteinnamen wurden während der Arbeit an die Aktivität und die aktueller CAZy Familienzugehörigkeit angepasst, Ts_ArFD wurde von Bröker 2019 publiziert. Die in dieser Arbeit auf Aktivitätslevel charakterisierten Enzyme sind fett markiert. *Kennzeichen für *Thermotoga neapolitana* DSM 4359/ ATCC 49049, auf das die Primer designiert wurden. GO = Gene Ontology, H = Hydrolase Aktivität, T = Transferase

3.2 Klonierung von Glykosidhydrolasen, Mutanten und ausgewählten Modulen in pET24c

Die Expressionsvektoren für alle in Tabelle 3.1.1 gelisteten Enzyme von *T. stercorarium* wurden bereits von Bröker (2019) konstruiert. Auch alle anderen ausgewählten Gene sollten in pET24c kloniert werden.

Die für den ersten Schritt benötigten Genfragmente, mit zum vorbereiteten pET24c komplementären Einzelstrangüberhängen, konnten für fast alle Gene spezifisch aus zuvor präparierter gDNA amplifiziert werden. Für *Bv_xynB* musste hierfür die Anlagerungstemperatur mittels Gradienten-PCR auf 67,7 °C angepasst werden. Die PCR für *Re_xynB* resultierte in zwei unterschiedlich großen Fragmenten, weshalb die Bande mit passender Größe über Agarosegelelektrophorese gereinigt wurde. Mit allen anderen spezifischen Amplifikaten erfolgte die Reinigung direkt über ein PCR-Reinigungskit. Die anschließende Assemblierung mit dem mit NdeI und XhoI geschnittenen pET24c-Vektor wurden nach Transformation von *E. coli* DH10b oder TOP10 Zellen durch Plasmidisolierung und Restriktionsverdau überprüft (beispielhaft in Abbildung 7.2.1 für die *Caldicellulosiruptor*-Gene *ramB*, *Athe_2094* und *Athe_2076* gezeigt). Durch Sequenzierung wurden die erwarteten Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäureabfolgen verifiziert, sowie für *Tn_Ram106B* und von *Tn_Gly* neu bestimmt, da das Genom des verwendeten Stammes *Thermotoga neapolitana* Z2706-MC24 noch nicht sequenziert wurde. Die

Sequenz des kompletten Plasmides pET24c-Tne_ *ramB* ist in NCBI unter MT031856 hinterlegt worden, wobei die Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins mit His₆-Tag unter QPI34914.1 zu finden ist. Die translatierte Sequenz der möglichen Glykosidase Tn_ *gly377* ist im Anhang 7.1 zu finden. Ein Alignment zeigt die Unterschiede zur Sequenz des homologen Proteins aus *Thermotoga neapolitana* DSM 4359, von dessen Gensequenz ursprünglich die PCR-Primer abgeleitet worden waren. Die Translation der Sequenz zeigt, dass das dreizehnte Codon ein Stopp codiert und dann erst die eigentlich proteincodierende Sequenz folgt.

Zusätzlich zum Vektor pET-ChGaf159A, der für die Wildtyp-Aminosäuresequenz von *Ch_Gaf159A* codiert, wurden in denselben durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.3.5) jeweils die Punktmutationen A5126C, A5495C, A5639C, G5638C und G5800C eingebracht, um die fünf Mutanten D19A, D142A, E190A, E190Q und H244N von *Ch_Gaf159A* produzieren zu können. Die Überlegungen zur Wahl der jeweiligen Mutationen ist in den Abschnitten 3.6.5 und 3.6.7 näher erläutert.

Nach dem in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Schema wurden zusätzlich die Plasmide für folgende Modul-Varianten von *Ts_Axh43A* (bestehend aus GH43_10 - GH43_C2 - GH43_16 - CBM6 = c1 - link - c2 – cbm = c1linkc2cbm) erstellt: c1, c1link, c1linkcbm, c2, c2link, c2cbm, c1linkc2.

3.3 Produktion von löslichen Glykosidhydrolasen

Die meisten in Tabelle 3.3.1 aufgelisteten Proteine und deren Varianten konnten in löslicher Form produziert werden. Die jeweiligen Expressionsstämme, die Imidazolkonzentration im Aufschlusspuffer und die Methode zur Reinigung der Proteine sind im Anhang in Tabelle 7.3.2 gelistet.

Tabelle 3.3.1 Produzierte Enzyme und Enzymvarianten dieser Arbeit; Proteinamen, GH-Familien-Zugehörigkeit in CAZy

Name	GH-Familie	HMMER von dbCAN	Genbank Nummer	AS	MG
<i>Ts_Ram106B</i>	GHnc/ GH106	GH106(13-745)	AGC67072.1	1046	121,3
<i>Cst_c20590</i>	GHnc/ GH106	GH106(30-562)	AGC69032.1	853	97,1
<i>Ts_ArfD</i> ; <i>Cst_c23150</i>	GHnc/ GH106	kein Ergebnis	AGC69275.1	857	98,8
<i>Tm_Ram106B</i>	GHnc/ GH106	GH106(6-516)	AGL50002.1	992	116,6
<i>Tn_Ram106B</i>	nicht in CAZy	GH106(6-534)	QPI34914.1	989	115,8
<i>Cb_Ram106B</i>	GHnc/ GH106	GH106(6-663)	ACM61646.1	1002	116,0
„8445“/ <i>Athe_2094</i>	GHnc/ GH106	GH106(15-841)	ACM61171.1	850	99,4
„8430“/ <i>Athe_2076</i>	GHnc/ GH106	GH106(6-757)	ACM61153.1	1046	122,3
<i>Cs_Gaf159A</i>	GHnc/ GH159	GH159(9-226)	ABP66075.1	318	37,6
<i>Ch_Gaf159A</i>	GHnc/ GH159	GH159(9-225)	ADQ06027.1	318	37,6
Mut I: D19A				318	
Mut II: D142A				318	

Ergebnisse

Name	GH-Familie	HMMER von dbCAN	Genbank Nummer	AS	MG
Mut III: E190A				318	
Mut IV: E190Q				318	
Mut V: H244N				318	
<i>Ck_Gaf159A</i>	GHnc/ GH159	GH159(9-226)	ADQ45201.1	318	37,8
<i>Tm_Gly</i>	GHnc/ GH130	GH130(45-330)	AGL49708.1	340	39,1
<i>Tn_Gly</i>	nicht in CAZy/ GH130	GH130(58-344)	ACM23973.1	354	40,7
<i>Tt_Gly</i>	nicht in CAZy/ GH130	GH130(50-347)	AAS80484.1	357	40,0
<i>Re_Xyl</i>	GHnc/ nicht mehr in CAZy	N	ABC91511.1	330	38,1
<i>Me_Xyl</i>	nicht in CAZy	N	WP_056500757.1	318	37,0
<i>Bv_Xyl</i>	nicht in CAZy	N	RXH01209.1	321	36,6
<i>Ts_Axh43A</i>	GH43_10, GH43_16, CBM6	GH43_10 (55-320)+ GH43_16 (761- 1072)+ CBM6 (1093- 1220)	AGC67716.1	1203	134,7
c1	GH43_10			279	32,1
c1link	GH43_10			713	80,9
c1linkcbm	GH43_10, CBM6			845	95,3
c2	GH43_16			323	35,6
c2link	GH43_16			757	84,3
c2cbm	GH43_16, CBM6			469	51,5
c1linkc2	GH43_10, GH43_16			1029	115,5

(Beginn der Arbeit 2018/Stand Dezember 2022) und durch HMMER von dbCAN annotiert, in Klammern sind die Bereiche in Aminosäure-Positionen angegeben; Genbank Nummern, Anzahl der Aminosäuren mit Histidin-Tag, MG: Molekulargewicht in kDa

Die erfolgreiche Expression löslicher Proteine und die Reinigung derselben erfolgte teils erst nach mehreren Versuchen in unterschiedlichen Expressionsstämmen und unter Verwendung verschiedener Methoden (siehe Tabelle 7.3.2. im Anhang). Allgemein wurde zunächst jeweils *E. coli* BL21 Zellen mit den entsprechenden, rekombinanten Expressionsplasmiden transformiert. Erst wurde meist eine Proteinexpression im Pilotmaßstab in 20 ml Kulturen durchgeführt. Konnte Protein im geklärten Überstand nach dem Zellaufschluss detektiert werden (entweder als eindeutige Bande im SDS-PAGE-Gel im Vergleich zum Zellextrakt von mit Leervektorkontrolle transformierten Zellen, oder durch Westernblot-Analyse), wurde das Kulturvolumen auf 200 ml erhöht, um ausreichende Mengen an gewünschtem Protein zu produzieren. Bei nicht ausreichender Löslichkeit wurden *E. coli* Arctic Express Zellen zur heterologen Expression verwendet, um die Expressionstemperatur senken zu können und durch die gleichzeitig produzierten kältetoleranten Faltungshelfer (Chaperonine) die Löslichkeit zu

erhöhen. Die Reinigung erfolgte entweder über HisTrap 5 ml FF-Säulen, für deren Verwendung eine FPLC Chromatographie-anlage und Gradientenelution zur Trennung von anderen an die Säule bindenden Proteinen eingesetzt wurde, oder über allein durch Schwerkraft beschickte Ni-TED-Säulen mit einer geringeren Kapazität, bei denen gebundenes Protein nur manuell und deshalb nur durch eine Stufen-Elution gelöst werden konnte. Der Zellaufschluss erfolgte zunächst immer in Wasch-Lyse-Puffer (W-L-P) mit 20 mM Imidazol, um unspezifische Bindung an die Säule möglichst gering zu halten. Fand sich das Protein nach der Reinigung im Durchfluss der Chromatographie, so wurde es erneut produziert. Für den Zellaufschluss wurde dann ein W-L-P ohne Imidazol, oder der bei den Ni-TED-Säulen mitgelieferte LEW-Puffer, der auch kein Imidazol enthält, verwendet. Im Folgenden sind die verschiedenen Bedingungen zusammengefasst, die zur Produktion und Reinigung der einzelnen Enzyme verwendet wurden. Genannt sind das Kulturvolumen, der benutzte *E. coli* Stamm, der Puffer mit oder ohne 20 mM Imidazol für den Zellaufschluss und wenn zutreffend die Säule, oder die Art des Reinigungsprozesses:

- Standardbedingungen = **200 ml**, *E. coli* **BL21**, **W-L-P** mit **20 mM Imidazol**, **His-Trap** 5 ml FF-Säulen: *Tm_gly*, *Tn_gly* (nicht reproduzierbar), *Tt_gly*, *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B*, *Ts_Ram106B*, *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* waren löslich produzierbar und gereinigt in den Elutionsfraktionen zu finden (Abbildung 7.2.2). Auch alle Mutanten von *Ch_Gaf159A* und Varianten von *Ts_Axh43A* konnten so hergestellt werden. (Abbildung 7.2.3). *Re_Xyl* und *Bv_Xyl* dagegen waren nicht löslich und deshalb nur im Pellet sichtbar (Abbildung 7.2.2).
- **20 ml**, *E. coli* **Arctic Express**, **W-L-P ohne Imidazol**, Zellextrakt nur nach **Hitzebehandlung** geklärt: *Tm_gly*, *Tt_gly*, *Re_Xyl* konnten zwar nicht auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel, aber durch Westernblot nachgewiesen werden. *Tn_gly* wurde jedoch nicht detektiert. (Abbildung 7.2.4)
- **200 ml**, *E. coli* **Arctic Express**, **W-L-P ohne Imidazol**, Affinitäts-Reinigung über **Ni-TED**-Säulen: Das SDS-PAGE-Gel zeigte Banden für die Molekulargewichte von *Tm_gly*, *Tt_gly* und *Re_Xyl*, jedoch jeweils mit einer zusätzlichen Bande, die auf das Chaperonin Cpn60 zurückzuführen war. *Tn_gly* konnte, wie zuvor in kleinem Maßstab, nicht produziert werden. (Abbildung 7.2.5)
- **200 ml** *E. coli* **Arctic Express**, **W-L-P** mit **20 mM Imidazol**, **His-Trap** 5ml FF: *Re_Xyl* und *Me_Xyl* konnten löslich produziert und von der Chaperonin-Bande getrennt werden. *Bv_Xyl* hingegen war unlöslich und nur im Pellet sichtbar. (Abbildung 7.2.6)
- **200 ml**, *E. coli* **BL21**, **LEW-Puffer**, **Ni-TED**: *Me_Xyl* konnte auch direkt in *E. coli* BL21 ohne Chaperonin produziert und so schneller gereinigt werden. (Abbildung 7.2.7)

Nicht reproduzierbar in BL21 produzierbar war die putative Glykosidase *Tn_Gly*, die nur einmal in geringen Mengen löslich gereinigt werden konnte (Abbildung 7.2.2). Dies kann jedoch durch Sequenzierung des verwendeten Plasmids erklärt werden, da sich wie zuvor beschrieben ein Stopp-

Codon unweit des Start-Codons befindet. Da jedoch zu wenig von der genomischen DNA von *Thermotoga neapolitana* Z2706-MC24 für eine Sequenzierung zur Verfügung stand und dieser Stamm nicht mehr zur Verfügung stand, wurde nicht überprüft, ob die Mutation erst bei der Klonierung, oder schon im ursprünglichen Stamm auftrat. Die putative Xylosidase *Bv_Xyl* konnte nur unlöslich in *E. coli* BL21 (Abbildung 7.2.2) sowie Arctic Express Zellen (Abbildung 7.2.6) produziert werden. Dagegen konnte *Me_Xyl* löslich sowohl in BL21 produziert werden und ohne Imidazol im W.-L.-P. über Ni-TED-Säulen gereinigt werden, als auch in Arctic Express Zellen produziert und mit 20 mM Imidazol im W-L-P über HisTrap-Säulen gereinigt werden.

3.4 Screening nach Glykosidhydrolaseaktivitäten

Eine Möglichkeit, um unterschiedliche Glykosidaseaktivitäten aufzudecken, ist die Inkubation mit verschiedenen Modellsubstraten, z.B. *para*-Nitrophenyl-Glykosiden, deren Spaltung zu einer gelben Färbung unter alkalischen Bedingungen führt. Eine weitere Möglichkeit ist die Inkubation von Enzymproben mit gelösten Polysacchariden und die anschließende Produktanalyse, um von den abgespaltenen Sacchariden auf die Aktivität rückschließen zu können.

Zunächst wurde ein Screening von Überständen von hitzebehandelten Zellextrakten von BL21-Kulturen, die erfolgreich *Cb_Ram106B* (ACM61646.1), *Cst_c20590* (AGC69032.1=AGI40007.1) und *ArfD/Cst_c23150* produzierten, durchgeführt. Die Behandlung erfolgte bei 50 °C und 60 °C mit *pNP- α -L-Arabinofuranosid* (*pNP- α -L-Araf*, *pNPA*), *pNP- α -L-Fucopyranosid* (*pNP- α -L-Fucp*), *pNP- β -L-Fucopyranosid* (*pNP- β -L-Fucp*), *pNP- β -D-Glukopyranosid* (*pNP- β -D-Glup*), *pNP- β -D-Galaktopyranosid* (*pNP- β -D-Galp*), *pNP- β -D-Mannopyranosid* (*pNP- β -D-Manp*), *pNP- α -D-Xylopyranosid* (*pNP- β -D-Xylp*) und *pNP- α -L-Rhamnopyranosid* (*pNP- α -L-Rhap*, *pNPR*). Von den drei Überständen zeigte nur *Cb_Ram106B* Aktivität gegenüber *pNP- α -L-Rhamnopyranosid* und zwar bei beiden Temperaturen. Auch die gereinigten GH106 Proteine von *T. maritima* und *T. neapolitana* zeigten α -L-Rhamnosidaseaktivität, weshalb *Tm_Ram106B* und *Tn_Ram106B* zusammen mit den zwei anderen aktiven Enzymen *Ts_Ram106B* und *Cb_Ram106B* als Rhamnosidasen charakterisiert wurden (Baudrexel et al. 2019). Die Ergebnisse der Charakterisierung sind in Abschnitt 3.5 detaillierter dargestellt.

Tarik Fida führte mit den drei Enzymen ABP666075.1, ADQ06027.1 und ADQ45201.1 von *C. saccharolyticus*, *C. hydrothermalis* und *C. kronostkyensis*, die zu Beginn der hier vorliegenden Studien noch in keine GH-Familie eingeordnet waren, ein Screening durch. Als Substrate wurden die verschiedenen *pNP*-Glykoside *pNP- α -L-Araf* (*pNPA*), *pNP- α -L-Fucp*, *pNP- β -L-Fucp*, *pNP- α -D-Galp*, *pNP- β -D-Glup*, *pNP- α -D-GluUA*, *pNP- β -D-Manp*, *pNP- α -L-Rhap*, *pNP- β -D-Xylp* und *pNP- β -D-Xylobiosid* verwendet. Hierbei konnte nur Aktivität gegenüber *pNPA* festgestellt werden (Fida 2018). Deshalb sollten die Enzyme als Arabinofuranosidasen (EC 3.2.1.55) charakterisiert werden. Im Verlauf der

Arbeit zeigte sich jedoch zusätzlich eine Galaktofuranosidaseaktivität (EC 3.2.1.146). Die Charakterisierung der drei *Caldicellulosiruptor*-Enzyme und die Aufklärung der 3D-Struktur von einem der GH159-Enzyme wurde bereits zu einem großen Teil publiziert (Baudrexl et al. 2022) und wird in Kapitel 3.6 näher erläutert.

Für die erfolgreich rekombinant produzierten putativen Glykosidasen *Tm_Gly*, *Tt_Gly* sowie *Re_Xyl* und *Me_Xyl* gab es bisher nur auf Grundlage bioinformatischer Sequenzvergleiche nur den Hinweis auf die Zugehörigkeit zu einer Superfamilie, bzw. nur die relativ unspezifische Verknüpfung (aufgrund von *conserved domains* in NCBI-Datenbank) mit der XynB Superfamilie und die automatische Annotation als β -Xylosidase für *Re_Xyl*. Um eine mögliche Aktivität zu detektieren, wurden *Tm_Gly*, *Tt_Gly*, sowie *Re_Xyl* und *Me_Xyl* (oder zentrifugierte Zellextraktüberstände, die die jeweiligen Enzyme enthielten) jeweils mit möglichst vielen unterschiedlichen Substraten inkubiert und die Spaltung dieser Substrate analysiert.

3.4.1 Screening von *Tm_Gly*, *Tt_Gly* und *Re_Xyl* produzierenden *E. coli* BL21 Überständen gegenüber verschiedenen Polysacchariden

Ein Screening wurde mit Überständen nach Hitzebehandlung von Zellextrakten von *E. coli* Arctic Express und 26 verschiedenen Substraten durchgeführt (Tabelle 3.4.1). Aufgrund der großen Anzahl an Reaktionen und da es sich nur um ein erstes Screening handelte, wurden keine Replikate durchgeführt. Das Vorhandensein der Enzyme *Re_Xyl*, *Tm_Gly*, oder *Tt_Gly* im Überstand wurde jeweils mittels Westernblot verifiziert (Ü in Abbildung 7.2.4). Die Reaktionstemperaturen wurden je nach Enzym an die Wachstumstemperatur des Ursprungsorganismus angepasst (Tabelle 3.4.1). Die gleichbehandelten Extrakte von pET24c-enthaltenen Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle. Die durch die Negativkontrolle korrigierten Konzentrationen der mit DNSA-Assay detektierten reduzierenden Glukoseäquivalente sind in Tabelle 3.4.1 gelistet.

Re_Xyl und *Tm_Gly* zeigten unter den gewählten Bedingungen keine detektierbare Aktivität gegenüber den gewählten Substraten. Da diverse Homo- und Heteropolysaccharidsubstrate mit unterschiedlichen Zuckern im Rückgrat abgedeckt wurden, ist eine endolytische Aktivität eher unwahrscheinlich.

Ergebnisse

Tabelle 3.4.1 Saccharide, ihre Monosaccharide und Bindungstypen für das Screening von *Re_Xyl*, *Tm_Gly* und *Tt_Gly*.

	Bindungen und Monosaccharidanteile laut Datenblatt des Herstellers, oder angegebener Referenz	mg/ml Glukose-Äquivalent		
		<i>Re_Xyl</i> 30 °C	<i>Tm_gly</i> 80 °C	<i>Tt_gly</i> 70 °C
Arabinan (Zuckerrübe)	α -(1,5), α -(1,3) Ara (Ara: Gal: Rha: GalUA: Andere = 69: 18,7: 1,4: 10,2: 0,7)	0,0	0,0	0,0
Arabinogalaktan (Lärche)	β -(1,3) Gal, β -(1,6) Gal, α -(1,4,6) Ara (Gal: Ara: Andere = 81: 14: 5)	0,0	0,0	0,0
Arabinoxylan (Weizen)	β -(1,4) Xyl, α -(1,2; 1,3) Ara (Ara: Xyl = 38:62)	0,0	0,0	0,0
β -Glukan (Gerste)	β -(1,3,4) Glu (95 %)	0,0	0,0	0,0
Curdlan	β -(1,3) Glu (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	0,0	0,0	0,0
Galaktan (Kartoffel)	β -(1,4) Gal (Gal: Ara: Rha: GalUA = 87: 3: 4: 6)	0,0	0,0	0,0
Galaktan (Lupine)	β -(1,4) Gal (Gal: Ara: Rha: Xyl: GalUA = 88: 5: 1: 1: 5)	0,0	0,0	0,0
pektisches Galaktan (Kart.)	β -(1,4) Gal (Gal: Ara: Rha: GalUA: Andere = 74: 0,1: 11,4: 10: 4,5)	0,0	0,0	0,1
pektisches Galaktan (Lupine)	β -(1,4) Gal (Gal: Ara: Rha: Xyl: GalUA= 74: 17: 3: 1: 5)	0,0	0,0	0,0
Galaktomannan (Guarbohne)	β -(1,4) Man, α -(1,6) Gal (Man: Gal = 62: 38)	0,0	0,0	0,1
Glukomannan (Konjak)	β -(1,4) Man, Glu (Man: Glu = 60: 40)	0,0	0,0	0,2
Gummi Arabicum (Akazie)	β -(1,3) Gal (Ara: Gal: Rha: GluUA \approx 3: 3: 1: 1 nach Pragnesh (2018); Beschreibung der Bindung durch Ali et al. (2009)	0,0	0,0	0,0
Inulin (Dahlienknolle)	β -(2,1) Fru (ca. 38 Reste + 1 Glu)	0,0	0,0	0,1
Laminarin	β -(1,3), β -(1,6) Glu, endständiges Mannitol	0,0	0,0	0,8
Lichenin	β -(1,3): β -(1,4) (1: 2) Glu	0,0	0,0	0,1
Mannan	β -(1,4) Man (Man: Gal = 98: 1)	0,0	0,0	0,1
Mannan (Steinnuss)	β -(1,4) Man (99 %)	0,0	0,0	0,0
Methyl-Glukuronoxylan	β -(1,4) Xyl	0,0	0,0	0,0
Pachyman	β -(1,3) Glu (98 %)	0,0	0,0	0,0
Polygalakturonsäure	α -(1,4) GalUA	0,0	0,0	0,0
Pullulan	α -(1,4) Maltotriose (3x α -(1,4) Glu)	0,0	0,0	0,0
Rhamnogalakturonan I	(GalUA: Rha: Ara: Xyl: Gal: Andere = 61: 6,2: 2,5: 0,5: 23,1: 6,7)	-0,1	-0,1	0,0
Sinistrin	β -(1,2), β -(1,6) Fru (3 % Glu)	0,0	0,0	0,0
Xylan (Birke)	β -(1,4) Xyl (90 %)	0,0	0,0	0,0
Xylan (Haferspelzen)	β -(1,4) Xyl	0,0	0,1	0,0
Xyloglukan	β -(1,4) Glu, α -(1,6) Xyl	0,0	0,0	0,0
- H ₂ O Kontrolle		0,0	0,0	0,0

Reaktionen mit 1:10 verdünntem Zellextrakt von den die rekombinanten Enzyme exprimierenden *E. coli* Arctic Express Zellen (siehe SDS-Gele und Westernblots in Abbildung 7.2.4), 0,5 % Substrat und 1x RP (pH 6,5) wurden 18 h bei den jeweiligen Temperaturen (30 °C, 80 °C, oder 70 °C) inkubiert und mit DNSA analysiert. Die freigesetzten reduzierenden Zucker in mg/ml wurden jeweils durch die vom Zellextrakt der Negativkontrolle (Stamm mit Leervektor) freigesetzten Glukose-Äquivalente korrigiert.

Die putative Glykosidase von *Thermus thermophilus Tt_gly* (inkubiert bei 70 °C) bildete beim Screening gegenüber einigen Polysacchariden (Tabelle 3.4.1) nur sehr geringe Mengen an reduzierenden

Zuckern: mit **pektischem Kartoffel-Galaktan** (jedoch nicht mit pektischem Lupinen-Galaktan), Guarbohnen-Galaktomannan, **Inulin** und **Mannan**. Etwas höhere Konzentrationen an reduzierenden Glukoseäquivalenten wurden in absteigender Reihenfolge mit **Laminarin** (0,7 mg/ml), einem Speicherglukan von Braunalgen mit β -1,3-Glu und β -1,6-Glu Bindungen, **Konjak-Glukomannan** (0,15 mg/ml) mit β -1,4-Man und β -1,4-Glu, und **Lichenin** (0,12 mg/ml) mit β -1,3-Glu und β -1,4-Glu gebildet, obwohl keine Aktivität gegenüber den anderen β -Glukanen (1,3;1,4 Gersten- β -Glukan, 1,3 Curdlan, 1,3 Pachyman, 1,4 Xyloglukan) ausgemacht werden konnte. Das deckt sich jedoch mit hohen Substratspezifitäten, die bereits für andere Laminarinasen (EC 3.2.1.39) beschrieben wurden, deren Aktivität gegenüber Gersten-Glukan, Lichenan, Curdlan und Pullulan jeweils nur bis zu höchstens 3,4 % (relativ zur Aktivität an Laminarin) erreichte (Alderkamp et al. 2007).

3.4.2 Screening von *Tm_Gly*, *Tt_Gly*, *Re_Xyl* und *Me_Xyl* gegenüber *pNP*-Glykosiden

Beim Screening von gereinigten Enzymen gegenüber verschiedenen *pNP*-Glykosiden konnte keine Aktivität für *Tm_Gly* (70 °C), *Re_Xyl* (30 °C) oder *Tt_Gly* (70 °C) beobachtet werden (Tabelle 3.4.2). Allein die Reaktionen mit *pNP*- α -D-N-Acetyl-Glukosamin, die bei 70 °C und 80 °C inkubiert wurden, verfärbten sich nach 4 h. In selbem Maße verfärbten sich jedoch die Negativkontrollen ohne Enzym, was auf eine Instabilität dieses Substrats bei höheren Temperaturen schließen ließ. Als Positivkontrolle wurde die Rhamnosidase *Tm_Ram106B* (Kapitel 3.5) verwendet, die, wie erwartet, Aktivität gegenüber *pNP*- α -L-Ram zeigte (Tabelle 3.4.2).

Tabelle 3.4.2 Screening mit *pNP*-Glykosiden und aus *E. coli* AE Zellen gereinigten Enzymen *Re_Xyl*, *Tm_Gly* und *Tt_Gly*.

	korrigierter A405 nm Wert							
	<i>Re_Xyl</i> 30 °C		<i>Tm_Gly</i> 70 °C		<i>Tt_Gly</i> 70 °C		<i>Tm_Ram106B</i> 70 °C	
	MW	St.Abw.	MW	St.Abw.	MW	St.Abw.	MW	St.Abw.
<i>pNP</i> - α -D-Glup	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - β -D-Glup	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02
<i>pNP</i> - α -L-Araf	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02
<i>pNP</i> - α -D-Xylp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - β -D-Xylp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - α -D-Galp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - β -D-Galp	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - α -L-Fucp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - α -Man	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - β -Man	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - α -L-Rhap	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,12	0,03
<i>pNP</i> - β -D-Cellobiosid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>pNP</i> - α -D-N-AcGlu	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	-0,01	0,00
β -D-GluUA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Reaktionen mit 1 mM *pNP*-Glykosid, 0,1 μ g/ μ l Enzym und 1x RP (pH 6,5) wurden jeweils 4 h und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Werte sind um Reaktionen ohne Enzym korrigiert, Mittelwert und Standardabweichung wurden aus Triplikaten berechnet.

Aus BL21 gereinigtes **Me_XylB** wurde mit fast allen *pNP*-Glykosiden in Tabelle 3.4.2 außer *pNP*- β -D-Glucp, aber zusätzlich mit *pNP*- β -D-Xylobiosid, mit einer Enzymkonzentration von 20 ng/ μ l bei 30 °C über die lange Zeit von 72 h, inkubiert, um auch ineffizienten Umsatz zu detektieren. Es zeigte sich jedoch keinerlei Verfärbung. Nur mit *pNP*- β -D-Galp entstanden 2 nmol *pNP* im 50 μ l Ansatz, was vermutlich auf Spuren von β -Galaktosidase des Expressionswirts *E. coli* BL21 Star zurückzuführen ist, da durch eine Stufenelution bei der Reinigung des Enzyms mittels Protino Ni-TED-Kit (ohne Imidazol im Aufschlusspuffer) fast keine Trennung von stark und schwach an die Säule bindenden Proteine erreicht wird.

3.4.3 Enzymatisch vorverdautes Stroh, Arabinoxylan und Xylan als mögliche Substrate für *Tm_Gly*, *Tt_Gly* und *Re_Xyl*

Stroh ist ein sehr robustes Substrat, das in großen Mengen als Nebenprodukt in der Lebensmittelherstellung anfällt und deshalb ein interessantes Substrat für die Verzuckerung zur Herstellung von Biokraftstoff darstellt (Passoth und Sandgren 2019). Deshalb ist es zum einen wünschenswert, Enzyme mit Aktivität gegenüber nahezu unbehandeltem Stroh zu finden, welches aus den drei Polymerbestandteilen Cellulose (35–39 %), Lignin (12–16 %) und Hemicellulose (23–30 %) besteht. Zum anderen wurde versucht, dieses im Vergleich zu den einzelnen Polysacchariden komplexere, native Substrat mit Celluclast vorzuverdauen, um durch den Celluloseabbau die Zugänglichkeit zu vorhandenen Hemicellulosen zu erhöhen. Auch Arabinoxylan (AX) und Xylan sollten durch die Xylanase *Ts_Xyn11A* (Broeker et al. 2018) vorbehandelt werden, um durch die Produktion von Oligosacchariden neue Angriffspunkte für die drei Enzyme zu erzeugen.

Jedoch konnten in den Ansätzen mit *Tm_Gly*, *Tt_Gly*, oder *Re_Xyl* mit vorverdaulichem Stroh, oder Xylan keine zusätzlichen Peaks detektiert werden, die nicht schon durch das vorverdauende Enzym entstanden waren (Abbildung 3.4.1. A und B). Auch mit AX war für *Tt_Gly* und *Re_Xyl* kein Unterschied zu dem Chromatogramm mit AX ohne Enzym feststellbar. Wurde AX mit *Tm_Gly* inkubiert, entstand jedoch ein Glukose-Peak im Kontroll-korrigierten Chromatogramm (markiert in Abbildung 3.4.1 C bei ca. 14 min). Dieser war jedoch schon in der AX Kontrolle („AX + H₂O + H₂O“ in Abbildung 3.4.1 D) vorhanden und der etwas höhere Wert in dem Ansatz mit Enzymen könnte auf eine Schwankung des minimalen Glukosegehalts im AX zurückzuführen sein.

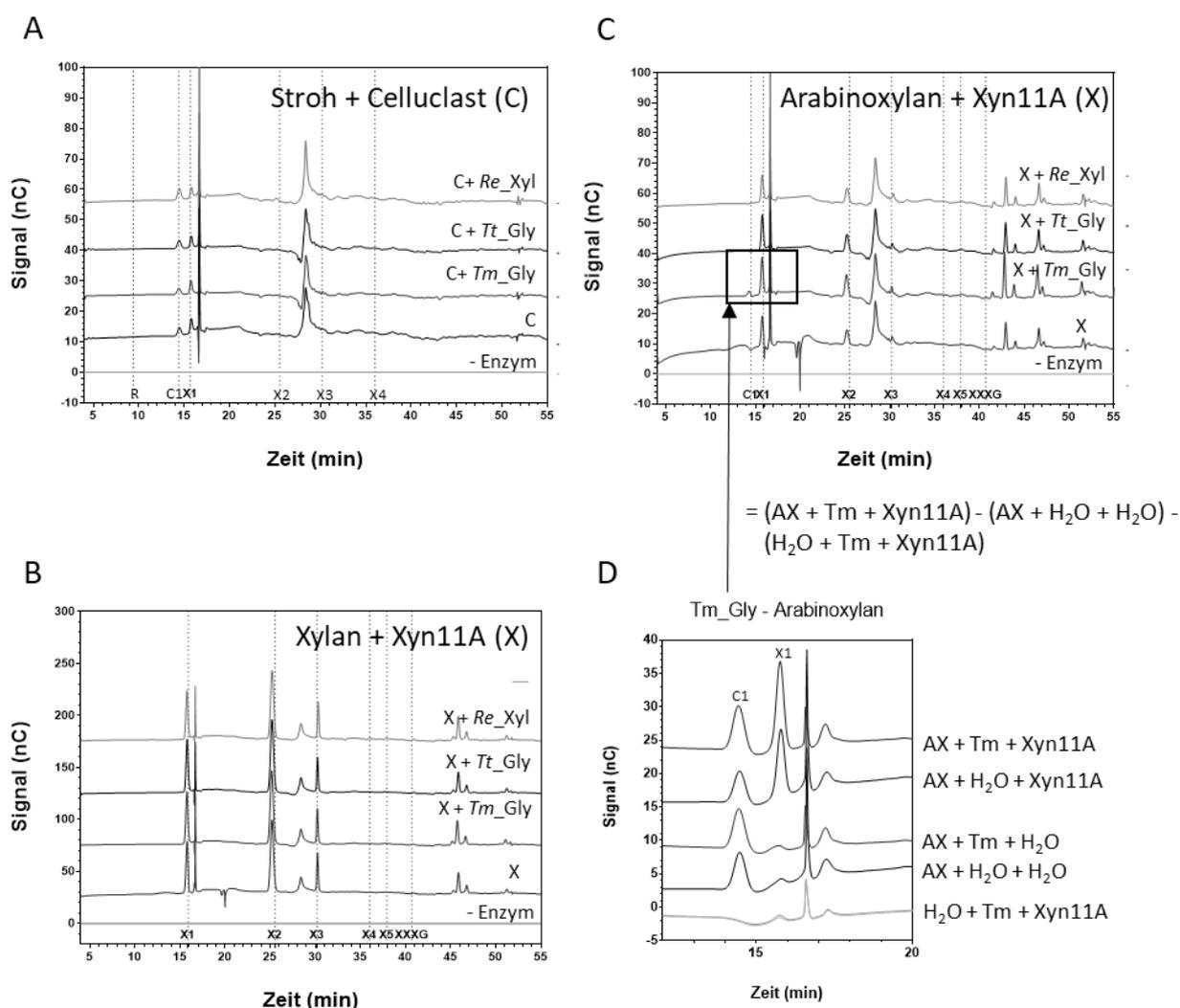


Abbildung 3.4.1 Polysaccharidabbau durch *Tm_Gly*, *Tt_Gly* und *Re_Xyl* in Kombination mit vorverdauenden Enzymen. Reaktionen mit 0,5 % Substrat (Weizenstrohpräparat, Haferspелzen-Xylan, Weizen-Arabinosyloxylan) in 1x RP wurden 24 h mit Celluclast von *Trichoderma reesei* (1,4 U/ml) und einem weiteren Enzym („C + zweites Enzym“), oder Xyn11A (6,6 µg/ml) und einem weiteren Enzym („X + zweites Enzym“) bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe des zweiten Enzyms (Endkonzentrationen: 0,02 µg/µl *Tm_Gly*, 0,22 µg/µl *Tt_Gly*, oder 0,03 µg/µl *Re_Xyl*) wurde 24 h bei 70 °C (*Tm_Gly* und *Tt_Gly*), bzw. bei 30 °C (*Re_Xyl*) inkubiert und die Reaktionen mittels HPAEC-PAD (Gradient 5 in Tabelle 2.5.5) analysiert. Chromatogramme in **A**, **B** und **C** wurden um den Enzymhintergrund und den Substrathintergrund bei den jeweiligen Temperaturen korrigiert. **D** zeigt beispielhaft die Kontrollläufe für das markierte Chromatogramm in **C**. Beschriftung über x-Achse: R=Rhamnose, C1=Glukose, X1–X6=Xylose–Xylohexaose.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit den bisher getesteten Substraten und unter den gewählten Bedingungen – pH 6,5 und als Inkubationstemperatur jeweils das Wachstumsoptimum für den Ursprungstamm – keine hohen oder eindeutigen Aktivitäten festgestellt werden konnten. Eine für *Tt_Gly* mögliche Laminarinaseaktivität (EC 3.2.1.39) wurde bisher nicht bestätigt. Allgemein sollten die Ansätze wiederholt und mittels HPAEC-PAD und passender Kontrollen analysiert werden, wie es bereits für Stroh, Xylan und AX durchgeführt wurde.

3.5 Rhamnosidaseaktivität neuer GH106-Enzyme: *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B, *Ts*_Ram106B

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits zu einem Teil publiziert (Baudrexel et al. 2019).

Broeker et al. (2018) charakterisierte hemicellulolytische GHn aus *Thermoclostridium stercorarium* und beobachtete geringe α -Rhamnosidaseaktivität (Ram, EC 3.2.1.40) für das Enzym *Ts*_Ram106B (AGC67072.1/Cst_c00400; RamB). Zur weiteren Untersuchung dieses Aktivitäts-Befunds wurden zwei sequenzähnliche Enzyme aus dem gleichen Stamm (*Cst_c20590* und ArfD) und fünf weitere Enzyme aus anderen thermophilen Organismen ausgewählt (Tabelle 3.1.1) und heterolog in *E. coli* produziert (Tabelle 7.2.1).

Zwei der drei ausgewählten *C. bescii* Proteine, codiert durch *Athe_2076* (ACM61153.1) und *Athe_2094* (ACM61171.1), konnten nicht löslich produziert werden und wurden daher nicht weiterbearbeitet. *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B zeigten, wie von Baudrexel et al. (2019) beschrieben, neben den erwarteten Proteinbanden (116,6 kDa, 115,8 kDa, 115,9 kDa und 121,3 kDa) für die ersten drei genannten auch Banden im höhermolekularen Bereich (Abbildung 7.2.2, sowie supplementary Figure S3 in Baudrexel et al. (2019)). Auch ArfD, jedoch nicht *Cst_c20590* (AGC69032.1), zeigte diese zusätzlichen womöglich Protein-spezifischen Banden, wie sie auch in der Arbeit von Bröker (2019; dort in Abbildung 6.4; Nr 40 = *Cst_c20590*, Nr. 42 = ArfD) bereits gezeigt wurden. Beim bereits beschriebenen Aktivitätsscreening (Abschnitt 3.4) zeigten nur *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B, und nur gegenüber dem Substrat *pNPR* Aktivität.

3.5.1 Sequenzähnlichkeiten der gewählten GH106-ähnlichen Enzyme mit und ohne Aktivität gegenüber *pNPR*

Um zu überprüfen, ob die gewählten Enzyme eine neue Subfamilie in GH106 bilden, wurden die Sequenzähnlichkeiten analysiert. Die vier aktiven α -Rhamnosidasen zeigen eine Aminosäuresequenzidentität von 27,9 % bis 79,1 % über 95 % bis 99 % der Sequenzen (Anhang: Tabelle 7.2.1). Dabei zeigt *Ts*_Ram106B die geringsten Übereinstimmungen zu den anderen Dreien. *Ts*_Ram106B ist zu 27,9 % sequenzidentisch zu *Cb*_Ram106B aus *Caldicellulosiruptor bescii*, 28,5 % zu *Tm*_Ram106B aus *Thermotoga maritima* und 29,4 % zu *Tn*_Ram106B von *Thermoclostridium neapolitana*. *Tm*_Ram106B stimmt hingegen zu 79,1 % mit *Tn*_Ram106B überein (Baudrexel et al. 2019). Die *T. stercorarium*-Enzyme *Cst_c20590* und *Ts*_ArfD, die keine α -Rhamnosidaseaktivität zeigten, weisen mit 23–29 % ähnlich hohe Sequenzähnlichkeiten wie *Ts*_Ram106 zu den drei anderen Rhamnosidasen (*Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B) auf. Jedoch liegen die Übereinstimmungen nur in 51–62 % (QC-Wert der BLASTp Analyse) der Sequenz. Die anderen zwei Proteine aus *C. bescii*, die nicht produziert werden konnten, zeigten jeweils

Aminosäuresequenzidentitäten von 22–25 % über 54–74 % der Sequenz (*Athe_2094/ACM61171.1*) und Identitätswerte zwischen 25 % und 31 % über 27–90 % der Sequenz (*Athe_2076/ACM61153.1*) zu den vier Rhamnosidasen.

Auf der Basis eines strukturellen Alignments wurde ein phylogenetischer Baum mit allen in dieser Arbeit untersuchten GH106-Enzymen, sowie den bisher charakterisierten Rhamnosidasen aus GH106 und GH78, mit der *Maximum-Likelihood*-Methode (Abbildung 3.5.1) erstellt. Da die CAZy Familieneinteilung auf der gemeinsamen Faltung beruht, wurde das strukturbasierte Alignment mittels Promal3DS gewählt. In phylogenetischen Bäumen können die Längen der horizontalen Linien als Substitutionsereignisse (in diesem Fall Aminosäuresubstitutionen) an bestimmten Stellen in der Sequenz angesehen werden. Ganz vereinfacht bedeutet das: je kürzer die horizontalen Linien zwischen zwei Enzymen sind, desto näher sind sie miteinander verwandt. Der erstellte phylogenetische Baum visualisiert die geringe Distanz zwischen den vier aktiven Rhamnosidasen (grün markiert), bzw. das Clustern derselben. Auch alle GH78-Enzyme clustern zusammen. Der *Maximum-Likelihood*-Baum zeigt auch, dass die Enzyme mit fehlender Aktivität aus *T. stercorarium* (grau umrandet) jeweils von den aktiven Rhamnosidasen dieser Arbeit (grün umrandet) und den bisher charakterisierten GH106-Enzymen (GH106 ohne „GH106 dist.“) ähnlich weit entfernt (Länge der horizontalen Verbindungslinien) liegen. Die Summen der horizontalen Verbindungslängen liegen bei 2,9 (*Ts_ArfD* zu BT0986) und 2,5 (*Ts_ArfD* zu *Cb_Ram106B*), sowie 3,6 (*Cst_c20590/AGC69032.1* zu BT0986) und 3,0 (*Cst_c20590/AGC69032.1* zu *Cb_Ram106B*). Auch die bisher nicht produzierbaren Enzyme von *C. bescii* sind ähnlich nah verwandt mit sowohl aktiven als auch mit inaktiven Enzymen. Innerhalb der GH106-Enzyme sind das *Niabella aurantiaca*-Enzym und RhaM von *S. paucimobilis* am weitesten voneinander entfernt (Summe der horizontalen Verbindungen = 4,1) und zeigen beide α -Rhamnosidaseaktivität.

Bemerkenswert ist, dass die Entfernungen von GH106 Rhamnosidasen zu GH78 Rhamnosidasen größer ist als von den GH106-Enzymen zu allen drei gewählten *Outgroups* (GH13 Amylase, GH28 Exo-PG und p-Aminobenzoate N-oxygenase). Eine der kürzesten Zweiglängen zu den vier Rhamnosidasen zeigte das *N. aurantiaca*-Enzym, dessen Rhamnosidaseaktivität, beschrieben von Helbert (2019), die Eingliederung aller im phylogenetischen Baum als „GH106_dist“ bezeichneten Enzyme in die GH106 Familie rechtfertigte.

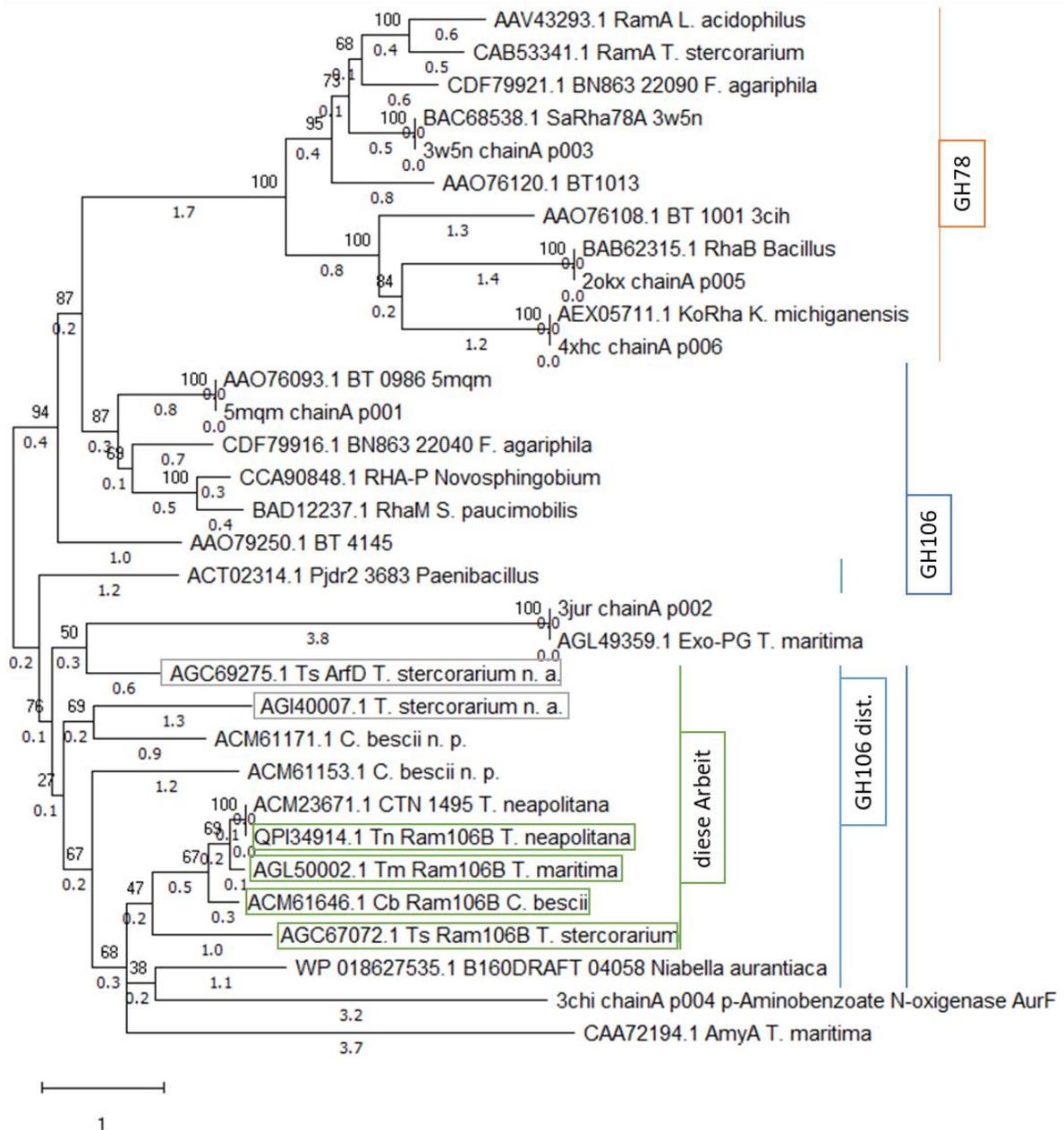


Abbildung 3.5.1 Phylogenetische Analyse ausgewählter Enzyme mit der *Maximum-Likelihood*-Methode. Verwendete Sequenzen sind im Anhang (Tabelle 6.4.1) erläutert. Ein durch Promal3DS (Pei et al. 2008) erstelltes strukturelles Alignment bildete die Basis. Die verwendete Substitutionsmethode Blosum62+F+I+G4 wurde durch den *Model Finder* (Kalyaanamoorthy et al. 2017) vom Webserver IQ-Tree (Trifinopoulos et al. 2016) ermittelt. Dargestellt ist der Baum mit der höchsten logarithmischen Wahrscheinlichkeit (-56708.98). Der prozentuale Anteil der Bäume aus 1000 Replikaten, in denen die zugehörigen Taxa geclustert haben, wurde mittels Ultra-Fast Bootstrap-Methode ermittelt (Hoang et al. 2018) und ist neben den Zweigen angegeben. Der Mittelpunkt-gewurzelte und maßstabsgetreue Baum wurde als Newick-Datei in MEGA X (Kumar et al. 2018) visualisiert. Die Zweiglängen geben die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position an. Grün umrandet: zeigten α -Rhamnosidaseaktivität in dieser Arbeit; Grau umrandet: keine α -Rhamnosidaseaktivität (n. a. = nicht aktiv); n. p. = nicht löslich produzierbar. AGI40007.1 von *T. stercorarium* entspricht AGC69032.1 (Cst_c20590).

3.5.2 Charakterisierung der α -Rhamnosidaseaktivitäten mit *pNPR*

Messungen der Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 160 min bei unterschiedlichen Temperaturen gaben ersten Aufschluss über das temperaturabhängige Verhalten der α -Rhamnosidasen (Abbildung 3.5.2).

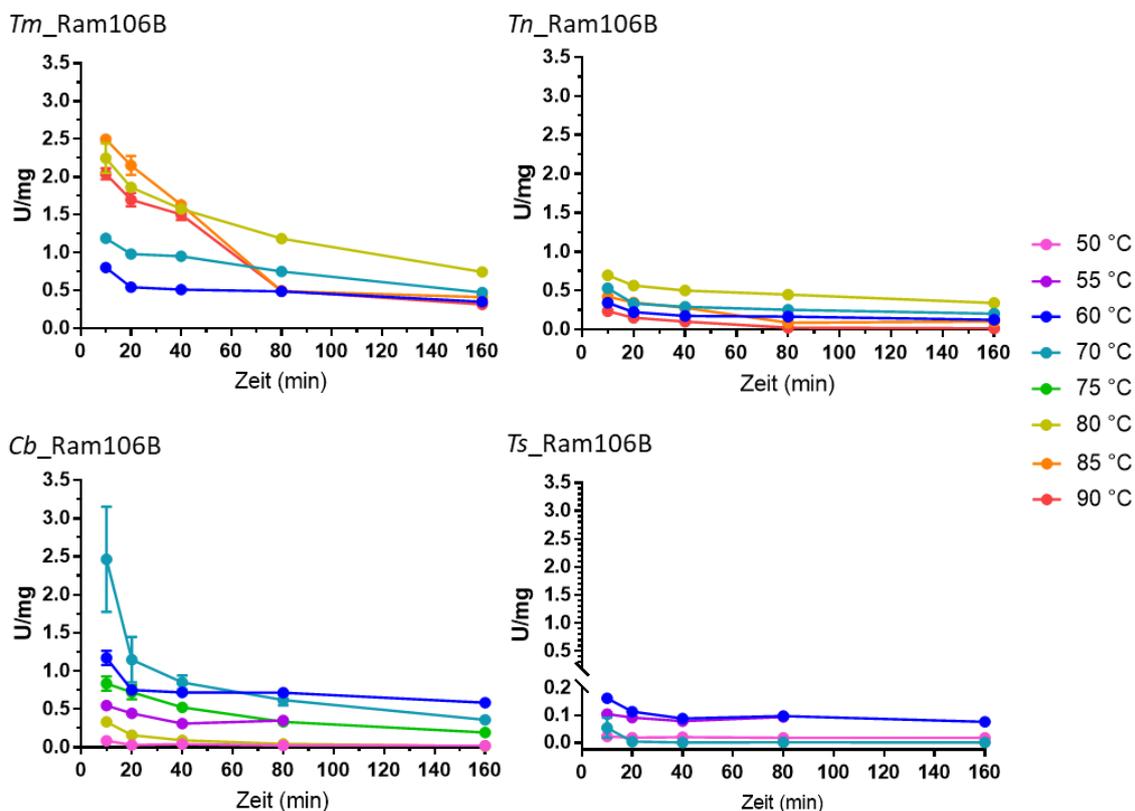


Abbildung 3.5.2 *pNP*- α -Rhamnosidaseaktivität von *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B bei verschiedenen Temperaturen. Ansätze enthielten 1 mM *pNPR*, 0,1 M MOPS pH 6,5, 2,7–12 μ g/ml Enzym. Spezifische Aktivitäten wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten berechnet. Balken zeigen die Standardabweichung aus Triplikaten.

*Tm*_Ram106B aus *T. maritima*, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 80 °C liegt, zeigte die höchste Aktivität bei 85 °C gemessen nach 10 min (~2,5 U/mg) und 20 min (~2,2 U/mg). Betrachtet man die spezifische Aktivität erst nach 40 min, so waren die Werte bei den Temperaturen 80, 85 und 90 °C vergleichbar. Dies lässt auf eine schneller nachlassende Umsatzgeschwindigkeit bei 85 °C schließen und damit auf eine Inaktivierung des Enzyms bei dieser Temperatur. Werden noch längere Zeiträume von 80 und 160 min betrachtet, so war für die höchste kumulative Produktausbeute eine Temperatur von 80 °C optimal. Auch *Tn*_Ram106B von *T. neapolitana* (Wachstums- T_{Opt} = 80 °C) zeigte über 160 min seine höchste Aktivität bei 80 °C (~0,7 U/mg nach 10 min), jedoch im Gegensatz zu *Tm*_Ram106B bei höheren Temperaturen keine anfangs erhöhten Umsatzgeschwindigkeiten. *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B zeigten stabile spezifische Aktivitäten bei 60 °C, und *Cb*_Ram106B anfangs höhere Aktivität bei 70 °C, wohingegen *Ts*_Ram106B bei dieser Temperatur nur in etwa halb so aktiv war.

Um diese offensichtlich auftretenden Inaktivierungseffekte über die Zeit minimal zu halten, wurden in allen folgenden Reaktionen dieser Arbeit die Aktivitäten von *Tm*-, *Tn*-, *Cb*- und *Ts*_Ram106B jeweils nach 10–20 min ermittelt, wobei jeweils bei 85 °C, 80 °C, 70 °C und 55 °C inkubiert wurde.

Das thermostabilste der vier Enzyme wurde zudem im Hinblick auf die vollständige Inaktivierung bei 100 °C untersucht. *Tm*_Ram106B wies nach 10 min bei 100 °C noch 1 % und nach 20 min bei 100 °C noch 0,2 % seiner ursprünglichen Aktivität auf. Deshalb wurde für eine Inaktivierung mindestens 30 min bei 100 °C inkubiert.

Die Produktinhibition ist ein wichtiger Parameter eines Enzyms, das industriell Anwendung finden soll, da er den entscheidenden limitierenden Faktor bei der Produktbildung darstellen kann. Wünschenswert sind deshalb hohe Werte für die halbmaximale Inhibitionskonzentration (IC_{50}).

Bei den Messungen zeigte sich jedoch, dass sowohl *Tm*_Ram106B als auch *Tn*_Ram106B schon bei niedrigen Rhamnosekonzentrationen von 26,8 mM und 56,2 mM, jeweils gemessen nach 10 min bei 80 °C (Abbildung 3.5.3), bereits nur noch die Hälfte ihrer ursprünglichen Aktivität hatten.

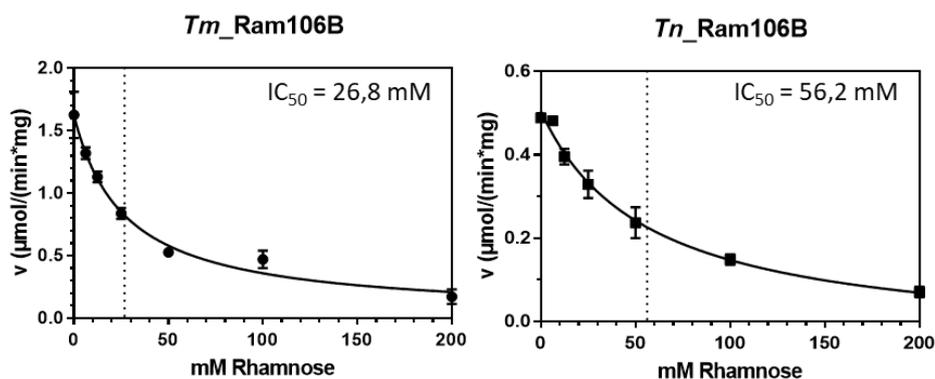


Abbildung 3.5.3 Bestimmung der halbmaximalen Inhibitionskonzentration IC_{50} der α -Rhamnosidasen *Tm*_Ram106B und *Tn*_Ram106B. Reaktionen mit 0,1 μ M Enzym (12 μ g/ml), 4 mM *p*NPR und verschiedene Rhamnosekonzentrationen wurden 10 min bei 80 °C inkubiert. Balken zeigen die Standardabweichung aus Triplikaten. IC_{50} -Werte wurden mit Graphpad mit der nicht linearen Methode „[inhibitor] vs. Response (three parameters)“ ermittelt.

In vielen Enzymen, darunter auch Glykosidhydrolasen, sind Metallionen wichtig für die Katalyse. Die Zugabe von verschiedenen Salzlösungen (10 mM) zu Reaktionen mit *Tn*_Ram106B zeigte, dass vor allem $CoCl_2$, $MnCl_2$, $NiSO_4$ und $MgCl_2$ die Aktivität zum Teil enorm steigerten (siehe Tabelle 3.5.1, visualisiert auch in Figure 2 in Baudrexel et al. (2019)). Dies zeigt außerdem, dass der Effekt auf die jeweiligen Kationen zurückzuführen ist, da die Ansätze mit Chloridionen sonst gleiche Aktivität aufgewiesen hätten. Die Absorptionen der Negativkontrollen (Ansätze ohne Enzyme) für $FeCl_3$, K_2HPO_4 und die Variation der A405 nm-Werte in Reaktionen mit $CuCl_2$ waren so hoch, dass die Reaktionen mit diesen Salzen zwar nicht auswertbar waren, jedoch zeigte der unwesentliche Unterschied der Absorptionen zwischen Reaktionen mit und ohne Enzym, dass diese Salze zumindest

keinen positiven Einfluss auf die Aktivität von *Tn_Ram106B* hatten. Zellextrakte, die anstatt mit CaCl_2 mit CoCl_2 im Aufschlusspuffer hergestellt wurden, zeigten unter Verwendung eines „Reaktionspuffers“ ohne zusätzliche Ionen (1 M MOPS, pH 6,5), mindestens doppelte bis vierfache Aktivität gegenüber *pNPR*. Das spricht dafür, dass bereits eventuell im aktiven Zentrum gebundene Metallionen dort stabil verbleiben, und Cobalt-Ionen, wie mit gereinigtem Protein gezeigt, zu höherer Aktivität führen als Calcium-Ionen. Die höhere Aktivität könnte auch daher rühren, dass die Enzyme mit Cobalt stabiler gegenüber dem Hitze-Inkubationsschritt (20 min, 60 °C) sind, der zur Denaturierung von Proteinen des Expressionswirts *E. coli* durchgeführt wurde. Die Reduktion der spezifischen Aktivität von *Tn_Ram106B* mit den Chelatoren EDTA und EGTA (jeweils 5 mM) auf 2 % und 6 % (Tabelle 3.5.1) bestätigt, dass zweiwertige Ionen entscheidend für die Katalyse sind.

Tabelle 3.5.1 Einfluss verschiedener Salze (10 mM) und Chelatoren (5 mM) auf die α -Rhamnosidaseaktivität von *Tn_Ram106B*.

-fache Aktivität verglichen mit Reaktionen ohne Zusätze	
MW \pm St.Abw in %	
CoCl_2	61,5 \pm 4,0
MnCl_2	36,6 \pm 3,9
NiSO_4	21,2 \pm 5,9
MgCl_2	6,4 \pm 1,0
K_2CO_3	1,9 \pm 2,5
CaCl_2	1,5 \pm 12,3
KNO_3	1,1 \pm 23,4
-	1,0 \pm 37,3
NH_4Cl	0,9 \pm 11,8
NaCl	0,8 \pm 11,2
KSO_4	0,7 \pm 3,3
KCl	0,7 \pm 12,2
ZnCl_2	0,2 \pm 9,6
EDTA	0,0 \pm 0
EGTA	0,1 \pm 4,8

Standardreaktionen mit 1 mM *pNPR*, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,05 μM) *Tn_Ram106B* wurden mit 10 mM verschiedener Salze oder 5 mM der Chelatoren EDTA und EGTA supplementiert und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Enzym, um den Einfluss der Salze in der Lösung auf die A405 nm- Werte zu berücksichtigen. Die Änderungen der Aktivität sind als Vielfache der Aktivität ohne zusätzliche Ionen angegeben. Die Standardabweichung von Triplikaten ist in % angegeben.

Mit steigenden Konzentrationen von 0,1 μM bis 100 μM der Salze CoCl_2 , MnCl_2 , NiSO_4 und MgCl_2 zeigte sich auch ein zunehmend aktivierender Effekt (Anhang Tabelle 7.4.2). Höhere Konzentrationen von 1–20 mM zeigten jedoch jeweils einen ungefähr gleich großen Effekt, weshalb 1 mM CoCl_2 als ausreichend bewertet und in allen folgenden Reaktionen verwendet wurde. Wie bereits gezeigt erhöhten CoCl_2 , NiSO_4 , MnCl_2 und MgCl_2 auch die Aktivitäten der anderen drei α -Rhamnosidasen in unterschiedlichem Maße (Baudrexel et al. 2019). Da jedoch zumindest für *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B* und *Cb_Ram106B* Cobalt-Ionen den höchsten Effekt aufwiesen und *Ts_Ram106B* einen nur

unwesentlich höheren Aktivitätszuwachs mit NiSO₄ (ca. 10-fache Aktivität) im Vergleich zu CoCl₂ (ca. 7-fache Aktivität) zeigte, wurden alle vier α -Rhamnosidasen mit dem Zusatz von CoCl₂ charakterisiert.

3.5.3 Charakterisierung der α -Rhamnosidasen in Anwesenheit von 1 mM CoCl₂

Eine Übersicht der Eigenschaften der α -Rhamnosidasen, die von Baudrexl et al. (2019) in Anwesenheit von 1 mM CoCl₂ bestimmt wurden, sind in Tabelle 3.5.2 gezeigt.

Nachdem 1 mM CoCl₂ zu allen Reaktionen zugegeben wurde, lagen die jeweiligen ermittelten Temperaturoptima (10 min Assay) für die Enzyme wenig verändert bei 86,5 °C (*T_m_Ram106B*), 84 °C (*T_n_Ram106B*), 70 °C (*Cb_Ram106B*) und 50 °C (*T_s_Ram106B*) (Table 2 und Figure S5 in Baudrexl et al. (2019)). Dies deutet eher auf einen Einfluss auf die Aktivitätstasche und nicht etwa auf die Gesamtstruktur hin.

Die beiden thermoaktivsten α -Rhamnosidasen dieser Arbeit, *T_m_Ram106B* und *T_n_Ram106B*, wurden in Bezug auf ihre Restaktivität nach Inkubation für verschiedene Zeiten bei 80 °C und 90 °C untersucht. Zwei unabhängige aktivitätsbasierte Temperaturstabilitäts-Messungen wurden jeweils bei 80 °C (Abbildung 3.5.4 A) und 90 °C (Abbildung 3.5.4 B) durchgeführt. Messreihe 1 zeigte bei beiden Temperaturen zunächst steigende Aktivitäten nach Vorinkubationen von bis zu einer Stunde. Die Messreihe 2 zeigte jeweils, dass *T_m_Ram106B* bei einer Temperatur von 80 °C (etwa 6,5 °C unter dem 10 min-Temperaturoptimum) mindestens 6 h lang fast volle Aktivität (98 %) behält: noch nach 12 h konnten 73 % Restaktivität gemessen werden (Abbildung 3.5.4 A). Ähnlich dazu zeigte *T_n_Ram106B* nach 6 h und 12 h bei 80 °C noch ca. 91 % und 69 % Aktivität (Baudrexl et al. 2019). Nach Inkubationen bei 90 °C (etwa 3,5 °C über dem ermittelten 10 min-Temperaturoptimum) konnten jeweils noch 47 % (6 h) und 14 % (12 h) Restaktivität für *T_m_Ram106B* (Abbildung 3.5.4 B), aber nur 3 % (6 h) und 0,1 % (12 h) für *T_n_Ram106B* gemessen werden (Table 3 in Baudrexl et al. (2019)). Es besteht die Möglichkeit, dass die Enzyme der Messreihe 1 zu Beginn der Messung noch Kühlschranktemperatur aufwiesen. Es könnte daher eine Art Adaptation (an die Reaktionstemperatur, oder durch Bindung von Kofaktoren) notwendig gewesen sein, um ihre volle Aktivität zu erreichen (Bisswanger 2014). Wie von Baudrexl et al. (2019) gezeigt, gleichen sich die Werte bei 6 h unter Bezugnahme auf die maximalen Aktivitätswerte und nicht wie hier dargestellt auf die Anfangsaktivität.

Tabelle 3.5.2 Zusammenfassung verschiedener Eigenschaften der α -Rhamnosidasen.

Protein	Stamm	MW (kDa)	theor. PI	-fache Aktivitäts- änderung mit CoCl ₂ ^a	Spezifische Aktivität ^{a,b} (U/mg)	Temp. Opt. (°C)	pH 60 % Aktivitäts- bereich	K _m or. K _{prime} , h ^{b,c} (mM)	k _{cat} ^b (s ⁻¹)	K _i ^b , α^b (mM L-Rham-nose)	IC ₅₀ (am K _m o. K _{prime})
<i>Tm</i> _Ram106B	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	116,6	5,95	25,1	40,50 ± 0,33	86,5	5,5-7	1,94 ± 0,20	217,8 ± 10,1	2,37 ± 0,13	4,9
<i>Tn</i> _Ram106B	<i>Thermotoga neapolitana</i> Z2706-MC24	115,8	5,89	60,8	32,23 ± 0,19	84	5-6,6	1,47 ± 0,14	146,8 ± 6,1	5,50 ± 1,01, 1,40 ± 0,44	6,5
<i>Cb</i> _Ram106B	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	115,9	6,31	52,9	7,38 ± 0,21	70	5-6,6	1,29 ± 0,23, 1,64 ± 0,20	51,9 ± 6,0	-	5,5
<i>Ts</i> _Ram106B	<i>Thermoclostridium</i> <i>stercorarium</i> subsp. <i>stercorarium</i> DSM 8532	121,3	5,63	6,9	2,13 ± 0,01	50	5-5,6	1,90 ± 0,18	14,3 ± 0,5	4,94 ± 0,75, 2,56 ± 0,63	8,3

aus Baudrexl et al. (2019), Table 2

^a mit 1 mM pNPR und 1 mM CoCl₂

^b ± Standardabweichung

^c k_{prime}/hill-coefficient h für *Cb*_Ram106B

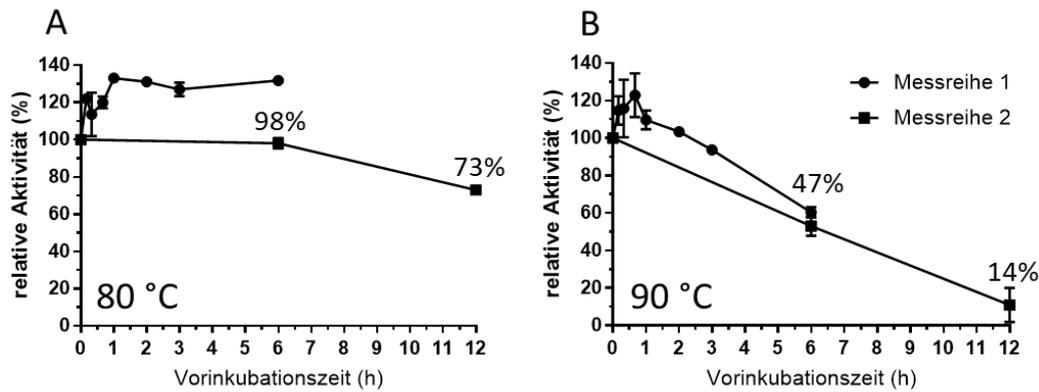


Abbildung 3.5.4 Resistenz von *Tm_Ram106B* gegenüber Hitzeinaktivierung bei 80 °C (A) und 90 °C (B). Enzymlösungen, die 1,75-fach konzentrierter waren als in den Reaktionen, durch die anschließend die Aktivitäten bestimmt wurden (6 ng/ μ l Enzym, 1 mM CoCl_2 , 100 mM MOPS pH 7, 1 mM pNPR), wurden für unterschiedliche Zeiten bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Es erfolgten zwei unabhängige Messungen. Die erste Messreihe wurde durch Inkubationen zwischen 10 min und 6 h, die zweite Messreihe wurde durch Inkubation für 0 h, 6 h und 12 h, erstellt. Im Vergleich zu Figure S6 in Baudrexl et al. (2019) wurden die prozentualen Aktivitäten nicht auf den höchst gemessenen Wert bei 80 °C, sondern auf den Wert bei $t = 0$ bezogen berechnet. Die Balken stellen die Standardabweichungen von Triplikaten dar.

Für eine Einordnung, bei welchem pH-Wert die Reaktion am besten katalysiert wird, wurden die Reaktionen (3–12 $\mu\text{g/ml}$ der Enzyme, 1 mM Substrat) zunächst mit Citrat-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten versetzt. Nach 15 min wurden für alle vier Enzyme deutlich niedrigere Umsatzgeschwindigkeiten ermittelt als für MOPS-gepufferten Standardreaktionen, sodass die Abweichungen des Substrathintergrunds bei den extremeren pH-Werten (pH 4, oder pH 8) vor allem bei diesen relativ hohen Temperaturen (80 °C, 70 °C oder 55 °C) teils größer waren als die Änderung der Messwerte durch die tatsächliche Aktivität. Die Phosphationen dieses Puffersystems komplexieren zweiwertige Ionen und entziehen den Enzymen so ihr essenzielles Metallion, weshalb dieser Puffer nicht weiterverwendet wurde. Wie in Baudrexl et al. (2019) gezeigt und beschrieben (supplementary Figure S7), wurden die Trends der Aktivität von *Tm_Ram106B* (bei 80 °C), *Tn_Ram106B* (bei 80 °C), *Cb_Ram106B* (bei 70 °C) und *Ts_Ram106B* (bei 55 °C) letztendlich mit den Puffersubstanzen Succinat, Malat, MES, MOPS, PIPES und HEPES in Anwesenheit von 1 mM CoCl_2 untersucht. Die höchsten relativen Aktivitäten (über 60 %) wurden für *Tm_Ram106B* indem pH-Bereich zwischen 5,5 und 7 erreicht, für *Tn_Ram106B* und *Cb_Ram106B* bei pH 5,0–6,6 und für *Ts_Ram106B* zwischen pH 5,8 und 6,0, wobei sich die pH-Werte auf eine Temperatur von 80 °C beziehen (Tabelle 3.5.2, Figure S7 in Baudrexl et al. (2019)). Da 0,1 M MOPS, der bei 20 °C auf pH 7 eingestellt wurde, bei 80 °C einem gemessenen Wert von 6 entsprach, wurde weiterhin dieser Puffer in Standardreaktionen verwendet.

Die Bestimmung der Parameter Substrataffinität (K_M), maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}), Anzahl der umgesetzten Moleküle pro Molekül Enzym (k_{cat}) und Produkt-Inhibitionskonstante (k_i) erfolgte durch das Fitten von unterschiedlichen mathematischen Formeln (Formeln (4)–(10)) auf die in Abbildung 3.5.5 gezeigten Sättigungskurven.

In Tabelle 3.5.3 sind alle bestimmten kinetischen und inhibitorischen Parameter gezeigt. Für die *Thermotoga*-Enzyme und *Ts_Ram106B* konnte die klassische Michaelis-Menten-Gleichung angewandt werden, während für *Cb_Ram106B* ein allosterisch Sigmoidaler Fit ein besseres Modell (mit $R^2=0,99$) darstellte, bei welchem der K_{prime} -Wert das Äquivalent zum K_M -Wert darstellt. Trotz der unterschiedlichen Methoden leicht unterschiedlichen Ergebnisse kann zusammengefasst werden, dass die durchschnittlichen K_M bzw. K_{prime} Werte für alle vier Enzyme zwischen 1,2 und 2,0 mM lagen. Die V_{max} Werte erreichten Durchschnittswerte von 7–112 U/mg (*Tm_Ram106B*: 112,4 U/mg, *Tn_Ram106B* 76,6 U/mg, *Cb_Ram106B*: 18,4 U/mg, *Ts_Ram106B*: 7,1 U/mg). Die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) für *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B* und *Ts_Ram106B* lagen in etwa bei $1,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $1,0 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $2,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und $7,5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, da sie ca. 218, 147, 18 und 7 Moleküle pro Sekunde umsetzten (k_{cat}). Jedoch wurden alle vier Enzyme bereits bei niedrigen Produktkonzentrationen inhibiert.

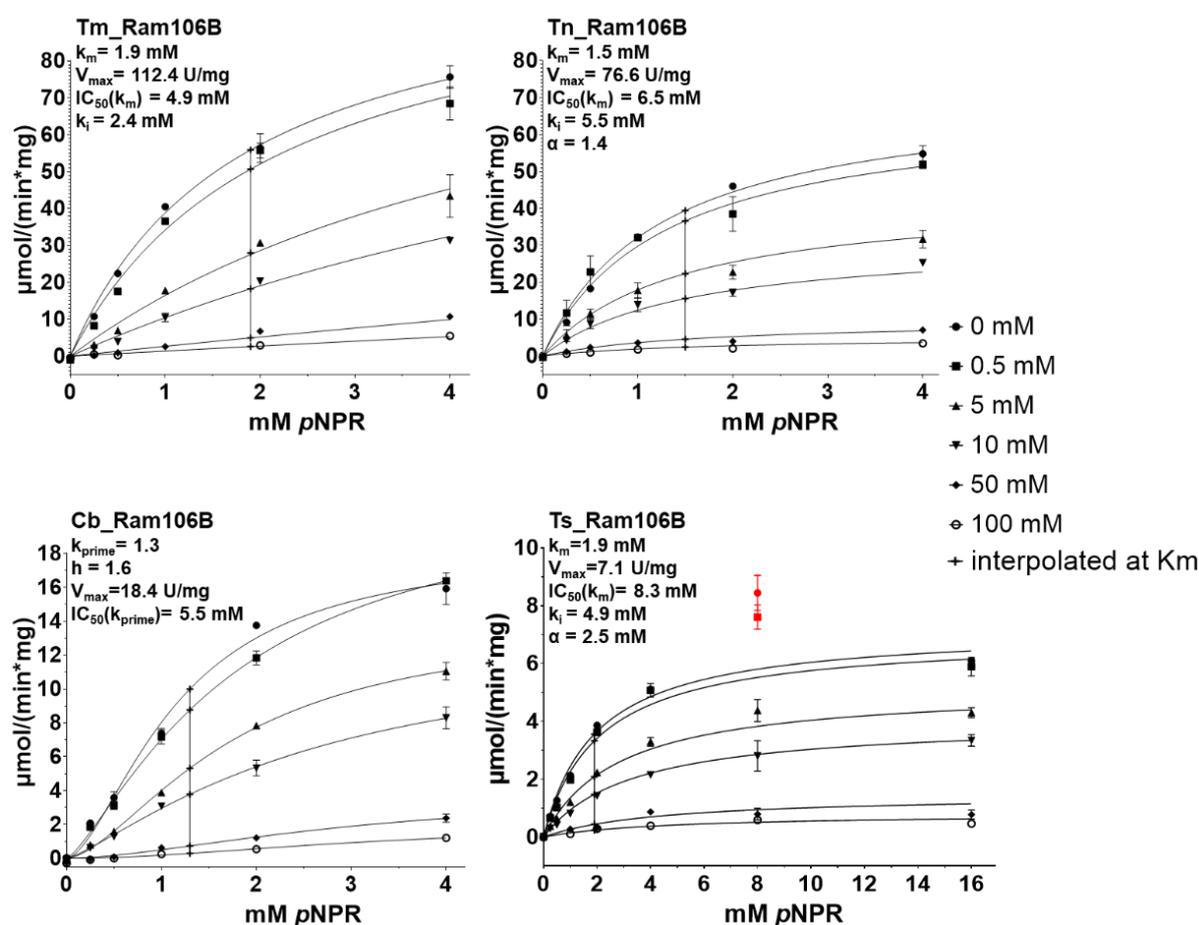


Abbildung 3.5.5 Bestimmung der kinetischen und inhibitorischen Parameter der α -Rhamnosidasen *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B* und *Ts_Ram106B*. Es wurden Standardreaktionen (1 mM pNPR, 1 mM CoCl₂, 100 mM MOPS pH 7 (RT), 10 min) mit den in Klammern angegebenen Enzymkonzentrationen, Reaktionstemperaturen und ggf. Änderungen durchgeführt: *Tm_Ram106B* (2,5 nM, 80 °C), *Tn_Ram106B* (10 nM, 80 °C), *Cb_Ram106B* (5 nM, 70 °C), *Ts_Ram106B* (50 nM; 55 °C; 50 mM Malat pH 4,6 RT). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Duplikate dar. Datenpunkte, die nicht in die Analyse einbezogen wurden, sind rot markiert. K_M , das Äquivalent K_{prime} und V_{max} wurden mit Graphpad Prism 7 berechnet, wie in Material und Methoden beschrieben. Die IC_{50} -Werte wurden durch Verwendung interpolierter Datenpunkte bei den jeweiligen K_M (verbunden durch eine vertikale Linie) bestimmt. (Figure S8 in Baudrexel et al. (2019))

Ergebnisse

Für *Cb_Ram106B* konnte auf die sigmoidalen Kurven kein Inhibitionsmodell gefittet werden. Die Inhibitionskonstanten k_i für *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B* und *Ts_Ram106B* lagen mit 2,4 mM, 5,5 mM und 5,0 mM alle in derselben Größenordnung. Halbmaximale Inhibitionskonzentrationen wurden ermittelt, indem die spezifischen Aktivitäten mit den unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen [I] bei einer Substratkonzentration, die dem durch das jeweilige Modell bestimmten K_M entspricht, über die Inhibitorkonzentrationen aufgetragen wurden. Da die Aktivitäten nicht mit den jeweiligen, dem K_M entsprechenden Substratkonzentrationen gemessen wurden, wurden die Werte mit Graphpad an den jeweiligen Kurven am K_M interpoliert (vertikale Linie in Abbildung 3.5.5). Der Inhibitionsparameter IC_{50} konnte so auch ohne passendem Inhibitionsmodell für *Cb_Ram106B* bestimmt werden. Dieser lag bei 5,5 mM L-Rhamnose, während die von *Tm*-, *Tn*- und *Ts_Ram106B* mit 4,9 mM, 6,5 mM und 8,3 mM in einem ähnlich niedrigen Bereich lagen.

Tabelle 3.5.3 Kinetik und Produktinhibitionsparameter von *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B* und *Ts_Ram106B*

		<i>Tm_Ram106B</i>	<i>Tn_Ram106B</i>	<i>Cb_Ram106B</i>	<i>Ts_Ram106B</i>
Kinetisches Modell, Inhibitionsmodell Gefittet auf [Substrat] vs. Reaktionsgeschwindigkeitskurve		Michaelis- Menten, kompetitive Inhibition	Michaelis- Menten, Gemischtes Inhibitionsmodell	Allosterisch sigmoidal, -	Michaelis- Menten, Gemischtes Inhibitionsmodell
Durch das kinetische Modell mit dem besten Fit bestimmte Parameter	K_m in mM bei [I]=0 mM	1,94 (0,20)	1,47 (0,14)	-	1,90 (0,18)
	K_{prime} in mM,	-	-	1,29 (0,23),	-
	K_{half}	-	-	1,17 (0,14),	-
	Hill-slope	-	-	1,64 (0,20)	-
	V_{max} (U/mg) bei [I]=0 mM	112,40 (5,20)	76,64 (3,18)	18,40 (1,27)	7,06 (0,23)
	R^2	0,99	0,99	0,99	0,99
Durch das Michaelis- Menten-Modell bestimmte Parameter	k_{cat} in 1/s	217,8 (10,1)	146,8 (6,1)	ca. 51,9 (6,0)	14,3 (0,5)
	K_m in mM	1,94 (0,19)	1,47 (0,14)	2,46 (0,55)	1,90 (0,18)
	V_{max} in $\mu\text{mol/s}$	$2,81 \cdot 10^{-5}$	$7,66 \cdot 10^{-2}$	$1,34 \cdot 10^{-2}$	$3,53 \cdot 10^{-5}$
	R^2	0,99	0,99	0,98	0,99
Durch das Inhibitionsmodell bestimmte Parameter	K_m in mM	1,81 (0,12)	1,24 (0,09)	-	1,95 (0,13)
	V_{max} in U/mg	109,2 (3,2)	72,1 (2,2)	-	7,2 (0,2)
	A	-	1,40 (0,44)	-	2,56 (0,63)
	K_i in mM	2,37 (0,13)	5,50 (1,01)	-	4,94 (0,75)
	R^2 (<i>global shared</i>)	0,99	0,99	-	0,98
Bestimmt durch Fitting von [I] vs. relative Aktivität, mittels Interpolation von spezifischen Aktivitäten bei K_m o. K_{prime} an in Abbildung 3.5.5 * gezeigten Kurven	IC_{50} in mM (bei K_m o. K_{prime} von kinetischem Modell)	4,9 (bei 1,9 mM $pNPR$)	6,5 (bei 1,5 mM $pNPR$)	5,5 (bei 1,3 mM $pNPR$)	8,3 (bei 1,9 mM $pNPR$)

Parameter ermittelt durch Analyse der Kurven [Substrat] gegen Geschwindigkeit (Abbildung S8), die wie in Material und Methoden beschrieben mit GraphPad Prism 7 und den angegebenen Modellen erstellt wurden. Berechneter Standardfehler in Klammern. Entspricht Table S4 in Baudrexel et al. (2019); *in Baudrexel et al. (2019) Fig. S8

Um Aktivität gegenüber diesem natürlichen Substrat zu zeigen, wurden nach der Inkubation von Naringin mit *Tm*-, *Tn*-, *Cb*- und *Ts*_Ram106B die entstandenen reduzierenden Zucker quantifiziert und die Zucker durch DC und HPAEC-PAD identifiziert. Zudem wurde allen Reaktionen, nach Inaktivierung der Enzyme bei 100 °C (30–60 min), jeweils auch einmal die β -Glukosidase CgIT aus *Thermoanaerobacter brockii* zugegeben. Da durch CgIT ein Abbau des Glukoserestes von Prunin erwartet wurde, sollte sich die Gesamtmenge der freigesetzten reduzierenden Enden in diesen Reaktionen verdoppeln. Eine Verdopplung war wie in Abbildung 3.5.7 gezeigt nicht zu sehen, jedoch erhöhte sich die Konzentration der freigesetzten Rhamnose-Äquivalente in Ansätzen mit CgIT um das mindestens 1,5-fache.

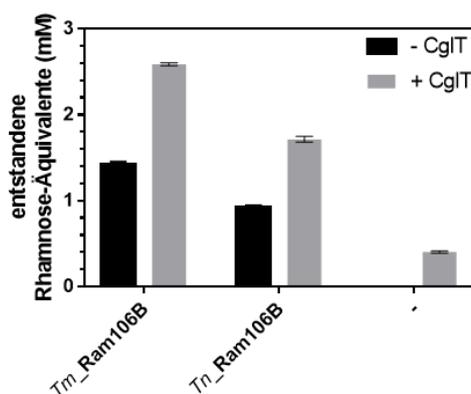


Abbildung 3.5.7 Quantifizierung entstandener reduzierender Enden nach Naringin-Verdau durch α -Rhamnosidasen und die β -Glukosidase CgIT. Reaktionen mit 5 mM Naringin in 100 mM Succinat pH 6,5 und 24 μ g/ml Enzym wurden zunächst für 180 min bei 80 °C inkubiert, anschließend wurde zu den angegebenen Reaktionen CgIT (6 μ g/ml) zugegeben und ÜN bei 55 °C inkubiert. A 540 nm Werte wurden an einer Rhamnose Standardkurve in Graphpad interpoliert. Balken zeigen Standardabweichungen aus Triplikaten.

Die durch CgIT allein freigesetzten und durch DNSA detektierten reduzierenden Enden konnten entweder von unspezifisch abgebauten Disacchariden stammen, oder die hydrolysierten Glukosereste von schon vorhandenem Prunin in der Substratlösung darstellen. Um dies zu überprüfen wurden die Reaktionen über Chromatographien aufgetrennt. Naringin und Prunin waren mit dem gewählten HPAEC-PAD Gradienten nicht visualisierbar. Jedoch zeigte die DC, dass in den Naringinlösungen oberhalb des Detektionslimits kein Prunin nachgewiesen werden konnte (siehe Figure 3 in Baudrexel et al. (2019)). Die HPAEC-PAD Chromatogramme mit Naringin-Verdau durch CgIT zeigten keine möglichen Disaccharid-Peaks und keine Rhamnose, dafür marginale Mengen an Glukose (Abbildung 3.5.8). Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass wohl kleine Mengen von durch CgIT freisetzbare Glukose in der Lösung vorlagen, eventuell als Prunin, das mittels DC in solch kleinen Mengen nicht visualisierbar war. Die spezifischen Aktivitäten von *Tm*_Ram106B und *Tn*_Ram106B, die durch DNSA-Assay nach einer Inkubation mit 3 mM Naringin für 3 h bei 80 °C bestimmt wurden, lagen bei 0,2–0,4 U/mg. Jedoch wurden die bis hierher beschriebenen Versuche noch ohne Zugabe von 1 mM CoCl_2 (siehe Effekt von Metallionen weiter oben) durchgeführt.

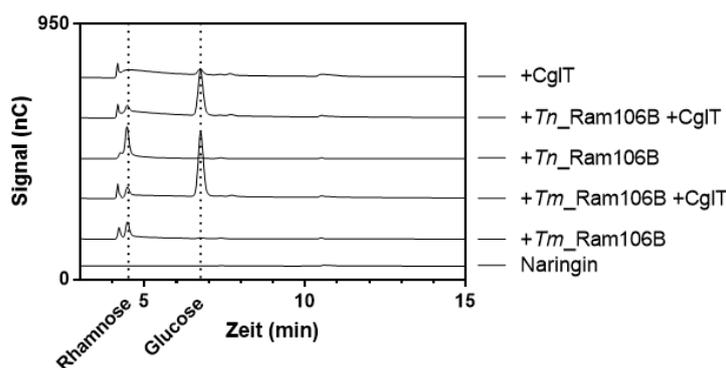


Abbildung 3.5.8 HPAEC-PAD Chromatogramme des Naringin-Abbaus durch α -Rhamnosidasen und β -Glukosidase CglT. Reaktionen mit 5 mM Naringin in 100 mM Succinat pH 6,5 und 24 $\mu\text{g/ml}$ Enzym wurden zunächst für 180 min bei 80 °C inkubiert, anschließend wurde zu den angegebenen Reaktionen CglT (6 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben und ÜN bei 55 °C inkubiert.

Die für *Tm_Ram106B* in Anwesenheit von CoCl_2 bestimmte **spezifische Aktivität gegenüber Naringin** (10 % Naringin, 40 min, 80 °C, bestimmt durch HPAEC-PAD) lag mit 2,7 U/mg (Baudrexel et al. 2019) im Vergleich zu der Aktivität ohne CoCl_2 um das 7–8-fache höher. Auch für *Tn_Ram106B* konnte durch CoCl_2 Zugabe eine 8–11-fach erhöhte spezifische Aktivität von 2,4 U/mg (6 ng/ μl Enzym, 2 h, 80 °C) erreicht werden.

Tm_Ram106B, *Tn_Ram106B* und *Cb_Ram106B* setzten aus 6 mM Naringin (theoretisch 6 mM, also 0,99 g/l Rhamnose möglich) nach 4 h zwischen 2,7 mM (0,45 g/l) und 3,2 mM (0,54 g/l) Rhamnose-Äquivalente frei, was 45–50 % entspricht (Abbildung 3.5.9). Diese Produktkonzentrationen liegen jedoch bereits nahe an den ermittelten IC_{50} -Werten für die vier Rhamnosidasen (zwischen 4,9 mM für *Tm_Ram106B* und 8,3 mM für *Ts_Ram106B*). *Ts_Ram106B* setzte in dieser Zeit nur etwa 0,5 % der möglichen Rhamnose frei, obwohl es den höchsten IC_{50} -Wert aufwies. Alle vier α -Rhamnosidasen konnten also Rhamnose auch vom natürlich vorkommenden Substrat Naringin abspalten (Abbildung 3.5.9); drei davon effizient.

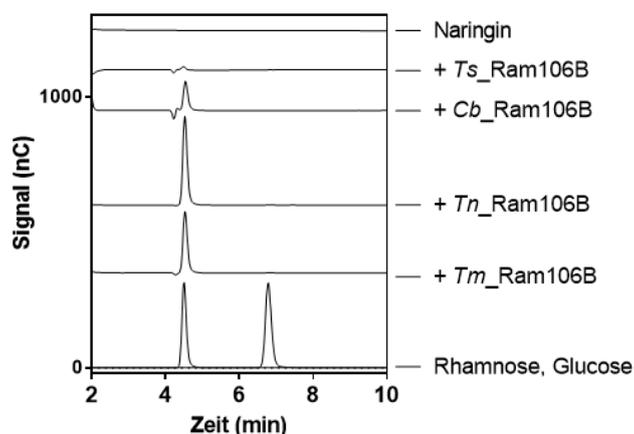


Abbildung 3.5.9 Naringinabbau durch *Tm*-, *Tn*-, *Cb*- und *Ts*_Ram106B in Anwesenheit von CoCl_2 . Reaktionen (6 mM Naringin, 1 mM CoCl_2 , 0,1 M MOPS pH 7 (RT) und den Enzymen *Tm_Ram106B* (50 nM, 80 °C), *Tn_Ram106B* (50 nM, 80 °C), *Cb_Ram106B* (100 nM, 70 °C), oder *Ts_Ram106B* (100 nM, 55 °C) wurden für 4 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und mittels HPAEC-PAD mit Gradient 1 (Tabelle 2.5.5) aufgetrennt und analysiert. Gezeigt sind die um den Enzymhintergrund korrigierten Chromatogramme aus Figure 3b in Baudrexel et al. (2019).

3.6 GH159 Galaktofuranosidasen mit Arabinofuranosidaseaktivität

Eine andere Gruppe bisher nicht charakterisierter Glykosidhydrolasen stellten die drei Leserahmen Csac_0437, Calhy_0274 und Calkro_0290 aus dem thermophilen Genus *Caldicellulosiruptor* dar, die zu Anfang dieser Arbeit noch in der Familie der nicht klassifizierten Proteine, GHnc, zu finden waren. Deshalb sollte ihre Aktivität aufgeklärt werden, um eine neue GH Familie zu definieren. Im Laufe der Arbeit wurde jedoch die neue GH Familie GH159 beschrieben. Das Gründungsmitglied von GH159, ein Enzym von *Bacteroides cellulosilyticus* WH2 (ALJ59596.1), hatte bei einem Screening Aktivität gegenüber *pNP*- β -D-Galaktofuranosid (*pNP*- β -D-Galf) gezeigt (Helbert et al. 2019). Auch die drei ausgewählten *Caldicellulosiruptor*-Enzyme wurden mit Sequenzähnlichkeiten von 39 % (ID) in 88 % der Sequenzen (*Query coverage*) zu ALJ59596.1 in GH159 eingeordnet. Daraufhin wurde die eher ungewöhnliche *pNP*- β -D-Galaktofuranosidaseaktivität (EC 3.2.1.146) auch für die drei, nun als Cs_Gaf159A, Ch_Gaf159A und Ck_Gaf159A bezeichneten, Enzyme festgestellt, die zudem höher war als die bei unserem Screening (Kapitel 3.4) entdeckte Arabinofuranosidaseaktivität (EC 3.2.1.55). Ein großer Teil der Ergebnisse zu diesen drei Galaktofuranosidasen mit Arabinofuranosidaseaktivität wurde bereits publiziert (Baudrexl et al. 2022).

3.6.1 Aktivität gegenüber *pNP*- β -D-Galaktofuranosid

Während die spezifische Aktivität gegenüber *pNP*- α -L-Araf (*pNPA*) bei der Screeningtemperatur von 65 °C für alle drei β -Galaktofuranosidasen bei 2–3 U/ μ mol (0,05–0,07 U/mg) lag, wurden bei 65 °C mit zwischen 8 und 9 U/ μ mol (0,2 U/mg) ca. 3–4 mal höhere Aktivitäten gegenüber *pNPGf* gemessen (Abbildung 3.6.1).

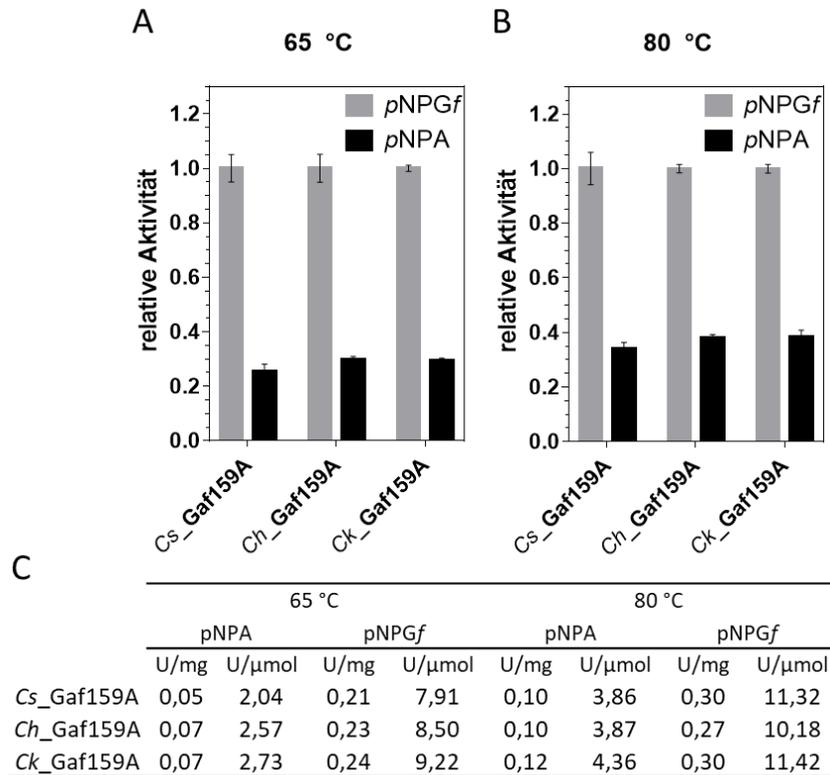


Abbildung 3.6.1 Vergleich von β -Galaktofuranosidase- und α -Arabinofuranosidaseaktivität von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* gegenüber *pNP*-Substraten bei 65 °C und 80 °C. Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym, 1 mM Substrat und 1x RP wurden 20 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Gezeigt sind relative Aktivitäten bei 65 °C (A) und 80 °C (B) bezogen auf *pNPGf*se Aktivität und spezifische Aktivitäten (C). Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus Triplikaten. Im Mittel sind die Enzyme bei 65 °C 3,6-fach und bei 80 °C 2,6-fach aktiver auf *pNPGf*, als auf *pNPA* (siehe Baudrexel et al. (2022) Figure 2).

Mit *pNPGf* wurden nach 20 min für alle drei Enzyme die höchsten Aktivitäten bei ca. 82 °C (Abbildung 3.6.2 A) gemessen, während die scheinbaren Temperaturoptima mit *pNPA* als Substrat für *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* bei 90 °C, 82 °C und 93 °C lagen (Abbildung 3.6.2 B, Baudrexel et al. (2022) Figure 4).

Deshalb wurden die Aktivitäten auch bei 80 °C verglichen (Abbildung 3.6.1 B). Hier wurden für alle drei Enzyme, mit *pNPA*, Umsätze von ca. 0,1 U/mg (4 U/ μmol) und auf *pNPG* mit 0,3 U/mg (10–11 U/ μmol) ca. jeweils auch das 3-fache gemessen.

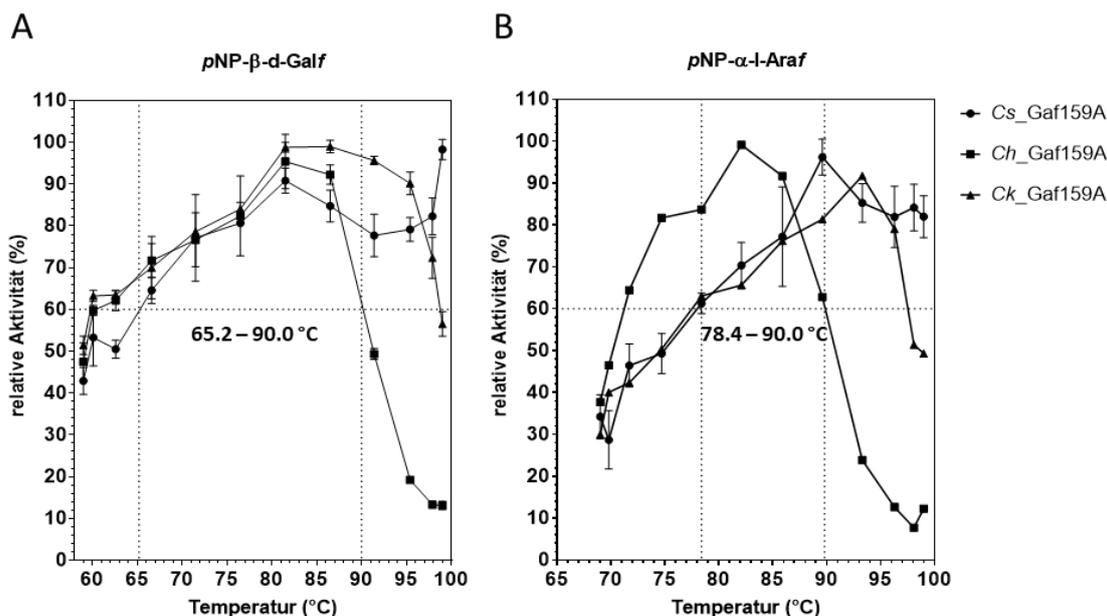


Abbildung 3.6.2 Einfluss der Temperatur auf die *pNPGf*-ase- (A) und die *pNPAase*- (B) Aktivitäten von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A*. Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym, 1x RP und 1 mM Substrat wurden für 20 min bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen von Triplikaten. (B) stellt eine Zusammenfassung von Figure 4 A–C in Baudrexel et al. (2022) dar.

Die mit zwei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen (0,1 und 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit dem Substrat *pNPGf* bestimmten kinetischen Parameter V_{max} und K_{M} lagen bei 2,2–4,7 U/mg (83–177 U/ μmol) und 3,6–8,1 mM (Abbildung 3.6.3). Die Wechselzahlen für *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* lagen bei 1,7 s^{-1} , 1,8 s^{-1} und 1,8 s^{-1} und die sich daraus ergebenden katalytischen Effizienzen bei 229 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$, 207 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ und 434 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$.

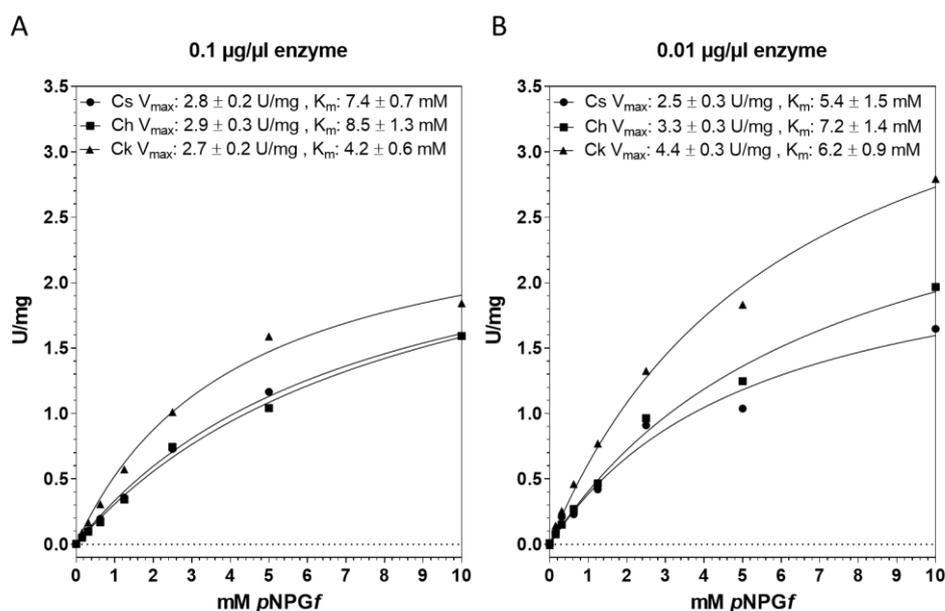


Abbildung 3.6.3 Bestimmung der kinetischen Parameter für die Hydrolyse von *pNPGf* durch *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A*. Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (A), oder 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (B) Enzym, 1x RP wurden für 10 min bei 80 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Graphpad Prism 7 unter Verwendung der Michaelis-Menten-Kinetik. $n=1$, V_{max} und K_{M} sind mit durch Graphpad berechneten Standardfehlern angegeben. Daten dieser Abbildung sind auch als supplementary Figure S 2 B und C in Baudrexel et al. (2022) gezeigt.

3.6.2 Biochemische Charakterisierung als Arabinofuranosidase mit *p*NPA als Substrat

Das Vorkommen des ungewöhnlichen Zuckers *Galf* ist fast ausschließlich auf Bakterien, Protozoen, Pilze und Algen beschränkt (Schmalhorst 2009). *Araf* hingegen stellt die zweithäufigste Pentose in verschiedener pflanzlicher Biomasse dar (Ruchala und Sibirny 2021). Deshalb, und weil diese Aktivität bisher für GH159 noch nicht beschrieben wurde, wurde im Folgenden der Fokus auf die Arabinofuranosidaseaktivität gesetzt, der in der Biomasseverzuckerung eine bedeutend größere Rolle zukommt.

Die höchsten Aktivitäten mit 4 mM *p*NPA nach 10 min und pH 6,5 (RT) wurden zunächst ohne externe Zugabe von Ionen bei 72,5–87,4 °C (*Cs_Gaf159A*), 77,5 °C (*Ch_Gaf159A*) und 72,5–82,5 °C (*Ck_Gaf159A*) erreicht. Währenddessen lagen die **bestimmten Temperaturoptima** in Ansätzen mit 1 mM CaCl₂ nach 20 min und pH 6,5 (RT), wie auch von Berk (2020) bestimmt, mit 90 °C (*Cs_Gaf159A*), 82 °C (*Ch_Gaf159A*) und 93 °C (*Ck_Gaf159A*), deutlich höher (Abbildung 3.6.2, Baudrexel et al. (2022)). Bei diesen Temperaturen wurden jeweils Aktivitäten von 0,1 U/mg erreicht. Der pH-Wert, der bei diesen Temperaturen in den höchsten Aktivitäten resultierte, lag für alle drei Enzyme in MOPS-Puffer bei 6,5 (20 °C; 80 °C: pH 6,0) und mit Citrat-Phosphat-Puffer bei 6,0 (20 °C; 80 °C: pH 6,0) (Anhang Abbildung 7.5.1 A–C). Unter Reaktionsbedingungen (wie in Klammern gezeigt: bei ca. 80 °C gemessen) entsprach der pH Wert beider Puffer einem Wert von 6,0 (Berk 2020; Anhang Abbildung 7.5.1 D–F). Die Enzyme zeigten mit MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂, NiSO₄ erhöhte Aktivitäten (Abbildung 3.6.5), sowie kompletten Aktivitätsverlust mit 5 mM EDTA, der durch Zugabe von CaCl₂ wieder komplementiert werden konnte (Fida 2018). Dies zeigt, dass zweiwertige Kationen essenziell für die Katalyse, oder aber auch für die korrekte Faltung sind.

Im Gegensatz zur Spaltung von *p*NPG konnten für die Spaltung von *p*NPA auch nach Zugabe von Calciumionen keine **kinetischen Parameter** bestimmt werden. Die niedrigste Enzymkonzentration, die bei der höchstmöglichen *p*NPA-Konzentration eingesetzt werden konnte, um noch einen messbaren Absorptionsunterschied zu generieren, resultierte in einem linearen Anstieg der Aktivität mit steigender Substratkonzentration. Dies lässt darauf schließen, dass noch keine Substratsättigung erreicht wurde, die eine wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung der kinetischen Parameter nach Michaelis-Menten darstellt (Li 2017).

Zum einen war die spezifische Aktivität so gering, dass Reaktionen mit geringen Enzymmengen zur Aufrechterhaltung der Substratsättigung innerhalb der Zeit, in der *p*NPA bei diesen hohen Temperaturen (90 °C, 82 °C und 93 °C) stabil war, nicht gemessen werden konnten. Andererseits führte eine Erhöhung der Substratkonzentration allein zu höheren Absorptionswerten. Eine Subtraktion der Substratkontrollen ohne Enzym war bei solchen Reaktionen nicht mehr möglich. Zunächst wurde die Standard-Enzymkonzentration von 0,1 µg/µl (2,65 µM) mit *p*NPA in Endkonzentrationen zwischen 0

und 10 mM für 10, 20 und 30 min bei 90 °C, der optimalen Temperatur für Cs_Abf159A, inkubiert (Abbildung 3.6.4 A). Die Standardabweichungen von Triplikaten waren unter diesen Reaktionsbedingungen akzeptabel (unter 5 %). Bei der Messung nach 10 min stieg die spezifische Aktivität linear mit zunehmender Substratkonzentration an, was bedeutet, dass die Substratsättigung nicht erreicht wurde. Bei den Kurven, die nach einer Inkubationszeit von 20 und 30 min erstellt wurden, zeigten die Kurven jedoch eine Abflachung, was bedeutet, dass die Enzyme mit der Zeit an Aktivität verloren. Daher wurden die Reaktionen in den folgenden Experimenten nach 10 min gestoppt. Die Möglichkeiten zur Schaffung von Bedingungen zum Erreichen von Substratsättigungen bestehen darin, entweder die Substratkonzentrationen zu erhöhen oder die Enzymkonzentrationen zu senken. Da pNPA in DMF gelöst wurde, waren die limitierenden Faktoren für höhere Substrat-Endkonzentrationen die Instabilität des löslichen pNPA in Konzentrationen über 1 M und die Menge an DMF, die 2 % der Reaktion nicht überschreiten sollte (reproduktionsgefährdend). Die höchste Substratkonzentration betrug daher 20 mM (1 µl von 1 M pNPA in DMF in einem Gesamtvolumen von 50 µl). Bei einer über 100-fachen Verringerung der Enzymkonzentrationen auf 1 ng/µl (0,027 µM) waren die Kontroll-korrigierten Werte nicht mehr geeignet, um Produktkonzentrationen, Reaktionsgeschwindigkeiten oder spezifische Aktivitäten zu berechnen. Grund hierfür war, dass die Leerwert-korrigierten A405 nm-Werte die für eine statistische Signifikanz notwendigen Differenzwerte nicht mehr erreichten. Weitere Ansätze mit bei 50 °C vorinkubierten Enzymen veränderten die Werte unwesentlich. Und auch wenn die Kurven teils bei höheren Substratkonzentrationen abflachten, ergaben sich in der *Lineweaver-Burk* Auftragung ($1/[\text{Reaktionsgeschwindigkeit}]$ gegenüber $1/[\text{Substratkonzentration}]$ aufgetragen) teils negative Werte für den Y-Achsenabschnitt, der „ $1/V_{\text{max}}$ “ darstellt.

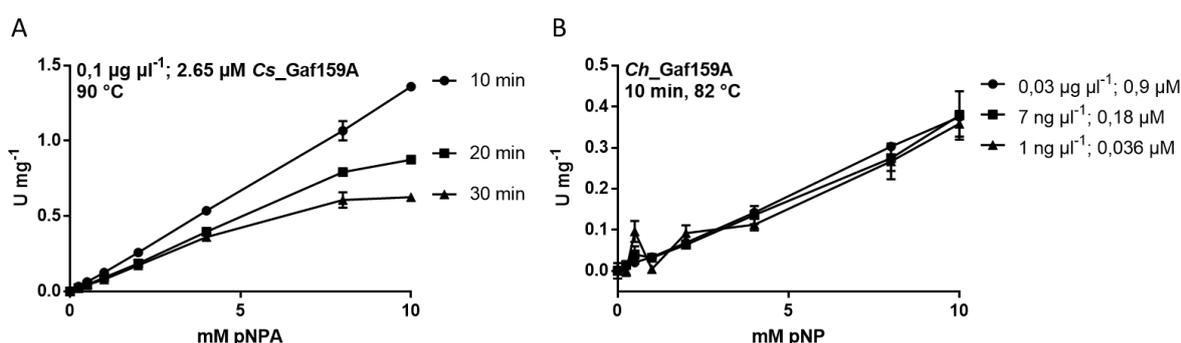


Abbildung 3.6.4 Reaktionen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Gaf gegenüber pNPA. **(A)** Standardreaktionen mit Cs_Gaf159A wurden bei dem 20 min Temperaturoptimum für 10, 20 und 30 min inkubiert. **(B)** Ansätze mit 3- bis 100-mal weniger Enzym innerhalb von 10 min bei dem. A und B entsprechen A und C in supplementary Figure S 4 in Baudrexl et al. (2022).

Da die Reaktionen mit 0,9 μM , 0,18 μM und 0,036 μM Enzym (*Ch_Abf159A*) und bis zu 10 mM *pNPA* nullter Ordnung blieben, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Substratkonzentration war, lässt sich daraus schließen, dass die dort eingesetzte Substratkonzentration von 10 mM noch unterhalb der Michaelis-Menten-Konstante K_M liegt (Li 2017). Somit lag K_M für die Arabinosidaseaktivität der drei Galaktofuranosidasen wahrscheinlich deutlich höher als 10 mM. Für eine Substratsättigung müsste ungefähr das 100-fache der K_M -Konzentration eingesetzt werden, also mehr als 1 M *pNPA* (Bisswanger 2014).

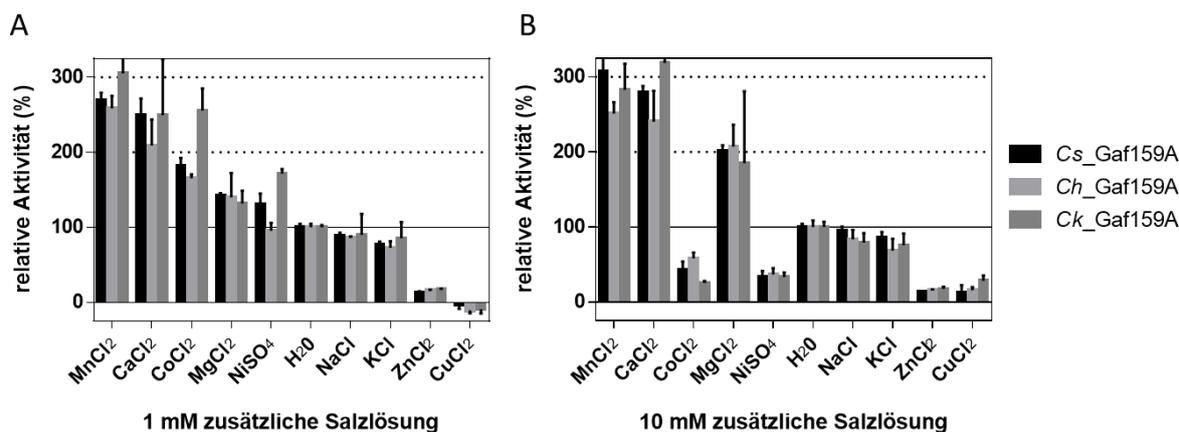


Abbildung 3.6.5 Einfluss verschiedener Salzlösungen auf die *pNPAase*-Aktivität von *Cs_Gaf159A* (bei 90 °C), *Ch_Gaf159A* (bei 82 °C) und *Ck_Gaf159A* (bei 93 °C). Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym, 0,1 M MOPS pH 6,5, 1 mM *pNPA* wurden entweder mit zusätzlich 1 mM (A), oder 10 mM (B) Salzlösung für 20 min bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen von Triplikaten. Entspricht Figure 3 in Baudrexel et al. (2022)

Um die Beständigkeit der untersuchten Enzyme gegen **Hitzeinaktivierung** zu untersuchen, wurden Enzymlösungen für verschiedene Zeiten bei gewissen Temperaturen vorinkubiert und deren Restaktivität gegenüber *pNPA* bestimmt. Die von Fida (2018) ermittelten Aktivitäten, die ohne zusätzlichem Calcium generiert wurden, zeigen, dass die Enzyme durch eine Inkubation bei 70 °C für 4 h eine um das 1,4–1,6-fach steigende Aktivitäten gegenüber *pNPA* zeigten, was auf die Adaptierung der Enzyme schließen ließ. Wurden die Enzyme für den gleichen Zeitraum bei 95 °C inkubiert, verlor *Cs_Gaf159A* kaum Aktivität, für *Ch_Gaf159A* war schon nach 15 min keine Aktivität mehr feststellbar und für *Ck_Gaf159A* sank die Aktivität kontinuierlich, bis nach 4 h kaum noch Aktivität vorhanden war (Fida 2018). Ähnliche Trends wurden auch für die Aktivitäten der Enzyme in Anwesenheit von zusätzlichen Calciumionen beobachtet, jedoch wurden die Enzyme bei ihrem nach 20 min bestimmten Temperaturoptimum und nicht bei 70 °C oder 95 °C vorinkubiert (Abbildung 3.6.6 A). Über einen Zeitraum von 24 h behielt *Cs_Gaf159A* wie zuvor ohne zusätzliche Calciumionen immer mindestens 80 % seiner ursprünglichen *pNPAase*-Aktivität (Berk 2020). Die Restaktivitäten von *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* nach 5 h betragen noch 50 % und 38 %, und nach 24 h 10 % und 8 % (Abbildung 3.6.6). Die Handhabung der vorinkubierten Proben scheint hier von großer Bedeutung zu sein, da ein Abkühlen (auf 20 °C, oder sogar auf 0 °C auf Eis) während der Zugabe des Substrates zu einer

Rückfaltung nach einer möglichen temperaturinduzierten reversiblen Entfaltung geführt haben könnte. Das würde die gleich hohe Aktivität von *Cs_Gaf159A* vor und nach 24-stündiger Inkubation bei seinem Temperaturoptimum erklären. Wie in Abschnitt 3.6.6 beschrieben, wurde daraufhin die Stabilität der Enzyme bei steigenden Temperaturen mittels Schmelzkurven durch DSF bestimmt.

Toleranzen gegenüber höheren Konzentrationen des Reaktionsprodukts sind für nahezu alle Anwendungen von Enzymen von Vorteil. Die **Produktinhibition** durch Arabinose scheint für die Arabinofuranosidaseaktivität der drei untersuchten Galaktofuranosidasen kein limitierender Faktor zu sein (Abbildung 3.6.6 B). Selbst in Anwesenheit von 500 mM bis 1 M Arabinose zeigten alle drei Enzyme noch zwischen 30 % und 50 % der ohne Arabinosezusatz gemessenen Aktivitäten. Vielleicht kommt die Tatsache, dass es sich bei Arabinofuranosylresten nicht um das favorisierte Substrat handelt, einer geringeren Produktinhibition zugute.

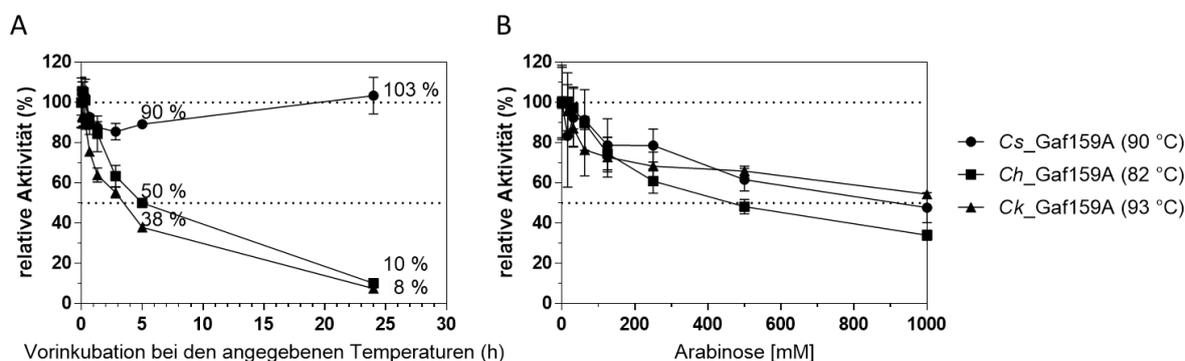


Abbildung 3.6.6 Temperatur-, oder Arabinose- induzierte Inaktivierung von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A*. Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1x RP, 1 mM pNPA und 1 mM CaCl_2 wurden für 20 min bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Die Enzyme wurden entweder für die angegebene Zeit bei der jeweiligen optimalen Temperatur vorinkubiert, bevor Substrat zugegeben wurde (A), oder die Reaktionen enthielten zusätzlich verschiedene Arabinosekonzentrationen (B). Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen von Triplikaten. Diese Abbildung entspricht supplementary Figure S 3 in Baudrexel et al. (2022)

Um die **Temperatur-induzierte Entfaltung** der Enzyme zu untersuchen, wurden Schmelzkurven mit *Differential Scanning Fluorimetry* aufgenommen. Diese ergaben für *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* Schmelztemperaturen von 95,5 °C, 92,5 °C bzw. 99 °C, womit diese jeweils 5,5 °C, 10,5 °C bzw. 6 °C über dem jeweils ermittelten Temperaturoptimum der Aktivität (20 min Assay) liegen (Abbildung 3.6.7).

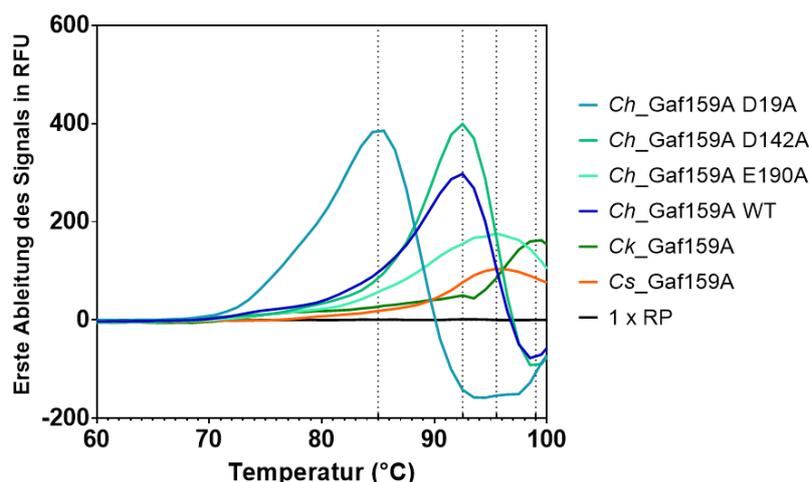


Abbildung 3.6.7 Schmelztemperaturbestimmung von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A*, *Ck_Gaf159A* und *Ch_Gaf159A*-Mutanten. *Differential Scanning Fluorimetry* wurde mit 4 μ M Enzym durchgeführt. Die Temperatur wurde zunächst 5 min bei 50 °C gehalten, dann wurde sie alle 15 sec um 1 °C erhöht und die Fluoreszenz gemessen. Die Schmelzpunkte wurden durch Bildung der ersten Ableitung und Glättung zweiter Ordnung in GraphPad Prism als Peaks visualisiert (First derivative with 2nd order smoothing). Die Abbildung entspricht Figure 6 in Baudrexel et al. (2022)

3.6.3 Aktivität gegenüber AXOS

Da die Aktivität von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* gegenüber dem künstlichen, niedermolekularen Substrat *p*NPA gezeigt werden konnte, sollte das Verhalten gegenüber natürlichen Arabinose-enthaltenden Oligosacchariden getestet werden. Es wurden sechs verschiedene AXOS (Arabinoxylooligosaccharide) eingesetzt, die jeweils einen an C3, oder an C2, oder an C3 und C2 doppelt arabinosylierten Xyloserest enthielten, der sich entweder am reduzierenden Ende (A^3X , A^2XX , $A^{2,3}XX$), oder eine Position vom reduzierenden Ende entfernt (XA^3XX , XA^2XX , $XA^{2,3}XX$), befand. Chromatogramme aller Reaktionen sind im Anhang gezeigt (Abbildung 7.5.2). Von allen drei Enzymen wurden nur A^3X und $A^{2,3}XX$ umgesetzt. Mit A^3X wurden jeweils Arabinose und Xylobiose freigesetzt, mit $A^{2,3}XX$ entstanden Arabinose und A^2XX . Daraus kann gefolgert werden, dass nur 1,3-Bindungen von endständigen Xyloseresten hydrolysiert werden können, oder aber, dass kürzere Substrate präferiert werden. Um dies zu überprüfen, müssten noch weitere AXOS getestet werden, die entweder die Substitution am reduzierenden Ende tragen und länger sind (wie A^3XX , A^3XXX und $A^{2,3}XXX$, oder $A^{2,3}XXXX$), oder Xylotriosen und Xylobiosen (also kürzere Rückgrate), deren Arabinose(n) sich am zweiten Xyloserest befinden. Aufgrund fehlender Verfügbarkeiten wurde dies jedoch nicht durchgeführt.

3.6.4 Untersuchung der Aktivität gegenüber Arabinogalaktan und anderen Arabinose enthaltenden Polysacchariden

Um die mögliche Aktivität der drei Galaktofuranosidasen gegenüber Arabinose enthaltenden Polysacchariden zu untersuchen, wurden Arabinoxylan (AX), Arabinan und Arabinogalaktan als Substrate eingesetzt. Eine geringfügig größere Menge an reduzierenden Zuckern im Vergleich zur

Substratkontrolle konnte nur mit Letzterem festgestellt werden, weshalb die Produkte mittels HPAEC-PAD aufgetrennt wurden. Alle drei Enzyme setzten ausschließlich geringe Mengen Arabinose (5,3–6,8 mg/l) von 5 g/l Arabinogalaktan frei (Abbildung 3.6.8).

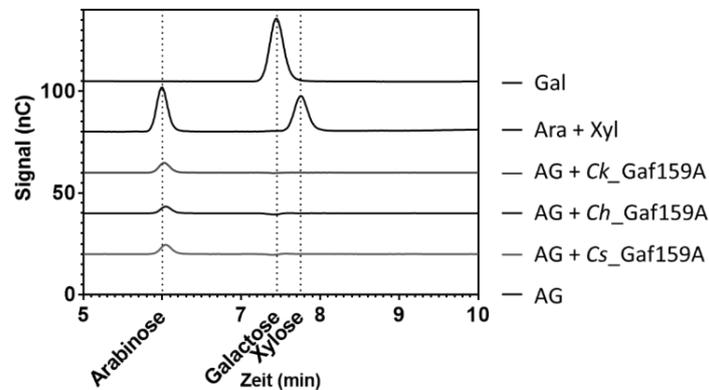


Abbildung 3.6.8 HPAEC-PAD Chromatogramme von Arabinogalaktanabbau mit *Cs*-, *Ch*- und *Ck*_Gaf159A. Reaktionen mit 5 g/l Arabinogalaktan, 0,1 µg/µl Enzym und 1x RP wurden 23 h bei 80 °C inkubiert und mittels Gradient 4 (Tabelle 2.5.5) getrennt. Je 50 mg/l der Zucker dienen als externer Standard. Diese Abbildung entspricht supplementary Figure S 5 in Baudrexl et al. (2022)

3.6.5 Gezielte Mutagenese bestätigt D19, D142 und E190 als katalytische Aminosäuren

Vor dieser Arbeit und der Publikation zu diesen drei GH159-Enzymen (Baudrexl et al. 2022) waren weder die Struktur von GH159-Enzymen, noch experimentelle Daten zu möglicherweise an der Katalyse beteiligten Aminosäuren verfügbar. Deshalb wurde zur Identifizierung möglicher katalytischer Aminosäuren zunächst eine HHpred-Analyse (Kapitel 2.2.2) mit *Ch*_Gaf159A durchgeführt, um mögliche Strukturhomologe zu finden. Daraufhin wurde das strukturelle Alignment mit dem Struktur-Homolog 4QQS (HoAraf43) analysiert (Abbildung 3.6.9). Die katalytischen Aminosäuren und andere sich im aktiven Zentrum befindenden Aminosäuren von HoAraf43 wurden bereits von Hassan et al. (2015) beschrieben. Die katalytische Säure wird von den Autoren als Nukleophil bezeichnet, jedoch ist bei invertierenden GH dieser Aminosäurerest für die Protonierung der Abgangsgruppe zuständig (Glycoside hydrolases - CAZypedia 2022). Diese katalytische Säure von HoAraf43, Glu195, entspricht der Position **Glu190** (E190) in *Ch*_Gaf159A; die katalytische Base Asp17 von HoAraf43 entspricht der Position **Asp19** (D19) in *Ch*_Gaf159A und Asp126 von HoAraf43 entspricht der Position **Asp142** (D142) in *Ch*_Gaf159A (Abbildung 3.6.9). Die einzige zusätzliche alignierende identische Aminosäure (grün hinterlegt) im aktiven Zentrum ist Trp85 (W85), wohingegen einige Aminosäurereste (E160, F260 und W279) jeweils nur ähnliche Eigenschaften, zu denen von HoAraf43 an dieser Stelle, aufweisen (gelb hinterlegt). Einige Aminosäurereste stimmten auch nicht in ihren Eigenschaften überein, oder fehlten im Alignment komplett (T83, V103, -, P188, -, C209 in *Ch*_Gaf159A anstatt D70, R90, W182, W184, Y215, Y220 in XynB; magenta hinterlegt). Alle nicht übereinstimmenden Aminosäuren befinden sich an den Enden, oder inmitten von vorhergesagten *Coil* Strukturen (C) (Abbildung 3.6.9).

Ergebnisse

>4QQS_B Glycoside hydrolase family 43; 5-bladed beta-propeller, glycoside hydrolase, hydrolase; HET: EPE; 1.1A {Halothermothrix orenii}; Related PDB entries: 4QQS_A
 Probab=99.90 E-value=5.4e-20 Score=150.10 Aligned_cols=263 Identities=24%
 Similarity=0.348 Sum_probs=187.3 Template_Neff=12.100

```

Q ss_pred          cccCCCC--CCCCcEEEECCcEeEeEecCccccCCCcCceEEEEeECCCCcEeCceEEec---CCCC
Q Q_1703325       8 LFRDPIYD--GAA[PT]IYNHLEKSWWILYTRRANQKLPKAFMHGTDIGIAESKDGGRWTFYRGTIELQ---YGRGR 81 (311)
Q Consensus       8 ~~~~p~~~~~ndp~V~~~~g~~~~~i~~~~~S~Dlgn~W~~~~~ 81 (311)
T Consensus       4 ~~~~nPV~~~~~dp~V~~~~~i~~~~~S~dn~W~~~~~ 68 (315)
T 4QQS_B          4 TYTNPVGGITGIGDPVYLKH--ESRYLYATSAI-----NRGFKVWESPNL-VDWELKGLALDSYYEKNWGT 68 (315)
T ss_dssp         EECSSCTTCCSBEEEEEE---TTEEEEEECCT-----TTEEEEEESSS-SSCEEEEEETTSTTCCCC
T ss_pred         cccCCCCCCCCcEeEe---CCEEEEEECc-----CCeEeEeCCc-CCeEeEecchhhcCCCC
Confidence        45688855 699999999 99999999753 34688999996 999988776542 23344
  
```

```

Q ss_pred          ceEeEEEEEEcEEEEEEcCCCCcCCcEeEEEEeECCCC-CEeEecccC-CCcEeEEEEcCCCcEEEEEE
Q Q_1703325       82 N[F]APEVIFYEGEYHMYV[F]PGVPQDWAERYIYYKSKNLWD-WEFVCKLELS-SNKVI[ACV]FQMPDGTFRMVKD 159 (311)
Q Consensus       82 ~~~~p~V~~~~~g~~~~~I~~~~~i~~~~~a~S~d~~~~~W~~~~~d~~~~~V~~~~~g~~~~~I~~~~~ 159 (311)
T Consensus       69 ~~~~p~V~~~~~g~~~~~Y~~~~~i~~~~~a~S~d~~~~~d~~~~~p~V~~~~~g~~~~~I~~~~~ 143 (315)
T 4QQS_B          69 ED[F]WAPEVIFYNNKFYMTYSARDND----GHLKIALASSKSPGPFKNIKAPLFDRLSFD[AH]IFIDQDGTPIYYVK 143 (315)
T ss_dssp         SCCEEEEEETTEEEEEEECTT-----SCEEEEEESSTTCCCEEEESSCCSSCEEEEEEECTTSCCEEEEE
T ss_pred         cCceeeEEEEECCEEEEEEEcCC-----CCEEEEEeECCCCCcccccCCcCccCccCceeeEEEECCCCcEEEE
Confidence        578899999999999999986532 24578999999987 776554332 3467899999987889999998
  
```

```

Q ss_pred          CCCC-----eEEEEEE-cCCCCcEeEcccC-CC-----CCCcEeEEEEcEEEEEEcCC-----CcEE
Q Q_1703325       160 EADH-----SYIYAAE-SNNLKDWKILGAL-TD-----R[BO]GPNVFWWKSQYWMITDPW---G[GL] 212 (311)
Q Consensus       160 ~~~~i~~~~~S~dn~~~~~i~~~~~a~S~d~~~~~p~~~~~g~~~~~I~~~~~ 212 (311)
T Consensus       144 ~~~~i~~~~~S~dn~~~~~i~~~~~a~S~d~~~~~p~V~~~~~g~~~~~I~~~~~ 223 (315)
T 4QQS_B          144 D[CS]ENIINGIHISQIYVQEMSDLLELKGDPVLAIQPSQDWEGINDA[WQ]WNEGPFVIKHEGKYMMYSANCYASPDYSIG 223 (315)
T ss_dssp         CTTTCEETTEEEEEEEBCTTSSCBCSCCEEEECSCSGGGCTTSSEEEEEEEEETTEEEEEEECTTSTTCEEE
T ss_pred         cCCcCceCCcCceEeEeCccccCCcEeEeCCCCccccccceEeEeEEEEcCEEEEEEEcCCCCcEeE
Confidence        6431 3445554 6667776433221 11 235779999999999999865 3689
  
```

```

Q ss_pred          EEEcCCCC-Ccee-c-CceecCCCCcCCcCceceEEEEECCE-EEEEEEecccCCCCChhhcCccceeeEEEEEE
Q Q_1703325       213 VYSSDAT-AWHR-H-ENILDRPGKREDDGIGHHADVLVIDE-TAYIFY[TH]PEGMETEEFWKDSKY[W]RTSLQVAKL 288 (311)
Q Consensus       213 ~~~~S~dn~~~~~W~~~~~ 288 (311)
T Consensus       224 ~~~~S~dn~~~~~W~~~~~g~~~~~Y~~~~~ 292 (315)
T 4QQS_B          224 YAVAETPLGPWIKYSGNPILSKRM--DKGISGPGHNSVTVSPDGSELFVVY[HT]HTYDPS-----PGGDRTVN--IDRL 292 (315)
T ss_dssp         EEEESSTTCCCECTTCCSBCCBG--GGTBCCCEEEEEECTTSSSEEEEEEEESCTTS-----CSSCEEE---EEEE
T ss_pred         EEEEECCCCCcccccEeC--CCcEeccccEeECCCCCEEEEEEEcCCCC-----CCCCeEE---EEEE
Confidence        99999987 5986 2 55555432 2233456777775443 38899998764321 22346666 6699
  
```

```

Q ss_pred          EEEcCEEEcCCC
Q Q_1703325       289 EYVDGKVVCDRDK 301 (311)
Q Consensus       289 ~~~~ 301 (311)
T Consensus       293 ~~~~ 305 (315)
T 4QQS_B          293 YFEDGILKVKGPT 305 (315)
T ss_dssp         EEETTEEEEECC
T ss_pred         EEEcCEEEcCCC
Confidence        998888877653
  
```

Abbildung 3.6.9 HHpred-Alignment von *Ch_Gaf159A* (Query Q; ADQ06027.1) mit HoAraf43 (Target T; PDB: 4QQS). Markierung: **Rot**: AS befinden sich laut Hassan et al. (2015) im aktiven Zentrum von HoAraf43, **grün**: AS befindet sich in *Ch_Gaf159A* an gleicher Position, **magenta**: AS in *Ch_Gaf159A* ist nicht ähnlich, oder fehlt, **gelb**: AS in *Ch_Gaf159A* hat ähnliche Eigenschaften zu der AS von HoAraf43 an dieser Stelle. Abbildung entspricht Figure S 7 in Baudrex et al. (2022)

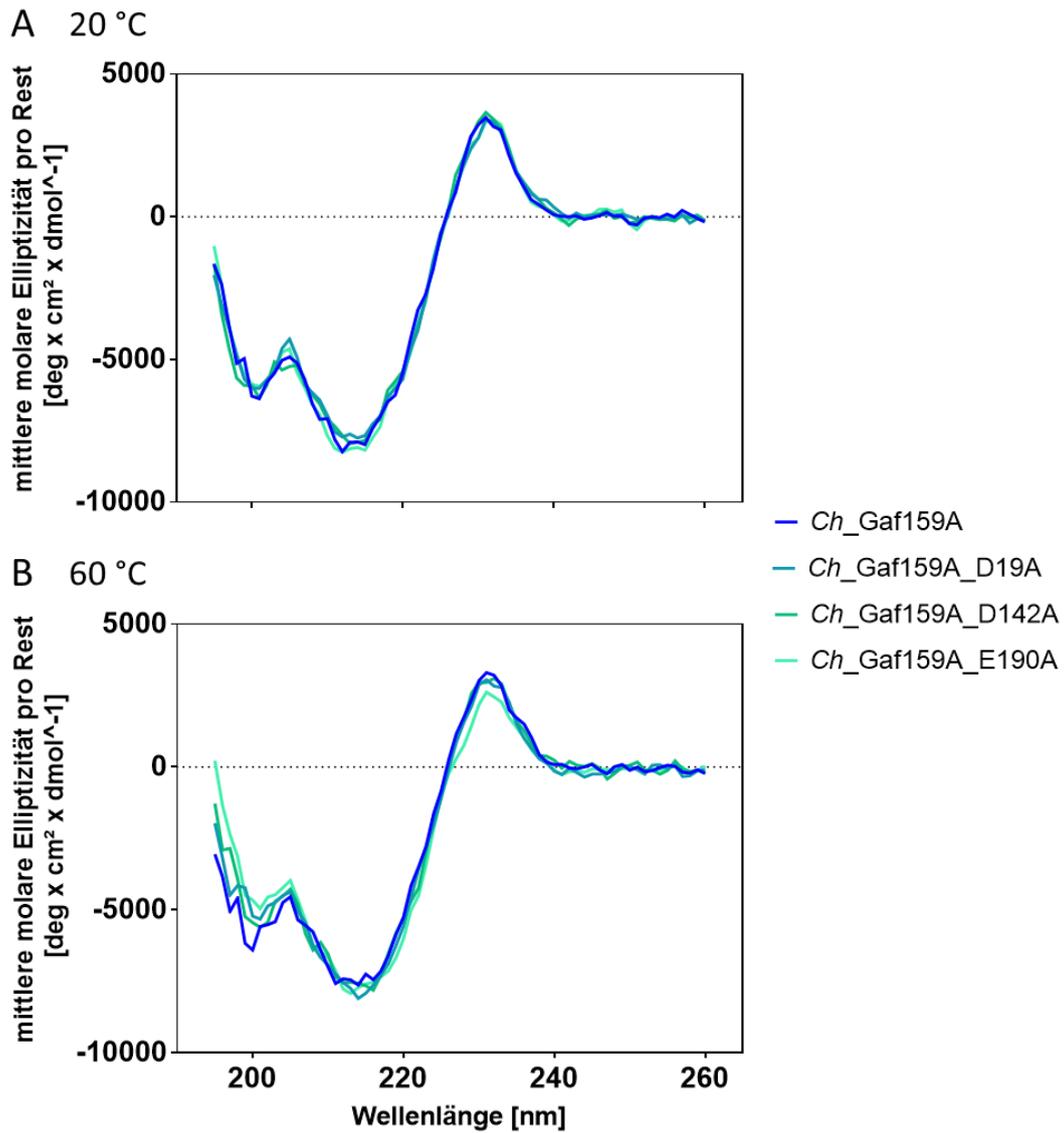
Durch PCR-vermittelte Mutagenese wurden gezielt drei Mutanten erstellt, die jeweils die kleine, neutrale Aminosäure Alanin anstelle der postulierten katalytischen Aminosäuren besaßen: *Ch_Gaf159A_D19A*, *Ch_Gaf159A_D142A* und *Ch_Gaf159A_E190A*.

Alle drei Mutationen, D19A, D142A und E190A, führten zur kompletten Inaktivierung von *Ch_Gaf159A*. Es konnte für die Mutanten weder auf *pNPG* und *pNPA*, noch gegenüber den AXOS A³X und A^{2,3}XX (Abbildung 7.5.3), oder Arabinogalaktan (Abbildung 7.5.4) Aktivität gezeigt werden.

3.6.6 Aktivitätsverlust durch Substitution von D19, D142 und E190 in *Ch_Gaf159A* mit Alanin ist nicht auf inkorrekte Faltung zurückzuführen

Um zu überprüfen, ob der Aktivitätsverlust auf eine inkorrekte Faltung zurückzuführen war, wurden die Schmelztemperaturen und die Gesamtfaltung der Mutanten analysiert. Wie in Abbildung 3.6.7 zu sehen, konnte für die Mutation D142A mit einer T_m von 92,5 °C kein verändertes Schmelzverhalten im Vergleich zum *Ch_Gaf159A* Wildtyp festgestellt werden, während für die D19A Mutante ein um 7,5 °C niedrigerer T_m -Wert (85 °C) und für die E190A Mutante ein um 3 °C erhöhter T_m (95,5 °C) bestimmt wurde (Abbildung 3.6.7).

Dass sich jedoch die Gesamtstruktur und die jeweiligen Anteile an Sekundärstrukturelementen durch die Mutationen nicht verändert haben, konnte mittels Zirkulardichroismus gezeigt werden. Die CD-Spektren aller drei Mutanten, die bei 20 °C (Abbildung 3.6.10 A) und 60 °C (Abbildung 3.6.10 B) aufgenommen wurden, verlaufen nahezu identisch zu denen des Wildtyps. Die daraus abgeleiteten Anteile an Sekundärstrukturen lagen bei jeweils ca. 31–32 % für antiparallele β -Faltblattstrukturen, 35–36 % für Random Coils und 21 % für β -Schleifen, während auch geringere Anteile an α -Helices und parallelen β -Faltblattstrukturen bestimmt wurden (Abbildung 3.6.10 B). Zusammen mit den oben geschilderten Aktivitäts- und T_m -Daten der Mutanten, verglichen mit dem Wildtypenzym, kann gefolgert werden, dass die Aminosäuren D19, D142 und E190 in *Ch_Gaf159A* einen direkten Einfluss auf die Katalyse haben. Diese Erkenntnis kann wiederum auf andere in GH159 gelisteten Enzyme übertragen werden.



C

Ch_Gaf159A				
195-260 nm	WT	D19A	D142A	E190A
Helix	8,60%	8,50%	8,40%	8,80%
Antiparallel	31,70%	31,50%	31,60%	31,30%
Parallel	4,70%	4,70%	4,70%	4,80%
Beta-Schleife	21,30%	21,30%	21,40%	21,20%
Random-Coil	35,10%	35,50%	35,40%	35,20%
Gesamtsumme	101,40%	101,50%	101,50%	101,30%

Abbildung 3.6.10 Sekundärstrukturvergleich zwischen Wildtyp und mutierten *Ch_Gaf159A*-Derivaten durch Zirkulardichroismus (CD). CD-Spektren wurden mit 0,1 g/l Protein unter Stickstofffluss bei Temperaturen von 20 °C (**A**), oder 60 °C (**B**) generiert und stellen das Mittel aus 10 Messungen dar. Die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturmerkmale konnte durch Auswertung mittels CDNN (complex reference spectra) ermittelt werden (**C**). Die CD-Messungen wurden freundlicherweise von Walter Stelzer (Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, Technische Universität München) durchgeführt. Abbildung entspricht Figure 9 in Baudrexel et al. (2022)

3.6.7 Kristallisierung von *Ch_Gaf159A*

Da die drei Enzyme *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* in eine neue, bisher nicht näher charakterisierte GH-Familie, GH159, eingeordnet wurden und bisher keine Strukturen von Vertretern dieser Familie bekannt waren, sollte die dreidimensionale Struktur eines der Enzyme aufgeklärt werden. Für die Strukturaufklärung mittels Synchrotron-Strahlen werden Proteinkristalle benötigt, die nur in hochkonzentrierten Enzymlösungen gebildet werden. Für die Produktion entsprechend großer Enzymmengen, die dafür nötig sind, wurde *Ch_Gaf159A* gewählt, da für dieses Enzym die höchsten Ausbeuten erzielt wurden.

3.6.7.1 Aufklärung der Apostruktur von *Ch_Gaf159A*

In Zusammenarbeit mit Professor Groll (Lehrstuhl für Biochemie, Garching) wurde ein Screening nach geeigneten Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden unterschiedlich hohe Proteinkonzentrationen zu vordefinierten Präzipitantenmischungen mit unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen an chaotropen Salzen, Polymeren, und/oder Detergenzien miteinander in speziellen Mikrotiterplatten (Material und Methoden Abschnitt 2.5.12) gemischt. Mit einer Anfangs-Proteinkonzentration von 19 µg/µl (eingesetzt: 38 µg/µl in Kristallisationspuffer) bildeten sich auf Platte 3 (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.5.12) in Vertiefung H12 (Pufferlösung aus 100 mM 2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure, pH 6,5 und 12 % (w/v) PEG 20000) innerhalb von 2 Wochen zwei 300 µm × 100 µm × 100 µm große tetragonal-dipyramidale Kristalle (Abbildung 3.6.11 A), die Synchrotronstrahlung mit 1,7 Å beugten, wodurch sich das Diffraktionsmuster in Abbildung 3.6.11 B ergab. In einem weiteren Ansatz mit 11 µg/µl *Ch_Gaf159A* (22 µg/µl in Kristallisationspuffer mit 5 % Glycerol eingesetzt) bildeten sich einige in Abbildung 3.6.11 C gezeigten Kristalle anderer Struktur in 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Tri-Natriumcitrat pH 5,6 und 30 % (v/v) 2-Methylpentan-2,4-diol (Platte 3, Well B5), die jedoch nicht weiter verwendet wurden.

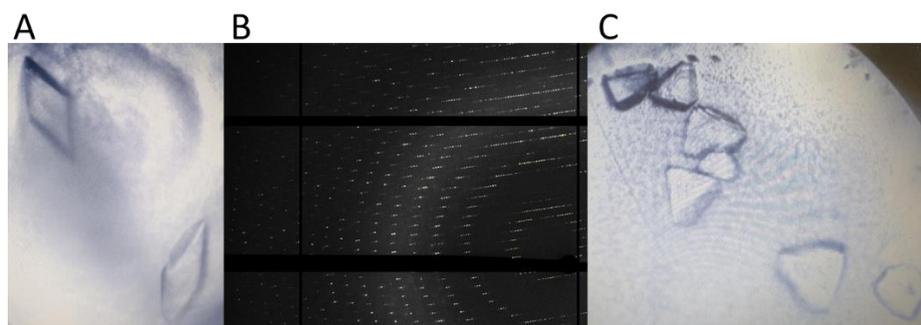


Abbildung 3.6.11 Kristalle und Diffraktionsmuster zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von *Ch_Gaf159A*. **(A)** Kristalle bildeten sich in H12 der Classic Suite Refill-Hit Solutions 96-Well Mikrotiterplatte. **(B)** Einer der Kristalle aus (A) streute Synchrotron-Licht in dem gezeigten Muster. **(C)** In Well B5 derselben Platte bildeten sich tetraedrische Kristalle.

Durch molekularen Ersatz der Diffraktionsdaten gelang es, die Struktur mit einer Auflösung von 1,7 Å zu bestimmen. Mittels EMBL-DALI Suche wurde einige Enzyme mit ähnlicher Topologie gefunden. Die

ersten zwei Treffer stellten Sequenzen dar, die in GH43 klassifiziert sind. Eine GH43_26 Exo- α -1,5-L-Arabinofuranosidase (PDB ID: 3AKI) (Fujimoto et al. 2010) und eine mit Xylobiose komplexierte E186Q-Mutante der β -Xylosidase XynB von *Bacillus pumilus* (PDB ID: 5ZQX) aus GH43_11 (Hong et al. 2018). Aus diesen Daten konnten die Koordinaten (Table S 4 in Baudrexel et al. (2022)) berechnet werden, die einer dreidimensionalen Struktur eines 5-fachen β -Propellers entsprachen (Abbildung 3.6.12 A). Die Apostruktur ist unter der PDB-Nummer 7ZEI öffentlich zugänglich. (Baudrexel et al. 2022)

Die fünf β -Faltblatt-Propellerblätter setzen sich aus je 45 meist antiparallelen β -Strängen zusammen und bilden eine tunnelartige Struktur, in deren Mitte sich ein Metallion befindet. Da kein anomales Signal detektiert wurde, was auf Mangan, Cobalt, oder Nickel hätte schließen lassen, und Magnesium experimentell einen weniger aktivierenden Effekt auf *Ch_Gaf159A* als Calcium hatte, wurde das Ion als Ca^{2+} modelliert. Es befindet sich von „vor der Ebene“ betrachtet hinter den drei beschrifteten katalytischen Aminosäuren. Ein kleiner Teil des N-Terminus scheint noch einen β -Strang als Teil des fünften Propeller-Blattes zu bilden, was vielleicht nicht ganz als molekularer Klettverschluss (Goyal et al. 2016) bewertet werden kann, jedoch als Verschluss des Propellers zu dienen scheint (Abbildung 3.6.12 A).

Eine Überlagerung mit der Struktur von XynB (Abbildung 3.6.12 B) zeigt, dass die AS-Rückgrate von *Ch_Gaf159A* und XynB fast identisch sind. Jedoch scheinen die „variablen Schleifenregionen“ der Propeller-Blätter 1,2,3 und 4, die sich jeweils auf der Seite des aktiven Zentrums auf der Oberseite des „Tunnels“ befinden, in *Ch_Gaf159A* jeweils kompakter zu sein, und die von Propeller-Blatt 5 in Richtung des Zentrums geklappt zu sein.

Die Aminosäuren D19, D142 und E190 entsprechen den Aminosäuren D14, D127 und E186Q in XynB (Abbildung 3.6.12 C), die für dieses Enzym als katalytische Aminosäuren beschrieben wurden (Hong et al. 2018). Die in der Struktur von XynB (5ZQX) komplexierte Xylobiose zeigt die wahrscheinlichen Substrat-Bindepositionen in *Ch_Gaf159A* für das Arabinose-, bzw. das Galaktofuranose-Glykon (-1) und das Aglykon (+1). Da in β -D-Xylp und α -L-Araf, sowie in β -D-Galf die Ringsubstituenten ähnlich orientiert sind, kann eine ähnliche Interaktion mit den katalytischen AS vermutet werden. Nahe dem katalytischen Zentrum befindet sich außerdem ein Histidinrest (H244), der mit dem Calciumion interagiert (Abbildung 3.6.12 C).

Neben (in Abbildung 3.6.12 D unter) der Substratbindetasche, in die das abzuspaltende Ende des Zuckers ragt, befindet sich eine weitere elektronegative Tasche.

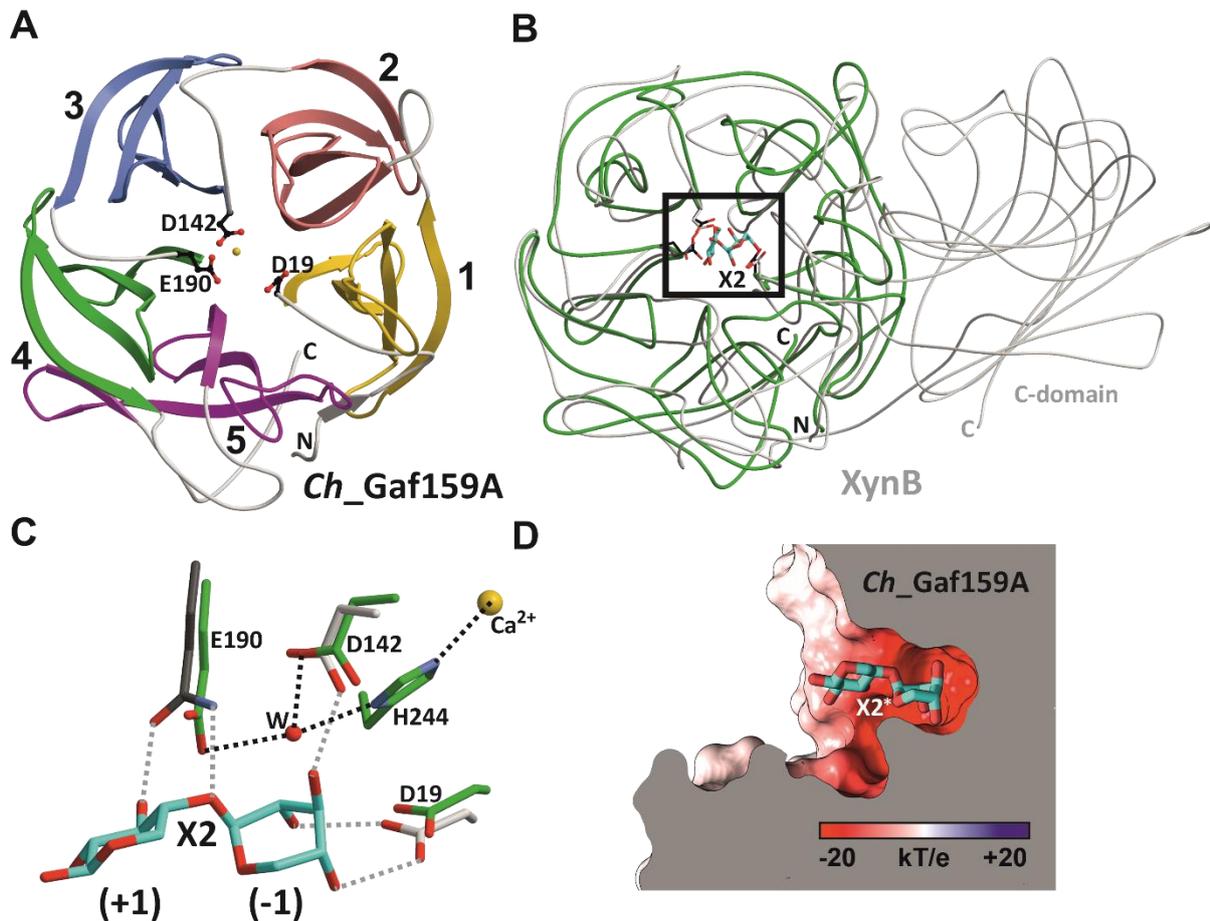


Abbildung 3.6.12 Dreidimensionale Struktur von *Ch_Gaf159A* (PDB: 7ZEI). **(A)** ‚ribbon‘ Darstellung der 5-fachen β -Propeller Struktur eines Monomers mit zentralem Metallion (modelliert als Ca^{2+} ; gelbe Kugel). Katalytische Aminosäuren sind als ‚ball and stick‘ gezeigt. Nummerierung der Propellerblätter beginnend am N-Terminus. **(B)** Überlagerung der E186Q Mutante einer β -Xylosidase (XynB; PDB: 5ZQX; grau) in Komplex mit Xylobiose (X2; cyan) mit *Ch_Gaf159A* (grün). **(C)** Zoom in das in (B) markierte aktive Zentrum (schwarzes Rechteck). Wasserstoffbrückenbindungen zu den katalytischen AS koordinieren X2 (graue gestrichelte Linien) in der Struktur von XynB E186Q (Glutamin in dunkelgrau), während in 7ZEI die funktionellen Gruppen von E190, D142 und H244 mit einem Wassermolekül (rot) interagieren (schwarze gestrichelte Linien). **(D)** Oberflächenrepräsentation des aktiven Zentrums je nach positivem oder negativem elektrostatischem Potential farblich markiert. Figure 8 in Baudrexel et al. (2022).

Da die Entfernung der allgemeinen katalytischen Base und der allgemeinen katalytischen Säure teilweise einen Aufschluss über den tatsächlichen Mechanismus der hydrolytischen Spaltung geben kann, wurden die Abstände der drei putativ katalytischen Aminosäurereste untersucht (Tabelle 3.6.1). Es ergaben sich Werte von 6,1–8,0 Å zwischen E190 und D19 (im Mittel 7,2 Å), während D19 und D142 mit durchschnittlich 6,1 Å ähnlich weit entfernt voneinander liegen. Etwas geringer sind die Distanzen mit 3,8–5,95 Å und durchschnittlich ca. 4,9 Å zwischen E190 und D142. Jedoch liegen die Distanzen jeweils in Bereichen, die bereits für sowohl invertierende als auch retendierende Glykosidhydrolasen beschrieben worden sind (Mhlongo et al. 2014).

Ergebnisse

Tabelle 3.6.1 Abstände zwischen den drei putativ katalytischen Aminosäuren von *Ch_Gaf159A*.

AS 1	O-Atom AS 1	AS 2	O-Atom AS 2	Distanz in Å	MW in Å
E190	1	D19	1	6,1	7,15
E190	1	D19	2	7,19	
E190	2	D19	1	7,34	
E190	2	D19	2	7,97	
E190	1	D142	1	5,95	4,875
E190	1	D142	2	4,54	
E190	2	D142	1	5,21	
E190	2	D142	2	3,8	
D19	1	D142	1	5,97	6,05
D19	1	D142	2	6,12	
D19	2	D142	1	5,52	
D19	2	D142	2	6,59	

Es wurde jeweils der Abstand zwischen zwei Sauerstoffatomen (O-Atom) der Aminosäure 1 (AS 1) und O-Atom der AS 2 in Chimära angezeigt und der Mittelwert (MW) gebildet

3.6.7.2 Versuch der Ligandierung von *Ch_Gaf159A* mit E190Q und H244N Mutanten

Wie bereits beschrieben, wurde durch den Vergleich der Apostruktur von *Ch_Gaf159A* mit dem PDB Eintrag 5ZQX E190 als mögliche katalytische Aminosäure ermittelt. Es wurde weiterhin versucht, eine Co-Kristallisierung mit dem Substrat durchzuführen, um eine ligandierte Struktur zu erhalten. Damit beim Kristallisationsprozess das Substrat nicht umgesetzt wird, wurde beschlossen, die Mutation E190Q einzuführen. Glutamin und Glutamat weisen strukturelle Ähnlichkeit auf, mit dem Unterschied, dass die Seitenketten-Carboxylgruppe im Glutamat im Glutamin durch eine Amidgruppe ersetzt ist. Im Gegensatz zum Glutamat ist Glutamin aufgrund der fehlenden Ladung nicht zur Katalyse geeignet. Zudem wurde His244 als eine wichtige Aminosäure zur Substratbindung identifiziert, weshalb auch diese zu einer ebenfalls polaren, ähnlichen, aber nicht zur Protonierung befähigten Aminosäure, in diesem Falle Asparagin, mutiert werden sollte.

Die Klonierung erfolgte nach PCR-basierter, ortsgerichteter Mutagenese mit den Primerpaaren 21, 22 für *Ch_Gaf159A_E190Q* und 23, 24 für *Ch_Gaf159A_H244N*. Die Produktion, Ausbeute und Reinigung der mutierten Enzyme unterschieden sich nicht von denen des Wildtyps.

Aktivitätstests mit diesen Mutanten zeigten den kompletten Aktivitätsverlust der **E190Q Mutante** gegenüber den pNP-Glykosiden und A³X, der auch bereits für die E190A-Mutante festgestellt worden war. Eine Hydrolyse von A^{2,3}XX zu geringen Mengen an A²XX fand wie in Abbildung 3.6.13 zu sehen zwar statt, war jedoch zu schwach um quantifizierbar zu sein. Wurde Arabinogalaktan (5 g/l) als Substrat verwendet, wurde nach 23 h bei 80 °C mit 0,8 mg/l Arabinose eine gerade noch messbare, jedoch sehr geringe Produktkonzentration freigesetzt (siehe Abbildung 7.5.4). Diese entspricht etwa 12 % der in der gleichen Zeitspanne durch den Wildtyp freigesetzten Konzentration (6,8 mg/l).

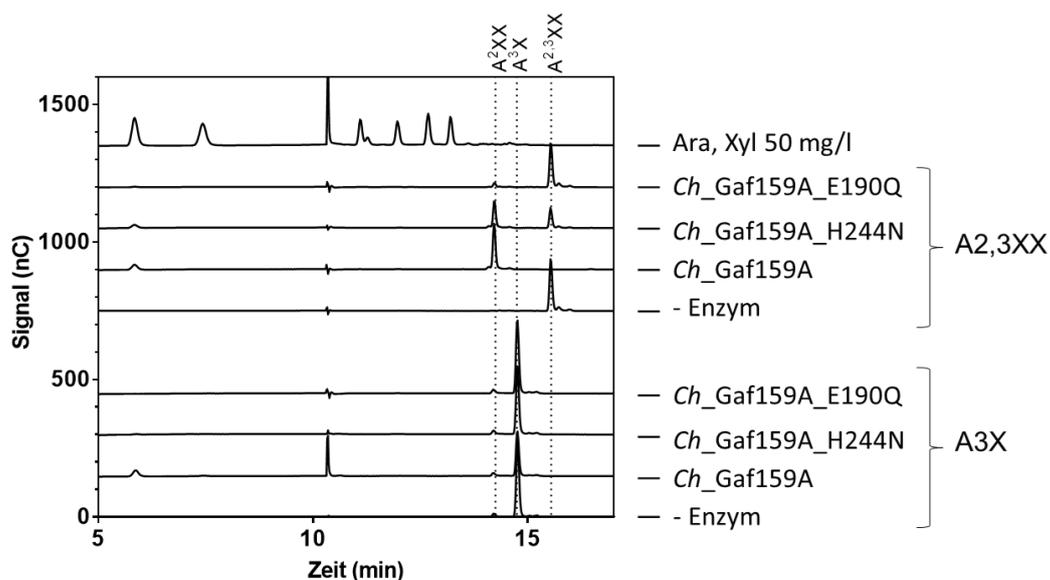


Abbildung 3.6.13 HPAEC-PAD Chromatogramme der Produkte der Verdauung von AXOS mit *Ch_Gaf159A* und den E190Q und H244N „Kristallisationsmutanten“ des Enzyms. Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym, 0,01 % AXOS, 1 x RP, zusätzlich 1 mM CaCl_2 wurden für 23 h bei 75 °C inkubiert. Mittels Gradienten 2 (Tabelle 2.5.5) wurden die Edukt- und Produkt-Saccharide aufgetrennt.

Die **H244N-Mutante** hingegen zeigte deutliche Aktivität auf allen Substraten außer A^3X (siehe Abbildung 3.6.13). Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym hatte *Ch_Gaf159A_H244N* noch 6 % der Aktivität gegenüber *pNPG*, 10 % gegenüber *pNPA* und setzte nach 23 h ca. 40 % der Arabinose (2,8 mg/l) von Arabinogalaktan frei (Abbildung 7.5.4). $\text{A}^{2,3}\text{XX}$ wurde durch die H244N-Mutante unvollständig zu A^2XX und Arabinose umgesetzt (Abbildung 3.6.13), wobei im Vergleich zur Konzentration mit WT-*Ch_Gaf159A* etwa 58 % Arabinose entstand. Dieser unvollständige Aktivitätsverlust passt zu der Annahme, dass es sich bei His244 um einen Aminosäurerest handelt, der wichtig für die Substratbindung ist.

Da der jeweilige Aktivitätsverlust gegenüber dem natürlichen Substrat vielversprechend für eine Kristallisierung mit dem Substrat im aktiven Zentrum des Enzyms ist, wurde für die Kristallisationsansätze $\text{A}^{2,3}\text{XX}$ verwendet. Ansätze mit *Ch_Gaf159A_E190Q* wurden mit einer Mischung aus 350 μl Protein (38,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 17,5 μl $\text{A}^{2,3}\text{XX}$ (100 mM) pipettiert. Jedoch bildeten sich in keinem der Wells von Platte 3, 4, 8 oder 9 Kristalle. Auch mit der Mutante *Ch_Gaf159A_H244N* (400 μl Protein mit 19,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 20 μl $\text{A}^{2,3}\text{XX}$ mit 100 mM), für die die Kristallisierung mit Substratligandierung wegen der Restaktivität unwahrscheinlicher war, war unter Verwendung der Platten 3, 4, 8, 9 und 12 keine Kristallisierung zu beobachten.

Eine Reduktion der Proteinkonzentration führte mit *Ch_Gaf159A_E190Q* zur Kristallisierung. Es konnten jedoch keine auswertbaren Daten mit diesen Kristallen generiert werden.

3.7 Multimodulare GH43 Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase *Ts_Axh43A* und enzymatischer Synergismus

Ein weiteres aus einem thermophilen Bakterium stammendes und noch nicht ausreichend charakterisiertes Enzym mit einer ähnlichen Aktivität wie die oben beschriebenen GH159-Enzyme, ist die Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase (Akh) *Ts_Axh43A*. *Ts_Axh43A* konnte die α -(1,2) und die α -(1,3)-glykosidischen Bindungen von einfach und doppelt mit L-Araf substituierten Xyloseeinheiten in AX hydrolysieren (Akh-md2,3-Spezifität; (Bröker 2019)). *Ts_Axh43A* ohne Signalpeptid besteht aus vier Proteinmodulen: dem katalytischen Modul 1 aus GH43_10 (c1), einem „Linker“ bestehend aus einem als GH43_C2 bezeichneten Modul (link) unbekannter Funktion, dem katalytischen Modul 2 aus GH43_16 (c2) und einem Substratbindungsmodul der CAZy Familie CBM6 (cbm). Um die Funktionen und das Zusammenwirken der verschiedenen Module von *Ts_Axh43A* im Hinblick auf diese auch von Broeker et al. (2018) beschriebene Axh-md2,3 Spezifität zu untersuchen, wurden die Module wie zuvor in Abschnitt 3.3 beschrieben einzeln und unterschiedlich kombiniert in *E. coli* produziert und gereinigt. Die Produktion und Untersuchung der in Abbildung 3.7.1 schematisch visualisierten Enzymvarianten wurden durch Seidler (2020) unterstützt. Die Enzyme sind in SDS-PAGE-Gelen in Abbildung 7.2.3 im Anhang gezeigt.

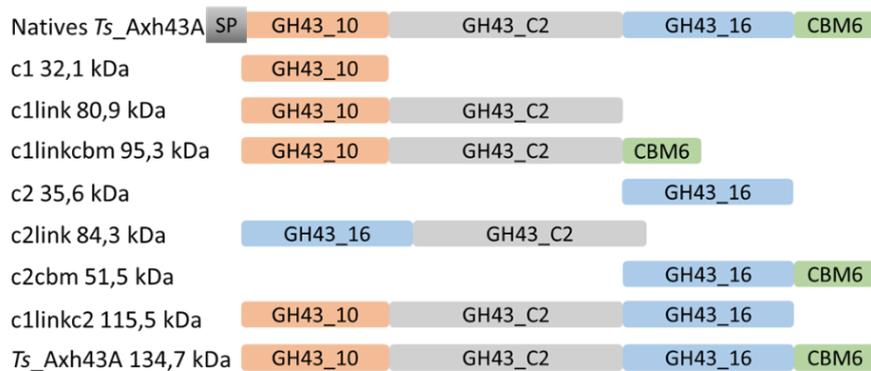


Abbildung 3.7.1 In dieser Arbeit produzierte *Ts_Axh43A*-Derivate. Die unterschiedlichen Module von *Ts_Axh43A*, GH43_10 (c1), GH43_C2 (link), GH43_16 (c2) und CBM6 (cbm), sind in verschiedenen Farben dargestellt.

3.7.1 Stabilität der heterolog produzierter *Ts_Axh43A*-Derivate mit Axh43A Modulen

Da ein intaktes Rückgrat und die korrekte dreidimensionale Faltung eines Enzyms die Aktivität des Enzyms bedingt, sollte die Stabilität der jeweiligen einzeln produzierten Module untersucht werden.

3.7.1.1 Instabilität der Enzymvarianten, die die GH43_C2 Domäne enthalten.

Nach kurzer Lagerzeit konnte eine teils vollständige, teils unvollständige Spaltung der Module mit GH43_C2 Domäne (c1link, c2link, c1linkcbm und *Ts_Axh43A*) beobachtet werden, die vermutlich auf Proteaseaktivität zurückzuführen ist. Auf SDS-PAGE-Gelen zeigten diese Proteine ein spezifisches

Bandenmuster, wenn sie umgepuffert in 1x RP (pH 6.5) im Kühlschrank gelagert worden waren (Abbildung 3.7.2 A). Dabei ist auffällig, dass sich für c1link und c2link jeweils eine Bande auf derselben Höhe zwischen 15 kDa und 20 kDa befand (oranger Rahmen). Zusätzlich waren für c1link und c2link jeweils zwei Banden im höhermolekularen Bereich zu sehen. Diese lagen für c2link jeweils ein klein wenig höher (lila Rahmen) als für c1link (grüner Rahmen). Die jeweils höhere der zwei Banden entspricht der Größe des entsprechenden vollständigen Enzymderivats. Neben den erwarteten Vollängen-Enzymderivaten waren also jeweils zwei zusätzliche Fragmente entstanden, was auf eine einzelne Spaltungsstelle schließen ließ. Für *Ts_Axh43A* waren drei sehr starke und mehr als 4 sehr schwache Banden sichtbar, wobei im Gegensatz zu c1link und c2link das vollständige Enzym nahezu nicht mehr detektierbar war. Auch c1linkc2 und c1linkcbm wurden komplett gespalten und es entstanden jeweils mehr als drei Fragmente. Die zwei prominenteren Banden von c1linkc2 waren auch für c1linkcbm vorhanden (blauer Rahmen). Für Letzteres entstand im Vergleich zu c1linkc2 noch ein zusätzliches Fragment mit einer Größe zwischen 55 kDa und 70 kDa (Abbildung 3.7.2 A).

Proteolyse im Bereich des GH43_C2-Moduls wurde bereits von Saleh et al. (2017) für XynF von *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* beschrieben, das sich in seiner Modularchitektur nur um eine zusätzliche CBM22 nach dem GH43_10 (erstes) Modul von *Ts_Axh43A* unterscheidet (siehe Abbildung 3.7.2 B). Die Sequenz von *Cs_XynF* und *Ts_Axh43A* wurden mittels BLASTp aligniert. Ein Ausschnitt des Alignments um die proteolytische Schnittstelle in *Cs_XynF* zeigt die jeweiligen Aminosäuren in *Ts_Axh43A*, Isoleucin (I741) und Leucin (L742), an. Würden die Module theoretisch an dieser Stelle gespalten ergäben sich die in Abbildung 3.7.2 C aufgeführten theoretischen Molekularmassen. Jedoch stimmen zumindest die Banden für c1link und c2link, die einzigen beiden, die laut SDS-PAGE-Gel nur einmal gespalten wurden, nicht mit den theoretischen Massen überein. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Spaltstelle vermutlich etwas weiter in Richtung des N-Terminus liegt und eventuell weitere Spaltstellen vorhanden sind. Was der Grund für dieses Phänomen ist, wurde nicht weiter untersucht, da das Ziel war, eine Möglichkeit zu finden, die konstruierten Enzymvarianten jeweils ungespalten zu erhalten. Die Autoren der Studie zu XynF erhielten ein stabiles Protein, indem sie die zwei Aminosäuren an der Prozessierungsstelle mutierten. Im Vergleich dazu wurden die GH43_C2 enthaltenden Proteine dieser Arbeit im Elutionspuffer bei pH 7,3 bei 4 °C gelagert und die Lagerlösungen nach den Aktivitätstests auf ihre Integrität auf SDS-PAGE-Gelen überprüft. Unter diesen Bedingungen schienen die Enzymvarianten weitgehend unprozessiert zu bleiben. Ob jedoch nach einer Reaktion, beispielsweise nach der Inkubation mit einem Substrat, das Enzym abgebaut oder noch vollständig vorlag wurde nicht überprüft.

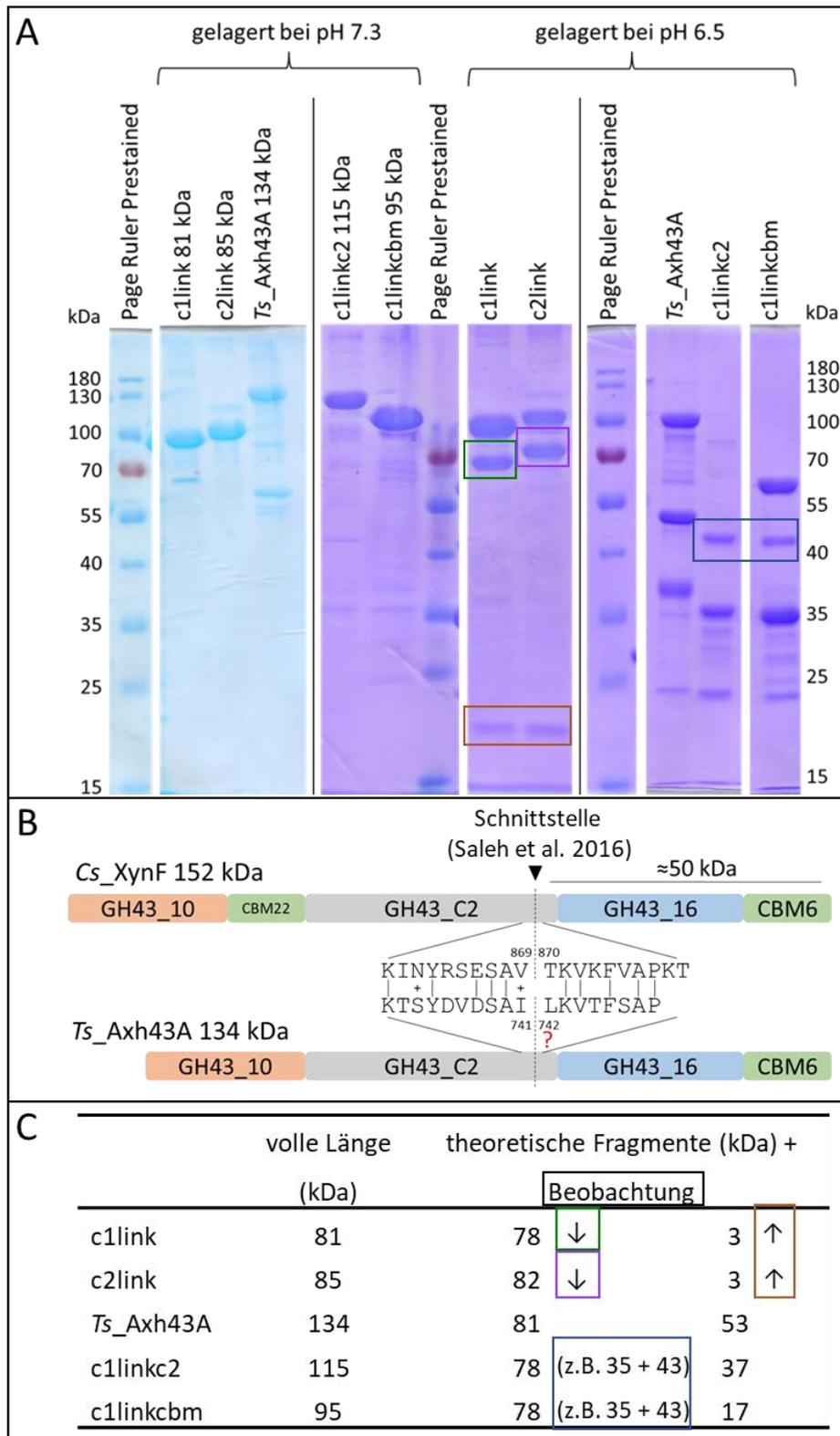


Abbildung 3.7.2 Proteolyse von *Ts_Axh43A* und rekombinanten Enzymderivaten mit GH43_C2 (link) Domäne. **(A)** SDS-PAGE-Gele der gelagerten Proteine die entweder direkt nach der Reinigung mittels His-Affinitätschromatographie in gepoolten Fraktionen nach Elution (pH 7,3), oder in 1x RP (pH 6,5) bei 4 °C gelagert wurden. Bearbeitung der Gelbilder ist wie folgt gezeigt: vertikale Linien: separat gelaufene SDS-PAGE-Gel; Platz zwischen Proben: unwichtige Proben wurden ausgeschnitten. **(B)** Durch Saleh et al. (2017) beschriebene Proteolyseschnittstelle in XynF. Die an die Schnittstelle angrenzenden AS in XynF und die jeweils alignierenden AS von *Ts_Axh43A*, ermittelt durch BLASTp, sind gezeigt mit den Positionen im Volllängenzym. **(C)** Zeigt die durch ExPASy ProtParam bestimmten Molekülmassen jeweils vom vollständigen Modul, als auch die theoretischen Fragmente, falls sich die „Bruchstelle“ zwischen AS 741 und 742 von *Ts_Axh43A* befindet, wie in (B) vermutet. Die in (A) beobachteten Abweichungen oder vermutete weitere Fraktionierung sind jeweils farblich in (A) und (C) markiert.

3.7.1.2 Schmelztemperaturen der einzeln exprimierten Module und Varianten von *Ts_Axh43A*

Um die Änderung des Entfaltungsverhaltens mit steigender Temperatur der einzelnen exprimierten Module bzw. Modulkombinationen von *Ts_Axh43A* im Vergleich zum Volllängenzym zu untersuchen, wurden mit dem Farbstoff SyproOrange Schmelzkurven im qPCR-Cycler aufgenommen. Demnach lag *Ts_Axh43A* (grüne Kurve) bei etwa 70 °C zur Hälfte entfaltet vor (Abbildung 3.7.3). Die Schmelztemperaturen von c1 und/oder cbm enthaltenden Modulen (c1linkcbm, c2cbm, c1link und c1) lagen mit höchstens 2,5 °C Unterschied in einem ähnlichen Bereich. Auch der zweite Peak von c1linkc2 lag bei 68,5 °C. Das Modul c2link (türkise Kurve) hatte mit 53,5 °C die niedrigste T_m . Jedoch wies die abgeleitete Kurve eine kleine Schulter bei etwa 62 °C auf, was auf ein weiteres Entfaltungsereignis hindeutet. Der erste Peak von c1linkc2 (lila Kurve) lag bei 59,5 °C und die T_m von c2 bei 62 °C, weshalb darauf geschlossen werden konnte, dass die c2-Domäne am C-Terminus von c1linkc2 wohl die Domäne war, die bei geringeren Temperaturen entfaltete als die c1-Domäne. Diese c1-Domäne schien sowohl mit zusätzlicher C-terminalen Domäne (rote Kurve), als auch ohne (hellrote Kurve) gegenüber temperaturinduzierter Entfaltung im gleichen Maße wie *Ts_Axh43A* resistent zu sein. GH43_C2 (link) schien nur in Kombination mit dem c1-Modul am N-Terminus thermostabil zu sein.

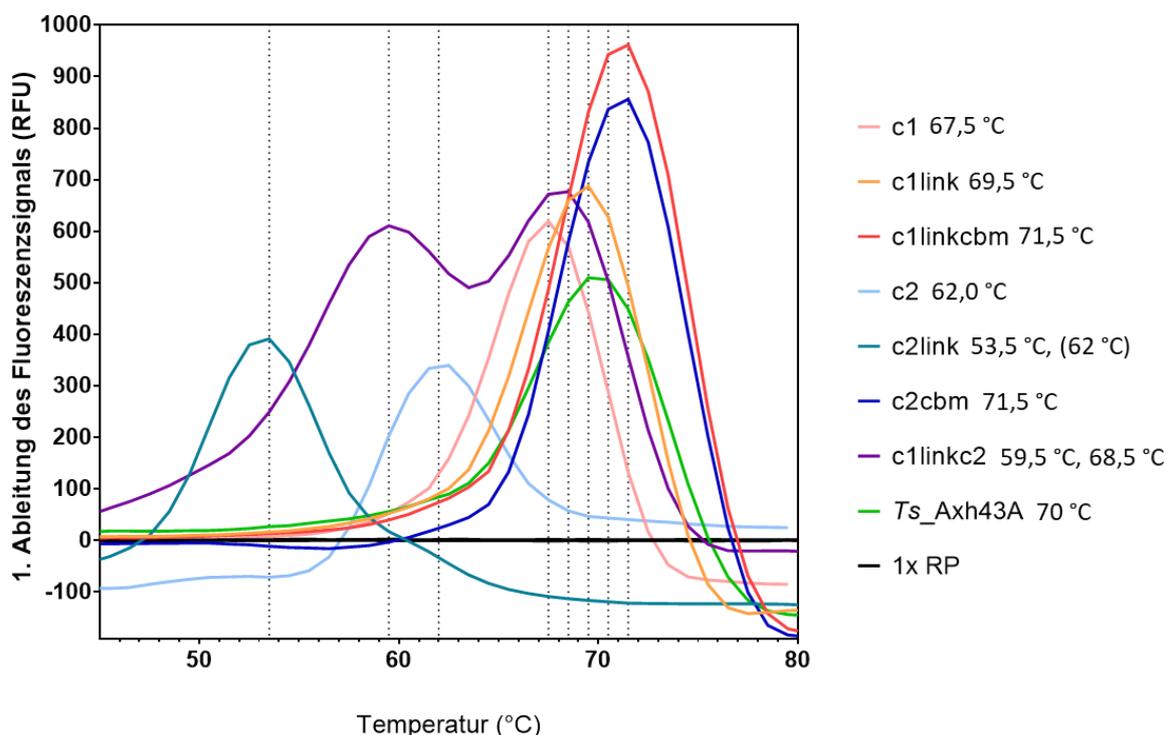


Abbildung 3.7.3 Schmelztemperaturbestimmung von *Ts_Axh43A* im Vergleich zu rekombinant hergestellten *Ts_Axh43A*-Modulen und -Modulkombinationen durch DSF. Ansätze mit 5 μ M Protein in 1 x RP und 20x SyproOrange wurden 10 min bei 25 °C inkubiert, dann wurde die Temperatur 65x alle 15 sec um 1 °C erhöht. Schmelzkurven wurden unter Verwendung des ROX Filters aufgenommen. In Graphpad wurde durch Bildung der 1. Ableitung des Signals in RFU die Wendepunkte der Kurven als Peaks visualisiert. control: 1x RP ohne Enzym.

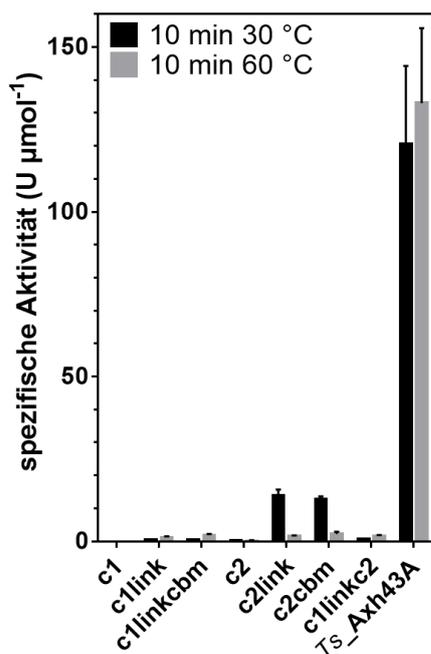
Dem teils niedrigeren T_m geschuldet, wurden alle Experimente zur Aktivitätsmessung sowohl bei 60 °C, dem von Bröker (2019) bestimmten „Temperaturoptimum“ (in 30 min Assay bestimmt) von *Ts_Axh43A*, als auch bei 30 °C durchgeführt.

3.7.2 α -Arabinosidaseaktivität der *Ts_Axh43A*-Varianten und -Modulkombinationen

Bevor die Spezifität untersucht werden sollte, musste überprüft werden, ob alle Varianten aktiv vorlagen, also α -Arabinofuranosidaseaktivität (Abf) aufwiesen. Dafür sollte die Arabinosefreisetzung sowohl von *pNPA* als auch von *AX* untersucht werden. Allgemein wurden molekulare spezifische Aktivitäten verglichen, um die unterschiedlichen Größen der Module zu berücksichtigen, da die weit verbreitete Einheit U/mg zu Verzerrungen zu Gunsten der kleineren Varianten des Proteins und damit einer schlechteren Vergleichbarkeit der Aktivitäten der verschiedenen Enzymderivate geführt hätte.

3.7.2.1 *pNPA*ase Aktivität

Während *Ts_Axh43A* sowohl bei 30 °C, als auch 60 °C Aktivitäten von 100–150 U/ μ mol (1 U/mg) gegenüber *pNPA* zeigte, waren die Module *c2cbm* und *c2link*, wie in Abbildung 3.7.4 zu sehen, bei 30 °C wesentlich aktiver (12–15 U/ μ mol; 0,2–0,3 U/mg) als bei 60 °C. Für alle anderen Varianten wurden bei beiden Temperaturen nur sehr geringe Aktivitäten von unter 2 % der *Ts_Axh43A*-Aktivität gemessen. Die sehr ähnliche Aktivität von *Ts_Axh43A* bei 30 °C und 60 °C wiesen darauf hin, dass mit 0,5 μ M Enzym und 1 mM *pNPA* schon nahezu alle Substratmoleküle umgesetzt wurden (eine Aktivität von 150 U/ μ mol setzt in 10 min 75 % des Substrates um). Da jedoch für eine Vergleichbarkeit jeweils die gleiche Enzymkonzentration eingesetzt werden sollte und die *c2*-Varianten deutlich inaktiver waren und noch ein geringer Unterschied von 30 °C zu 60 °C feststellbar war, wurde *Ts_Axh43A* nicht verdünnt. Auch eine längere Inkubation von 30–60 min führte für *c1*-Varianten nicht zu einem messbaren Umsatz von *pNPA*. Arabinofuranosidaseaktivität gegenüber *pNPA* zeigten also nur das Volllängenzym und die *c2*-Varianten, die eine c-terminale Domäne besitzen.



	U/μmol	
	60 °C	30 °C
c1link	1,2 ± 0,3	0,3 ± 0,0
c1linkcbm	1,9 ± 0,4	0,5 ± 0,1
c2	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,1
c2link	1,5 ± 0,3	13,9 ± 1,8
c2cbm	2,3 ± 0,6	12,8 ± 0,9
c1linkc2	1,7 ± 0,3	0,7 ± 0,0
Ts_Axh43A	133,0 ± 22,8	120,6 ± 23,7

Abbildung 3.7.4 Spezifische Aktivitäten der *Ts_Axh43A*-Module gegenüber *pNPA* bei 30 °C und 60 °C. Reaktionen enthielten 1 mM *pNPA*, 0,5 μM Enzym und 1x RP und wurden für 10 min entweder bei 30 °C oder 60 °C inkubiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus Triplikaten.

3.7.2.2 Aktivität gegenüber dem Polysaccharid Arabinoxylan (AX) und Synergismus durch Kombination von *Ts_Axh43A*-Varianten

Die Dearabinsylierung des Polysaccharids AX wurde anhand der freigesetzten Menge an Arabinose nach Inkubation mit dem jeweiligen Modul, oder der jeweiligen Modulkombination bewertet. Die Quantifizierung erfolgte dabei mittels HPAEC-PAD anhand externer Standards (Tabelle 3.7.1). Für die anschaulichere Auswertung wurde die theoretisch mögliche, freisetzbare Konzentration an Arabinose (2,159 g/l) berechnet. Dafür wurde angenommen, dass nach vollständiger Hydrolyse 5,68 g/l Monosaccharide aus den eingesetzten 5 g/l AX entstehen können (Verhältnis von Molekulargewicht hydrolysiertes freier Arabinose, oder Xylose zu Molekulargewicht der Monomere im Polysaccharid ist 150,13 g/mol: 132,13 g/mol) und, dass der Anteil an Arabinose in mittelviskosem Weizen-AX etwa 38 % beträgt (Datenblatt von Megazyme). Da zwischen 0,3 μM und 1,8 μM der Module eingesetzt wurden und die Reaktionen 20 h inkubiert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass alle theoretisch durch das Protein spaltbaren Bindungen hydrolysiert wurden. Broeker et al. (2018) bestimmte die spezifische Aktivität von *Ts_Axh43A* gegenüber AX auf 41 U/mg (≈ 5522 U/μmol). So könnten 0,3 μM *Ts_Axh43A* ($5 \cdot 10^{-5}$ μmol in 50 μl) in 20 h bereits 100 μmol Arabinose freisetzen, was mehr als das 130-fache ist im Vergleich zu der Menge an Arabinose, die theoretisch in 0,5 % AX vorhanden ist (0,72 μmol in 50 μl). Vor der Analyse mittels HPAEC-PAD deuteten Präzipitate in allen Reaktionen mit *Ts_Axh43A* und in kombinatorischen Reaktionen mit c2cbm sowie in allen Reaktionen mit c2link, die bei 30 °C inkubiert wurden, bereits auf eine effektive Dearabinsylierung, und damit

Kristallisierung des dearabinosylierten AX hin, wie sie von Bröker (2019) bereits schon für *Ts_Axh43A* beschrieben wurde.

Das Gesamtprotein *Ts_Axh43A* generierte bei 60 °C durchschnittlich 1,08 g/l Arabinose, was ca. 50 % des theoretischen Arabinoseanteils in AX entspricht. Bei 30 °C waren es mit 46,5 % der möglichen Arabinose etwas weniger. Bis auf c1 und c2, die bei keiner Temperatur nennenswerte Arabinosemengen aus AX freisetzten, zeigten alle Varianten Aktivität gegenüber AX. Bei 60 °C wurden von allen anderen Modulen/Modulkombinationen (c1link, c1linkcbm, c2link, c2cbm, c1linkc2) nur 12–17 % der möglichen Arabinose freigesetzt. Es ist vor allem auffällig, dass auch die zwei Varianten c2link und c2cbm die *pNPAase*-Aktivität nur bei 30 °C zeigten, gegenüber dem Polysaccharid AX auch bei 60 °C aktiv waren, obwohl c2link seine T_m mit 53,5 °C bereits bei niedrigeren Temperaturen erreicht. Bei 30 °C wurden von allen Modulen, bis auf c1link, mehr L-Araf-Bindungen hydrolysiert als bei 60 °C. So entstanden mit c1link, c1linkcbm und c2cbm zwischen 17 % und 19 % der möglichen Araf. C1linkc2 und c2link setzten bei 30 °C jeweils 22 % und 28 % der möglichen, also 35 % und 79 % mehr Arabinose als bei 60 °C frei, was auf einen zusätzlichen Angriffspunkt bei niedrigeren Temperaturen hinweist. Dies kann wahrscheinlich der c2-Domäne zugeschrieben werden. Die Variante c2cbm zeigte mit AX die gleiche Tendenz der scheinbaren Aktivitätssteigerung bei niedrigeren Temperaturen, die bereits mit *pNPA* beobachtet wurde. Bei 60 °C wurden 12 % und bei 30 °C 18 % der möglichen Arabinose durch c2cbm freigesetzt (Tabelle 3.7.1). Somit könnte es sich um eine erhöhte Summenaktivität bei 30 °C handeln, jedoch gab die T_m Messung von c2cbm im Gegensatz zu c1linkc2 und c2link keinen Hinweis auf eine Instabilität bei 60 °C.

Bei Enzymvarianten mit Modulkombinationen mit c1 (c1linkcbm + c1linkc2) überstieg die Menge der freigesetzten Arabinose die Menge, die von c1linkc2 allein freigesetzt wurde, nicht wesentlich. Ebenso setzte eine Kombination von c1link oder c1linkcbm mit c2link bei 60 °C nur etwa 20 % Arabinose frei, was darauf hindeutet, dass c1link, c1linkcbm und auch c2link bei 60 °C die gleiche Bindung spalten. Bei 30 °C wurden dagegen bis zu 32 % durch c2link-enthaltende Kombinationen freigesetzt, was erneut auf eine zusätzliche Spaltspezifität für c2link bei niedrigeren Temperaturen hinweist. Ansonsten wäre die Ausbeute an Arabinose gleichgeblieben, wie für die Kombinationen bei 60 °C beschrieben.

Möglich wäre somit eine intrinsische gleiche Aktivität der katalytischen Domänen c1 und c2, die durch die direkte Fusion mit der cbm geändert wird. Eine weitere Option wäre, dass der Linker (GH43_C2-Modul) eventuell doch eine katalytische Funktion (mit gleicher Spezifität wie c1) hat, die bei beiden Temperaturen auftritt, und die c2-Domäne jeweils nur bei niedrigeren Temperaturen aktiv ist, was die geringere Schmelztemperatur vermuten lässt. Um diese Frage aufzuklären, wären die Analyse der Variante c1cbm, ohne Linker und mit separatem Linker, sowie die Verbindung von linkc2 in der

Ergebnisse

Tabelle 3.7.1 Arabinoxylan-Abbau mit *Ts_Axh43A*, einzelnen Modulen und Kombinationen, und Synergismus bei Kombination.

	60 °C					30 °C				
	\emptyset ¹⁾ freigesetzte Arabinose (mg/l)	Summe ²⁾ der einzelnen Module (mg/l)	Syner- gismus ³⁾	% der möglichen Arabinose (2,16 g/l von 5 g/l AX)	% der <i>Ts_Axh43A</i> - Aktivität	\emptyset ¹⁾ freigesetzte Arabinose (mg/l)	Summe ²⁾ der einzelnen Module (mg/l)	Syner- gismus ³⁾	% der möglichen Arabinose (2,16 g/l von 5 g/l AX)	% der <i>Ts_Axh43A</i> - Aktivität
c1	0			0,0	0,0	0,0			0,0	0,0
c1link	366			17,0	33,9	358			16,6	35,7
c1linkcbm	373			17,3	34,5	405			18,7	40,3
c2	1,1			0,1	0,1	0,0			0,0	0,0
c2link	343			15,9	31,8	613			28,4	61,1
c2cbm	262			12,1	24,2	397			18,4	39,6
c1linkc2	356			16,5	33,0	481			22,3	48,0
c1linkcbm + c1linkc2	439	730	-	20,4	40,7	556	886	-	25,7	55,4
c1link + c2link	439	709	-	20,3	40,6	683	971	-	31,6	68,1
c1linkcbm + c2link	462	716	-	21,4	42,7	690	1,02*10 ³	-	31,9	68,7
c2link + c2cbm	793	605	+	36,7	73,4	618	1,01*10 ³	-	28,6	61,6
c1linkcbm + c2cbm	951	635	+	44,1	88,1	957	802	+	44,3	95,4
c1linkc2 + c2cbm	976	618	+	45,2	90,4	925	878	+	42,9	92,3
c1link + c2cbm	890	628	+	41,2	82,4	869	755	+	40,2	86,6
<i>Ts_Axh43A</i>	1,08*10 ³			50,0	100	1,00*10 ³			46,5	100,0

Reaktionen enthielten 5 g/l AX, 1x RP und die angegebene Konzentration an Enzym(en): 1,6 μ M c1, 0,8 μ M c1link, 1,3 μ M c1linkcbm, 2,8 μ M c2, 0,6 μ M c2link, 1,8 μ M c2cbm, 0,8 μ M c1linkc2, 0,3 μ M *Ts_Axh43A*. Sie wurden 20 h bei 30 °C, oder 60 °C inkubiert und anschließend mittels HPAEC-PAD unter Verwendung des Gradienten 2 (Tabelle 2.5.5) analysiert.

1) Werte der einzelnen Replikate, Anzahl der Replikate und Standardabweichungen sind in Tabelle 7.6.1 zu finden

2) Summe der von den einzelnen Enzymvarianten freigesetzten Arabinosekonzentrationen

3) Synergismus wird angenommen, wenn die gemessene Arabinosekonzentration größer ist als die Summe der Einzelwerte

Reihenfolge vom nativen Protein sinnvoll. Die experimentelle Bearbeitung wurde jedoch zurückgestellt, da jeweils die natürlichen Kombinationen aus GH43_10 (c1) und GH43_C2 (link) und aus GH43_16 (c2) und CBM6 (cbm) als funktionelle Einheiten angesehen wurden und die Aufklärung der Funktion von GH43_C2 allein nicht Priorität dieser Arbeit war.

In Anbetracht der Tatsache, dass c2link die gleiche Spezifität wie die c1-Enzymvarianten aufweist, ist es nicht überraschend, dass eine Kombination von c2link und c2cbm zur Freisetzung von 37 % der Arabinose bei einer Temperatur von 60 °C führte. Dies weist sowohl auf A_{xh}-d-Aktivität, als auch von A_{xh}-m-Aktivität hin. Wenn c1cbm, c1linkc2 oder c1link zusammen mit c2cbm in kombinatorischen Reaktionen anstelle des artifiziellen c2link verwendet wurden, wurde sogar noch mehr Arabinose, nämlich etwa 40 % der möglichen freisetzbaren Arabinose, nachgewiesen. Diese Kombinationen erbrachten also etwa 82–95 % der Menge, die durch *Ts_Axh43A* erreicht werden konnte.

3.7.3 Spezifitäten von *Ts_Axh43A* und seinen einzelnen Modulen

Allein durch die Abschätzung der aus Arabinoxylan freigesetzten Menge an Arabinose konnten verschiedene Spezifitäten bereits vermutet werden. Jedoch sollten die tatsächlich hydrolysierten Bindungen in definierten Arabinoxylan-abgeleiteten-Oligosacchariden (AXOS), Arabinan-abgeleiteten-Oligosacchariden (AOS) und dem Polysaccharid Arabinoxylan (AX) identifiziert werden.

3.7.3.1 Spezifität gegenüber Arabinoxylan- und Arabinan-abgeleiteten Oligosacchariden

Um die jeweilig gespaltene Bindung zunächst in AXOS festzustellen, wurden verschiedene Arabinoxyloligosaccharide (AXOS) mit den einzel bzw. zusammen mit link oder cbm exprimierten katalytischen GH43-Modulen von *Ts_Axh43A* inkubiert und die Produkte anschließend mittels HPAEC-PAD analysiert. Zur Verfügung standen zum einen die monosubstituierten AXOS (m-AXOS) A³X und A²XX mit der Arabinosylierung am nicht reduzierenden terminalen Xyloserest und XA³XX, sowie die Mischung aus XA³XX und XA²XX (XAXX-Mix), bei denen der Arabinoserest jeweils an der dritten Xylose vom reduzierenden Ende aus, entweder O-3 oder O-2 verbunden war. Zum anderen wurden die doppelt-substituierten AXOS (d-AXOS) A^{2,3}XX und XA^{2,3}XX verwendet (siehe Tabelle 3.7.2). Die Chromatogramme der HPAEC-PAD Analyse der Reaktionen mit allen Enzymderivaten und allen verfügbaren AXOS jeweils bei 30 °C und bei 60 °C sind in Abbildung 7.6.1 A-L im Anhang zu finden und wurden in Tabelle 3.7.2 interpretiert.

Die m_{2,3}-Aktivität von *Ts_Axh43A* konnte bei 60 °C und 30 °C bestätigt werden. Der erste Enzymabschnitt c1link hydrolysierte die 1,2-Bindung in A^{2,3}XX und die 1,3-Bindung in XA^{2,3}XX. Es zeigte also d-Aktivität, wohingegen c2cbm alle m-AXOS de-arabinosylierte. Bei 60 °C wurden die AXOS A³X und A²XX von c2cbm nicht vollständig umgesetzt, was an der höheren molekularen Konzentration der kleineren Moleküle und einer etwas geringeren Aktivität von c2cbm bei 60 °C liegen könnte. Diese wurde bereits gegenüber *pNPA* beschrieben. Die Kombination aus c1link + c2cbm glich der *Ts_Axh43A*

md_{2,3}-Aktivität zumindest bei 30 °C, wobei bei 60 °C die geringere Aktivität gegenüber den kleineren AXOS, wie aus den genannten Gründen erwartet, erneut sichtbar war. Das zeigt, wie schon mit AX beobachtet, dass zwei Teile des Enzyms, nämlich die zwei katalytischen Domänen, jeweils mit dem natürlicherweise assoziierten Modul, unterschiedliche Spezifitäten aufweisen.

Im Gegensatz zum Abbau des Polysaccharids AX waren auch die katalytischen Module ohne C-terminale Domäne, c1 und c2, aktiv. Dabei zeigte c1 die gleiche Spezifität wie mit Linker (d₂-, bzw. d₃-Aktivität). C2 zeigte jedoch im Vergleich zu c1 zusätzliche m-Aktivität gegenüber AXOS, die aus mehr als 4 Monomeren bestehen. Im Vergleich zu c2cbm zeigte c2 hingegen zusätzliche d-Aktivität. Eine Addition des Linkers an c2 bedingte eine allgemein höhere Aktivität mit der gleichen Spezifität (md_{2,3}). Dies weist auf eine intrinsische md-Aktivität hin, die eventuell durch die cbm auf eine m-Aktivität eingeschränkt wird.

Die zusätzliche cbm an c1link führte analog auch zu einer zusätzlichen Aktivität gegenüber m-AXOS. Jedoch kann aufgrund des Linker-Moduls in c1linkcbm zwischen c1 und cbm kein eindeutiger Rückschluss auf die Funktion der cbm gezogen werden. Der Austausch der cbm mit dem Linker in c2link hatte, sowohl bei 30 °C (hier zusätzlich zu der m_{2,3}-Aktivität), als auch bei 60 °C, eine d-Aktivität zur Folge, was auch bereits gegenüber AX vermutet wurde.

Das Enzymderivat c1linkc2 verhielt sich bei 30 °C tendenziell wie die Kombination aus c1link und c2. C1link hätte mittels d₂-, bzw. d₃-Aktivität zwar alle Doppelsubstituierungen hydrolysiert, jedoch wären durch die m-Aktivität von c2 (gegenüber AXOS mit mindestens fünf oder mehr Monosaccharideinheiten) kleinere monosubstituierte AXOS übrig geblieben. Jedoch wurden von c1linkc2 zusätzlich, zumindest bei 30 °C, zum Teil auch die kleineren AXOS (A³X und A²XX), und alle anderen AXOS sogar vollständig abgebaut. C2linkc2 zeigte also höherer Aktivität als durch die theoretische Kombination aus c1link und c2 vermutet wurde.

A³XX, das aus A^{2,3}XX und der d₂-Aktivität von c2link entstand, scheint für diese artifizielle Modulkombination im Gegensatz zu A²XX kein Substrat zu sein, da A^{2,3}XX nicht komplett zu XXX und Arabinose umgesetzt wurde. Es könnte sein, dass terminale Arabinosylierungen nur eingeschränkt als Substrat dienen, weil die Rückgratzucker zur Stabilisierung und Orientierung des Substrates in der Aktivitätstasche des Enzyms benötigt werden könnten. Das würde auch auf die reduzierte Aktivität von c2cbm gegenüber A³X und A²XX bei 60 °C zutreffen. Außerdem ist nicht zu erklären, wieso c2link bei 30 °C den XAXX-Mix komplett umsetzte, der ja auch XA²XX enthält, wohingegen beim Abbau von XA^{2,3}XX noch größere Mengen an XA²XX detektiert wurden (siehe rote Markierung in Tabelle 3.7.2; vgl. c1link in Abbildung 7.6.1 J mit L).

Ergebnisse

Tabelle 3.7.2 Interpretation des Abbaus von AXOS (Abbildung 7.6.1) durch verschiedene *Ts_Axh43A* Derivate.

							
		A ³ X	A ² XX	A ^{2,3} XX	XA ³ XX	XAXX-Mix	XA ^{2,3} XX
c1 (GH43_10)	60 + 30 °C	-	-	d2+	-	-	d3+
c1link (GH43_10 + GH43_C2)	60 + 30 °C	-	-	d2++	-	-	d3++
c1linkcbm (GH43_10 + CBM6)	60 + 30 °C	+	+	d2++ m3+	+	+	d3++ m2+
c2 (GH43_16)	60 °C	-	-	-	-	-	-
	30 °C	-	-	d2+	+	+	d3+ m2+
c2link (GH43_10 + GH43_C2)	60 °C	-	-	d2+	+	+	d3++
	30 °C	++	++	d2++	++	++	d3++ m2+
c2cbm (GH43_10 + CBM6)	60 °C	+	+	-	++	++	-
	30 °C	++	++	-	++	++	-
c1linkc2 (GH43_16 + GH43_10)	60 °C	-	-	d2++	+	+	d3++ m2+
	30 °C	+	+	++	++	++	++
c1link + c2cbm	60 °C	+	+	++	++	++	++
	30 °C	++	++	++	++	++	++
<i>Ts_Axh43A</i> (GH43_16 + GH43_10 + CBM6)	60 + 30 °C	++	++	++	++	++	++

Reaktionen mit je 0,1 % AXOS, 0,5 µM jedes Proteins und 1x RP wurden für 20 h entweder bei 30 °C, oder 60 °C inkubiert und mittels Gradient 4 (Tabelle 2.5.5) aufgetrennt. m2, bzw. m3: 1,2-, bzw. 1,3-verbundene Arabinose an einfach-substituiertem Xyloserest; d2, bzw. d3: 1,2-, bzw. 1,3-verbundene Arabinose zu doppelt substituiertem Xyloserest; -: keine Aktivität; +: Arabinose wurde abgespalten, Substrat ist jedoch noch detektierbar; ++, grün hinterlegt: alle genannten Bindungen wurden komplett gespalten, kein Substrat war mehr detektierbar. Rot markiert: widersprüchliches Ergebnis.

Zusätzlich zu den Aktivitäten gegenüber AXOS zeigte *Ts_Axh43A* auch Aktivität gegenüber verzweigten, von Arabinan abgeleiteten, Oligosacchariden (AOS). Da aus AA³A Arabinotriose entstand und auch mit AA^{2,3}A und AAA³A ein Peak für Arabinotriose und ein weiterer Peak detektiert werden konnte (vermutlich Arabinotetraose), wird davon ausgegangen, dass zumindest das Volllängenzym *Ts_Axh43A* auch die 1,2- und 1,3-Bindungen zwischen Arabinose-Seitenketten und einem Arabinose-Rückgrat aus 1,5-verbundenen Arabinoseresten hydrolysieren kann (siehe Abbildung 3.7.5). Die Kombination aus c1link und c2cbm hingegen dearabinsylierte zwar AA³A, setzte jedoch AAA³A gar nicht und AA^{2,3}A wahrscheinlich auf andere Weise um (anderer nicht zuzuordnender Peak bei ca. 23 min, anstatt Arabinotriose). Da die 1,3-Araf-Bindung in AAA³A erst an der dritten Stelle vom nicht reduzierenden Ende liegt, wäre die Untersuchung auch von dem theoretischen AXOS XXA³X

3.7.3.2 Aufklärung der Spezifität gegenüber AX mit Hilfe der Xylanase *Ts_Xyn11A*

Der theoretische Verdau von AX, welches m2-, m3- und d2,3- verbundene Araf-Reste enthält, wie in Abbildung 3.7.6 A schematisch gezeigt und von Mechelke (2018) beschrieben, führt mit der Xylanase *Ts_Xyn11A* zur Freisetzung von Xylose, m-AXOS und d-AXOS. Inkubiert man vor dem Xylanase-Verdau das AX mit einem Enzym mit Axl-d3 Spezifität, entstehen zudem Arabinose, und vergleichsweise mehr m-AXOS (rote Pluszeichen, blau umrandet), jedoch theoretisch keine d-AXOS (gelb umrandet) mehr. Erfolgt die Vorinkubation hingegen mit einem Axl-m2,3-Enzym, steigt im Vergleich zur Analyse ohne Axl neben der Arabinosekonzentration auch die Xylosekonzentration und es sollten theoretisch keine m-AXOS mehr detektierbar sein. Genau nach diesem Schema sollten die Produkte, die durch die verschiedenen Axl43A-Module und anschließendem Xylanaseverdau entstanden sind, analysiert werden und so auf deren Spezifität gegenüber AX rückgeschlossen werden.

Wie erwartet entstand aus 5 g/l AX ohne Axl mit der Xylanase *Ts_Xyn11A* keine Arabinose (Abbildung 3.7.6 B) und zwischen 0,1 und 0,2 g/l Xylose (Abbildung 3.7.6 C). Außerdem wurden die m3-AXOS A³X und XA³XX, das d-AXOS XA^{2,3}XX, sowie einige nicht weiter identifizierte Produkte (unsymmetrische Peaks bei ca. 27 und 29 min, sowie eine Schulter nach 33–37 min) detektiert. Diese stellt wahrscheinlich höhermolekulare Oligosaccharide dar (Abbildung 3.7.6 D). Auch Mechelke (2018) konnte durch Xylanaseabbau des gleichen AX keine Peaks für A²XX, oder XA²XX detektieren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass wahrscheinlich keine Xylosereste vorkommen, die lediglich am O-2 arabinosyliert vorliegen, sondern nur m3-, oder d2,3-Bindungen.

In Abbildung 3.7.6 B ist gezeigt, dass die Zugabe der Xyn11A die entstandene Arabinosekonzentration nicht beeinflusste und alle gezeigten Module aktiv waren. *Ts_Axl43A* und c1-enthaltende Module setzten bei 60 °C mehr Arabinose frei als bei 30 °C. Mit dem Vollängenprotein *Ts_Axl43A* konnten jeweils die höchsten Arabinose- und Xylosekonzentrationen erreicht werden. Zudem verschwand die Schulter mit höhermolekularen Oligosacchariden im Chromatogramm (bei etwa 34 min, siehe Abbildung 3.7.6 D) und fast alle Peaks für AXOS bei 60 °C. Bei 30 °C war dieser stark reduziert.

Vereint man die Informationen aus Abbildung 3.7.6 B–D, bestätigt sich die Axl-d3-Aktivität gegenüber AX für die c1-enthaltende Module jeweils bei beiden Temperaturen. Zwar entsteht Arabinose, jedoch aber keine zusätzliche Xylose (im Vgl. zu Ansatz ohne Axl-Variante), der Peak für XA^{2,3}XX verschwindet, die Anzahl der m-AXOS steigt und vor allem entstehen auch m2-AXOS. C1link2, welches die thermoinstabile c2-Domäne enthält, setzt etwas mehr Arabinose bei 30 °C frei als c1link und c1linkcbm. Außerdem setzt es mit der Xylanase etwas mehr Xylose als die Kontrolle ohne Axl-Variante um (Abbildung 3.7.6 D), was auf geringe zusätzliche m-Aktivität von c1link2 (im Vgl. zu c1link und c1linkcbm) bei 30 °C schließen lässt. Dies ist wiederum auf die c2-Domäne zurückzuführen. Jedoch kann man den Unterschied nicht anhand der identifizierbaren AXOS in Abbildung 3.7.6 D erkennen, da

die theoretisch durch m-Aktivität übrigbleibenden d-AXOS aufgrund der d3-Aktivität von c1link weiter zu m2-AXOS abgebaut werden, die wiederum teils weiter dearabinosyliert werden.

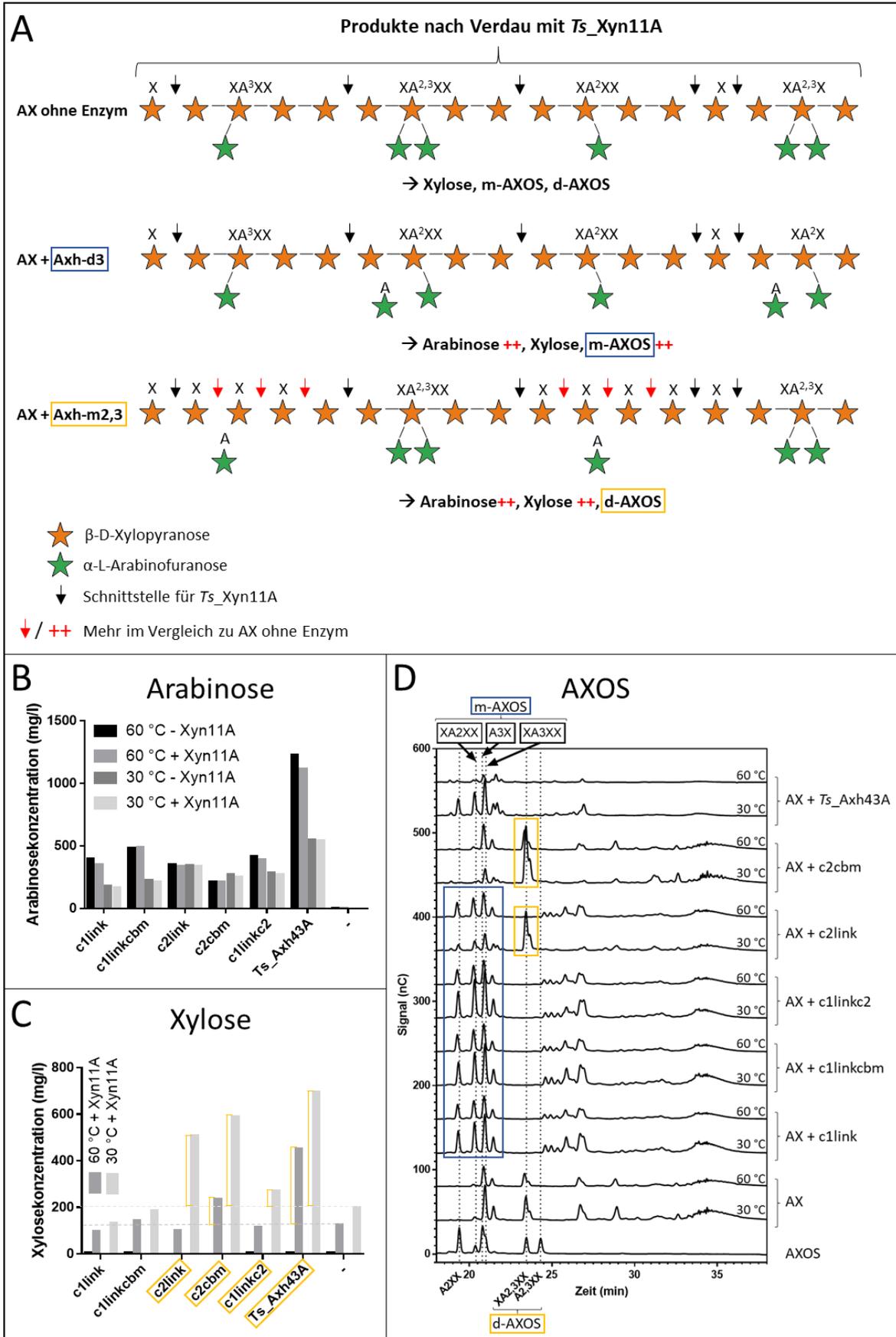


Abbildung 3.7.6 Aufklärung der Spezifität der *Ts_Axh43A*-Module gegenüber AX bei 60 °C und 30 °C durch *Ts_Xyn11A*. **(A)** Theoretische Produkte nach der Inkubation von Arabinoxylan ohne Enzym, mit einem Axb-d3, oder einem Axb-m2,3-Enzym und anschließender Hydrolyse mit *Ts_Xyn11A*. Mit Axb-d3-Enzym entstehen die gleichen Mengen Xylose, wie ohne einer Axb und zusätzlich AXOS mit monosubstituierten Xyloseresten (m-AXOS). Mit m2,3-Aktivität können nach Xylanaseaktivität größere Mengen Xylose und zudem nur noch AXOS mit zweifach substituierter Xylose (d-AXOS) gefunden werden. **(B)**, **(C)** und **(D)** Ergebnisse der HPAEC-PAD Analyse nach Arabinoxylanverdau. Reaktionen mit 0,5 % Arabinoxylan, 1x RP und ca. 0,5 µM der *Ts_Axh43A*-Module wurden zunächst 23 h bei 30 °C, oder 60 °C inkubiert, anschließend für 30 min bei 95 °C inaktiviert und mit 50 ng/µl *Ts_Xyn11A* oder H₂O (Kontrolle) für weitere 22 h bei 60 °C inkubiert. Nach 30 min Inaktivierung bei 90 °C wurden die Reaktionsprodukte mittels HPAEC-PAD mit Gradient 4 (Tabelle 2.5.5) aufgetrennt. Konzentrationen wurden durch Chromeleon an Standardkurven interpoliert **(B)** Durch HPAEC-PAD ermittelte Arabinosekonzentrationen in bei 60 °C und 30 °C, jeweils mit und ohne Xyn11A Zugabe, inkubierten Reaktionen. **(C)** Durch HPAEC-PAD bestimmte Xylosekonzentrationen. Erhöhung der Konzentration im Vergleich zur AX-Kontrolle ohne Enzym (graue Linie) ist gelb gekennzeichnet und auf Axb-m2,3-Aktivität zurückzuführen. **(D)** Ausschnitt der Chromatogramme zwischen 18 min und 38 min zeigt m-AXOS (blau markiert) und d-AXOS (gelb markiert) und AXOS mit höherem Polymerisationsgrad ohne bekanntem Substituierungsmuster.

Für c2cbm kann eindeutig Axb-m-Aktivität gezeigt werden, da sowohl bei 30 °C, als auch bei 60 °C mehr Xylose frei wird und nach Xylanaseverdau d-AXOS sogar in größeren Mengen als in der Kontrolle detektiert werden. Dies kann daran liegen, dass ohne Dearabinosylierung manche einzeln- und doppelt-substituierten Xylosereste so nah beieinanderliegen, dass zunächst durch sterische Hinderung nur wenige für die Endoxylanase *Ts_Xyn11A* zugängliche Spaltstellen vorliegen. Werden jedoch die Monosubstituierungen durch m-Aktivität abgespalten, entstehen neue Spaltstellen für die Xylanase, wodurch die Konzentration an d-AXOS steigt.

Das artifiziell in inverser Modulreihenfolge kombinierte Enzym c2link zeigt bei 60 °C ein ähnliches Chromatogramm wie die Enzyme mit c1-Modulen, zeigt also d3-Aktivität, was eine Spekulation über eine katalytische oder katalysebeeinflussende Funktion des GH43_C2 Linkers zulässt. Da jedoch gegenüber den AXOS zuvor auch md2,3-Aktivität für c2 allein gezeigt wurde, könnte das GH43_C2-Modul vielleicht auch nur die d3-Aktivität des c2-Moduls erhöht haben. Bei 30 °C hingegen entsteht mit c2link fast genauso viel Xylose wie mit c2cbm und auch d-AXOS, während die m-AXOS Peaks kleiner sind als bei 60 °C, was eindeutig auf md2,3-Aktivität schließen lässt, wenn auch in geringerem Maße als mit *Ts_Axh43A*.

Zusammenfassend konnte also die Axb-md2,3-Spezifität von *Ts_Axh43A* auch gegenüber dem Polysaccharid Arabinoxylan gezeigt werden. Zudem zeigten die c1-Module c1link, c1linkcbm und c1linkc2, also das GH43_10-Modul mit der Linker Domäne GH43_C2, bei 60 °C und 30 °C, sowie auch c2link bei 60 °C d3-Aktivität. Das Modul c2cbm hingegen zeigte ausschließlich m-Aktivität. C1linkc2 und c2link agierten zumindest bei 30 °C, und in geringerem Maße als das Gesamtprotein, auch als Axb-md2,3-Enzym.

4 Diskussion

Glykosidhydrolasen (GHn) sind ubiquitär in allen Organismen zu finden sind. Sie sind sowohl innerhalb der Zelle in wichtigen metabolischen Prozessen, aber auch membranständig in Signalübertragungsvorgängen, involviert. Außerdem sind sie nach der Sekretion als extrazelluläre Enzyme von zentraler Bedeutung für den Abbau von Biomasse in Form von Polysacchariden und Oligosacchariden. Das Ziel dieser Arbeit war es, neue GHn zu identifizieren und zu charakterisieren. Die erfolgreiche Verfolgung dieses Ziels könnte z.B. (1.) den enzymatischen Biomasse-Abbau durch neue Cellulasen und Hemicellulasen effizienter machen und in der Folge die fermentative Produktion von Biokraftstoffen als eine nachhaltige und klimaneutralere Alternative zu fossilen Kraftstoffen konkurrenzfähiger machen; (2.) Es könnten neue GHn für eine Vielzahl von Aufgaben in kosteneffizienteren, schnelleren, schonenderen oder neuartigen industriellen Prozessen bereitgestellt werden. Dafür müssen die Biokatalysatoren aber charakterisiert bzw. ihre Aktivität und Spezifität bekannt sein.

Aufgrund der breiten Anwendung neuer Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden und OMICS-Ansätzen sind in Datenbibliotheken eine große Anzahl an Sequenzen mit noch unbekannter Funktion zu finden. Die Sequenz-, Struktur- und teils Funktions-basierte Klassifizierung von Glykosidhydrolasen in der CAZy-Datenbank und die funktionelle Annotation von neuen Sequenzen in Protein- sowie Genomdatenbanken wie SwissProt, Uniprot, Pfam und COG (Galperin et al. 2021) beruht auf der Beschreibung neuer Aktivitäten und der detaillierten Charakterisierung neuer Enzymfamilien. Eine Identifizierung und Charakterisierung trägt damit (3.) zur sinnvollen Namensgebung, Annotation und Klassifizierung von ähnlichen Sequenzen in Datenbanken, sowie zum allgemeinen Wissenszuwachs für Struktur-/Funktionsstudien bei.

Die Auswahl bisher nicht charakterisierter Sequenzen erfolgte auf folgenden Annahmen: Routinemäßig können Eigenschaften wie Struktur, Funktion und Evolution neuer, oder noch uncharakterisierter Proteine anhand von Ähnlichkeiten zu experimentell charakterisierten Proteinen abgeleitet werden (Gabler et al. 2020). Die These besagt, dass zwei signifikant ähnliche Proteine möglicherweise auch eine ähnliche Funktion zeigen. Die Ähnlichkeit muss dabei laut Wang et al. (2018) über 80 % liegen, damit Enzyme strukturidentische Substrate mit gleichem Reaktionsmechanismus umsetzen, also die selbe Reaktion katalysieren, und damit die gleiche EC Nummer erhalten. Zwar kann weder von einer hohen Sequenzähnlichkeit auf dieselbe Aktivität geschlossen werden, noch kann geringe Sequenzübereinstimmung ausschließen, dass Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren, jedoch erhöhen im Umkehrschluss zur oben erwähnten These unterschiedliche Sequenzen die Wahrscheinlichkeit neuartige Aktivitäten aufzudecken.

Deshalb wurden als Basis dieser Arbeit Enzyme zur Charakterisierung gewählt, die keine, oder nur sehr geringe Ähnlichkeiten zu bereits bekannten GH-Familien aufwiesen, also entweder in GHnc (Familie in CAZy mit einigen nicht klassifizierten Glykosidhydrolasen ohne bekannter Funktion⁷) gelistet waren, oder hohe Sequenzähnlichkeiten zu einer dort gelisteten putativen GH zeigten.

Thermostabile Enzyme besitzen einige Vorteile, v.a. höhere mögliche Temperaturen, dadurch Hygienisierung von Rohstoffen und Produkten, sowie die Möglichkeit der Integration in vorhandene Prozesse bei höheren Temperaturen und allgemein erhöhte Stabilität und erhöhte Resistenz gegenüber Chemikalien. Deshalb wurde der Fokus vor allem auf putative GHn aus thermophilen Organismen, wie *Thermoclostridium stercorarium*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor bescii*, *C. hydrothermalis*, *C. saccharolyticus* und *C. kronotskyensis*, gelegt. Jedoch wurden auch Kandidaten aus den mesophilen Bakterien *Methylobacterium extorquens* und *Rhizobium etli* aufgrund ihres Vorkommens im Boden und der Assoziation von *R. etli* mit Pflanzen ausgewählt. Von den 17 ausgewählten bisher uncharakterisierten Proteinen ließen sich 14 erfolgreich in *E. coli* produzieren. Davon zeigten *Re_Xyl*, *Me_Xyl* und *Tm_gly* jedoch auf den bisher getesteten Substraten (26 verschiedene Polysaccharide und 13 verschiedene *pNP*-Glykoside; Kapitel 3.4) keine Aktivität. Sie sind also entweder nicht hydrolytisch aktiv gegenüber glykosidischen Bindungen, oder das richtige Substrat wurde bisher noch nicht gefunden. Eine mögliche Laminarinaseaktivität für *Tt_Gly* wurde bisher nicht weiter untersucht. Eindeutig positiv fiel das Screening gegenüber *pNPR* für *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B* und *Ts_Ram106B* aus, die infolgedessen als Rhamnosidasen, bzw. Naringinasen in der Anwesenheit von Aktivitäts-steigerndem CoCl_2 charakterisiert wurden (Baudrexel et al. 2019). Zwei Enzyme der gleichen Familie (GH106) hingegen, *Cst_c20590* und *Ts_ArfD*, für das in einer früheren Studie Aktivität gegenüber *pNPA* beobachtet wurde (Broeker et al. 2018), zeigten weder Aktivität gegenüber den getesteten Rhamnosidsubstraten, noch gegenüber anderen *pNP*-Glykosiden. *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* zeigten Aktivität mit *para*-Nitrophenyl- β -D-Galaktofuranosid (*pNPGf*) und *para*-Nitrophenyl- α -L-Arabinofuranosid (*pNPA*). Nach der Bestimmung der kinetischen Parameter und Temperaturoptima gegenüber *pNPGf* wurde der Fokus auf ihre Arabinosidaseaktivität gesetzt, da diese Aktivität in GH159 bisher noch nicht beobachtet wurde. Insbesondere wurde ihre Fähigkeit beschrieben, die 1,3-Arabinosylierungen von terminal substituierten Xyloseresten in AXOS und in geringem Maße Arabinose von Arabinogalaktan zu hydrolysieren. Zudem erfolgte durch die Kristallisierung von *Ch_Gaf159A* die Aufklärung der ersten 3D-Struktur für ein Enzym der GH-Familie GH159.

⁷ Es gibt aktuell 8 Ausnahmen, deren Funktion und E.C Nummer bereits zugeordnet sind, für die jedoch noch keine neue GH-Familie erstellt wurden. (http://www.cazy.org/GHO_characterized.html), Stand: 11.05.23

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die A_{xh}-m_{2,3}-Spezifität der aus vier Modulen bestehenden Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase *Ts_Axh43A* von *T. stercorarium* untersucht. Es konnte durch die Produktion der einzelnen Module und verschiedener Modulkombinationen gezeigt werden, dass jeweils zwei aufeinander folgende Module zusammen eine funktionelle Einheit bilden. Die zwei N-terminalen Module, ein katalytisches Modul GH43_10 und ein in der NCBI-Datenbank als GH43_C2 bezeichnetes, bisher nicht genauer charakterisiertes Modul, zeigten A_{xh}-d₃-Aktivität gegenüber AXOS und AX. Das GH43_10-Modul in Kombination mit dem GH43_C2-Modul spaltete also die 1,3-verbundene Araf von doppelt substituierten Xylp vom Xylan-Rückgrat. Das zweite *Ts_Axh43A* katalytische Modul aus Familie GH43_16 mit C-terminaler CBM6 hydrolysierte hingegen alle Araf-Substituenten von monosubstituierten Xyloseresten in AXOS, sowie vom Polysaccharid AX, was einer m_{2,3}-Aktivität entspricht.

Vor Beginn dieser Arbeit war von den untersuchten Enzymen nur *Ts_Axh43A* in der bestehenden GH-Familie 43 (GH43) klassifiziert, alle anderen waren als nicht klassifizierte GHn (*non classified*, GHnc) gelistet, oder zum Teil gar nicht in der CAZy-Datenbank zu finden, da sie über Homologie zu einem GHnc-Enzym ausgewählt wurden. Aktuell (Stand Mai 2023) sind alle Proteine bis auf die XynB-Module enthaltenden Proteine von *Rhizobium etli*, *Methylobacterium extorquens* und *Bradyrhizobium vignae* in CAZy-Familien eingeteilt, und auch das *Re_Xyl* Protein, das am Anfang der Arbeit noch in GHnc zu finden war, ist jetzt nicht mehr in der Datenbank gelistet (siehe Tabelle 3.3.1).

4.1 Einflussfaktoren auf den Erfolg von Aktivitätsscreenings

Ein Ziel dieser Arbeit war es ursprünglich, neue Aktivitäten im Zusammenhang mit Biomasseabbau zu finden. Von den insgesamt 17 gewählten Proteinen waren nur drei bisher nicht produzierbar. Für weitere vier Enzyme konnte durch die bisherigen Methoden, trotz des breiten Einsatzes an unterschiedlichen Substratkandidaten, keine Aktivität beobachtet werden. Mögliche Einflussfaktoren auf den Erfolg dieser Herangehensweise und mögliche Limitierungen sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1.1 Heterologe Produktion

Die erfolgreiche funktionelle Expression ist ein komplexer molekularer Prozess aus Transkription, Translation, Proteinfaltung und teils Sekretion (Liebl et al. 2014). Der genetische Code ist mit einigen Ausnahmen (Knight et al. 2001) allgemein als universal anerkannt (Lobry und Chessel 2003). Theoretisch könnten aber in Genen aus exotischen Organismen Abweichungen vom genetischen Code vorkommen und im Expressionswirt zu Problemen führen. Das in dieser Arbeit nicht exprimierbare *Tn_Gly* von *Thermotoga neapolitana* Z2706-MC24 enthielt ein GTG als Translationsstart und als dreizehntes Codon das in *E. coli* bei der Translation für ein „Stop“ codierendes TGA. Für *Cs_Gaf159A*,

Ch_Gaf159A und *Ck_Gaf159A* wurde deren natives GTG-Startcodon für die Expression beibehalten und führte zu guten Ausbeuten. In dem zu *Tn_Gly* orthologen Gen aus dem Stamm *T. neapolitana* DSM 4359, CTN_1797, steht an 13. Stelle das Codon TGG, welches für Tryptophan kodiert. Es gibt auch Organismen, vor allem Mycoplasma (Inamine et al. 1990), Mollicutes und Ciliaten (Grosjean et al. 2010), die eine tRNA für Trp besitzen, die das Codon UGA₃ mithilfe des Anticodons U₃₄CA bindet. Für *Thermotoga* ist dagegen bisher nichts dergleichen bekannt. Um *Tn_Gly* erfolgreich zu produzieren, könnte ein entsprechend „ausgebessertes“ ORF in pET24c kloniert werden, worauf jedoch verzichtet wurde, da für das Aktivitätsscreening die zu 87 % und 38 % (Anhang Tabelle 7.2.1) ähnlichen Enzyme *Tm_Gly* und *Tt_Gly* verwendet werden konnten.

Von einem alternativen genetischen Code muss ein unterschiedlicher Codongebrauch (*Codon Usage*) als Ursache für mangelnde Expression klar abgegrenzt werden, die eine ineffektive Translation zur Folge hat. Letzteres kann durch die Neusynthese des Gens vermieden werden, wobei die verwendeten Codons auf den Wirtsorganismus angepasst werden. Bei unterschiedlichen genetischen Codes hingegen müssten diese erst einmal bekannt sein, was häufig bisher nicht untersucht wurde (Keeling 2016). In dieser Arbeit wurde die DNA durch PCR aus der gDNA des jeweiligen Ursprungsorganismus amplifiziert und nicht Codon-optimiert synthetisiert. Deshalb wären Probleme bei der Expression oder die fehlende Aktivität auch aufgrund unterschiedlichen Codongebrauchs möglich gewesen. Jedoch konnte *Bv_Xyl*, zwar bisher nur unlöslich, jedoch in detektierbaren Mengen in *E. coli* produziert werden und für *Tm_Gly*, *Tt_Gly*, *Re_Xyl* und *Me_Xyl* konnte sowohl Expression als auch Reinigung erreicht, jedoch keine Aktivität detektiert werden. Im Anschluss an die erfolgreiche Produktion von 13 neuen Enzymproteinen in dieser Arbeit stellte sich nun die Frage, welche Substrate für ein Aktivitätsscreening verwendet werden sollten.

4.1.2 Substrate - Komplexität und Unzugänglichkeit der Biomasse erschwert das Finden geeigneter Substrate

Ein Ansatz, um die bisher unbekannt Funktion der bisher nicht klassifizierten, putativen Glykosidasen *Tm_Gly*, *Tt_Gly* und der möglichen Xylosidase *Re_Xyl* herauszufinden, war die Inkubation mit den komplexen Substraten „Weizenstroh“, Apfelpektin, Weizen-Arabinoxylan und Haferspelzen Xylan. Da für die Aufdeckung der tatsächlichen Aktivitäten eines unbekanntes Enzyms natürliche Substrate den selektierten Modellsubstraten vorzuziehen sind (Østby et al. 2020). Dass hierbei keine Produkte identifiziert wurden, ist nicht unbedingt auf fehlende Aktivität der Enzyme zurückzuführen. Stroh ist ein schwer abzubauenendes Substrat. Weizenstroh enthält neben Glukan in Form von Cellulose (33–40 %) vor allem die Hemicellulosen (20–25 %) Xylan und Arabinan, jedoch auch insgesamt 15–20 % Lignin (Momayez et al. 2019). Laut Studien über den Abbau von Weizenstroh zur Erzeugung von Biokraftstoffen der zweiten Generation kann die Kutinschicht (DPM Holzdesign GmbH 2021),

natürliche Polyester aus C16- oder C18-Hydroxyfettsäuren, vernachlässigt werden. Grund hierfür ist, dass bei der mechanischen Zerkleinerung diese wasserabweisende Wachsschicht zerstört wird (D&H Schubert UG 2019). Die Quervernetzungen von Lignin zu Xylan durch Esterbindungen von phenolischen Säuren zu Uronsäuren (Wallace et al. 1995; Lapierre et al. 2001) oder zu feruloylierten pektischen Polysacchariden, oder das Lignin selbst können die enzymatische Zugänglichkeit erschweren (Ebringerová et al. 2005). Zur Extraktion von Hemicellulose aus Weizenstroh werden normalerweise Kombinationen aus thermischen, chemischen und/oder mechanischen Bedingungen verwendet (Ebringerová und Heinze 2000), was zeigt, wie stabil das „Geflecht“ aus Cellulose, Hemicellulosen, Lignin und Proteinen ist.

Das in dieser Arbeit eingesetzte „Strohpräparat“ wurde durch Mahlen auf Partikelgrößen unter 50 µm zerkleinert. Es wurde jedoch nicht weiter behandelt, was wenig neue Angriffspunkte für die Enzyme bedeutet. Neben chemischen und physikalischen Vorbehandlungen wurden bereits auch biologische Möglichkeiten untersucht (Momayez et al. 2019). Allerdings konnten auch nach der Vorinkubation mit Celluclast, einer kommerziell erhältlichen, Cellulase-reichen, pilzlichen Enzymmischung, keine zusätzlichen Produkte mit den Enzymen *Tm_gly*, *Tt_gly* und *Re_Xyl* erzeugt werden. Celluclast besteht aus Enzymen von *Trichoderma reesei*. Die Mischung enthält Cellobiohydrolasen und Endo-1,4-β-Glukanasen (Rosgaard et al. 2007). Diese können Cellulose, ausgenommen der kristallinen Bereiche, abbauen. Dazu kommt, dass die Cellulose sich wie oben beschrieben in einer Matrix aus Lignin und Hemicellulosen mit Xylanen befindet, die sich ähnlich hartnäckig wie kristalline Cellulose verhalten können (Østby et al. 2020). In Celluclast könnten sich lytische Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMOs) von *T. reesei* befinden. Die Aktivität von LPMOs gegenüber kristallinen Substraten ist bekannt, jedoch bisher noch nicht mit Cellulose bestätigt worden (Østby et al. 2020). LPMOs könnten die 1,4-glykosidischen Bindungen eventuell oxidativ spalten, ohne einen einzelnen Cellulosestrang aus der kristallinen Matrix herauslösen zu müssen. Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb neue Angriffspunkte geschaffen wurden und geringe Produktmengen per HPAEC-PAD nach Inkubation mit Celluclast detektiert werden konnten. Allgemein ist davon auszugehen, dass die Behandlung mit Celluclast neue, besonders Oligosaccharid-haltige Strukturen schafft, die von den untersuchten Enzymen angegriffen werden könnten. Ohne Celluclast konnten von unbehandeltem Stroh etwa 4 g/l Zucker freigesetzt werden. Mit Vorbehandlung durch Celluclast wurden über 9 g/l erreicht, also eine Steigerung um mehr als das Doppelte.

4.1.3 Analytik der Hydrolyseprodukte

Zusätzlich zum richtigen Substrat war es auch wichtig, eine geeignete Methode zur Analyse der Produkte einzusetzen. Das in dieser Arbeit vorgestellte erste Screening wurde mittels Polysaccharidsubstraten mit *Tm_Gly*, *Tt_Gly* und *Re_Xyl* und anschließender Messung der entstandenen zusätzlichen reduzierenden Enden mittels DNSA durchgeführt. Die Schwankungen der bestimmten relativen Konzentrationen an reduzierenden Zuckern im Vergleich zur Kontrolle (Zellextrakt ohne Enzym) lassen bei niedrigen positiven Werten keine eindeutige Aussage über vorhandene Aktivitäten zu. Die Ansätze müssten mit Positiv-Kontrollen, die die Rückgrat-Verbindungen hydrolysieren können, z.B. Xylanasen, Glukanasen, Mannanasen, oder Seitenketten spaltenden Enzymen, wie Arabinofuranosidasen, Galaktosidasen und Rhamnosidasen wiederholt werden, um beurteilen zu können, welche Messwertunterschiede als positiv zu bewerten sind. Außerdem ist die DNSA-Methode für Enzyme, die Seitenketten abspalten, die nur zu einem sehr geringen Anteil in dem jeweiligen Polysaccharid vorkommen, wie z.B. Rhamnose in Arabinan, nicht geeignet, da sie nicht sensitiv genug ist. Deshalb sollten die entstandenen Produkte mittels der sehr viel sensitiveren HPAEC-PAD identifiziert und quantifiziert werden.

Die langen Analysezeiten schlossen allerdings HPAEC-PAD als Methode zur Analyse des Screenings in dieser Arbeit aus. Um diese zu verkürzen, wäre es möglich, bis zu 5 Reaktionen mit unterschiedlichen Substraten zu poolen. So würde innerhalb von zwei anstatt 10 Läufen (gepoolte Reaktionen und gepoolte Negativkontrollen), ersichtlich werden, ob zusätzliche Produkte entstanden sind, oder nicht. Bei einer Laufzeit von 76 min wären das immerhin 2,5 h anstatt mehr als 12,5 h.

Manche Produkte liefern mit DNSA nur geringe oder sehr unterschiedliche spezifische Absorptionswerte (Megazyme Datasheet 2021). Es ist denkbar, dass die Farbintensität auch mit unterschiedlicher Länge einiger Rückgrat-Oligosaccharide variiert. So könnten auch stark negative Werte im Vergleich zur Negativkontrolle ein Hinweis auf Aktivität sein, da es möglich wäre, dass eventuell schon vor der Hydrolyse vorhandene längere Oligosaccharide, z.B. in RG I, eine höhere Absorption mit DNSA erreichen als kürzere GalUA -und Rhap-enthaltende Oligosaccharide, die erst durch eine Spaltung mit *Re_Xyl* entstanden sein könnten.

Da alle Polysaccharide, mit denen *Tm_Gly* leicht erhöhte Zuckerkonzentrationen zeigte (unter 0,05 mg/ml), gewisse Anteile an Arabinose aufwiesen, wurde Arabinosidaseaktivität gegenüber AXOS, AOS, oder anderen Arabinose-enthaltenen Oligosacchariden vermutet. Jedoch setzte die gleichzeitige Inkubation mit AX und Xyn11A, was sowohl d2,3-AXOS, sowie m3-AXOS entstehen lässt (siehe Abbildung 3.7.6), mit *Tm_Gly* keine Arabinose frei.

Die Funktionsvorhersagemethoden für Proteine verbessern sich durch Anwendung von künstlicher Intelligenz mit *Machine Learning* und *Deep Learning* immer weiter (Xu et al. 2022; Biswas und Hasija

2022). Eine neue Beta-Version von UniProt gab durch *Gene Ontology* Annotierung (April 2022) den Hinweis darauf, dass es sich bei *Tm_Gly*, *Tn_Gly* und *Tt_Gly* eventuell auch um Glykosyltransferasen handeln könnte. Auch das Funktionsvorhersage-Tool PANNZER (Törönen und Holm 2022) wies auf eine Glykosyltransferasefunktion hin. Dies könnte beim Screening mit Saccharidsubstraten zur Folge haben, dass durch ihre Aktivität keine zusätzlichen reduzierenden Enden entstehen, was DNSA als Nachweismethode ungeeignet machte. Eine Aufklärung der möglichen Glykosyltransferasefunktion war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen. Jedoch wäre es interessant eine Glykosyltransferaseaktivität nachzuweisen und ggf. die strukturellen Gründe für diese Aktivität aufzuklären, die teils minimal sein können (Roston et al. 2014).

Die Zugehörigkeit von *Tm_Gly* und *Tt_Gly* (sowie auch *Tn_Gly*) zur Superfamilie „GH43_62_32_68_117_130“ (cl14647) lässt eine Spekulation über die 3D-Struktur zu. Diese Superfamilie enthält Enzyme aus Clans F und J, die beide eine 5-fache β -Propeller Faltung aufweisen. Für *Tm_Gly* wird außerdem eine Ähnlichkeit zur Familie Glyo_hydro_130 (pfam04041) angegeben, von der einige Enzyme als β -1,4-Mannooligosaccharid-Phosphorylasen beschrieben wurden. Im Laufe der Arbeit wurden die drei Enzyme der GH130-Familie zugeordnet (Stand Dezember 2022). Eine β -1,2-Mannobiose-Phosphorylase von *Thermoanaerobacter* (Dai et al. 2021) zeigt von den bisher charakterisierten GH130-Enzymen (April 2022) mit 26 % Sequenzähnlichkeit über 81 % der Sequenzlänge die größte Übereinstimmung zu *Tm_Gly*. Auch *Tt_Gly* (40 % Identität über 95 % der Sequenz zu *Tm_Gly*) zeigt ähnliche Übereinstimmungen zu diesem GH130-Enzym (24 % Identität über 82 % der Sequenz), obwohl die *conserved domain* Suche hier keine spezifischen Treffer zu GH130 zeigt. Dieser Ähnlichkeitsgrad entspricht ungefähr dem zwischen den später in dieser Arbeit behandelten α -Rhamnosidasen untereinander, was eine Mannose-Phosphorylaseaktivität möglich erscheinen lässt. Sie wurde jedoch bisher jedoch noch nicht überprüft.

4.1.4 Extreme Spezifität

Auch wenn das korrekte Substrat eingesetzt und die richtige Analysemethode gewählt wird, könnte es zu falsch negativen Ergebnissen kommen, denn manche Enzyme können als Teil einer komplexen Abbaukaskade extrem spezifisch gegenüber einem gewissen Substrat sein. Dies zeigten beispielsweise Ndeh et al. (2017) für den Abbau von Pektin durch *Bacteroides thetaiotaomicron*. Eine Mutante, dem das GH106-Enzym BT0986 fehlte, produzierte aus dem hochkomplexen Rhamnogalakturonan II ein Heptasaccharid, welches normalerweise von diesem Enzym umgesetzt wird. Diese Spezifität wäre wohl durch reine Co-Inkubation mit einzelnen anderen Enzymen nur sehr unwahrscheinlich aufgedeckt worden. Auch für die Aufklärung einer Aktivität für *Tm_Gly*, *Tt_Gly*, *Re_Xyl* und *Me_Xyl* könnten solche *in vivo* Mutationsansätze erfolgsversprechend sein (sofern eine genetische Modifizierbarkeit der jeweiligen Mikroorganismen möglich ist).

Da die Identifizierung enzymatischer Aktivitäten für die anderen in dieser Arbeit untersuchten Enzyme positiv ausfiel und damit deren Charakterisierung möglich war, wurde der Fokus auf diese Charakterisierung gelegt. Jedoch wäre die oben schon erwähnte Analyse von Hydrolyseprodukten mittels HPAEC-PAD und die Änderung von Reaktionsparametern wie Temperatur und pH-Werte weitere vorhandene Möglichkeiten, um eventuelle Aktivitäten für *Tm_Gly*, *Re_Xyl* und *Me_Xyl* aufzudecken. Zudem könnte künftig die Möglichkeit einer Glykosyltransferaseaktivität von *Tm_Gly* und *Tt_Gly* abgeklärt und die vermutete Laminarinaseaktivität von *Tt_Gly* zudem mittels HPAEC-PAD verifiziert werden.

4.2 Die aktuell thermophilsten α -Rhamnosidasen in Familie GH106

α -L-Rhamnosidasen (Ram, EC 3.2.1.40) spalten hydrolytisch Bindungen, die vom anomeren C von α -L-Rhamnopyranose (L-Rhap) ausgehen. Diese kommen in Pektin in Rhamnogalakturonan II als Seitenkettensubstituierung vor, oder sind oft Flavonon-assoziiert. Ein Beispiel hierfür ist Naringin, welches in Zitrusfruchtschalen zu finden ist. Eine Derhamnosylierung von Naringin zu Prunin führt zu weniger bitterem Geschmack und wird deshalb industriell in der Fruchtsaftherstellung zur Geschmacksverbesserung eingesetzt (Yadav et al. 2017; Busto et al. 2007). Andere rhamnosylierte natürliche Pflanzenstoffe sind beispielsweise Hesperidin, Rutin, Troxerutin und Diosmin, welche alle gefäßschützende Wirkung haben, und deshalb als natürliche Heilmittel bei Venenerkrankungen verabreicht werden (Apetrei 2021). Weitere Anwendungen für α -Rhamnosidasen finden sich bei der Herstellung von L-Rhap (Puri und Banerjee 2000), für die Aufklärung der Konfiguration dieses Zuckers in verschiedenen Polysacchariden, Glykosiden und Glykolipiden (Kamiya et al. 1985), bei der Verbesserung von Weinaroma (Gallego et al. 2001), der Erhöhung der Flavonoid-Bioverfügbarkeit (Beekwilder et al. 2009; Mueller et al. 2018) und bei der Synthese von Pharmazeutika (Bouriche und Arnhold 2010). A-Rhamnosidasen sind in den Familien GH28, GH78 und GH106 beschrieben. GH78 α -Rhamnosidasen bilden den größten Anteil der bereits biochemisch charakterisierten Rhamnosidasen und können sowohl *para*-Nitrophenyl- α -L-Rhamnopyranosid (*p*NPR) als auch die glykosidische Bindung der endständigen L-Rhap-Gruppe der zuvor genannten glykosylierten Flavonone spalten.

4.2.1 Verwandtschaft der untersuchten Enzyme zu anderen GH106-Enzymen

Für das zu Beginn dieser Arbeit noch in GHnc gelistete RamB aus *T. stercorarium* wurde bereits α -Rhamnosidaseaktivität gegenüber *p*NPR beschrieben (Broeker et al. 2018). Deshalb wurden einige auf Sequenzebene ähnliche Enzyme, jedoch mit geringen Aminosäuresequenzähnlichkeiten zwischen 22 und 29 % (Sequenzidentität) zu RamB ausgewählt, um zu überprüfen, ob es sich um eine neue GH-Familie handeln könnte. Die gewählten Sequenzen aus den thermophilen Organismen *T. maritima*, *T. neapolitana*, *C. bescii* und *T. stercorarium* zeigten bis zu 79 % Sequenzidentität untereinander (Tabelle 7.2.1). Da vier der sechs produzierbaren Proteine α -Rhamnosidaseaktivität (EC 3.2.1.40) zeigten und mittlerweile in GH106 klassifiziert sind, wurden die Enzyme *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B genannt. Die biochemische Charakterisierung in Anwesenheit von CoCl_2 wurde von Baudrexl et al. (2019) für die vier α -Rhamnosidasen durchgeführt, die zwischen 27 % und 79 % Sequenzübereinstimmung aufweisen. So konnte eine postulierte Mindestähnlichkeit von 80% für gleiche Aktivität (Wang et al. 2018) deutlich unterboten werden.

Außerdem sollte funktionell und bioinformatisch überprüft werden, ob die untersuchten Sequenzen eine neue Subfamilie in der Familie GH106 bildeten. Im Gegensatz zu einigen anderen GH-Familien wurden bisher für GH106 keine unterschiedlichen Aktivitäten in abgrenzbaren Claden identifiziert, die

zur Einführung neuer Subfamilien hätte führen können. Dies war beispielsweise in GH30 (Li et al. 2022b), GH43 (Mewis et al. 2016), oder GH5 der Fall (Lombard et al. 2014). Zwar sind etwa auch innerhalb von GH5 nur ein Drittel der Subfamilien monospezifisch, jedoch ist die Übereinstimmung der Substratspezifität auf Subfamilienebene signifikant höher als auf Familienebene (Aspeborg et al. 2012). Dass Bröker (2019) für *Ts_ArfD* α -Arabinofuranosidaseaktivität detektieren konnte, war ein Hinweis auf eine neue Aktivität in GH106. Diese konnte jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise sind andere Bedingungen nötig, da z.B. auch andere *T. stercorearium*-Enzyme einen niedrigeren pH-Wert, abweichende Temperaturen, oder andere Puffersubstanzen bevorzugen (Bröker 2019). Die Aktivität von Xyn43B wäre in dieser Studie z.B. vermutlich nicht entdeckt worden, da es seine höchste Aktivität bei pH 3,5 zeigt und bei dem hier für das Screening verwendeten pH 6,5 nur weniger als 10 % Restaktivität aufweist (Suryani et al. 2004).

Um bioinformatisch die sequenzbasierten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen α -Rhamnosidasen zu untersuchen, verwendeten Baudrexl et al. (2019) die Clustering- und Distanz-basierte *Neighbor-Joining*-Methode, wohingegen in dieser Arbeit die Optimierungs- und Merkmal-basierte *Maximum-Likelihood*-Methode verwendet wurde. Keine der beiden Ansätze garantiert einen evolutionär korrekten Baum, jedoch hat die *Maximum-Likelihood*-Methode einige postulierte Vorteile (Rahmann 2010).

Die gewählte *Outgroup* hat einen großen Einfluss auf die Aussagekraft eines phylogenetischen Baums. Im Folgenden soll die Auswahl derselben diskutiert werden. Laut CAZy stellen die 3D-Strukturen von GH78 ein $(\alpha/\alpha)_6$ -barrel, wie in Clan GH-G, -L, -M, -O, -P und GH-Q, und die von GH106 ein $(\beta/\alpha)_8$ -barrel, wie in Clan GH-A, -D, -H und GH-R, dar. Dies wurde schon vor der Strukturaufklärung für GH106 (Ndeh et al. 2017) durch Ähnlichkeitsanalysen von Naumoff (2012) vermutet. Jedoch gehört auch die GH13 α -Amylase, die von Baudrexl et al. (2019) als *Outgroup* verwendet wurde, zu Clan GH-H und besitzt damit eine $(\beta/\alpha)_8$ -barrel Struktur. Da das multiple Alignment strukturbasiert durchgeführt wurde, sollte eine von den anderen zwei Gruppen abweichende 3D-Struktur eine bessere Referenzgruppe darstellen. Deshalb wurde der phylogenetische Baum, der die Verwandtschaft von charakterisierten GH78- und GH106-Enzymen, auch untereinander, zeigen sollte, zunächst mit einer Exo-Polygalakturonase von *T. maritima* als *Outgroup* erstellt. Die GH28 Exo-Polygalakturonasestruktur wird als parallele β -Helix beschrieben. Jedoch handelte es sich immer noch um eine GH. So wurde noch eine *p*-Aminobenzoate N-Oxygenase mit fast ausschließlich α -Helices zugefügt. Jedoch scheint für alle drei Randgruppen eine ähnliche Anzahl an Aminosäureaustauschen im Vergleich zu den GH106-Enzymen stattgefunden zu haben, was an den ähnlich langen Kantenlängen im phylogenetischen Baum zu sehen ist, weshalb die *Outgroups* alle gleichermaßen geeignet gewesen sind.

Im direkten Vergleich zeigt der von Baudrexl et al. (2019) durch weniger Rechenkapazität erstellte *Neighbor-Joining*-Baum ähnliche Ergebnisse auf. Die GH106-Enzyme clustern alle zusammen und sind ähnlich weit entfernt von GH78-Rhamnosidasen wie zu den gewählten *Outgroups*. Alle GH106-Enzyme dieser Arbeit gliedern sich in diesem Ast zwischen den zwei Gründern der „GH106_dist.“-Enzyme im Baum ein, was deren Einordnung in GH106 bioinformatisch legitimiert (Baudrexl et al. 2019).

Die inaktiven *T. stercorarium* GH106-Enzyme bildeten keine einzelne Clade, was bedeutet, dass die α -Rhamnosidaseaktivität wohl nicht auf analoge, oder homologe Weise verloren ging, jedoch ist dies anhand der Daten des *Maximum-Likelihood*-Baums auch nicht ganz auszuschließen. Der Baum lässt auch die Spekulation nicht zu, ob die entfernteren nicht produzierbaren *C. bescii*-Proteine auch Rhamnosidaseaktivität, oder keine Aktivität aufgewiesen hätten.

Interessant ist außerdem, dass die Proteomanalyse mit einer auf Cellobiose gewachsenen *T. stercorarium* Kultur zeigte, dass *Ts_Ram106B*, sowie auch die zwei „funktionslosen“ *Ts_ArfD* und AGC69032.1 (AGI40007.1) exprimiert und, da sie auch im Überstand zu finden waren, wahrscheinlich auch sekretiert wurden (Broeker et al. 2018). So handelt es sich also wahrscheinlich nicht um unexprimierte, oder funktionslose duplizierte Pseudogene (Zhang 2003), da einerseits bei Energie-limitierten anaeroben Bakterien nur die Expression von Genen mit nützlicher und notwendiger Funktion sinnvoll erscheint. Andererseits kann die Expression vermeintlich funktionsloser Proteine evolutionär sinnvoll sein, da sie in bestimmten Habitaten möglicherweise einen Vorteil bieten könnten. Eine Möglichkeit ist auch, dass sie ihre Aktivität verloren haben, oder die noch funktionslosen Vorgänger der sich entwickelnden Rhamnosidasen darstellen (Martínez Cuesta et al. 2015). Es wäre also interessant weitere Substrate zu Screenen, da eine andere Aktivität nicht auszuschließen ist.

Trotz der teils geringen Sequenzidentität von ca. 20 % (zwischen dem *Paenibacillus*- und dem *Niabella aurantiaca*-Enzym) kann geschlussfolgert werden, dass sowohl wegen der zu den bisher in GH106 charakterisierten Enzymen identischen α -Rhamnosidaseaktivität als auch wegen der geringen Distanz im strukturellen Alignment keine neue Unterfamilie von GH106 erforderlich ist. So wurde die Familie GH106 durch die „GH106_dist.“ Proteine inklusive aller in dieser Arbeit untersuchten Orthologen legitim erweitert. Andere Spezifitäten außer α -Rhamnosidaseaktivität wurden bisher bei GH106-Enzymen nicht gefunden.

4.2.2 Biochemische Charakterisierung

Die Charakterisierung der Enzyme im Hinblick auf Ionenabhängigkeit, Temperaturoptimum und teils Temperaturstabilität, sowie die Bestimmung von kinetischen und inhibitorischen Parametern erfolgte für die drei thermophilen α -Rhamnosidasen mit dem Modellsubstrat *p*NPR. Die anfangs niedrigen spezifischen α -Rhamnosidaseaktivitäten von höchstens 3,5 U/mg (*Cb*_Ram106B nach 10 min bei 70 °C) konnten durch den Zusatz bestimmter zweiwertiger Kationen (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) um das bis zu 60-fache (für *Tn*_Ram106B mit CoCl_2) erhöht werden, was die Messung von Inhibitionskinetiken erst möglich machte. Dass sich im katalytischen Zentrum von GH106-Enzymen tatsächlich ein für die Katalyse notwendiges zweiwertiges Kation befindet, wurde durch die erste Kristallstruktur eines GH106-Enzyms, BT0986, bestätigt (Ndeh et al. 2017). Auch RHA-P, die zweite GH106-Rhamnosidase mit bekannter Struktur, dessen PDB Eintrag (6Q2F) allerdings kein zweiwertiges Ion enthält, ist funktionell abhängig von Ca^{2+} -Ionen (Terry et al. 2020). Es wurde nur mit dem Substrat *p*NPR getestet, welche Kationen das höchste Potenzial zur Aktivitätserhöhung haben. Es ist jedoch bekannt, dass Substratwechsel oft auch die Cofaktorabhängigkeit ändern können (Bisswanger 2014). Deshalb wäre es möglich, dass der untersuchte Naringinabbau mit einem anderen Kation noch effektiver gewesen wäre.

Die ermittelten Temperaturoptima der Aktivität (10 min Reaktion) ohne zusätzliche Ionen (*Tm*_Ram106B: 85 °C; *Tn*_Ram106B: 80 °C; *Cb*_Ram106B: 70 °C und *Ts*_Ram106B: 60 °C), ähnlich zu denen von Baudrexl et al. (2019) mit Cobaltionen bestimmten (*Tm*_Ram106B: 86,5 °C; *Tn*_Ram106B: 84 °C; *Cb*_Ram106B: 70 °C und *Ts*_Ram106B: 50 °C), stimmten in etwa auch mit den Bereichen für die optimalen Wachstumsoptima für *T. maritima* (80 °C), *T. neapolitana* (80 °C), *C. bescii* (72–75 °C, bzw. 78–80 °C) und *T. stercorarium* (65 °C) überein (Huber et al. 1986; Jannasch et al. 1988; Svetlichnyi 1990; Yang et al. 2010; Madden 1983). Jedoch variieren sie offensichtlich stärker für *Ts*_Ram106B als für die anderen drei α -Rhamnosidasen. Bröker (2019) beschrieb für *Ts*_Ram106B höhere spezifische Aktivitäten bei 55 °C (0,1 U/mg) und 50 °C (0,43 U/mg) nach Inkubation über Nacht als bei 60 °C. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen dieser Arbeit, in der die anfänglichen Aktivitäten bis 160 min bei 60 °C deutlich höher als bei 50 °C waren. Dies könnte damit erklärt werden, dass das Enzym bei niedrigeren Temperaturen länger aktiv ist, was in Summe bei den von Bröker (2019) über Nacht inkubierten Reaktionen zu höheren Produktkonzentrationen und damit bei der Berechnung zu höheren spezifischen Aktivitäten führte. In der Konsequenz wurden die Enzyme *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B folglich jeweils bei (wenn angegeben auch niedriger als) 85 °C, 80 °C, 70 °C und 55 °C, jeweils nur zwischen 10 min und 20 min lang, inkubiert.

Dennoch war es zunächst unerwartet, dass auch nach Zugabe von CoCl_2 , durch das eigentlich eine Stabilisierung von $Ts_Ram106B$ erwartet wurde, von Baudrexel et al. (2019) nach 10 min die höchste Aktivität ebenfalls bei 50 °C gezeigt wurde. In den Ansätzen mit CoCl_2 wurde als Puffer 100 mM MOPS mit pH 7 (bei 20 °C; pH 6 bei 80 °C) verwendet, während in den Ansätzen ohne zusätzliche Ionen (gezeigt in dieser Arbeit) der pH um 0,5 niedriger lag (100 mM MOPS mit pH 6,5 bei 20 °C). Das Temperaturoptimum sollte jedoch für vergleichbare Ergebnisse bei dem optimalen pH-Wert für $Ts_Ram106B$ (50 mM Malat pH 4 bei 20 °C, pH 5 bei 80 °C) – ermittelt durch Baudrexel et al. (2019) ermittelt werden, was für $Ts_Ram106B$ nicht der Fall war. Aufgrund einer Instabilität von $Ts_Ram106B$ bei höheren pH-Werten wurde also wahrscheinlich mit CoCl_2 eine geringere optimale Temperatur ermittelt, als dies bei dem optimalen pH-Wert der Fall gewesen wäre.

Die höchste für $Ts_Ram106B$ nach 10 min und 60 °C gemessene Aktivität lag mit 0,16 U/mg, etwa vier Mal höher als Bröker (2019) für dieses Enzym bereits angab (0,04 U/mg bei 60 °C). Jedoch wurde, neben den eben angesprochenen pH-Unterschieden, in der Arbeit von Bröker (2019) Zellextrakt und kein gereinigtes Protein verwendet, was die höhere spezifische Aktivität in der aktuellen Arbeit erklären kann.

$Tm_Ram106B$ und $Tn_Ram106B$ stellen, mit T_{Opt} von 85 °C und 80 °C (10 min Reaktion), die ersten GH106-Rhamnosidasen mit solch hoher Temperaturpräferenz dar. In einer anderen GH-Familie, GH78, wurde mit $DtRha$, das ein Temperaturoptimum von 95 °C (5 min Reaktion) aufweist, kürzlich eine noch thermophilere α -Rhamnosidase beschrieben (Guillot et al. 2019). Eine hohe Aktivität bei hohen Temperaturen sowie eine hohe Resistenz gegenüber Thermoinaktivierung wäre für α -Rhamnosidasen zwar wünschenswert für eine industrielle Anwendung (z.B. als Naringinase), jedoch blieben für einen kommerziellen Einsatz der hohe K_M -Wert (K_M , bzw. K_{prime} -Werte für alle vier hier untersuchten Enzyme zwischen 1,2 mM und 2,0 mM), sowie die hohe Produktinhibition (IC_{50} -Werte zwischen 4,9 mM und 8,3 mM Rhamnose) ungelöste Probleme.

Eine mögliche Oligomerisierung von $Tm_Ram106B$, $Tn_Ram106B$ und $Cb_Ram106B$ konnte weder durch SDS-PAGE-Gele noch durch Gelfiltration (beispielhaft für $Tm_Ram106B$ durchgeführt) ausgeschlossen werden. Während für $Ts_Ram106B$ keine Doppelbande auftrat, konnte hingegen für das nicht aktive Ts_ArfD eine Doppelbande im SDS-PAGE-Gel beobachtet werden, wie in Abbildung 6.4 Spur 42 in der Dissertation von Bröker (2019) zu sehen ist. Jedoch sind auch für andere Enzyme von *T. stercorarium* solche Doppelbanden sichtbar (Bröker 2019), was bei sehr thermostabilen Enzymen auch auf unvollständige Denaturierung zurückzuführen sein kann (Baudrexel et al. 2019).

Die Kristallisierung zweier GH106-Enzyme, BT_0986 und RHA-P zeigt, dass sich die Aminosäureketten dieser Familie zu einem sogenannten $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel falten, das sich aus jeweils acht parallelen β -Strängen und acht α -Helices zusammensetzt. Außerdem befinden sich noch vier zusätzliche Domänen um diese Faserstruktur angeordnet, die auch in anderen Glykosidasen vorkommen (Terry et al. 2020). Das aktive Zentrum befindet sich in der Mitte der fassartigen Struktur.

4.2.3 Katalytische Aminosäuren in GH106-Enzymen

Durch ein strukturelles Alignment mit der Struktur von BT_0986 wurde für alle zu dem Zeitpunkt charakterisierten GH106-Rhamnosidasen eine Übereinstimmung in der generellen **katalytischen Base** gefunden (Baudrexel et al. (2019), E593 in BT_0986 (Ndeh et al. 2017). In *Tm*_Ram106B und *Tn*_Ram106B entspricht diese jeweils dem Glutamat E335, in *Cb*_Ram106B E336 und *Ts*_Ram106B E385. Die für BT_0986 **vorgeschlagene katalytische Säure** E461 konnte hingegen nur in RHA-P (CCA90848.1), RhaM (BAD12237.1), BN863_22040 (CDF79916.1) von *Formosa agariphila* KMM 3901 und BT 4145 (AAO079250.1) wiedergefunden werden, nicht jedoch in den zwei GH106_dist.-Enzymen, B160DRAFT 04058 von *Niabella aurantiaca* (WP 018627535.1) und Pjdr2 3683 (ACT02314.1) von *Paenibacillus* sp. JDR-2, oder den vier α -Rhamnosidasen dieser Arbeit. Nun ist auch die Beschreibung der Struktur von RHA-P (Terry et al. 2020) verfügbar, die sich ebenfalls auf die zuvor von Ndeh et al. (2017) beschriebenen katalytischen Aminosäuren stützt. Von Mensitieri et al. (2018) wurde für RHA-P jedoch gezeigt, dass die Mutation E506A (E506 aligniert mit der vorgeschlagenen katalytischen Säure E461 von BT_0986) eine geringe, jedoch messbare Restaktivität von 0,6 % aufwies und dass die Mutation D503A hingegen zum kompletten Aktivitätsverlust führte. Dieses Aspartat (D503 in RHA-P) scheint zudem, im Gegensatz zu dem vorgeschlagenen E461 von BT_0986, in allen GH106-Enzymen konserviert zu sein (supplementary Figure S2 in Baudrexel et al. (2019)). Deshalb wird hiermit das Aspartat an der Position 503 in RHA-P, (D458 in BT_0986) als die wahrscheinlichere katalytische Säure vorgeschlagen. Dieser Rest befindet sich ebenfalls im katalytischen Zentrum, wurde jedoch von Ndeh et al. (2017) nur als metallbindende Aminosäure vorgeschlagen, die Mutation D458A führte jedoch zur vollständigen Inaktivierung von BT_0986. Damit wären die **katalytischen Säuren** in *Tm*_Ram106B und *Tn*_Ram106B jeweils D191, für *Cb*_Ram106B D192 und für *Ts*_Ram106B D235. Zur Absicherung sollten die wahrscheinlich katalytischen Aminosäuren der vier Rhamnosidasen jedoch künftig experimentell verifiziert werden.

4.3 Struktur und Aktivität von thermophilen GH159 Galaktofuranosidasen

Die drei gewählten ORFs von *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *C. hydrothermalis* und *C. kronotskyensis* wurden zur Charakterisierung gewählt, da es sich bei diesen zu Anfang dieser Arbeit unter GHnc klassifizierten Enzymen um noch nicht charakterisierte, möglicherweise neue Glykosidhydrolasen handelte. Während der Arbeit mit diesen Enzymen wurde die neue GH-Familie GH159 gegründet, da Helbert et al. (2019) bei einem Screening von bis dahin uncharakterisierten Sequenzen für ein ähnliches Enzym von *Bacteroides cellulosilyticus* eine β -D-Galaktofuranosidase (Gaf) Aktivität (ALJ59596.1) beobachtete. Dieses Enzym zeigte über 93 % der Sequenzlänge eine Ähnlichkeit von über 30 % zu den *Caldicellulosiruptor* Sequenzen, welche auch Gaf Aktivität zeigten, sodass sie nach der gängigen GH-Nomenklatur als *Cs_Gaf159A* (ABP666075.1), *Ch_Gaf159A* (ADQ06027.1) und *Ck_Gaf159A* (ADQ45201.1) benannt wurden. Mit *pNPGf* und einem pH von 6,5 (20 °C) wurde für alle drei Enzyme die höchste Aktivität bei einer Temperatur von 82 °C erreicht. Bei 80 °C konnten für die drei Gaf K_M -Werte von ca. 4–9 mM und V_{max} -Werte von ca. 2–3 U/mg bestimmt werden.

Galaktofuranose ist die in der Natur am häufigsten vorkommende Hexofuranose (Seničar et al. 2020). Beispielsweise ist sie Bestandteil von Zellwänden (Bakterien und Protozoen), sowie pilzlichen und bakteriellen Exopolysacchariden. Galf-enthaltende Glykokonjugate sind interessante therapeutische Zielstrukturen, da sie als essenzielle Virulenzfaktoren von Pathogenen, wie enteroinvasiven *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und verschiedenen Leishmanien, beschrieben wurden (Seničar et al. 2020; Marino et al. 2012). Aufgrund der ähnlichen Ausrichtung der Furanose-Ringsubstituenten von β -D-Galaktofuranosid und α -L-Arabinofuranosid (McGill und Westmoreland 2018; Baudrexel et al. 2022) kommen natürlicherweise Enzyme mit Affinität zu beiden Zuckern vor; z.B in GH51 und GH54 (Tefsen et al. 2012). Es konnte auch bereits durch Mutation aus einer Arabinofuranosidase eine Galaktofuranosidase gemacht werden, wie es für *CtAraf51* demonstriert wurde (Pavic et al. 2019). Auch wurden einige wenige, meist pilzliche, spezifische Galaktofuranosidasen beschrieben, die nur Galaktofuranoside, jedoch keine Arabinofuranoside spalten (Rietschel-Berst et al. 1977; Matsunaga et al. 2015a). Für eine spezifische exo-Galaktofuranosidase aus GH2 wurde Aktivität gegenüber einem aus Pilzen präparierten Galaktomannan gezeigt. Es zeigte mit *pNPGf* als Substrat mit 4,4 mM einen ähnlichen K_M Wert zu dem der Galaktofuranosidase dieser Arbeit (Matsunaga et al. 2015b). Es wäre deshalb interessant zu sehen, ob die drei Enzyme dieser Arbeit auch im Stande sind, dieses natürliche Oligosaccharid zu hydrolysieren.

Die Enzyme könnten mit dem richtigen Donor und Akzeptorsubstrat zur Herstellung von biologisch relevanten Galaktofuranokonjugaten verwendet werden. Jedoch wären noch Optimierungen notwendig. Zwar liegen die K_M -Werte von ca. 4–9 mM (Gaf159) in etwa im Bereich der engineernten *CtAraf51* L319 Mutanten (3–7 mM), dennoch liegen die katalytischen Effizienzen der drei Gaf mit 207–

434 s⁻¹ M⁻¹ deutlich unter denen, die durch die Mutation von CtAraf51 erreicht wurden (710–2235 s⁻¹ M⁻¹). Da sich die unterschiedlichen Aktivitäten (Galaktofuranosidase- und Arabinofuranosidaseaktivität) in ungefähr der gleichen Größenordnung befanden (zwischen 0,05 U/mg und 0,20 U/mg) ist auch anzunehmen, dass unter gewissen Bedingungen jeweils die Galaktofuranosidase- oder die Arabinofuranosidaseaktivität überwiegen könnte, was je nach Anwendungswunsch ausgenutzt werden könnte.

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die zusätzliche Arabinofuranosidaseaktivität der drei Galaktofuranosidasen gegenüber *p*NPA, bestimmten AXOS und Arabinogalaktan gesetzt, da es sich um eine in der GH159-Familie noch nicht beschriebene Aktivität handelt und Arabinofuranosidasen wichtige Enzyme für die vollständige Biomasseverzuckerung sind (Liu et al. 2021). Die drei Galaktofuranosidasen spalteten die 1,3-Bindung in A^{2,3}XX, sowie auch in A³X, wobei mit letzterem in der gleichen Zeit weniger Arabinose entstand.

Bezüglich der Lokalisierung der drei Galaktofuranosidasen in ihren natürlichen Wirtsorganismen lässt sich feststellen, dass sie kein durch SignalP vorhersagbares, bekanntes Signalpeptid für den Export über die Cytoplasmamembran besitzen, was eine cytoplasmatische Lokalisation nahelegt. Allerdings wäre ein alternativer Sekretionsweg denkbar. Auch nach einer Analyse mit dem Webtool SecretomeP (Bendtsen et al. 2004), das durch künstliche Intelligenz und basierend auf der Primärsequenz weitere Faktoren eines Proteins für eine mögliche Sekretion berücksichtigt, ist eine intrazelluläre Lokalisation wahrscheinlicher. Da allerdings auch Proteine existieren, die innerhalb und außerhalb der Zelle unterschiedliche Funktionen haben (Bendtsen et al. 2005), wäre eine Analyse und der quantitative Vergleich von zellulären und extrazellulären Proteinen mittels Massenspektrometrie interessant, wie es Broeker et al. (2018) für Kulturüberstände von *T. stercorarium* durchführte.

Eine Funktion für *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A*, sowie weiteren ähnlichen Enzymen in anderen Spezies, beim intrazellulären Oligosaccharidabbau ist durchaus denkbar, da z.B. *C. hydrothermalis* zwei extrazelluläre GH10-Xylanasen besitzt, die AXOS generieren würden (Sawhney und Preston 2014), die durch *Ch_Gaf159A* weiter abgebaut werden könnten. Andererseits befindet sich stromaufwärts des Gens für *Ch_Gaf159A* das Gen für ein mögliches GH35-Enzym mit 100 % Sequenzähnlichkeit über 99 % der Sequenzlänge zu einer β -Galaktosidase, was wiederum für ein Galaktose-enhaltendes, natürliches Substrat spricht.

Die nach 20 min gemessenen Temperaturoptima von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* mit *p*NPA (90 °C, 82 °C und 93 °C) passen zu den thermophilen Wachstumsoptima der jeweiligen Ursprungsorganismen, 70 °C für *C. saccharolyticus* und *C. kronotskyensis* und 65 °C für *C. hydrothermalis* (Miroshnichenko et al. 2008), und liegen jeweils 5,5 °C, 10,5 °C und 6 °C unter den jeweiligen durch DSF ermittelten Schmelztemperaturen von 95,5 °C, 92,5 °C und 99 °C. Die mögliche

temperaturinduzierte Teilentfaltung und der damit verbundene Aktivitätsverlust von *Cs_Gaf159A* (bei 90 °C) war noch nach 24 h reversibel, wohingegen *Ch_Gaf159A* (bei 82 °C) und *Ck_Gaf159A* (bei 93 °C) schon nach wenigen Stunden teils irreversibel Aktivität verloren (Baudrexel et al. 2022).

Die kinetischen Parameter konnten nur mit *pNPGf* als Substrat bestimmt werden. Mit *pNPA* wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten auch nach 10 min und mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen bis zu einer Substratkonzentration von 20 mM *pNPA* bestimmt. Die Kurven flachten nicht ab, was auf eine fehlende Substratsättigung, also zu geringe Substratkonzentrationen, bzw. eine zu hohe Enzymkonzentration schließen ließ. Jedoch war die Enzymkonzentration aufgrund zu geringer Aktivität nicht reduzierbar und die Substratkonzentration wegen Instabilität nicht zu erhöhen. Bei Enzymen, die der Michaelis-Menten Kinetik folgen sollte bei korrekter Verdünnung und präzisen Messdaten auch bei geringen Substratkonzentrationen durch eine doppelt reziproke Auftragung (Lineweaver-Burk-Plot) die Bestimmung von V_{\max} und K_M möglich sein (Robinson 2015). Jedoch ergaben sich auch ohne Beachtung der kleinsten Substratkonzentrationen, die normalerweise am fehleranfälligsten sind, so hohe Abweichungen, dass V_{\max} auch negativ hätte sein können. Bei 70 °C, was mehr als 10 °C von den optimalen Temperaturen der Enzyme abweicht, und bei welcher die Galaktofuranosidasen nur ca. 30 % ihrer Aktivität zeigten, konnte ein annähernd sigmoidaler Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Substratkonzentration beschrieben werden (Fida 2018). Die mit höheren Substratkonzentrationen teils mehr als linear ansteigenden Geschwindigkeiten konnten jedoch auch bei den optimalen Temperaturen beobachtet werden. Ein sigmoidaler Kurvenverlauf ist oft auf allosterische Effekte zurückzuführen. Diese treten meist durch Multimerisierung, durch mehreren aktive Zentren, oder durch kooperative Bindung mehrerer Substratmoleküle auf (Robinson 2015). Anhand der Struktur von *Ch_Gaf159A* konnte jedoch eine Di- und Multimerisierung sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden (Baudrexel et al. 2022). Ein weiteres aktives Zentrum, das Substratmoleküle binden könnte, ist für diese β -Propeller und weitere fassartigen 3D-Strukturen bisher nicht beschrieben worden. Jedoch könnte das Verdrängen anderer mit dem aktiven Zentrum interagierender Substanzen, wie Glycerinmoleküle aus dem Enzymlagerpuffer, durch höhere Substratkonzentrationen auch einen solchen Effekt auslösen. Diese könnten durch einen Pufferwechsel durch Diafiltration vermieden werden. Andererseits entsprach der Kurvenverlauf von Reaktionsgeschwindigkeit über die Substratkonzentration bei optimaler Temperatur annähernd einer Reaktion ersten Grades, weshalb man annehmen kann, dass die gewählten Substratkonzentrationen deutlich unter dem des K_M -Werts liegen ($c_s \ll K_M$; Li 2017). So liegt K_M mindestens über 10 mM (Baudrexel et al. 2022).

Die Abhängigkeit der Aktivität der Galaktofuranosidasen von zweiwertigen Kationen wurde sowohl experimentell gezeigt als auch durch die Ergebnisse der Kristallisierung nochmals verifiziert, da sich im Zentrum des 5-fachen β -Propellers ein nicht eindeutig identifizierbares Metallion befand. Da Mangan-

und Calciumionen den größten aktivierenden Effekt auf *Ch_Gaf159A* erzielen, und Mangan ein anomales Signal ausgelöst hätte, was nicht detektiert wurde, wurde das zentrale Metallion als Ca^{2+} modelliert (Baudrexel et al. 2022).

Die 3D-Struktur bestätigte außerdem, dass *Ch_Gaf159A* aus in Summe über 50 % β -Strängen besteht, auf was schon die Zirkulardichroismus-Analyse der Sekundärstrukturzusammensetzung hingewiesen hat. Diese, erstmalig für die Familie GH159 (nun im Gegensatz zu Li et al. (2021) experimentell) bestimmte, konservierte 5-fache β -Propeller Struktur kommt nicht nur auch in GH43, sondern auch in weiteren Familien vor. Der Mechanismus der Hydrolyse kann sich zwar zwischen den Familien unterscheiden, ist jedoch innerhalb einer Familie meist konserviert (Aspeborg et al. 2012). Dementsprechend könnte die Familie GH159, entweder wie GH43, GH62 und GH117 zu dem die anomere Konfiguration invertierenden Clan GH-F, oder wie GH32 und GH68 zu den retendierenden (die anomere Konfiguration beibehaltenden) Enzymen des Clans GH-J gezählt werden (Tabelle 4.3.1). Andererseits wurden beispielsweise in GH97 bereits Enzyme mit invertierendem, aber auch Enzyme mit retendierendem Mechanismus beschrieben, weshalb auch nicht zu 100 % postuliert werden kann, dass der Mechanismus innerhalb einer Familie tatsächlich durchgehend konserviert ist (Gloster et al. 2008).

Tabelle 4.3.1 GH-Clans mit 5-facher β -Propeller Struktur.

Clan	GH Familie	Mechanismus	involvierte AS / Information aus CAZy
GH-F	GH43	invertierend	Asp, Glu
	GH62	invertierend	Asp, Glu
	GH117	invertierend	(entfernt verwandt zu GH43)
GH-J	GH32	retendierend	Asp: Nukleophil/Base; Glu: Protonendonor
	GH68	retendierend	Asp, Glu

Um dies aufzuklären wäre eine Untersuchung der gebildeten Reaktionsprodukte durch NMR interessant. Alternativ dazu kann der Abstand der katalytischen Aminosäuren einen Hinweis auf den Mechanismus geben. Der Abstand zwischen den zwei katalytischen Aminosäuren beträgt bei den meisten invertierenden Enzymen 6–11 Å, da ein zusätzliches Wasser-Molekül, das von der Base deprotoniert wird, in das aktive Zentrum passen muss. Hingegen läuft die Katalyse durch ein retendierendes Enzym in einer klassischen Koshland Reaktion ab. Dabei sind das Nukleophil und der Säure/Base-Rest ca. 5,5 Å voneinander entfernt (Glycoside hydrolases - CAZyedia 2022). Die katalytische Base in *Ch_Gaf159A* ist aufgrund von Ähnlichkeiten zu BpXynB (D17) und damit zu GsXynB3 (D15) (Hong et al. 2018) sehr wahrscheinlich D19. Diese aktiviert ein Wassermolekül, während E190 (E187 in GsXynB3) als allgemeine Säure die Abgangsgruppe protoniert (Hong et al. 2018). E190 und D19 liegen in 7ZEI (*Ch_Gaf159A*) durchschnittlich 7,15 Å voneinander entfernt

(Tabelle 4.3.2) und damit innerhalb der postulierten 6–11 Å für invertierende Enzyme. Die Distanz zwischen E190 und D142 beträgt, übereinstimmend mit der Distanz von 4 Å zwischen D128 und E187 in GsXynB3, zwischen 3,8 Å und 5,95 Å (Tabelle 4.3.2). D142 dient somit, wie D128 (in GsXynB3), wahrscheinlich zur Stabilisierung der Säurekonstante, sowie der Orientierung von E190 bei der Katalyse (Brüx et al. 2006).

Anhand dieser Abstandsanalyse scheint also ein invertierender Mechanismus sehr wahrscheinlich zu sein.

Tabelle 4.3.2 Distanzen zwischen den katalytischen Aminosäuren in *Ch_Gaf159A*. Distanzen wurden in Chimera anhand des PDB Files 7ZEI gemessen

AS 1	O-Atom AS 1	AS 2	O-Atom AS 2	Distanz	Mittlere Distanz
E190	1	D19	1	6,10 Å	7,15 Å
E190	1	D19	2	7,19 Å	
E190	2	D19	1	7,34 Å	
E190	2	D19	2	7,97 Å	
E190	1	D142	1	5,95 Å	4,88 Å
E190	1	D142	2	4,54 Å	
E190	2	D142	1	5,21 Å	
E190	2	D142	2	3,80 Å	
D19	1	D142	1	5,97 Å	6,05 Å
D19	1	D142	2	6,12 Å	
D19	2	D142	1	5,52 Å	
D19	2	D142	2	6,59 Å	

Zwar kann von der Struktur nicht auf die Funktion geschlossen werden, jedoch wurden in GH43 sowohl Enzyme, die gegenüber Arabinose und Galaktose aktiv sind, wie α -L-Arabinofuranosidasen (EC 3.2.1.55) und β -D-Galaktofuranosidase (EC 3.2.1.146), als auch Enzyme mit Aktivität gegenüber Xylose enthaltenden Substraten, wie β -Xylosidasen (EC 3.2.1.37) und Xylanasen (EC 3.2.1.8) beschrieben. Deshalb müssen diese Aktivitäten auch für GH159-Enzyme als möglich diskutiert werden. Auch die Strukturüberlagerung mit XynB von *Bacillus pumilus* und die Übereinstimmung der Ausrichtung der katalytischen Aminosäuren wirft die Frage auf, ob die drei β -Galaktofuranosidasen dieser Arbeit eventuell auch in der Lage gewesen wären, Xylobiose zu spalten (Hong et al. 2018). Jedoch konnte bei dem anfänglichen Screening keine Aktivität gegenüber *p*NP- β -D-Xylopyranosid festgestellt werden. Es könnte aber sein, dass eine Aglykon-Xylose besser als *p*NP im aktiven Zentrum binden könnte.

Peptidschleifen in der Struktur sind meist entscheidend für die selektive Substratpräferenz eines Enzyms und bilden die Substratbindefurche (cleft). Die Aminosäuren in den Schleifen können durch Wasserstoffbrückenbindungen oder durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Rückgrat von

Polysacchariden oder deren Seitenketten interagieren. Außerdem können die Schleifen sterisch verhindern, dass gewisse Substrate zum aktiven Zentrum hin positioniert werden (Goyal et al. 2016). Die beobachtete „Verkürzung“ der Schleifenregionen von *Ch_Gaf159A* im Vergleich zur β -Xylosidase XynB könnte mehrere Gründe haben. Einerseits könnte es auf unterschiedliche natürliche Substrate hindeuten; nämlich wie beobachtet Oligosaccharide mit Xylose-Rückgrat für *Ch_Gaf159A*, während XynB Xylobiose effektiv umsetzt und durch die längeren Schleifenregionen diese eventuell von einer Diffusion aus dem aktiven Zentrum abhält. Andererseits könnten die kürzeren Schleifen auch etwas mit der Temperaturstabilität zu tun haben, da thermostabilere Enzyme oft kleiner und kompakter sind (Lebbink 1999).

Die variablen Schleifen machen außerdem ein strukturelles Alignment in diesen Bereichen sehr wenig aussagekräftig. Da die zentrale Struktur aus den β -Strängen aber sehr konserviert ist, und da die katalytischen Aminosäuren sich jeweils ganz am Ende der Peptidschleifen und am Anfang der ersten β -Stränge von Propeller-Blättern 1,3 und 4 befinden, konnte das strukturelle Alignment erfolgreich zur Vorhersage der katalytischen Aminosäuren genutzt werden. Jedoch kann keine Aussage über eine mögliche Unterscheidung oder Übereinstimmung in der Substraterkennung/-bindung gemacht werden, bzw. trotz der fehlenden Übereinstimmungen in vielen der Aminosäuren kann nicht geschlussfolgert werden, dass sich die Aminosäuren, die bei der Substratbindung in *Ch_Gaf159A* involviert sind, sich stark von denen in XynB unterscheiden. Gezielte Mutagenese konnte D19, D142 und E190 als katalytische Aminosäuren verifizieren, da die jeweiligen Alanin-Austauschmutanten keinerlei Aktivität gegenüber *pNP*-Glykosiden, AXOS, oder Arabinogalaktan mehr zeigten.

Wie von Goyal et al. (2016) für CtAbf43A beschrieben, wird auch in *Ch_Gaf159A* das Calciumion von einem Histidinrest (H244) koordiniert. Es könnte durch einen Elektronen-ziehenden Effekt und einen dadurch modulierten pK_s von Glu190 indirekt an der Katalyse beteiligt sein (Till et al. 2014), wie experimentell vermutet. Dass Calcium zwar wichtig, jedoch nicht essenziell für die Katalyse ist, zeigten Restaktivitäten der H244N Mutante von 6 % und 10 % gegenüber *pNPG* und *pNPA* und verminderte Arabinoseausbeuten nach Abbau von Arabinogalaktan und $A^{2,3XX}$, sowie fehlende Aktivität gegenüber A^3X .

Zwar konnte die Kristallstruktur nicht eindeutig einen invertierenden Mechanismus vorschlagen und die Funktion des Metallions nicht vollständig aufklären, jedoch lieferte sie nun den Beweis, dass es sich bei *Ch_Gaf159A* und aufgrund der hohen Ähnlichkeit auch bei *Cs_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* um Exo-Enzyme handelt. Um aufzuklären, wie die Substrate jeweils in das aktive Zentrum gebunden werden und wie auf Strukturebene die experimentell beobachteten Spezifitäten entstehen, wäre eine Strukturaufklärung mit gebundenem Liganden notwendig. Weil natives Enzym das Substrat während der Kristallisierung trotz niedrigerer Temperaturen eventuell umgesetzt hätte, sollte eine katalytische

Aminosäure zu einer ähnlichen, jedoch nicht zur Katalyse befähigten Aminosäure, mutiert werden. Das Substrat sollte so während der Kristallisation möglichst im aktiven Zentrum der inaktiven Mutante verbleiben. Um eine Kristallisierung mit A^{2,3}XX zu ermöglichen, ohne dass dieses umgesetzt wird, wurde bereits die E190Q Mutante von *Ch_Gaf159A* generiert, die wie die E190A Mutante komplett inaktiv war. Das Glutamin ist das γ -Amid der Glutaminsäure. Anstelle der Hydroxylgruppe der γ -Carboxylgruppe von Glutaminsäure trägt Glutamin eine Aminogruppe und ist trotz gleicher Orientierung und Größe nicht fähig, bei der Hydrolyse der glykosidischen Bindung die Abgangsgruppe zu protonieren. So sollte das Substrat ungespalten im aktiven Zentrum kristallisiert werden können. Jedoch gelang es trotz mehrerer Kristallisationsansätze mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen bisher nicht, messbare Kristalle mit der E190Q Mutante und dem Substrat A^{2,3}XX zu generieren. Deshalb konnten die experimentell auftretenden Fragen nicht beantwortet werden, ob doppelt substituierte Xylosereste spezifischer im aktiven Zentrum gebunden werden als einfach substituierte, und ob auch kleinere AXOS mit einem nicht substituierten Xyloserest am nicht reduzierenden Ende so gebunden werden könnten, sodass auch von diesen Substraten Arabinose abgespalten werden könnte.

4.4 Spezifitäten von GH43_10 und GH43_16 Modulen und deren Kombination im thermostabilen Enzym *Ts_Axh43A*

Die Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase *Ts_Axh43A* (ehemals XynD) aus dem hemicellulolytischen *T. stercorarium* ist aus vier Modulen aufgebaut. Die Definition von Modulen ist, dass sie funktionell und strukturell eigenständige Einheiten darstellen (Cantarel et al. 2009). Nach einem N-terminalen Signalpeptid bildet eine in GH43_10 klassifizierte Sequenz das erste katalytische Modul (c1), gefolgt von einem bisher nicht ausreichend charakterisierten, wahrscheinlich nicht katalytischen Modul GH43_C2 (link), einem zweiten katalytischen Modul aus der Familie GH43_16 (c2), sowie einem C-terminalen Kohlenhydratbindemodul CBM6 (cbm).

Die Familie GH43 wurde wie bereits erwähnt weiter untergliedert. Dazu wurden über 91 % der GH43-Module in 37 Familien unterteilt, deren Mitglieder jeweils in den konservierten Aminosäureresten und den Ergebnissen von biochemischen und strukturellen Charakterisierungen übereinstimmen. Auch wurde bereits vermutet, dass die Domänen von multimodularen GH43-Enzymen aus unterschiedlichen Subfamilien feine, aber signifikante Unterschiede in der Spezifität aufweisen könnten, die jedoch nur auf geeigneten, definierten Substraten charakterisierbar sind (Mewis et al. 2016).

Ts_Axh43A wurde in der Arbeit von Bröker (2019) im Zuge der Charakterisierung der Enzymausstattung von (*Thermo*-)*Clostridium stercorarium* als Arabinoxylan-Hydrolase mit einer spezifischen Aktivität von 41 U/mg gegenüber Arabinoxylan und 1,43 U/mg gegenüber *p*NPA, einem pH Optimum von 6,0 in Citrat-Phosphat Puffer und einem Temperatur Optimum von 60,6 °C, beschrieben. Es wurde außerdem bereits postuliert, dass das Volllängenenzym in der Lage ist, in Arabinoxylan und den abgeleiteten Oligosacchariden (AXOS) jeweils alle vorkommenden Bindungen von Arabinose zum Xylan-Rückgrat zu hydrolysieren (Broeker et al. 2018; Mechelke 2018). Das bedeutet, dass es in der Lage ist, sowohl die Monosubstitutionen als auch die Disubstitutionen und sowohl die 1,2- als auch die 1,3-Bindungen der Xylp-Rückgrat-Substituenten zu spalten (Bröker 2019). Diese Aussage lässt sich nach der Untersuchung der Spezifitäten in dieser Arbeit nicht vollständig bestätigen. Zum einen stellte die von *Ts_Axh43A* freigesetzte Arabinosekonzentration aus Arabinoxylan nur zwischen 45–50 % der auf Grundlage der Zuckerzusammensetzung des Polysaccharids möglichen Arabinosekonzentration dar, zum anderen konnten nach der anschließenden Inkubation mit einer Xylanase noch mono-substituierte AXOS detektiert werden, was auf unvollständige Dearabinosylierung schließen lassen könnte. Es könnte sich dabei aber auch um zusätzlich mit β -D-1,2-Xylp oder Ferulasäure substituierte Oligosaccharide handeln, die weder durch die Axh-md2,3, noch durch die Xylanaseaktivität hydrolysiert werden können (Wilkens et al. 2017). Auch eine sterische Hinderung des Enzyms durch zu viele benachbarte Arabinosylierungen, sodass das Binden der CBM am Xylan-Rückgrat nicht mehr möglich ist, wäre denkbar. Jedoch kann festgehalten werden, dass in Arabinoxylanverdau-Ansätzen mit *Ts_Axh43A*

keine Peaks mehr für Oligosaccharide mit höherem Polymerisationsgrad sichtbar waren. Außerdem konnte eine md_{2,3}-Aktivität sowohl gegenüber den Oligosacchariden als auch in unvollständigem Maße gegenüber dem Polysaccharid zweifelsfrei gezeigt werden.

Wie bereits erwähnt wurde eine md-Aktivität gegenüber Arabinoxylan bisher schon häufiger beschrieben, jedoch wurde die Hydrolyse beider Arabinosylbindungen oft nur für die endständigen Xylosereste gezeigt (Koutaniemi und Tenkanen 2016). Durch die Bildung von monosubstituierten AXOS nach Verdau von Arabinoxylan mit *Ts_Axh43A* und anschließendem Xylanase-Verdau kann jedoch vermutet werden, dass auch interne Doppelsubstituierungen gespalten wurden. Es gibt natürlicherweise wahrscheinlich keine Notwendigkeit die internen Arabinosylreste effizient vom Xylan-Rückgrat abzuspalten, da der erste Schritt des Abbaus von Arabinoxylan in der Spaltung des Rückgrats durch Xylanasen besteht (Adelsberger et al. 2004). Deshalb reicht es vollkommen aus, wenn ein Enzym die Arabinosylierungen von AXOS komplett entfernen kann. Im Kontext zur physiologischen Rolle von *Ts_Axh43A* beim Polysaccharidabbau sei noch angemerkt, dass es auch denkbar wäre, dass weder das polymere Arabinoxylan noch kurzkettige AXOS die primären Ziele dieses Enzyms beim Abbau von Arabinoxylan darstellen, sondern vielleicht Abbauprodukte mittlerer Größe. Leider konnte dieser Hypothese aufgrund mangelnder Verfügbarkeit derartiger Substrate nicht nachgegangen werden.

Bisher ist nur ein Enzym (XynF; Csac_2411, ABP67988.1 aus *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903) mit einer zu *Ts_Axh43A* ähnlichen modularen Architektur charakterisiert worden (Saleh et al. 2017; VanFossen et al. 2011; Bergquist et al. 1999; Te'o 1996). Die Spezifitäten der einzelnen katalytischen Domänen in Bezug auf die Bindung an Xylp-Reste in AX sind jedoch nicht weiter untersucht worden. *Ts_Axh43A* zeigt über 96 % der Sequenzlänge 62,5 % Identität mit XynF.

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die A_{xh}-md Aktivität von *Ts_Axh43A* aus einer Kombination aus zwei Modulen mit derselben Spezifität resultiert, oder die zwei katalytischen Module, die beide zu GH43, aber zu den Unterfamilien 10 (c1) bzw. 16 (c2) gehören, jeweils unterschiedliche Spezifitäten haben. Dazu wurden verschiedene Varianten des Enzyms durch unterschiedliche Kombinationen der Module produziert und auf ihre Spaltungsprodukte nach Inkubation mit AX, oder AXOS hin untersucht. Neben ***Ts_Axh43A*** in voller Länge wurden die alleinigen katalytischen Domänen, **c1** und **c2**, und mit ihrer nativen C-terminalen Domäne, **c1link** und **c2cbm**, hergestellt. Außerdem wurde *Ts_Axh43A* ohne CBM6 produziert, was als **c1linkc2** bezeichnet wurde, und die c2-Domäne wurde deletiert, um **c1linkcbm** zu generieren. Zusätzlich wurde **c2link** (dritte Domäne plus zweite Domäne) erzeugt, um die Wirkung von GH43_C2 auf die zweite katalytische Domäne zu untersuchen. So wurden insgesamt acht Enzymvarianten hergestellt und einzeln und in verschiedenen

Kombinationen auf ihre Aktivität gegenüber verschiedenen Arabinose-haltigen Substraten wie *p*NPA, AX, Xylan, Arabinan, XOS und AXOS getestet.

Die beobachtete proteolytische Spaltung innerhalb der „Linker“-Domäne wurde nicht weiter untersucht, stimmt jedoch nicht mit der Spaltstelle von XynF von *C. saccharolyticus* überein (Saleh et al. 2017). Die Proteolyse konnte durch die Lagerung bei 4 °C im Elutionspuffer mit pH 7,3 umgangen werden. Die DSF-Analyse zur Schmelztemperaturbestimmung lässt durch das Vorhandensein jeweils mindestens eines Entfaltungseignisses zwischen 50 °C und 90 °C vermuten, dass alle Module zumindest bei 30 °C richtig gefaltet vorlagen, weshalb die Aktivitätstests jeweils bei 30 °C und 60 °C durchgeführt wurden. Für alle Enzymvarianten bis auf c2, c1linkc2 und c2link lagen die T_m -Werte zwischen 67,5 °C und 71,5 °C. Die DSF Analyse deutete darauf hin, dass das c2-Modul nur dann stabiler zu sein scheint, wenn es wie im nativen Volllängenzym mit dem C-terminalen Modul (cbm) assoziiert vorliegt. Außerdem scheint das GH43_C2 Modul nur mit dem GH43_10 Modul am N-Terminus stabil zu sein, was mit der weiter unten diskutierten Notwendigkeit der Kombination für die Bindung an AX übereinstimmt (Yoshida et al. 2010). Fusionsproteine können häufig die Löslichkeit eines Fusionspartners verbessern (Costa et al. 2014), was auch die hier gemessene scheinbaren Schmelztemperaturen verändert haben könnte.

Auf die Bestimmung von kinetischen und Inhibitions-Parametern, sowie Stabilitätstests mit allen AXOS und mit allen acht Varianten wurde verzichtet, da unverhältnismäßig viel Substrat und Analysezeit durch die HPAEC-PAD nötig gewesen wäre und zur Beantwortung der Frage nach der Entstehung der Spezifität die qualitativen Aussagen ausreichend schienen. Jedoch könnten sowohl unterschiedliche spezifische Aktivitäten, als auch unterschiedliche Produktinhibitionen oder schnell abnehmende Stabilitäten einzelner Module Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Spezifische Aktivitäten wären aber nur mit derselben Spezifität gegenüber dem gleichen Substrat vergleichbar, was z.B. für die Module c1link (Aktivität gegenüber Arabinoxylan) und c2cbm (keine Aktivität gegenüber Arabinoxylan) nicht gegeben war.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden Endpunkt-Abbauprodukte von Arabinoxylan und AXOS untersucht, und 20 h wurde als ausreichende Inkubationszeit ermittelt. Der Effekt, dass einige Enzymvarianten die kleineren AXOS nicht vollständig spalteten, könnte jedoch auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein: 1. auf höhere Substratmengen im Vergleich zu Reaktionen mit höhermolekularen AXOS - (0,006 μ mol für $XA^{2,3}XX$ im Vergleich zu 0,01 μ mol für A^3X), 2. auf eine geringere Aktivität gegenüber Oligosacchariden im Vergleich zum Polysaccharid, sowie 3. auf eine geringere Aktivität der Enzymvarianten im Vergleich zum Volllängen-*Ts_Axh43A* im Allgemeinen zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde die allgemeine Spezifität untersucht und keine quantitative Analyse für den AXOS-Abbau durchgeführt.

Nach dem Arabinoxylanabbau wurden jeweils prozentuale Anteile von der hypothetisch möglichen, freisetzbaren Arabinosemenge berechnet. Der prozentuale Anteil hängt davon ab, wie viel Prozent des eingewogenen Arabinoxylans tatsächlich Arabinose darstellt. Jedoch ist das Arabinoxylan sehr wahrscheinlich nicht so homogen, wie vom Hersteller angegeben, sodass der Wert, auf den sich die Berechnungen der Prozentwerte bezieht, von dem tatsächlich vorliegenden abweichen könnte.

4.4.1 Spezifitäten der A_{xh}43A-Enzymvarianten bei verschiedenen Temperaturen - Kombination stellt A_{xh}-md_{2,3}-Spezifität von *T_s*_A_{xh}43A wieder her

Unter Anwendung der Nomenklatur für A_{xh}s von Pitson et al. (1996), Beldman et al. (1997) und Ferré et al. (2000), wie sie von Vandermarliere et al. (2009) sinnvoll kombiniert wurden, lassen sich die Aktivitäten wie folgt zusammenfassen: Bei der optimalen Temperatur von 60 °C zeigte ***T_s*_A_{xh}43A** (GH43_10 + GH_C2 + GH43_16 + CBM6; c1linkc2cbm) **A_{xh}-md_{2,3}-Aktivität**, die auf AX, AXOS sowie *para*-Nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid (*p*NPA) wirkte. Auch bei 30 °C änderte sich die Spezifität nicht. **C1link** (GH43_10 + GH43_C2) agierte gegenüber AXOS als **A_{xh}-d3** auf interne Doppelsubstitutionen, oder als **A_{xh}-d2** auf terminale Doppelsubstitutionen direkt am nicht reduzierenden Terminus. Weder bei 60 °C noch bei 30 °C wurde eine A_{xh}-m-Aktivität festgestellt. C1link setzte aus AX ebenfalls nur Arabinose frei, wahrscheinlich mit der gleichen d3-Spezifität wie für interne Substitutionen in AXOS, zeigte aber nur eine vernachlässigbare Aktivität gegenüber *p*NPA. Interessanterweise wurde für eine GH54 *Trichoderma reesei* ABF (*Tr*_ABF) in Abhängigkeit von der Lokalisation der Mono- bzw. Doppelsubstitution ein genau umgekehrter Wechsel der Regioselektivität beschrieben: während c1link O-3-Araf an internen und O-2-Araf an terminalen Xylp-Resten abbaute, bevorzugt *Tr*_ABF O-2-Araf an internen Xylp und O-3-Araf an terminalen Xylp-Resten (Koutaniemi und Tenkanen 2016).

C2cbm (GH43_16 + CBM6) spaltete bei 60 °C beträchtliche Mengen an 1,2- und 1,3-verknüpfte L-Araf von m-AXOS, und dearabinosylierte bei 30 °C die m-AXOS sogar vollständig. Außerdem war c2cbm in der Lage, *p*NPA zu hydrolysieren und bei 60 °C bzw. 30 °C von AX 12 % bzw. 18 % der möglichen Arabinosen abzuspalten. Dies deutet darauf hin, dass c2cbm auch in Polysacchariden Xylp-Reste bevorzugte, die nur mit einer Arabinose dekoriert sind. Die DSF-Analyse zeigte, dass c2cbm sich bei einer ähnlichen Temperatur (etwa 70 °C) entfaltet wie c1link, c1linkcbm und *T_s*_A_{xh}43A. Eine Senkung der Reaktionstemperatur von 60 °C auf 30 °C führte jedoch zu höheren Aktivitäten gegenüber *p*NPA, AX und AXOS. So zeigte c2cbm eine **A_{xh}-m_{2,3}-Aktivität**.

Strukturelle Erklärungen für die Regioselektivität wurden bereits sowohl für die A_{xh}-m_{2,3}-Enzyme (Wang et al. 2014) als auch für die A_{xh}-d3 (McKee et al. 2012) wirkenden Enzyme publiziert und wurden jeweils entweder durch eine enge und tiefe Tasche im aktiven Zentrum oder einen vergleichsweise flachen Bindungsspalt neben einer tiefen Tasche im aktiven Zentrum erklärt. Eine strukturelle Aufklärung wäre aus zweierlei Gründen von Interesse. Erstens, um den Wechsel in der

Spezifität der c1link-, c1linkcbm-, c1c2- sowie c2link-Enzymvarianten von d3-Aktivität für interne zu d2-Aktivität für externe Arabinofuranosylierungen strukturell zu erklären, und zweitens, um die hohe spezifische Aktivität von *Ts_Axh43A* auf *pNPA* im Vergleich zu den unabhängig produzierten Domänen zu begründen.

Aus den bisher diskutierten Informationen kann bereits geschlossen werden, dass die Spezifitäten von c1link und c2cbm komplementär sind und eine Kombination aus ihnen tatsächlich die Axh-md-Spezifität des nativen *Ts_Axh43A* sowohl auf AX als auch auf AXOS wiederherstellt.

Die Kombination, die das Volllängenenzym widerspiegelt, c1link + c2cbm baute bei 60 °C die kleineren AXOS nicht vollständig ab, wohingegen die Kombination von c1linkcbm und c2cbm und auch die Kombination aus c1linkc2 und c2cbm die AXOS sowohl bei 30 °C, als auch bei 60 °C komplett abbauten. Das liegt wahrscheinlich daran, dass c2cbm bei 60 °C weniger aktiv ist, was jedoch nicht an einem niedrigeren Schmelzpunkt (mit DSF gezeigt) liegt. Und im Vergleich zu c1linkcbm (d-Aktivität, geringe m-Aktivität) kann c1link (nur d-Aktivität) bei 60 °C c2cbm nicht bei der Spaltung der Monosubstitutionen unterstützen.

Die einfachste Definition von Synergie lautet wie folgt: Die Aktivität einer Kombination von Enzymvarianten ist höher als die Summe der Einzelaktivitäten. Im Falle der AXHs und wenn das Endprodukt Arabinose gemessen wird, würde Synergie bedeuten, dass eine zusätzliche Bindung in AX gespalten worden sein muss, die ein einzelnes Modul nicht hydrolysieren konnte. Werden die d3- und m2,3-Aktivitäten einzeln summiert, bleiben theoretisch die 1,2-verknüpften L-Araf der ehemals doppelt substituierten Xylp-Reste übrig. Bei kombinierter oder schrittweiser Inkubation, bei der die d3-Aktivität der m2,3-Aktivität vorausgeht, würden alle Arten von Araf-Bindungen im AX gespalten werden. Um ein Beispiel zu erläutern: c1link allein setzte 367 mg/l Arabinose frei, c2cbm setzte 191 mg/l frei, insgesamt also 558 mg/l. Der tatsächlich gemessene Wert von c1link + c2cbm war jedoch deutlich höher und betrug 894 mg/l. Die Synergie mehrerer anderer Kombinationen wurde gleichermaßen bewertet (Tabelle 3.7.1). So bestätigte sich beispielsweise die Annahme, dass für die Kombinationen c2link + c2cbm eine Synergie nur bei 60 °C auftritt, da c2link allein bereits bei 30 °C sowohl Axh-d- als auch Axh-m-Aktivität zu zeigen scheint. Neben dem obigen Beispiel (c1link + c2cbm), welches die Architektur des Enzyms in voller Länge widerspiegelt, zeigten die Kombinationen c1linkcbm + c2cbm und c1linkc2 + c2cbm Synergie bei 60 °C und bei 30 °C. Dies war zu erwarten, da die ersten beiden Module in c1linkcbm und c1linkc2 „c1link“ entsprechen, jedoch mit einer zusätzlichen cbm- bzw. c2-Domäne ausgestattet sind. Das Maß an Synergismus, das sich im natürlich kombinierten Gesamtzym *Ts_Axh43A* zeigt, verglichen mit der Addition der Einzel-Aktivitäten von c1link und c2cbm, wurde von keiner der Kombinationen erreicht oder übertroffen.

Die höchsten DSE-Werte (*degree of synergistic effect*; 1,3–1,6 bei 60 °C) wurden durch die Kombination eines der Linker enthaltenden Enzymvarianten (c1link, c1linkcbm, c1linkc2 oder c2link), die alle d3-Aktivität zeigten, mit c2cbm erreicht, dessen m_{2,3}-Aktivität anschließend alle verbleibenden m-Araf-Reste entfernen konnte (Tabelle 3.7.1). Da vor allem c2link, aber auch c1linkc2, bei 30 °C schon jeweils allein Axh-md_{2,3}-Aktivität zeigten, lag die DSE bei dieser Temperatur für c2link+c2cbm unter eins (0,6) und für c1linkc2 + c2cbm nur leicht über eins (1,1).

Auch wenn die jeweiligen Spezifitäten auf allen getesteten Substraten übereinstimmten, müssen die Ergebnisse doch kritisch betrachtet werden, da mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen teils Spezifitätsänderungen auftreten könnten (da Fonseca et al. 2020)

4.4.2 GH43_C2 und CBM6-Domänen sorgen möglicherweise für: Aktivität, Stabilität und Spezifität

Des Weiteren sollte auch der Einfluss der assoziierten Module untersucht werden. Deshalb wurden die Spaltungsmuster von definierten AXOS mit allen Enzymvarianten verglichen.

Mehrere Linker-Regionen sowie CBMs tragen nachweislich zur Thermostabilität (1) bei (Miao et al. 2018), wie z.B. CBM22 (Araki et al. 2006). Sie können aber auch die Substrataffinität (2), die katalytische Effizienz (3) und die korrekte Faltung (4) im Allgemeinen verbessern (Zeng et al. 2019) und auch die Substratpräferenz, und damit auch die Spezifität (5), bestimmen (Li et al. 2015). Da zu Beginn der Arbeit angenommen wurde, dass es sich bei der GH43_C2 Domäne um einen Abstandshalter (spacer), oder eine Verknüpfungs-Sequenz (linker) zum nächsten katalytischen Modul handeln würde, wurde die Sequenz auch in die Kombination aus c1 und cbm (c1linkcbm), sowie in die Kombination aus c1 und c2 (c1linkc2) eingefügt. Deshalb eignet sich der Vergleich von c1 mit c1link und von c2 mit c2link für eine Aussage über die Funktion der GH43_C2 Domäne. Durch den Vergleich von c2 und c2cbm, sowie von c1link (nicht c1) und c1linkcbm könnte auf die Funktion der cbm rückgeschlossen werden.

Eine Übersicht über die ermittelten Auswirkungen der Fusionen mit GH43_C2 und CBM6 sind in Tabelle 4.4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.4.1 Übersicht über den Einfluss der assoziierten Domänen auf die katalytischen Domänen aus GH43_10 (c1) und GH43_16 (c2) in *Ts_Axh43A*.

Vergleich von:	GH43_C2		CBM6	
	c1→c1link	c2→c2link	c1link→c1linkcbm	c2→c2cbm
1. „Thermostabilität“ - Schmelztemperatur	T _m +1 °C	T _m +0 °C *	T _m +2 °C	T _m +9,5 °C
2. „Substrataffinität“ - Aktivität gegenüber AX	++	++	+	++
3. „katalytische Effizienz“ - spez. Aktivität pNPA	+	++	+	++
4. Faltung	wurde nicht genauer untersucht, eventuell c1 und c2 aufgrund von inkorrektter Faltung inaktiv			
5. Spezifität gegenüber AXOS	gleich	gleich	+ m-Aktivität	nur noch m-Aktivität

Es ist jeweils der Unterschied von y zu x gezeigt (x→y) wie in Abbildung 3.7.3, Abbildung 3.7.4, Tabelle 3.7.1 und Tabelle 3.7.2 gezeigt. * bei der Schmelzkurve von c2link wird angenommen, dass der prominente Peak bei 53,5 °C die Entfaltung der GH43_C2 Domäne, und die Schulter bei 62 °C die Entfaltung von c2 darstellt (Abbildung 3.7.3).

Die künstliche Anlagerung von CBMs an eine katalytische Domäne kann zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität führen, wie Tajwar et al. (2017) für eine Xylanase aus *Thermotoga maritima* gezeigt haben. Allerdings kann die Orientierung (C- oder N-terminal) entscheidend sein, da die 3D-Struktur so verändert werden kann, dass das CBM das Substrat nicht mehr binden kann. Daher wurden die assoziierten Domänen wie in *Ts_Axh43A* C-terminal verknüpft. Diese Aktivitätserhöhung konnte für c1 (c1 vs. c1link vs. c1linkcbm) und auch für c2 (c2 vs. c2cbm, c2 vs. c2link) jeweils gegenüber allen getesteten Substraten beobachtet werden.

Die Enzymvarianten c1 und c2 weisen im Vergleich zu ihren Gegenstücken mit GH43_C2 oder CBM6 (c1link und c2cbm) niedrigere Schmelzpunkte und damit eine geringere Thermostabilität (1) auf. So liegt die T_m von c1 um 2 °C niedriger als die von c1link. Die Schmelztemperaturen von c2, c2link und die c2-assozierte Schmelztemperatur von c1linkc2 waren mindestens 7,5 °C niedriger als die T_m von c2cbm. Die verringerte Thermostabilität führte zu niedrigeren optimalen Temperaturen für Aktivitätsassays aller GH43_16-haltigen Enzymvarianten, was für alle getesteten Substrate beobachtet wurde. Die Enzymvariante c2 zeigte bei 30 °C **Abf**-md2,3 Aktivität, während c1linkc2 und c2link bei dieser Temperatur beide als **Axh**-md2,3 bezeichnet werden konnten. Im Gegensatz zu c2 fehlt der c2cbm-Variante die d3-Aktivität, kann also nur als Axh-m2,3 bezeichnet werden. Dies zeigt zum einen eine Änderung der Affinität (zu AX) durch beide assoziierten Domänen (2), sowie eine Änderung der Spezifität (5) durch CBM6.

Eine mögliche Rolle des Linkers könnte darin bestehen, dass er eine m2,3-katalytische Domäne in ein d3-agierendes Enzym verwandelt. Dieser Effekt wurde jedoch nur beim Vergleich der Aktivitäten von c2cbm (m2,3-Aktivität) und c2link (d3-Aktivität bei 60 °C, md2,3-Aktivität bei 30 °C) an AXOS beobachtet, und c2link ist eine Enzymvariante, deren Modulreihenfolge nicht natürlich vorkommt. Die Unterschiede in den Aktivitäten der c1- Enzymvarianten waren nicht geeignet, die Funktion des Linkers aufzuklären.

Alternativ könnte die d3-Aktivität zum Teil allein von der GH43_C2-Domäne herrühren, da alle Enzymvarianten, die dieses Modul enthalten, diese Spezifität in hohem Maße aufweisen. Es könnte aber auch sein, dass GH43_C2 die intrinsische Spezifität nur verstärkt, indem es die Substrataffinität erhöht. Dafür spricht die geringe d3-Aktivität von c1 und die md2,3-Aktivität von c2 (zumindest bei 30 °C), die für die Kombinationen c1link bzw. c2link verstärkt beobachtet werden konnten. Daher wäre es von Interesse, zusätzlich die "Linker-Region" GH43_C2 allein herzustellen, um ihre individuelle Aktivität, falls vorhanden, zu untersuchen.

Ein Teil der "Linker-Region" zwischen c1 und c2 in *Ts_Axh43A* (AS 325-759) gehört zu pfam17851: GH43_C2 (β -Xylosidase C-terminale Concanavalin A-ähnliche Domäne) und befindet sich am C-Terminus der Domäne pfam04616 (Glykosylhydrolasen Familie 43). Diese Domäne nimmt eine Concanavalin A-ähnliche Faltung an und ist auch in XynF von *C. saccharolyticus* vorhanden, dem einzigen teilweise charakterisierten Enzym, das sowohl aus einer GH43_10- als auch aus einer GH43_16-katalytischen Domäne besteht (VanFossen et al. 2011). Im Gegensatz dazu fehlt *Ts_Axh43A* ein CBM22-Modul (pfam02018: CBM_4_9; Reste 376-503 in XynF), das in XynF auf das erste katalytische Modul folgt. Diese CBM22 wurde zunächst noch als TSD (*thermo stabilizing domain*) bezeichnet (Bergquist et al. 1999).

Der „Linker“ wurde, als X19 bezeichnet, bereits als Stabilisierungsdomäne ohne offensichtlicher Funktion diskutiert, die nur in GH43-Enzymen und dort vor allem in den Subfamilien 9–15 und 36 vorkommt, welche auch aufgrund der Ähnlichkeit ihrer HMM-Profile zusammen clustern (Mewis et al. 2016). Jedoch wurde in dieser Arbeit im Gegensatz dazu gezeigt, dass auch c1 ohne fusioniertem Linker einen hohen T_m , also Resistenz gegenüber hitzeinduzierter Entfaltung, zeigte. Jedoch war c1 wesentlich inaktiver als c1link. Auch c2 allein hatte einen höheren T_m -Wert als das Fusionskonstrukt mit der „Stabilisierungsdomäne“ c2link (Peak plus Schulter in DSF). Wobei letzteres auch daran liegen könnte, dass der Linker nur in Kombination mit c1 stabil ist, wie im Nachfolgenden noch diskutiert werden wird.

Die geringere A_{xh}-m Aktivität von c2link bei 60 °C ist eher mit einer Inaktivierung der GH43_C2-Domäne bei höheren Temperaturen zu erklären als mit einer Änderung der Spezifität. DSF-Messungen mit c2link deuteten auf zwei unterschiedliche Schmelztemperaturen hin: zunächst ein prominenter T_m-Peak bei 53,5 °C gefolgt von einer Schulter bei ca. 59,5 °C, was ungefähr dem ersten Peak von c1linkc2 entspricht und in etwa auch der T_m von c2 (ca. 62 °C). Das würde bedeuten, dass der prominente Peak von c2link auf das Entfalten der GH43_C2 Domäne bei 53,5 °C zurückzuführen ist. Es ist unwahrscheinlich, dass der Linker die Substratspezifität determiniert, da auch für c1 und auch c2 allein die d3-Spezifität gegenüber den AXOS beobachtet werden konnte, jedoch mit etwas geringeren Arabinoseausbeuten. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist eine Erhöhung der allgemeinen Aktivität von c2link, möglicherweise aufgrund der bereits erwähnten erhöhten Löslichkeit durch Fusion. Außerdem scheint c2link wie c1link interne d3-Araf zu favorisieren, denn c2link zeigt bei 60 °C definitiv A_{xh}-d3 Aktivität gegenüber Arabinoxylan, da Arabinose entsteht und nach Inkubation mit Xyn11A keine XA^{2,3}XX AXOS mehr detektiert werden. Auch gegenüber AXOS (XA^{2,3}XX) bestätigte sich die Spezifität gegenüber O3-Araf. Bei 30 °C wurden, vermutlich aufgrund geringerer Hitzeinaktivierung und dadurch bedingt höherer Aktivität, sowohl d- als auch m-Aktivität gegenüber allen getesteten AXOS detektiert.

Für das c1-Modul wird eine intrinsische d3-Aktivität angenommen (beobachtet bei intern doppelt substituiertem XA^{2,3}XX), die durch das GH43_C2-Modul verstärkt und auf das Polysaccharid Arabinoxylan ausgedehnt wurde. Dies könnte allerdings auch ein Nebeneffekt der allgemeinen Stabilisierung und damit erhöhten Aktivität sein, die mittels DSF gezeigt wurde. Während c1 und c2 alleine nur auf AXOS aktiv waren, zeigte c1linkc2 auch Arabinoxylan-Hydrolaseaktivität, was auf die GH43_C2-Domäne zwischen c1 und c2 zurückgeführt wurde. Yoshida et al. (2010) beobachteten die Bindung von FsA_{xh}1, bestehend aus GH43_10, GH43_C2 und einer CBM6, an Arabinoxylan nur, wenn die Kombination von GH43_10 und GH43_C2 beibehalten wurde. Weder das GH43_10-Modul noch das GH43_C2-Modul allein waren in der Lage, Arabinoxylan zu binden. Vergleicht man die Sequenzen aller bisher charakterisierten GH43_10-Enzyme, so fällt auf, dass alle Enzyme, für die eine Aktivität gegenüber Polysacchariden beschrieben wurde, das Tyrosin (oder ein Phenylalanin) an Stelle 484 (Position in A_{xh}1) innerhalb der GH43_C2-Domäne besitzen, das bereits von Yoshida et al. (2010) als kritisch für die Substratspezifität gezeigt wurde (Abbildung S 5). Dieser Rest ist auch in T_s_A_{xh}43A vorhanden (Y559) und wahrscheinlich für die Affinität zu Arabinoxylan mit verantwortlich, was den oben beschriebenen experimentellen Ergebnissen entspricht. Das Modul **GH43_C2 erhöht also die Substrataffinität zu Arabinoxylan und damit auch die katalytische Aktivität.**

Die C-terminale CBM von *Ts_Axh43A*, die auf das GH43_16 (c2)-Modul folgt, ist eine nicht-katalytische, CBM6-Xylanase-ähnliche Domäne (cd04084) mit einer β -Sandwich-Faltung wie beim *Bacillus*-Enzym AXH-m2,3 (Bourgois et al., 2007), das die Subfamilie GH43_16 definiert (Vandermarliere et al. 2007; Czjzek et al. 2001). Die Ergebnisse für c2cbm stimmen mit der für dieses *Bacillus*-Enzym berichteten AXH-m2,3-Aktivität überein und deuten darauf hin, dass das CBM6 bei der Ausprägung dieser Aktivität eine Rolle spielt, da die bisher charakterisierten GH43_16-Enzyme nur A_{xh}-m2,3-Enzyme sind und nur wenigen GH43_16-Enzymen die CBM6 fehlt. *Ts_Axh43Δc2* (c1linkcbm) zeigte im Wesentlichen die gleiche Spezifität wie c1link, jedoch mit zusätzlich geringer Abf-m-Aktivität, die daher auch auf die CBM-Domäne zurückgeführt werden kann, da sie sich nur durch das zusätzliche CBM6-Modul unterscheiden. Und auch die c2-enthaltenden Enzymvarianten ohne CBM waren bei der Spaltung von Monosubstitutionen weniger effektiv als c2cbm. Zusammenfassend **erhöht die CBM6 die m-Aktivität.**

4.4.3 Arbeitsteilung innerhalb eines Enzyms beim Arabinoxylanabbau - Fazit

Es kann geschlussfolgert werden, dass die komplexe md-2,3-Spezifität von *Ts_Axh43A* das Ergebnis der Kombination von zwei Enzymmodulen mit unterschiedlicher Spezifität ist; genauer gesagt die Kombination von GH43_10 mit dem Modul GH43_C2 (c1link), welches eine A_{xh}-d3-Aktivität zeigt, und GH43_16 mit CBM6 (c2cbm), welches verantwortlich für die A_{xh}-m2,3-Aktivität zu sein scheint.

C1- (GH43_10) Enzymvarianten spalteten hauptsächlich Arabinose von doppelt substituierten Xylp-Resten ab. Die Enzymvariante c1link, bei der die Reihenfolge der Module der Reihenfolge im nativen *Axh43A* entspricht, zeigte hauptsächlich d-1,2-Aktivität an A^{2,3}XX und d-1,3-Aktivität gegenüber XA^{2,3}XX. Dies ist in sehr geringem Maße auch für c1 auf A^{2,3}XX und XA^{2,3}XX zu beobachten, insbesondere bei niedrigeren Temperaturen. Dies zeigt noch einmal, dass für eine effektive Aktivität die GH43_10 und die GH43_C2 Module beide vorhanden sein müssen.

GH43_C2 („Linker“), das zweite Modul des nativen *Ts_Axh43A*, fungierte ähnlich wie ein CBM und ermöglichte es den entsprechenden fusionierten katalytischen Modulen, Arabinose auch von dem Polysaccharid zu spalten. Über den Einfluss des Linkers auf das native Protein konnten keine definitiven Aussagen gemacht werden, und es wären weitere Untersuchungen erforderlich, wie z. B. die individuelle Expression dieser Domäne mit anschließenden Affinitäts- und Aktivitätsassays.

Enzymvarianten, die die GH43_16 (c2)-Domäne enthalten, zeigten eine intrinsische d3-Spezifität, die in eine m2,3-Aktivität umgewandelt wurde, wenn CBM6 wie in *Ts_Axh43A* c-terminal fusioniert war.

4.5 Erweiterung der Nomenklatur für Spezifitäten von Arabinofuranosidasen

In der Literatur bezeichnet der Begriff Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase (A_{xh}) eine Unterart der Arabinofuranosidasen (A_{bf}), wenn sie Aktivität gegenüber dem Polysaccharid Arabinoxylan zeigen. Nach dieser Definition scheinen die, in den Kapiteln zu *Ts_Axh43A* beschriebenen, einzelnen katalytischen Modulen c1 und c2 keine echten A_{xh} zu sein, da sie nur gegenüber den AXOS aktiv waren. Deshalb sollte man bei der Benennung der Aktivität korrekterweise auf die Abkürzung A_{bf} anstatt A_{xh} zurückgreifen. Das c1-Modul zeigte intrinsische spezifische d-A_{bf} Aktivität, wobei von terminalen Xyloseresten die 1,2-Bindungen und von internen Xyloseresten die 1,3-Bindungen hydrolysiert wurden. Das Modul c2 zeigte geringe md-A_{bf} Aktivität, spaltete jedoch A³X nicht. So müsste eventuell auch eine Mindestlänge der spaltbaren Substrate angegeben werden.

Eine noch spezifischere Benennung der A_{xh}-Enzyme nach Mroueh et al. (2019) wäre denkbar, jedoch jeweils mit dem Zusatz, ob die Lokalisierung der Substituierung eine Rolle spielt. Sie könnte beispielsweise mit folgenden Abkürzungen umgesetzt werden: „t,r“ (terminal, reduzierend), oder „t,n“ (terminal, nicht-reduzierend), wenn sie eine Aktivität nur gegenüber Xyloseresten, die sich terminal am reduzierenden, oder nicht reduzierenden Ende befinden, oder „i,r“, oder „i,n“ entsprechend für interne Xylp des Xylan-Rückgrats. Auf die Enzyme dieser Arbeit mit A_{bf}- und A_{xh}- Aktivitäten angewandt, ergäben sich die Namen:

Cs-, *Ch*- und *Ck_Gaf159A*_{m,d3(t,n)} und *Ts_Axh43A*_{md2,3} bestehend aus c1link_{d3} und c2cbm_{m2,3}.

Um die Analyse der Spaltprofile von Arabinoxylan-hydrolysierenden Enzymen mit verschiedenen AXOS und die Ermittlung der Spezifitäten zudem effizienter zu gestalten, könnten in Zukunft weniger zeitintensive Methoden als die Produktanalyse mittels HPAEC-PAD verwendet werden, wie beispielsweise „DNA sequencer-aided fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (DSA-FACE)“ (da Fonseca et al. 2020).

5 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Proteine rekombinant hergestellt und biochemisch und teilweise strukturell charakterisiert. Zu Beginn der Arbeit waren einige dieser Proteine, bzw. Orthologe davon, die nur schwache oder fehlende Ähnlichkeit mit bereits bekannten Enzymen aufwiesen, in der Familieneinteilung der Glykosidhydrolasen in der *Carbohydrate Active Enzyme* (CAZy) Datenbank noch nicht klassifiziert. Vier Enzyme zeigten α -L-Rhamnosidaseaktivität und sind aktuell in GH106 klassifiziert. Die untersuchten α -Rhamnosidasen der thermophilen bis hyperthermophilen Bakterien *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, *Caldicellulosiruptor bescii* und *Thermoclostridium stercorarium* waren hitzeaktiv und -beständig. Die beiden *Thermotoga*-Enzyme stellen die bisher thermoaktivsten und thermostabilsten α -Rhamnosidasen der GH-Enzymfamilie GH106 dar. Diese Enzyme konnten das natürliche Glykoflavonon Naringin spalten, wodurch sie industrielles Anwendungspotenzial besitzen. Dafür ungünstig ist allerdings, dass sie metallionenabhängig sind.

Drei weitere untersuchte Enzyme aus den *Caldicellulosiruptor*-Arten *C. saccharolyticus*, *C. hydrothermalis* und *C. kronotskyensis*, jetzt in GH159 klassifiziert, sind hitzeaktive und -stabile β -D-Galaktofuranosidasen. Diese hydrolysierten das chromogene Substrat *p*NP- β -D-Galaktofuranosid, aber auch *p*NP- α -L-Arabinofuranosid und mit geringer Aktivität auch Arabinogalaktan und verschiedene Arabinoxylooligosaccharide. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass es in GH159 Enzyme mit α -L-Arabinofuranosidaseaktivität gibt. Zusätzlich zeigten sie eine Spezifität gegenüber α -1,3-Bindungen zu Xyloseresten, die sich terminal am nicht reduzierenden Ende befanden. Darüberhinausgehend gelang in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Proteinkristallographen die Strukturaufklärung von *Ch_Gaf159A*, was zur ersten dreidimensionalen Struktur eines Vertreters der GH-Familie GH159 führte. Dabei ergab sich eine 5-fache β -Propeller-Faltung, die den Strukturen der GH-Clans GH-F und GH-J ähnelt. Untersuchungen wie diese belegen, wie wichtig es ist, noch nicht genauer untersuchte Glykosidhydrolasen eingehend zu charakterisieren, wenn man mehr über ihre möglichen Substrate und ihre putativen physiologischen Rollen erfahren will. Ihre Klassifizierung aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in eine GH-Enzymfamilie mag zwar erste, oft auch gute Hinweise auf ihre Aktivität und Spaltungsspezifität geben, kann jedoch nicht ausschließen, dass sie weitere, in der entsprechenden GH-Familie noch unbekanntes Spaltungseigenschaften aufweisen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Modulstruktur der multimodularen Arabinoxyylan Arabinofuranohydrolase *Ts_Axh43A* von *Thermoclostridium stercorarium* und deren Substratspaltungsspezifität gegenüber polymerem Arabinoxyylan und davon abgeleiteten Arabinoxylooligosacchariden genauer untersucht. Durch Konstruktion verschiedener Mutanten bzw. rekombinant hergestellter Enzymderivate wurde aufgeklärt, dass die Axh-md2,3 Aktivität dieses Enzyms gegenüber Arabinoxylooligosacchariden und Arabinoxyylan aus einer

Kombination der Module GH43_10 + GH43_C2 mit A_{xh}-d₃ Arabinofuranosidaseaktivität und der Module GH43_16 + CBM6 mit A_{xh}-m_{2,3} Arabinofuranosidaseaktivität entsteht. Eine *take-home-message* dieser Arbeiten wird darin gesehen, dass bei multimodularen Glykosidhydrolasen die einzelnen Module nicht isoliert zu sehen sind, auch wenn sie einzeln synthetisierbar sind und sie einzeln oft auch nachweisbaren Aktivitäten besitzen, sondern dass die Funktion der einzelnen Module immer im Kontext mit den benachbarten Modulen betrachtet werden muss.

Die an den Enzymen aus GH159 und GH43 durchgeführten Studien tragen nicht zuletzt dazu bei, den Abbau komplexer pflanzlicher Biomasse durch mikrobielle Enzyme besser zu verstehen, denn erst wenn alle Substrat- und Spaltspezifitäten der beteiligten Enzyme gut untersucht sind, kann ein umfassendes Bild ihres Zusammenwirkens beim Abbau von Biomassepolysacchariden entstehen. Leider fehlen uns aber – zusätzlich zu den detaillierten Charakteristika der Enzyme – heute oft auch noch weitere Detailkenntnisse, etwa über die genauen Strukturen der oft von unterschiedlichen Pflanzenarten stammenden Biomasse in verschiedenen Habitaten oder über die am Abbau bestimmter Pflanzenarten jeweils tatsächlich beteiligten Enzyme. Nicht zuletzt ist noch zu bedenken, dass in natürlichen Habitaten immer Mischkulturen diverser verschiedener Mikroorganismen vorkommen, deren Enzymsysteme beim Biomasseabbau zusammenwirken können. Deshalb kann eine Dissertation wie diese naturgemäß nur einen kleinen Beitrag zum besseren Verständnis der hoch komplexen Vorgänge beim natürlichen Biomasseabbau durch Mikroorganismen und deren Enzyme leisten

6 Literaturverzeichnis

- Adelsberger, H.; Hertel, C.; Glawischnig, E.; Zverlov, V.V.; Schwarz, W.H.** (2004): Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. In: *Microbiology* 150 (7 // Pt 7), S. 2257–2266. DOI: 10.1099/mic.0.27066-0.
- Alderkamp, A.-C.; van Rijssel, M.; Bolhuis, H.** (2007): Characterization of marine bacteria and the activity of their enzyme systems involved in degradation of the algal storage glucan laminarin. In: *FEMS Microbiology Ecology* 59 (1), S. 108–117.
- Al-Dosari, D.I.; Ahmed, M.M.; Al-Rejaie, S.S.; Alhomida, A.S.; Ola, M.S.** (2017): Flavonoid naringenin attenuates oxidative stress, apoptosis and improves neurotrophic effects in the diabetic rat retina. In: *Nutrients* 9 (10), S. 1161.
- Ali, B.H.; Ziada, A.; Blunden, G.** (2009): Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. In: *Food and Chemical Toxicology* 47 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.fct.2008.07.001.
- Amin, K.; Tranchimand, S.; Benvegnu, T.; Abdel-Razzak, Z.; Chamieh, H.** (2021): Glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophilic archaea: Insights on their characteristics and applications in biotechnology. In: *Biomolecules* 11 (11), S. 1557.
- Apetrei, C.** (2021): Determination of Diosmin in Pharmaceutical Products with Chemically Modified Voltammetric Sensors. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (14), S. 7315.
- Aspeborg, H.; Coutinho, P.M.; Wang, Y.; Brumer, H.; Henrissat, B.** (2012): Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). In: *BMC Evolutionary Biology* 12 (1), S. 186. DOI: 10.1186/1471-2148-12-186.
- Atalah, J.; Cáceres-Moreno, P.; Espina, G.; Blamey, J.M.** (2019): Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. In: *Bioresource technology* 280, S. 478–488.
- Bar-On, Y.M.; Phillips, R.; Milo, R.** (2018): The biomass distribution on Earth. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (25), S. 6506–6511.
- Baudrexl, M.; Fida, T.; Berk, B.; Schwarz, W.H.; Zverlov, V.V.; Groll, M.; Liebl, W.** (2022): Biochemical and structural characterization of thermostable GH159 glycoside hydrolases exhibiting α -L-arabinofuranosidase activity. In: *Frontiers in Molecular Biosciences* 9, S. 670. Online verfügbar unter <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2022.907439>.
- Baudrexl, M.; Schwarz, W.H.; Zverlov, V.V.; Liebl, W.** (2019): Biochemical characterisation of four rhamnosidases from thermophilic bacteria of the genera *Thermotoga*, *Caldicellulosiruptor* and *Thermoclostridium*. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 15924. DOI: 10.1038/s41598-019-52251-0.

- Beekwilder, J.; Marcozzi, D.; Vecchi, S.; Vos, R. de; Janssen, P.; Francke, C. et al. (2009):** Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. In: *Applied and environmental microbiology* 75 (11), S. 3447–3454. DOI: 10.1128/AEM.02675-08.
- Beldman, G.; Schols, H.A.; Pitson, S.M.; Searle-Van Leeuwen, M.J.; Voragen, A.G. (1997):** Arabinans and arabinan degrading enzymes. In: *Adv. Macromol. Carbohydr. Res* 1 (1), S. 64.
- Bendtsen, J.D.; Jensen, L.J.; Blom, N.; Heijne, G. von; Brunak, S. (2004):** Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. In: *Protein engineering, design & selection : PEDS* 17 (4), S. 349–356. DOI: 10.1093/protein/gzh037.
- Bendtsen, J.D.; Kiemer, L.; Fausbøll, A.; Brunak, S. (2005):** Non-classical protein secretion in bacteria. In: *BMC Microbiol* 5, S. 58. DOI: 10.1186/1471-2180-5-58.
- Bergquist, P.L.; Gibbs, M.D.; Morris, D.D.; Te'o, V.S.J.; Saul, D.J.; Morgan, H.W. (1999):** Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. In: *FEMS Microbiology Ecology* 28 (2), S. 99–110. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00565.x.
- Berk, B. (2020):** Biochemische Charakterisierung von Glykosidhydrolase Familie 159 α -L-Arabinofuranosidasen aus Caldicellulosiruptor Stämmen.
- Biely, P.; Singh, S.; Puchart, V. (2016):** Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. In: *Biotechnology Advances* 34 (7), S. 1260–1274. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.09.001.
- biofuel.org.uk (2022): Biofuels - Third Generation Biofuels. Online verfügbar unter <https://biofuel.org.uk/third-generation-biofuels.html>, zuletzt aktualisiert am 11.12.2022, zuletzt geprüft am 11.12.2022.
- Bisswanger, H. (2014):** Enzyme assays. In: *Perspectives in Science* 1 (1-6), S. 41–55. DOI: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- Biswas, S.; Hasija, Y. (2022):** Machine Learning Methods for Protein Function Prediction. In: Ramesh C. Bansal, Akka Zemari, K. G. Sharma und Jyoti Gajrani (Hg.): *Proceedings of International Conference on Computational Intelligence and Emerging Power System. ICCIPS 2021*. 1st ed. 2022. Singapore: Springer Singapore; Imprint Springer (Springer eBook Collection), S. 85–98.
- Blumer-Schuette, S.E.; Brown, S.D.; Sander, K.B.; Bayer, E.A.; Kataeva, I.; Zurawski, J.V. et al. (2014):** Thermophilic lignocellulose deconstruction. In: *FEMS Microbiology Reviews* 38 (3), S. 393–448. DOI: 10.1111/1574-6976.12044.
- Boraston, A.B.; Bolam, D.N.; Gilbert, H.J.; Davies, G.J. (2004):** Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. In: *Biochemical Journal* 382 (3), S. 769–781.

- Borsenberger, V.; Dornez, E.; Desrousseaux, M.-L.; Massou, S.; Tenkanen, M.; Courtin, C.M. et al.** (2014): A ¹H NMR study of the specificity of α-l-arabinofuranosidases on natural and unnatural substrates. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840 (10), S. 3106–3114. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.07.001.
- Bourgeois, T.M.; van Craeyveld, V.; van Campenhout, S.; Courtin, C.M.; Delcour, J.A.; Robben, J.; Volckaert, G.** (2007): Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. In: *Applied microbiology and biotechnology* 75 (6), S. 1309–1317.
- Bouriche, H.; Arnhold, J.** (2010): Effect of *Cleome arabica* leaf extract treated by naringinase on human neutrophil chemotaxis. In: *Natural product communications* 5 (3), 1934578X1000500315.
- Boysen, M.** (2018): Structure of saccharides. Monosaccharides. Universität Kiel. Online verfügbar unter http://scholle.oc.uni-kiel.de/lind/iteach/kh_struct/kh_struct_eng_kap1.pdf, zuletzt geprüft am 15.11.2022.
- Bradford, N.A.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. In: *Anal. Biochem* 72 (248), e254.
- Briand, L.; Marcion, G.; Kriznik, A.; Heydel, J.M.; Artur, Y.; Garrido, C. et al.** (2016): A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. In: *Scientific Reports* 6 (1), S. 33037. DOI: 10.1038/srep33037.
- Brock, T.D.; Freeze, H.** (1969): *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. In: *J Bacteriol* 98 (1), S. 289–297.
- Broeker, J.; Mechelke, M.; Baudrexel, M.; Mennerich, D.; Hornburg, D.; Mann, M. et al.** (2018): The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*. Comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. In: *Biotechnology for Biofuels* 11 (1), S. 229. DOI: 10.1186/s13068-018-1228-3.
- Bröker, J.** (2019): Charakterisierung der Enzymausstattung von *Clostridium stercorarium* für den vollständigen Abbau von Hemicellulosen. Technische Universität München.
- Bronnenmeier, K.; Kern, A.; Liebl, W.; Staudenbauer, W.L.** (1995): Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. In: *Appl Environ Microbiol* 61 (4), S. 1399–1407. DOI: 10.1128/aem.61.4.1399-1407.1995.
- Bronnenmeier, K.; Kundt, K.; Riedel, K.; Schwarz, W.H.; Staudenbauer, W.L.** (1997): Structure of the *Clostridium stercorarium* gene *celY* encoding the exo-1, 4-β-glucanase Avicelase II. In: *Microbiology* 143 (3), S. 891–898.

- Bronnenmeier, K.; Rücknagel, K.P.; Staudenbauer, W.L.** (1991): Purification and properties of a novel type of exo-1, 4- β -glucanase (Avicelase II) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. In: *European journal of biochemistry* 200 (2), S. 379–385.
- Brüx, C.; Ben-David, A.; Shallom-Shezifi, D.; Leon, M.; Niefind, K.; Shoham, G. et al.** (2006): The structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. In: *Journal of molecular biology* 359 (1), S. 97–109.
- Busto, M.D.; Meza, V.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M.** (2007): Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly (vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. In: *Food chemistry* 104 (3), S. 1177–1182.
- Caffall, K.H.; Mohnen, D.** (2009): The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. In: *Carbohydrate Research* 344 (14), S. 1879–1900.
- Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B.** (2009): The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. In: *Nucleic acids research* 37 (suppl_1), D233-D238.
- Carrard, G.; Koivula, A.; Söderlund, H.; Béguin, P.** (2000): Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (19), S. 10342–10347. DOI: 10.1073/pnas.160216697.
- Choi, Y.S.; Zhang, H.; Brunzelle, J.S.; Nair, S.K.; Zhao, H.** (2008): In vitro reconstitution and crystal structure of p-aminobenzoate N-oxygenase (AurF) involved in aureothin biosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (19), S. 6858–6863.
- Christian, T.J.; Manley-Harris, M.; Richards, G.N.** (1998): A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems. In: *Carbohydrate polymers* 35 (1-2), S. 7–12.
- Chuzel, L.; Ganatra, M.B.; Rapp, E.; Henrissat, B.; Taron, C.H.** (2018): Functional metagenomics identifies an exosialidase with an inverting catalytic mechanism that defines a new glycoside hydrolase family (GH156). In: *Journal of Biological Chemistry*, jbc. RA118. 003302.
- Costa, S.; Almeida, A.; Castro, A.; Domingues, L.** (2014): Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 63.
- Cui, Z.; Maruyama, Y.; Mikami, B.; Hashimoto, W.; Murata, K.** (2007): Crystal structure of glycoside hydrolase family 78 α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1. In: *Journal of molecular biology* 374 (2), S. 384–398. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.09.003.

(D&H Schubert UG) (Hg.) (2019): Strohsysteme und Pelletierung. Farmtechnik.com. Online verfügbar unter <http://farmtechnik.com/Strohmuehle-Strohsysteme-Ballenaufloeser-Pelletierung-Pellets-regenerative-Energie>, zuletzt geprüft am 24.02.2022.

da Fonseca, M.J.M.; Armstrong, Z.; Withers, S.G.; Briers, Y.; Master, E.R. (2020): High-Throughput Generation of Product Profiles for Arabinoxylan-Active Enzymes from Metagenomes. In: *Appl Environ Microbiol* 86 (23), e01505-20. DOI: 10.1128/AEM.01505-20.

da Fonseca, M.J.M.; Jurak, E.; Kataja, K.; Master, E.R.; Berrin, J.-G.; Stals, I. et al. (2018): Analysis of the substrate specificity of α -L-arabinofuranosidases by DNA sequencer-aided fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. In: *Applied microbiology and biotechnology* 102 (23), S. 10091–10102.

Dai, L.; Chang, Z.; Yang, J.; Liu, W.; Yang, Y.; Chen, C.-C. et al. (2021): Structural investigation of a thermostable 1,2- β -mannobiose phosphorylase from *Thermoanaerobacter* sp. X-514. In: *Biochemical and biophysical research communications* 579, S. 54–61. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.09.046.

Dakhova, O.N.; Kurepina, N.E.; Zverlov, V.V.; Svetlichnyi, V.A.; Velikodvorskaya, G.A. (1993): Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Thermotoga neapolitana* genes coding for enzymes of carbohydrate substrate degradation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 194 (3), S. 1359–1364.

Dam, P.; Kataeva, I.; Yang, S.-J.; Zhou, F.; Yin, Y.; Chou, W. et al. (2011): Insights into plant biomass conversion from the genome of the anaerobic thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725. In: *Nucleic acids research* 39 (8), S. 3240–3254. DOI: 10.1093/nar/gkq1281.

Davies, G.; Henrissat, B. (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. In: *Structure* 3 (9), S. 853–859. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.

Davies, G.J.; Wilson, K.S.; Henrissat, B. (1997): Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. In: *Biochemical Journal* 321 (Pt 2), S. 557.

dos Santos, C.R.; Cordeiro, R.L.; Wong, D.W.S.; Murakami, M.T. (2015): Structural Basis for Xyloglucan Specificity and α -d-Xyl p (1 \rightarrow 6)-d-Glc p Recognition at the -1 Subsite within the GH5 Family. In: *Biochemistry* 54 (10), S. 1930–1942.

dos Santos, C.R.; Giuseppe, P.O. de; Souza, F.H.M. de; Zanphorlin, L.M.; Domingues, M.N.; Pirolla, R.A.S. et al. (2018): The mechanism by which a distinguishing arabinofuranosidase can cope with internal di-substitutions in arabinoxylans. In: *Biotechnology for Biofuels* 11 (1), S. 223. DOI: 10.1186/s13068-018-1212-y.

(DPM Holzdesign GmbH) (Hg.) (2021): Iso-Stroh. Im Detail. Geschichte Technik Anwendung. Online verfügbar unter <https://www.dpm-gruppe.com/assets/Uploads/isostroh-technischer-folder-8-web4.pdf>, zuletzt geprüft am 24.02.2022.

Drula, E.; Garron, M.-L.; Dogan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N. (2021): The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. In: *Nucleic Acids Res.*

Drula, E.; Garron, M.-L.; Dogan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N. (2022): The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. In: *Nucleic acids research* 50 (D1), D571-D577. DOI: 10.1093/nar/gkab1045.

Duffaud, G.D.; McCutchen, C.M.; Leduc, P.; Parker, K.N.; Kelly, R.M. (1997): Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. In: *Applied and environmental microbiology* 63 (1), S. 169–177.

Ebringerová, A.; Heinze, T. (2000): Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. In: *Macromolecular rapid communications* 21 (9), S. 542–556.

Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T. (Hg.) (2005): Polysaccharides I: Structure, Characterisation and Use. Hemicellulose. Unter Mitarbeit von Heinze, Thomas (Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer.

Emsley, P.; Cowtan, K. (2004): Coot: model-building tools for molecular graphics. In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 60 (Pt 12 Pt 1), S. 2126–2132. DOI: 10.1107/S0907444904019158.

Fauré, R.; Courtin, C.M.; Delcour, J.A.; Dumon, C.; Faulds, C.B.; Fincher, G.B. et al. (2009): A brief and informationally rich naming system for oligosaccharide motifs of heteroxylans found in plant cell walls. In: *Australian Journal of Chemistry* 62 (6), S. 533–537.

Ferré, H.; Broberg, A.; Duus, J.Ø.; Thomsen, K.K. (2000): A novel type of arabinoxylan arabinofuranohydrolase isolated from germinated barley: Analysis of substrate preference and specificity by nano-probe NMR. In: *European journal of biochemistry* 267 (22), S. 6633–6641.

Fida, T. (2018): Heterologe Produktion und Charakterisierung nicht klassifizierter Glycosidhydrolasen. Master Thesis. Technische Universität München. Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Fry, S.C. (2004): Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. In: *New phytologist* 161 (3), S. 641–675.

- Fujimoto, Z.; Ichinose, H.; Maehara, T.; Honda, M.; Kitaoka, M.; Kaneko, S.** (2010): Crystal structure of an Exo-1,5- α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces avermitilis* provides insights into the mechanism of substrate discrimination between exo- and endo-type enzymes in glycoside hydrolase family 43. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (44), S. 34134–34143. DOI: 10.1074/jbc.M110.164251.
- Fujimoto, Z.; Jackson, A.; Michikawa, M.; Maehara, T.; Momma, M.; Henrissat, B. et al.** (2013): The structure of a *Streptomyces avermitilis* α -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement. In: *Journal of Biological Chemistry*, jbc. M113.460097. DOI: 10.1074/jbc.M113.460097.
- Gabler, F.; Nam, S.-Z.; Till, S.; Mirdita, M.; Steinegger, M.; Söding, J. et al.** (2020): Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. In: *Current protocols in bioinformatics* 72 (1), e108. DOI: 10.1002/cpbi.108.
- Gallego, M.V.; Pinaga, F.; Ramón, D.; Vallés, S.** (2001): Purification and Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of Interest in Winemaking. In: *Journal of Food Science* 66 (2), S. 204–209.
- Galperin, M.Y.; Wolf, Y.I.; Makarova, K.S.; Vera Alvarez, R.; Landsman, D.; Koonin, E.V.** (2021): COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. In: *Nucleic Acids Res* 49 (D1), D274-D281. DOI: 10.1093/nar/gkaa1018.
- Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A.** (2005): Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The proteomics protocols handbook*: Springer, S. 571–607.
- Gibson, D.G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J.C.; Hutchison III, C.A.; Smith, H.O.** (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. In: *Nature methods* 6 (5), S. 343. DOI: 10.1038/NMETH.1318.
- Gloster, T.M.; Turkenburg, J.P.; Potts, J.R.; Henrissat, B.; Davies, G.J.** (2008): Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora. In: *Chemistry & biology* 15 (10), S. 1058–1067. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.09.005.
- Glycoside hydrolases - CAZyedia (2022). Online verfügbar unter https://www.cazyedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#Inverting_glycoside_hydrolases, zuletzt aktualisiert am 19.10.2022, zuletzt geprüft am 25.10.2022.
- Gong, J.; Li, J.; Xu, J.; Xiang, Z.; Mo, L.** (2017): Research on cellulose nanocrystals produced from cellulose sources with various polymorphs. In: *RSC Adv.* 7 (53), S. 33486–33493. DOI: 10.1039/C7RA06222B.

Goyal, A.; Ahmed, S.; Sharma, K.; Gupta, V.; Bule, P.; Alves, V.D. et al. (2016): Molecular determinants of substrate specificity revealed by the structure of *Clostridium thermocellum* arabinofuranosidase 43A from glycosyl hydrolase family 43 subfamily 16. In: *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 72 (Pt 12), S. 1281–1289. DOI: 10.1107/S205979831601737X.

Green, P.N.; Ardley, J.K. (2018): Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms. A proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. DOI: 10.1099/ijsem.0.002856.

Grönemeyer, J.L.; Hurek, T.; Bünger, W.; Reinhold-Hurek, B. (2016): *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66 (1), S. 62–69. DOI: 10.1099/ijsem.0.000674.

Grosjean, H.; Crécy-Lagard, V. de; Marck, C. (2010): Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. In: *FEBS letters* 584 (2), S. 252–264.

Guillotin, L.; Kim, H.; Traore, Y.; Moreau, P.; Lafite, P.; Coquoin, V. et al. (2019): Biochemical Characterization of the α -L-Rhamnosidase DtRha from *Dictyoglomus thermophilum*: Application to the Selective Derhamnosylation of Natural Flavonoids. In: *ACS omega* 4 (1), S. 1916–1922. DOI: 10.1021/acsomega.8b03186.

Gupta, R. (2021): *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism*: Springer Nature.

Hassan, N.; Kori, L.D.; Gandini, R.; Patel, B.K.C.; Divne, C.; Tan, T.C. (2015): High-resolution crystal structure of a polyextreme GH43 glycosidase from *Halorubrum* sp. showing high α -L-arabinofuranosidase activity. In: *Acta Crystallographica Section F* 71 (3), S. 338–345. DOI: 10.1107/S2053230X15003337.

Helbert, W.; Poulet, L.; Drouillard, S.; Mathieu, S.; Liodice, M.; Couturier, M. et al. (2019): Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, S. 201815791. DOI: 10.1073/pnas.1815791116.

Henrissat, B.; Bairoch, A. (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. In: *Biochemical Journal* 316 (Pt 2) (Pt 2), S. 695–696. DOI: 10.1042/bj3160695.

Henrissat, B.; Davies, G. (1997): Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. In: *Current opinion in structural biology* 7 (5), S. 637–644.

Henrissat, B.; Surolia, A.; Stanley, P. (2009): A genomic view of glycobiology. In: *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*.

- Herlet, J.; Kornberger, P.; Roessler, B.; Glanz, J.; Schwarz, W.H.; Liebl, W.; Zverlov, V.V.** (2017): A new method to evaluate temperature vs. pH activity profiles for biotechnological relevant enzymes. In: *Biotechnology for Biofuels* 10 (1), S. 234. DOI: 10.1186/s13068-017-0923-9.
- Hess, M.; Sczyrba, A.; Egan, R.; Kim, T.-W.; Chokhawala, H.; Schroth, G. et al.** (2011): Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. In: *Science* 331 (6016), S. 463–467.
- Hoang, D.T.; Chernomor, O.; Haeseler, A. von; Minh, B.Q.; Le Vinh, S.** (2018): UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. In: *Molecular biology and evolution* 35 (2), S. 518–522. DOI: 10.1093/molbev/msx281.
- Hong, S.; Kyung, M.; Jo, I.; Kim, Y.-R.; Ha, N.-C.** (2018): Structure-based protein engineering of bacterial β -xylosidase to increase the production yield of xylobiose from xylose. In: *Biochemical and biophysical research communications* 501 (3), S. 703–710. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.051.
- Horn, S.J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Eijsink, V.** (2012): Novel enzymes for the degradation of cellulose. In: *Biotechnology for Biofuels* 5 (1), S. 45.
- Houston, K.; Tucker, M.R.; Chowdhury, J.; Shirley, N.; Little, A.** (2016): The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 984.
- Huber, R.; Langworthy, T.A.; König, H.; Thomm, M.; Woese, C.R.; Sleytr, U.B.; Stetter, K.O.** (1986): *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 C. In: *Archives of Microbiology* 144 (4), S. 324–333.
- Inamine, J.M.; Ho, K.C.; Loechel, S.; Hu, P.C.** (1990): Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. In: *J Bacteriol* 172 (1), S. 504–506. DOI: 10.1128/jb.172.1.504-506.1990.
- Jannasch, H.W.; Huber, R.; Belkin, S.; Stetter, K.O.** (1988): *Thermotoga neapolitana* sp. nov. of the extremely thermophilic, eubacterial genus *Thermotoga*. In: *Archives of Microbiology* 150 (1), S. 103–104.
- Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O. et al.** (2021): Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. In: *nature* 596 (7873), S. 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kabsch, W.** (2010): Xds. In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (2), S. 125–132.

- Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; Haeseler, A. von; Jermiin, L.S.** (2017): ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. In: *Nature methods* 14 (6), S. 587–589. DOI: 10.1038/nmeth.4285.
- Kamiya, S.; Esaki, S.; Tanaka, R.** (1985): Synthesis of Some Disaccharides Containing an L-Rhamnopyranosylor L-Mannopyranosyl Residue, and the Substrate-specificity of α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus niger*. In: *Agricultural and biological chemistry* 49 (1), S. 55–62.
- Kapli, P.; Yang, Z.; Telford, M.J.** (2020): Phylogenetic tree building in the genomic age. In: *Nature Reviews Genetics* 21 (7), S. 428–444.
- Karlsson, E.N.; Schmitz, E.; Linares-Pastén, J.A.; Adlercreutz, P.** (2018): Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. In: *Applied microbiology and biotechnology* 102 (21), S. 9081–9088.
- Keeling, P.J.** (2016): Genomics: evolution of the genetic code. In: *Current Biology* 26 (18), R851-R853.
- Kim, J.O.; Park, S.R.; Lim, W.J.; Ryu, S.K.; Kim, M.K.; An, C.L. et al.** (2000): Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* VF5. In: *Biochemical and biophysical research communications* 279 (2), S. 420–426.
- Kim, S.-K.; Russell, J.; Cha, M.**; (Michael E. Himmel); (Yannick J. Bomble); (Janet Westpheling); (Rebecca E. Parales) (2021): Coexpression of a β -d-Xylosidase from *Thermotoga maritima* and a Family 10 Xylanase from *Acidothermus cellulolyticus* Significantly Improves the Xylan Degradation Activity of the *Caldicellulosiruptor bescii* Exoproteome. In: *Appl Environ Microbiol* 87 (14), e00524-21. DOI: 10.1128/AEM.00524-21.
- Knight, R.D.; Freeland, S.J.; Landweber, L.F.** (2001): Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. In: *Nature Reviews Genetics* 2 (1), S. 49–58.
- Koutaniemi, S.; Tenkanen, M.** (2016): Action of three GH51 and one GH54 α -arabinofuranosidases on internally and terminally located arabinofuranosyl branches. In: *Journal of biotechnology* 229, S. 22–30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.050.
- Krissinel, E.; Henrick, K.** (2005): Detection of Protein Assemblies in Crystals. In: David Hutchison, Takeo Kanade, Josef Kittler, Jon M. Kleinberg, Friedemann Mattern, John C. Mitchell et al. (Hg.): Computational life sciences. First international symposium, CompLife 2005, Konstanz, Germany, September 25-27, 2005 ; proceedings, Bd. 3695. Berlin: Springer (Lecture notes in computer science Lecture notes in bioinformatics, 3695), S. 163–174.
- Kubicki, J.D.; Yang, H.; Sawada, D.; O'Neill, H.; Oehme, D.; Cosgrove, D.** (2018): The Shape of Native Plant Cellulose Microfibrils. In: *Sci Rep* 8 (1), S. 13983. DOI: 10.1038/s41598-018-32211-w.

- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K.** (2018): MEGA X. Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. In: *Molecular biology and evolution* 35 (6), S. 1547–1549.
- Lagaert, S.; Pollet, A.; Delcour, J.A.; Lavigne, R.; Courtin, C.M.; Volckaert, G.** (2010): Substrate specificity of three recombinant α -l-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. In: *Biochemical and biophysical research communications* 402 (4), S. 644–650.
- Lapierre, C.; Pollet, B.; Ralet, M.-C.; Saulnier, L.** (2001): The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. In: *Phytochemistry* 57 (5), S. 765–772.
- Lebbink, J.H.G.** (1999): Molecular characterisation of the thermostability and catalytic properties of enzymes from hyperthermophiles: Wageningen University and Research.
- Lee, R.A.; Lavoie, J.-M.** (2013): From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. In: *Animal Frontiers* 3 (2), S. 6–11. DOI: 10.2527/af.2013-0010.
- Li, D.-D.; Wang, J.-L.; Liu, Y.; Li, Y.-Z.; Zhang, Z.** (2021): Expanded analyses of the functional correlations within structural classifications of glycoside hydrolases. In: *Computational and structural biotechnology journal* 19, S. 5931–5942. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.10.039.
- Li, D.-D.; Zhang, Z.; Wang, J.-N.; Zhang, P.; Liu, Y.; Li, Y.-Z.** (2022a): Estimate of the degradation potentials of cellulose, xylan, and chitin across global prokaryotic communities. In: *Environmental microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.16290.
- Li, S.** (2017): Chapter 11 - Fundamentals of Biochemical Reaction Engineering. In: Shaofen Li (Hg.): *Reaction Engineering*. Boston: Butterworth-Heinemann, S. 491–539. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124104167000112>.
- Li, X.; Kouzounis, D.; Kabel, M.A.; Vries, R.P. de; Dilokpimol, A.** (2022b): Glycoside Hydrolase family 30 harbors fungal subfamilies with distinct polysaccharide specificities. In: *New Biotechnology* 67, S. 32–41. DOI: 10.1016/j.nbt.2021.12.004.
- Liebl, W.; Angelov, A.; Juergensen, J.; Chow, J.; Loeschcke, A.; Drepper, T. et al.** (2014): Alternative hosts for functional (meta) genome analysis. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 98 (19), S. 8099–8109.
- Liebl, W.; Brem, D.; Gotschlich, A.** (1998): Analysis of the gene for beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 50 (1), S. 55–64. DOI: 10.1007/s002530051256.

- Liebl, W.; Feil, R.; Gabelsberger, J.; Kellermann, J.; Schleifer, K.H.** (1992): Purification and characterization of a novel thermostable 4- α -glucanotransferase of *Thermotoga maritima* cloned in *Escherichia coli*. In: *European journal of biochemistry* 207 (1), S. 81–88. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17023.x.
- Liebl, W.; Stemplinger, I.; Ruile, P.** (1997): Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* alpha-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. In: *Journal of bacteriology* 179 (3), S. 941–948.
- Liners, F.; Letesson, J.-J.; Didembourg, C.; van Cutsem, P.** (1989): Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. In: *Plant physiology* 91 (4), S. 1419–1424. DOI: 10.1104/pp.91.4.1419.
- Liu, Q.P.; Sulzenbacher, G.; Yuan, H.; Bennett, E.P.; Pietz, G.; Saunders, K. et al.** (2007): Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. In: *Nature biotechnology* 25 (4), S. 454–464.
- Liu, Y.** (2022): Identification and analysis of novel bacterial enzymes for pectin degradation. Dissertation. Technische Universität München, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Liu, Y.; Angelov, A.; Feiler, W.; Baudrexl, M.; Zverlov, V.; Liebl, W.; Vanderhaeghen, S.** (2022): Arabinan saccharification by biogas reactor metagenome-derived arabinosyl hydrolases. In: *Biotechnol Biofuels* 15 (1), S. 121. DOI: 10.1186/s13068-022-02216-9.
- Liu, Y.; Vanderhaeghen, S.; Feiler, W.; Angelov, A.; Baudrexl, M.; Zverlov, V.; Liebl, W.** (2021): Characterization of Two α -L-Arabinofuranosidases from *Acetivibrio mesophilus* and Their Synergistic Effect in Degradation of Arabinose-Containing Substrates. In: *Microorganisms* 9 (7), S. 1467.
- Lobry, J.R.; Chessel, D.** (2003): Internal correspondence analysis of codon and amino-acid usage in thermophilic bacteria. In: *Journal of Applied Genetics* 44 (2), S. 235–262.
- Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B.** (2014): The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. In: *Nucleic acids research* 42 (D1), D490-D495.
- Luis, A.S.; Briggs, J.; Zhang, X.; Farnell, B.; Ndeh, D.; Labourel, A. et al.** (2018): Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides*. In: *Nature microbiology* 3 (2), S. 210. DOI: 10.1038/s41564-017-0079-1.
- Madden, R.H.** (1983): Isolation and characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., cellulolytic thermophile. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 33 (4), S. 837–840.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.A.; Clark, D.P.** (2013): Brock Mikrobiologie. 13. Aufl.

- Makarem, M.; Lee, C.M.; Kafle, K.; Huang, S.; Chae, I.; Yang, H. et al.** (2019): Probing cellulose structures with vibrational spectroscopy. In: *Cellulose* 26 (1), S. 35–79. DOI: 10.1007/s10570-018-2199-z.
- Malgas, S.; Mafa, M.S.; Mkabayi, L.; Pletschke, B.I.** (2019): A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. In: *World J Microbiol Biotechnol* 35 (12), S. 187. DOI: 10.1007/s11274-019-2765-z.
- Marino, C.; Gallo-Rodriguez, C.; Lederkremer, R.M. de** (2012): Galactofuranosyl-containing glycans: occurrence, synthesis and biochemistry. In: *Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications*, S. 207–268.
- Martínez Cuesta, S.; Rahman, S.A.; Furnham, N.; Thornton, J.M.** (2015): The Classification and Evolution of Enzyme Function. In: *Biophysical Journal* 109 (6), S. 1082–1086. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.04.020.
- Matsunaga, E.; Higuchi, Y.; Mori, K.; Tashiro, K.; Kuhara, S.; Takegawa, K.** (2015a): Draft genome sequence of *Streptomyces* sp. JHA19, a strain that possesses β -D-galactofuranosidase activity. In: *Genome Announc* 3 (5), e01171-15.
- Matsunaga, E.; Higuchi, Y.; Mori, K.; Yairo, N.; Oka, T.; Shinozuka, S. et al.** (2015b): Identification and Characterization of a Novel Galactofuranose-Specific β -D-Galactofuranosidase from *Streptomyces* Species. In: *PloS one* 10 (9), e0137230. DOI: 10.1371/journal.pone.0137230.
- McCarter, J.D.; Stephen Withers, G.** (1994): Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. In: *Current opinion in structural biology* 4 (6), S. 885–892. DOI: 10.1016/0959-440X(94)90271-2.
- McDougall, G.J.; Morrison, I.M.; Stewart, D.; Hillman, J.R.** (1996): Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70 (2), S. 133–150.
- McGill, C.J.; Westmoreland, P.R.** (2018): Monosaccharide isomer interconversions become significant at high temperatures. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 123 (1), S. 120–131.
- McKee, L.S.; Peña, M.J.; Rogowski, A.; Jackson, A.; Lewis, R.J.; York, W.S. et al.** (2012): Introducing endo-xylanase activity into an exo-acting arabinofuranosidase that targets side chains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (17), S. 6537–6542.
- Mechelke, M.; Herlet, J.; Benz, J.P.; Schwarz, W.H.; Zverlov, V.V.; Liebl, W.; Kornberger, P.** (2017): HPAEC-PAD for oligosaccharide analysis—novel insights into analyte sensitivity and response stability. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 409 (30), S. 7169–7181. DOI: 10.1007/s00216-017-0678-y.

Mechelke, M.L.N. (2018): Enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose zu Oligosacchariden. Technische Universität München.

(Megazyme Datasheet) (2021): POLYGALACTURONIC ACID (from Citrus Pectin) (Lot 200801). Hg. v. Megazyme Knowledge Base. Online verfügbar unter https://www.megazyme.com/documents/Data_Sheet/P-PGACIT-10G_DATA.pdf, zuletzt aktualisiert am 30.04.2021, zuletzt geprüft am 10.02.2022.

Mensitieri, F.; De Lise, F.; Strazzulli, A.; Moracci, M.; Notomista, E.; Cafaro, V. et al. (2018): Structural and functional insights into RHA-P, a bacterial GH106 α -L-rhamnosidase from *Novosphingobium* sp. PP1Y. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 648, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.abb.2018.04.013.

Mewis, K.; Lenfant, N.; Lombard, V.; Henrissat, B. (2016): Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: a Motivation for Detailed Enzyme Characterization. In: *Applied and environmental microbiology* 82 (6), S. 1686–1692. DOI: 10.1128/AEM.03453-15.

Mhlongo, N.N.; Skelton, A.A.; Kruger, G.; Soliman, M.E.S.; Williams, I.H. (2014): A critical survey of average distances between catalytic carboxyl groups in glycoside hydrolases. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 82 (9), S. 1747–1755. DOI: 10.1002/prot.24528.

Miehe, H. (1907): Die selbsterhitzung des heus: Eine biologische studie: G. Fischer.

Miller, G.L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. In: *Analytical chemistry* 31 (3), S. 426–428.

Miroshnichenko, M.L.; Kublanov, I.V.; Kostrikina, N.A.; Tourova, T.P.; Kolganova, T.V.; Birkeland, N.-K.; Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2008): Caldicellulosiruptor kronotskyensis sp. nov. and Caldicellulosiruptor hydrothermalis sp. nov., two extremely thermophilic, cellulolytic, anaerobic bacteria from Kamchatka thermal springs. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58 (6), S. 1492–1496.

Momayez, F.; Karimi, K.; Horváth, I.S. (2019): Sustainable and efficient sugar production from wheat straw by pretreatment with biogas digestate. In: *RSC advances* 9 (47), S. 27692–27701.

Mörch, M. (2019): Entwicklung eines Systems zur komplementationsbasierten Selektion thermostabiler Glycosidhydrolasen in *Thermus thermophilus*. Technische Universität München.

Mroueh, M.; Aruanno, M.; Borne, R.; Philip, P. de; Fierobe, H.-P.; Tardif, C.; Pagès, S. (2019): The xyl-doc gene cluster of *Ruminiclostridium cellulolyticum* encodes GH43- and GH62- α -L-arabinofuranosidases with complementary modes of action. In: *Biotechnology for Biofuels* 12 (1), S. 144. DOI: 10.1186/s13068-019-1483-y.

- Mueller, M.; Zartl, B.; Schleritzko, A.; Stenzl, M.; Viernstein, H.; Unger, F.M.** (2018): Rhamnosidase activity of selected probiotics and their ability to hydrolyse flavonoid rhamnoglucosides. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 41 (2), S. 221–228. DOI: 10.1007/s00449-017-1860-5.
- Mutter, M.; Beldman, G.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J.** (1994): Rhamnogalacturonan [alpha]-L-Rhamnopyranohydrolase (A Novel Enzyme Specific for the Terminal Nonreducing Rhamnosyl Unit in Rhamnogalacturonan Regions of Pectin). In: *Plant physiology* 106 (1), S. 241–250.
- Naumoff, D.G.** (2004): Phylogenetic analysis of α -galactosidases of the GH27 family. In: *Molecular Biology* 38 (3), S. 388–400.
- Naumoff, D.G.** (2005): GH97 is a new family of glycoside hydrolases, which is related to the α -galactosidase superfamily. In: *BMC genomics* 6 (1), S. 1–12.
- Naumoff, D.G.** (2011): Hierarchical classification of glycoside hydrolases. In: *Biochemistry (Moscow)* 76 (6), S. 622–635.
- Naumoff, D.G.** (Hg.) (2012): Evolution of the α -L-rhamnosidases: history of the lateral gene transfers and the gene duplications. Abstracts, The Eighth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB'12).
- Ndeh, D.; Rogowski, A.; Cartmell, A.; Luis, A.S.; Baslé, A.; Gray, J. et al.** (2017): Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. In: *nature* 544 (7648), S. 65. DOI: 10.1038/nature21725.
- Oliveira, C.; Carvalho, V.; Domingues, L.; Gama, F.M.** (2015): Recombinant CBM-fusion technology - Applications overview. In: *Biotechnology Advances* 33 (3-4), S. 358–369. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.006.
- O'Neill, E.C.; Stevenson, C.E.M.; Paterson, M.J.; Rejzek, M.; Chauvin, A.-L.; Lawson, D.M.; Field, R.A.** (2015): Crystal structure of a novel two domain GH 78 family α -rhamnosidase from *Klebsiella oxytoca* with rhamnose bound. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 83 (9), S. 1742–1749. DOI: 10.1002/prot.24807.
- Oshima, T.; Imahori, K.** (1971): Isolation of an extreme thermophile and thermostability of its transfer ribonucleic acid and ribosomes. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 17 (6), S. 513–517.
- Oshima, T.; Imahori, K.** (1974): Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 24 (1), S. 102–112.

- Østby, H.; Hansen, L.D.; Horn, S.J.; Eijsink, V.G.H.; Várnai, A.** (2020): Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. In: *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, S. 1–35.
- Pandiyan, K.; Singh, A.; Singh, S.; Saxena, A.K.; Nain, L.** (2019): Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. In: *Renewable energy* 132, S. 723–741. DOI: 10.1016/j.renene.2018.08.049.
- Pantazaki, A.A.; Pritsa, A.A.; Kyriakidis, D.A.** (2002): Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 58 (1), S. 1–12. DOI: 10.1007/s00253-001-0843-1.
- Parrent, J.L.; James, T.Y.; Vasaitis, R.; Taylor, A.F.S.** (2009): Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. In: *BMC Evolutionary Biology* 9 (1), S. 148. DOI: 10.1186/1471-2148-9-148.
- Passoth, V.; Sandgren, M.** (2019): Biofuel production from straw hydrolysates: current achievements and perspectives. In: *Applied microbiology and biotechnology* 103 (13), S. 5105–5116.
- Pauly, M.; Keegstra, K.** (2010): Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. In: *Current Opinion in Plant Biology* 13 (3), S. 304–311. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.12.009.
- Pavic, Q.; Pillot, A.; Tasseau, O.; Legentil, L.; Tranchimand, S.** (2019): Improvement of the versatility of an arabinofuranosidase against galactofuranose for the synthesis of galactofuranoconjugates. In: *Organic & biomolecular chemistry* 17 (28), S. 6799–6808.
- Pei, J.; Kim, B.-H.; Grishin, N.V.** (2008): PROMALS3D. A tool for multiple protein sequence and structure alignments. In: *Nucleic acids research* 36 (7), S. 2295–2300.
- Perrakis, A.; Sixma, T.K.; Wilson, K.S.; Lamzin, V.S.** (1997): wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple-refined dummy atomic models. In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 53 (Pt 4), S. 448–455. DOI: 10.1107/S09074444997005696.
- Phuengmaung, P.; Kunishige, Y.; Sukhumsirichart, W.; Sakamoto, T.** (2018): Identification and characterization of GH62 bacterial α -l-arabinofuranosidase from thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10 that preferentially degrades branched l-arabinofuranoses in wheat arabinoxylan. In: *Enzyme and Microbial Technology* 112, S. 22–28. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2018.01.009.
- Pirillo, V.; Pollegioni, L.; Molla, G.** (2021): Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate. In: *The FEBS Journal* 288 (16), S. 4730–4745.

Pitson, S.M.; Voragen, A.G.J.; Beldman, G. (1996): Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. In: *FEBS letters* 398 (1), S. 7–11.

Poschner, B.C.; Reed, J.; Langosch, D.; Hofmann, M.W. (2007): An automated application for deconvolution of circular dichroism spectra of small peptides. In: *Analytical biochemistry* 363 (2), S. 306–308.

Pouvreau, L.; Joosten, R.; Hinz, S.W.; Gruppen, H.; Schols, H.A. (2011): Chrysosporium lucknowense C1 arabinofuranosidases are selective in releasing arabinose from either single or double substituted xylose residues in arabinoxylans. In: *Enzyme and Microbial Technology* 48 (4), S. 397–403. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.01.004.

Pragnesh, N.D.; Ankur, G. (2018): Chapter 3 - Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications. In: Chaudhery Mustansar Hussain (Hg.): Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications. Amsterdam, Netherlands: Elsevier (Micro and Nano Technologies), S. 36–66. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133514000031>.

Purewal, S.S.; Sandhu, K.S. (2021): Debitting of citrus juice by different processing methods: A novel approach for food industry and agro-industrial sector. In: *Scientia Horticulturae* 276, S. 109750.

Puri, M.; Banerjee, U.C. (2000): Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. In: *Biotechnology Advances* 18 (3), S. 207–217.

Rahmann, S. (2010): Einführung in die Angewandte Bioinformatik: Phylogenetik und Taxonomie. Technische Universität Dortmund. Online verfügbar unter <http://ls11-www.cs.tu-dortmund.de/people/rahmann/teaching/ss2009/angebio/PhylogenetikTaxonomie.pdf>, zuletzt geprüft am 21.02.2022.

Raich, L.; Rovira, C. (2015): Sugar conformations that enhance cleavage of glycosidic bonds in carbohydrate-active enzymes. Barcelona Supercomputing Center. Online verfügbar unter <https://upcommons.upc.edu/handle/2099/16563>.

Rainey, F.A.; (Am Donnison); **Janssen, P.H.; Saul, D.; Rodrigo, A.; Bergquist, P.L. et al.** (1994): Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov. An obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. In: *FEMS microbiology letters* 120 (3), S. 263–266.

Rajan, S.S.; Yang, X.; Collart, F.; Yip, V.L.Y.; Withers, S.G.; Varrot, A. et al. (2004): Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD⁺/Mn²⁺-dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. In: *Structure* 12 (9), S. 1619–1629. DOI: 10.1016/j.str.2004.06.020.

- Rashamuse, K.; Sanyika Tendai, W.; Mathiba, K.; Ngcobo, T.; Mtimka, S.; Brady, D.** (2017): Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite (*Trinervitermes trinervoides*) and the characterization of a multimodular β -1, 4-xylanase (GH11). In: *Biotechnology and applied biochemistry* 64 (2), S. 174–186.
- Rettenmaier, R.; Kowollik, M.-L.; Klingl, A.; Liebl, W.; Zverlov, V.** (2019): *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov., a mesophilic and moderately thermophilic cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a lab-scale biogas fermenter fed with maize silage. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 71 (3), S. 4692. DOI: 10.1099/ijsem.0.004692.
- Ridley, B.L.; O'Neill, M.A.; Mohnen, D.** (2001): Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. In: *Phytochemistry* 57 (6), S. 929–967.
- Riedel, K.; Ritter, J.; Bronnenmeier, K.** (1997): Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (CelZ) and Avicelase II (CelY) in the degradation of microcrystalline cellulose. In: *FEMS microbiology letters* 147 (2), S. 239–243.
- Rietschel-Berst, M.; Jentoft, N.H.; Rick, P.D.; Pletcher, C.; Fang, F.; Gander, J.E.** (1977): Extracellular exo-beta-galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*: isolation, purification, and properties. In: *Journal of Biological Chemistry* 252 (10), S. 3219–3226.
- Ríos-Fránquez, F.J.; Rojas-Rejón, Ó.A.; Escamilla-Alvarado, C.** (2019): Chapter 13 - Microbial Enzyme Applications in Bioethanol Producing Biorefineries: Overview. In: Ramesh C. Ray und S. Ramachandran (Hg.): *Bioethanol production from food crops. Sustainable sources, interventions and challenges*. London, San Diego, Cambridge, MA, Oxford: Academic Press, S. 249–266. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128137666000138>.
- Robinson, P.K.** (2015): Enzymes: principles and biotechnological applications. In: *Essays in biochemistry* 59, S. 1–41. DOI: 10.1042/bse0590001.
- Rosgaard, L.; Pedersen, S.; Langston, J.; Akerhielm, D.; Cherry, J.R.; Meyer, A.S.** (2007): Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. In: *Biotechnology progress* 23 (6), S. 1270–1276. DOI: 10.1021/bp070329p.
- Roston, R.L.; Wang, K.; Kuhn, L.A.; Benning, C.** (2014): Structural determinants allowing transferase activity in SENSITIVE TO FREEZING 2, classified as a family I glycosyl hydrolase. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (38), S. 26089–26106. DOI: 10.1074/jbc.M114.576694.
- Rovira, C.; Males, A.; Davies, G.J.; Williams, S.J.** (2020): Mannosidase mechanism: at the intersection of conformation and catalysis. In: *Current opinion in structural biology* 62, S. 79–92. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.11.008.

- Ruchala, J.; Sibirny, A.A.** (2021): Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. In: *FEMS Microbiology Reviews* 45 (4). DOI: 10.1093/femsre/fuaa069.
- Russell, N.J.; Fukunaga, N.** (1990): A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. In: *FEMS Microbiol Lett* 75 (2-3), S. 171–182.
- Rye, C.S.; Withers, S.G.** (2000): Glycosidase mechanisms. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 4 (5), S. 573–580. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00135-6.
- Sakamoto, T.; Inui, M.; Yasui, K.; Hosokawa, S.; Ihara, H.** (2013): Substrate specificity and gene expression of two *Penicillium chrysogenum* α -l-arabinofuranosidases (AFQ1 and AFS1) belonging to glycoside hydrolase families 51 and 54. In: *Applied microbiology and biotechnology* 97 (3), S. 1121–1130. DOI: 10.1007/s00253-012-3978-3.
- Sakka, M.; Tachino, S.; Katsuzaki, H.; van Dyk, J.S.; Pletschke, B.I.; Kimura, T.; Sakka, K.** (2012): Characterization of Xyn30A and Axx43A of *Bacillus licheniformis* SVD1 identified by its genomic analysis. In: *Enzyme and Microbial Technology* 51 (4), S. 193–199. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2012.06.003.
- Saleh, M.A.; Han, W.-J.; Lu, M.; Wang, B.; Li, H.; Kelly, R.M.; Li, F.-L.** (2017): Two Distinct α -l-Arabinofuranosidases in *Caldicellulosiruptor* Species Drive Degradation of Arabinose-Based Polysaccharides. In: *Appl Environ Microbiol* 83 (13), e00574-17. DOI: 10.1128/AEM.00574-17.
- Salehi, B.; Fokou, P.V.T.; Sharifi-Rad, M.; Zucca, P.; Pezzani, R.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J.** (2019): The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. In: *Pharmaceuticals* 12 (1), S. 11.
- Sathya, T.A.; Khan, M.** (2014): Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. In: *Journal of Food Science* 79 (11), R2149-R2156.
- Sawhney, N.; Preston, J.F.** (2014): GH51 arabinofuranosidase and its role in the methylglucuronarabinoxylan utilization system in *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. In: *Appl Environ Microbiol* 80 (19), S. 6114–6125.
- Schmalhorst, P.S.** (2009): Biosynthesis of Galactofuranose Containing Glycans and Their Relevance for the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. Medizinische Hochschule Hannover. Institut für Zelluläre Chemie.
- Schwarz, W.H.** (2004): Cellulose - Struktur ohne Ende. In: *Naturwissenschaftliche Rundschau* 57 (8), S. 443–445.
- Schwarz, W.H.; Adelsberger, H.; Jauris, S.; Hertel, C.; Funk, B.; Staudenbauer, W.L.** (1990): Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: Cloning and expression of xylanase, β -D-

xylosidase, and α -L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 170 (1), S. 368–374.

Schwarz, W.H.; Bronnenmeier, K.; Krause, B.; Lottspeich, F.; Staudenbauer, W.L. (1995): Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercoararium* (ArfB). In: *Applied microbiology and biotechnology* 43 (5), S. 856–860.

Segovia, L.; Young, J.P.W.; Martínez-Romero, E. (1993): Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 43 (2), S. 374–377.

Seidler, A. (2020): Eigenschaften der multimodularen Glykosidhydrolase Axh43A von *Thermoclostridium stercoararium*. Bachelorarbeit. Technische Universität München, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Seničar, M.; Lafite, P.; Eliseeva, S.V.; Petoud, S.; Landemarre, L.; Daniellou, R. (2020): Galactofuranose-Related Enzymes: Challenges and Hopes. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (10). DOI: 10.3390/ijms21103465.

Sillitoe, I.; Bordin, N.; Dawson, N.; Waman, V.P.; Ashford, P.; Scholes, H.M. et al. (2021): CATH: increased structural coverage of functional space. In: *Nucleic acids research* 49 (D1), D266–D273. DOI: 10.1093/nar/gkaa1079.

Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A.; Ankaram, S.; Duan, Y.; Awasthi, M.K. (2019): Chapter 5 - Biofuel Production From Biomass: Toward Sustainable Development. In: Sunil Kumar, Rakesh Kumar und Ashok Pandey (Hg.): *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier, S. 79–92. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444640833000051>.

Söding, J. (2005): Protein homology detection by HMM-HMM comparison. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 21 (7), S. 951–960. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti125.

Sørensen, H.R.; Jørgensen, C.T.; Hansen, C.H.; Jørgensen, C.I.; Pedersen, S.; Meyer, A.S. (2006): A novel GH43 α -L-arabinofuranosidase from *Humicola insolens*: mode of action and synergy with GH51 α -L-arabinofuranosidases on wheat arabinoxylan. In: *Applied microbiology and biotechnology* 73 (4), S. 850–861.

Spök, A.; Proksch, M. (2007): *Lebensmittelenzyme in der EU: Herstellung, Anwendungen, Marktsituation und rechtliche Regelungen*: Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, Sektion IV.

- Stam, M.R.; Danchin, E.G.J.; Rancurel, C.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B.** (2006): Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 19 (12), S. 555–562.
- Steinegger, M.; Meier, M.; Mirdita, M.; Vöhringer, H.; Haunsberger, S.J.; Söding, J.** (2019): HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. In: *BMC bioinformatics* 20 (1), S. 473. DOI: 10.1186/s12859-019-3019-7.
- Stelzer, W.; Poschner, B.C.; Stalz, H.; Heck, A.J.; Langosch, D.** (2008): Sequence-specific conformational flexibility of SNARE transmembrane helices probed by hydrogen/deuterium exchange. In: *Biophysical Journal* 95 (3), S. 1326–1335.
- Stetter, K.O.** (2009): Hyperthermophilic microorganisms. In: *EXTREMOPHILES-Volume I* 3, S. 158.
- Studier, F.W.** (2005): Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. In: *Protein expression and purification* 41 (1), S. 207–234.
- Suryani, -; Kimura, T.; Sakka, K.; Ohmiya, K.** (2004): Sequencing and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* β -xylosidase Xyl43B in *Escherichia coli*. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68 (3), S. 609–614.
- Svetlichnyi, V.A.** (1990): *Anaerocellum thermophilum* gen. nov. sp. An extremely thermophilic cellulolytic eubacterium isolated from hot springs in the valley of geysers. In: *Microbiology* 59, S. 598–604.
- Tajwar, R.; Shahid, S.; Zafar, R.; Akhtar, M.W.** (2017): Impact of orientation of carbohydrate binding modules family 22 and 6 on the catalytic activity of *Thermotoga maritima* xylanase XynB. In: *Enzyme and Microbial Technology* 106, S. 75–82. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.07.004.
- Tefsen, B.; Lagendijk, E.L.; Park, J.; Akeroyd, M.; Schachtschabel, D.; Winkler, R. et al.** (2012): Fungal α -arabinofuranosidases of glycosyl hydrolase families 51 and 54 show a dual arabinofuranosyl- and galactofuranosyl-hydrolyzing activity. In: *Biological chemistry* 393 (8), S. 767–775.
- Te'o, V.S.J.** (1996): Multiple Xylanases from the Extreme Thermophile *Caldicellulosiruptor Saccharolyticus*. University of Auckland. Molecular Genetics and Microbiology (Biological Sciences).
- Terry, B.; Ha, J.; Lise, F. de; Mensitieri, F.; Izzo, V.; Sazinsky, M.H.** (2020): The crystal structure and insight into the substrate specificity of the α -L rhamnosidase RHA-P from *Novosphingobium* sp. PP1Y. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 679, S. 108189. DOI: 10.1016/j.abb.2019.108189.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C.; Armand, S.; Kalk, K.H.; Isogai, A.; Henrissat, B.; Dijkstra, B.W.** (1995): Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex

with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. In: *Biochemistry* 34 (48), S. 15619–15623. DOI: 10.1021/bi00048a003.

Teugjas, H.; Väljamäe, P. (2013): Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. In: *Biotechnol Biofuels* 6 (1), S. 105. DOI: 10.1186/1754-6834-6-105.

Thapa, S.; Mishra, J.; Arora, N.; Mishra, P.; Li, H.; Bhatti, S.; Zhou, S. (2020): Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. In: *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 19 (3), S. 621–648.

Till, M.; Goldstone, D.; Card, G.; Attwood, G.T.; Moon, C.D.; Arcus, V.L. (2014): Structural analysis of the GH43 enzyme Xsa43E from *Butyrivibrio proteoclasticus*. In: *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* 70 (Pt 9), S. 1193–1198. DOI: 10.1107/S2053230X14014745.

Törönen, P.; Holm, L. (2022): PANNZER—A practical tool for protein function prediction. In: *Protein Science* 31 (1), S. 118–128.

Trifinopoulos, J.; Nguyen, L.-T.; Haeseler, A. von; Minh, B.Q. (2016): W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. In: *Nucleic acids research* 44 (W1), W232-5. DOI: 10.1093/nar/gkw256.

Turakainen, H.; Aho, S.; Korhola, M. (1993): MEL gene polymorphism in the genus *Saccharomyces*. In: *Appl Environ Microbiol* 59 (8), S. 2622–2630.

Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E.N. (2007): Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. In: *Microbial cell factories* 6 (1), S. 9. DOI: 10.1186/1475-2859-6-9.

Tutunchi, H.; Naeini, F.; Ostadrahimi, A.; Hosseinzadeh-Attar, M.J. (2020): Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. In: *Phytotherapy Research* 34 (12), S. 3137–3147.

Urakami, T.; Komagata, K. (1984): *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 34 (2), S. 188–201.

Vagin, A.A.; Steiner, R.A.; Lebedev, A.A.; Potterton, L.; McNicholas, S.; Long, F.; Murshudov, G.N. (2004): REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 60 (Pt 12 Pt 1), S. 2184–2195. DOI: 10.1107/S0907444904023510.

van Laere, K.M.; Voragen, C.H.; Kroef, T.; van den Broek, L.A.; Beldman, G.; Voragen, A.G. (1999): Purification and mode of action of two different arabinoxylan arabinofuranohydrolases from

Bifidobacterium adolescentis DSM 20083. In: *Applied microbiology and biotechnology* 51 (5), S. 606–613.

van Laere, K.M.J.; Beldman, G.; Voragen, A.G.J. (1997): A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. In: *Applied microbiology and biotechnology* 47 (3), S. 231–235. DOI: 10.1007/s002530050918.

Vandermarliere, E.; Bourgois, T.M.; Winn, M.D.; van Campenhout, S.; Volckaert, G.; Delcour, J.A. et al. (2009): Structural analysis of a glycoside hydrolase family 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase in complex with xylotetraose reveals a different binding mechanism compared with other members of the same family. In: *Biochemical Journal* 418 (1), S. 39–47. DOI: 10.1042/BJ20081256.

VanFossen, A.L.; Ozdemir, I.; Zelin, S.L.; Kelly, R.M. (2011): Glycoside hydrolase inventory drives plant polysaccharide deconstruction by the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. In: *Biotechnology and bioengineering* 108 (7), S. 1559–1569. DOI: 10.1002/bit.23093.

(VDB) (Hg.): Wie wird Bioethanol hergestellt? Online verfügbar unter <http://www.biokraftstoffverband.de/index.php/78.html>, zuletzt geprüft am 17.02.2022.

Vera, C.; Illanes, A.; Guerrero, C. (2021): Enzymatic production of prebiotic oligosaccharides. In: *Current Opinion in Food Science* 37, S. 160–170.

Verastegui, Y.; Cheng, J.; Engel, K.; Kolczynski, D.; Mortimer, S.; Lavigne, J. et al. (2014): Multisubstrate isotope labeling and metagenomic analysis of active soil bacterial communities. In: *MBio* 5 (4), e01157-14.

Wallace, G.; Russell, W.R.; Lomax, J.A.; Jarvis, M.C.; Lapierre, C.; Chesson, A. (1995): Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. In: *Carbohydrate Research* 272 (1), S. 41–53. DOI: 10.1016/0008-6215(95)00036-5.

Wang, W.; Mai-Gisondi, G.; Stogios, P.J.; Kaur, A.; Xu, X.; Cui, H. et al. (2014): Elucidation of the molecular basis for arabinoxylan-debranching activity of a thermostable family GH62 α -l-arabinofuranosidase from *Streptomyces thermoviolaceus*. In: *Appl Environ Microbiol* 80 (17), S. 5317–5329. DOI: 10.1128/AEM.00685-14.

Wang, X.; Weber, G.F. (2021): Quantitative Analysis of Protein Evolution: The Phylogeny of Osteopontin. In: *Frontiers in genetics* 12.

Wang, Z.; Zhao, C.; Wang, Y.; Sun, Z.; Wang, N. (2018): PANDA: Protein function prediction using domain architecture and affinity propagation. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 3484. DOI: 10.1038/s41598-018-21849-1.

- Whistler, R.L.** (1993): Hemicelluloses. In: *Industrial gums*: Elsevier, S. 295–308.
- Wiegel, J.** (1982): Ethanol from cellulose. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 38 (2), S. 151–156. DOI: 10.1007/BF01945067.
- Wiegel, J.** (1990): Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. In: *FEMS Microbiology Reviews* 6 (2-3), S. 155–169.
- Wilkens, C.; Andersen, S.; Dumon, C.; Berrin, J.-G.; Svensson, B.** (2017): GH62 arabinofuranosidases: structure, function and applications. In: *Biotechnology Advances* 35 (6), S. 792–804.
- Williams, C.J.; Headd, J.J.; Moriarty, N.W.; Prisant, M.G.; Videau, L.L.; Deis, L.N. et al.** (2018): MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 27 (1), S. 293–315. DOI: 10.1002/pro.3330.
- Wood, T.M.; Bhat, K.M.** (1988): Methods for measuring cellulase activities. In: *Methods in enzymology*, Bd. 160: Elsevier, S. 87–112.
- Xu, H.; Han, D.; Xu, Z.** (2015): Expression of heterologous cellulases in *Thermotoga* sp. strain RQ2. In: *BioMed research international* 2015.
- Xu, W.; Zhao, Z.; Zhang, H.; Hu, M.; Yang, N.; Wang, H. et al.** (2022): Deep neural learning based protein function prediction. In: *Mathematical Biosciences and Engineering* 19 (3), S. 2471–2488.
- Xue, S.; Pattathil, S.; Sousa, L.C.; Ubanwa, B.; Dale, B.; Jones, A.D.; Balan, V.** (2021): Understanding The Structure And Composition of Recalcitrant Oligosaccharides In Ammonia Treated Lignocellulosic Biomass Hydrolysate Using High-Throughput Biotin-Based Glycome Profiling And Mass Spectrometry.
- Yadav, P.; CHAUHAN, A.K.; Singh, S.P.** (2017): α -L-rhamnosidase. Sources, production, purification and characterization of the debittering enzyme. In: *International Journal of Biotechnology and Research* 7 (1), S. 2249–6858.
- Yang, S.-J.; Kataeva, I.; Wiegel, J.; Yin, Y.; Dam, P.; Xu, Y. et al.** (2010): Classification of ‘*Anaerocellum thermophilum*’ strain DSM 6725 as *Caldicellulosiruptor bescii* sp. nov. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60 (9), S. 2011–2015. DOI: 10.1099/ijs.0.017731-0.
- Yoshida, S.; Hespren, C.W.; Beverly, R.L.; Mackie, R.I.; Cann, I.K.O.** (2010): Domain analysis of a modular α -L-Arabinofuranosidase with a unique carbohydrate binding strategy from the fiber-degrading bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. In: *J Bacteriol* 192 (20), S. 5424–5436. DOI: 10.1128/JB.00503-10.
- Zavyalov, A.V.; Rykov, S.V.; Lunina, N.A.; Sushkova, V.I.; Yarotsky, S.V.; Berezina, O.V.** (2019): Plant Polysaccharide Xyloglucan and Enzymes That Hydrolyze It (Review). In: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 45 (7), S. 845–859. DOI: 10.1134/S1068162019070148.

Zhang, J. (2003): Evolution by gene duplication: an update. In: *Trends in ecology & evolution* 18 (6), S. 292–298.

Zhang, X.; Tu, B.; Dai, L.; Lawson, P.A.; Zheng, Z.; Liu, L.-Y. et al. (2018): *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateiclostridiaceae fam. nov. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. DOI: 10.1099/ijsem.0.002966.

Zverlov, V.; Mahr, S.; Riedel, K.; Bronnenmeier, K. (1998): Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (Cela) from the extreme thermophile '*Anaerocellum thermophilum*' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. In: *Microbiology* 144 (2), S. 457–465.

Zverlov, V.V.; Hertel, C.; Bronnenmeier, K.; Hroch, A.; Kellermann, J.; Schwarz, W.H. (2000): The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*. Biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. In: *Molecular microbiology* 35 (1), S. 173–179.

Zverlov, V.V.; Hiegl, W.; Köck, D.E.; Kellermann, J.; Köllmeier, T.; Schwarz, W.H. (2010): Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. In: *Engineering in Life Sciences* 10 (6), S. 528–536.

Zverlov, V.V.; Schwarz, W.H. (2008): Bacterial Cellulose Hydrolysis in Anaerobic Environmental Subsystems—*Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, Thermophilic Plant-fiber Degraders. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125 (1), S. 298–307.

Zverlov, V.V.; Velikodvorskaya, G.A.; Schwarz, W.H. (2002): A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*. Investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. In: *Microbiology* 148 (1), S. 247–255.

Zverlov, V.V.; Volkov, I.Y.; Velikodvorskaya, T.V.; Schwarz, W.H. (1997a): Highly thermostable endo-1, 3- β -glucanase (laminarinase) Lam A from *Thermotoga neapolitana*. Nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. In: *Microbiology* 143 (5), S. 1701–1708.

Zverlov, V.V.; Volkov, I.Y.; Velikodvorskaya, T.V.; Schwarz, W.H. (1997b): *Thermotoga neapolitana* bgIB gene, upstream of lamA, encodes a highly thermostable β -glucosidase that is a laminaribiase. In: *Microbiology* 143 (11), S. 3537–3542.

Zykwinska, A.; Rondeau-Mouro, C.; Garnier, C.; Thibault, J.-F.; Ralet, M.-C. (2006): Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. In: *Carbohydrate polymers* 65 (4), S. 510–520.

7 Anhang

Tabelle 4.5.1 Enzyme Commission Nummern für β -D-Glukosyl-Bindungen spaltende Enzyme

	EC Nummer	Akzeptierter Name
1	EC 3.2.1.4	Endo-1,4- β -D-Glukanasen = Cellulasen
2	EC 3.2.1.6	Endo-1,3(4)- β -Glukanasen
3	EC 3.2.1.21	β -D-Glukosidasen
4	EC 3.2.1.39	Glukan Endo-1,3- β -D-Glukosidase
5	EC 3.2.1.58	Glukan 1,3- β -Glukosidase
6	EC 3.2.1.71	Glukan endo-1,2- β -Glukosidase
7	EC 3.2.1.74	Glukan 1,4- β -Glukosidase
8	EC 3.2.1.75	Glukan endo-1,6- β -Glukosidase
9	EC 3.2.1.117	Amygdalin β -Glukosidase
10	EC 3.2.1.118	Prunasin β -Glukosidase
11	EC 3.2.1.119	Vicianin β -Glukosidase
12	EC 3.2.1.125	Raucaffricine β -Glukosidase
13	EC 3.2.1.126	Coniferin β -Glukosidase
14	EC 3.2.1.150	Oligoxyloglukan <i>reducing-end-specific</i> Cellobiohydrolase
15	EC 3.2.1.151	Xyloglukan- spezifische endo- β -1,4-Glukanase
16	EC 3.2.1.155	Xyloglukan-spezifische endo-prozessive β -1,4-Glukanase
17	EC 3.2.1.161	β -Apiosyl- β -Glukosidase
18	EC 3.2.1.168	Hesperidin 6-O- α -L-Rhamnosyl- β -D-Glukosidase
19	EC 3.2.1.175	β -D-Glukopyranosyl Abscisat β -Glukosidase
20	EC 3.2.1.182	4-Hydroxy-7-Methoxy-3-Oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-Benzoxazin-2-yl Glukosid β -D-Glukosidase
21	EC 3.2.1.186	Protodioscin 26-O- β -D-glukosidase
22	EC 3.2.1.192	Ginsenosid Rb1 β -glukosidase
23	EC 3.2.1.206	Oleuropein β -Glukosidase
24	EC 3.2.1.214	Exo β -1,2-Glukooligosaccharide Sophorohydrolase (<i>non-reducing end</i>)

7.1 Ergebnisse der Sequenzierung von *Tn_gly* aus *T. neapolitana* Z2706-MC24

Nukleotidsequenz von *Tn_Gly*, ermittelt durch Sequenzieren von pET24c-*Tn_gly*377:

```
GTGAAGGGGCGAGATGCCCTTCACTCATGGGGGAGTGAGACATGGCAGAGGAGATTTTA
AGAAAACCTCCTTTTCCATAAAAAGATCGCTGAGAAAAGACGAAACGATCGACATTTTGA
AGGGTGACCTACTTCTTTCCCAAAGATTTTCGTCTCACGAATTATCCCAGACAACCCGTT
GCCGTTTTCAACCCGGGAGCAGTCCTCGTGGGAAAGAGTCTTCACGTGTTTCCAAGGGTG
ATATTCGATTACTACAAGTACGTGTCGTGATAGGTCACCTTCGTGGTGGACATCGATGAA
CTGCTCAACAAAGAAGTGAAGAACCCATAGAGATGGAGATCGTTTTCTGGCCACGCGAT
ATTCAGGAGTTCCTCGGGTGCAGAACCCAAAGGGTCTTCTTCAGAGACTCCCATTTTCGAG
ATACTGTACACGGCAAAGGGTACAAAGACTGGTCACAGGAAGGAAAACCATACGGAC
TTTCTTGCTTACGCTGTTCTGGACGAAGACCTGAATCTTCTGGAAAAGAAAACGCTCTCC
ATAAGGAGCACACTTGGTGATTTTCATCCCCGTTTCGATGAAGGACAGCTCTTTTGTGGAA
TCGAACGTGATACTGACCAGGATAACGGTGGGAGATACCAAAGTCTGCTGGCGTGGAAGA
ATGGAGGGGAGACTCTATAGATCTCTACAGCCTGGATCCGGTTTTCTTCCCGGAAAATGG
GAAACAAAGGTTGGATGGTCCACCAACGCCGTCAGGGTGAAGAAGGGATACCTCATAGGC
TGGCAGCTGTTCTCAAAGATCTCACCTACAAAACGGTCTGGCGCTTGTGGATGGTTCGA
AGAAAACCTTCTTGAACGACGAACACTACGTTCTCTCACCGAAAGGTGTGATTGAAGAGTAC
GGTGACAGGATCAGGGTGTCTTTGGCTGTGGGCTTGTGGTATACGAAGGAAAGGTGATA
TGGATAGGTGGTGTCTCCGACTGGGCTATAGGTGTGTTTCGAGGCCGACGAAGGTGAGATC
ATGAATTTAATGAAAGAAGCAACGCACCACCACCACCACTGA
```

Aminosäuresequenz translatiert durch das ExPASy Translate tool (offene Leserahmen sind rot hinterlegt):

```
VKGRDAPSLMGE-DMAEIILRKLLFHKRSLRKDETIIDIFRRVITYFFPKDFVLTNYPRQPVAVFNPVAV
LVGKSLHVFPRVIFDYKYVSSIGHFVVDIDELLNKEVKRPIEMEIVFWPRDIQEF LGCEDPRVFFRD
SHFEILYTAKGYKDWSEQEGKPHDFLAYAVLDEDLNLEKKYVSIRSTLGDFIPVSMKSSFVESNVI
LTRITVGDTKVCWRGRMEGDSIDLYS LDPVFFPEKWETKVGWSTNAVRVKGYLIGWHAVLKDLYKN
GLALVDGRRKLLGTTNYVLS PKGVIEEYGDRI RVI FGCGLVVYEGKVIWIGGVSDWAIGVFEADEGEI
MNL MKEATHHHHHH-
```

Query	1	MAEEIILRKLLFHKRSLRKDETIIDIFRRVITYFFPKDFVLTNYPRQPVAVFNPVAVLVGKSL	60
Sbjct	15	74
Query	61	HVFPRVIFDYKYVSSIGHFVVDIDELLNKEVKRPIEMEIVFWPRDIQEF LGCEDPRVFF	120
Sbjct	75D.F.GK.K.....	134
Query	121	RDSHFEILYTAKGYKDWSEQEGKPHDFLAYAVLDEDLNLEKKYVSIRSTLGDFIPVSMK	180
Sbjct	135	...R.....K.....	194
Query	181	DSSFVESNVILTRITVGDTKVCWRGRMEGDSIDLYS LDPVFFPEKWETKVGWSTNAVRVK	240
Sbjct	195	254
Query	241	KGYLIGWHAVLKDLYKNGLALVDGRRKLLGTTNYVLS PKGVIEEYGDRI RVI FGCGLVW	300
Sbjct	255	R.....G.....	314
Query	301	YEGKVIWIGGVSDWAIGVFEADEGEIMNL MKEAT	334
Sbjct	315	348

Abbildung 7.1.1 Alignment von *Tn_Gly* aus *Thermotoga neapolitana* Z2706-MC24 (Query) mit CTN_1797 (ACM23973.1) von *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 (Sbjct). Erstellt mit Voreinstellungen in BLASTp (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Unterschiede sind in rot hervorgehoben.

7.2 Gelbilder

Agarosegel pET24c:

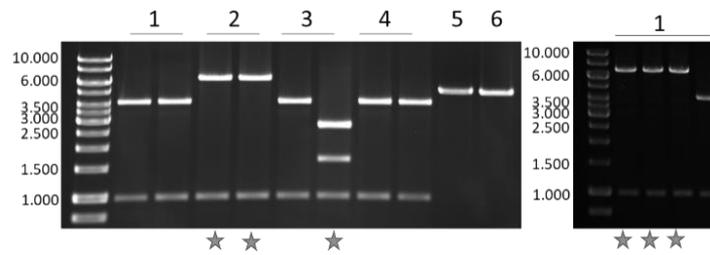


Abbildung 7.2.1 Beispielhaftes Agarosegel nach Restriktionsverdau von pET24c-Plasmiden. Erwartete Fragmentgrößen sind in Klammern angegeben. Erfolgreiche Insertionen sind mit einem Stern gekennzeichnet

1. pET-Cbe_ramB PvuII (7123, 999, 93 bp)
2. pET-Cbe_8445 PvuII (6667, 999, 93 bp)
3. pET-Cbe_8430 PvuII (2810, 2765, 1680, 999, 93 bp)
4. pET24c PvuII (4216, 999, 93 bp)
5. pET24c NdeI (5308 bp)
6. pET24c NdeI XhoI (5232 bp)

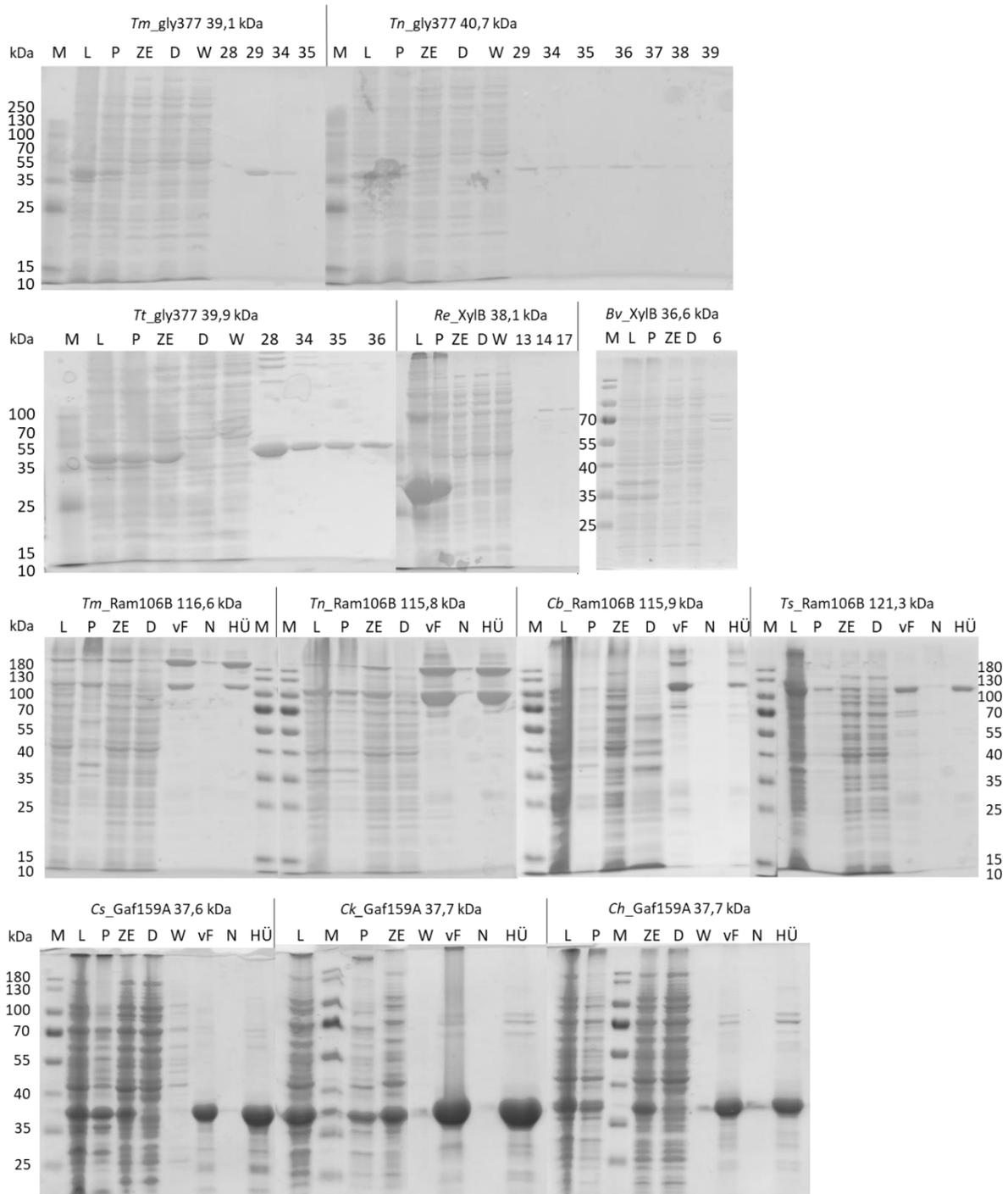


Abbildung 7.2.2 SDS-PAGE-Gele der Produktion von *Tm_Gly*, *Tn_Gly*, *Tt_Gly*, *Re_XylB*, *Bv_XylB*, *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B*, *Ts_Ram106B* *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A* in *E. coli* BL21. Für alle Proteine sind Proben während der Produktion und des Reinigungsfortschritts gezeigt. Pellets aus 200 ml Kulturen wurden in 20 ml Waschlyse Puffer mit 20 mM Imidazol resuspendiert. Affinitäts-Reinigung erfolgte über HisTrap FF 5 ml Säulen. M = Marker; L = Lysat; P = Pellet; ZE = Zellextrakt; D = Durchfluss; W = Waschfraktion; 28-36: Elutionsfraktionen 28-36 (je 2 ml), vF = vereinte Fraktionen, N = Niederschlag nach Hitzebehandlung, HÜ = Hitzebehandelter Überstand

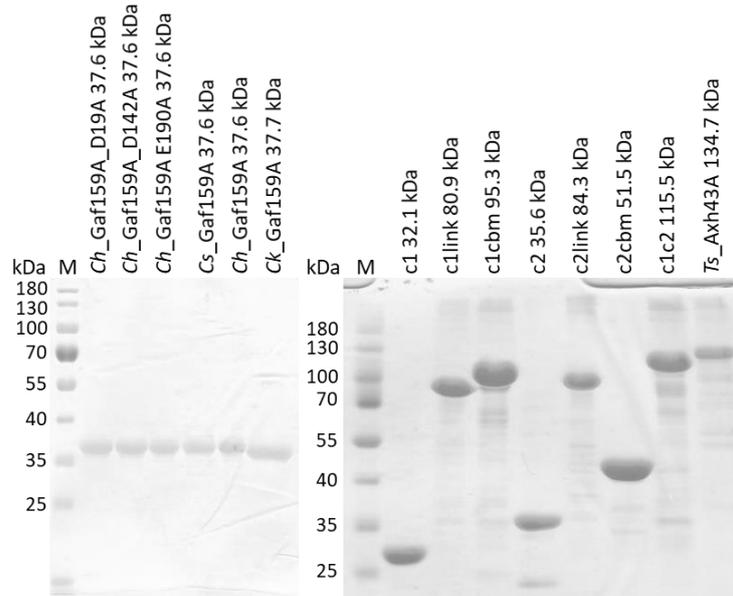


Abbildung 7.2.3 SDS-PAGE-Gele der gereinigten Proteine *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A*, *Ck_Gaf159A*, den Mutanten von *Ch_Gaf159A* und allen *T5_Axh43A* Domänen-Varianten, die in *E. coli* BL21 produziert wurden. Pellets aus 200 ml Kulturen wurden in 20 ml Wasch-Lyse Puffer mit 20 mM Imidazol resuspendiert. Affinitäts-Reinigung erfolgte über HisTrap FF 5 ml Säulen. M = Marker

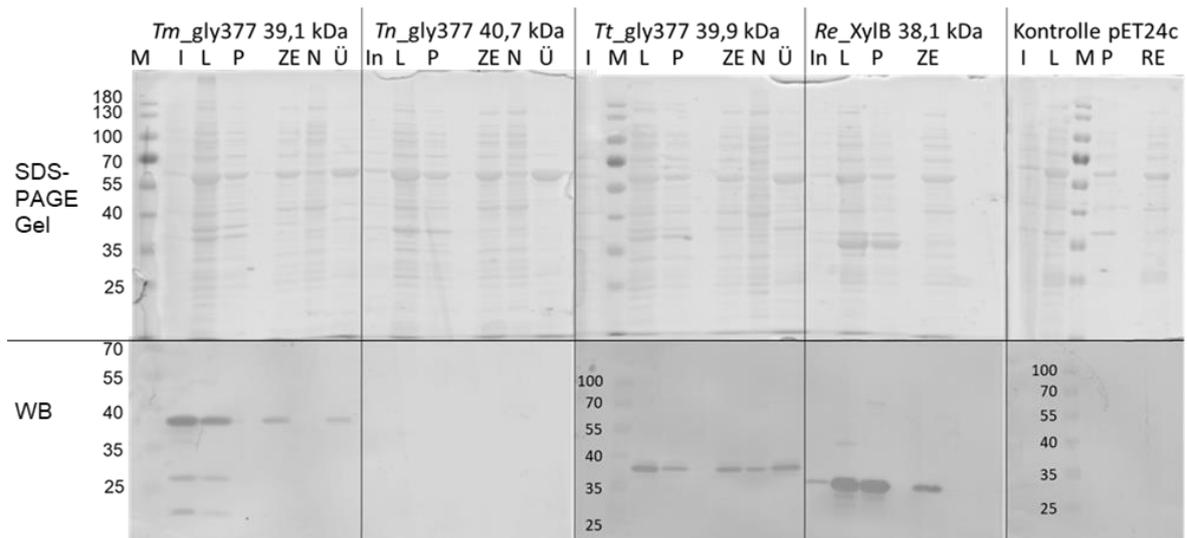


Abbildung 7.2.4 SDS-PAGE-Gele und Westernblots der Produktion von *Tm_Gly*, *Tn_Gly*, *Tt_Gly* und *Re_XylB* in *E. coli* Arctic Express. (20 ml in Kolben ohne Schikanen, angeimpft mit 400 µl VK, die 20 µg/ml Gen enthält, 3 h bei 30 °C, dann induziert mit 1 mM IPTG, 20 h bei 10 °C 220 rpm, Zellaufschluss von 10 ml Kultur in 1 ml Wasch-Lyse-Puffer ohne Imidazol. Mit 10 µl (100 mg/ml) Lysozym 1 h auf Eis inkubiert, Sonifizieren für 1-2 min mit 50 % Amplitude, 0,4 Intervall, Inkubation bei 60 °C für 10 min) I=vor Induktion; L=Lysat; P=Pellet Nach Ultraschall; ZE=Zellextrakt; N=Niederschlag nach Hitzebehandlung; Ü=Überstand nach Hitzebehandlung

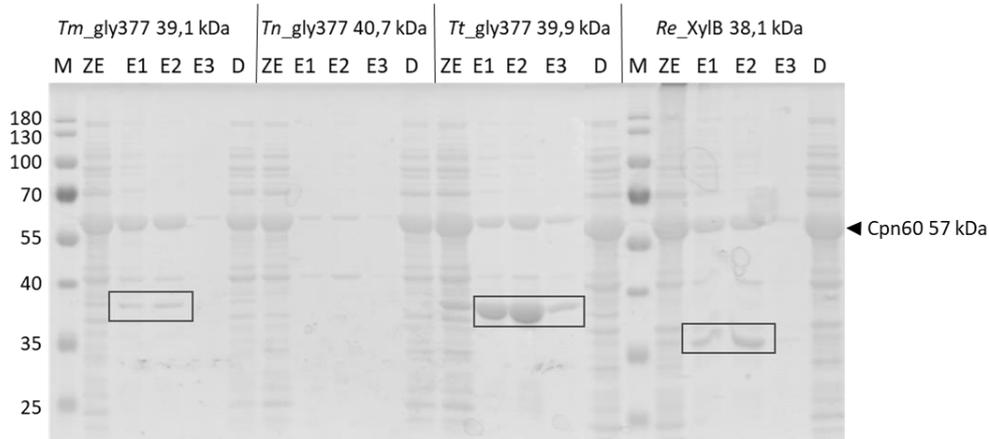


Abbildung 7.2.5 SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von *Tm_Gly*, *Tn_Gly*, *Tt_Gly* und *Re_XylB* aus *E. coli Arctic Express*. Pellets aus 200 ml Kulturen wurden in 10 ml Wasch-Lyse Puffer ohne Imidazol resuspendiert. Affinitäts-Reinigung erfolgte über Ni²⁺ TED Säulen. ZE = Zellextrakt; E1-3: Eluat 1-3 (je 1 ml); D = Durchfluss

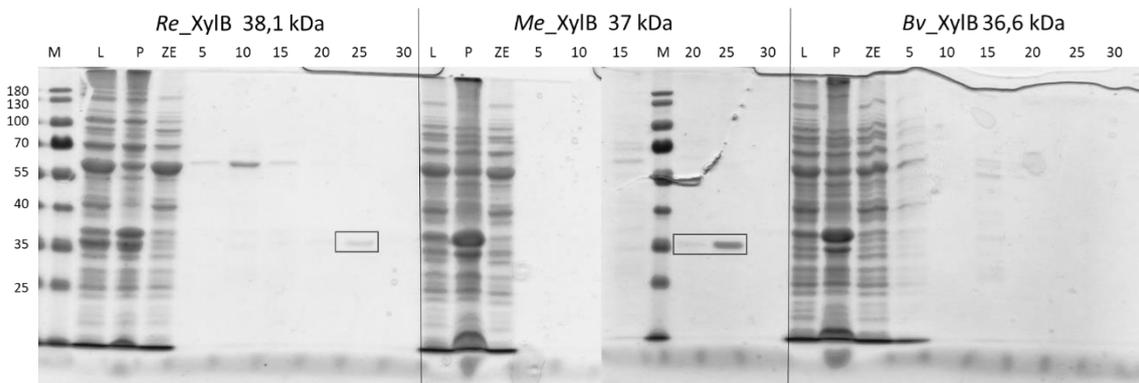


Abbildung 7.2.6 SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von *Re_XylB*, *Me_XylB*, *Bv_XylB* aus *E. coli Arctic Express*. Pellets aus 200 ml Kulturen wurden in 10 ml Wasch-Lyse-Puffer mit **20 mM Imidazol** resuspendiert. Affinitäts-Reinigung erfolgte über 5 ml His-Trap FF Säulen. L = Lysat; P = Pellet; ZE = Zellextrakt; 5-30: Fraktionen 3-30 (je 2 ml Fraktionen)

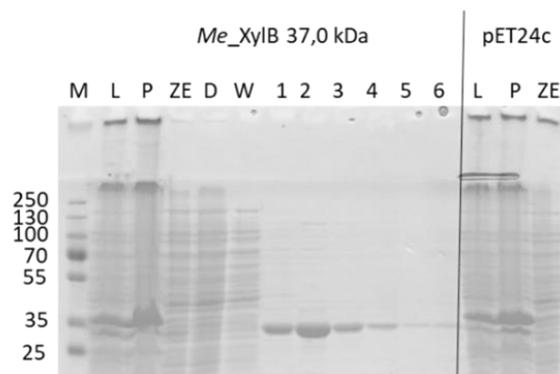


Abbildung 7.2.7 SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von *Me_XylB* aus *E. coli BL21*. Pellets aus 200 ml Kulturen wurden in **10 ml 1x LEW** (Protino Ni-TED Kit) resuspendiert. Affinitäts-Reinigung erfolgte über Ni²⁺ TED Säulen. L = Lysat; P = Pellet; ZE = Zellextrakt; D = Durchfluss, W = Waschfraktion; 1-6: Elutionsfraktionen 1-6 (je 1,5 ml)

7.3 Ähnlichkeitsanalyse und Produktionsbedingungen der Proteine

Tabelle 7.2.1 Ähnlichkeitsanalyse aller ausgewählter Proteine mittels BLASTp. QC = query coverage in %, ID = identity in %

			QC	ID														
<i>Ts_Ram106B</i>	AGC67072.1		100	100	95	28,5	95	29,4	98	27,9	64	22,0	93	25,2				
<i>Tm_Ram106B</i>	AGL50002.1		95	28,5	100	100	99	79,1	99	60,1	88	22,6	54	30,1				
<i>Tn_Ram106B</i>	QPI34914.1		95	29,4	99	79,1	100	100	99	60,6	89	23,9	57	30,6				
<i>Cb_Ram106B</i>	ACM161646.1		98	27,9	99	60,1	98	60,6	100	100	88	23,4	68	27,1				
<i>Cb_GH106_8445</i>	ACM61171.1		54	22,0	73	22,6	74	24,0	74	23,4	100	100	66	24,5				
<i>Cb_GH106_8430</i>	ACM61153.1		90	25,2	57	30,1	62	30,6	67	27,1	78	24,5	100	100				
<i>Cs_Gaf159A</i>	ABP66075.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100	90,7
<i>Ch_Gaf159A</i>	ADQ06027.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	90,7	100	100
<i>Ck_Gaf159A</i>	ADQ45201.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	92,3	100	93,9
<i>Ts_Axh43A</i>	AGC67716.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100		
<i>Tm_Gly</i>	AGL49708.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	95	87,1
<i>Tn_Gly</i>	ACM23973.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	87,1	100	100
<i>Tt_Gly</i>	AAS80484.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	40,5	93	38,2
<i>Re_Xyl</i>	ABC91511.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	95	75,8
<i>Me_Xyl</i>	WP_056500757.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91	75,8	100	100
<i>Bv_Xyl</i>	RXH01209.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	69,1	95	73,6

Anhang

Tabelle 7.3.2 Bedingungen zur Produktion, zum Zellaufschluss und Reinigung von löslichen Proteinen. Vergleiche Abbildung 7.2.4, Abbildung 7.2.5, Abbildung 7.2.2, Abbildung 7.2.7 und Abbildung 7.2.6

Bedingungen zur Proteinproduktion und Zellaufschluss (Säule für Proteinreinigung)					
		BL21, 200 ml Kultur, 20 mM Imidazol (HisTrap FF)	BL21, 200 ml Kultur, 0 mM Imidazol (Ni-TED)	Arctic Express, 20 ml Kultur, 0 mM Imidazol (keine mM Imidazol, (Ni- TED)	Arctic Express, 200 ml Kultur, 0 mM Imidazol (HisTrap FF)
<i>Tm_Gly</i>	löslich = L	++		+	+ (zus.)
	im Pellet = P	+		+	/
<i>Tn_Gly</i>	L	+		-	-
	P	+		-	/
<i>Tt_Gly</i>	L	+++		+	+++ (zus.)
	P	+		+	/
<i>Re_XylB</i>	L	-		+	++
	P	+++		++	/
<i>Me_XylB</i>	L		+++		++
	P		+		++
<i>Bv_XylB</i>	L	-			-
	P	++			++
<i>Tm_Ram106B</i>	L	++ (zus. spez)			
<i>Tn_Ram106B</i>	L	++ (zus. spez)			
<i>Ts_Ram106B</i>	L	++ (zus. spez)			
<i>Cst_c20590/B142</i>	L	++ (zus. spez)			
<i>ArfD (Cst_c23150)</i>	L	++ (zus. spez)			
<i>Cb_Ram106B</i>	L	++ (zus. spez)			
<i>Athe_2094/8445</i>					
<i>Athe_2076/8430</i>					
<i>Cs_Gaf159A</i>	L	+++			
<i>Ch_Gaf159A</i>	L	+++			
<i>Ch_Gaf159A_D19A</i>	L	+++			
<i>Ch_Gaf159A_D142A</i>	L	+++			
<i>Ch_Gaf159A_E190A</i>	L	+++			
<i>Ch_Gaf159A_E190A</i>	L	+++ (+10 % Glyc.)			
<i>Ch_Gaf159A_H244N</i>	L	+++ (+10 % Glyc.)			
<i>Ck_Gaf159A</i>	L	+++			
<i>Ts_Axh43A</i>	L	++			
<i>c1</i>	L	++			
<i>c1link</i>	L	++			
<i>c1linkcbm</i>	L	++			
<i>c2</i>	L	++			
<i>c2link</i>	L	++			
<i>c2cbm</i>	L	++			
<i>c1linkc2</i>	L	++			

L = löslich im Überstand; P = im Pellet; - = nicht auf Coomassie gefärbtem SDS-PAGE-Gel sichtbar; + = auf Coomassie gefärbtem SDS-PAGE-Gel sichtbar; ++ = große Menge; +++ = sehr große Menge; (zus.) = es sind starke zusätzliche Banden auf dem Gel zu sehen; (zus. spez.) = es sind zusätzliche, und wahrscheinlich proteinspezifische, Banden auf dem Gel zu sehen; (+10 % Glyc.) = allen Puffern wurde 10 % Glycerin zugesetzt; / = nicht auf SDS-PAGE-Gel analysiert; <leer> = nicht durchgeführt

7.4 Ergebnisse zu Rhamnosidasen

Tabelle 7.4.1 Information zu Proteinen für ein Promal3DS Alignment für die Erstellung eines ML phylogenetischen Baumes in Abbildung 3.5.1.

Genbank/Uniprot Acc.	Name	Organismus	Referenz
AAV43293.1	RamA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	
CAB53341.1	RamA	<i>Thermoclostridium stercorarium</i> NCIB 11754	
CDF79921.1	BN863_22090	<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	
BAC68538.1 (PDB: 3w5n)	SaRha78A	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 = NBRC 14893	Fujimoto et al. 2013
AAO76120.1	BT1013	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	
AAO76108.1 (PDB: 3cih)	BT_1001	<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	
BAB62315.1 (PDB: 2okx)	RhaB	<i>Bacillus</i> sp. GL1	Cui et al. 2007
AEX05711.1 (PDB: 4xhc)	KoRha	<i>Klebsiella michiganensis</i> KCTC 1686	O'Neill et al. 2015
CCA90848.1	RHA-P	<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	
BAD12237.1	RhaM	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> FP2001 / JCM 10661	
CDF79916.1	BN863_22040	<i>F. agariphila</i> KMM 3901	
AAO76093.1 (PDB: 5mqm)	BT_0986	<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	Ndeh et al. 2017
AAO79250.1	BT_4145	<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	Luis et al. 2018
ACT02314.1	Pjdr2_3683	<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	Helbert et al. 2019
AGC69275.1	Ts_ArFD	<i>T. stercorarium</i> subsp. <i>stercorarium</i> DSM 8532	Bröker 2019, diese Arbeit
AGI40007.1 (AGC69032.1)	Cst_c20590	<i>T. stercorarium</i> subsp. <i>stercorarium</i> DSM 8532	diese Arbeit
ACM61171.1	„8445“	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	diese Arbeit
ACM61153.1	„8430“	<i>C. bescii</i> DSM 6725	diese Arbeit
WP_018627535.1	B160DRAFT_04058	<i>Niabella aurantiaca</i>	Helbert et al. 2019
AGC67072.1	Ts_Ram106B	<i>T. stercorarium</i> subsp. <i>stercorarium</i> DSM 8532	Bröker 2019, Baudrexel et al. 2019, diese Arbeit
ACM61646.1	Cb_Ram106B	<i>C. bescii</i> DSM 6725	Baudrexel et al. 2019, diese Arbeit
AGL50002.1	Tm_Ram106B	<i>T. maritima</i> MSB8	Baudrexel et al. 2019, diese Arbeit
QPI34914.1	Tn_Ram106B	<i>T. neapolitana</i> Z2706-MC24	Baudrexel et al. 2019, diese Arbeit
ACM23671.1	CTN_1495	<i>T. neapolitana</i> DSM 4359	
CAA72194.1	AmyA	<i>T. maritima</i> MSB8	
AGL49359.1 (PDB: 3jur)	ExoPG	<i>T. maritima</i> MSB8	
CAE02601.1 (Uniprot: Q70KH9, PDB: 3chi)	4-aminobenzoate N-oxygenase AurF	<i>Streptomyces thioluteus</i>	Choi et al. 2008

Basiert auf Tabelle S3 in Baudrexel et al. (2019)

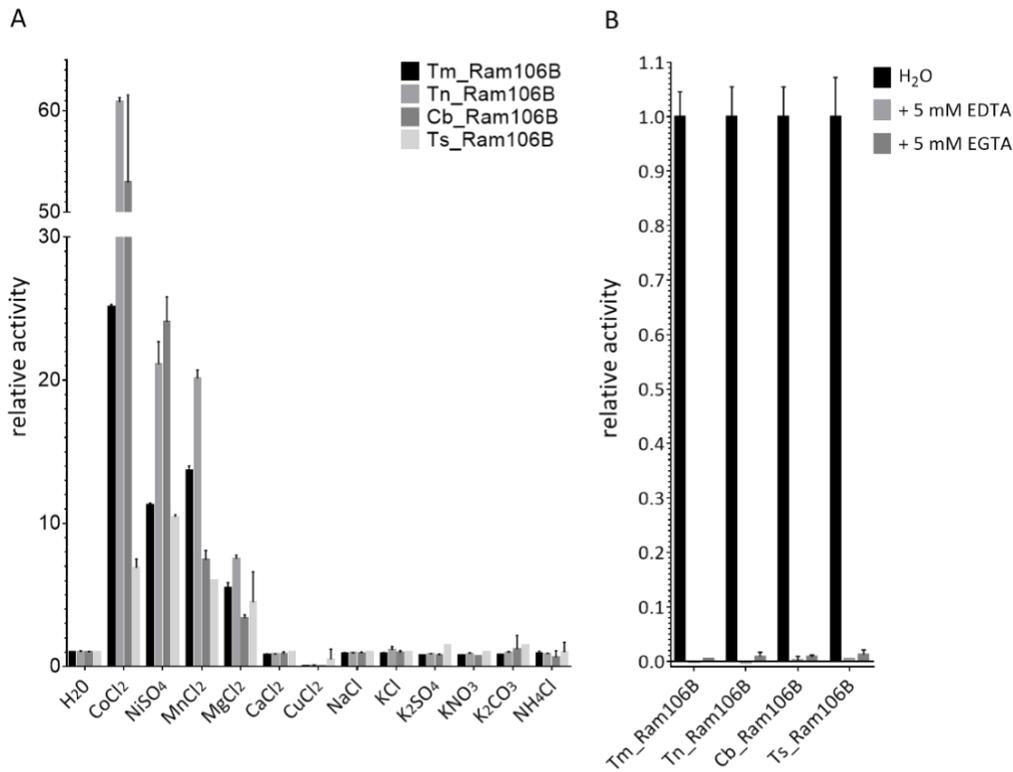


Abbildung 7.4.1 Einfluss von Salzlösungen (A) und Ionenchelatoren (B) auf die pNP-α-L-Rhamnosidase Aktivität von *Tm_Ram106B*, *Tn_Ram106B*, *Cb_Ram106B* und *Ts_Ram106B*. A ist aus Baudrexel et al. (2019) (Figure 2)

Tabelle 7.4.2 Änderung der Aktivität von *Tn_Ram106B* durch Zugabe von Salzlösungen.

	20 mM	10 mM	5 mM	2,5 mM	1,3 mM	100 μM	10 μM	1 μM	0,1 μM
CoCl ₂	76,47	88,39	101,60	92,29	98,44	64,20	33,00	3,96	1,80
MnCl ₂	47,32	48,56	34,20	40,29	34,00	12,76	2,80	1,69	1,35
NiSO ₄	20,63	28,83	34,13	34,59	37,94	26,00	19,68	3,35	1,50
MgCl ₂	7,00	7,56	7,40	6,59	6,31	3,20	1,28	1,19	1,20
K ₂ CO ₃	2,84	2,28	1,67	1,35	1,25	1,08	0,96	1,04	1,15
-	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Standardreaktionen mit 1 mM pNPR, 5 μg/ml (0,05 μM) *Tn_Ram106B* wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Salzlösungen supplementiert und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Enzym um den Einfluss der Salze in der Lösung auf die A405 nm- Werte zu berücksichtigen. Die Änderungen der Aktivität sind als Vielfache der Aktivität ohne zusätzliche Ionen angegeben.

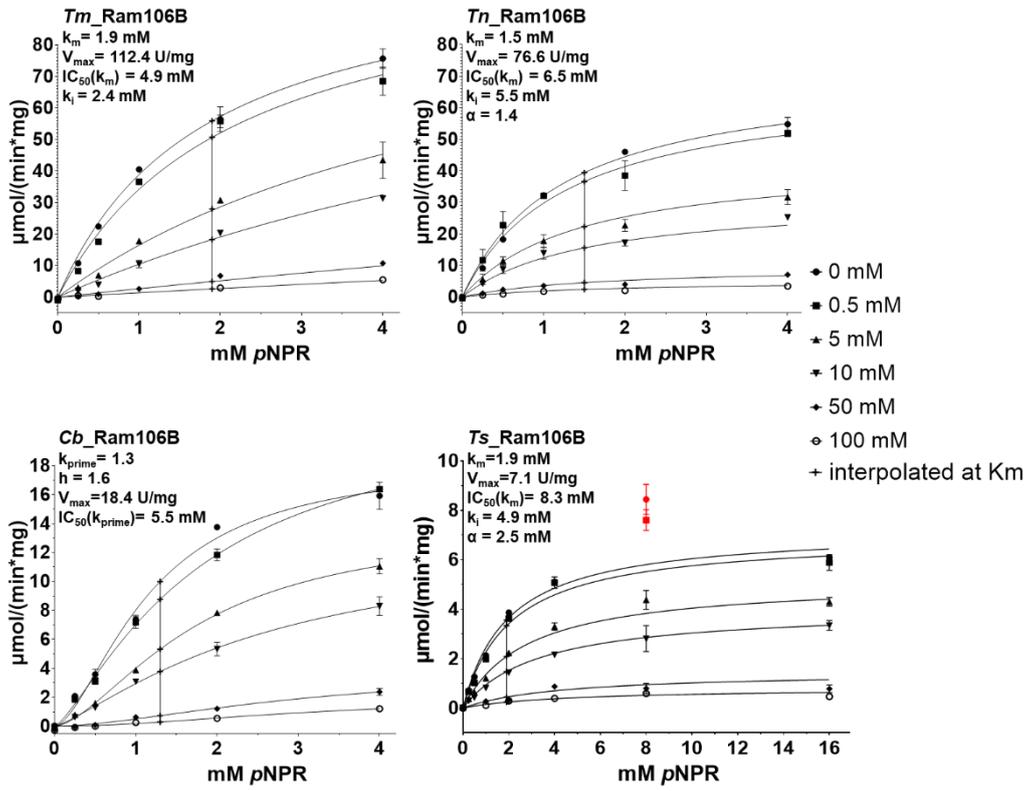


Abbildung 7.4.2 Graphen zur Bestimmung der Inhibitionskinetiken der Rhamnosidasen *Tm*_Ram106B, *Tn*_Ram106B, *Cb*_Ram106B und *Ts*_Ram106B mit Rhamnose. Aus Supplementary Material von Baudrexl et al. (2019)

7.5 Ergebnisse zu Galaktofuranosidasen und die Charakterisierung ihrer Arabinosidase Aktivität

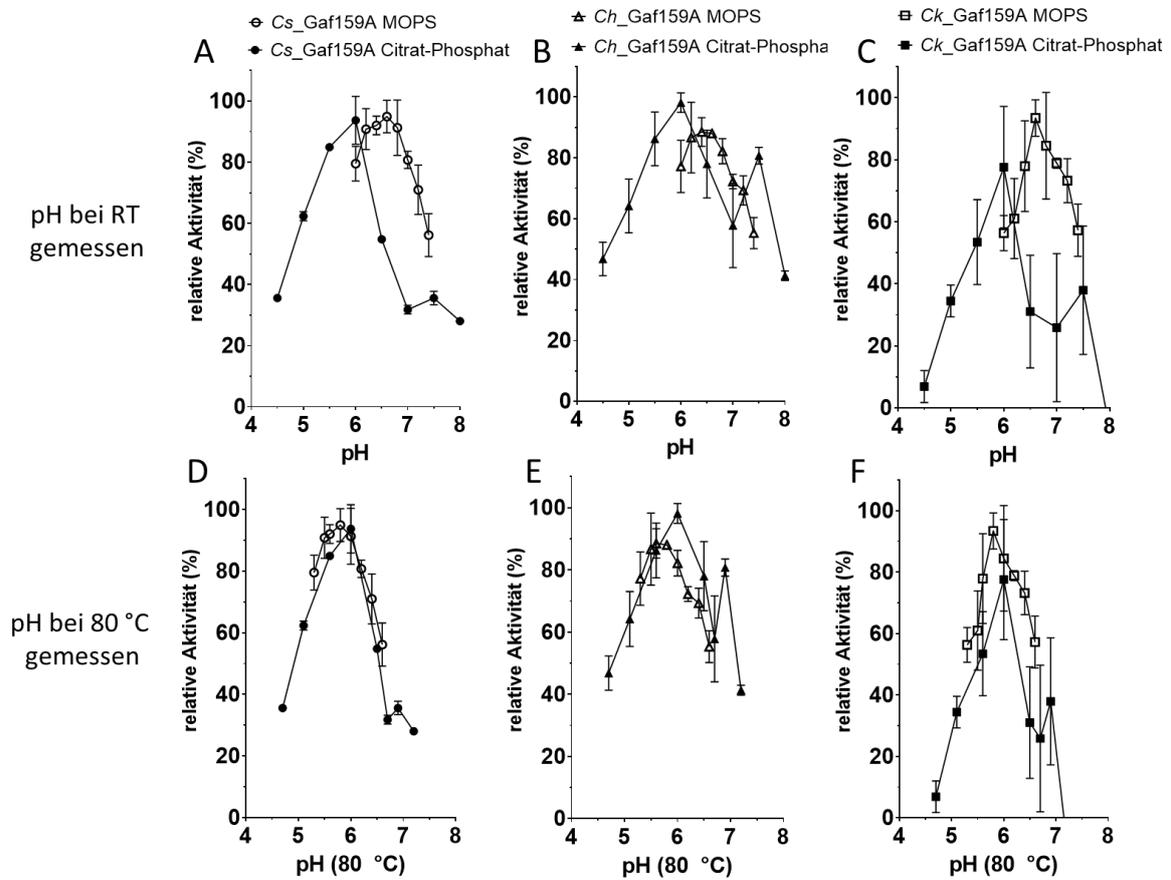


Abbildung 7.5.1 Einfluss des pH-Wertes auf die pNPAase-Aktivität von *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A*. **(A)** *Cs_Gaf159A*, bei 90 °C; **(B)** *Ch_Gaf159A* bei 82 °C; **(C)** *Ck_Gaf159A* bei 93 °C. Reaktionen mit 0,1 µg/µl Enzym, 1x RP, 1 mM CaCl₂, 1 mM pNPA wurden für 20 min bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Die pH-Werte wurden sowohl bei 20 °C (**A-C**), als auch bei 80 °C (**D-F**) gemessen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen von Triplikaten. **D**, **E** und **F** stellen Figure 5 in Baudrexl et al. (2022) dar.

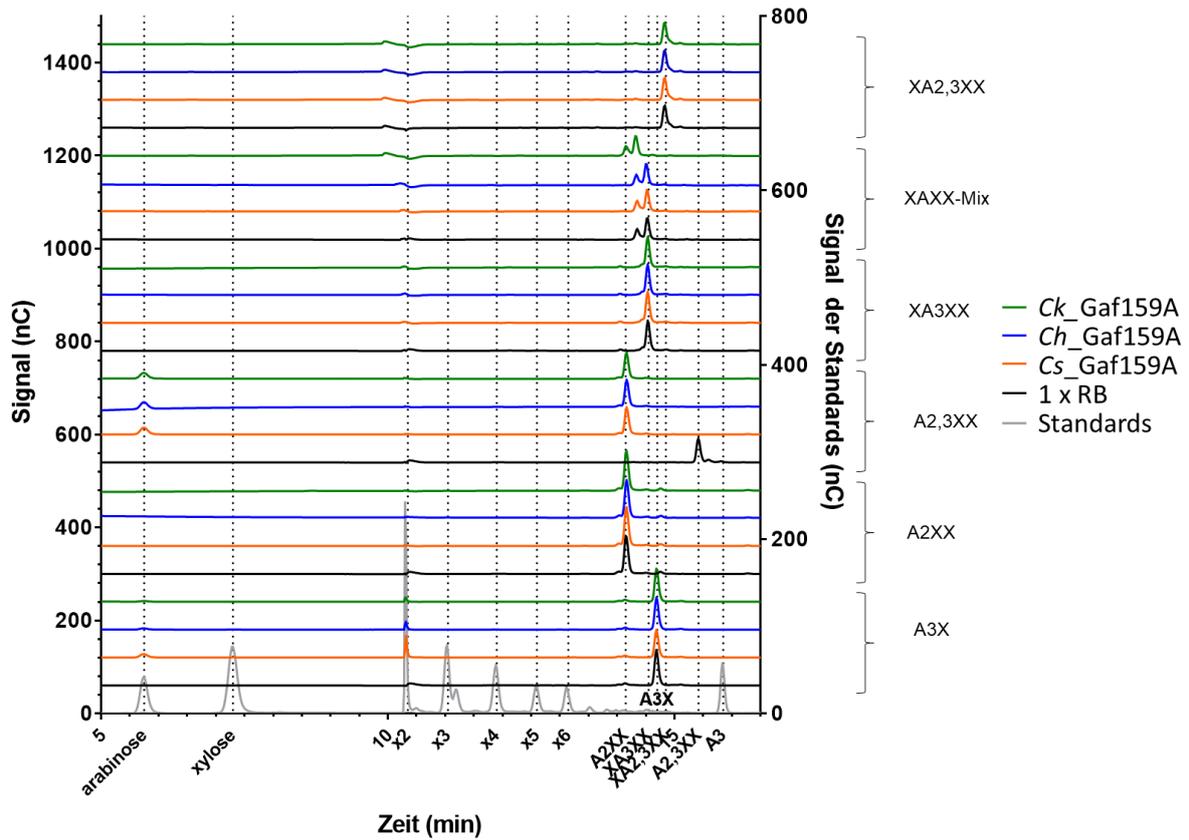


Abbildung 7.5.2 HPAEC-PAD Chromatogramme von AXOS Verdaus mit *Cs_Gaf159A*, *Ch_Gaf159A* und *Ck_Gaf159A*. Reaktionen mit 0,1 µg/µl Enzym, 0,01 % AXOS, 1 x RP, zusätzlich 1 mM CaCl₂ wurden für 24 h bei 75 °C inkubiert. Mittels Gradienten 2 (Tabelle 2.5.5) wurden die Saccharide voneinander getrennt. Diese Abbildung entspricht supplementary Figure S 6 in Baudrexel et al. (2022)

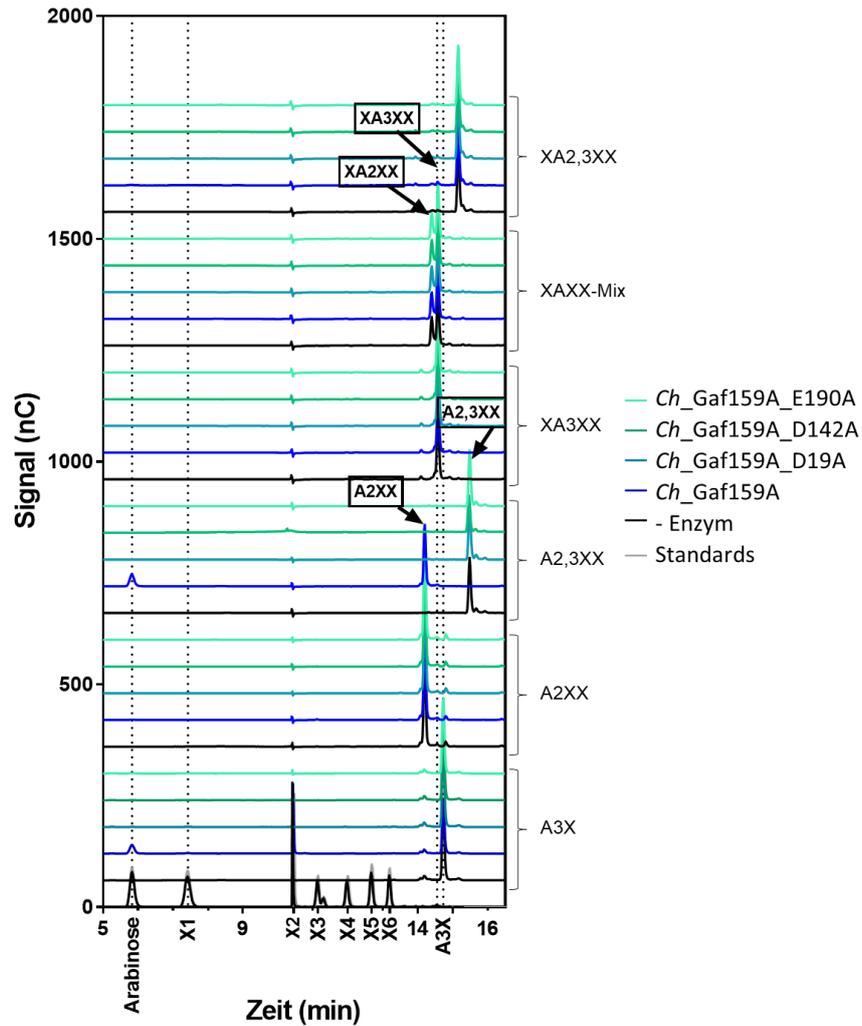


Abbildung 7.5.3 HPAEC-PAD Chromatogramme von AXOS Verdaus mit *Ch_Gaf159A* und dessen Mutanten. Reaktionen mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym, 0,01 % AXOS, 1 x RP, zusätzlich 1 mM CaCl_2 wurden für 24 h bei 75 °C inkubiert. Mittels Gradienten 2 (Tabelle 2.5.5) wurden die Saccharide voneinander getrennt. Diese Abbildung entspricht der supplementary Figure S 8 in Baudrexl et al. (2022)

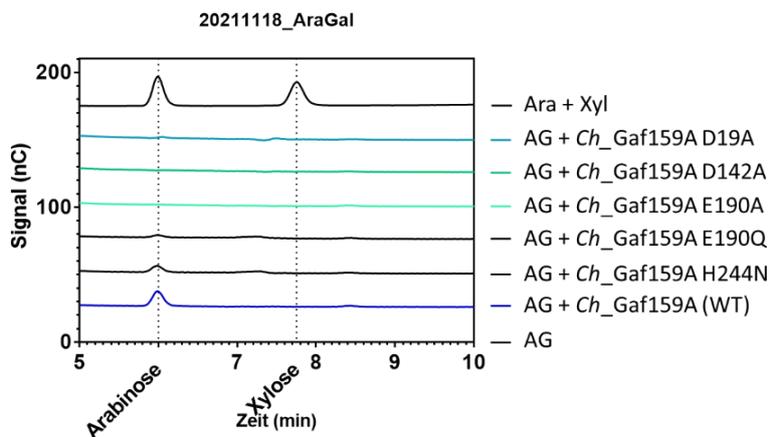
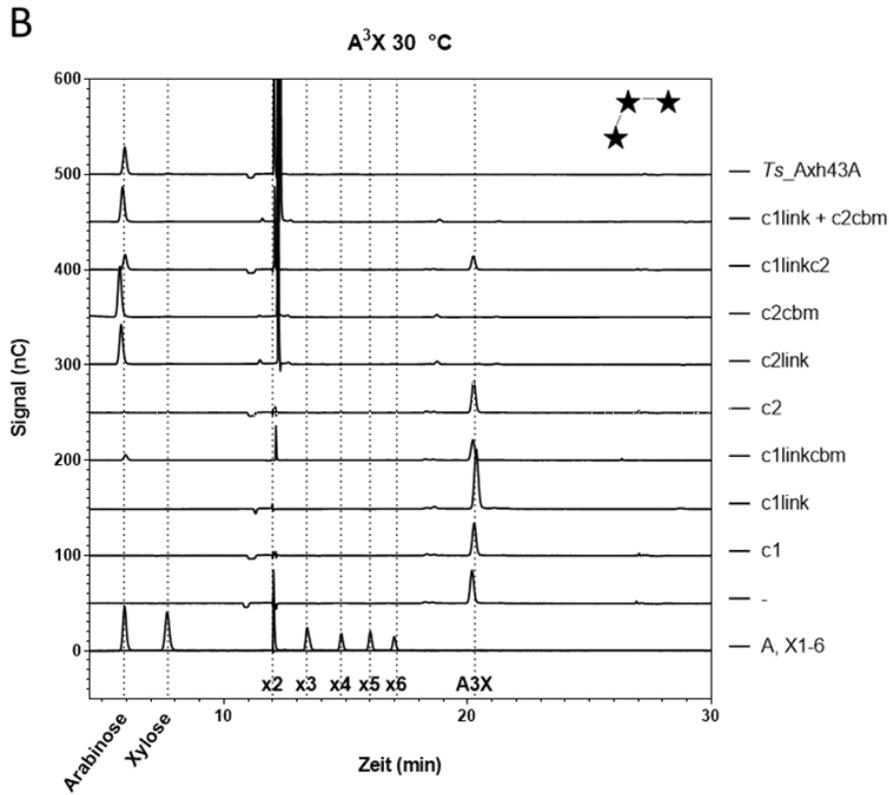
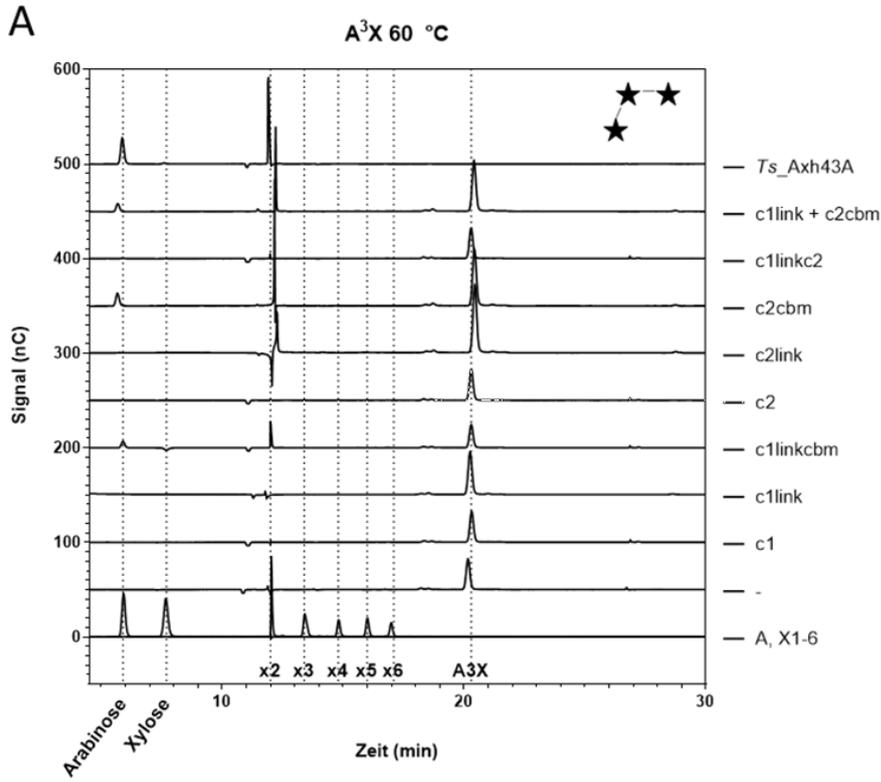


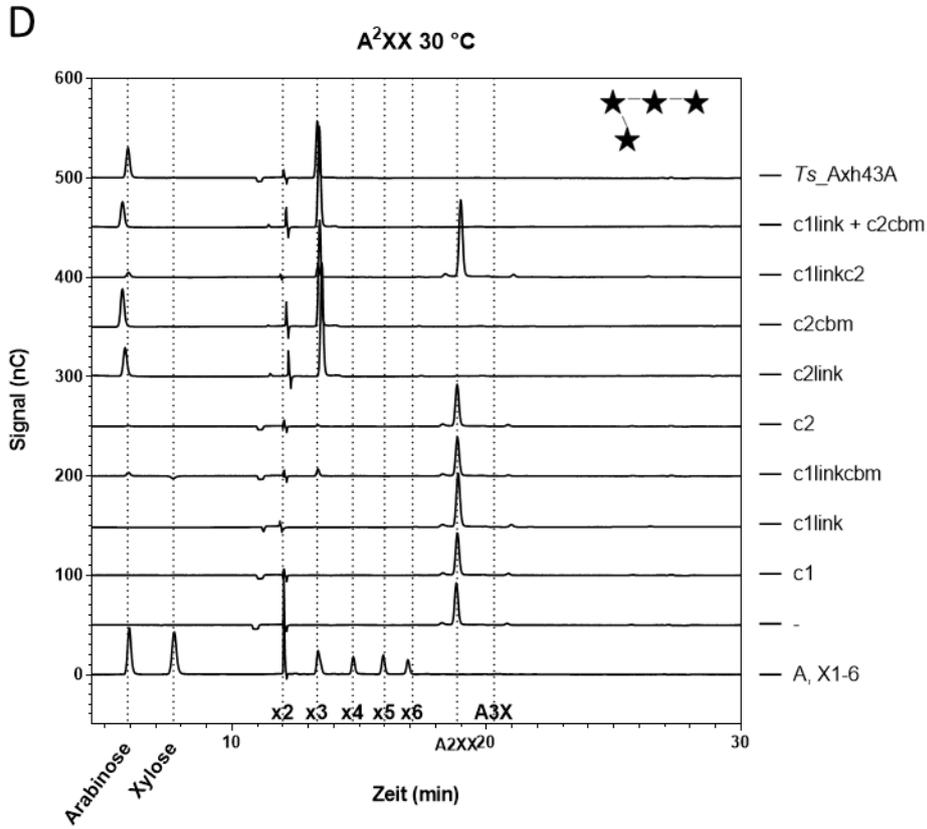
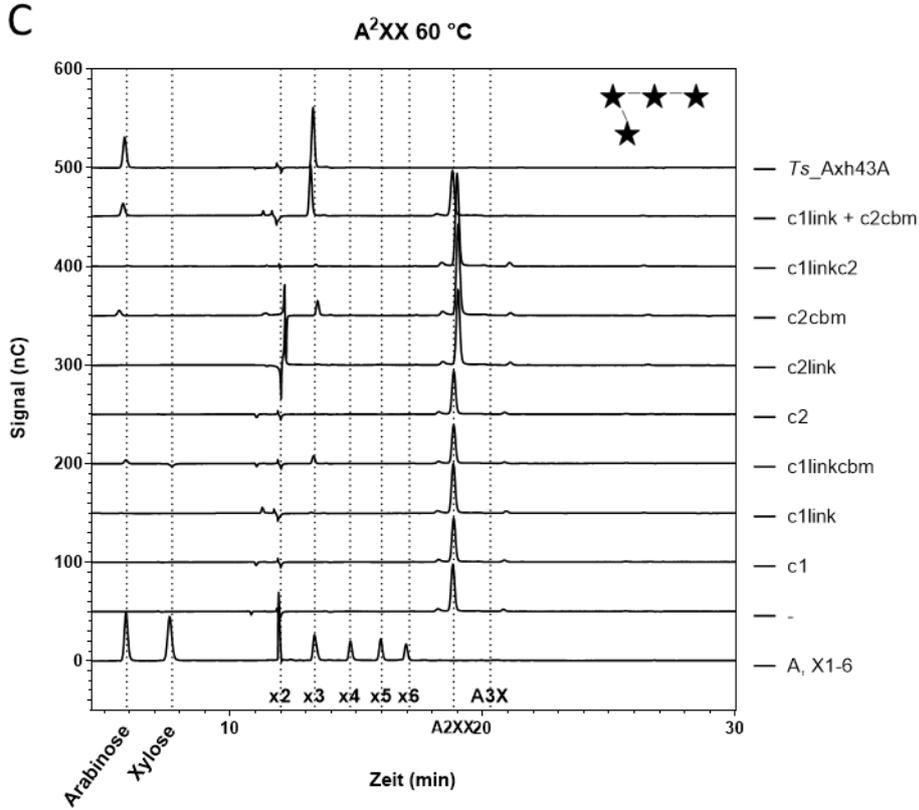
Abbildung 7.5.4 HPAEC-PAD Chromatogramme von Arabinogalaktan Verdaus mit *Ch_Gaf159A* und dessen Mutanten. Reaktionen mit 5 g/l Arabinogalaktan, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym und 1x RP wurden 23 h bei 80 °C inkubiert und mittels Gradient 4 (Tabelle 2.5.5) getrennt. Je 12,5 mg/l der Zucker Arabinose und Xylose dienen als externer Standard.

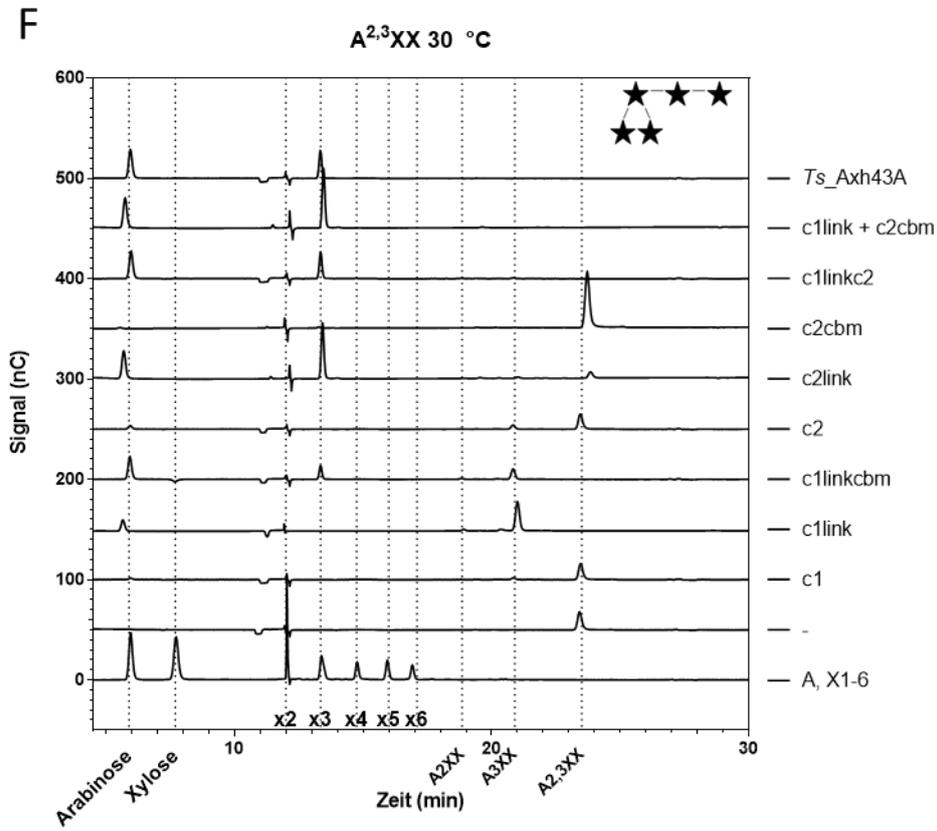
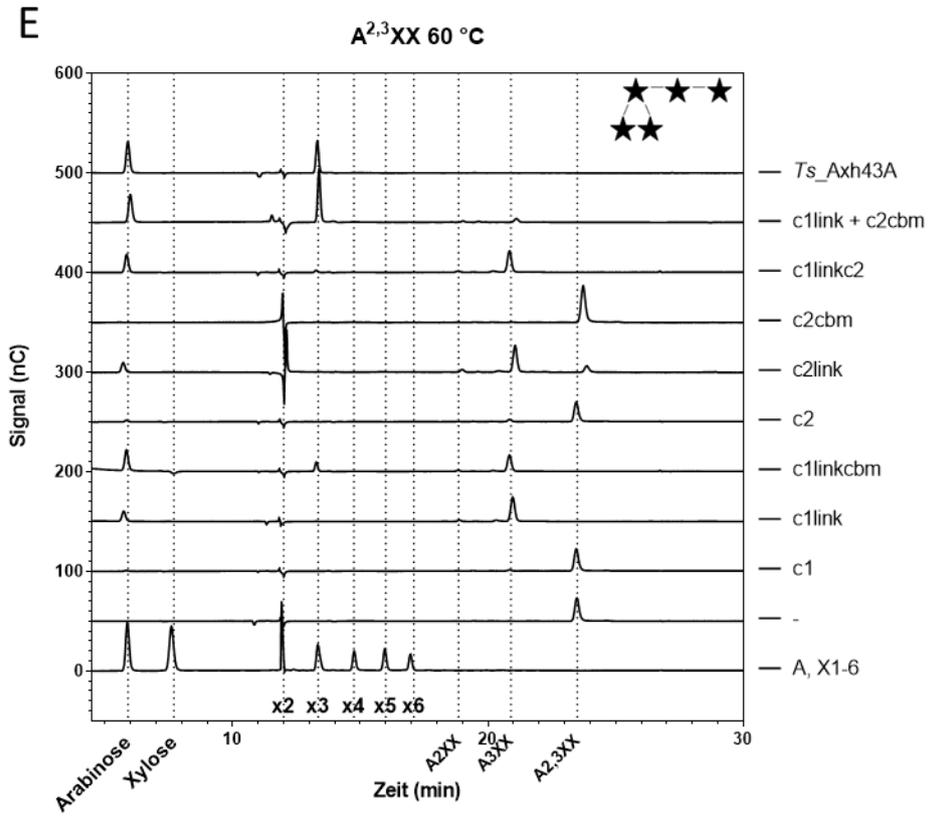
7.6 Ergebnisse zu *Ts_Axh43A*Tabelle 7.6.1 Einzelwerte der Replikate vom AX Abbau durch *Ts_Axh43A*, Modulen und Kombinationen.

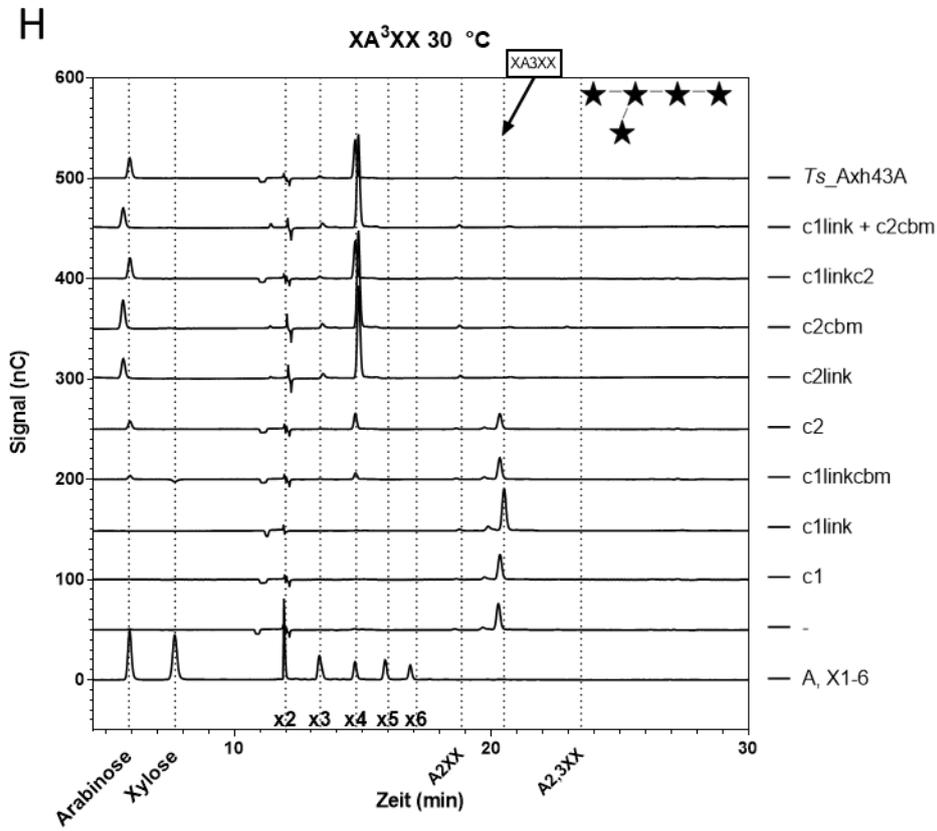
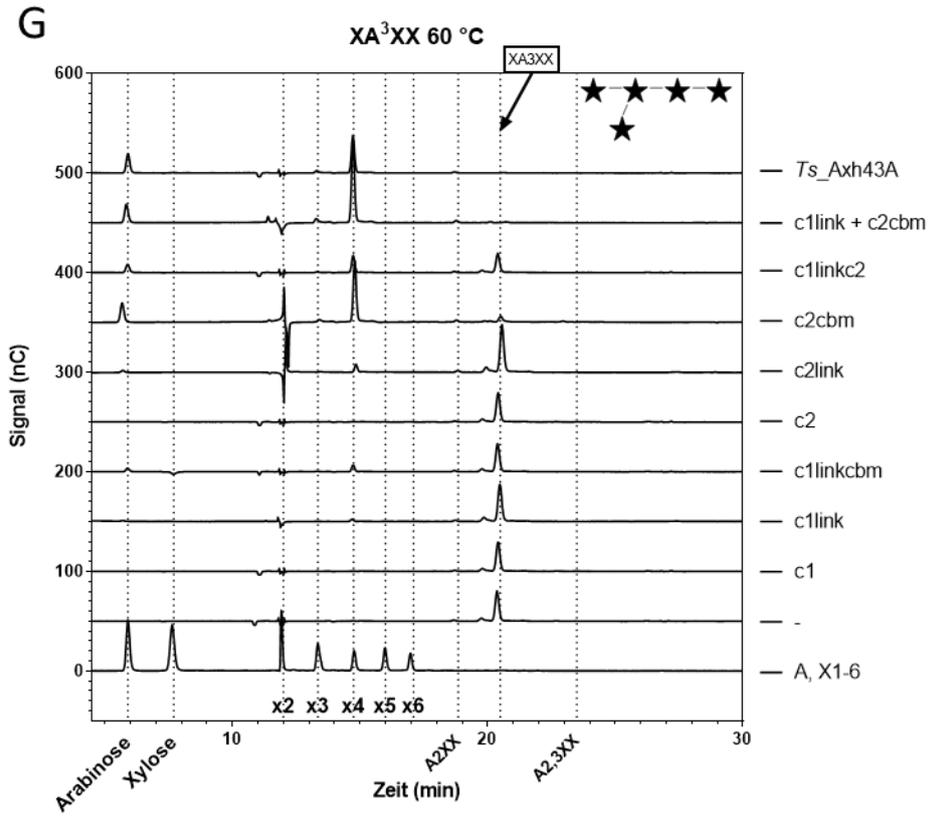
Durch HPAEC-PAD ermittelte Arabinosekonzentration (mg/l) nach Abbau von 5 g/l AX 60 °C											
1. Replik	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	MW	Anzahl Werte (n)	St. Abw.	
c1	0,01	0,00						0,00	2	0,0	
c1link	351,09	381,17						366,13	2	21,3	
c1linkcbm	235,20	421,50	462,66					373,12	3	121,2	
c2	2,23	0,00						1,11	2	1,6	
c2link	404,26	260,32	364,57					343,05	3	74,3	
c2cbm	24,07	191,16	570,39					261,87	3	279,9	
c1linkc2	254,19	407,31	342,83	421,17				356,37	4	76,2	
c1linkcbm + c1linkc2	468,98	510,37	338,92	439,44				439,43	4	73,0	
c1link + c2link	354,40	586,69	375,36					438,81	3	128,5	
c1linkcbm + c2link	406,87	556,94	420,97					461,59	3	82,9	
c2link + c2cbm	681,06	904,06						792,56	2	157,7	
c1linkcbm + c2cbm	867,48	922,77	1063,37					951,20	3	101,0	
c1linkc2 + c2cbm	968,03	931,71	1029,30					976,35	3	49,3	
c1link + c2cbm	753,13	929,65	984,05					888,94	3	120,7	
<i>Ts_Axh43A</i>	945,41	1110,47	1100,45	1222,90	979,68	1154,74	971,60	1156,47	1080,21	8	102,2
30 °C											
c1	0,00	0,00						0,00	2	0,0	
c1link	378,33	341,13						359,73	2	26,3	
c1linkcbm	392,25	417,24						404,74	2	17,7	
c2	0,00	0,00						0,00	2	0,0	
c2link	626,41	544,42	667,75					612,86	3	62,8	
c2cbm	266,05	428,52	496,03					396,87	3	118,2	
c1linkc2	405,80	444,74	593,07					481,20	3	98,8	
c1linkcbm + c1linkc2	497,13	551,87	460,65	713,64				555,82	4	111,7	
c1link + c2link	463,54	802,46	783,54					683,18	3	190,4	
c1linkcbm + c2link	433,54	819,71	815,26					689,51	3	221,7	
c2link + c2cbm	554,87	680,93						617,90	2	89,1	
c1linkcbm + c2cbm	847,14	1059,94	963,65					956,91	3	106,6	
c1linkc2 + c2cbm	790,06	1055,47	930,36					925,30	3	132,8	
c1link + c2cbm	837,50	893,04	876,20					868,91	3	28,5	
<i>Ts_Axh43A</i>	972,29	1024,10	1181,16	848,42	1011,88	980,24		1003,01	6	107,3	

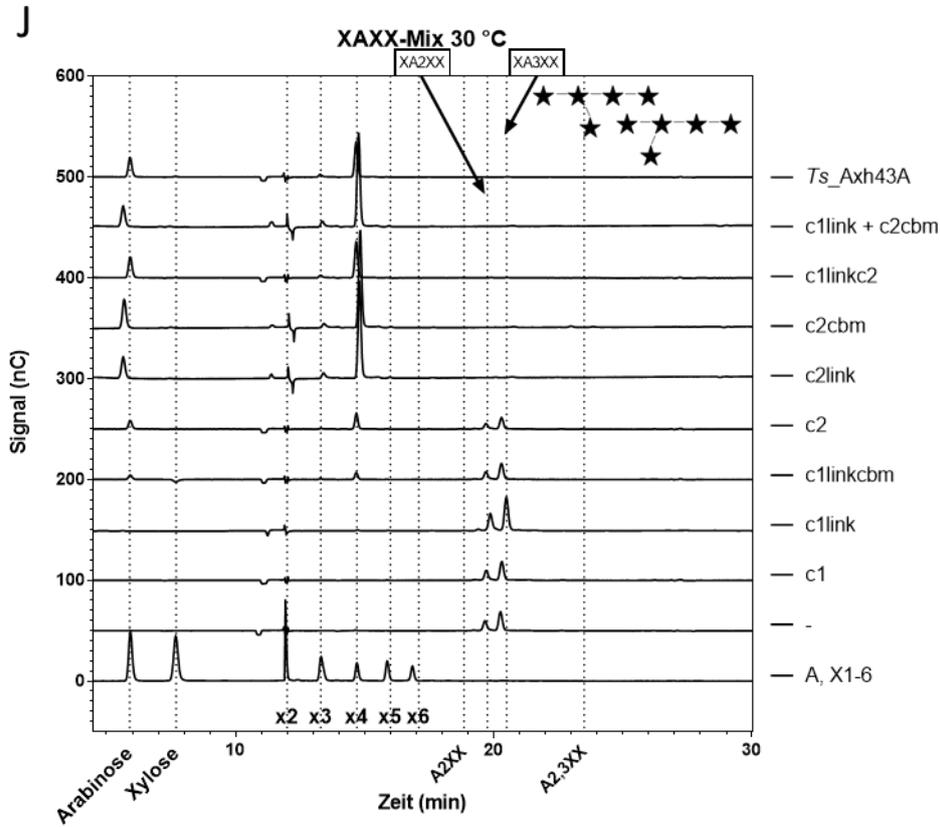
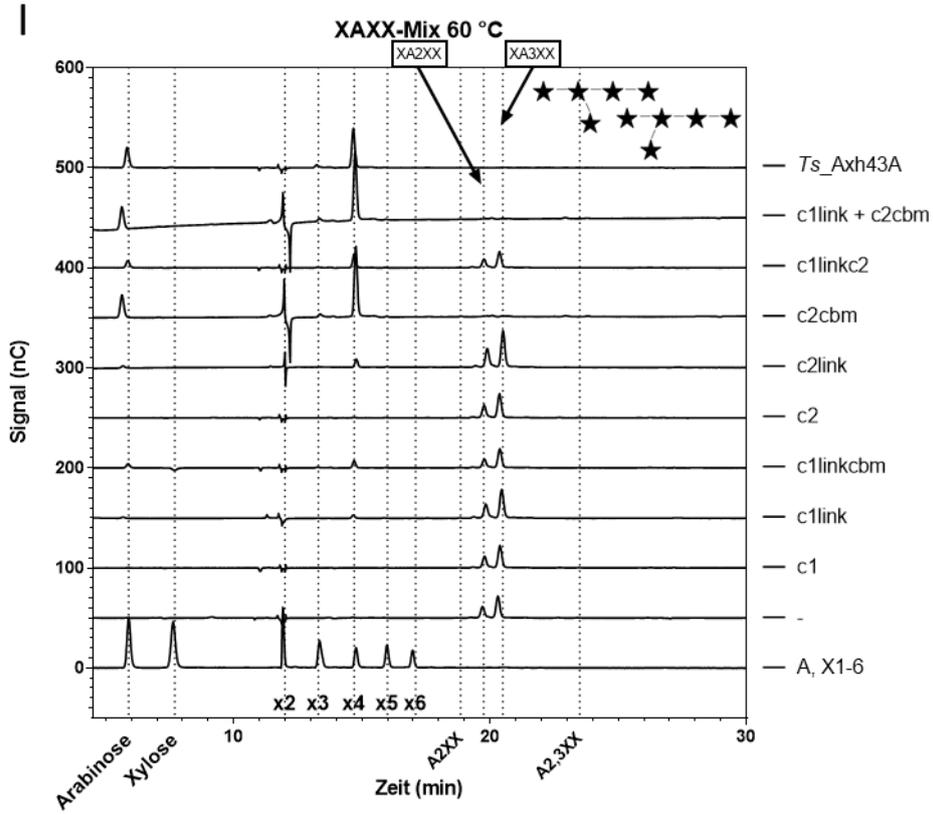
Reaktionen enthielten 5 g/l AX, 1x RP und die angegebene Konzentration an Enzym(en): 1,6 µM c1, 0,8 µM c1link, 1,3 µM c1linkcbm, 2,8 µM c2, 0,6 µM c2link, 1,8 µM c2cbm, 0,8 µM c1linkc2, 0,3 µM *Ts_Axh43A*. Sie wurden ÜN bei 30 °C, oder 60 °C inkubiert und anschließend mittels HPAEC-PAD unter Verwendung des Gradienten 2 (Tabelle 2.5.5) analysiert.











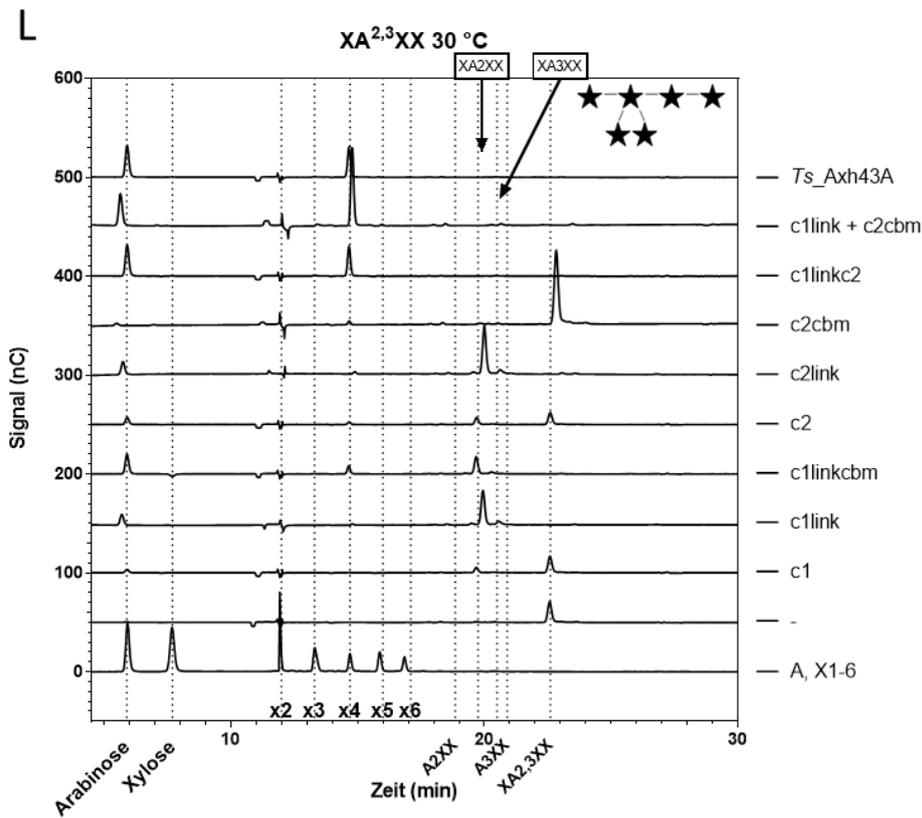
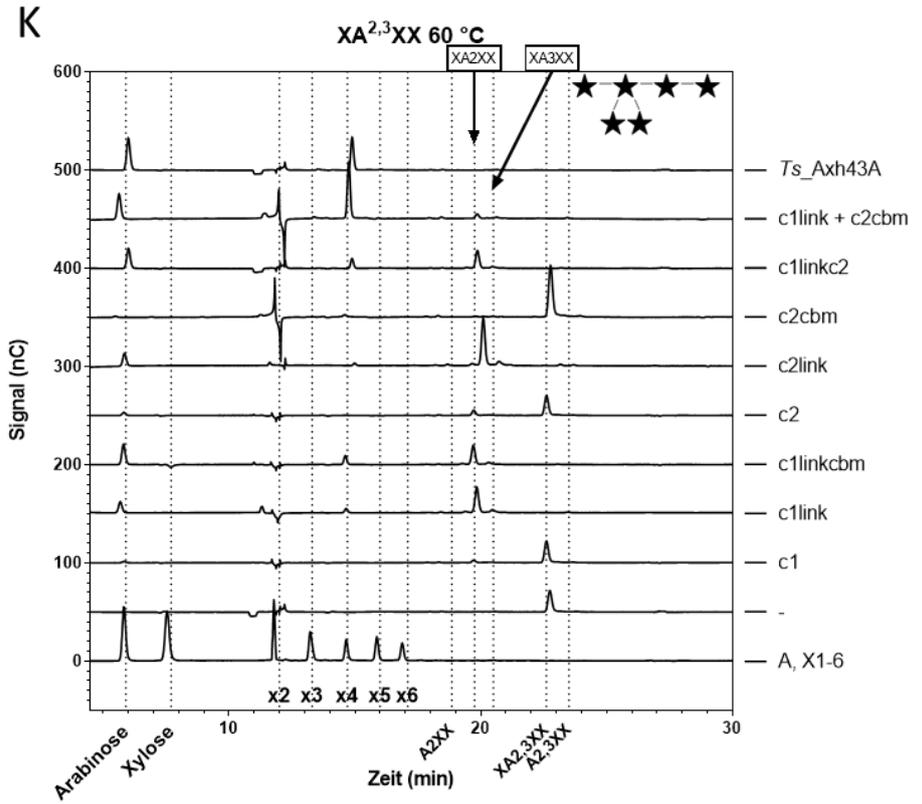


Abbildung 7.6.1 HPAEC-PAD Chromatogramme vom AXOS Abbau durch *Ts_Axh43A* Module bei 30 °C oder 60 °C. Reaktionen mit je 0,1 % AXOS, 0,5 µM jedes Proteins und 1x RP wurden für 20 h entweder bei 30 °C, oder 60 °C inkubiert und mittels Gradient 4 (Tabelle 2.5.5) aufgetrennt. Die Datenpunkte wurden um den Wasser-Blank und den Enzymhintergrund korrigiert. A., B. A³X; C., D. A²XX; E., F. A^{2,3}XX; G., H. XA³XX; I., J. XAXX-Mix; K., L. XA^{2,3}X

IX. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig erstellt habe und nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 der Promotionsordnung angebotenen Hilfsmittel benutzt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel verwendet. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

X. Danksagung

An erster Stelle möchte ich gerne Professor Dr. Wolfgang Liebl danken, der mir die Arbeit mit den Glykosidasen an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat und als Betreuer immer mit Rat und Tat zur Verfügung stand. Ich weiß sehr zu schätzen, dass Sie unsere Anliegen immer priorisiert haben.

Dr. Vladimir Zverlov gebührt der größte Dank, auch wenn er ihn leider nicht mehr entgegennehmen kann, danke für die direkte Betreuung und für die großartige Zeit in deiner Arbeitsgruppe, die Unterstützung, dein Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Motivation. Du hast mich als Wissenschaftler und Mensch nachhaltig geprägt und ich werde dich und deine Arbeit in Ehren halten.

Vor allem durch das Korrekturlesen hat mir Dr. Wolfgang Schwarz enorm geholfen und mich unterstützt, weshalb ich ihm ganz besonders danken will. Herzlichsten Dank an dieser Stelle auch an Eva Bauersachs, Dr. Klaas Reglitz und Marius Firscher für die Zeit, die ihr in das Korrigieren dieser Arbeit investiert habt.

Bei Prof. Dr. Dieter Langosch und insbesondere Walter Stelzer will ich mich für die unkomplizierte Kommunikation und die Messung und Auswertung der CD-Spektren bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Prof. Dr. Michael Groll und Astrid König vom Lehrstuhl für Biochemie in Garching, die die Kristallisierung und Strukturaufklärung des ersten GH159-Enzyms übernommen und ermöglicht haben und einen sehr langen Weg mit mir gegangen sind.

Danke Konny und Sibylle, dass die Arbeit am Lehrstuhl so reibungslos verlaufen kann und die gemeinsamen Gespräche. Maria Übelacker und Patricia Krähe danke ich vor allem auch für alles, was sie mir beigebracht haben, für ihre Geduld bei Fragen, und ihren ansteckenden Fleiß.

Meine Kollegen und Freunde am Lehrstuhl werde ich nie vergessen und ich will mich recht herzlich für jegliche Unterstützung, ob durch Rat, oder Tat, vor allem noch bei meinem Mentor Angel, Regina, Nils, Björn, Waldemar, Georg, Martin, Holger und Sonja, und auch bei Martina, Yajing, Enzo, Matthias Mörch, Matthias Mechelke, Simon, Jannis, Antoni, Armin, Simone, Luis, Rui, Cecilia, Helga G., Helga M., Manuela, Luciana, Aline, Nataliia, Lisa und Verena bedanken. Allen danke ich für die gemeinsame Zeit am Lehrstuhl, interessante Gespräche, für die Rätsel in den Mittagspausen und den Zuspruch.

Meinen Studenten Lea, Ramona, Tarik, Martina, Lisa, Alex, Berkay, Ariel und Alina danke ich dafür, dass sie meine Arbeit mir ihrer Laborarbeit unterstützt, manche Launen ertragen und mich mit Kuchen versorgt haben.

Und zu guter Letzt danke ich von Herzen meiner ganzen Familie, die immer hinter mir steht, mich finanziell, emotional und ganzheitlich gesehen zu jeder Zeit unterstützt, und allen meinen lieben Freunden, die mit viel Liebe und Rückhalt immer für mich da sind. Ihr seid wundervoll.