

## Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone

Geraldine Kolter





Forschungszentrum Jülich GmbH  
Institut für Biotechnologie 2 (IBT-2)

# **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantio- komplementärer 2-Hydroxyketone**

Geraldine Kolter

Schriften des Forschungszentrums Jülich  
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 26

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-626-2

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der  
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten  
sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH  
Zentralbibliothek, Verlag  
D-52425 Jülich  
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103  
e-mail: [zb-publikation@fz-juelich.de](mailto:zb-publikation@fz-juelich.de)  
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2010

Schriften des Forschungszentrums Jülich  
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 26

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2010)

ISSN 1866-1785  
ISBN: 978-3-89336-626-2

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen, Darstellungen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Textstellen, die wortwörtlich oder sinngemäß anderen Werken oder sonstigen Quellen entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der jeweiligen Quelle, auch der Sekundärliteratur, als Entlehnung gekennzeichnet.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass die Dissertation in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

---

(Datum, Unterschrift)

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des  
Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des  
Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.*

Sir Isaac Newton

*Meiner Familie*

## WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DIESER PROMOTION

### Artikel in Fachjournalen

Gocke, D., Walter, L., Gauchenova, E., Kolter, G., Knoll, M., Berthold, C.L., Schneider, G., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2008). Rational protein design of ThDP-dependent enzymes: engineering stereoselectivity. *ChemBioChem* 9:406-412.

Gocke, D., Kolter, G., Müller, M., Pohl, M. (2010). Entwicklung einer Enzym-Plattform für die biokatalytische C-C Verknüpfung. *Chem. Ing. Tech.* 1-2:81-86.

### Eingereichte Artikel

Gocke, D. \*, Kolter, G. \*, Gerhards, T., Berthold-Siöberg, C.L., Gauchenova, E., Knoll, M., Pleiss, J., Müller, M., Schneider, G., Pohl, M. (**in Arbeit**). (S)-selective mixed benzoin condensation by rational design of the pyruvate decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus*. (\* gleichwertiger Beitrag beider Autoren)

### Poster Präsentationen

Kolter, G., Gocke, D., Knoll, M., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2007). A new variant of the ThDP-dependent enzyme benzoylformate decarboxylase. 8<sup>th</sup> *International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Oviedo (Spain).

Kolter, G., Gocke, D., Knoll, M., Walter, L., Gauchenova, E., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2008). New variants of the ThDP-dependent enzyme Benzoylformate Decarboxylase of *Pseudomonas putida*. 7<sup>th</sup> *International Conference on Mechanisms and Physiology of Thiamine*, Lutherstadt Wittenberg.

Kolter, G., Gocke, D., Gauchenova, E., Walter, L., Bonina, F., Knoll, M., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2008). Variants of the ThDP-dependent pyruvate decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus*. 4<sup>th</sup> *International Congress on Biocatalysis*, Hamburg-Harburg.

Gocke, D., Kolter, G., Gauchenova, E., Knoll, M., Berthold Siöberg, C.L., Schneider, G., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2009). Designed enzymes for (S)-selective benzoin condensation. *DECHEMA presentation- and discussion-symposium on biocatalysis*, Bad Schandau.

1. Poster Award

## **PUBLIKATIONEN**

---

Kolter, G., Gocke, D., Gauchenova, E., Walter, L., Knoll, M., Müller, M., Pleiss, J., Pohl, M. (2009). Structure function relationship of thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes. *9<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Bern (Switzerland).

### **Vorträge (Koautor)**

Gocke, D., Kolter, G., Gauchenova, E., Knoll, M., Berthold Siöberg, C.L., Schneider, G., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2009). Rational design for (*S*)-selective mixed benzoin condensation. *9<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Bern (Switzerland).

Gocke, D., Kolter, G., Gauchenova, E., Knoll, M., Berthold Siöberg, C.L., Schneider, G., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M. (2009). Designed enzymes for (*S*)-selective benzoin condensation. *Chem. Ing. Tech.* **8**:1256. 27. *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*, Mannheim.

## DANKSAGUNG

Mein erster und ganz besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Martina Pohl für die interessante Themenstellung und das fortlaufende Interesse an der Ausführung dieser Promotion. Durch eine sehr engagierte und lehrreiche Betreuung, zahlreichen äußerst hilfreichen Anregungen und Diskussionen und zu guter Letzt durch ein immer offenes Ohr konnte diese Arbeit abgerundet werden. Ich wünsche ihr alles Gute und viel Erfolg mit ihrer neuen AG ‚Biokatalyse und Biosensoren‘ im Institut für Biotechnologie 2 (IBT2)!

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wiechert danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats, für das Interesse an dieser Arbeit und die Zeit die er sich genommen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken meine Promotionsarbeit im Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) anfertigen zu können. Zudem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des IMETs für das angenehme Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Michael Müller und allen Mitarbeitern aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Freiburg. Bei mehreren Forschungsaufenthalten in Freiburg wurde ich stets mit offenen Armen empfangen und in die Arbeitsgruppe eingebunden. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Lydia Walter, Herrn Fabrizio Bonina und Herrn Volker Brecht für die hervorragende Hilfe bezüglich der instrumentellen Analytik und der Durchführung zahlreicher Messungen bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Ekaterina Gauchenova und Frau Patrizia Lehwald, die mir ebenfalls zahlreiche Tipps gegeben haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Einen recht herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Pleiss und Herrn Dr. Michael Knoll vom Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart aussprechen. Mit Hilfe der computergestützten Struktur-Funktions-Analysen konnten Varianten geplant und strukturelle Einsichten in die aktiven Zentren der ThDP-abhängigen Enzyme gegeben werden.

Dem Graduiertenkolleg BioNoCo (GRK 1166) möchte ich für die vielen Möglichkeiten der Weiterbildung und der Teilnahme an internationalen Kongressen danken. Ich bedanke mich bei allen BioNoCo-Mitgliedern für die freundschaftliche Atmosphäre und den ein oder anderen lustigen Abend im Hotel zu alten Forsthaus!

## DANKSAGUNG

---

Vielen lieben Dank vor allem auch an alle Mitglieder der ehemaligen Arbeitsgruppe AG ‚Applied Enzyme Technology‘ im IMET. Bei Frau Dr. Dörte Gocke möchte ich mich für anregende Diskussionen und vor allem für das kritische Lesen dieser Arbeit bedanken! Auch ihr wünsche ich alles Gute und viel Erfolg für ihren weiteren Werdegang im IBT2! Für eine tatkräftige Unterstützung im Labor, ernste aber auch witzige Unterhaltungen und ein freundschaftliches Verhältnis danke ich Frau Katharina Range, Frau Dipl. Ing. Ilona Frindi-Wosch und Frau Sabine Kruschinski. An Frau Dipl. Biol. Melanie Schwarz: Wo geht es danach hin?

Bei Frau Dr. Jennifer Andexer und Herrn Dr. Benjamin Franken (ebenfalls IMET-Ehemalige) bedanke ich mich für ihre tolle Unterstützung im Labor.

Während meiner Zeit im IMET durfte ich mehrere Praktikanten betreuen, denen ich hiermit danken möchte. Allen voran bedanke ich mich bei Frau Dipl. Biol. Tina Gerhards, die nach dem Praktikum für ihre Diplomarbeit zurückgekommen ist. Danke für die tolle Zusammenarbeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich wünsche ihr viel Erfolg bei der Durchführung ihrer Promotion im IBT2! Weiter möchte ich mich bei Julia Blümer, Benita Kopka und Sarah Pflanz bedanken.

Meiner Mutter Dagmar Kolter möchte ich von ganzem Herzen für die immerwährende und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meinem Freund René Bergmann danke ich für seine Geduld, seine aufmunternden Worte und seine Liebe.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Freundschaft bedanken.

## INHALTSVERZEICHNIS

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Enzyme in der Biotechnologie.....</b>                              | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Der Weg der Biotechnologie – Damals bis Heute .....                   | 1         |
| 1.1.2      | Weißer Biotechnologie.....  | 2         |
| 1.1.3      | Feinchemikalien und Stereoselektivität .....                          | 3         |
| 1.1.4      | Enzymklassen .....  | 5         |
| <b>1.2</b> | <b>Das <i>Toolbox</i>-Konzept.....</b>                                | <b>6</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Bedeutung chiraler 2-Hydroxyketone in der Biotechnologie .....</b> | <b>8</b>  |
| <b>1.4</b> | <b>Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme .....</b>                       | <b>11</b> |
| 1.4.1      | Ein Überblick .....   | 11        |
| 1.4.2      | Der Cofaktor Thiamindiphosphat .....                                  | 12        |
| 1.4.3      | Struktur Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme.....                     | 14        |
| 1.4.4      | ThDP-Reaktionsmechanismus – Lyase- und Carboligaseaktivität .....     | 16        |
| 1.4.5      | Chemoselektivität.....  | 19        |
| 1.4.6      | Stereoselektivität.....   | 20        |
| 1.4.6.1    | Zugang zu ( <i>S</i> )-2-Hydroxyketonen.....                          | 22        |
| 1.4.6.2    | Donor-Bindestelle .....   | 26        |
| 1.4.6.3    | Akzeptor-Bindestelle.....   | 27        |
| <b>1.5</b> | <b>Spezielle Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme .....</b>             | <b>28</b> |
| 1.5.1      | Benzaldehydlyasen.....  | 28        |
| 1.5.2      | Benzoylformiatdecarboxylasen.....                                     | 31        |
| 1.5.3      | Pyruvatdecarboxylasen .....   | 33        |
| <b>2</b>   | <b>MOTIVATION UND ZIELSETZUNG .....</b>                               | <b>36</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                    | <b>38</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material .....</b>   | <b>38</b> |
| 3.1.1      | Chemikalien und Enzyme .....  | 38        |
| 3.1.2      | Geräte .....  | 39        |
| 3.1.3      | Computerprogramme und Datenbanken .....                               | 40        |
| 3.1.4      | Bakterienstämme .....   | 40        |
| 3.1.5      | Plasmide.....   | 41        |
| 3.1.6      | Oligodesoxyribonukleotide ( <i>Primer</i> ).....                      | 42        |
| <b>3.2</b> | <b>Kultivierung und Lagerung von Bakterienstämmen .....</b>           | <b>43</b> |
| 3.2.1      | Nährmedien.....   | 43        |
| 3.2.2      | Kultivierung von Flüssig- und Plattenkulturen .....                   | 43        |
| 3.2.3      | Kultivierung von Proteinexpressionskulturen .....                     | 43        |
| 3.2.4      | Hochzelldichte-Kultivierung.....                                      | 44        |
| 3.2.5      | Bestimmung der Zelldichte .....                                       | 45        |
| 3.2.6      | Lagerung von Bakterienstämmen.....                                    | 45        |
| <b>3.3</b> | <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>                            | <b>46</b> |
| 3.3.1      | Nukleinsäureisolierungen und –reinigungen.....                        | 46        |
| 3.3.1.1    | Präparation von Plasmid-DNA.....                                      | 46        |
| 3.3.1.2    | Präparation genomischer DNA .....                                     | 46        |
| 3.3.1.3    | Ethanol-fällung .....   | 46        |
| 3.3.1.4    | Elution von DNA aus Agarosegelen .....                                | 47        |
| 3.3.1.5    | PCR-Produktreinigung .....  | 47        |

## INHALTSVERZEICHNIS

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.3.2      | Nukleinsäuremodifikationen .....   | 47        |
| 3.3.2.1    | Restriktion .....  | 47        |
| 3.3.2.2    | Dephosphorylierung geschnittener Vektoren .....  | 47        |
| 3.3.2.3    | Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | 48        |
| 3.3.2.4    | Zielgerichtete Mutagenese .....  | 49        |
| 3.3.3      | Agarose-Gelelektrophorese.....   | 50        |
| 3.3.4      | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....   | 51        |
| 3.3.5      | Klonierung .....   | 51        |
| 3.3.5.1    | Ligation von DNA-Fragmenten .....  | 51        |
| 3.3.5.2    | Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....                           | 51        |
| 3.3.5.3    | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....                                      | 52        |
| 3.3.6      | Sequenzierung von DNA .....  | 52        |
| <b>3.4</b> | <b>Proteinchemische Methoden .....</b>   | <b>53</b> |
| 3.4.1      | Zellaufschluss mittels Sonifikation.....   | 53        |
| 3.4.2      | Quantitative Proteinbestimmung (nach Bradford) .....   | 53        |
| 3.4.3      | Aufkonzentrierung von Proteinlösungen (TCA-Fällung) .....                                    | 54        |
| 3.4.4      | Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....                                      | 55        |
| 3.4.5      | Färbung von SDS-Gelen .....  | 56        |
| 3.4.6      | Lagerung von gereinigten Enzymen .....   | 56        |
| 3.4.7      | Herstellung rekombinanter HL-ADH für den indirekten Test .....                               | 56        |
| <b>3.5</b> | <b>Chromatographische Methoden .....</b>   | <b>58</b> |
| 3.5.1      | Präparative Dünnschichtchromatographie (DC) .....  | 58        |
| 3.5.2      | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....   | 59        |
| 3.5.3      | Gaschromatographie .....   | 60        |
| 3.5.4      | Anionenaustauschchromatographie .....  | 61        |
| 3.5.5      | Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix.....     | 62        |
| 3.5.6      | Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex G-25-Matrix .....                           | 63        |
| <b>3.6</b> | <b>Bestimmung von Enzymaktivitäten .....</b>   | <b>64</b> |
| 3.6.1      | Direkter photometrischer Test zur Bestimmung der Reduktionsaktivität (ADHs) .....            | 64        |
| 3.6.2      | Direkter photometrischer Test zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität.....                 | 65        |
| 3.6.3      | Indirekter photometrischer Test zur Bestimmung der Lyaseaktivität .....                      | 66        |
| 3.6.3.1    | Benzoin-Spaltung .....   | 66        |
| 3.6.3.2    | Decarboxylaseaktivität .....   | 68        |
| 3.6.4      | Bestimmung des Effektes von Temperatur und pH-Wert auf die Enzymaktivität .....              | 69        |
| 3.6.5      | Durchführung von Stabilitätsmessungen gegenüber Temperatur und pH-Wert .....                 | 70        |
| 3.6.6      | Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums.....  | 70        |
| 3.6.7      | Bestimmung der kinetischen Parameter ( $V_{max}$ und $K_M$ ).....                            | 71        |
| 3.6.8      | Tetrazoliumrot (TTC)-Test zur quantitativen Bestimmung der Carboligaseaktivität .....        | 71        |
| 3.6.9      | Carboligationsansätze .....  | 73        |
| <b>3.7</b> | <b>Spektroskopische Methoden .....</b>   | <b>73</b> |
| 3.7.1      | Circulardichroismus (CD).....  | 73        |
| 3.7.2      | Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) .....  | 74        |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Potentielle neue ThDP-abhängige Enzyme.....</b>   | <b>75</b> |
| 4.1.1      | Benzaldehydlyasen aus <i>Silicibacter pomeroyi</i> und <i>Francisella philomiragia</i> ..... | 75        |
| 4.1.1.1    | Klonierungsstrategie.....  | 76        |
| 4.1.1.2    | Proteinexpression und -reinigung .....   | 77        |
| 4.1.1.3    | Lyaseaktivität .....   | 78        |
| 4.1.1.4    | Carboligaseaktivität.....  | 80        |
| 4.1.2      | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Chromobacterium violaceum</i> .....                       | 82        |
| 4.1.2.1    | Klonierungsstrategie.....  | 83        |
| 4.1.2.2    | Proteinexpression .....  | 83        |
| 4.1.2.3    | Lyaseaktivität .....   | 84        |
| 4.1.2.4    | Carboligaseaktivität.....  | 85        |
| 4.1.3      | Fazit: Neue ThDP-abhängige Enzyme .....  | 85        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>4.2</b> | <b>Konzepte für den Zugang zu (S)-2-Hydroxypropiofenon-Derivaten .....</b>   | <b>87</b>  |
| 4.2.1      | Optimierung der Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> mittels zielgerichteter Mutagenese .....                                 | 87         |
| 4.2.2      | Biochemische Charakterisierung der <i>PpBFDL461G</i> -Variante .....   | 90         |
| 4.2.2.1    | Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der <i>PpBFDL461G</i> -Variante .....   | 90         |
| 4.2.2.2    | Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>PpBFDL461G</i> -Variante .....   | 95         |
| 4.2.2.3    | Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>PpBFDL461G</i> -Variante .....   | 96         |
| 4.2.2.4    | Carboligaseaktivität der <i>PpBFDL461G</i> -Variante .....   | 98         |
| 4.2.3      | Fazit: Erweiterung der Enzym- <i>Toolbox</i> mit (S)-2-Hydroxypropiofenon-Derivaten .....  | 103        |
| <b>4.3</b> | <b>Kombination struktureller und funktionaler Informationen der <i>PpBFD</i> .....</b>   | <b>104</b> |
| 4.3.1      | Herstellung von <i>PpBFD</i> -Doppelvarianten .....  | 106        |
| 4.3.1.1    | Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>PpBFD</i> -Doppelvarianten .....   | 106        |
| 4.3.1.2    | Carboligaseaktivität der <i>PpBFD</i> -Doppelvarianten .....   | 107        |
| 4.3.2      | Fazit: Hinweise auf einen alternativen Weg für die Synthese von (S)-2-Hydroxyketonen in der <i>PpBFD</i> .....                                     | 112        |
| <b>4.4</b> | <b>Konzepte für den Zugang zu (S)-Phenylacetylcarbinol-Derivaten.....</b>  | <b>113</b> |
| 4.4.1      | Optimierung der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Acetobacter pasteurianus</i> mittels zielgerichteter Mutagenese .....                                  | 113        |
| 4.4.2      | Varianten im Bereich der <i>ApPDC</i> -Donor-Bindestelle .....   | 113        |
| 4.4.3      | Biochemische Charakterisierung der <i>ApPDC</i> -Varianten im Bereich der Donor-Bindestelle <i>ApPDCW388A/I</i> .....                              | 114        |
| 4.4.3.1    | Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten .....  | 114        |
| 4.4.3.2    | Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten .....  | 118        |
| 4.4.3.3    | Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten .....  | 121        |
| 4.4.3.4    | Carboligaseaktivität der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten .....  | 122        |
| 4.4.4      | Fazit: Hinweise auf einen alternativen Weg für die Synthese von (S)-2-Hydroxyketonen in der <i>ApPDC</i> .....                                     | 126        |
| 4.4.5      | Varianten im Bereich der <i>ApPDC</i> -Akzeptor-Bindestelle .....  | 127        |
| 4.4.6      | Biochemische Charakterisierung der <i>ApPDC</i> -Varianten im Bereich der Akzeptor-Bindestelle ( <i>ApPDCE469D/Q/G</i> ; <i>ApPDCI468A</i> ) ..... | 127        |
| 4.4.6.1    | Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>ApPDCE469D/Q/G</i> -Varianten .....  | 127        |
| 4.4.6.2    | Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>ApPDCI468A</i> -Variante .....   | 129        |
| 4.4.6.3    | Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>ApPDCE469D/Q/G</i> - und <i>ApPDCI468A</i> -Varianten .....  | 131        |
| 4.4.6.4    | Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der <i>ApPDCE469G</i> -Variante .....   | 133        |
| 4.4.6.5    | Carboligaseaktivität der <i>ApPDCE469D/Q/G</i> - und <i>ApPDCI468A</i> -Varianten .....  | 137        |
| 4.4.7      | Fazit: Erstmalige enzymatische Synthese von (S)-Phenylacetylcarbinol möglich .....   | 143        |
| <b>4.5</b> | <b>Kombination struktureller und funktionaler Informationen der <i>ApPDC</i> .....</b>   | <b>144</b> |
| <b>5</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>   | <b>147</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSION AND OUTLOOK .....</b>  | <b>151</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>155</b> |

## ABKÜRZUNGEN

## ABKÜRZUNGEN

Tab. 1: Abkürzungen für Enzyme.

| Bezeichnung            | Erläuterung   |
|------------------------|---|
| ApPDC                  | Pyruvatdecarboxylase aus <i>Acetobacter pasteurianus</i>  |
| BfdA                   | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12663 (PpBFD)                              |
| BfdB                   | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12663                                      |
| BfdC                   | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12663                                      |
| BfdM                   | Benzoylformiatdecarboxylase aus Metagenom   |
| BjBFD                  | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i>   |
| CvBFD                  | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Chromobacterium violaceum</i>  |
| FpBAL                  | Benzaldehydlyase aus <i>Francisella philomiragia</i> spp. <i>philomiragia</i>                             |
| Hefe-ADH               | Alkoholdehydrogenase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  |
| HL-ADH                 | Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber ( <i>horse liver</i> )   |
| HL-ADH <sub>rek.</sub> | rekombinante Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber ( <i>horse liver</i> )                              |
| LKdcA                  | verzweigt-kettige 2-Ketosäuredecarboxylase aus <i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>cremoris</i> B1157 |
| PaBFD                  | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| PfBAL                  | Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>   |
| PpBFD                  | Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12663 (BfdA)                               |
| RpBAL                  | Benzaldehydlyase aus <i>Rhodospseudomonas palustris</i>   |
| ScPDC                  | Pyruvatdecarboxylase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  |
| SpBAL                  | Benzaldehydlyase aus <i>Silicibacter pomeroyi</i>   |
| SvPDC                  | Pyruvatdecarboxylase aus <i>Sarcina ventriculi</i>  |
| ZmPDC                  | Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>   |
| ZpPDC                  | Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymobacter palmae</i>   |

Tab. 2: Allgemeine Abkürzungen.

| Bezeichnung | Erläuterung  |
|-------------|--|
| °C          | Grad Celsius   |
| µg          | Mikrogramm   |
| µl          | Mikroliter   |
| AA          | Acetaldehyd  |
| Abb.        | Abbildung  |
| Amp         | Ampicillin   |
| APS         | Ammoniumperoxidsulfat  |
| AS          | Aminosäure   |
| ATP         | Adenosintriphosphat  |
| AU          | relative Einheiten ( <i>absorption units</i> )                                     |
| BA          | Benzaldehyd  |
| bp          | Basenpaar(e)   |
| BSA         | Bovines Serum Albumin  |
| CD          | Circulardichroismus  |
| C-Terminus  | Carboxyterminus  |
| DC          | Dünnschichtchromatographie   |
| DMB         | 3,5-Dimethoxybenzaldehyd   |
| DMSO        | Dimethylsulfoxid   |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP        | Desoxynukleotidtriphosphat   |
| DSMZ        | Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, D) |
| ee          | Enantiomerenüberschuss ( <i>enantiomeric excess</i> )                              |
| EDTA        | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| F&E         | Forschung und Entwicklung  |

## ABKÜRZUNGEN

|                   |   |
|-------------------|---|
| g                 | Gramm   |
| h                 | Stunde(n)   |
| HPLC              | Hochleistungskflüssigkeitschromatographie<br>( <i>high performance/pressure liquid chromatography</i> ) |
| 2-HPP             | 2-Hydroxypropiophenon / 2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on   |
| GC                | Gaschromatographie  |
| IEC               | Ionenaustauschchromatographie ( <i>ion exchange chromatography</i> )                                    |
| IMAC              | Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie  |
| IPTG              | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid  |
| Kan               | Kanamycin   |
| kb                | Kilobasenpaar(e)  |
| kDa               | Kilo Dalton   |
| kPa               | Kilo Pascal   |
| Kpi-Puffer        | Kaliumphosphat-Puffer   |
| L/l               | Liter   |
| LB                | <i>lysogeny broth</i>   |
| Lsg.              | Lösung  |
| M                 | mol/Liter   |
| mg                | Milligramm  |
| min               | Minute(n)   |
| ml                | Milliliter  |
| mM                | Millimol/Liter  |
| NADH              | Nicotinamid-adenin-dinukleotid  |
| NADPH             | Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat   |
| ng                | Nanogramm   |
| nm                | Nanometer   |
| NMR               | Kernresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )   |
| NTA               | Nitrilotriessigsäure  |
| N-Terminus        | Aminoterminus   |
| OD <sub>600</sub> | optische Dichte bei 600 nm  |
| p.A.              | <i>per analyse</i>  |
| PAC               | Phenylacetylcarbinol / 1-Hydroxy-1-phenylpropan-2-on  |
| PCR               | Polymerasekettenreaktion  |
| PEG               | Polyethylenglykol   |
| pmol              | Picomol   |
| RT                | Raumtemperatur  |
| SDS               | Sodiumdodecylsulfat   |
| SDS-PAGE          | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| sek               | Sekunde(n)  |
| $\tau_{1/2}$      | Halbwertszeit   |
| Tab.              | Tabelle   |
| TCA               | Trichloressigsäure  |
| tech.             | technisch   |
| TEMED             | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| ThDP              | Thiamindiphosphat   |
| T <sub>m</sub>    | Schmelztemperatur   |
| TMF               | Transformationspuffer für <i>E. coli</i>  |
| Tris              | Trishydroxymethylaminomethan  |
| TTC               | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid   |
| U                 | Unit  |
| Upm               | Umdrehungen pro Minute  |
| V                 | Volt  |
| VE                | voll entsalzt   |
| v/v               | Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )  |
| w/v               | Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )  |



# 1 Einleitung

## 1.1 Enzyme in der Biotechnologie

### 1.1.1 Der Weg der Biotechnologie – Damals bis Heute

Bereits 3500 v. Chr. wurde von den Assyrern und Ägyptern Wein durch die Nutzung von Hefe hergestellt. Erst vor etwa 200 Jahren, zu Beginn des neunzehnten Jahrhunderts, beobachteten Naturwissenschaftler, dass chemische Reaktionen durch den Zusatz bestimmter Stoffe schneller ablaufen. So entdeckte der russische Chemiker Kirchoff im Jahre 1811, dass Stärke durch Kochen mit Schwefelsäure zu Traubenzucker hydrolysiert wird (Kirchoff, 1811). 1833 konnten Payen und Persoz zeigen, dass Stärke durch eine weiße, wasserlösliche Substanz, die durch Ethanol-fällung aus keimender Gerste gewonnen wurde, ebenfalls hydrolysiert wurde (Payen & Persoz, 1834). Die Substanz wurde Diastase (später Amylase) genannt. Berzelius erbrachte 1835 den Nachweis, dass der Einsatz der Diastase den Umsatz der Stärke bedeutend effektiver katalysierte als der Ansatz mit Schwefelsäure und schlug in einer Abhandlung von 1836 den Begriff ‚Katalyse‘ vor (Berzelius, 1836). 1897 konnte Buchner anhand der alkoholischen Gärung erstmals Aktivität in zellfreien Hefe-Extrakt nachweisen (Buchner, 1897). Nachdem Michaelis und Menten 1913 Pionierarbeit in der Erforschung der Enzymkinetik betrieben hatten (Michaelis & Menten, 1913), wurde 1926 von Sumner das erste Enzym (Urease) kristallisiert (Sumner, 1926). Die erste Röntgenkristallstruktur (Myoglobin) wurde 1958 publiziert (Kendrew, 1950) und ebnete den Weg für das breite Feld der strukturellen Biologie.

Die industrielle Nutzung von Enzymen als Biokatalysatoren begann Ende des neunzehnten Jahrhunderts durch Christian Hansen, der 1874 die erste Labfabrik zur Herstellung von Käse gründete. Zeitgleich konnte Jokichi Takamine ein Stärke-spaltendes Enzym aus *Aspergillus oryzae* isolieren, welches bis heute unter dem Namen ‚Taka-Diastase‘ vermarktet wird (Stürmer & Breuer, 2006). Die mittlerweile breite Akzeptanz zum Einsatz von Enzymen in der chemischen Industrie basiert auf folgenden Entwicklungen (Vasic-Racki, 2006):

1. Rekombinante DNA-Technologie
2. Isolierung großer Enzymmengen
3. Immobilisierung großer Enzymmengen
4. Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln

Die rekombinante DNA-Technologie hat Wege eröffnet, durch die immer leistungsfähigere Enzym-Produktionsorganismen entwickelt werden können. Die Herstellung und Optimierung von Biokatalysatoren wurde dadurch immer schneller und preisgünstiger.

Heutzutage werden viele Enzyme in Produktionsstämmen exprimiert und als Ganzzell-Biokatalysatoren, in isolierter Form oder immobilisiert in verschiedenen Biotransformations-Verfahren eingesetzt. Viele industrielle Großunternehmen, wie DSM, Evonik oder BASF, besitzen umfangreiche Sammlungen von Organismen und Enzymen, die mittels verschiedener *Screening*-Methoden durchgemustert werden können (Asano, 2002; Ogawa & Shimizu, 2002). Ziel ist die fortwährende Entdeckung neuer Biokatalysatoren für den industriellen Einsatz (Thayer, 2006). Aus diesem Grund stellen biotechnologische Verfahren und deren Entwicklung einen wesentlichen Wirtschaftsfaktor dar. Nach einem stetigen Zuwachs der Einnahmen in der globalen Biotechnologie sanken diese im Jahr 2008 um 36% auf 34 Billionen US-Dollar von 53 Billionen US-Dollar im Jahre 2007 (Huggett *et al.*, 2009). Die Wirtschaftskrise wirkt sich jedoch nur geringfügig auf kleine Biotechnologie-Firmen, sowie den Forschungs- und Entwicklungs- (F&E-) Bereichen von Universitäten aus (Huggett *et al.*, 2009). Die Ausgaben für den F&E-Bereich sind jährlich um etwa 3 Billionen US-Dollar gestiegen. So auch von 22,8 Billionen US-Dollar im Jahr 2007 auf 25,5 Billionen US-Dollar in 2008 (Huggett *et al.*, 2009).

### **1.1.2 Weiße Biotechnologie**

In der weißen Biotechnologie, auch industrielle Biotechnologie genannt, steht die Produktion von chemischen Produkten unter milden, umweltschonenden und zudem auch kostengünstigen Bedingungen durch den Einsatz von isolierten Enzymen, bzw. Ganzzell-Biokatalysatoren im Vordergrund. Im Gegensatz zu nicht katalysierten Reaktionen können die Wechselzahlen (*turnover numbers*) bei enzymatisch katalysierten Reaktionen  $10^8 - 10^{14}$ -fach erhöht werden (Frey & Hegeman, 2007; Sukumaran & Hanefeld, 2005). Dies ist in vielen Fällen wesentlich schneller als bei chemisch katalysierten Reaktionen (Azerad, 1995).

Diese hohe katalytische Leistungsfähigkeit von Enzymen ist allerdings stark von den Umgebungsbedingungen abhängig (Jäckel *et al.*, 2008). Äußere Einflüsse, wie pH-Wert und/oder Temperatur, Puffer, organische Lösungsmittel, Substrate und Produkte können die Aktivität und Stabilität von Enzymen drastisch beeinflussen. Unter diesem Aspekt ist die Erforschung der optimalen Reaktionsbedingungen von entscheidender Bedeutung. Für die Erweiterung des mit Enzymen zugänglichen Reaktions- und Substratspektrums ist die Suche

nach neuen Enzymen sowie die gezielte Optimierung vorhandener Enzyme ein wichtiges Forschungsgebiet. Hierbei spielt die rekombinante DNA-Technologie für den Fortschritt der weißen Biotechnologie eine entscheidende Rolle. Die Optimierung von Enzymen kann beispielsweise über verschiedene Mutagenese-Verfahren durchgeführt werden (Damborsky & Brezovsky, 2009; Jäckel *et al.*, 2008). Auf diese Weise können Enzyme zu hervorragenden Werkzeugen für die Katalyse von bisher nur auf chemischem Wege herstellbaren Stoffen oder gar unzugänglichen Produkten rekrutiert werden.

Methoden der Molekularbiologie können in der Bioverfahrenstechnik mit technischen Komponenten verknüpft werden und zu groß angelegten Industrieprozessen führen (BMBF, 2009; Drepper *et al.*, 2006). Das wohl bekannteste biotechnologische Verfahren ist die kontinuierliche Regenerierung des Cofaktors NADH. Die Synthese von L-Leucin kann mittels L-Leucindehydrogenase unter NADH-Verbrauch in einem kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor katalysiert werden. Der Konzern Evonik betreibt beispielsweise einen repetitiven *Batch*-Reaktor mit Ultrafiltration (Liese *et al.*, 2006). Die Regenerierung von NAD<sup>+</sup> zu NADH erfolgt durch den Einsatz des Coenzym Formiatdehydrogenase (Wichmann *et al.*, 1981).

### 1.1.3 Feinchemikalien und Stereoselektivität

Die Biokatalyse hat mittlerweile einen festen Platz in der Synthese vieler Feinchemikalien. Eine Analyse von 134 industriellen Biotransformationen zeigte, dass die meisten Produkte (89%) hochreine chirale Verbindungen sind (Straathof *et al.*, 2002). Spätestens nach der Thalidomid- (Contergan)-Tragödie, die in den Jahren 1961 und 1962 aufgedeckt wurde, gelang es, die pharmakologischen Unterschiede von Enantiomeren besser zu verstehen (Roth, 2005; Rouhi, 2003). In den folgenden Jahren wurde eine Neufassung des Arzneimittelgesetzes gefordert und so ist es seit vielen Jahren Pflicht bei chiralen Verbindungen beide Enantiomere auf ihre pharmakologische Wirkung zu prüfen.

Die Produktion reiner Enantiomere mittels chiraler Enzyme nimmt eine bedeutende Stellung in der Industrie ein (Ganesan, 2008; Patel, 2006; Patel, 2008). Durch die Weiterentwicklung der Enzymtechnologie ist es heutzutage möglich chemisch katalysierte Mehrschritt-Synthesen durch enzymatisch katalysierte Einzelschritt-Synthesen zu ersetzen oder mit enzymatisch katalysierten Schritten zu kombinieren (Breuer *et al.*, 2004; Wohlgemuth, 2009).

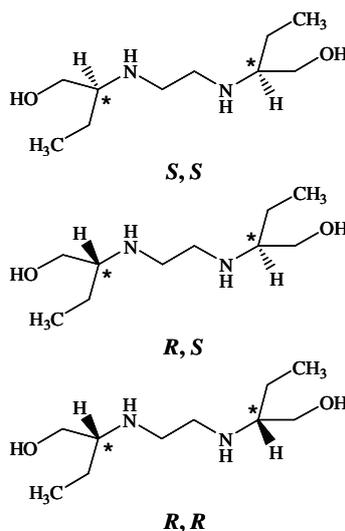
## EINLEITUNG

---

Enantiomere sind Stereoisomere, deren räumliche Struktur sich wie Bild und Spiegelbild verhält. Sie unterscheiden sich nicht in ihrem physikalischen Verhalten, wie Siedepunkt, Schmelzpunkt und Dichte. Eine Ausnahme bildet der Drehwinkel von polarisiertem Licht, die so genannte optische Aktivität.

Im biochemischen Verhalten von Enantiomeren sind Unterschiede vorhanden. Im Organismus kommt es zu Wechselwirkungen mit anderen chiralen Molekülen, bei denen die Konfiguration einen wesentlichen Einfluss hat. In vielen Fällen übt lediglich ein Enantiomer einen pharmakologisch positiven Effekt aus, während das komplementäre Enantiomer keine, oder gar eine toxische Wirkung aufweist. Aus diesem Grund sind racemische Synthesen, bei denen je 50% beider Enantiomere anfallen, nicht profitabel. Ein interessantes Beispiel ist der pharmazeutische Wirkstoff Ethambutol (Abb. 1).

2-[2-(1-Hydroxybutan-2-ylamino)ethylamino]butan-1-ol  
(auch Ethambutol)



**Abb. 1: Struktur von Ethambutol.** Ethambutol kann nur in der (*S,S*)-enantiomeren Form als Tuberkulose-Medikament eingesetzt werden. \*: Chiralitätszentren.

Ethambutol ist ein Antibiotikum mit zwei Chiralitätszentren. Lediglich das (*S,S*)-Enantiomer kann zur Bekämpfung von Tuberkulose eingesetzt werden (Abb. 1) (Thomas *et al.*, 1961; Wilkinson *et al.*, 1961; Yendapally & Lee, 2008). Der Einsatz des (*R,S*)- oder (*R,R*)-Enantiomers kann zu diversen Nebenwirkungen, unter anderem zur Erblindung führen.

Die hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität von Enzymen stellt bei der Synthese enantiomerenreiner Substanzen einen enormen Vorteil dar. Selektivitäten können sowohl

durch Reaktionstechnik als auch durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden zusätzlich beeinflusst werden. Gerade im Bereich der Gewinnung von chiralen, hochreinen Feinchemikalien ist der Einsatz von Enzymen ein wichtiges Arbeitsgebiet. Zeit- und kostenintensive Aufreinigungsprozesse von Feinchemikalien können deutlich verbessert werden. Im Bereich von klinischen Testphasen können die Kosten durch die Überprüfung von lediglich einer reinen Substanz ebenfalls enorm gesenkt werden.

#### **1.1.4 Enzymklassen**

Der Begriff ‚Enzym‘ wurde 1878 von dem deutschen Physiologen Wilhelm Friedrich Kühne geprägt (griech: *en* = in; *zyme* = Hefe) (Kühne, 1878). Die sechste komplette Nomenklatur der Enzyme wurde von der *International Union of Biochemistry* 1992 publiziert und wird fortwährend aktualisiert. Dazu werden Enzyme entsprechend ihrer katalysierten Reaktionen in sechs Enzymklassen eingeordnet (Tab. 3).

## EINLEITUNG

---

**Tab. 3: Enzymklassen und ihre spezifischen Reaktionen.** Die Klassifizierungsnummern (EC-Nummern) der Enzymdatenbank BRENDA (Chang *et al.*, 2009) sind mit aufgeführt.

| <b>Enzymklasse</b><br>(EC-Nummer) | <b>Spezifische Reaktion</b><br>(Beispiele aus Unterklassen)  |
|-----------------------------------|--|
| Oxidoreduktasen<br>(EC 1)         | Redoxreaktionen<br>(Dehydrogenasen, Reduktasen, Oxidasen, Monooxygenasen)  |
| Transferasen<br>(EC 2)            | Transfer von funktionellen Gruppen<br>(Transketolasen, Transaminasen, Acyltransferasen)  |
| Hydrolasen<br>(EC 3)              | Hydrolyse von funktionellen Gruppen, z.B.: C-O,<br>C-N<br>(Proteasen, Lipasen, Esterasen, Amidasen, Glycosidasen,<br>Acylasen, Amylasen)                                       |
| Lyasen<br>(EC 4)                  | Nicht-hydrolytische Spaltung von z.B.: C-C, C-O<br>und C-N unter Doppelbindungsbildung; Bindung<br>von Gruppen zu Doppelbindungen<br>(Decarboxylasen, Aldolasen, Dehydratasen) |
| Isomerasen<br>(EC 5)              | Strukturelle oder geometrische Veränderungen<br>(Racemasen, Epimerasen, Isomerasen, Tautomerasen,<br>Mutasen)  |
| Ligasen<br>(EC 6)                 | Ligation von zwei Substraten unter simultaner<br>Spaltung eines Pyrophosphates eines Nucleosid-<br>triphosphates<br>(Carboxylasen)   |

Jede Enzymklasse wird in mehrere Unterklassen gegliedert. So setzt sich beispielsweise die Enzymklasse EC 4.1.1.1 (Pyruvatdecarboxylasen) wie folgt zusammen: EC 4: Lyasen, EC 4.1: C-C-Lyasen, EC 4.1.1: Carboxy-Lyasen und folglich EC 4.1.1.1 für die spezifische Reaktion der Pyruvatdecarboxylasen. Anhand der in Tab. 3 dargestellten Enzymklassen und den breit gefächerten Unterteilungen selbiger, wird deutlich, wie groß das Potential von Enzymen für den Bereich der Biokatalyse ist.

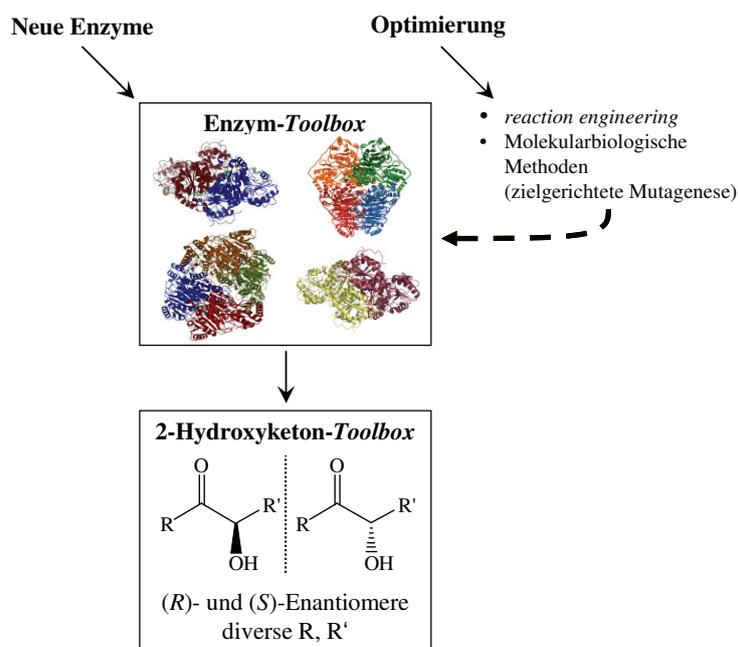
### 1.2 Das *Toolbox*-Konzept

Die meisten Biotechnologie- und Pharmakonzerne haben große Enzym-Plattformen, auch als *Toolbox* bezeichnet, aufgebaut (Thayer, 2006). Die Entwicklung passender Biokatalysatoren für spezielle Anwendungen übersteigt meistens die Zeit, welche große Konzerne für die Etablierung neuer Syntheserouten haben. So besteht eine *Toolbox* beispielsweise aus verschiedenen Biokatalysatoren deren Substratspektren sich sehr ähnlich sind. Durch diese Diversität

können gezielt passende Biokatalysatoren ausgewählt werden, welche anschließend optimiert werden. So können Etablierungszeiten verkürzt werden.

Ein weiterer Vorteil einer *Toolbox* besteht darin, dass ausgewählte chirale Produkte mit Hilfe von maßgeschneiderten Enzymen in sehr hohen enantiomerenreinen Formen hergestellt werden können. Des Weiteren laufen enzymatisch katalysierte Reaktionen meist umweltfreundlicher ab als chemisch katalysierte Reaktionen. Ein Beispiel für eine industriell vermarktete Plattform ist ChiPros<sup>®</sup> von BASF (Hieber & Ditrich, 2001; Straathof *et al.*, 2002).

In der Arbeitsgruppe von Apl. Prof. Dr. Martina Pohl wurde in den vergangenen Jahren eine *Toolbox* bestehend aus ThDP-abhängigen Enzymen aufgebaut (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, eingereicht) (Abb. 2).

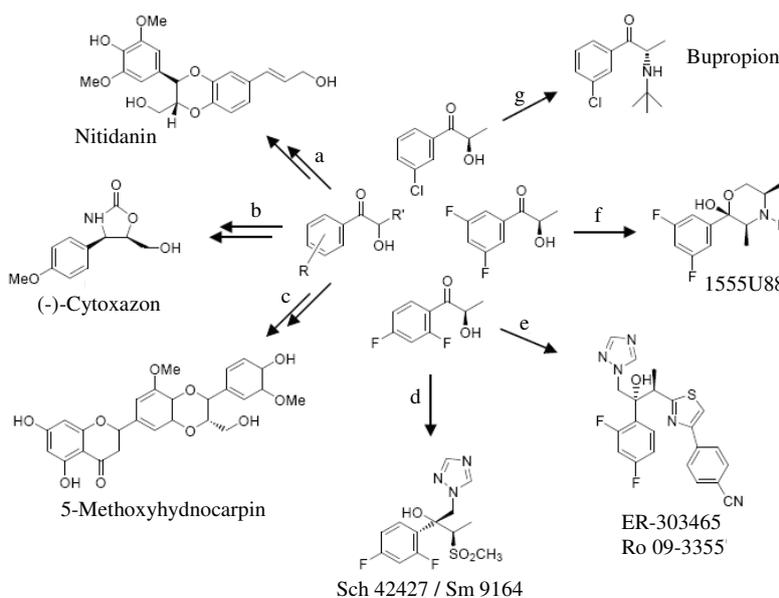


**Abb. 2: Enzym- und 2-Hydroxyketon-Toolbox.** Die Erweiterung erfolgt durch neue Wildtyp-Enzyme und durch die Optimierung bereits vorhandener Enzyme.

Durch die *Enzym-Toolbox* kann eine *2-Hydroxyketon-Toolbox* zugänglich gemacht werden. Damit eine produktorientierte Weiterentwicklung stattfinden kann, muss die *Enzym-Toolbox* kontinuierlich erweitert werden.

### 1.3 Bedeutung chiraler 2-Hydroxyketone in der Biotechnologie

2-Hydroxyketone stellen vielseitig einsetzbare Bausteine für die Synthese bioaktiver Moleküle aus den Bereichen der Pharmazie und des Pflanzenschutzes dar (Gocke *et al.*, eingereicht; Ward & Singh, 2000). Die Existenz eines Chiralitätszentrums, einer prochiralen Carbonylgruppe und die Bifunktionalität machen diese Moleküle zu exzellenten Vorstufen für weitere synthetische Transformationen (Sukumaran & Hanefeld, 2005). Mittels enantioselektiver Reduktion oder reduktiver Aminierung der Ketogruppe können chirale Diole und Aminoalkohole zugänglich gemacht werden, welche bei der Synthese von Liganden und chiralen Auxiliaren weit verbreitet zum Einsatz kommen (Kihumbu *et al.*, 2002; Stillger, 2004). Eine entscheidende Bedeutung von 2-Hydroxyketonen stellt die Herstellung pharmazeutisch aktiver Wirkstoffe, wie in Abb. 3 gezeigt, dar.



**Abb. 3: Anwendungen von 2-Hydroxyketonen.** 2-Hydroxyketone finden als Bausteine ihren Einsatz in der Herstellung biologisch aktiver Wirkstoffe in Form von Pharmazeutika und Pflanzenschutzmitteln (Stillger, 2004).

Nitidanin (Abb. 3 a) diente schon in der Volksmedizin als Wirkstoff bei Lebererkrankungen und wurde aus der Heilpflanze *Silybum marianum* gewonnen (Flora *et al.*, 1998; Morazzoni & Bombardelli, 1965). Heutzutage wird Nitidanin aus verschiedensten Pflanzen isoliert, ferner kann das Malaria-Medikament über eine chemische Mehrschrittsynthese hergestellt werden

(Kuboki *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2006). (-)-Cytozaxon (Abb. 3 b) wird als Inhibitor für die Bildung von Typ 1 Cytokinen im Rahmen der Behandlung von allergischen Reaktionen eingesetzt (Kakeya *et al.*, 1999). 5-Methoxyhydnocarbin (Abb. 3 c) fungiert als Inhibitor der mikrobiellen MDP (*multidrug pump*), welche den Zellen durch Ausschleusung unbekannter Moleküle eine Antibiotika-Resistenz verleiht (Stermitz *et al.*, 2000). Das Regioisomer (*R*)-1-(2,4-Difluorphenyl)-2-hydroxypropanon ist Vorläufer für die Fungizide Sch 42427/Sm 9164 (Abb. 3 d) und ER-303465/Ro 09-335 (Abb. 3 e) (Gala & DiBenedetto, 1997; Gala *et al.*, 1996a; Gala *et al.*, 1996b; Kitazaki *et al.*, 1999) und (*R*)-1-(3,5-Difluorphenyl)-2-hydroxypropanon ist die Ausgangsverbindung für das Antidepressivum 1555U88 (Abb. 3 f). Besonders hervorzuheben ist die Struktureinheit (*R*)-2-Hydroxypropiofenon ((*R*)-2-HPP), welche durch katalytische Eigenschaften verschiedener Thiamindiphosphat-(ThDP)-abhängiger Enzyme (Kap. 1.4) zugänglich gemacht werden kann. (*R*)-2-HPP wird als direkter Vorläufer für die Synthese pharmazeutischer Verbindungen wie (*R*)-1-(3-Chlor-phenyl)-2-hydroxypropanon eingesetzt, welches wiederum als Vorläufer für Bupropion (Abb. 3 g) Verwendung findet und auf chemischem Wege lediglich über eine langwierige Drei-Schritt-Synthese hergestellt werden kann (Amarante *et al.*, 2008). Bupropion ist als Wirkstoff in den Antidepressiva Wellbutin<sup>®</sup> und Zyban<sup>®</sup> (Glaxo Wellcome) vorhanden (Fang *et al.*, 2000).

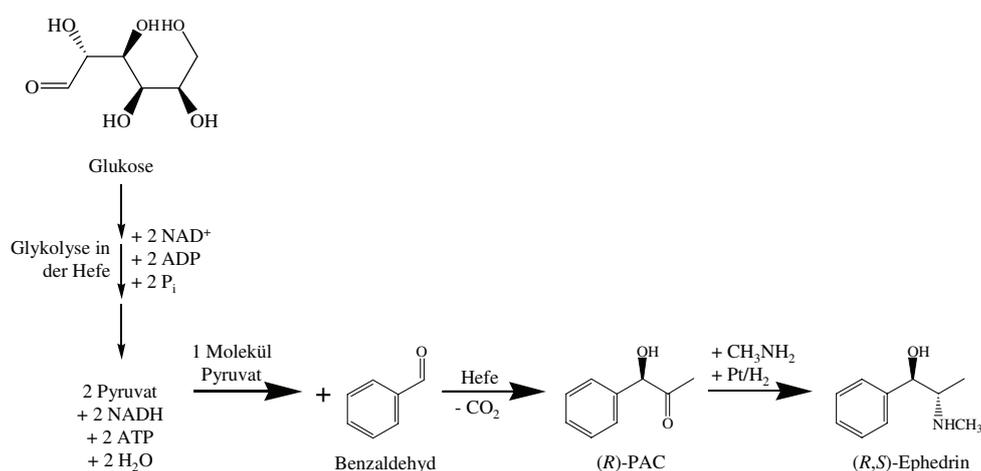
Es existiert eine Vielzahl chemischer und biologischer Methoden für die Synthese chiraler 2-Hydroxyketone. Bei chemischen Verfahren ist beispielsweise die enantioselektive Oxidation von Enothern weit verbreitet (Adam *et al.*, 1998; Solladié-Cavallo *et al.*, 2003). Dabei kommen elektrophile Sauerstoffdonoren, wie zum Beispiel Osmiumtetroxid in Gegenwart chiraler Auxillare (*ee* 86-95%) (Hashiyama *et al.*, 1992) oder Mangan-(III)-Selen-Komplexe (*ee* 11-89%) (Adam *et al.*, 1996; Adam *et al.*, 1998) zum Einsatz. Im Laufe der Jahre wurden weitere oxidative Prozesse, wie die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Ketonen und die Keto-Hydroxylierung von Olefinen, beschrieben (Plietker, 2005). Die konvergente Syntheseroute von 2-Hydroxyketonen mittels Aldehyd-Verknüpfung unter Bildung einer C-C-Bindung im Sinne einer Benzoinkondensation stellt ein weiteres Syntheseverfahren dar. Als Katalysatoren kommen Cyanidionen, aber auch Thiazoliumsalze, welche Reaktionen unter mildereren Bedingungen zulassen (Breslow, 1957), in Frage. Die Verwendung chiraler, bicyclischer Thiazoliumsalze führt zu Enantiomerenüberschüssen (*ee*) von bis zu 95% (Enders *et al.*, 1996; Enders & Kallfass, 2002; Knight & Leeper, 1998).

Bei der chemisch katalysierten enantio- und regioselektiven Reduktion von 1-Phenyl-1,2-propandion zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) kann ein *ee* von lediglich 64% erreicht

## EINLEITUNG

werden (Toukoniitty *et al.*, 2001). Durch den Einsatz diverser Enzyme aus der Gruppe der Thiamindiphosphat- (ThDP)-abhängigen Enzyme erreicht der *ee* für (*R*)-PAC einen Wert von bis zu 99% (Baykal *et al.*, 2006). (*R*)-PAC stellt den Vorläufer für die Synthese von Ephedrin, welches unter anderem zur Behandlung von Bronchialerkrankungen eingesetzt wurde, dar. Der Wirkstoff gehört zu der Gruppe der Sympathikomimetika und stellt eine Grundsubstanz für die Herstellung des verbotenen Betäubungsmittels N-Methylamphetamin dar. Aus diesen Gründen fällt Ephedrin in Deutschland unter das Grundstoffüberwachungsgesetz und steht laut Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) auf der Verbotsliste.

Die Synthese von (*R*)-PAC wurde bei der Fermentation von Hefe-Zellen in Gegenwart von Benzaldehyd bereits 1921 von Neuberg und Hirsch beobachtet (Abb. 4) (Neuberg & Hirsch, 1921).



**Abb. 4: Klassische enzymatisch/chemisch gekoppelte Ephedrin-Synthese.** Mittels fermentierender Hefe-Zellen wird Glukose in der Glykolyse zu 2 Pyruvat-Molekülen abgebaut. Pyruvat wird zu Acetaldehyd decarboxyliert. In Gegenwart von Benzaldehyd entsteht (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) welches anschließend zu (*R,S*)-Ephedrin reductiv aminiert wird.

Die Pyruvatdecarboxylase (PDC) der Hefe decarboxyliert Pyruvat zu Acetaldehyd welches durch Carboligation mit Benzaldehyd zu (*R*)-PAC ligiert wird. Anschließend erfolgt eine reductive Aminierung des (*R*)-PAC zu (*R/S*)-Ephedrin. Ephedrin, Pseudoephedrin sowie Derivate dieser Moleküle finden in der organischen Synthese als chirale Auxiliare Verwendung (Carey & Sundberg, 2007; Drewes *et al.*, 1993; Myers *et al.*, 1994; Rück, 1995).

## 1.4 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

### 1.4.1 Ein Überblick

Thiamindiphosphat- (ThDP)-abhängige Enzyme stellen eine herausragende Gruppe von Biokatalysatoren für die weiße Biotechnologie (Kap. 1.1.2) dar. Die Fähigkeit zur Spaltung und Knüpfung von C-C-, C-S-, C-N- und C-P-Bindungen erhalten ThDP-abhängige Enzyme durch den Cofaktor ThDP (Kap. 1.4.2) (Frank *et al.*, 2007; Pohl *et al.*, 2004). Die katalytische Antriebskraft ThDP-abhängiger Enzyme basiert auf der Bildung zahlreicher äußerst effektiver Übergangszustände, wodurch die Reaktionen um ein  $10^{12}$ -faches beschleunigt werden können (Kluger & Tittmann, 2008).

ThDP-abhängige Enzyme führen eine facettenreiche Palette an Reaktionen aus. Dazu gehören die nicht-oxidative und oxidative Decarboxylierung von 2-Ketosäuren, die Spaltung von C-C-Verbindungen und die Carboligierung von Aldehyden (Kap. 1.4.4) (Sprenger & Pohl, 1999). Diese verschiedenartigen katalytischen Eigenschaften scheinen sich unter anderem durch Domänen-Umordnung, Gen-Duplikationen und Mutationen in funktionellen Bereichen ausgeprägt zu haben, jedoch sind dies bis heute lediglich Vermutungen (Costelloe *et al.*, 2008). Eine Gemeinsamkeit aller ThDP-abhängigen Enzyme ist die Bindung des Cofaktors ThDP an der Grenzfläche zweier Struktur-Domänen (Costelloe *et al.*, 2008). Auf der Grundlage einer phylogenetischen Analyse verschiedener Domänen von 17 ThDP-abhängigen Enzymen wurden sechs strukturelle Gruppen beschrieben (Costelloe *et al.*, 2008). Im Allgemeinen stimmen die phylogenetischen Daten mit denen aus rein strukturellen Vergleichen überein (Costelloe *et al.*, 2008; Duggleby, 2006).

Unabhängig von den erwähnten phylogenetischen Daten kann die Klasse der ThDP-abhängigen Enzyme anhand mechanistischer Ähnlichkeiten in zwei Hauptgruppen aufgeteilt werden: die mit Transferase-ähnlicher Aktivität und die mit Decarboxylaseaktivität (Frank *et al.*, 2007). Darunter fallen unter anderem folgende Enzyme: Pyruvatoxidase (EC 1.2.3.3), 2-Ketosäuredehydrogenase (EC 1.2.4.X), Pyruvatsynthase (EC 1.2.7.1), Transketolase (EC 2.2.1.3), Acetolactatsynthase (EC 2.2.1.6), 1-Deoxyxylulose-5-phosphatsynthase (EC 2.2.1.7), Sulfoacetaldehydtransferase (EC 2.3.3.15), N<sub>2</sub>-2-Carboxyethylargininsynthase (EC 2.5.1.66), Carboxylasen (EC 4.1.1.X), Glyoxylatcarboligase (EC 4.1.1.47) und die Benzaldehydlyase (EC 4.1.2.38) (Frank *et al.*, 2007; Pohl *et al.*, 2004). In der folgenden Tabelle sind die Enzyme, die relevant für diese Arbeit sind, aufgelistet.

## EINLEITUNG

---

Tab. 4: Für diese Arbeit relevante ThDP-abhängige Enzyme.

| Enzym<br>(Abkürzung)                 | EC-<br>Nummer | Physiologische<br>Aktivität | Erste<br>Referenz             |
|--------------------------------------|---------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Pyruvatdecarboxylase<br>(PDC)        | 4.1.1.1       | Alkoholische<br>Gärung      | (Holzer <i>et al.</i> , 1956) |
| Benzoylformiatdecarboxylase<br>(BFD) | 4.1.1.7       | Mandelsäure-<br>Abbau       | (Hegeman, 1966)               |
| Benzaldehydlyase<br>(BAL)            | 4.1.2.38      | Unbekannt                   | (González & Vicuña, 1989)     |

Eine ausführliche Beschreibung der Enzymklassen PDC, BFD und BAL ist in Kapitel 1.5 dargestellt.

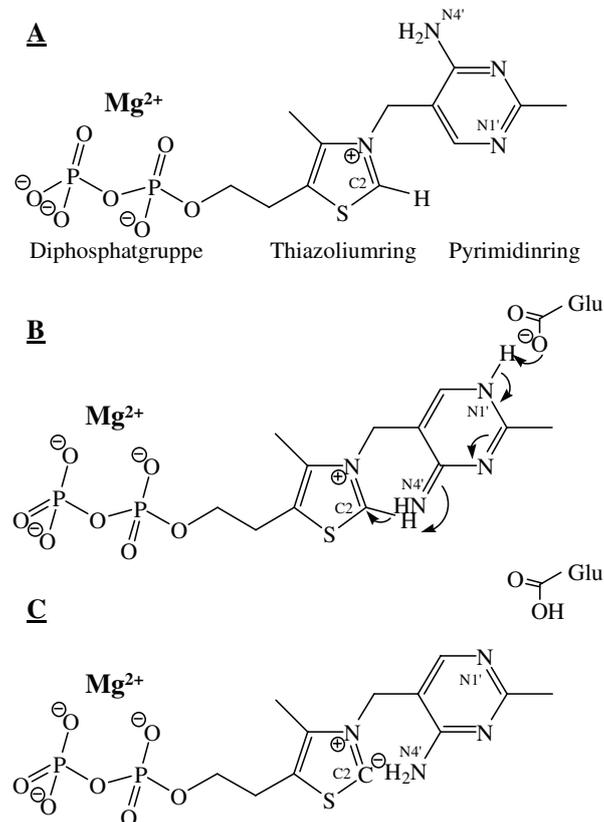
### 1.4.2 Der Cofaktor Thiamindiphosphat

Erste strukturelle Informationen über Thiamin (Vitamin B1) wurden durch den Abbau von Thiamin mittels Natriumsulfit hergeleitet (Williams, 1935; Williams, 1936). 1937 erbrachten Lohmann und Schuster den Nachweis darüber, dass das Coenzym ‚Cocarboxylase‘ in der Pyruvatdecarboxylase Thiamindiphosphat (ThDP) ist (Kluger & Tittmann, 2008; Lohmann & Schuster, 1937). ThDP, ein vermutlich evolutionär sehr früh auftretendes Molekül fungiert als Elektronensenke für die Katalyse einer Vielzahl unterschiedlicher Biosyntheseschritte des Ana- und Katabolismus (z.B.: Pentose-Phosphat-Weg, Krebs-Zyklus) (Frank *et al.*, 2007; Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004).

Die katalytischen Eigenschaften von freiem ThDP sind im Gegensatz zu Enzym-gebundenem ThDP sehr schwach (Kluger & Tittmann, 2008). Dies kommt dadurch zustande, dass das Enzym die Substrate in einen optimalen Abstand zum ThDP bringt und so eine reaktive Positionierung entsteht (Kluger & Tittmann, 2008). Zusätzlich wird die typische V-Konformation des ThDP, welche im Enzym durch eine im Bereich des Thiazoliumrings lokalisierte hydrophobe Seitenkette vermittelt wird (Jordan *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 1977), für die Bildung der aktiven Ylid-Form benötigt (Abb. 5). Diese Konformation wird im aktiven Zentrum optimal stabilisiert. Abweichungen von dieser konservierten ThDP-Bindung wurden in der Kristallstruktur einer Acetolactatsynthase (ALS) von *Klebsiella pneumoniae* beobachtet (Pang *et al.*, 2004).

Ein ThDP-Molekül enthält einen Pyrimidinring, der über eine Methylengruppe (CH<sub>2</sub>) mit einem Thiazoliumring verbunden ist. Das C2-Atom ist für den Reaktionsmechanismus von großer Bedeutung (Kap. 1.4.4). Des Weiteren fungiert ein assoziiertes Magnesium-Ion als

Anker für die Bindung der Diphosphatgruppe im aktiven Zentrum der Enzyme (Dobritzsch *et al.*, 1998).



**Abb. 5: Chemische Strukturen des ThDPs (nach Frank *et al.*, 2007).** **A:** ThDP in Lösung. **B:** Enzymgebundenes ThDP in der typischen V-Konformation, welche durch Annäherung des  $N4'$ -Atoms des Pyrimidinrings an das  $C2$ -Atom des Thiazoliumrings entsteht. Das  $C2$ -Proton geht auf das  $N4'$ -Atom über und wird dann auf einen konservierten Glutamatrest (Glu) übertragen. **C:** Aktive Ylid-Form.

Wie bereits erwähnt liegt das ThDP in einer V-Konformation im aktiven Zentrum des Enzyms vor (Jordan, 2003). Das  $C2$ -Atom des Thiazoliumrings liegt in räumlicher Nähe zu der  $N4'$ -Aminogruppe des Pyrimidinrings (Abb. 5 **B**). Zwischen einem hoch konservierten Glutamatrest im aktiven Zentrum und dem  $N1'$ -Atom des Pyrimidinrings erfolgt ein Protonentransfer. Die Basizität der  $N4'$ -Aminogruppe wird durch eine Delokalisierung der negativen Ladung erhöht (Kern *et al.*, 1997). Das  $N4'$ -Atom entzieht daraufhin dem  $C2$ -Atom ein Proton um die negative Ladung auszugleichen. Diese enzymatische Deprotonierung des ThDP (letztlich des  $C2$ -Atoms des Thiazoliumrings) ist der erste Schritt des ThDP-Reaktionsmechanismus welcher in Kap. 1.4.4 ausführlich beschrieben wird.

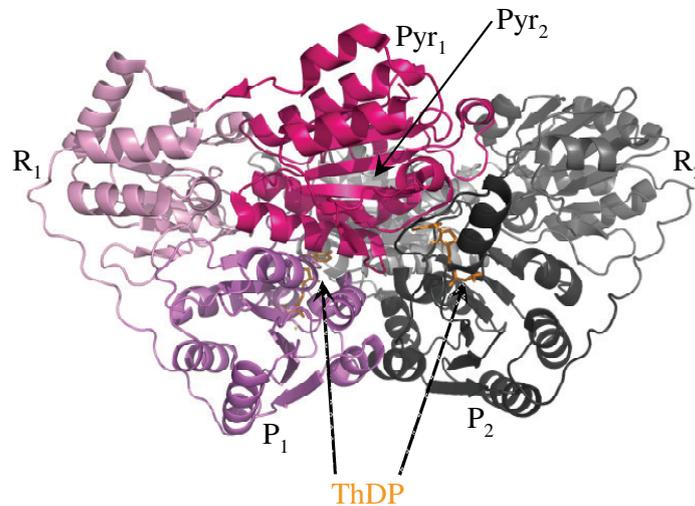
Ein entscheidender Durchbruch im Bereich der Thiamin-Katalyse war die Beobachtung über die Synthese von 2-Hydroxyketonen mittels Thiamin von Ukai (Ukai *et al.*, 1943) und Mizuhara (Mizuhara & Handler, 1954). Bis heute stellt die Thiamin-Katalyse in der organischen Chemie und in der Biochemie einen bedeutenden Forschungsbereich dar (Kluger & Tittmann, 2008).

### 1.4.3 Struktur Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme

Ogleich vieler Ähnlichkeiten im Katalysemechanismus, weisen die meisten ThDP-abhängigen Enzyme eine relativ geringe Sequenz-Identität auf (Frank *et al.*, 2007). Dennoch zeigt die Tertiärstruktur dieser Enzyme, ausgehend von mehr als 20 Kristallstrukturen aus eukaryotischen und prokaryotischen Gruppen sowie Archaea-Bakterien, eine beeindruckende Ähnlichkeit (Frank *et al.*, 2007).

Der Unterschied in der Ähnlichkeit der Sequenz und der Tertiärstruktur ist für Enzyme, die evolutiv weiter voneinander entfernt sind, nicht ungewöhnlich (Frank *et al.*, 2007). Demzufolge hat sich der ThDP-bindende Bereich wahrscheinlich mittels divergenter Evolution, ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer, entwickelt (Frank *et al.*, 2007). So lässt sich auch erklären, dass alle bisher beschriebenen ThDP-abhängigen Enzyme eine hoch konservierte Region mit der Sequenz G-D-G(X)<sub>25-30</sub>-N aufweisen (Duggleby, 2006; Hawkins *et al.*, 1989; Reynen & Sahn, 1988). Diese Aminosäuren scheinen als Liganden für die Bindung eines Magnesium-Ions zu fungieren und stellen so die Bindung der Diphosphatgruppe des ThDP im Enzym sicher (Jordan *et al.*, 2002).

ThDP-abhängige Enzyme fungieren als Multimere, wobei jede Polypeptidkette in drei Domänen mit  $\alpha/\beta$ -Topologie unterteilt werden kann (Costelloe *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2007). Zwei dieser Domänen sind in die Bindung des Cofaktors ThDP und des Magnesium-Ions involviert. Die Bindung des ThDP erfolgt an der Grenzfläche von zwei Untereinheiten (Muller *et al.*, 1993; Pohl *et al.*, 2009). Beispielhaft ist in Abb. 6 die Dömanenanordnung in der Kristallstruktur der PpBFD (Polovnikova *et al.*, 2003) dargestellt.



**Abb. 6: Darstellung der Anordnung der Domänen in ThDP-abhängigen Enzymen.** Jeweils eine Pyrimidin (Pyr)-, regulatorische (R) und Pyrophosphat (P)-Domäne bilden ein Monomer. Pyr<sub>1</sub> (pink), R<sub>1</sub> (rosa) und P<sub>1</sub> (violett) = Monomer 1; Pyr<sub>2</sub> (hellgrau), R<sub>2</sub> (mittelgrau) und P<sub>2</sub> (dunkelgrau) = Monomer 2. Die ThDP-Moleküle sind in orange dargestellt und an der Grenzfläche der Pyr- und P-Domänen des jeweilig anderen Monomers lokalisiert. Diese Abbildung wurde auf der Basis der *PpBFDwt*-Kristallstruktur (PDB: 1MCZ; Polovnikova *et al.*, 2003) mit dem Programm Pymol hergestellt.

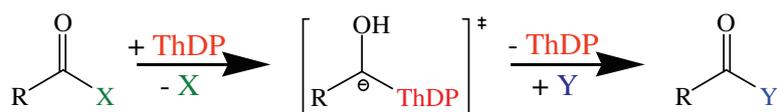
Die N-terminale PYR- ( $\alpha$  oder Pyrimidin) Domäne des Monomers 1 interagiert mit dem Pyrimidinring, die C-terminale P- ( $\gamma$  oder Pyrophosphat) Domäne des Monomers 2 mit der Diphosphatgruppe des ThDPs (Duggleby, 2006; Lindqvist *et al.*, 1992). Die R- ( $\beta$  oder regulatorische) Domäne in PDC-ähnlichen Enzymen zeigt keine Interaktion mit dem Cofaktor und zudem merklich strukturelle Unterschiede zu den anderen Domänen (Duggleby, 2006). Im Gegensatz dazu ist das aktive Zentrum des Enzyms 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat-Synthase an der Grenzfläche der PYR- und P-Domäne desselben Monomers situiert (Xiang *et al.*, 2007).

ThDP-abhängige Enzyme können in Multienzymkomplexen, wie dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex (Frank *et al.*, 2005) vorkommen oder sie fungieren wie bereits erwähnt als Multimere. Entweder sind die aktiven Formen der Enzyme Dimere wie bei der Transketolase (Lindqvist *et al.*, 1992) oder der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuredecarboxylase (Berthold *et al.*, 2007), oder sie liegen als Tetramer vor (Pohl *et al.*, 2009). Ein Tetramer lässt sich am besten als Dimer aus Dimeren beschreiben (Duggleby, 2006). Zu den tetrameren ThDP-abhängigen Enzymen gehören die meisten der 2-Ketosäuredecarboxylasen (Arjunan *et al.*, 1996; Dobritzsch *et al.*, 1998; Dyda *et al.*, 1993; Gocke *et al.*, 2008; Hasson *et al.*, 1998; Schütz *et al.*, 2007).

*al.*, 2003; Versées *et al.*, 2007), Acetohydroxysäuresynthasen (Pang *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2004) und die Benzaldehydlyase (Maraité *et al.*, 2007; Mosbacher *et al.*, 2005). Neben der Bildung von Tetrameren haben manche PDCs die Tendenz zu Dimeren zu dissoziieren (Kutter *et al.*, 2006) oder höher molekulare Zustände, wie Octamere, anzunehmen (Pohl *et al.*, 1994; Raj *et al.*, 2002). So wurden molekulare Massen von bis zu 300 – 500 kDa für pflanzliche PDCs beobachtet (König, 1998).

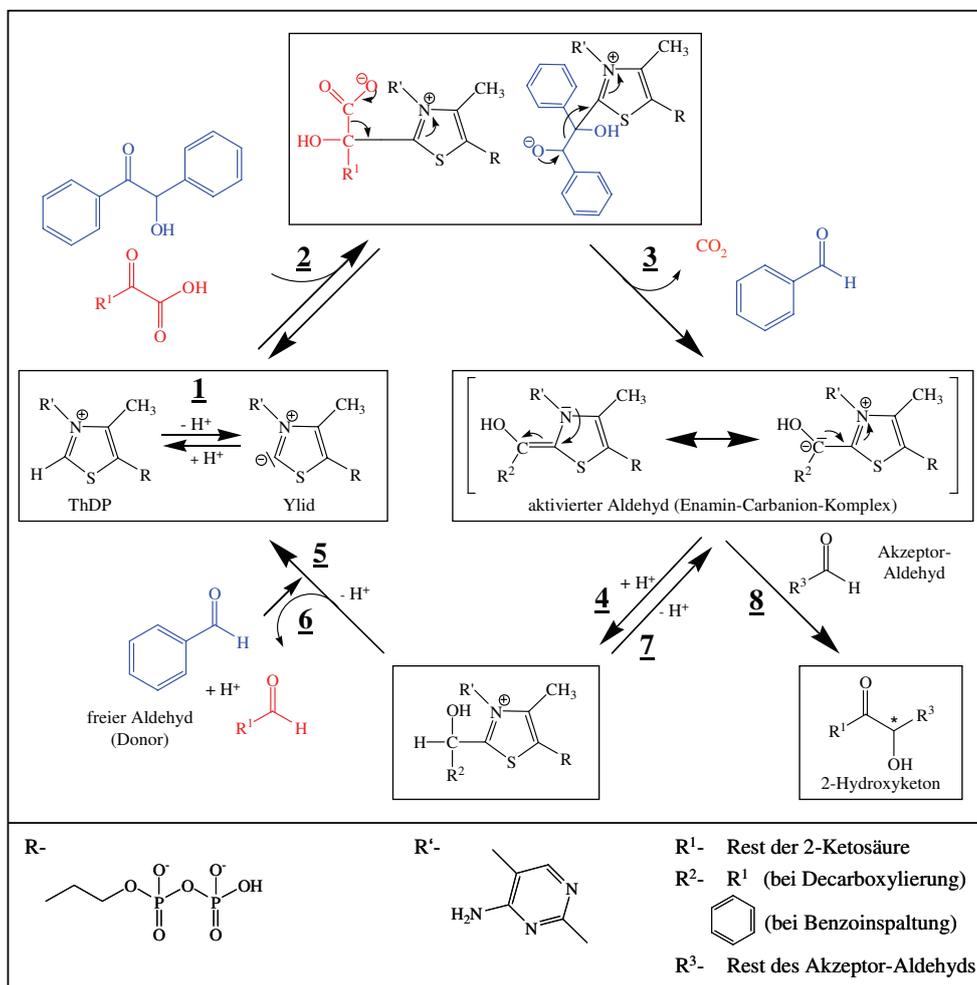
#### 1.4.4 ThDP-Reaktionsmechanismus – Lyase- und Carboligaseaktivität

Die Lyaseaktivität, zu der die Decarboxylierung von 2-Ketosäuren und die Spaltung von 2-Hydroxyketonen gehört, findet in ein und demselben aktiven Zentrum wie die Carboligation statt. Generell lässt sich eine Vielzahl der Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme durch ein gemeinsames Schema darstellen (Abb. 7) (Schellenberger, 1998).



**Abb. 7: Allgemeiner Katalysemechanismus ThDP-abhängiger Enzyme.** Mit X = Abgangsgruppe und Y = elektrophiles Akzeptormolekül.

Für die Vermittlung der Aktivitäten durch den Cofaktor ThDP ist, wie bereits in Kap. 1.4.2 beschrieben, die Aktivierung des C2-Atoms, welches im Thiazoliumring des ThDPs lokalisiert ist, zu einem effizienten nukleophilen Ylid nötig (Breslow, 1957; Kern *et al.*, 1997; Pohl *et al.*, 2009). Unter Abspaltung der Abgangsgruppe X eines Substratmoleküls kann dieses an die Ylid-Form des ThDP binden. Die erfolgte Umpolung der Carbonylgruppe des Substratmoleküls von einem elektrophilen zu einem nukleophilen Reaktionszentrum erlaubt eine nukleophile Addition eines elektrophilen Akzeptormoleküls Y. Der Cofaktor ThDP wird freigesetzt und in einem Katalysezyklus, welcher in Abb. 8 detailliert dargestellt ist, regeneriert.



**Abb. 8: Allgemeiner ThDP-Reaktionsmechanismus (Gerhards, 2009; Siegert *et al.*, 2005).** Blau: Benzoin-spaltung. Rot: Decarboxylaseaktivität. Nucleophiler Angriff des Ylids (1) auf die Ketogruppe einer 2-Ketosäure oder eines Benzoin und Bildung eines ThDP-Substrat-Intermediates (2). Der Enamin-Carbanion-Komplex entsteht durch Abspaltung von CO<sub>2</sub> oder Benzaldehyd (3). Durch eine Protonierung des Komplexes (4), eine darauf folgende Abspaltung eines freien Aldehyds (6) und eine Deprotonierung (5) kann das ThDP regeneriert werden. Durch die Addition eines weiteren Aldehyds (Akzeptoraldehyd) an den Komplex entsteht über eine Carboligations-Reaktion ein chirales 2-Hydroxyketon (8). Nach der Abspaltung des 2-Hydroxyketons liegt das ThDP in der Ylid-Form vor und wird so rezykliert.

Alle ThDP-abhängigen Enzyme benötigen einen Protonen-Akzeptor (Abb. 8, linke Seite) für die erste Hälfte und einen Protonen-Donor (Abb. 8, rechte Seite) für die zweite Hälfte des Reaktionsmechanismus. Der Protonen-Akzeptor stellt das 1',4'-Imino Tautomer des ThDP in Kombination mit einem invariablen Glutamatrest dar (Abb. 5 **B**) (Frank *et al.*, 2007; Lindqvist *et al.*, 1992). Für die zweite Hälfte des Reaktionsmechanismus gibt es keine konservierten Aminosäurereste, die dieselbe Funktion übernehmen; sie unterscheiden sich

entsprechend der Enzymklassen. In der E1-Komponente der Pyruvatdehydrogenase wird das ThDP von zwei Histidinresten flankiert (Frank *et al.*, 2004): eines direkt an der Diphosphatgruppe positioniert, das andere nahe am C2-Atom und der N4'-Aminogruppe. In Pyruvatdecarboxylasen (Frank *et al.*, 2007), Benzoylformiatdecarboxylasen (Kneen *et al.*, 2005; Polovnikova *et al.*, 2003; Siegert, 2000) und der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (Kneen *et al.*, 2005) liegen Histidinreste nahe am Thiazoliumring (Frank *et al.*, 2007).

Der Katalysezyklus beginnt mit der Deprotonierung des ThDPs am C2-Atom des Thiazoliumrings (1). So wird das Molekül in die aktive Ylid-Form überführt (Breslow, 1957; Kern *et al.*, 1997). Das Ylid kann nun eine 2-Ketosäure oder ein 2-Hydroxyketon (z.B. Benzoin) nukleophil angreifen (2). Das resultierende instabile Zwischenprodukt reagiert anschließend im Falle der Decarboxylierung unter Abspaltung eines CO<sub>2</sub>-Moleküls und im Falle der Benzoinspaltung unter Freisetzung eines Benzaldehyd-Moleküls zu einem Enamin-Carbanion-Komplex weiter (3). Die Protonierung des Enamin-Carbanion-Komplexes führt zu einem hydroxylierten ThDP-Intermediat (4). Die anschließende Freisetzung des Aldehyds (6) und eine weitere Deprotonierung führt zur Regeneration des ThDPs (5).

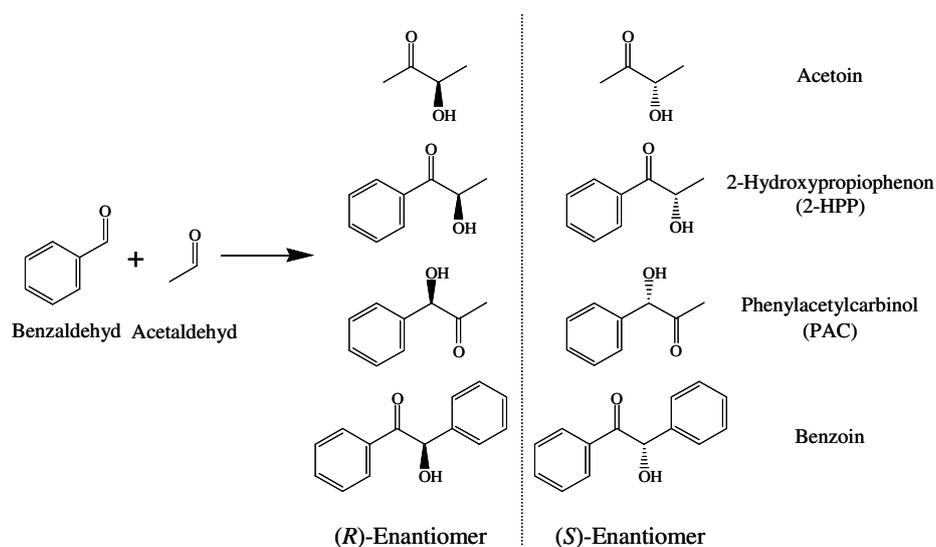
Das gemeinsame Intermediat der ThDP-katalysierten Decarboxylierung und Carboligation ist der Enamin-Carbanion-Komplex. Die Protonierung in Schritt 4 ist reversibel (7), so kann ein weiterer Aldehyd gebunden werden und über eine Carboligasereaktion entsteht im Falle der Ligation von zwei Aldehyden ein 2-Hydroxyketon (8). Für die Bindung des Akzeptoraldehyds an den Enamin-Carbanion-Komplex muss es nicht zwangsläufig zu Schritt 4 kommen. Die Anlagerung kann auch direkt erfolgen (8). Des Weiteren ist die Bindung eines freien Aldehyds (Donoraldehyd) (6) an die aktive Ylid-Form möglich. Der entstandene Komplex wird deprotoniert (7), es entsteht der Enamin-Carbanion-Komplex, an dem wiederum ein weiteres Aldehydmolekül (Akzeptoraldehyd) (8) bindet und im Falle der Decarboxylasen und der Benzaldehydlyase ein 2-Hydroxyketon entsteht. Nach der Abspaltung des 2-Hydroxyketons wird das ThDP in der Ylid-Form wieder rezykliert.

### Folgende Punkte können festgehalten werden:

1. Wenn der Akzeptor ein Proton ist, erfolgt eine Decarboxylierung und ein Aldehyd wird frei. Dies ist die physiologische Hauptreaktion der ThDP-abhängigen Decarboxylasen.
2. Wenn der Akzeptor ein Aldehyd ist, erfolgt eine Carboligation und ein 2-Hydroxyketon wird gebildet.

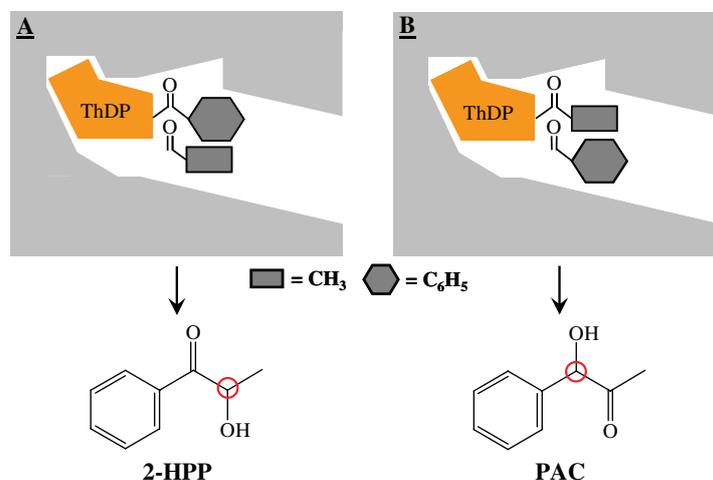
### 1.4.5 Chemoselektivität

Die von den meisten ThDP-abhängigen Enzymen katalysierte gemischte Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd wurde in vorangegangenen Studien ausführlich diskutiert (Demir *et al.*, 2001a; Demir *et al.*, 2002; Dünwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000; Lingen *et al.*, 2002). In Abb. 9 sind die möglichen Produkte dieser Reaktion aufgeführt.



**Abb. 9: Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd.** Vier verschiedene Produkte in der (*R*)- oder der (*S*)-enantiomeren Form sind möglich.

Es können vier mögliche Produkte auftreten, welche wiederum als (*R*)- oder als (*S*)-Enantiomer vorliegen können. Neben den Selbstligationsprodukten Acetoin und Benzoin, die aus zwei gleichartigen Aldehyden hervorgehen, können zwei gemischte Produkte entstehen: 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP) und Phenylacetylcarbinol (PAC) und zwar abhängig davon welcher Aldehyd zuerst am ThDP gebunden und somit aktiviert wird (Donor) und welcher als Akzeptor fungiert. Dieses Donor-Akzeptor-Konzept ist in Abb. 10 gezeigt.

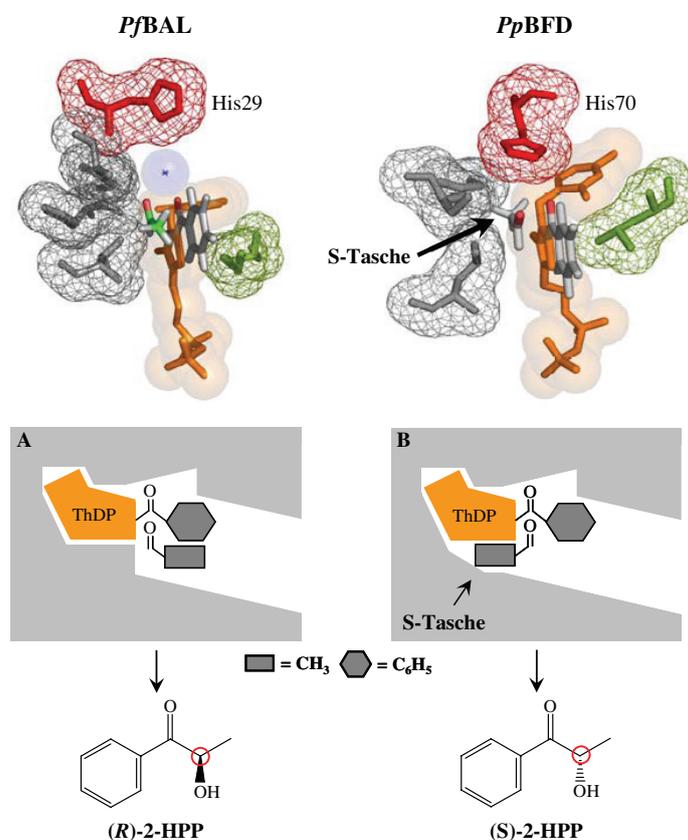


**Abb. 10: Chemoselektive Bildung von 2-HPP und PAC.** Zweidimensionales Schema des aktiven Zentrums ThDP-abhängiger Enzyme. **A:** Benzaldehyd, gebunden am C2-Atom des ThDPs, fungiert als Donoraldehyd und Acetaldehyd als Akzeptoraldehyd; es entsteht 2-HPP. **B:** Bei der Entstehung von PAC liegt der Acetaldehyd gebunden am ThDP vor und stellt so den Donoraldehyd und Benzaldehyd den Akzeptoraldehyd dar.

Die Chemoselektivität von Enzymen wird durch sterische Eigenschaften des aktiven Zentrums beeinflusst. So akzeptieren Pyruvatdecarboxylasen (Kap. 1.5.3) bevorzugt aliphatische und Benzoylformiatdecarboxylasen (Kap. 1.5.2) bevorzugt aromatische 2-Ketosäuren oder Aldehyde (Abb. 8 Schritte **5** und **2**). Bereits einfach substituierte Benzaldehyd-Moleküle, wie zum Beispiel 2-Chlor-Benzaldehyd, können drastische Auswirkungen auf Selektivität und Umsatz haben (Dünelmann *et al.*, 2002; Gocke *et al.*, 2007).

#### 1.4.6 Stereoselektivität

In Kapitel 1.1 wurden die Vorteile enzymatischer Biokatalysatoren, insbesondere die Fähigkeit zur Synthese enantiomerenreiner Feinchemikalien in der Biotechnologie, erläutert. In diesem Kontext ist der Bereich der stereoselektiven Carboligation durch ThDP-abhängige Enzyme ein faszinierender Bereich. Die Reaktion von Benzaldehyd als Donor- und Acetaldehyd als Akzeptoraldehyd führt, wie in Kap. 1.4.5 beschrieben, zu 2-Hydroxypropio-phenon (2-HPP; Abb. 10 **A**). Wird diese Reaktion mit der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*Pp*BFD) als Katalysator durchgeführt, so resultiert dies in (*S*)-2-HPP (Iding *et al.*, 1998; Wilcocks *et al.*, 1992). Im Falle der Verwendung der Benzaldehydlyase aus *P. fluorescens* (*Pf*BAL) entsteht das komplementäre (*R*)-2-HPP (Abb. 11) (Demir *et al.*, 2001a; Demir *et al.*, 2002).



**Abb. 11: Molekulare und schematische Modelle zur Entstehung von (R)- und (S)-2-HPP.** Die Substrate Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA) wurden in Strukturausschnitte der *PfBAL* und der *PpBFD* hinein modelliert. BA (grau) liegt in beiden aktiven Zentren planar zum Thiazoliumring des ThDPs (orange). Das Sauerstoff-Atom des Donoraldehyds und des Akzeptoraldehyds (AA in *PfBAL*: grün, in *PpBFD* grau) ist in Richtung der Histidine His29 in *PfBAL* und His70 in *PpBFD* orientiert. Die Histidine fungieren als Protonen-Relais-System. **A:** In der schematischen Darstellung des aktiven Zentrums der *PfBAL* besteht für AA lediglich die Möglichkeit einer parallelen Anordnung zum BA; es entsteht (R)-2-HPP. **B:** In der *PpBFD* existiert eine S-Tasche, die eine antiparallele Anordnung des AA zum BA ermöglicht; so kann (S)-2-HPP entstehen (Gocke, 2007; Knoll *et al.*, 2006).

Der stereoselektive Unterschied in der Synthese von (R)-2-HPP mittels *PfBAL* und (S)-2-HPP mittels *PpBFD* kann durch die unterschiedliche Gestaltung des aktiven Zentrums beider Enzyme erklärt werden (Knoll *et al.*, 2006). Die *PpBFD* besitzt im Gegensatz zur *PfBAL* eine so genannte S-Tasche, deren Größe hauptsächlich durch ein Leucin in Position 461 (Leu461) beeinflusst wird. Der Methylrest (-CH<sub>3</sub>) des Akzeptoraldehyds Acetaldehyd passt genau in diese S-Tasche hinein und wird dort zusätzlich stabilisiert (Abb. 11 **B**) (Knoll *et al.*, 2006). Dadurch besteht die Möglichkeit einer antiparallelen Anordnung von Donor- und Akzeptoraldehyd. Dies ist die Voraussetzung für die Entstehung von (S)-2-Hydroxyketonen. Sterisch

anspruchsvollere Akzeptoraldehyde wie Benzaldehyd passen aufgrund des aromatischen Ringsystems nicht in die *S*-Tasche, weshalb die *Pp*BFD in alleiniger Gegenwart von Benzaldehyd die Synthese von (*R*)-Benzoin (*ee* > 98%) katalysiert (Iding *et al.*, 2000). Im aktiven Zentrum der *Pf*BAL existiert eine solche *S*-Tasche nicht. Die zu Leu461 korrespondierende Aminosäure Threonin 481 (Thr481) bewirkt eine starke sterische Hinderung in diesem Bereich, so dass nicht einmal eine Methylgruppe Platz finden könnte (Knoll *et al.*, 2006).

In den letzten Jahren wurden viele weitere Untersuchungen bezüglich der stereoselektiven Carboligation verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme und erzeugter Varianten durchgeführt (Demir *et al.*, 2003; Demir *et al.*, 2002; Dünkermann *et al.*, 2002; Dünnwald *et al.*, 2000; Lingen *et al.*, 2003; Pohl *et al.*, 2002; Stillger *et al.*, 2006). Anhand dieser Studien fällt auf, dass die Stereoselektivität nur dann strikt verläuft, wenn wenigstens ein aromatischer Aldehyd an der Carboligationsreaktion beteiligt ist. Die Selbstligation von aliphatischen Aldehyden führt zu einer stark verminderten Stereoselektivität (Baykal *et al.*, 2006; Domínguez de María *et al.*, 2006; Siegert *et al.*, 2005). Erwähnenswert ist des Weiteren, dass sowohl die Ligation eines aromatischen und eines aliphatischen Aldehyds, als auch die Selbstligation zweier aromatischer Aldehyde, neben zwei Ausnahmen, stets zu (*R*)-2-Hydroxyketonen führt. Die erste Ausnahme wurde 1994 von Prosen und Ward beschrieben. Der Einsatz von Zellen, bzw. zellfreiem Rohextrakt des Organismus *Acinetobacter calcoaceticus* führte zu einer Synthese von (*S*)-HPP mit einem Enantiomerenüberschuss von > 98% (Prosen & Ward, 1994). Die zweite Ausnahme stellt die oben beschriebene Synthese von (*S*)-2-HPP mittels *Pp*BFD dar (Abb. 11).

### 1.4.6.1 Zugang zu (*S*)-2-Hydroxyketonen

Im vorangegangenen Kapitel wurde erläutert, dass der Einsatz ThDP-abhängiger Enzyme im Normalfall zur Synthese von 2-Hydroxyketonen mit einer absoluten (*R*)-Konfiguration führt. In Anlehnung an den Ausnahmefall der *Pp*BFD wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Jürgen Pleiss am Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart Struktur-Funktions-Beziehungen untersucht (Gocke, 2007). Aus einer Übereinanderlagerung der Kristallstrukturen folgender Enzyme: *Pp*BFD (Hasson *et al.*, 1998), *Pf*BAL (Mosbacher *et al.*, 2005), Pyruvatdecarboxylasen (PDCs) aus den Organismen *Zymomonas mobilis* (*Zm*PDC, Dobritzsch *et al.*, 1998), *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*PDC, Arjunan *et al.*, 1996) und *Acetobacter pasteurianus* (*Ap*PDC, Gocke *et al.*, in Arbeit), und der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuredecarboxylase aus *Lactococcus lactis* (*Ll*KdcA, Berthold *et al.*, 2007) konnte eine

Kartierung in Bezug auf die sterischen Bedingungen in den aktiven Zentren vorgenommen werden (Gocke *et al.*, 2008). Zusammen mit den bekannten Effekten, die von verschiedenen Punktmutationen bekannt sind, konnte so ein Überblick über die Struktur-Funktions-Beziehungen diverser Aminosäurereste in wichtigen Positionen der aktiven Zentren erhalten werden. Eine detaillierte Zusammenfassung der wichtigsten Aminosäuren ist in Tab. 5 gegeben.

Vergleiche der Kristallstrukturen zeigten, dass nicht nur die *PpBFD* über eine *S*-Tasche verfügt. Auch bei der *ZmPDC*, *ScPDC* sowie der *ApPDC* konnte ein solches Strukturelement identifiziert werden (Gocke *et al.*, 2008). Bezogen auf das Proteinerückgrat bietet die *S*-Tasche bei den *PDCs* mehr Platz, als die der *PpBFD* und die vergleichsweise größte *S*-Tasche konnte bei der *ApPDC* identifiziert werden (Gocke, 2007; Müller *et al.*, 2009). Allerdings katalysiert keines dieser Enzyme die Synthese von (*S*)-2-Hydroxyketonen im Überschuss. Dies kann einerseits dadurch zustande kommen, dass die *S*-Tasche durch die Seitenkette eines hoch konservierten Glutamats ausgefüllt ist und/oder andererseits, dass der Zugang zur *S*-Tasche durch sterisch anspruchsvolle Aminosäure-Seitenketten blockiert ist.

Die *ApPDC*, die unter den verglichenen Enzymen die größte *S*-Tasche besitzt, katalysiert die Synthese von (*R*)-PAC mit einem verminderten Enantiomerenüberschuss von 93% im Vergleich zu 98% (*R*)-PAC, welches mit der *ZmPDC* synthetisiert wurde (Pohl *et al.*, 1998). Daraus lässt sich schließen, dass eine geringe (*S*)-PAC-Synthese stattfinden muss (Definition *ee*: Kap. 3.5.2). Das aktive Zentrum der *ApPDC* scheint sterisch genügend Platz in der *S*-Tasche für das aromatische Ringsystem des Benzaldehyds zu bieten (Gocke, 2007; Pohl *et al.*, 2009).

## EINLEITUNG

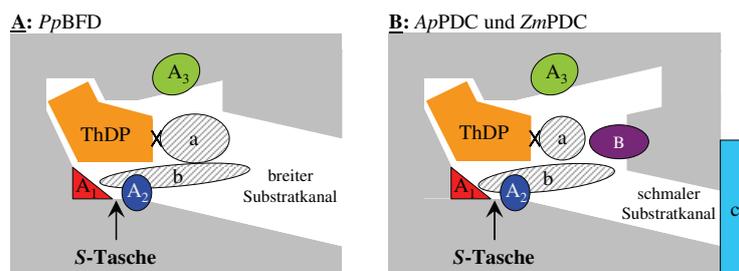
**Tab. 5: Korrespondierende Aminosäuren zu den aktiven Zentren diverser Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme:** Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (PjBAL), Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (PpBFD), Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus* (ApPDC), Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (ZmPDC), verzweigt-kettige 2-Ketosäuredecarboxylase aus *Lactococcus lactis* (LJKdcA) und Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDC). In Klammern unter dem Enzymnamen befinden sich die Struktur-Zugangsnummern bei der PDB (*protein data bank*; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Gocke, 2007).

| PjBAL<br>(PDB: 2ag0)                                  | PpBFD<br>(PDB: 1mcz, 1bfd) | ApPDC<br>(PDB: 2vbi) | ZmPDC<br>(PDB: 1zpd) | LJKdcA<br>(PDB: 2vbf) | ScPDC<br>(PDB: 1pyd) | Verfügbare Varianten<br>(Referenzen)  |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---|
| L25   | (N23)                      | V24                  | V24                  | V23                   | L25                  |   |
| H26   | P24                        | A25                  | A25                  | P24                   | P26                  |   |
| G27   | G25                        | G26                  | G26                  | G25                   | G27                  | PpBFDG25A (Siegert, 2000)   |
| A28   | S26                        | D27                  | D27                  | D26                   | D28                  | PpBFDS26A (Kneen <i>et al.</i> , 2005; Polovnikova <i>et al.</i> , 2003); PjBALA28S (Janzen, 2002); ZmPDCD27E,N (Chang <i>et al.</i> , 1999; Wu <i>et al.</i> , 2000) |
| F484<br>(E487)  | F464<br>(Y458)             | I472<br>Y466         | I476<br>Y470         | I465<br>Y459          | I480<br>Y474         | PpBFDF464I (Siegert <i>et al.</i> , 2005)   |
| -   | L461                       | E469                 | E473                 | E462                  | E477                 | PpBFDM365L/L461S (Lingen <i>et al.</i> , 2003); ZmPDC E473I,D,N,T,A (Mesch, 1997; Meyer, 2009; Pohl <i>et al.</i> , 1998)   |
| <u>Reste, welche die S-Tasche definieren</u>          |                            |                      |                      |                       |                      |   |
| A480  | A460                       | I468                 | I472                 | V461                  | I476                 | PpBFDA460I, ZmPDCI472A (Siegert <i>et al.</i> , 2005); PjBALA480I (Janzen, 2002)  |
| <u>Reste, welche die Donor-Bindestelle definieren</u> |                            |                      |                      |                       |                      |   |
| H415<br>(C414, L398)<br>Y397                          | (T380)<br>C398<br>F397     | W388                 | W392                 | F381                  | A392                 | ZmPDCW392A (Bruhn <i>et al.</i> , 1995); ZmPDCW392M,I (Mesch, 1997)   |

Tab. 5: Fortsetzung.

| Reste, welche die V-Konformation des ThDP stabilisieren     |             |  |  |  |  |  |
|---|-------------|--|--|--|--|--|
| M421  | L403        | I411   | I415   | I404   | I415   |  |
| Protonen-Relais-System                                      |             |  |  |  |  |  |
| H29<br>Q113   | H70         |  |  |  |  | <i>Pp</i> BFDH70 (Kneen <i>et al.</i> , 2005; Polovnikova <i>et al.</i> , 2003; Siegert, 2000); <i>Pf</i> BALH29A (Kneen <i>et al.</i> , 2005)<br><i>Zm</i> PDCHI13/HI14 (Bruhn <i>et al.</i> , 1995; Huang <i>et al.</i> , 2001); <i>Sc</i> PDCHI14F/HI15F (Liu <i>et al.</i> , 2001) |
|   |             | H113<br>H114                                 | H113<br>H114                                   | H112<br>H113                                 | H114<br>H115                                   |  |
| $\alpha$ -Helix, die den Eingang zum Substratkanal verdeckt |             |  |  |  |  |  |
| AS 550-555<br>$\alpha$ -Helix, 1,5<br>Drehungen             | Keine Helix | AS 538-555<br>$\alpha$ -Helix<br>4 Drehungen | AS 544-566<br>$\alpha$ -Helix<br>> 4 Drehungen | AS 532-547<br>$\alpha$ -Helix<br>4 Drehungen | AS 564-556<br>$\alpha$ -Helix<br>2-3 Drehungen | <i>Zm</i> PDC C-terminale Deletionsmutanten (Chang <i>et al.</i> , 1999)   |

Anhand der Resultate aus der Kartierung wurde ein schematisches Modell erstellt, in dem die Positionen der wichtigsten Reste im aktiven Zentrum dargestellt wurden (Abb. 12) (Gocke, 2007).



**Abb. 12:** Schematische Darstellung des aktiven Zentrums und des Substratkanals der *PpBFD* (A) und *ApPDC/ZmPDC* (B). Der Cofaktor ThDP (orange) ist in der V-Konformation am aktiven Zentrum gebunden. X: C2-Atom des Thiazoliumrings; A<sub>1</sub>: Aminosäure (AS), welche maßgeblich die Größe der S-Tasche beeinflusst; A<sub>2</sub>: AS, welche den Eingang zur S-Tasche definiert; a: Akzeptoraldehyd-Bindestelle; b: Bindestelle für 2-Ketosäuren oder den Donoraldehyd; B: AS, welche die Donor-Bindestelle in den PDCs (B) beeinflusst, c: C-terminale α-Helix verschließt den Substratkanal im Falle der PDCs (B) (Gocke, 2007).

In Abb. 12 wurde lediglich der Vergleich zwischen zwei PDCs und der *PpBFD*wt dargestellt. Die S-Taschen bei den PDCs sind durch sterisch anspruchsvolle Seitenketten der Aminosäuren in Position A<sub>1</sub> ausgefüllt: ein konservierter Glutamatrest befindet sich in äquivalenter Position zu Leucin 461 in der *PpBFD*. Bei den PDCs fungiert der aliphatische Aldehyd als Donor, dementsprechend muss der aromatische Rest des Akzeptoraldehyds im Falle der Synthese von (S)-2-Hydroxyketonen in der S-Tasche Platz finden. Da aber die S-Tasche der *ApPDC* durch den Glutamatrest in Position 469 blockiert ist, werden keine (S)-Produkte im Überschuss synthetisiert. In den folgenden zwei Kapiteln werden die Bereiche a und b aus Abb. 12 genauer diskutiert.

#### 1.4.6.2 Donor-Bindestelle

Wie bereits erwähnt werden bei *PpBFD*-katalysierten Decarboxylierungen bevorzugt aromatische 2-Ketosäuren als Substrat akzeptiert. Im Gegensatz dazu bevorzugen PDCs aliphatische 2-Ketosäuren. Dies korreliert im Falle der *PpBFD* mit einer Präferenz für aromatische Aldehyde als Donoren bei der Carboligation, während PDCs aliphatische Donoraldehyde bevorzugen. Die Unterschiede können direkt anhand der Größe der Donor-Bindestelle (Abb. 12 B, a) erklärt werden. Im Vergleich zur *PpBFD*wt wird die Donor-Bindestelle der *ApPDC*wt und *ZmPDC*wt von einem großen Tryptophanrest (Abb. 12 B, B) gegenüber dem

C2-Atom des ThDP begrenzt. Dadurch können lediglich kurzkettige aliphatische 2-Ketosäuren oder Aldehyde am C2-Atom gebunden werden. In der *ApPDC*wt ist dieser Bereich größer als in der *ZmPDC*wt, so kann lediglich in der *ApPDC*wt eine geringe Decarboxylaseaktivität gegenüber Benzoylformiat (1,1 U/mg) und eine minimale Synthese von Benzoin beobachtet werden (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, in Arbeit; Graf, 2005). Als Konsequenz der Präferenz aliphatischer Donoraldehyde bei den PDCs resultieren aus der gemischten Carboligation mit aromatischen Aldehyden die entsprechenden PAC-Derivate (Kap. 1.4.5).

In der *ZmPDC* wurde die korrespondierende Aminosäure Tryptophan 392 bereits zu Alanin ausgetauscht (*ZmPDC*W392A, Bruhn *et al.*, 1995). Ziel dieser Arbeiten war die Optimierung der katalytischen Aktivität für die Synthese von (*R*)-PAC. Weitere Untersuchungen bezüglich der (*R*)-PAC-Synthese und der Stabilität von W392-Varianten ergaben eine Verbesserung bei Varianten mit Isoleucin oder Methionin in Position 392 (Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001; Pohl, 1997). So konnte die Carboligaseaktivität der *ZmPDC* um den Faktor 5 gesteigert werden (Pohl, 1997).

### 1.4.6.3 Akzeptor-Bindestelle

Der Bereich der Akzeptor-Bindestelle wird vorrangig von zwei Positionen (Abb. 12 **B**, A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>) beeinflusst und ist insbesondere für die Carboligation von großer Relevanz. Wie in Kap. 1.4.6 dargestellt, resultiert aus der Orientierung des Akzeptoraldehyds relativ zum ThDP-gebundenen Donoraldehyd die Stereoselektivität der Carboligation. Wenn die Seitenkette des Akzeptoraldehyds parallel zur Seitenkette des Donoraldehyds liegt, zeigen beide in Richtung Substratkanal und es entstehen (*R*)-2-Hydroxyketone. Liegt die Seitenkette des Akzeptoraldehyds allerdings antiparallel zum Donoraldehyd, zeigt sie in Richtung *S*-Tasche, und es entstehen (*S*)-2-Hydroxyketone.

In PDCs wird der Bereich A<sub>2</sub> von einem konservierten Isoleucin beeinflusst. In der *ZmPDC* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Austausch von Isoleucin zu Alanin im Gegensatz zum Wildtyp bei der Ligation von Benzaldehyd mit Acetaldehyd zu einem erhöhten Enantiomerenüberschuss für (*S*)-Acetoin, einem verminderten Enantiomerenüberschuss für (*R*)-PAC und zur Bildung von (*S*)-2-HPP geführt hat (Siegert, 2000; Siegert *et al.*, 2005). Wahrscheinlich wurde der Zugang zur *S*-Tasche durch die kürzere Seitenkette des Alanins verbessert. Auf diese Weise konnte sich der Methylrest des Acetaldehyds zur *S*-Tasche ausrichten, so dass vermehrt (*S*)-2-Hydroxyketone entstanden.

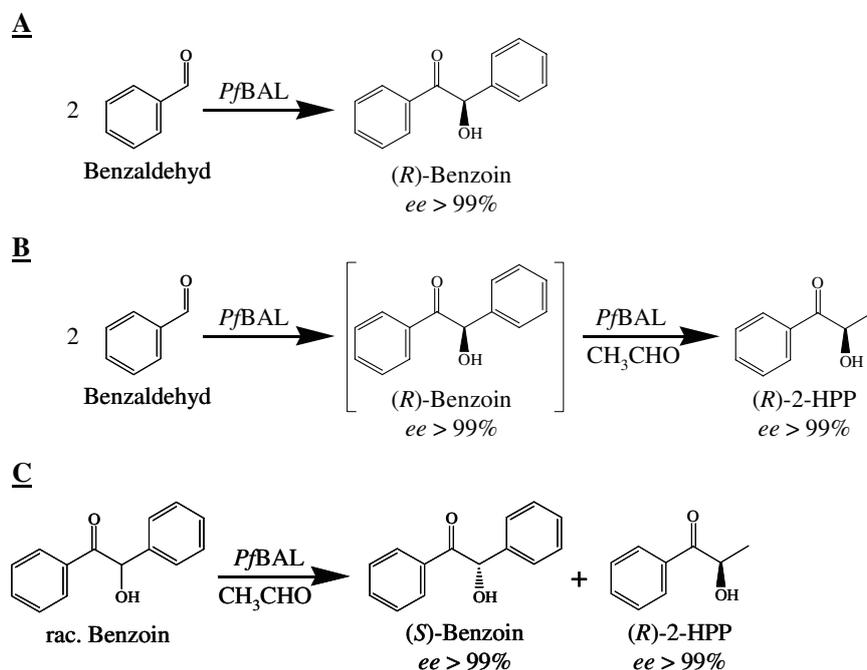
Der Bereich A<sub>1</sub> wurde in der *ZmPDC* von Glutamat (E473) zu verschiedenen Aminosäuren mutiert (Pohl *et al.*, 1998). Die resultierenden Varianten wurden nur schlecht exprimiert und wiesen keine Decarboxylaseaktivität auf, aus diesem Grund wurde E473 als katalytisch essentiell eingestuft (Pohl, 1997). Weitere Untersuchungen einer *ZmPDC*-Variante (*ZmPDCE473Q*) haben gezeigt, dass die Decarboxylaseaktivität zwar auf 0,1% gesunken ist, eine Carboligation aber dennoch stattfinden kann (Kluger & Tittmann, 2008; Meyer, 2009). Die Variante ermöglicht eine um den Faktor 2,5 höhere Synthese (relativ zum Wildtyp-Enzym) von nahezu reinem (*R*)-PAC (*ee* 98,4%) aus Pyruvat und Benzaldehyd unter vollständigem Substratverbrauch (Meyer, 2009).

### 1.5 Spezielle Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Im Verlauf des folgenden Kapitels werden die für diese Dissertation relevanten Enzyme kurz vorgestellt. Für die Nomenklatur der Produkte wird auf Kapitel 1.4.5 verwiesen.

#### 1.5.1 Benzaldehydlyasen

Bisher wurde lediglich eine einzige Benzaldehydlyase beschrieben. Der bakterielle Stamm *Pseudomonas fluorescens* Biovar I wurde aus Holzresten einer Zellulosefabrik isoliert und ist in der Lage, ligninähnliche Verbindungen wie Anisoin (4,4'-Dimethoxybenzoin) und Benzoin zu metabolisieren (González *et al.*, 1986). Diese Lyaseaktivität konnte einer Benzaldehydlyase (*PfBAL*, EC 4.1.2.38) zugeordnet werden (González & Vicuña, 1989). Aldehyde, welche durch die Spaltung der Acyloinbindung von 2-Hydroxyketonen entstehen, werden wahrscheinlich im  $\beta$ -Ketoacid-Weg (Stanier & Ornston, 1973) weiter metabolisiert. Aufgrund von inhibierenden Wirkungen von Aldehyden auf das Enzym wurde 1989 von González und Vicuña beschrieben, dass die Spaltung von 2-Hydroxyketonen irreversibel abläuft (González & Vicuña, 1989). Im Gegensatz dazu gelang es Demir und Mitarbeitern eine C-C-Bindungsbildung im umgekehrten Sinne der C-C-Spaltung zu zeigen (Abb. 13 **A**) (Demir *et al.*, 2001b; Demir *et al.*, 2002).



**Abb. 13: PfBAL-katalysierte Reaktionen.** **A:** Zwei Benzaldehyd-Moleküle werden in einer Carboligationsreaktion der PfBAL zu (R)-Benzoin ligiert. **B:** (R)-Benzoin entsteht durch Carboligation, wird zu Benzaldehyd lysiert und in Anwesenheit von Acetaldehyd (CH<sub>3</sub>CHO) mittels PfBAL zu (R)-2-HPP ligiert. **C:** Wird racemisches Benzoin als Substrat eingesetzt, entsteht in einer Lyasereaktion Benzaldehyd, welches mit Acetaldehyd zu (R)-2-HPP ligiert wird. Aufgrund der strikten (R)-Spezifität der PfBAL wird lediglich das (R)-Benzoin zu Benzaldehyd gespalten und (S)-Benzoin bleibt zurück.

Die Selbstligation von Benzaldehyd zu Benzoin ist eine der typisch PfBAL-katalysierten Reaktionen. Die Reaktion läuft mit einer spezifischen Aktivität von 336 U/mg und einer exzellenten Enantioselektivität von > 99% für (R)-Benzoin ab (Knoll *et al.*, 2006). Die Reaktion ist reversibel. Daher ist auch die Synthese von (R)-2-HPP (*ee* > 99%) ausgehend von (R)-Benzoin und Acetaldehyd möglich. Wird Benzaldehyd als Substrat in die gemischte Carboligation mit Acetaldehyd eingesetzt, so kann (R)-Benzoin als Zwischenprodukt beobachtet werden (Abb. 13 **B**).

Aufgrund eines breiten Substratspektrums für *ortho*-, *meta*- und *para*-substituierte Benzaldehyde sowie aliphatische Aldehyde ist das Enzym für den Einsatz in der organischen Synthese besonders interessant (Demir *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist die PfBAL bezüglich ihrer Eigenschaften zur Spaltung von Acyloinbindungen bisher einzigartig und kann daher zur kinetischen Racematspaltung von racemischen (*rac*-) Benzoin eingesetzt werden. Lediglich das (R)-Benzoin wird gespalten (Abb. 13 **C**) (Demir *et al.*, 2001a; Müller *et al.*, 2009; Stillger, 2004). Aufgrund der strikten (R)-Spezifität der PfBAL führt die Racematspaltung

von *rac*-Benzoin in Anwesenheit von Acetaldehyd zu (*R*)-2-HPP (*ee* > 99%) und zu (*S*)-Benzoin (*ee* > 99%), welches sonst schwer zugänglich ist (Demir *et al.*, 2001a). Eine detaillierte Charakterisierung der Lyaseaktivität der *PfBAL* ergab eine maximale spezifische Aktivität für die Spaltung von racemischen Benzoin von 74 U/mg ( $K_M$ : 0,05 mM) und 3,6 U/mg ( $K_M$ : 0,3 mM) für die Spaltung von (*R*)-2-HPP (Janzen *et al.*, 2006). In weiteren Untersuchungen wurde das Enzym für die Synthese einer Vielzahl aromatischer, aliphatischer und gemischter 2-Hydroxyketone eingesetzt (Demir *et al.*, 2001a; Demir *et al.*, 2002; Domínguez de Maria *et al.*, 2007; Dünkelmann *et al.*, 2002; Janzen *et al.*, 2006).

Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln ist aufgrund der schlechten Löslichkeit aromatischer Substrate in wässrigem Puffer unumgänglich. Ein Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler hat sich sowohl in Hinsicht auf die Löslichkeit aromatischer Substrate als auch auf die Stabilität der *PfBAL* als sehr vorteilhaft erwiesen (Demir *et al.*, 2001a; Demir *et al.*, 2003; Demir *et al.*, 2002). In einer jüngsten Studie wurden die biochemischen Besonderheiten in Abhängigkeit des pH-Wertes, der Ionenstärke und der DMSO-Konzentration in einem mathematischen Modell prognostiziert und experimentell untersucht (Schmidt *et al.*, 2009). Weitere Studien, die sich mit der Synthese von 2-Hydroxyketonen in kontinuierlich arbeitenden Membranreaktoren sowie in wässrig/organischen Zwei-Phasen- oder Festphasen/Gas-Systemen beschäftigen sind in folgenden Publikationen beschrieben: Hildebrand *et al.*, 2007; Kühl *et al.*, 2007; Mikolajek *et al.*, 2007a; Mikolajek *et al.*, 2007b; Mikolajek *et al.*, 2009; Spiess *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006. Neben dem Einsatz von reinem Enzym und Ganzzell-Biokatalysatoren spielt die Immobilisierung von Enzymen in heutigen biotechnologischen Anwendungen eine weitere bedeutende Rolle (Hischer *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2008). Immobilisierte *PfBAL* kann unter anderem für die kontinuierliche Synthese von (*R*)-2-HPP eingesetzt werden (Kurlemann & Liese, 2004; Sopaci *et al.*, 2009), als auch in Zwei-Phasen-Systemen für die Synthese von (*R*)-3,3'-Furoin und weiteren Benzoin-Derivaten (Ansorge-Schumacher *et al.*, 2006; Hischer *et al.*, 2005).

Die Kristallstruktur der *PfBAL* wurde 2005 mit 2,6 Å Auflösung publiziert (Mosbacher *et al.*, 2005) und 2007 auf 1,65 Å verfeinert (Maraite *et al.*, 2007). Basierend auf strukturellen Daten konnten Varianten erzeugt und strukturelle Unterschiede zwischen *PfBAL* und *PpBFD* erklärt werden (Kap. 1.4.6) (Janzen *et al.*, 2006; Knoll *et al.*, 2006).

Sequenzvergleiche über das System BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wiesen zwei putative *bal*-Gene aus dem gram-negativem Bakterium *Rhodopseudomonas palustris* ATCC BAA-98 (Larimer *et al.*, 2004) auf. Das Gen, welches für das Enzym *RpBAL* kodiert, wurde kloniert und charakterisiert (Brosi, 2006). Allerdings zeigt das Enzym keine nennenswerte BAL-spezifische Aktivität (Brosi, 2006; Gocke, 2007).

### 1.5.2 Benzoylformiatdecarboxylasen

Die Aktivität der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* ATCC 12633 (*PpBFD*, EC 4.1.1.7) wurde erstmals 1966 von Hegemann und Mitarbeitern beschrieben (Hegeman *et al.*, 1970). Die *PpBFD* ist das dritte Enzym im Mandelat-Abbauweg von *P. putida* und katalysiert dort die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO<sub>2</sub> (Tsou *et al.*, 1990). Der zu Benzoat umgewandelte Benzaldehyd wird im  $\beta$ -Ketoacid-Weg über mehrere Zwischenprodukte zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA umgewandelt und im Citrat-Zyklus metabolisiert (Stanier & Ornston, 1973). Aus diesem Grund ist es dem Organismus *P. putida* möglich, auf Benzoylformiat (Mandelat, bzw. Mandelsäure) zu wachsen. Das die *PpBFD*-kodierende Gen *mlc* wurde 1990 kloniert (Tsou *et al.*, 1990).

Weitere BFD-Aktivitäten wurden in *Pseudomonas aeruginosa* (Barrowman *et al.*, 1986) und in *Acinetobacter calcoaceticus* (Barrowman & Fewson, 1985) nachgewiesen. Aufgrund zahlreicher Sequenzierungsprojekte ist eine Vielzahl an putativen BFDs ohne jeglichen Nachweis von Aktivität annotiert. Bisher konnte bei sechs weiteren potentiellen BFDs eine Aktivität nachgewiesen werden: 1. BFD aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Wendorff, 2006), 2. BFD aus *P. aeruginosa* PAO 1 (Wendorff, 2006), 3. & 4. BfdB und BfdC aus einer Genombibliothek von *P. putida* ATCC 12633 (Henning *et al.*, 2006), 5. BfdM aus einer Metagenombibliothek (Henning *et al.*, 2006) und 6. BFD aus *Pseudomonas stutzeri* (Saehuan *et al.*, 2007). Allerdings ist die *PpBFD* (auch BfdA) aus *P. putida* ATCC 12633 bis heute die am besten charakterisierte BFD (Iding *et al.*, 2000; Siegert *et al.*, 2005). Das Decarboxylase-Substratspektrum und die kinetischen Parameter wurden ausführlich untersucht. Gegenüber Benzoylformiat besitzt das Enzym verglichen mit den anderen bekannten BFDs die höchste spezifische Aktivität ( $V_{\max}$ : 400 U/mg,  $K_M$ : 0,37 mM) (Gocke *et al.*, 2008). Sterisch anspruchsvollere aromatische oder aliphatische 2-Ketosäuren werden nur in geringem Maße akzeptiert (Iding *et al.*, 2000).

1984 konnte von Chen und Jordan gezeigt werden, dass die Inkubation von Acetaldehyd mit der Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Bildung von Acetoin führte (Chen & Jordan, 1984). Daraufhin stellten 1988 Reynolds und Mitarbeiter die Hypothese auf, dass es auch in der BFD-Katalyse eine solche Reaktion geben müsste (Reynolds *et al.*, 1988). 1992 wurde die durch die *Pp*BFD katalysierte C-C-Bindungsbildung erstmals experimentell verifiziert (Wilcocks & Ward, 1992; Wilcocks *et al.*, 1992). Die Inkubation eines *P. putida*-Ganzzell-Extraktes mit Benzoylformiat und Acetaldehyd führte zu einer (*S*)-2-HPP-Synthese mit einem Enantiomerenüberschuss von 91-92% (Wilcocks *et al.*, 1992). Genauere Analysen der Carboligaseaktivität von gereinigtem *Pp*BFD-Enzym folgten (Demir *et al.*, 1999; Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000). Eine besondere Stellung nimmt die *Pp*BFD in der Synthese von (*S*)-2-Hydroxyketonen ein. Neben der einmalig beschriebenen (*S*)-2-HPP-Synthese durch Inkubation von *A. calcoaceticus*-Zellen mit Benzoylformiat und Acetaldehyd (Prosen & Ward, 1994) stellt die *Pp*BFD eine Ausnahme im Bereich der ThDP-abhängigen Enzyme dar (Kap. 1.4.6). Im Allgemeinen ist das Enzym dazu in der Lage, Acetaldehyd mit verschiedenen aromatischen, heteroaromatischen, zyklisch aliphatischen und olefinischen Aldehyden zu verknüpfen (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen Chemoselektivität für aromatische Donoraldehyde entsteht bei diesen Carboligasereaktionen vorrangig das 2-HPP-Produkt (Dünnelmann *et al.*, 2002). Dies spiegelt sich in den kinetischen Parametern für die Synthese von (*S*)-2-HPP ( $V_{\max}$ : 7 U/mg, 92% *ee*), (*R*)-Benzoin ( $V_{\max}$ : 0,25 U/mg, 99% *ee*) und (*S*)-Acetoin ( $V_{\max}$ : < 0,01 U/mg, 13% *ee*) wider (Domínguez de Maria *et al.*, 2007; Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000; Siegert *et al.*, 2005). Parameter wie Selektivität, Aktivität und Stabilität der *Pp*BFD konnten mittels Optimierung der Reaktionsbedingungen verbessert werden. Des Weiteren konnte der Einfluss der Temperatur und der Benzaldehyd-Konzentration auf den Enantiomerenüberschuss von (*S*)-2-HPP gezeigt werden (Iding *et al.*, 2000).

Unterschiedlichste Methoden zur Erzeugung von Varianten wurden angewendet um eine Verbesserung der Carboligaseaktivität, eine verbesserte Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln und eine Veränderung der sterischen Verhältnisse im aktiven Zentrum zu erreichen (Gocke *et al.*, 2008; Lingen *et al.*, 2002; Lingen *et al.*, 2003; Siegert *et al.*, 2005; Yep *et al.*, 2006). Die Kristallstruktur wurde erstmalig von Hasson und Mitarbeitern mit 1,6 Å aufgelöst (Hasson *et al.*, 1998). Später folgten *Pp*BFD-Kristallstrukturen mit Inhibitoren wie (*R*)-Mandelat (2,8 Å, Polovnikova *et al.*, 2003) und Methylbenzoylphosphonat (1,37 Å,

Brandt *et al.*, 2009). Auf dieser Grundlage sind rationales Proteindesign und Mechanismus-basierende Inhibitor-Studien heutzutage weitaus effizienter als zuvor.

### 1.5.3 Pyruvatdecarboxylasen

Pyruvatdecarboxylasen (PDCs) sind Schlüsselenzyme bei der anaeroben Vergärung von Glukose zu Ethanol und CO<sub>2</sub> (Abb. 14).

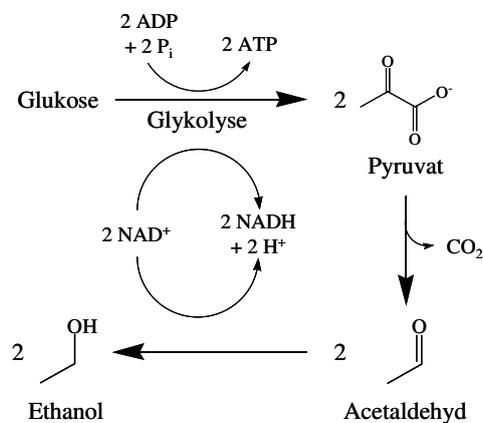


Abb. 14: Alkoholische Gärung (Campbell, 2000).

Durch über zehn enzymatisch katalysierte Schritte entsteht aus Glukose im Verlauf der Glykolyse Pyruvat. Das Pyruvat wird in einer nicht-oxidativen Decarboxylierung mittels PDC zu Acetaldehyd und CO<sub>2</sub> gespalten. Der entstandene Acetaldehyd wird im weiteren Verlauf durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zu Ethanol reduziert (Campbell, 2000; McGill & Dawes, 1971).

PDCs aus verschiedenen Organismen werden bereits seit vielen Jahren untersucht. Auf der Internetseite der Datenbank BRENDA (Chang *et al.*, 2009) befindet sich unter der EC-Nummer 4.1.1.1 eine Fülle an Informationen zu dieser Enzymklasse. Im Folgenden werden einige Beispiele gegeben.

PDCs kommen in vielen Pilzen, Hefen und wenigen Bakterien vor. In Pflanzen findet man PDCs vor allem in keimenden Samen, zum Beispiel in *Oryza sativa* (Reis, Hossain *et al.*, 1996; Rivoal *et al.*, 1990), *Zea mays* (Mais, Forlani, 1999), *Pisum sativum* (Erbse, Mücke *et al.*, 1995) sowie in Holzgewächsen wie *Populus* (Pappel, Nguyen *et al.*, 2009) vor.

Weitere PDCs wurden in diversen Hefen, beispielsweise in Brauhefe (Holzer *et al.*, 1956), *Saccharomyces carlsbergensis* (Hopmann, 1980), *S. cerevisiae* (*ScPDC*, Schmitt & Zimmermann, 1982), *S. kluyveri* (Moller *et al.*, 2004), *Kluyveromyces marxianus* (Holloway & Subden, 1993) und in *Zygosaccharomyces bisporus* (Neuser *et al.*, 2000) beschrieben. In Pilzen (*Neurospora crassa*, Alvarez *et al.*, 1993, *Aspergillus nidulans* Lockington *et al.*, 1997, *Rhizopus oryzae*, Skory, 2003) und Bakterien (gram-negativ: *Zymomonas mobilis* (*ZmPDC*) Dawes *et al.*, 1966, *Zymobacter palmae* (*ZpPDC*) Okamoto *et al.*, 1993 und *Acetobacter pasteurianus* (*ApPDC*) Raj *et al.*, 2001; gram-positiv: *Sarcina ventriculi* (*SvPDC*, Lowe & Zeikus, 1992) wurden ebenfalls PDCs entdeckt. Hingegen wurden in höheren Eukaryoten bisher keine PDCs gefunden.

Die bakterielle PDC aus *Zymomonas mobilis* (*ZmPDC*) ist neben der *ScPDC* ein sehr gut charakterisiertes Enzym. *Z. mobilis* ist ein Modell-Organismus für den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, einem alternativen Weg zur Glykolyse, bei dem Glukose anaerob zu Ethanol und CO<sub>2</sub> umgesetzt wird (Entner & Doudoroff, 1952). 1966 konnte der Stoffwechselweg zur Ethanol-Produktion in *Z. mobilis* aufgeklärt und in Zusammenhang mit der *ZmPDC* gebracht werden (Dawes *et al.*, 1966). *Z. mobilis* weist eine höhere Spezifität gegenüber Glukose und eine höhere Ethanol-Ausbeute auf als der Hefe-Organismus *S. carlsbergensis* (Lee *et al.*, 1979; Rogers *et al.*, 1973). Die *ZmPDC* wurde aus dem Stamm ATCC 29191 isoliert und ausgiebig charakterisiert (Bringer-Meyer *et al.*, 1986; Miczka *et al.*, 1992; Neale *et al.*, 1987; Pohl *et al.*, 1994; Pohl *et al.*, 1995). Erste Mutagenese-Studien wurden auf der Grundlage eines 3D-Strukturmodells, welches auf der Kristallstruktur der *ScPDC* basierte (Arjunan *et al.*, 1996), durchgeführt. Das Interesse lag im Reaktionsmechanismus und im Bereich konservierter Aminosäuren des aktiven Zentrums (Bruhn *et al.*, 1995; Candy & Duggleby, 1994; Candy & Duggleby, 1998; Mesch, 1997; Pohl, 1997; Pohl *et al.*, 1998; Tittmann *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur der *ZmPDC* wurde 1998 publiziert (Dobritzsch *et al.*, 1998) und lieferte die Grundlage für präzise Struktur-Funktions-Analysen.

Erst kürzlich konnten zwei neue PDCs erfolgreich kloniert, exprimiert und in die *Toolbox* (Kap. 1.2) eingegliedert werden: *ApPDC* aus *Acetobacter pasteurianus* ATCC 12874 (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, in Arbeit; Graf, 2005) und *ZpPDC* aus *Zymobacter palmae* ATCC 51623 (Brosi, 2006; Gocke, 2007). *Z. palmae* wurde erstmals als Ethanol-produzierendes Bakterium aus Palmensaft isoliert (Okamoto *et al.*, 1993). Biochemische Analysen bezüglich kinetischer Parameter ( $V_{\max}$ : 130 U/mg;  $K_M$ : 0,24 mM für Pyruvat), des Molekulargewichts und der physikalischen Einflüsse wurden 2002 von Raj und Mitarbeitern durchgeführt (Raj *et al.*,

2002). Die *ApPDC* spielt bei der Umsetzung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO<sub>2</sub> eine zentrale Rolle im Lactat-Metabolismus des acidophilen Bakteriums *A. pasteurianus* (Raj *et al.*, 2001). Gereinigte, rekombinante *ApPDC* wurde hinsichtlich der Decarboxylaseaktivität ausführlich charakterisiert (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, in Arbeit; Graf, 2005; Raj *et al.*, 2002). Ein nennenswerter Aspekt ist die hohe Stabilität der *ApPDC* gegenüber 20% und 30% DMSO. Mit Halbwertszeiten von ~ 430 Stunden sind optimale Voraussetzungen für eine technische Anwendung gegeben (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, in Arbeit).

Wie bereits in Kap. 1.3 erwähnt wurde, haben Neuberg und Hirsch bereits 1921 eine Carboligaseaktivität in fermentierenden Hefe-Zellen beobachtet (Neuberg & Hirsch, 1921). Im Gegensatz zu der *ScPDC* benötigt die *ZmPDC* keine vorgeschaltete Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd für eine Carboligaseaktivität (Bornemann *et al.*, 1993; Rosche *et al.*, 2002). Die Synthese von PAC und PAC-Derivaten ist im Falle der *ZmPDC*-Katalyse strikt (*R*)-spezifisch, jedoch wird (*S*)-Acetoin mit einem Enantiomerenüberschuss von 50-60% gebildet (Bornemann *et al.*, 1993; Bornemann *et al.*, 1996; Bruhn *et al.*, 1995). Die (*R*)-PAC-Synthese konnte mittels zielgerichteter Mutagenese optimiert werden. Die Variante *ZmPDCW392M*, bei der Tryptophan (W) gegen die bedeutend kleinere Aminosäure Methionin (M) ausgetauscht wurde (Pohl, 1997), erbrachte in einem Enzym-Membran-Reaktor eine Raum-Zeit-Ausbeute von 81 g/L/d (Goetz *et al.*, 2001). In weiteren Studien konnten wichtige Reste, die für die Enantioselektivität von Bedeutung sind, identifiziert werden (Pohl, 1997; Pohl *et al.*, 1998; Siegert *et al.*, 2005).

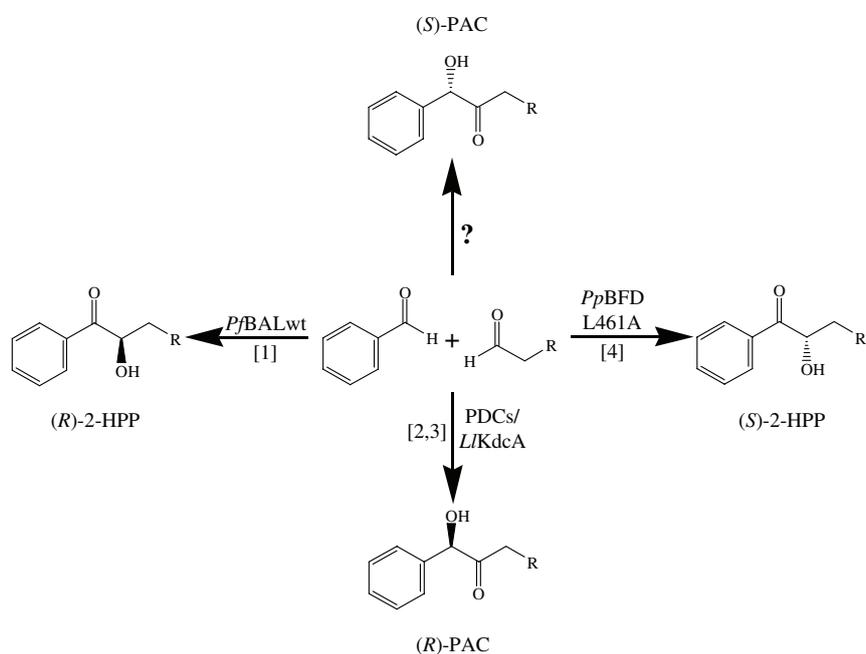
Die Carboligaseaktivität der *ZpPDC* konnte in *Z. palmae*-Ganzzell-Extrakten und in gereinigter Form nachgewiesen werden (Brosi, 2006; Gocke, 2007; Rosche *et al.*, 2003). Die spezifische Aktivität für die *ZpPDC*-katalysierte (*S*)-Acetoin-Synthese liegt bei 2 U/mg (*ee* 58%) und die Ligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd führt zur Bildung von (*R*)-PAC (*ee* 89%). Eine Benzoin-Bildung konnte nicht detektiert werden (Gocke, 2007).

Im Vergleich zu anderen ThDP-abhängigen Decarboxylasen zeigt die *ApPDC* mit 60 U/mg eine signifikant höhere spezifische Aktivität für die Synthese von Acetoin (Gocke *et al.*, in Arbeit). Im Falle der gemischten Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd entsteht, wie bei allen anderen PDCs, (*R*)-PAC als Hauptprodukt (Gocke *et al.*, in Arbeit).

## 2 Motivation und Zielsetzung

Eine Vielzahl Thiamindiphosphat- (ThDP)-abhängiger Enzyme katalysiert die Carbolygation verschiedener Aldehyde zu 2-Hydroxyketonen. Einen bedeutenden Vorteil stellt die Stereoselektivität von Enzymen dar. Bei der chemisch katalysierten Synthese des 2-Hydroxyketons (*R*)-Phenylacetylcarbinol (*R*)-PAC kann beispielsweise lediglich ein Enantiomerenüberschuss von 64% erreicht werden (Toukoniitty *et al.*, 2001), wohingegen der Einsatz diverser ThDP-abhängiger Enzyme zu Enantiomerenüberschüssen von bis zu 99% führen kann (Baykal *et al.*, 2006). Dieser Unterschied kommt unter anderem dadurch zustande, dass sowohl Substrate, als auch Produkte in den aktiven Zentren stabil in eine(r) Richtung/Position gebunden werden. So werden bestimmte Produkte bevorzugt gebildet.

Normalerweise führt die Katalyse mit ThDP-abhängigen Enzymen zu (*R*)-2-Hydroxyketonen. Die Produktpalette enantiokomplementärer (*S*)-2-HPP (-Derivate) konnte bereits mittels zielgerichteter Mutagenese der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*PpBFD*) erweitert werden (Gocke *et al.*, 2008) (Abb. 15).



**Abb. 15: Chemo- und enantioselektive Bildung von gemischten 2-Hydroxyketonen.** Der enzymatische Zugang zu (*S*)-PAC war zu Beginn dieser Dissertation noch nicht beschrieben. [1]: (Demir *et al.*, 2003); [2]: (Bornemann *et al.*, 1993); [3]: (Gocke *et al.*, 2007); [4]: (Gocke *et al.*, 2008).

Ziel dieser Dissertation war die Erweiterung der 2-Hydroxyketon-*Toolbox* mit (*S*)-konfigurierten Produkten. Hierzu sollte einerseits basierend auf der *PpBFD* mit weiteren Punktmutationen der Zugang zu weiteren (*S*)-2-HPP-Derivaten, sowie Einflüsse auf die Stereoselektivität und die Aktivität untersucht werden. Um die isomeren (*S*)-PAC-Derivate zugänglich zu machen, sollte das *S*-Taschen-Konzept auf geeignete Pyruvatdecarboxylasen übertragen werden. Die *ApPDC* erwies sich hier aufgrund der großen *S*-Tasche als geeignet. Die Herstellung diverser Varianten mittels zielgerichteter Mutagenese sollte ein tieferes Verständnis in Bezug auf die Tertiärstruktur ThDP-abhängiger Enzyme erbringen.

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war die Vergrößerung der Enzym-*Toolbox*, mit neuen potentiellen ThDP-abhängigen Enzymen. Durch anders gestaltete sterische Bedingungen in den aktiven Zentren neuer Enzyme könnte der Weg für eine enzymatische Synthese neuer 2-Hydroxyketone geebnet werden. Im Rahmen dieser Dissertation wird auf zwei potentielle Benzaldehydlyasen aus den Organismen *Silicibacter pomeroyi* und *Francisella philomiragia* ssp. *philomiragia*, sowie auf eine neue potentielle Benzoylformiatdecarboxylase aus dem Organismus *Chromobacterium violaceum* (de Almeida *et al.*, 2003) näher eingegangen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Tab. 6: Chemikalien und Enzyme.

| Chemikalien  | Bezugsquelle                                     |
|--|--|
| Antibiotika  | Roth (Karlsruhe, D)                              |
| Bradford-Lösung  | AppliChem (Darmstadt, D)                         |
| 2-Ketobutansäure   | AppliChem (Darmstadt, D)                         |
| 2-Keto-4-phenylbutansäure                                      | (Krix <i>et al.</i> , 1997)                      |
| 2-Keto-5-phenylpentansäure                                     | (Krix <i>et al.</i> , 1997)                      |
| Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH)                          | biomol (Hamburg, D)                              |
| Ni <sup>2+</sup> -Nitrilotriessigsäure (Ni <sup>2+</sup> -NTA) | Qiagen (Hilden, D)                               |
| Polyethylenglykol (PEG) 400                                    | Hüls AG (Marl, D)                                |
| Q-Sepharose <i>Fast Flow</i>                                   | GE-Healthcare (München, D)                       |
| Enzyme   | Bezugsquelle                                     |
| Hefe-Alkoholdehydrogenase                                      | Roche (Mannheim, D)                              |
| Alkoholdehydrogenase (aus Pferdeleber)                         | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)                   |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase                                     | Fermentas (St. Leon-Rot, D)                      |
| <i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase                                | Stratagene (Heidelberg, D)                       |
| Phusion-DNA-Polymerase   | Finnzymes (Espoo, FIN)                           |
| Restriktionsendonukleasen                                      | Fermentas (St. Leon-Rot, D)                      |
| <i>Shrimp alkaline</i> Phosphatase                             | USB Corp. (Ohio, USA)                            |
| T4-DNA-Ligase  | Fermentas (St. Leon-Rot, D); Roche (Mannheim, D) |
| T4-Polynukleotid-Kinase  | Fermentas (St. Leon-Rot, D)                      |
| Längenstandards  | Bezugsquelle                                     |
| Gene Ruler 1kb DNA <i>ladder (ready-to-use)</i>                | Fermentas (St. Leon-Rot, D)                      |
| Page Ruler Plus Prestained Protein <i>ladder</i>               | Fermentas (St. Leon-Rot, D)                      |

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Sternheim, D), Gerbu (Gaiberg, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D).

## 3.1.2 Geräte

Tab. 7: Geräteliste. Alle nicht aufgeführten Geräte entsprachen den allgemeinen Laborstandards.

| Gerät                     | Hersteller                | Bezeichnung               |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Agarose-Gelelektrophorese | Consert                   | EV243/E143                |
|                           | Pharmacia                 | LKB GPS 200/400           |
|                           | Advance                   | Mupid-exu                 |
| Autoklav                  | H+P                       | Varioklav V1500           |
|                           | KSG-Sterilisator          |                           |
| Bilddokumentation         | Stratagene                | Eagle Eye II              |
| Externe Pumpe             | Pharmacia                 | Peristaltic Pump P1       |
|                           | Abimed Gilson             | Minipuls 3                |
| Externes Thermometer      | Amarell                   | ama-digit ad 15 th        |
| Feinwaage                 | Sartorius                 | CP 224S                   |
| Fermenter                 | Infors AG                 | Techfors I                |
| Flüssigchromatograph      | Amersham Bioscience       | Äkta basic, Äkta explorer |
| Gefriertrockner           | Steris                    | Lyovac GT2                |
| Heizblock                 | Stuart                    | SBH130D                   |
| Heizschrank               | Memmert                   |                           |
| Magnetrührer              | IKA Labortechnik          | RCT basic                 |
| Mehrkanalpipetten         | Eppendorf                 | research                  |
| Millipore Anlage          | Millipore Corporation     | Milli-Q                   |
| PCR-Automat               | Eppendorf                 | Mastercycler gradient     |
| pH-Elektrode              | Nordantec GmbH            | pH Electrode IJ44         |
| pH-Meter                  | Knick                     | pH Meter 766 Calimatic    |
| Pipetten                  | Eppendorf                 | research                  |
| Rotoren                   | Dupont                    | SLC-4000/SS-34            |
|                           | Eppendorf                 | F-45-12-11                |
|                           | Heraeus                   | 7500 3328                 |
|                           | Hettich                   | 001535                    |
| Scanner                   | hp                        | scanjet 5400C             |
| Schüttelinkubator         | GFL                       | 3033                      |
|                           | Biotron Labortechnik GmbH | HT                        |
| Schüttler                 | IKA Labortechnik          | KS 250 basic              |
| SDS-Stromgerät            | BioRad                    | 1000/500 Power supply     |
|                           | BioRad                    | Power Pac 300             |
| Sonotrode                 | Dr. Hielscher GmbH        | S1, S3, SD14              |
| Spektralphotometer        | Beckmann                  | DU 650                    |
| Thermomixer               | Eppendorf                 | Thermomixer comfort       |
| Tischautoklav             | KSG                       | 25-2-3                    |
| Ultraschallbad            | Bandelin                  | Sonorex                   |
| Ultraschallprozessor      | Dr. Hielscher GmbH        | UP 200S                   |
|                           | Bio-Budget                | 40-ECX-20L                |
| UV-Tisch                  | MWG Biotech               |                           |
|                           | Heidolph                  |                           |
| Vortexer                  | Stuart                    | Reax 2000                 |
| Waage                     | Sartorius                 |                           |
| Wasserbad                 | B. Braun                  | Thermomix M               |
|                           | Eppendorf                 | Mini Spin                 |
| Zentrifugen               | Heraeus                   | Biofuge pico              |
|                           | Hettich                   | Rotina 35R                |
|                           | Dupont                    | Sorvall RC-5B/RC-5B plus  |
|                           |                           |                           |

### 3.1.3 Computerprogramme und Datenbanken

Tab. 8: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken.

| Bezeichnung                     | Hersteller oder Referenz  |
|---------------------------------|---|
| BLAST                           | NCBI (National Center for Biotechnology Information)<br><a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>                   |
| BioEdit                         | Ibis Bioscience (Carlsbad, USA)   |
| ChemDraw 7.0                    | CambridgeSoft (Cambridge, USA)  |
| Clone Manager 7                 | Scientific & Educational Software (Cary, USA)   |
| ClustalW2                       | European Bioinformatic Institute (EBI) (Cambridge, UK)<br><a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a> |
| DoubleDigest™                   | Fermentas (St-Leon-Rot, D)<br><a href="http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html">http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html</a>                           |
| ExpASY Molecular Biology Server | Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (Lausanne, CH)<br><a href="http://www.expasy.ch/">http://www.expasy.ch/</a>   |
| ISI Web of Knowledge            | <a href="http://apps.isiknowledge.com">http://apps.isiknowledge.com</a><br>(London, UK)   |
| ORIGIN 7                        | Microcal Software Inc. (Northampton, USA)   |
| Pymol 0.99rc6                   | De Lano Scientific LLC (Palo Alto, CA)  |
| Unicorn 5.10                    | GE Healthcare (München, D)  |
| Tm-calculator                   | <a href="http://www.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/">http://www.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/</a>   |
| Codon usage optimizer           | <a href="http://www.evolvingcode.net">http://www.evolvingcode.net</a> (Wu & Zhang, 2006)  |
| QuikChange®Primer Design        | <a href="http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx">http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx</a><br>Stratagene (Heidelberg, D)                       |
| RCSB Protein Data Bank          | Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)<br><a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>                  |

### 3.1.4 Bakterienstämme

Tab. 9: Verwendete Bakterienstämme.

| Stamm                                  | Genotyp  | Bezugsquelle               |
|--|--|----------------------------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)               | F', <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3), <i>pLysS</i> , Cm <sup>R</sup>   | Promega (Mannheim, D)      |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$            | F', $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\lambda$ | Invitrogen (Karlsruhe, D)  |
| <i>E. coli</i> XL1blue                 | $\Delta$ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proABlacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tc <sup>R</sup> )]  | Stratagene (Amsterdam, NL) |
| <i>Silicibacter pomeroyi</i> DSM 15171 | Wildtyp  | DSMZ (Braunschweig, D)     |

## 3.1.5 Plasmide

Tab. 10: Verwendete Plasmide.

| Plasmid                           | Merkmal   | Bezugsquelle                                  |
|-----------------------------------|---|---|
| pGEM <sup>®</sup> -T              | linearisiert mit <i>EcoRV</i> , T-Überhänge am 3' Ende, T7-Promotor, <i>lacZ</i> , f1-ori, Amp <sup>R</sup> | Promega (Mannheim, D)                         |
| pBluescript II KS(+)              | T7-Promotor, lac-Promotor, <i>lacZ</i> , ColE1, f1-ori, pUC-ori, Amp <sup>R</sup>                           | Stratagene (Amsterdam, NL)                    |
| pET22b(+)                         | T7-Promotor, <i>lacI</i> , C-terminaler Hexahistidin-Tag, f1-ori, Amp <sup>R</sup>                          | Novagen (Gibbstown, USA)                      |
| pET28a(+)                         | T7-Promotor, <i>lacI</i> , N- und C-terminaler Hexahistidin-Tag, T7-Tag, f1-ori, Kan <sup>R</sup>           | Novagen (Gibbstown, USA)                      |
| <i>PpBFDwt</i> /pkk233_2          | pkk233_2 mit inseriertem Gen für <i>PpBFDwt</i> (über <i>NcoI</i> , <i>BglII</i> ), Amp <sup>R</sup>        | (Iding <i>et al.</i> , 2000)                  |
| <i>PpBFDL461G</i>                 | pkk233_2 mit inseriertem Gen für <i>PpBFDL461G</i> , Amp <sup>R</sup>                                       | Diese Arbeit                                  |
| <i>PpBFDL461G/H281A</i>           | pkk233_2 mit inseriertem Gen für <i>PpBFDL461G/H281A</i> , Amp <sup>R</sup>                                 | Diese Arbeit                                  |
| <i>PpBFDL461G/L476Q</i>           | pkk233_2 mit inseriertem Gen für <i>PpBFDL461G/L476Q</i> , Amp <sup>R</sup>                                 | Diese Arbeit                                  |
| <i>PpBFDA460G/L476Q</i>           | pkk233_2 mit inseriertem Gen für <i>PpBFDA460G/L476Q</i> , Amp <sup>R</sup>                                 | Diese Arbeit                                  |
| <i>ApPDCwt</i> /pET22b            | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCwt</i> (über <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> ), Amp <sup>R</sup>           | (Gocke <i>et al.</i> , in Arbeit; Graf, 2005) |
| <i>ApPDCW388I</i>                 | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCW388I</i> , Amp <sup>R</sup>   | (Gerhards, 2009)                              |
| <i>ApPDCW388A</i>                 | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCW388A</i> , Amp <sup>R</sup>   | (Gerhards, 2009)                              |
| <i>ApPDCE469G</i>                 | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCE469G</i> , Amp <sup>R</sup>   | Diese Arbeit                                  |
| <i>ApPDCE469D</i>                 | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCE469D</i> , Amp <sup>R</sup>   | Diese Arbeit                                  |
| <i>ApPDCE469Q</i>                 | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCE469Q</i> , Amp <sup>R</sup>   | Diese Arbeit                                  |
| <i>ApPDCI468A/E469D</i>           | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCI468A/E469D</i> , Amp <sup>R</sup>                                   | Diese Arbeit                                  |
| <i>ApPDCI468A</i>                 | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCI468A</i> , Amp <sup>R</sup>   | Diese Arbeit                                  |
| <i>ApPDCW388A/E469G</i>           | pET22b mit inseriertem Gen für <i>ApPDCW388A/E469G</i> , Amp <sup>R</sup>                                   | Diese Arbeit                                  |
| <i>CvBFDwt_C-His</i> /pBluescript | pBluescript mit inseriertem Gen für <i>CvBFD_C-His</i> (über <i>SmaI</i> ), Amp <sup>R</sup>                | Diese Arbeit                                  |
| <i>CvBFDwt_C-His</i> /pET22b      | pET22b mit inseriertem Gen für <i>CvBFD_C-His</i> (über <i>NdeI</i> ; <i>XhoI</i> ), Amp <sup>R</sup>       | Diese Arbeit                                  |
| <i>SpBALwt_C-His</i> /pGEM-T      | pGEM-T mit inseriertem Gen für <i>SpBAL_C-His</i> (über <i>SmaI</i> ), Amp <sup>R</sup>                     | (Gerhards, 2009)                              |
| <i>SpBALwt_C-His</i> /pET22b      | pET22b mit inseriertem Gen für <i>SpBAL_C-His</i> (über <i>NdeI</i> ; <i>XhoI</i> ), Amp <sup>R</sup>       | (Gerhards, 2009)                              |
| <i>SpBALwt_N-His</i> /pBluescript | pBluescript mit inseriertem Gen für <i>SpBAL_N-His</i> (über <i>SmaI</i> ), Amp <sup>R</sup>                | (Gerhards, 2009)                              |
| <i>SpBALwt_N-His</i> /pET28a      | pET28a mit inseriertem Gen für <i>SpBAL_N-His</i> (über <i>NdeI</i> ; <i>XhoI</i> ), Kan <sup>R</sup>       | (Gerhards, 2009)                              |
| <i>FpBALwt</i> /pUC57             | pUC57 mit inseriertem synthetischen Gen für <i>FpBALwt</i> , Amp <sup>R</sup>                               | Eurogentec (Seraing, B)                       |
| <i>FpBALwt_C-His</i> /pET22b      | pET22b mit inseriertem Gen für <i>FpBALwt_C-His</i> (über <i>NdeI</i> ; <i>NotI</i> ), Amp <sup>R</sup>     | (Gerhards, 2009)                              |

## MATERIAL & METHODEN

|                                    |  |                        |
|------------------------------------|--|------------------------|
| HL-ADH <sub>rek</sub> /pPCR_Script | pPCR_Script mit inseriertem synthetischen Gen für HL-ADH <sub>rek</sub> , Amp <sup>R</sup>               | Sloning (Punchheim, D) |
| HL-ADH <sub>rek</sub> /pET28a      | pET28a mit inseriertem Gen für HL-ADH <sub>rek</sub> (über <i>NdeI</i> ; <i>NotI</i> ), Kan <sup>R</sup> | Diese Arbeit           |

### 3.1.6 Oligodesoxyribonukleotide (*Primer*)

Tab. 11: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide (*Primer*).

| Bezeichnung                | Sequenz (5' → 3')                                 |
|----------------------------|---|
| <i>PpBFDL461G_up</i>       | GGC ACC TAC GGT GCG ggc CGA TGG TTT GCC GGC       |
| <i>PpBFDL461G_down</i>     | GCC GGC AAA CCA TCG gcc GCG ACC GTA GGT GCC       |
| <i>PpBFDA460G_up</i>       | AAC GGC ACC TAC GGT ggc TTG CGA TGG TTT GCC       |
| <i>PpBFDA460G_down</i>     | GGC AAA CCA TCG CAA gcc ACC GTA GGT GCC GTT       |
| <i>ApPDCW388I_up</i>       | GTG GCA GAA ACC GGC GAT TCA att TT                |
| <i>ApPDCW388I_down</i>     | GCG CAT GGC ATT GAA aat TGA ATC G                 |
| <i>ApPDCW388A_up</i>       | GTG GCA GAA ACC GGC GAT TCA gcg TT                |
| <i>ApPDCW388A_down</i>     | GCG CAT GGC ATT GAA cgc TGA ATC G                 |
| <i>ApPDCE469G_up</i>       | CGT GGC TAT GTC ATT ggc ATC GCC ATT CAT GAC GGC   |
| <i>ApPDCE469G_down</i>     | GCC GTC ATG AAT GGC GAT gcc AAT GAC ATA GCC ACG   |
| <i>ApPDCE469D_up</i>       | CGT GGC TAT GTC ATT gat ATC GCC ATT CAT GAC GGC   |
| <i>ApPDCE469D_down</i>     | GCC GTC ATG AAT GGC GAT atc AAT GAC ATA GCC ACG   |
| <i>ApPDCE469Q_up</i>       | CGT GGC TAT GTC ATT caa ATC GCC ATT CAT GAC GGC   |
| <i>ApPDCE469Q_down</i>     | GCC GTC ATG AAT GGC GAT ttg AAT GAC ATA GCC ACG   |
| <i>ApPDCI468A_up</i>       | ATC AAC AAC CGT GGC TAT GTC gac GAA ATC GCC       |
| <i>ApPDCI468A_down</i>     | GGC GAT TTC gtc GAC ATA GCC ACG GTT GTT GAT       |
| <i>L/KdcAE462G_up</i>      | AAC AAC CGT GGC TAT GTC ATT gga ATC GCC ATT CAT G |
| <i>L/KdcAE462G_down</i>    | TTG TTG GCA CCG ATA CAG TAA cct TAG CGG TAA GTA C |
| <i>CvBFDwt_up</i>          | CAT ATG AGC GTG GAC GAG GCA GGG G                 |
| <i>CvBFDwt_down</i>        | CTC GAG GAA GAT CAC CGG CAC GTT G                 |
| <i>CvBFD-intern-seq_up</i> | AAC CCC ATC ATC GTC A                             |
| <i>SpBALwt_C-His_up</i>    | CAT ATG AAC GCC CAC ACC AGG AT                    |
| <i>SpBALwt_C-His_down</i>  | CTC GAG CTC GAT CGA GGC CTT GT                    |
| <i>SpBALwt_N-His_up</i>    | CAT ATG AAC GCC CAC ACC AGG AT                    |
| <i>SpBALwt_N-His_down</i>  | CTC GAG TCA CTC GAT CGA GGC C                     |

Triplets in Kleinbuchstaben zeigen die Positionen, an der eine Mutation eingebracht wurde.

## 3.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterienstämmen

### 3.2.1 Nährmedien

Alle Flüssig- und Festmedien wurden 20 min bei 121°C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Für eine Anzucht von Bakterienstämmen unter Plasmid-kodiertem Selektionsdruck wurde hitzelabiles Ampicillin [100 µg/ml] oder Kanamycin [50 µg/ml] vor der Verwendung sterilfiltriert (Membranfilter, Porendurchmesser ≤ 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) und dem autoklaviertem Medium bei einer Temperatur ≤ 60°C zugesetzt.

LB-Medium (pH 7,0) (Sambrook & Russell, 2001): 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefe-Extrakt

LB-Platten: 15 g/l Agar

### 3.2.2 Kultivierung von Flüssig- und Plattenkulturen

*E. coli*-Kulturen wurden entweder aus einer Gefrierkultur oder mittels Einzelkolonien einer Platte inokuliert. Bakterienstämme mit Plasmid-kodierender Antibiotikaresistenz wurden unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Kulturmengen bis zu 5 ml wurden in sterilen Reagenzgläsern, größere Kulturmengen in Erlenmeyerkolben bei 30 – 37°C und 120 Upm über Nacht inkubiert.

Für Plattenkulturen wurden *E. coli*-Bakterienstämme aus einer Gefrierkultur, einer Übernachtskultur oder einem Transformationsansatz mit einem Drigalski-Spatel auf LB-Platten, mit oder ohne Antibiotika, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutraum aerob inkubiert.

### 3.2.3 Kultivierung von Proteinexpressionskulturen

Proteinexpressionskulturen wurden in 1 L LB-Medium (Kap. 3.2.1) in 5 L Erlenmeyerkolben angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 – 0,2 aus einer Vorkultur inokuliert, bei unterschiedlichen Temperaturen (25 – 30°C) und 120 Upm inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3 – 0,7 durch Zugabe von 0,1 – 1 mM IPTG. Anschließend wurden die Kulturen für 4 – 17 h bei 25 – 30°C bis zur Zellernte inkubiert.

### 3.2.4 Hochzelldichte-Kultivierung

Die Hochzelldichte- (HZD)-Kultivierung ausgewählter Bakterienstämme erfolgte im 15 L Maßstab in einem Techfors I-Fermenter (40 L) entsprechend dem Protokoll von Korz *et al.*, 1995. 10 L Batch-Medium wurden mit 100 ml einer Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Über den gesamten Zeitraum der Fermentation wurde kontinuierlich HZD-Feed-Lösung zugeführt. Die Induktion der Expression erfolgte nach ca. 27 h mit 2 mM IPTG. Der pH-Wert wurde konstant bei pH 7,0 gehalten und wenn nötig mit 25% (v/v) NH<sub>3</sub> oder 85% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> titriert. Der Sauerstoffpartialdruck wurde zwischen 30 und 40% gehalten. Die Zellernte erfolgte ca. 14 h nach Induktion.

Hochzelldichte-Medium (Korz *et al.*, 1995):

HZD-Batch: 2g/l NH<sub>4</sub>Cl, 20 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 30 g/l Hefeextrakt

HZD-Feed: 500 ml HZD-Batch + 75 g Hefeextrakt

MgSO<sub>4</sub>-Lösung: 200 g/l MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O

Glukose-Batch: 400 g/l Glukose

Glukose-Feed: 717 g/l Glukose

Spurenelemente-Lösung (in 5 M HCl): 10 g/l CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/l ZnSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O; 0,25 g/l CuSO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O; 2,5 g/l MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 1,75 g/l CoCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O; 0,125 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2,5 g/l AlCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O; 10 g/l FeSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O

Vitamin-Lösung: 0,1 g/l Riboflavin; 10 g/l Thiamin-HCl; 0,5 g/l Nicotinsäure; 0,5 g/l Pyridoxin-HCl; 0,5 g/l Ca-Phanthotenat; 0,001 g/l Biotin; 0,002 g/l Folsäure; 0,01 g/l Cyanocobalamin

Thiamin-Lösung: 200 g/l Thiamin-HCl

Antibiotika-Lösung: 200 g/l Ampicillin oder 75 g/l Kanamycin

IPTG-Lösung: 233 g/l IPTG

Die Lösungen HZD-Batch, HZD-Feed, MgSO<sub>4</sub>-Lsg., Glukose-Batch und Glukose-Feed wurden getrennt voneinander autoklaviert. Durch ihren niedrigen pH-Wert war die Spurenelemente-Lösung autosteril. Die übrigen Lösungen wurden mittels eines Membranfilters (0,2 µm, Carl Roth) sterilisiert.

Aus den oben aufgeführten Komponenten wurde folgendermaßen ein Batch-Medium und eine HZD-Feed-Lösung zusammengestellt:

Batch-Medium: 1000 ml HZD-Batch, 50 ml Glukose-Batch, 50 ml MgSO<sub>4</sub>-Lsg., 40 ml Spurenelement-Lsg., 50 ml Vitamin-Lsg., 5 ml Thiamin-Lsg., 3 ml Antischaum (Antifoam Sigma AF 289), 8700 ml VE-H<sub>2</sub>O.

HZD-Feed-Lösung: 500 ml HZD-Feed, 4180 ml Glukose-Feed, 250 ml MgSO<sub>4</sub>-Lsg., 20 ml Spurenelement-Lsg., 25 ml Vitamin-Lsg., 25 ml Thiamin-Lsg., 2 ml Antischaum (Antifoam Sigma AF 289).

### **3.2.5 Bestimmung der Zelldichte**

Zur Messung des Zellwachstums wurde die optische Dichte (OD) einer Kultur in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm relativ zum jeweiligen Medium bestimmt. Eine OD<sub>600</sub> von 1 entsprach etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

### **3.2.6 Lagerung von Bakterienstämmen**

Für eine langfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden Gefrierkulturen mit DMSO oder Glycerin angelegt. 1,3 ml einer Kultur wurden mit 0,1 ml DMSO versetzt und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung einer Glycerin-Gefrierkultur wurde die entsprechende Kultur 1:2 (für die Lagerung bei -80°C) oder 1:5 (Lagerung bei -20°C) mit Glycerin versetzt.

Sedimentierte Zellen aus Proteinexpressionskulturen (Kap. 3.2.3), die nicht direkt nach der Expression benötigt wurden, konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Nukleinsäureisolierungen und –reinigungen

##### 3.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA in geringen Mengen wurde aus 1,5 – 5 ml *E. coli*-Kultur (Kap. 3.2.2) gemäß den Herstellerangaben mit unterschiedlichen Kits durchgeführt: „Gene JET Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot, D), „pepGold Plasmid Miniprep Kit II“ (peqLab, Erlangen, D), „plasmiddna-ols“-Kit (omni life science, Hamburg, D) oder „innuPREP Plasmid Mini Kit“ (analytik jena, Jena, D). Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte jeweils in Millipore-H<sub>2</sub>O.

Wurden größere Mengen an DNA benötigt, so wurde die Präparation aus einer 50 ml-Kultur mit dem „Qiagen High speed Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden, D) oder dem „NucleoBond Xtra Midi“-Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte auch hier in Millipore-H<sub>2</sub>O.

##### 3.3.1.2 Präparation genomischer DNA

Genomische DNA aus dem Bakterium *Silicibacter pomeroyi* wurde mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerangaben präpariert. Die genomische DNA wurde abweichend vom Protokoll durch Millipore-H<sub>2</sub>O eluiert.

##### 3.3.1.3 Ethanolfällung

Proben mit geringer DNA-Konzentration wurden mittels Ethanol und Natriumacetat gefällt (Sambrook & Russell, 2001). Nach Zugabe des 2,5 – 3-fachen Volumen eiskalten absoluten Ethanols und 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat wurde der Ansatz für 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Die als Natriumsalz präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 13.400 Upm, RT) sedimentiert und bei 37°C oder Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die DNA in Millipore-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **3.3.1.4 Elution von DNA aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden mit dem „Qiaex II-Kit“ (Qiagen, Hilden, D) gemäß den Herstellerangaben aus Agarosegelen (Kap. 3.3.3) isoliert.

#### **3.3.1.5 PCR-Produktreinigung**

PCR-Produkte (Kap. 3.3.2.3) wurden mit dem „Qiaex II-Kit“ (Qiagen, Hilden, D) gemäß den Herstellerangaben entsalzt.

### **3.3.2 Nukleinsäuremodifikationen**

#### **3.3.2.1 Restriktion**

1 – 2 µg DNA wurden mit 1 – 2 Einheiten (Units, U) der jeweiligen Restriktionsendonuklease unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen 1 – 2 h bei 37°C (Ausnahme z.B.: *SmaI* bei 30°C) inkubiert. Während der Inkubation erfolgt eine hydrolytische Spaltung an einer, für jedes Enzym spezifischen Signalsequenz in der DNA. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte über eine gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.3.3).

#### **3.3.2.2 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren**

Restriktionsendonukleasen, die dazu führen, dass am 5'- sowie am 3'-Ende des DNA-Stranges kein Überhang von ein oder zwei Basen entsteht, führen zu so genannten glatten Enden (*blunt-end*). Um die Religation eines restringierten Vektors zu vermeiden, wurde dieser mittels *Shrimp alkaline* Phosphatase (SAP) nach Herstellerangaben an den 5'-Enden dephosphoryliert. Die zu inserierende DNA wurde mittels T4-Polynukleotid-Kinase ebenfalls nach Herstellerangaben phosphoryliert. So konnte die Ligationseffizienz gesteigert werden.

### 3.3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine Standard-PCR (modifiziert nach Mullis & Faloona, 1987) besteht aus einem Denaturierungsschritt, einer Hybridisierungsphase und einem Elongationsschritt. Bei dem Denaturierungsschritt wird der Ansatz auf 98°C erhitzt und die beiden Stränge der Matrizen-DNA (Ausgangs-DNA) werden getrennt. In der Hybridisierungsphase wird die Temperatur gesenkt, um den Oligodesoxyribonukleotiden (*Primer*) Gelegenheit zu geben an beide Stränge der Matrizen-DNA zu hybridisieren. Die Temperatur für diese Phase richtet sich hauptsächlich nach der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der *Primer* [Richtwert:  $(T_{m1}+T_{m2})/2 - 5^\circ\text{C}$ ]. Im Elongationsschritt wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht. Für die Phusion-DNA-Polymerase liegt dieses Optimum bei 72°C, für die *Pfu*-DNA-Polymerase bei 68°C und für die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase bei 68 – 72°C. Die Elongationszeit wurde an die Länge des erwarteten Produkts und an die Syntheseleistung der verwendeten Polymerase (Phusion-DNA-Polymerase: 15 – 30 sek/kb, *Pfu*-DNA-Polymerase: 120 sek/kb, *PfuTurbo*-DNA-Polymerase: 60 sek/kb) angepasst. Dadurch, dass sich die *Primer* an beide Stränge der Matrizen-DNA anlagern, verdoppelt sich der amplifizierte Bereich in jedem Zyklus. Dementsprechend erhält man nach 25 – 40 Zyklen eine ausreichende Menge an amplifizierter DNA.

#### Standardansatz einer PCR:

|                            |              |
|----------------------------|--------------|
| <i>Primer_up</i>           | 5 – 100 pmol |
| <i>Primer_down</i>         | 5 – 100 pmol |
| dNTP's                     | 0,2 mM       |
| Matrizen-DNA               | 1 – 100 ng   |
| DNA-Polymerase             | 0,5 – 1 U    |
| Polymerase-Puffer          | 1 x          |
| Millipore-H <sub>2</sub> O | ad 50 µl     |

#### Standardprotokoll einer PCR:

|  |           |             |
|--|-----------|-------------|
| 1.) Initiale Denaturierung                 | 98°C      | 1 min       |
| 2.) Denaturierung                          | 98°C      | 1 min       |
| 3.) Hybridisierung                         | 55 – 65°C | 0,5 – 1 min |
| 4.) Elongation                             | 68 – 72°C | 0,5 – 5 min |
| 5.) zurück zu Schritt 2.), Zyklusfunktion: |           | 25 – 40 x   |
| 6.) Finale Elongation                      | 72°C      | 1 – 10 min  |
| 7.) Kühlung                                | 4°C       | ∞           |

Durch die Zugabe von Additiven kann das Auftreten von Sekundärstrukturen, wie zum Beispiel Haarnadelschleifen in GC-reichen Regionen verhindert, und/oder Ausbeute erhöht werden. 0,2 M Betain, 1 – 10% (v/v) DMSO und 5 – 20% (v/v) Glycerin optimieren die Denaturierung der Matrizen-DNA und verringern das Risiko zur Bildung von Sekundärstrukturen (Henke *et al.*, 1997; Ralser *et al.*, 2006).

Weitere Anwendungen für die Methode der PCR werden in Kapitel 3.3.2.4 erläutert.

#### **3.3.2.4 Zielgerichtete Mutagenese**

Mittels zielgerichteter Mutagenese ist es möglich eine oder mehrere spezifische Mutationen im Elongationsschritt einer PCR (Kap. 3.3.2.3) einzufügen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der QuikChange<sup>®</sup> (Stratagene, Heidelberg, D) verwendet.

Als Matrizen-DNA dienten *dam* methylierte Plasmide aus Bakterienstämmen mit intaktem Methylierungssystem. Oligodesoxynukleotide (Tab. 11), welche die gewünschte Mutation tragen, lagern sich an den komplementären DNA-Strang an und werden mittels *PfuTurbo*-DNA-Polymerase in der Elongationsphase einer PCR verlängert. Im Anschluss daran wurde die *dam* methylierte Matrizen-DNA durch Zugabe von 1 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* hydrolysiert. Halb-methylierte DNA kann durch Hybridbildung zwischen parentaler Matrizen-DNA und des amplifizierten PCR-Produktes zustande kommen und wird ebenfalls von der Restriktionsendonuklease *DpnI* erkannt und hydrolysiert. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ - oder XL1blue-Zellen (Kap. 3.3.5.2) mit 1 – 5  $\mu$ l des Ansatzes transformiert (Kap. 3.3.5.3).

Potentielle Varianten wurden mittels Sequenzierung (Sequiserve, Vaterstetten, D) verifiziert.

##### Standardansatz einer QuikChange<sup>®</sup>-PCR:

|                                 |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| <i>Primer_up</i>                | 125 ng                 |
| <i>Primer_down</i>              | 125 ng                 |
| dNTP's                          | 0,2 mM                 |
| Matrizen-DNA                    | 5-50 ng                |
| <i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase | 2,5 U [2,5 U/ $\mu$ l] |
| 10 x Polymerase-Puffer          | 1 x                    |
| Millipore-H <sub>2</sub> O      | ad 50 $\mu$ l          |

## MATERIAL & METHODEN

---

### Standardprotokoll einer QuikChange®-PCR:

|  |           |             |
|--|-----------|-------------|
| 1.) Initiale Denaturierung                 | 95°C      | 1 min       |
| 2.) Denaturierung                          | 95°C      | 1 min       |
| 3.) Hybridisierung                         | 65 – 72°C | 0,5 – 1 min |
| 4.) Elongation                             | 72°C      | 1 min/kb    |
| 5.) zurück zu Schritt 2.), Zyklusfunktion: |           | 25 – 30 x   |
| 6.) Finale Elongation                      | 72°C      | 1 min/kb    |
| 7.) Kühlung                                | 4°C       | ∞           |

Auch hier wurden, wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben, wenn nötig Additive hinzugefügt.

### **3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

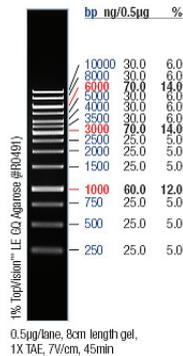
Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine effektive Methode, um DNA-Fragmente von 0,1 – 25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren (Sambrook & Russell, 2001). Sie basiert auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuren besitzen auf Grund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente hängt von ihrem Molekulargewicht, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente erfolgte die Auftrennung in 0,5% – 2%igen Agarosegelen. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid-Lösung [1 µg/10 ml] versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 20% 5 x DNA-Probenpuffer versetzt und sofort in die Taschen eines horizontalen Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese wurde in Gelkammern bei einer auf 60 mA limitierten Stromstärke und konstanten Spannungen zwischen 8 und 12 V/cm Gellänge mit 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Als Längenstandard wurde der „Gene Ruler 1kb DNA ladder“ (Fermentas, St. Leon Rot, D) verwendet.

TBE-Puffer (5 x): 89 mM Tris/HCl; 89 mM Borsäure; 0,5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

Probenpuffer (5 x): 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 43% (v/v) Glycerin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Lösung: Ethidiumbromid (Biorad, München, D)

### 3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren



Die Konzentrationen von DNA-Proben wurden mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.3.3) anhand des Längensstandards „Gene Ruler 1kb DNA ladder“ (Fermentas, St. Leon Rot, D), welcher distinkte Mengen an DNA beinhaltet, abgeschätzt.

Abb. 16: „Gene Ruler 1kb DNA ladder“. Quelle: <http://www.fermentas.com>

### 3.3.5 Klonierung

Unter dem Begriff Klonierung (griech: *klōn*, der abgebrochene Zweig, der für die vegetative Vermehrung von Rebstöcken oder Obstbäumen verwendet wird) versteht man die Vermehrung eines bestimmten DNA-Moleküls in Wirtszellen. Durch das schnelle Wachstum der Wirtszellen findet eine enorme Vermehrung des DNA-Moleküls statt.

#### 3.3.5.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter Hydrolyse von ATP die kovalente Bindung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden. Ligationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 15 – 20 µl durchgeführt. DNA-Fragmente wurden in einem 3 – 5-fachen molaren Überschuss zu restringierter Vektor-DNA gegeben. Die Inkubation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 – 2 h bei Raumtemperatur oder 16°C, über Nacht bei 16°C oder 4°C. Chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen (Kap. 3.3.5.2) wurden mit 1 – 3 µl des Ligationsansatzes transformiert (Kap. 3.3.5.3).

#### 3.3.5.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 5 ml-Vorkultur (Kap. 3.2.2) des entsprechenden Bakterienstammes über Nacht angezogen. Anschließend wurden 50 ml LB-Medium (Kap. 3.2.1) mit 0,5 ml der Vorkultur inokuliert, mit 1 ml Mg<sup>2+</sup>-Mix

## **MATERIAL & METHODEN**

---

versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert wurden (15 min, 5000 Upm, 4°C), wurde das Sediment in 50 ml eiskaltem TMF-Puffer vorsichtig resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 4000 Upm, 4°C) wurde das Sediment in 4 ml eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen und mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt. 200 µl-Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

TMF-Puffer: 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM RbCl, 40 mM MnCl<sub>2</sub>

Mg<sup>2+</sup>-Mix: 500 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM MgSO<sub>4</sub>

Beide Lösungen wurden in Millipore-H<sub>2</sub>O angesetzt und anschließend 20 min bei 121°C und 200 kPa autoklaviert. Der TMF-Puffer wurde nach der Sterilisation bei 4°C gelagert.

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

Für eine chemische Transformation wurden 1 – 5 µl Plasmid-DNA mit 200 µl kompetenten *E. coli*-Zellen (Kap. 3.3.5.2) gemischt (Hanahan, 1983). Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 90 sek bei 42°C. Im Anschluss wurden die Transformationsansätze 5 min auf Eis inkubiert. Nachdem 700 µl LB-Medium (Kap. 3.2.1) hinzu gegeben wurden erfolgte die phänische Expression für 1,5 – 3 h bei 37°C auf einem Brutroller. Die Transformationsansätze wurden mit einem Drigalski-Spatel zu 1/10 und zu 9/10 auf LB-Platten, je nach Plasmid-kodierter Resistenz mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37°C aerob inkubiert.

### **3.3.6 Sequenzierung von DNA**

Alle Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, D) durchgeführt. Für eine Sequenzierung mussten mindestens 300 ng eines Plasmids und 100 ng eines PCR-Produktes bereitgestellt werden. Wurden spezielle *Primer* mit versendet, sollten diese eine Konzentration von 10 pmol/µl und im Idealfall eine Schmelztemperatur von 50 – 60°C aufweisen.

### 3.4 Proteinchemische Methoden

#### 3.4.1 Zellaufschluss mittels Sonifikation

Der Aufschluss von Zellmaterial aus Proteinexpressionskulturen (Kap. 3.2.3) oder Hochzell-dichte-Kultivierung (Kap. 3.2.4) erfolgte mittels Ultraschallbehandlung oder in Kombination von enzymatischem Zellaufschluss mittels Lysozym und Ultraschall. So konnten die intrazellulär gebildeten rekombinanten Proteine freigesetzt werden. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 20% (w/v) in 50 mM Kpi-Puffer pH 6,5 -7,0 (inklusive 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP) resuspendiert. Wurde Lysozym hinzugegeben, so geschah dies in einer Konzentration von 1 mg/ml. Lysozym spaltet die  $\beta$ -(1→4)-glykosidische Bindung zweier Peptidoglycanmoleküle im Mureinnetz der Bakterienzellwand, wodurch die Zellwand ihre Stabilität verliert und die Zelle zerstört wird. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation auf Eis wurde eine Ultraschallbehandlung mit einer Beschallung von 4 x 1 – 5 min auf Eis, mit je 1 – 5 min Pause dazwischen, durchgeführt (Ultraschallprozessor UP 200S und Sonotroden S1, S3, SD14, Dr. Hielscher GmbH, Telthof, D). Der Desintegrator wurde auf 70% der Maximalamplitude und einen Cycle von 0,5 eingestellt. Durch Ultraschall entstehen in Flüssigkeiten kleine, zunächst wachsende Blasen, die bei der anschließenden Implosion zu hohen, rasch wechselnden Druckänderungen führen. Dieser Effekt, genannt Kavitation, führt zum Zerreißen der Zellmembran und Zellwände. Unlösliche und lösliche Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation voneinander getrennt (45 min, 18.000 Upm, 4°C, SS34). Der enzymhaltige Überstand wurde direkt in Enzymaktivitätstests (Kap. 3.6) oder als Rohextrakt für Proteinreinigungen (Kap. 3.5.4 & 3.5.5) eingesetzt.

#### 3.4.2 Quantitative Proteinbestimmung (nach Bradford)

Die Bestimmung der quantitativen Proteinkonzentration nach Bradford ist ein einfaches kolorimetrisches Verfahren. Es beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliant Blau G250, einem Triphenylmethan-Farbstoff, in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Die Intensität des Farbkomplexes ist direkt vom Proteingehalt abhängig. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt im Bereich von 0,05 - 0,5 µg/ml. Für die Herstellung der Bradford-Lösung wurde Coomassie Brilliant Blau G250 in Ethanol<sub>abs.</sub> gelöst und anschließend mit *ortho*-Phosphorsäure versetzt. Die Lösung wurde für eine Stunde gerührt, danach mit Millipore-H<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt

## **MATERIAL & METHODEN**

---

und über Nacht weiter gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung durch einen Faltenfilter (240 mm, Schleicher & Schuell) filtriert und in einer dunklen Flasche gelagert. Neben der selber hergestellten Bradford-Lösung wurde ebenfalls eine käuflich erworbene Bradford-Lösung genutzt (AppliChem, Darmstadt, D).

Bei dieser Methode wird die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe relativ zu einem Protein (bovines Serum Albumin, BSA) bekannter Konzentration bestimmt. 100 µl Probe wurde mit 900 µl Bradford-Lösung versetzt, mit einem Spatel vermischt und 10 – 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Referenz dienten 900 µl Bradford-Lösung mit 100 µl des jeweiligen Puffers. Die Absorption des entstandenen Proteinkomplexes wurde bei 595 nm gemessen. Anhand der Kalibrierungsgeraden von BSA konnte die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

Bradford-Lösung: 100 mg/ml Coomassie Brilliant Blau G250, 50 ml/l Ethanol<sub>abs.</sub>, 100 ml/l 85% *ortho*-Phosphorsäure

### **3.4.3 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen (TCA-Fällung)**

Die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) wurde angewandt, um Proteine aus Lösungen zu konzentrieren oder hohe Salzkonzentrationen zu entfernen. Proteinhaltige Proben wurden mit 70%iger (w/v) TCA-Lösung auf 10% TCA gebracht. Bei Proben mit hoher Salzkonzentration wurden die Proben bis zu 20-fach mit Millipore-H<sub>2</sub>O verdünnt. Nach anschließender Inkubation (10 min bei Raumtemperatur) wurde die Probe zentrifugiert (15 min, 13.400 Upm, RT). Die Sedimente wurden zweimal mit 80% (v/v) Aceton gewaschen, danach getrocknet, in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (Kap. 3.4.4).

TCA-Lösung: 70% (w/v) TCA

Aceton-Lösung: 80% (v/v) Aceton

### 3.4.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Verwendet wurde das diskontinuierliche Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern (Laemmli, 1970). Die meisten Proteine, denaturiert durch Natrium-dodecylsulfat (SDS) und reduziert mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol, binden das Detergenz SDS zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit konstantem Masse-Ladungs-Verhältnis. Während der Elektrophorese wandern die SDS-Proteinkomplexe durch die Polyacrylamidmatrix zur Anode. Im Übergang zwischen Sammel- und Trenngel werden die Proteine aufgrund des pH-Wertes- und Porengrößenwechsels fokussiert und im Trenngel nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt.

Die unten aufgeführten Volumenangaben von Trenn- und Sammelgel beziehen sich auf das Volumen von 2 Minigelen in einer vertikalen Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ (Biorad, München, D). Die einzelnen Komponenten wurden miteinander vermischt, wobei die Zugabe von APS und TEMED erst kurz bevor die Mischung in die Gelkammern gefüllt wurde erfolgte.

In jede Spur eines SDS-Geles wurde von Zellsuspensionen eine Probe entsprechend einer  $OD_{600}$  von 0,15 und von Proteinlösungen entsprechend einer Proteinkonzentration von 15  $\mu$ g aufgetragen. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt (Endkonzentration: 1%), 5 – 10 min bei 99°C inkubiert und anschließend elektrophoretisch getrennt oder bei -20°C gelagert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 100 bzw. 200 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele gefärbt (Kap. 3.4.5) und dokumentiert.

SDS-Probenpuffer (5 x) pH 6,8: 0,4 M Tris/HCl pH 6,8; 25% (v/v) Glycerin; 10% (w/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau

SDS-Probenpuffer (1 x) pH 6,8: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 4% (w/v) SDS; 2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,03% (w/v) Bromphenolblau

Elektrophorese-Puffer pH 8,8: 250 mM Tris Ultra; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS

Trenngel-Puffer pH 8,8: 1,5 M Tris/HCl

Sammelgel-Puffer pH 6,8: 0,5 M Tris/HCl

SDS-Stammlösung: 10% (w/v) SDS

Acrylamid-Stammlösung: 30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

APS-Stammlösung: 10% (w/v) APS

Trenngel (12%): 4 ml Acrylamid-Stammlösung; 2,5 ml Trenngel-Puffer; 3,4 ml Millipore-H<sub>2</sub>O; 100  $\mu$ l SDS-Stammlösung; 100  $\mu$ l APS-Stammlösung; 10  $\mu$ l TEMED

## **MATERIAL & METHODEN**

---

Sammelgel (5%): 0,83 ml Acrylamid-Stammlösung; 1,3 ml Sammelgel-Puffer; 2,8 ml Millipore-H<sub>2</sub>O; 50 µl SDS-Stammlösung; 50 µl APS-Stammlösung; 10 µl TEMED

### **3.4.5 Färbung von SDS-Gelen**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung (Merril, 1990) geschwenkt. Anschließend wurde die Färbelösung gegen eine Entfärbelösung getauscht und diese etwa alle 20 – 30 min gewechselt, bis die proteinfreien Bereiche komplett entfärbt waren. Die Gele wurden eingescannt und bei Bedarf in Folie eingeschweißt, um bei 4°C gelagert zu werden.

Coomassie-Färbelösung: 50% (v/v) Ethanol<sub>tech.</sub>; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250

Entfärbelösung: 40% (v/v) Ethanol<sub>tech.</sub>; 10% (v/v) Essigsäure

### **3.4.6 Lagerung von gereinigten Enzymen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden in gefriergetrockneter Form bei -20°C gelagert. Für eine Gefriertrocknung (Lyophilisation) wurden die gereinigten und entsalzten Proteinfractionen (Kap. 3.5.6) in einer flachen Glasschale mit maximal 1,5 cm Füllhöhe und maximal 1 – 1,5 mg/ml Proteinkonzentration bei -20°C eingefroren. Die gefrorene Lösung wurde in einer Lyophille (Lyovac GT2) gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde bei -20°C gelagert.

### **3.4.7 Herstellung rekombinanter HL-ADH für den indirekten Test**

Für die Messung von Enzymaktivitäten mittels indirekten photometrischen Test (Kap. 3.6.3) ist der Einsatz von Alkoholdehydrogenasen (ADHs) als Hilfsenzyme erforderlich. ADHs gehören zu der Enzymklasse der Oxidoreduktasen und katalysieren sowohl die Oxidation von Alkoholen zu den korrespondierenden Aldehyden, als auch die Reduktion von Aldehyden zu den korrespondierenden Alkoholen. Als Cofaktor wird meist NAD(P)H benötigt. Diese große Gruppe von Enzymen kann in drei Enzym-Superfamilien unterteilt werden: die Metallionen-abhängigen länger-kettigen ADHs mit mehr als 350 Aminosäuren, die zink-abhängigen mittel-kettigen ADHs mit ~ 350 Aminosäuren und die kurz-kettigen ADHs ohne Metallion mit

~ 250 Aminosäuren (Abokitse, 2004; de Smidt *et al.*, 2008). Das Hefe-ADH- und das Pferdeleber (HL)-ADH-Enzym gehören zu der Superfamilie der mittelkettigen ADHs. Eine wesentliche Limitierung bei dem Einsatz von Hilfsenzymen in indirekten photometrischen Tests ist das jeweilige Substratspektrum. Schon seit den 60er-Jahren ist bekannt, dass zwischen diesen beiden Enzymen ein Unterschied in der Substratspezifität besteht. Für länger-kettige oder aromatische Alkohole und Aldehyde weist die HL-ADH geringere  $K_M$ -Werte auf als die Hefe-ADH (Dickinson & Dalziel, 1967; Dickinson & Monger, 1973). Aus diesem Grund kann die Hefe-ADH zum Nachweis von aliphatischen Aldehyden, insbesondere Acetaldehyd, und die HL-ADH zum Nachweis insbesondere von Benzaldehyd, eingesetzt werden (Kap. 3.6.3.1 & 3.6.3.2).

#### Klonierung und Expression

Das Gen, welches für das Alkoholdehydrogenase-E-Isoenzym aus der Leber von *Equus caballus* (Pferd) kodiert (NCBI-Accession-Nr.: NM\_001082528), wurde einer Codon-Optimierung unterzogen (<http://www.evolvingcode.net>; Wu & Zhang, 2006). So konnte eine optimale Translation in *E. coli* gewährleistet werden. Das Gen wurde bei der Firma Sloning (Puchheim, Deutschland) als synthetisches Gen geordert. Über zwei eingefügte Restriktionsschnittstellen (*NdeI* und *NotI*) erfolgte die Umklonierung in den Expressionsvektor pET28a. Die Verifizierung der Sequenz erfolgte über eine Sequenzierung.

Die Expression erfolgte im Maßstab von 5 L. Hierzu wurde eine Vorkultur unter Kanamycin-Selektionsdruck angezogen, aus der je 1 L LB-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 inokuliert wurde. Die Kultur wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 – 0,6 bei 25°C und 120 Upm inkubiert und anschließend mit 0,5 mM IPTG versetzt um die Expression zu induzieren. Nach ~ 18 h Wachstum bei 25°C wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert.

#### Reinigung und Bestimmung der kinetische Parameter

Die rekombinante HL-ADH (HL-ADH<sub>rek.</sub>) wurde über den N-terminalen Hexahistidin-Tag mittels IMAC (Kap. 3.5.5) gereinigt. Die spezifische Aktivität gegenüber Benzaldehyd als Substrat konnte um den Faktor 7,5 von 10 U/mg im Rohextrakt auf 75 U/mg nach der Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.5.6) gesteigert werden. Die kinetischen Parameter für den Umsatz von Benzaldehyd wurden mittels direktem photometrischen Enzymaktivitätstest (Kap. 3.6.1) aufgenommen:  $V_{max}$ :  $55 \pm 5,7$  U/mg,  $K_M$ -Wert:  $0,17 \pm 0,06$  mM Benzaldehyd.

## **MATERIAL & METHODEN**

---

### Herstellung von HL-ADH<sub>rek</sub>-Lyophilisat

10 g Expressionszellen wurden in 50 ml 50 mM Kpi-Puffer (inklusive 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP) gelöst. Der Rohextrakt wurde wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben hergestellt. Die Überprüfung der Aktivität erfolgte mittels direktem photometrischen Test (Kap. 3.6.1). Aufgrund einer hohen Hintergrundaktivität, welche durch einen enzymatischen Abbau von NADH durch andere ADHs aus *E. coli* zustande kommen kann, wurde der Rohextrakt einer Hitze-fällung für 10 min bei 55°C unterzogen. Hierfür wurde der Rohextrakt zu je 10 ml auf Glas-Röhrchen aufgeteilt und im temperierten Wasserbad inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation, durch welche die Hitze-denaturierten Bestandteile sedimentiert wurden, wurde der Rohextrakt erneut einer Aktivitätsmessung unterzogen. Wies der Hintergrund eine Steigung von  $\Delta A/\text{min}$  von  $< 0,1$  auf, wurde der Rohextrakt bei -20°C gefroren und anschließend gefriergetrocknet (Kap. 3.4.6). Das HL-ADH<sub>rek</sub>-Lyophilisat wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in die indirekten photometrischen Tests eingesetzt.

## **3.5 Chromatographische Methoden**

Die Chromatographie ist eine Trennmethode, bei der eine Substanzmischung mittels einer mobilen Phase über eine stationäre Phase geleitet wird und dabei in die Einzelbestandteile der Mischung aufgetrennt wird.

### **3.5.1 Präparative Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine weit verbreitete Trennmethode, welche erstmals 1903 von dem russischen Botaniker Tswett zur Trennung von Blattfarbstoffen verwendet wurde (griech: chroma, Farbe). Mittels DC wurden präparative Ansätze aufgearbeitet. Die stationäre Phase stellte eine mit Kieselgel bedeckte Glasplatte dar. Als mobile Phase (Fließmittel) diente eine Mischung aus 80% Cyclohexan und 20% Ethylacetat. Das zu trennende Stoffgemisch wurde in 2 ml Ethylacetat gelöst und mit einer Kapillare punkt- oder strichförmig auf die DC-Platte aufgetragen. Nach dem Trocknen der Platte wurde diese senkrecht in einer mit Fließmittel gesättigten verschließbaren Chromatographiekammer gestellt. Aufgrund der Kapillarkräfte steigt das Fließmittel hoch. Sobald das Fließmittel den Punkt erreicht hat, an dem das Stoffgemisch aufgetragen wurde, befinden sich die einzelnen Komponenten des Stoffgemisches einerseits der Anziehungskraft der mobilen Phase, andererseits der Anziehungskraft der stationären Phase ausgesetzt.

Die präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg auf DC-Glasplatten mit Kieselgel 60 F254 der Firma Merck.

### 3.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance/pressure liquid chromatography*, HPLC) können chemische Komponenten nicht nur voneinander getrennt, sondern auch mit Hilfe eines Standards identifiziert und quantifiziert werden. Die HPLC wurde zur Detektion von 2-Hydroxyketonen und zur Ermittlung der Enantiomerenüberschüsse (*ee*-Werte) angewendet. Das zu analysierende Stoffgemisch wird durch ein über die Säule laufendes Fließmittels mitgetragen. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Wechselwirkung der einzelnen Komponenten mit der stationären Phase ab. Beim Austritt aus der Säule werden die chemischen Komponenten mit einer Fotodiodenzeile (*photo diode array detector*, DAD) nachgewiesen. Das Besondere an der HPLC-Methode ist der hohe eingesetzte Druck von 100 – 200 bar. So können Säulen und dementsprechend auch die Laufzeiten verkürzt werden.

HPLC-DAD-Analysen an chiraler stationärer Phase wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg mit dem „HP 1100“ Chromatographiesystem der Firma Agilent (Böblingen, D) durchgeführt. Für die Identifizierung und Charakterisierung der Produkte wurde das gesamte UV-Spektrum herangezogen, die Ermittlung der *ee*-Werte erfolgte anhand der UV-Adsorptionen bei  $\lambda = 210, 230, 254$  und  $280$  nm. *ee*-Werte wurden über folgenden Zusammenhang berechnet:

$$ee = \frac{E_1 - E_2}{E_1 + E_2} * 100 \%$$

$E_1$  Peakfläche des Enantiomers im Überschuss

$E_2$  Peakfläche des Enantiomers im Unterschuss

Als chirale stationäre Phasen wurden die Chromatographiesäulen Chiralcel<sup>®</sup> OD-H (Diacel Inc., 250 \* 4 mm), Chiralcel<sup>®</sup> OB (Diacel Inc., 250 \* 4 mm) und Chiralcel<sup>®</sup> AS-H (Diacel Inc., 250 mm \* 4 mm) verwendet. Die Chiralcel<sup>®</sup> OB Säule war mit einer entsprechenden Vorsäule (Diacel Inc., 50 \* 4 mm) ausgerüstet.

### 3.5.3 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist eine Analysemethode zur Auftrennung von Stoffgemischen, deren Komponenten unter den gewählten Bedingungen gasförmig sind oder deren Siedepunkt  $< 400^{\circ}\text{C}$  liegt. Auch hier können chemische Substanzen mit Hilfe eines Standards identifiziert und quantifiziert werden. Die GC wurde, wie die Methode der HPLC, zur Detektion von 2-Hydroxyketonen und zur Ermittlung der Enantiomerenüberschüsse (*ee*-Werte) angewendet. Die mobile Phase ist ein inertes Gas, wie zum Beispiel Helium, welches als Trägergas bezeichnet wird. Die Probe wird nach der Injektion durch das Trägergas über eine in einem temperierbaren Ofen befindliche Säule geleitet. Die einzelnen Komponenten des Stoffgemisches verweilen je nach ihrer Polarität unterschiedlich lange an der stationären Phase. Enantiomere, die in ihren physikalischen Eigenschaften gleich sind und so auch denselben Siedepunkt besitzen, können mit speziellen Derivaten von chiralen Cyclodextrinen, die in der Säule immobilisiert sind, aufgetrennt werden. Mit einem Detektor kann die Austrittszeit am Säulenende gemessen und über eine Computersoftware ausgewertet werden. Ein Beispiel für einen Detektor ist ein Flammenionisationsdetektor (FID). Die zu analysierende Komponente wird durch das Trägergas in die Flamme transportiert und dort thermisch ionisiert. Die dadurch freiwerdenden Elektronen werden durch ein Gitter, welches um die Flamme herum angebracht ist, aufgefangen und durch die Computersoftware als Signal identifiziert.

#### GC an chiraler Phase:

GC-FID-Chromatogramme wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg mit dem Gerät "GC-2010" und dem Injektor "AOC-20i" der Firma Shimadzu (Duisburg, D) aufgenommen. Das Gerät war mit einem Flammenionisationsdetektor (FID, Makeup Gas:  $\text{N}_2/\text{Luft}$ , Makeup Flow: 30,0 ml/min,  $\text{H}_2$ -Flow: 40,0 ml/min, Sampling Rate: 40 ms) ausgestattet. Als chirale stationäre Phase wurde die FS-Lipodex D-Säule ( $L = 50,0$  m, innerer Durchmesser = 0,25 mm, Filmdicke = 1,00  $\mu\text{m}$ , maximale Säulentemperatur:  $280^{\circ}\text{C}$ ) eingesetzt. Als Trägergas wurde Helium eingesetzt (6,0 ml/min, konstant).

### 3.5.4 Anionenaustauschchromatographie

Proteine haben aufgrund des Ladungszustandes der Aminosäuren bei jedem pH-Wert (außer am isoelektrischen Punkt) eine positive oder negative Nettoladung. Aus diesem Grund können Proteine an positiv oder negativ geladene Säulenmaterialien binden. Diese Eigenschaft macht sich die Ionenaustauschchromatographie (*ion exchange chromatography*, IEC) zu Nutze. Eine Form der IEC ist die Anionenaustauschchromatographie. Starke Anionenaustauscher, wie Q-Sepharose *Fast Flow* (GE Healthcare, München, D), binden negativ geladene Proteine. Die Ionenaustauschergruppe sind quartäre Amine, gebunden an quervernetzter Agarose.

Zu Beginn der Reinigung wurde der pH-Wert des Rohextraktes mittels Titration oder durch Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.5.6) eingestellt. Wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, wurde automatisch die Ionenstärke mit eingestellt. Die Q-Sepharose-Säule wurde mit dem Äquilibrierungspuffer gespült und so auf den benötigten pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers eingestellt. Anschließend konnte der zuvor hergestellte Rohextrakt (Kap. 3.4.1) auf die Säule aufgetragen werden. Das Zielprotein sollte bei richtigem pH-Wert an den Ionenaustauscher binden und zurückgehalten werden, während alle Proteine, die nicht binden, mit Äquilibrierungspuffer herausgespült werden konnten. Anschließend wurde ein NaCl-Gradient (0 – 1 M innerhalb von 150 min, 1 ml/min) gestartet um das gebundene Protein zu eluieren. Die Salzionen konkurrieren mit dem Protein um die Bindung an den Ionenaustauscher. Schwach geladene Proteine werden vor den stark geladenen Proteinen von der Säule verdrängt. Die kontinuierliche Proteindetektion im Eluat erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt (Kap. 3.4.2) und ihre Aktivität (Kap. 3.6) hin untersucht.

Säulenkörper: XK16/20 (GE Healthcare, München, D) ( $\emptyset = 1,6$  cm, Füllhöhe = 15 cm)

Säulenvolumen: 30 ml

Fluss: 1 – 3 ml/min

Aufschlusspuffer: 50 mM Kpi-Puffer; 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM ThDP

Äquilibrierungspuffer: 50 mM Kpi-Puffer

Elutionspuffer: 50 mM Kpi-Puffer; 1 M NaCl

Nachdem der pH-Wert der Puffer eingestellt wurde, wurde eine Sterilfiltration über eine Vakuumpumpe (Ilmvac, Ilmenau; 0,2  $\mu$ m Membranfilter, Sartorius) durchgeführt. In einem Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex) wurden die Puffer für 15 min entgast. Das Säulenvolumen kann über folgende Formel berechnet werden:  $\pi * r^2 * \text{Füllhöhe [cm]}$ .

### 3.5.5 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix

Die Reinigung rekombinanter C- oder N-terminal markierter Hexahistidin-Fusionsproteine erfolgte unter nativen Bedingungen mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC; Porath *et al.*, 1975). Das Prinzip der IMAC beruht auf einer stabilen Interaktion von Ni<sup>2+</sup>-Ionen und Nitrilotriessigsäure- (NTA)-Liganden, welche auf einer Agarosematrix immobilisiert sind. Die Ni<sup>2+</sup>-Ionen können im Austausch gegen Wasser mit zwei Histidinresten interagieren und so zwei Fusionsproteine binden (Hochuli, 1988; Janknecht *et al.*, 1991). Gebundene Proteine können durch die Protonierung der interagierenden Aminosäureketten oder durch Metall-bindende Liganden, wie Imidazol (entspricht der Histidin-Seitenkette), eluiert werden.

Zu Beginn einer Reinigung wurde eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule mit Äquilibrierungspuffer gespült. Anschließend wurde der Rohextrakt aufgetragen. Nach Kopplung des Zielproteins an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix konnten ungebundene Proteine mit Äquilibrierungspuffer ausgewaschen werden (Durchlauf). Durch die sich anschließende Waschpufferspülung mit geringer Imidazolkonzentration wurden unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Die gebundenen Proteine konnten mit Elutionspuffer und dem darin enthaltenen Imidazol von der Matrix verdrängt werden. An diese Reinigung schloss sich eine Entsalzung durch Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.5.6) an, um das Imidazol aus der Proteinfraction zu entfernen. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Bradford auf ihren Proteingehalt (Kap. 3.4.2) und soweit möglich auf ihre Aktivität (Kap. 3.6) hin untersucht.

Säulenkörper: XK26/20 (GE Healthcare, München, D) (Ø = 1,6 cm, Füllhöhe = 5,3 und 6,5 cm)

Säulenvolumen: 28 und 34,5 ml

Fluss: 1 – 3 ml/min

Aufschlusspuffer: 50 mM Kpi-Puffer; 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM ThDP

Äquilibrierungspuffer: 50 mM Kpi-Puffer

Waschpuffer: 50 mM Kpi-Puffer; 50 mM Imidazol

Elutionspuffer pH 7,5: 50 mM Kpi-Puffer; 250 mM Imidazol

Unabhängig von dem benötigten pH-Wert wurde der Elutionspuffer auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. So konnte gewährleistet werden, dass das Imidazol nicht deprotoniert wird und eine bestmögliche Verdrängung des Zielproteins von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix erreicht werden konnte. Auch hier wurden alle Puffer sterilfiltriert und entgast. Das Säulenvolumen kann über folgende Formel berechnet werden:  $\pi * r^2 * \text{Füllhöhe [cm]}$ .

### 3.5.6 Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex G-25-Matrix

Zur Entsalzung des Eluats aus der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (Kap. 3.5.5) oder der Anionenaustauschchromatographie (Kap. 3.5.4) wurde eine Sephadex<sup>®</sup> G-25-Säule (GE Healthcare, München, D) mit einem Säulenvolumen von 1 L verwendet. Die Gelmatrix besteht aus porösen Polymerkügelchen. Je größer das zu trennende Molekül, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit der Diffusion in die Polymerkügelchen. Größere Moleküle wandern daher schneller durch die Säule als kleine. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Entsalzungspuffer äquilibriert. Nach dem Auftrag der zu entsalzenden Probe wurde bis zur Elution des Proteins mit Entsalzungspuffer gespült. Die zurückgehaltenen Salze konnten anschließend, alternativ zum Puffer, auch durch 20% (v/v) Ethanol<sub>tech.</sub> eluiert werden um die Säule zu konservieren.

Geringe Probenmengen wurden alternativ über PD 10-Säulen (GE Healthcare, München, D) nach Herstellerangaben unter Verwendung des Entsalzungspuffers entsalzt werden.

Säulenkörper: XK50/60 (GE Healthcare, München, D) (Ø = 5,0 cm, Füllhöhe = 51 cm)

Säulenvolumen: 1000 ml

Fluss: 5 – 15 ml/min

Entsalzungspuffer: 10 mM Kpi-Puffer; 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM ThDP

Der Entsalzungspuffer wurde sterilfiltriert und über Nacht unter Vakuum entgast. Das Säulenvolumen kann über folgende Formel berechnet werden:  $\pi * r^2 * \text{Füllhöhe [cm]}$ .

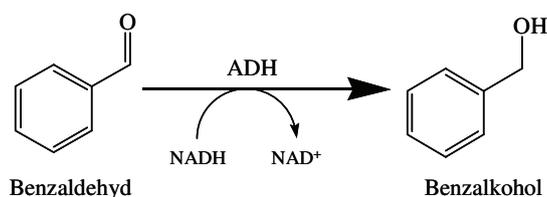
### 3.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivität der Enzyme wird in der Einheit Unit [U] angegeben.

**1 U entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute bei 30°C umsetzt.**

#### 3.6.1 Direkter photometrischer Test zur Bestimmung der Reduktionsaktivität (ADHs)

Der Nachweis der Reduktion von Benzaldehyd zu Benzalkohol unter Verwendung der Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber (*horse liver*, HL-ADH<sub>(rek.)</sub>) wurde in einem direkten photometrischen Test durchgeführt (Abb. 17).



**Abb. 17: Direkter HL-ADH<sub>(rek.)</sub>-Aktivitätstest.** Die Alkoholdehydrogenase (ADH) reduziert Benzaldehyd unter NADH-Verbrauch zu Benzalkohol.

Die Abnahme von NADH wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. 750 µl Reaktionspuffer wurden mit 100 µl NADH-Lösung und 100 µl Benzaldehyd-Lösung für etwa 5 min im Photometer auf 30°C erwärmt. Durch die Zugabe von 50 µl rekombinantem Enzym (Rohextrakt oder gereinigte Form) wurde die Reaktion gestartet. Die Messpunkte wurden alle 10 sek über 90 sek aufgenommen. Die Messung ergab eine Gerade mit fallender Steigung  $-\Delta A/\text{min}$ . Über folgenden Zusammenhang konnte die volumetrische Aktivität berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{\Delta A/\text{min} * V}{\epsilon * v * d} * f = \Delta A/\text{min} * F * f$$

|                       |   |
|-----------------------|---|
| $\Delta A/\text{min}$ | Änderung der Absorption pro min   |
| V                     | gesamtes Testvolumen (hier 1000 µl)   |
| $\epsilon$            | molarer Extinktionskoeffizient (für NADH $6,22 \text{ L} * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ) |
| v                     | Probenvolumen der Enzymlösung (hier 50 µl)  |
| d                     | Schichtdicke der Küvette (1 cm)   |
| f                     | Verdünnungsfaktor der Enzymlösung   |
| F                     | Umrechnungsfaktor: 3,2154   |

Um die spezifische Aktivität in U/mg angeben zu können wurde die Proteinkonzentration (Kap. 3.4.2) bestimmt.

Reaktionspuffer pH 7,0: 50 mM Kpi-Puffer mit 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP

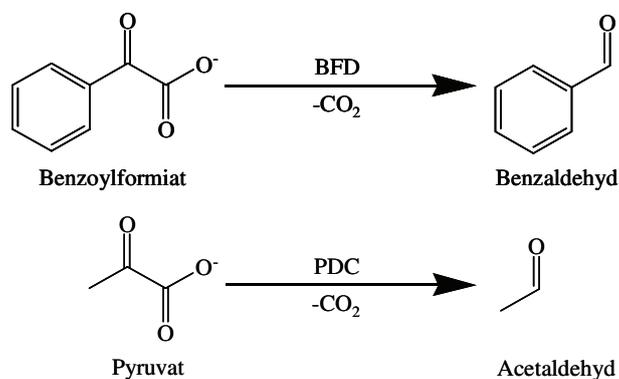
NADH-Lösung: 2,5 mM NADH in 50 mM Reaktionspuffer

Benzaldehyd-Lösung: 5 – 50 mM Benzaldehyd in 50 mM Reaktionspuffer

Der Reaktionspuffer enthielt MgSO<sub>4</sub> und ThDP, da die getesteten ADHs als Hilfsenzym in einem indirekten Test zur Bestimmung der katalytischen Aktivität Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme (Kap. 3.6.3) eingesetzt werden sollte.

### 3.6.2 Direkter photometrischer Test zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität

Die Decarboxylaseaktivität von Benzoylformiat- oder Pyruvatdecarboxylasen (BFDs und PDCs) wurde mittels direkten photometrischen Aktivitätstest analysiert. Die Substrate Benzoylformiat und Pyruvat werden unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung zu den korrespondierenden Aldehyden Benzaldehyd und Acetaldehyd umgesetzt (Abb. 18).



**Abb. 18: Direkter Decarboxylaseaktivitätstest.** Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) setzt Benzoylformiat unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> zu Benzaldehyd um und die Pyruvatdecarboxylase (PDC) Pyruvat zu CO<sub>2</sub> und Acetaldehyd.

Die Abnahme der Substrate wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm (Benzoylformiat), bzw. 320 nm (Pyruvat) verfolgt. 950 µl Benzoylformiat- oder Pyruvat-Lösung wurden in eine Küvette gegeben und im Photometer auf 30°C erwärmt. Die Reaktion

## MATERIAL & METHODEN

---

wurde durch die Zugabe von 50 µl rekombinantem Enzym gestartet und alle 10 sek über einen Gesamtzeitraum von 90 sek verfolgt. Die volumetrische Aktivität wurde über den in Kapitel 3.6.1 aufgeführten Zusammenhang bestimmt ( $\epsilon$  [Benzoylformiat]= 0,032 L \* mmol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>;  $\epsilon$  [Pyruvat]= 0,022 L \* mmol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>). Aus den molaren Extinktionskoeffizienten ergeben sich folgende Umrechnungsfaktoren:  $F_{\text{Benzoylformiat}} = 625$  und  $F_{\text{Pyruvat}} = 909,1$ .

Reaktionspuffer pH 6,5 – 7,0: 50 mM Kpi-Puffer mit 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP

Benzoylformiat-Lösung: 25 mM Benzaldehyd in 50 mM Reaktionspuffer

Pyruvat-Lösung: 42 mM Benzaldehyd in 50 mM Reaktionspuffer

Die Extinktionskoeffizienten für Benzoylformiat und Pyruvat liegen um den Faktor 194, bzw. 283 niedriger als der von NADH ( $\epsilon = 6,22$  L \* mmol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>). Aufgrund des wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten für NADH ist der indirekte photometrische Test (Kap. 3.6.3) sensitiver und erfordert den Einsatz einer entsprechend geringeren Enzymkonzentration. Der direkte Test wurde zur Bestimmung von pH- und Temperatur-Optima verwendet. So konnte eine Limitierung des Messergebnisses durch eingesetzte Hilfsenzyme vermieden werden.

### 3.6.3 Indirekter photometrischer Test zur Bestimmung der Lyaseaktivität

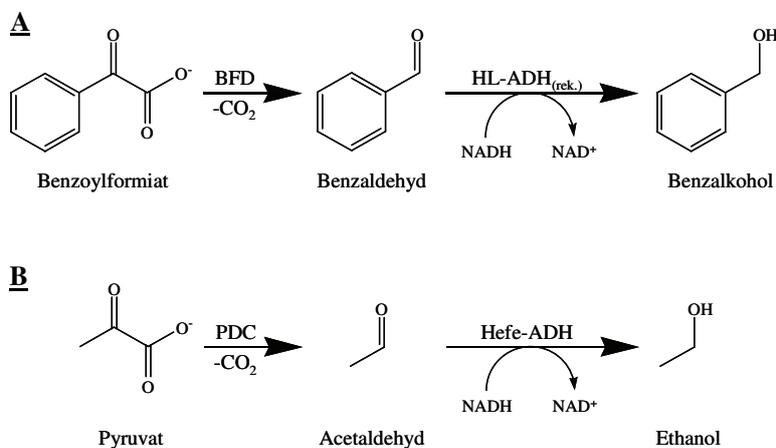
#### 3.6.3.1 Benzoin-Spaltung

Die Fähigkeit zur Spaltung von Benzoin der potentiellen neuen Benzaldehydlyasen (BALs) wurde in einem indirekten photometrischen Test bestimmt, der die Spaltung von Benzoin zu zwei Benzaldehyd-Molekülen mittels Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber (HL-ADH<sub>(rek.)</sub>) nachweist. Entstandener Benzaldehyd wird durch die HL-ADH<sub>(rek.)</sub> unter NADH-Verbrauch, welcher bei 340 nm kontinuierlich verfolgt werden kann, reduziert (Abb. 19).



## 3.6.3.2 Decarboxylaseaktivität

Die Decarboxylaseaktivität potentieller Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme und hergestellter Varianten wurde in einem indirekten photometrischen Test bestimmt. Die bevorzugten Substrate der Enzyme Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) und Pyruvatdecarboxylase (PDC) wurden zu den korrespondierenden Aldehyden unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung durch diese Decarboxylasen umgesetzt. Die entstandenen Aldehyde wurden durch Hilfsenzyme (Hefe- oder HL-ADH<sub>(rek.)</sub>) unter NADH-Verbrauch zu den entsprechenden Alkoholen reduziert (Abb. 20).



**Abb. 20: Indirekter Decarboxylasetest.** Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) spaltet ein Molekül Benzoylformiat zu  $\text{CO}_2$  und Benzaldehyd (**A**) und die Pyruvatdecarboxylase (PDC) ein Molekül Pyruvat zu  $\text{CO}_2$  und Acetaldehyd (**B**). Unter NADH-Verbrauch werden die Aldehyde durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Die ADH aus der Pferdeleber (HL-ADH<sub>(rek.)</sub>) wird im Falle von aromatischen, länger-kettigen oder verzweigt-kettigen Aldehyden, die Hefe-ADH im Falle von Acetaldehyd eingesetzt.

Die Abnahme von NADH wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. 750  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Substrat-, 100  $\mu\text{l}$  NADH- und 50  $\mu\text{l}$  ADH-Lösung in eine Küvette gegeben und auf 30°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  rekombinantem Enzym gestartet und alle 10 sek über einen Gesamtzeitraum von 90 sek verfolgt. Die volumetrische Aktivität wurde über den in Kapitel 3.6.1 aufgeführten Zusammenhang bestimmt ( $\epsilon [\text{NADH}] = 6,22 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Aus den molaren Extinktionskoeffizienten ergibt sich folgender Umrechnungsfaktor:  $F_{\text{NADH}} = 3,2154$ .

Reaktionspuffer pH 6,5 – 7,0: 50 mM Kpi-Puffer mit 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP

Benzoylformiat-Lösung: 50 mM in 50 mM Reaktionspuffer

Pyruvat-Lösung: 400 mM in 50 mM Reaktionspuffer

NADH-Lösung: 2,5 mM NADH in 50 mM Reaktionspuffer

HL-ADH<sub>(rek.)</sub>-Lösung: 5,5 mg/ml HL-ADH von Sigma; 10 mg/ml HL-ADH<sub>rek.</sub> (Kap. 3.4.7)

Hefe-ADH-Lösung: 2 µl der käuflichen ADH-Suspension in 48 µl 50 mM Reaktionspuffer

### **3.6.4 Bestimmung des Effektes von Temperatur und pH-Wert auf die Enzymaktivität**

Der biotechnologische Einsatz von Enzymen beispielsweise in zellfreien Systemen setzt Kenntnisse über die Umgebungseinflüsse, welche die Aktivität aber auch die Stabilität beeinflussen können, voraus. Aus diesem Grund wurde der Effekt von Temperatur und pH-Wert auf die Enzymaktivität untersucht. Für diese Untersuchung wurde der direkte Decarboxylaseaktivitäts-Test (Kap. 3.6.2) verwendet. So konnte sichergestellt werden, dass die gemessenen Aktivitäten auf das Enzym von Interesse zurückzuführen sind und nicht auf das Hilfsenzym aus dem indirekten Decarboxylasetest (Kap. 3.6.3.2).

Die Komponenten des Tests wurden nicht verändert. Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde unter variierenden Bedingungen (pH-Wert und Temperatur) durchgeführt. Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit und -Stabilität wurde Kaliumphosphatpuffer ausgehend von einem pH-Wert von 6,5 oder 7,0 mit Phosphorsäure oder Kaliumhydroxid auf verschiedene pH-Werte, auch über den Pufferbereich von pH 5,0 – 8,0 hinaus, eingestellt. Die Auswertung dieser Untersuchungen ergab das so genannte pH- bzw. Temperatur-Optimum.

Zusätzlich konnte aus dem linearen Bereich einer Temperaturkurve die Aktivierungsenergie  $E_A$  für die Decarboxylaseaktivität bestimmt werden. Während einer enzymatisch katalysierten Umsetzung eines Substrates zum Produkt wird die Aktivierungsenergie  $E_A$  im Gegensatz zu einer nicht katalysierten Reaktion herabgesetzt. Aus der Steigung einer Geraden, die durch Auftragen von  $\ln v_{\max}$  gegen  $1/T[K]$  erhalten werden kann, wurde die Aktivierungsenergie  $E_A$  berechnet.

### 3.6.5 Durchführung von Stabilitätsmessungen gegenüber Temperatur und pH-Wert

In Kapitel 3.6.4 wurde die Bestimmung von pH-Wert- und Temperatur-Optima behandelt, die auf Bestimmungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten beruhen. Da in biotechnologischen Anwendung Reaktionen über einen längeren Zeitraum unter definierten äußeren Einflüssen ablaufen sollen, sind Stabilitätsmessungen unerlässlich. Bei der Durchführung dieser Versuche wurden Enzymlösungen bei verschiedenen Temperaturen, bzw. in Reaktionspuffer mit verschiedenen pH-Werten über einen Zeitraum von bis zu 50 Tagen inkubiert. Die Restaktivität wurde mittels indirekten Decarboxylaseaktivitäts-Test (Kap. 3.6.3.2) unter Standardbedingungen bestimmt. Die Restaktivitäten wurden entweder als volumetrische Aktivität [U/ml] oder als spezifische Aktivität [U/mg] gegen die Zeit [h] in einem Diagramm aufgetragen. Die spezifischen Aktivitäten wurden dann gewählt, wenn die Proteinkonzentration einen Einfluss auf die Werte hatte. Im Falle der Temperatur-Optima konnten Halbwertszeiten ( $\tau_{1/2}$ ) bestimmt werden.

$\tau_{1/2}$  eines Enzyms ist als der Zeitpunkt definiert, an dem das Enzym nur noch die Hälfte der Ausgangsaktivität aufweist und kann nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\tau_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{deac.}}$$

Anhand der Steigung der Geraden, welche durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der relativen Aktivität über die Zeit ermittelt werden kann, wird die Deaktivierungsgeschwindigkeit  $k_{\text{deac.}}$  bestimmt.

### 3.6.6 Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums

Für die Untersuchung des Substratspektrums wurde der indirekte Decarboxylaseaktivitäts-Test (Kap. 3.6.3.2) verwendet. Als Substrate dienten verschiedene aliphatische, aromatische sowie verzweigt-kettige 2-Ketosäuren. Die Substratlösungen wurden mit einer Endkonzentration von 30 mM in den Test eingesetzt. Manche 2-Ketosäuren sind als Natriumsalz eingesetzt worden, andere waren nur als freie Säure verfügbar. Bei diesen Substraten musste der pH-Wert auf 6,5 – 7,0 eingestellt werden. Aufgrund schlechter Löslichkeit in Reaktionspuffer konnten einige Substrate (wie Indol-3-pyruvat) lediglich in einer geringeren Konzentration (bis zu 1 mM) in den Test eingesetzt werden.

### 3.6.7 Bestimmung der kinetischen Parameter ( $V_{\max}$ und $K_M$ )

Die Bestimmung der kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$  erfolgte durch die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen in einem indirekten Decarboxylaseaktivitäts-Test (Kap. 3.6.3.2). Die Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  wurde über eine Dreifachbestimmung bei 30°C bestimmt. Die Enzymlösung wurde in Reaktionspuffer angesetzt, ebenso wie die einzelnen Substrat-Lösungen.

$V_{\max}$  und  $K_M$  können durch eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt werden (Michaelis & Menten, 1913). Die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$v = V_{\max} * \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

|            |  |
|------------|--|
| $v$        | Anfangsreaktionsgeschwindigkeit [ $\mu\text{M} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$ ]   |
| $V_{\max}$ | maximale Reaktionsgeschwindigkeit [ $\mu\text{M} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$ ] |
| $S$        | Substratkonzentration [ $\text{mg} * \text{ml}^{-1}$ ]                                 |
| $K_M$      | Michaelis-Menten-Konstante [mM]  |

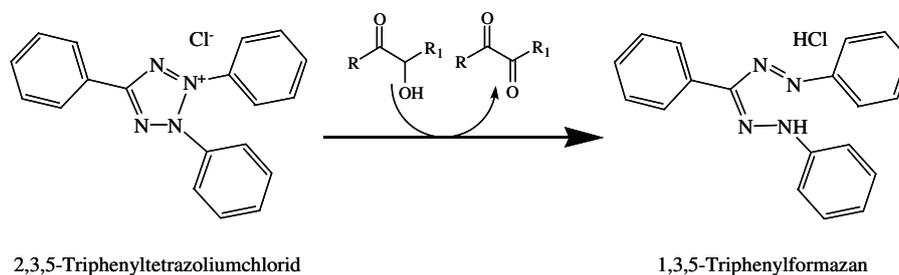
Die Bestimmung der  $V_{\max}$ - und  $K_M$ -Werte erfolgte, unter Verwendung der gemessenen spezifischen Aktivitäten, durch nicht linearer Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Beziehung mittels der Computersoftware Origin 7.

### 3.6.8 Tetrazoliumrot (TTC)-Test zur quantitativen Bestimmung der Carboligaseaktivität

Der 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Test (Breuer *et al.*, 2002; Gocke, 2007; Müller *et al.*, 2009) ist ein Schnelltest zur Untersuchung der Carboligaseaktivität. TTC wird im alkalischen in Anwesenheit von 2-Hydroxyketonen reduziert, wobei die 2-Hydroxyketone zu Diketonen oxidiert werden. Die Reduktion des Farbstoffes resultiert in einer Öffnung des Tetrazoliumrings, was mit einem Farbumschlag von farblos zu rosa bis rot verbunden ist (Abb. 21).

## MATERIAL & METHODEN

---



**Abb. 21: Reaktionsschema des TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)-Tests.** 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid wird in Anwesenheit von 2-Hydroxyketonen zu 1,3,5-Triphenylformazan reduziert. 2-Hydroxyketone werden zu Diketonen oxidiert.

Der Test wurde in Mikrotiterplatten (96-well, Greiner bio-one, Frickenhausen, D) durchgeführt. In jedes Well wurden 50  $\mu$ l Substratlösung (Endkonzentration im Test: 18 mM) vorgelegt. Dabei wurden die Mikrotiterplatten so mit Substrat-Kombinationen bestückt, dass ein möglichst breites Spektrum an möglichen Produkten abgedeckt werden konnte. Anschließend wurde die Reaktion mit 50  $\mu$ l Enzymlösung (Endkonzentration im Test: 0,3 mg/ml) oder 50  $\mu$ l frisch hergestelltem Rohextrakt gestartet. Die DMSO-Endkonzentration im Test betrug 20% (v/v). Als Negativkontrolle diente Reaktionspuffer, als Positivkontrolle wurde die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (P<sub>f</sub>BALwt) oder die Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus* (ApPDCwt) verwendet.

Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte bei 30°C und 130 Upm für ca. 18 h. Anschließend wurden 40  $\mu$ l der basischen TTC-Lösung in jedes Well der Mikrotiterplatten gegeben, wodurch die Enzymreaktion gestoppt und das entstandene 2-Hydroxyketon oxidiert wurde. Entsprechend der Menge an entstandenem Produkt zeigt sich eine mehr oder weniger intensive Rotfärbung. Die Platten wurden zur Dokumentation nach einer, zwei, drei, fünf und zehn Minuten gescannt. Der TTC-Test stellt eine Endpunktbestimmung dar, durch die lediglich eine Produktbildung nachgewiesen werden konnte. Es können keine quantitativen Aussagen über Produkt, Produktmenge oder stereoisomerische Eigenschaften des Produktes gemacht werden.

Reaktionspuffer: 50 mM Kpi-Puffer mit 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP

Aliphatische Aldehyde: 90 mM in Reaktionspuffer lösen

Aromatische Aldehyde: 90 mM in DMSO lösen

TTC-Lösung (40 ml): 40 mg TTC; 10 ml 70% Ethanol<sub>abs.</sub>; 30 ml 1 M NaOH

Für eine Mikrotiterplatte mussten mindestens 5 ml Enzymlösung, bzw. Rohextrakt und 5 ml Substratlösung hergestellt werden. Die Substratlösungen wurden auf eine Aldehydkonzentration von 36 mM verdünnt, zudem wurde eine DMSO-Konzentration von 40% eingestellt. Durch das Mischverhältnis von 50:50 der Substrat- und Enzymlösungen ergaben sich folgende Endkonzentrationen für den Test: 18 mM der jeweiligen Substrate und 20% DMSO.

### **3.6.9 Carboligationsansätze**

#### Analytischer Ansatz [1,5 ml]

18 mM Substrate [0,27 mmol] und 0,3 mg/ml Enzym in Kpi-Puffer [50 mM; 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM ThDP; 20% DMSO, pH 7,0 – 8,0].

Reaktionszeit: 72 h

Reaktionsbedingungen: 30°C im Thermomixer bei 300 Upm

#### Präparativer Ansatz [15 ml]:

18 mM Substrate [0,27 mmol] und ~ 15 mg Enzym-Lyophilisat in Kpi-Puffer [50 mM; 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM ThDP; 20% DMSO, pH 7,0 – 8,0].

Reaktionszeit: 72 h

Reaktionsbedingungen: 30°C im Thermomixer bei 300 Upm

Die Produktdetektion erfolgte mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (Kap. 3.7.2), wobei die Angabe zur Produktmenge in mol% bezogen auf den aromatischen Aldehyd angegeben wurde. Der Enantiomerenüberschuss wurde mittels chiraler Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Kap. 3.5.2) oder Gaschromatographie (Kap. 3.5.3) durchgeführt.

## **3.7 Spektroskopische Methoden**

### **3.7.1 Circulardichroismus (CD)**

Die Methode der Circulardichroismus- (CD)-Spektroskopie nutzt die Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht. Optisch aktive Substanzen sind Moleküle mit einem Chiralitätszentrum, welches dadurch charakterisiert ist, dass ein Kohlenstoffatom vier verschiedene Substituenten in tetraedrischer Anordnung trägt. In einem CD-Spektrum wird

der Absorptions-Unterschied von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht einer Komponente als Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt. Die CD-Spektroskopie wurde zur Bestimmung der Chiralität von 2-Hydroxyketonen eingesetzt.

CD-Spektren wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg mit dem Spektralpolarimeter "J-810" der Firma Jasco International Co (Tokyo, Japan) mit folgenden Parametern gemessen: Raumtemperatur, Länge der Zelle = 1,0 cm, Empfindlichkeit = Standard, Messgeschwindigkeit = 100 nm/min, Daten-Abstand = 1 nm, Bandbreite 1 nm, Resonanz = 2 s, Akkumulation = 3. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril verwendet.

### 3.7.2 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) erlaubt eine Untersuchung der chemischen Umgebung von Atomen über elektromagnetische Wechselwirkungen. Hauptanwendungsbereich ist die strukturelle Analytik in der organischen Chemie und Biochemie. Intramolekulare Dynamik in Proteinen, Übergangszustände von Cofaktoren und zahlreiche zeitabhängige Phänomene, wie Reaktionskinetiken, können untersucht werden. Mit Hilfe von NMR-Spektren konnte die Bildung von 2-Hydroxyketonen nachgewiesen werden. Neben der Bestimmung von Molekülstrukturen konnte die Reinheit von, aus präparativen Ansätzen gewonnenen, 2-Hydroxyketonen überprüft werden.

NMR-Spektren wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg mit den "Bruker DRX 400" der Firma Bruker BioSpin ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100,6 MHz) von Herrn Volker Brecht aufgenommen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Potentielle neue ThDP-abhängige Enzyme

Zur Erweiterung der *Toolbox* bestehend aus Thiamindiphosphat- (ThDP)-abhängigen Enzymen wurden neue potentielle ThDP-abhängige Enzyme mittels Datenbank-Recherche identifiziert. Auf der Basis von Aminosäuresequenzen können über frei im Internet zugängliche Suchmaschinen (BLAST, 2009; *conserved domain database* (CCD), Marchler-Bauer *et al.*, 2009) Sequenzen bereits charakterisierter Enzyme mit Sequenzen aus Genomprojekten oder anderweitig sequenzierten Gen-Bereichen verglichen werden (Wackett, 2004). Durch das 1989 beschriebene ThDP-bindende Motiv G-D-G-(X)<sub>25-30</sub>-N (Hawkins *et al.*, 1989), welches einen hoch konservierten Sequenzbereich darstellt, können potentielle Enzyme in die ThDP-Superfamilie eingeordnet werden. Sequenzvergleiche liefern jedoch keine Aussage über eine tatsächliche Enzymaktivität. Anhand von Sequenzähnlichkeiten werden Proteine als putative Enzyme klassifiziert. Aus diesem Grund ist eine Datenbank-Recherche lediglich ein Hilfsmittel für die Suche und eine biochemische Charakterisierung ist unerlässlich.

#### 4.1.1 Benzaldehydlyasen aus *Silicibacter pomeroyi* und *Francisella philomiragia*

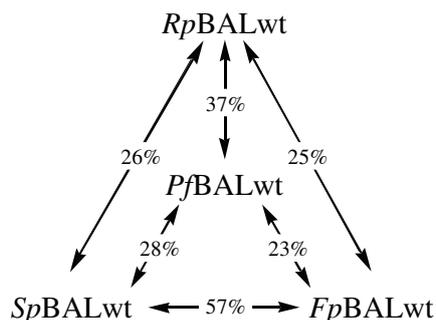
Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*) wurde in Kapitel 1.5.1 der Einleitung ausführlich beschrieben und war lange Zeit die einzige biochemisch charakterisierte BAL (Demir *et al.*, 1999; González & Vicuña, 1989; Janzen *et al.*, 2006). Im Jahr 2006 wurde die BAL aus *Rhodopseudomonas palustris* (*RpBAL*) kloniert und biochemisch charakterisiert. Es handelte sich um ein aktives ThDP-abhängiges Enzym. Allerdings wies die *RpBAL* bezüglich der Carboligierung von zwei Benzaldehyd-Molekülen mit < 1 U/mg zu 336 U/mg für die *PfBAL* eine signifikant geringere spezifische Aktivität auf (Brosi, 2006; Gocke, 2007; Janzen *et al.*, 2006). Eine Lyaseaktivität bezogen auf Benzoin konnte nicht nachgewiesen werden (Brosi, 2006; Gocke, 2007). Jedoch muss die fehlende Lyaseaktivität keinen Nachteil darstellen, da so eine Rückreaktion unterbunden wird.

Mittels Datenbank-Recherche konnten neue potentielle Benzaldehydlyasen identifiziert werden. Mit 28% Sequenzidentität zur *PfBAL* wurde die potentielle BAL aus dem gramnegativen Meeresbakterium *Silicibacter pomeroyi* (*SpBAL*, González *et al.*, 2003) gefunden. Des Weiteren wurde eine BLAST-Analyse mit der Aminosäuresequenz der potentiellen

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

*SpBAL* durchgeführt. Dabei wurde mit 57% Sequenzidentität eine putative BAL aus dem Organismus DSM 7535 *Francisella philomiragia* ssp. *philomiragia* (*FpBAL*, Hollis *et al.*, 1989; Jensen *et al.*, 1969) identifiziert. Die Sequenzidentität der potentiellen *FpBAL* zur *PfBAL* liegt bei 23% (Abb. 22).



**Abb. 22: Vergleich der BAL-Sequenzidentitäten.** Die mittels BLAST-Analyse bezogenen Sequenzidentitäten verschiedener Benzaldehydlyasen (BALs) im prozentualen Vergleich zueinander (*Pf*: *Pseudomonas fluorescens*, *Sp*: *Silicibacter pomeroyi*, *Fp*: *Francisella philomiragia*, *Rp*: *Rhodopseudomonas palustris*).

Die meisten ThDP-abhängigen Enzyme weisen geringe Sequenzidentitäten, allerdings bei hoher Strukturhomologie auf (Frank *et al.*, 2007). Aus diesem Grund und weil Enzyme mit neuen katalytischen Fähigkeiten eine Bereicherung für die *Toolbox* wären, wurden beide potentiellen BALs trotz der geringen Sequenzidentität zur *PfBAL* zugänglich gemacht. Diese Arbeiten erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Tina Gerhards (Gerhards, 2009).

### 4.1.1.1 Klonierungsstrategie

Damit das potentielle Enzym *SpBAL* exprimiert und gereinigt werden konnte, musste das kodierende Gen (NCBI-Accession-Nr.: AAV95643) in Expressionsvektoren eingebracht werden. Aufgrund fehlender struktureller Daten konnte die optimale Lokalisation des Hexahistidintags nicht prognostiziert werden. Ob ein C- oder N-terminaler angefügter Hexahistidintag frei zugänglich ist war dementsprechend unklar. So wurden beide Fusionsproteine hergestellt und die Wahrscheinlichkeit einer freien Zugänglichkeit für die nachfolgende Reinigung konnte gewährleistet werden.

Das *Spbal*-Gen wurde mit den entsprechenden *Primern* (Kap. 3.1.6), auf Basis der präparierten genomischen DNA aus *Silicibacter pomeroyi*, mittels PCR amplifiziert. Das Gen konnte erfolgreich über die durch PCR eingefügten Schnittstellen (*NdeI* und *XhoI*) in die

Expressionsvektoren pET22b (C-terminaler Tag) und pET28a (N-terminaler Tag) ligiert werden. Kompetente *E. coli* DH5a-Zellen wurden mit potentiell positiven Klonen transformiert und nach einer Testrestriktion mittels Sequenzierung verifiziert.

Damit das potentielle Enzym *FpBAL* exprimiert werden konnte, wurde das Gen *Fpbal* (NCBI-Accession-Nr.: YP\_001678056.1) ausgehend von der veröffentlichten NCBI-Sequenz bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) als synthetisches Gen geordert. Die Gensequenz wurde für eine optimale Translation in *E. coli* einer Codon-Optimierung unterzogen (<http://www.evolvercode.net>; Wu & Zhang, 2006). Ferner wurden zwei Schnittstellen (*NdeI* und *NotI*) für die Umklonierung in den pET22b-Expressionsvektor eingefügt. Über den Vektor konnte das potentielle Enzym mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag fusioniert werden. Auch hier wurden kompetente *E. coli* DH5a-Zellen mit potentiell positiven Klonen transformiert und nach einer Testrestriktion mittels Sequenzierung verifiziert.

#### **4.1.1.2 Proteinexpression und -reinigung**

Im Anschluss an die erfolgreichen Klonierungen wurden die optimalen Expressionsbedingungen überprüft. Hierzu wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den zu testenden Konstrukten transformiert. Anschließend wurde der Einfluss der IPTG-Konzentration und der Temperatur auf die Expression in Hinblick auf die quantitative und qualitative Enzymausbeute untersucht. Die Analyse ergab für die *SpBAL*-Konstrukte folgende optimale Expressionsbedingungen: 25°C, IPTG-Konzentration: 0,5 – 1 mM. Für das *FpBAL*-Konstrukt lagen die optimalen Expressionsbedingungen bei 30°C und 1 mM IPTG.

Für die Reinigung der Enzyme wurden Proteinexpressionskulturen im 5 L-Maßstab (Kap. 3.2.3) angelegt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen mit einer Ausbeute von 20 – 30 g Zellmasse geerntet und anschließend bei -20°C gelagert.

Das *SpBAL\_C-His*-Konstrukt konnte mittels Metallaffinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix (Kap. 3.5.5) bei einem pH-Wert von 7,0 bis zur Homogenität gereinigt werden (Gerhards, 2009).

Im Gegensatz zu der Reinigung des Konstruktes mit C-terminalen Hexahistidin-Tag konnte das *SpBAL\_N-His*-Enzym nicht mittels Metallaffinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gereinigt werden. Aus vorherigen Arbeiten war bekannt, dass die meisten ThDP-abhängigen Enzyme einen frei zugänglichen C-Terminus besitzen und so auch über einen C-terminalen Hexahistidin-Tag gereinigt werden können (*ApPDC*, Gocke *et al.*, in Arbeit; *ZmPDC*, Mesch, 1997; *PfBAL*, Janzen *et al.*, 2006; Kneen *et al.*, 2005; *PpBFD*, Iding *et al.*, 2000). Aus diesem

Grund war eine erfolgreiche Bindung über den N-terminalen Hexahistidin-Tag an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix weniger wahrscheinlich. Folglich wurde eine Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt (Kap. 3.5.4). Das *SpBAL*\_N-His-Enzym konnte erfolgreich mit einer Reinheit von ~ 90% durch einen NaCl-Gradienten von der Säule eluiert werden.

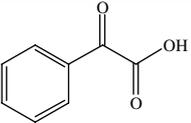
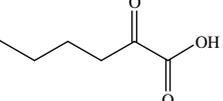
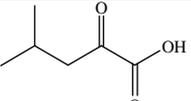
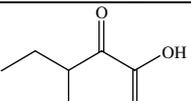
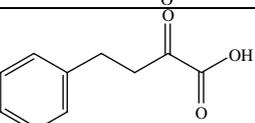
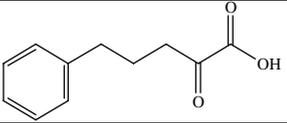
Das *FpBAL*\_C-His-Enzym wurde löslich exprimiert und konnte im Rohextrakt nachgewiesen werden. Fehlende Aktivitäten im Rohextrakt (Kap. 4.1.1.3 & 4.1.1.4) führten zu dem Entschluss dieses Enzym nicht zu reinigen.

### 4.1.1.3 Lyaseaktivität

Bei den Decarboxylasen stellt die Lyaseaktivität, bei der Transketolase beispielsweise die Carboligation die physiologische Hauptreaktion dar. Welche Reaktion durch die *PfBAL* bevorzugt katalysiert wird, ist bis heute noch unklar. Beide potentiellen neuen Benzaldehydlyasen (*SpBAL* und *FpBAL*) wurden mittels verschiedener Aktivitätstests auf Lyaseaktivität untersucht. Dazu wurde frisch hergestellter Rohextrakt in folgende Tests eingesetzt: Benzoin-Spaltung (Kap. 3.6.3.1) und Decarboxylaseaktivität mittels indirekten Photometertest (Kap. 3.6.3.2).

Der photometrische Nachweis der Enzym-katalysierten Benzoin-Spaltung konnte nicht erbracht werden. In Bezug auf die Decarboxylaseaktivität wurde in einem indirekten photometrischen Schnelltest im Mikrotiterplatten-Format ein Substratspektrum mit diversen 2-Ketosäuren aufgenommen. Erste Interpretationen des Vortests zeigten, dass die Aktivitäten im Falle von länger- oder verzweigt-kettigen, sowie komplexeren aromatischen 2-Ketosäuren, deutlich über der Hintergrundaktivität des *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstammes lagen (nicht abgebildet). Weitere Untersuchungen wurden mittels indirekten Decarboxylasetest photometrisch (Kap. 3.6.3.2) durchgeführt (Tab. 12).

**Tab. 12: Decarboxylase-Substratspektren der *Sp*BAL und *Fp*BAL.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylasetest mit verschiedenen Substraten und n = 3 (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.6). Substrat **1** wurde mit 5 mM Endkonzentration im Test eingesetzt; **2, 3, 4** und **6** mit 30 mM. Substrat **5** wies eine sehr geringe Löslichkeit auf, hier wurde nach einer Zentrifugation der klare Überstand in den Test eingesetzt. Durch Zugabe der Rohextrakte wurden die Reaktionen gestartet und photometrisch verfolgt. Als Positivkontrolle diente der Rohextrakt der *Pp*BFD. Ugs.: umgangssprachlich.

| Nr.      | 2-Ketosäure                                  | Strukturformel  | relative Aktivitäten [%] |               |               |
|----------|--|---|--------------------------|---------------|---------------|
|          |  |   | <i>Pp</i> BFD            | <i>Sp</i> BAL | <i>Fp</i> BAL |
| <b>1</b> | Phenylglyoxylsäure<br>(ugs.: Benzoylformiat) |    | 100                      | 0,07          | 0,02          |
| <b>2</b> | 2-Ketohexansäure                             |    | 0,8                      | 0,08          | 0,05          |
| <b>3</b> | 2-Keto-4-methyl-pentansäure                  |    | 1,2                      | 0,08          | 0,04          |
| <b>4</b> | 2-Keto-3-methyl-pentansäure                  |   | 0,7                      | 0,07          | 0,03          |
| <b>5</b> | 2-Keto-4-phenyl-butansäure                   |  | 0,7                      | 0,1           | 0,05          |
| <b>6</b> | 2-Keto-5-phenyl-pentansäure                  |  | 1,5                      | 0,03          | 0,02          |

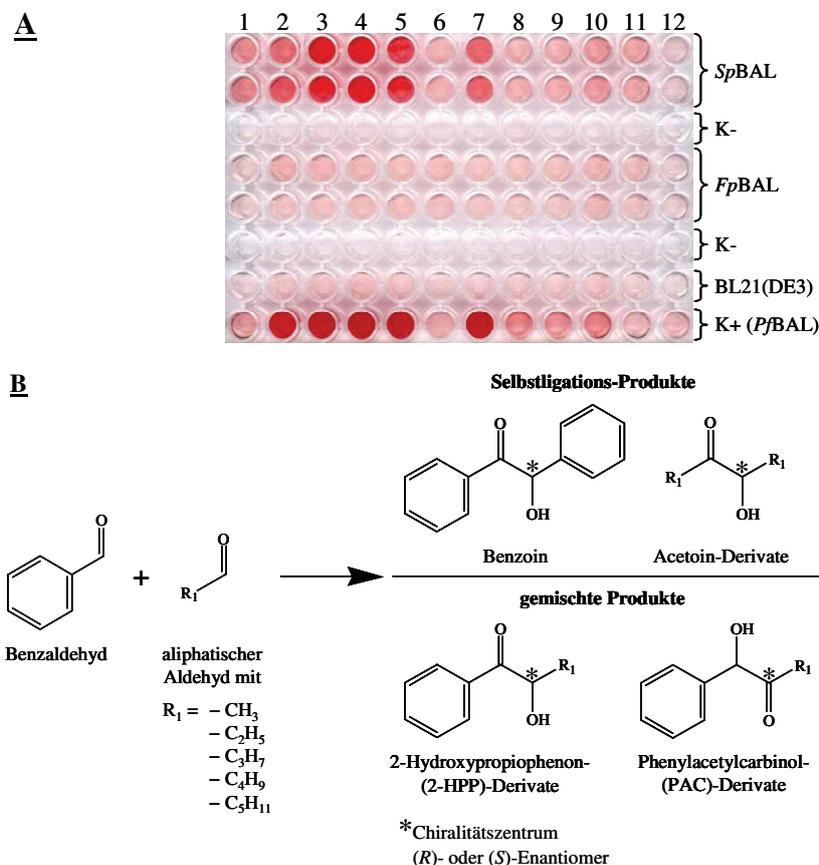
Im Vergleich zu den relativen Aktivitäten (Hintergrundaktivitäten) des BL21(DE3)-Expressionsstammes von 0,004 – 0,01% (nicht mit aufgeführt) wiesen weder *Sp*BAL, noch *Fp*BAL eine signifikante Aktivität auf. Bei der *Pp*BAL und bei der *Rp*BAL konnten ebenfalls keine signifikanten Decarboxylaseaktivitäten nachgewiesen werden (Brosi, 2006). Lediglich die Annahme, dass komplexere 2-Ketosäuren als bevorzugtes Substrat dienen könnten, lässt die Hypothese zu, dass durch Überprüfung weiterer Substrate eine deutlichere Aktivität gefunden werden könnte. Dieser methodische Ansatz wäre für die *Sp*BAL eventuell lohnenswert, da in den Versuchen zur Carboligaseaktivität signifikante Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Dieser Aspekt wird im nun folgenden Kapitel dargestellt.

### 4.1.1.4 Carboligaseaktivität

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, kann neben der Lyaseaktivität die so genannte Carboligation (Kap. 1.4.4) ebenfalls eine bedeutende Rolle im Katalysemechanismus verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme spielen.

Wie anhand der *RpBAL* gezeigt werden konnte (Brosi, 2006), muss eine fehlende Lyaseaktivität nicht zwingend bedeuten, dass potentielle neue ThDP-abhängige Enzyme in der Carboligation ebenfalls inaktiv sind. Das Enzym *RpBAL* wies im Gegensatz zum *PfBAL*-Enzym, mit  $< 1$  U/mg zu 336 U/mg für die Benzoin-Synthese allerdings eine wesentlich geringe spezifische Aktivität auf (Brosi, 2006; Gocke, 2007; Janzen *et al.*, 2006).

Beide Benzaldehydlyasen wurden mittels eines Schnelltests auf Carboligaseaktivität im Mikrotiterplatten-Format analysiert (TTC-Test, Kap. 3.6.8). In Abb. 23 ist das Ergebnis dargestellt.



**Abb. 23: SpBAL und FpBAL: Carboligaseaktivitäts-Screening.** **A:** Die zu untersuchenden Enzyme wurden neben einer Positivkontrolle (K+: PpBAL) und zwei Negativkontrollen (K-: Kpi-Puffer, BL21(DE3)) im TTC-Test auf Carboligaseaktivität hin untersucht. Als Substrate dienten Benzaldehyd (BA) und aliphatische Aldehyde in folgender Zusammensetzung: 1: BA + Acetaldehyd, 2: BA + Propanal, 3: BA + Butanal, 4: BA + Pentanal, 5: BA + Hexanal, 6: K-, 7: BA, 8: Acetaldehyd, 9: Propanal, 10: Butanal, 11: Pentanal, 12: Hexanal. Reaktionsbedingungen: 18 mM BA, 18 mM aliphatische Aldehyde, 50 mM Kpi-Puffer pH 7,0 mit 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 mM ThDP, 20% DMSO, 30°C, 130 UpM. Die Inkubation erfolgte über 16 h mit Rohextrakten. Die Rotfärbung erfolgte nach Zugabe der TTC-Lösung in Anwesenheit von 2-Hydroxyketonen; die Platte wurde nach 2 min gescannt. **B:** Darstellung der möglichen Produkte aus der Ligation von BA mit verschiedenen aliphatischen Aldehyden. Es können sowohl Selbstligationsprodukte, als auch gemischte Produkte entstehen (Kap. 1.4.5).

Es konnte keine Carboligaseaktivität für das FpBAL-Enzym nachgewiesen werden, allerdings eine sehr deutliche für das SpBAL-Enzym (Abb. 23 **A**). In den Spalten 1 – 5 in Abb. 23 wurde als Substratlösung eine Mischung aus Benzaldehyd (BA) und aliphatischen Aldehyden eingesetzt. Mit zunehmender Kettenlänge der aliphatischen Aldehyde, von Acetaldehyd (Spalte 1) bis Pentanal (Spalte 4), nimmt die Rotfärbung kontinuierlich zu. Dies bedeutet, dass mehr Produkt synthetisiert wurde. Im Falle der Kombination von Benzaldehyd und Hexanal (Spalte 5) lässt sich ein leichter Rückgang der Rotfärbung erkennen, welcher dadurch

zustande gekommen sein könnte, dass der Umsatz aufgrund des sterisch anspruchsvolleren Substrates zurückgegangen ist. Anhand dieses Testes kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches der vier möglichen Produkte gebildet wurde (Abb. 23 **B**). Es kann sich um ein Selbstligations- oder um ein gemischtes Produkt handeln. In Spalte 7 wurde lediglich BA als Substrat eingesetzt; diese Rotfärbung beruht somit allein auf der Benzoin-Synthese der *SpBAL*. Da in den Spalten 3, 4 und 5 eine stärkere Rotfärbung als in Spalte 7 zu erkennen ist, muss es sich, neben Benzoin, um ein weiteres Produkt handeln. Eine Selbstligation der aliphatischen Aldehyde (Spalten 8 – 12) scheint ebenfalls mit zunehmender Kettenlänge zu erfolgen. Hier muss jedoch erwähnt werden, dass die Nachweisgrenzen für länger-kettige aliphatische 2-Hydroxyketone nicht bekannt ist. Somit kann auch keine quantitative Aussage getroffen werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Substratkombinationen BA + Butanal (Spalte 3), BA + Pentanal (Spalte 4) und BA + Hexanal (Spalte 5) neben den Selbstligationsprodukten um die Synthese gemischter Produkte. Ob jedoch ein HPP- oder PAC-Derivate entstanden ist und in welcher chiralen Konformation diese(s) Produkt(e) vorliegen, soll mittels instrumenteller Analytik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller der Universität Freiburg untersucht werden. Dieses Projekt konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden.

Das Ergebnis des Carboligaseaktivitäts-*Screenings* deutet auf ein relativ großes aktives Zentrum in der *SpBAL* hin. Fasst man die Daten der Lyase- und der Carboligaseaktivität zusammen, ist zu erkennen, dass bevorzugt Benzaldehyd in Kombination mit länger-kettigen Aldehyden und komplexere 2-Ketosäuren als Substrate akzeptiert werden.

### 4.1.2 Benzoylformiatdecarboxylase aus *Chromobacterium violaceum*

Neben der *PfBAL* stellt die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*PpBFD*) ein weiteres biotechnologisch bedeutsames Enzym dar und ist das bis heute am besten charakterisierte Enzym mit Decarboxylaseaktivität gegenüber Benzoylformiat (Kap. 1.5.2). Neben vielen anderen zur *PpBFD* ähnlichen Sequenzen zeigt die potentielle Benzoylformiatdecarboxylase aus *Chromobacterium violaceum* (*CvBFD*) (Sequenzidentität zur *PpBFD*: 28%) eine veränderte Abfolge der Aminosäuren, welche direkt hinter dem ThDP-bindendem Motiv liegen. In Abb. 24 ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs dargestellt.

```

PpBFD  -----ERQVIAVIGDGSANYSISALWTAQYNIPTIFVIMNN-----GTY
CvBFD  CQDINTRFVVAATGDGSSLFYPQTWWTAQHRQLGVLYIIITNNHEYHTLQMGLTQVEAMY
          * * * * *          * * * * *          * * * * *
PpBFD  GALRWFAGVLEAEN---VPGLDVPGIDFRALAKGYG-VQALKADNLEQLKGSLEALSAAK
CvBFD  GEAPGYEWTARTQDPE-YLRIHRPKPDFVTLAKAFGGMEGEIVRHPEDVRAAVRRGIDHA
          * * * * *          * * * * *          * * * * *

```

**Abb. 24: Ausschnitt eines Aminosäure-Sequenzvergleichs der PpBFDwt und der CvBFDwt.** In **Fett** gedruckt ist das ThDP-bindende Motiv G-D-G-(X)<sub>24-25</sub>-N zu erkennen. Unterstrichen sind sie 14 Aminosäuren, die keine Sequenzhomologie zu der PpBFD aufweisen. (\* = identische Aminosäuren).

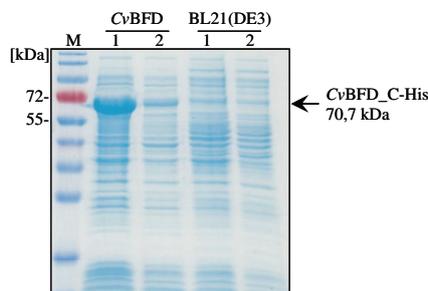
Äußerst interessant an diesem Ausschnitt sind die 14 Aminosäuren in der Sequenz der CvBFD, die in der PpBFD nicht vorhanden sind (unterstrichener Teil in Abb. 24). Die Sequenzinsertion liegt in dem Bereich, indem sich die Aminosäuren befinden, die bei der PpBFD das aktive Zentrum und vermutlich auch die S-Tasche bilden. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass das aktive Zentrum der CvBFD andere strukturelle Eigenschaften aufweist und sich somit die Funktionalität gegenüber der PpBFD unterscheidet.

#### 4.1.2.1 Klonierungsstrategie

Das potentielle Enzym CvBFD wurde exprimiert und charakterisiert. Hierzu wurde ein rekombinanter CvBFD-Klon hergestellt. Da der bakterielle Organismus *Chromobacterium violaceum* DSM 30191 durch die zentrale Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS) in die Risikogruppe 2 eingeordnet wurde, wurde genomische DNA bei der DSMZ bezogen. Das für die CvBFD kodierende Gen (*mdlC*, NCBI-Accession-Nr.: NC\_005085.1: 3387614 bis 3389530) wurde mittels PCR amplifiziert und über *NdeI/XhoI* in den pET22b-Expressionsvektor ligiert. Kompetente *E. coli* DH5a-Zellen wurden mit potentiell positiven Klonen transformiert und nach einer Testrestriktion mittels Sequenzierung verifiziert.

#### 4.1.2.2 Proteinexpression

Kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mit dem CvBFD-Konstrukt transformiert. Anschließend wurde eine Proteinexpressionskultur in einem Maßstab von 1 L durchgeführt (Kap. 3.2.3). So konnte ausreichend Zellmaterial für Aktivitätstests gewonnen werden.



**Abb. 25: Proteinexpression der CvBFD.** 12%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Expressionsproben der CvBFD und des BL21(DE3) als Negativkontrolle. 1: Kulturprobe nach 4 h Induktion. 2: Probe des Rohextraktes (löslicher Proteinanteil). M: Marker (Prestained Plus Protein *ladder*, Fermentas).

Wie in Abb. 25 zu sehen, war die Expression des potentiellen CvBFD-Konstruktes erfolgreich. Neben dem Marker ist eine deutliche Expressionsbande im Bereich von 70 kDa, dem kalkulierten Molekulargewicht des Enzyms, zu erkennen. Der Hauptanteil des Enzyms befindet sich allerdings in der unlöslichen Fraktion (nicht abgebildet). Der CvBFD-Rohextrakt (Spur 2) weist eine leichte Bande im Bereich von 70 kDa auf, in dem bei den BL21(DE3)-Proben keine Proteinbande zu erkennen ist. Die Expressionsbedingungen können durch eine Änderung der Temperatur, der IPTG-Konzentration oder durch den Wechsel des Expressionsstammes hinsichtlich einer erhöhten Proteinlöslichkeit optimiert werden. Allerdings waren die erzielten Ausbeuten für erste Aktivitätstests ausreichend.

#### 4.1.2.3 Lyaseaktivität

Wie für die neuen potentiellen Benzaldehydlyasen (Kap. 4.1.1.3), wurde für das CvBFD-Konstrukt ebenfalls ein 2-Ketosäure-Substratspektrum im Mikrotiterplatten-Format aufgenommen. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten der CvBFD befanden sich in einem Bereich von 0,7 – 2,7 U/mg, konnten allerdings aufgrund zu hoher Schwankungen durch den Plattentest nicht als signifikant gewertet werden.

Ausgewählte 2-Ketosäuren (Tab. 12) wurden mittels indirekten Decarboxylasetest erneut als Substrate der CvBFD getestet. Die Umsetzung von Benzoylformiat durch die CvBFD wies mit einer relativen Aktivität von 0,11% im Vergleich zu 0,01% für die Hintergrundkontrolle (BL21(DE3)) eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 11 auf. Die spezifische Aktivität lag bei 0,2 U/mg. Im Vergleich hierzu liegen die spezifischen Aktivitäten beispielsweise für die BFD aus *Pseudomonas putida* bei 400 U/mg (Gocke *et al.*, 2008), bei der BFD aus *P. aeruginosa* bei 75 U/mg (Wendorff, 2006) und bei der BfdC, ebenfalls aus *P. aeruginosa*,

bei 78,5 U/mg (Henning, 2007). Wie anhand dieser Beispiele deutlich wird, sind die spezifischen Aktivitäten hinsichtlich des bevorzugten Substrates ThDP-abhängiger Benzoylformiatdecarboxylasen deutlich höher als die bereits erwähnten 0,2 U/mg der CvBFD. Durch die zusätzlichen 14 Aminosäuren in der Sequenz der CvBFD (Abb. 24), welche sich in dem Bereich befinden, der bei der PpBFD das aktive Zentrum beeinflusst, besteht die Möglichkeit einer strukturellen Besonderheit. So könnte das aktive Zentrum beispielsweise sterische Vorteile für komplexere 2-Ketosäuren bieten. Zwei weitere Erklärungen für die geringe Lyaseaktivität können zum einen der Einfluss äußerer Faktoren wie pH-Wert und Temperatur sein oder zum anderen die Möglichkeit, dass das Enzym gar keine BFD ist, sondern eine bisher unbekannte Aktivität katalysiert.

#### **4.1.2.4 Carboligaseaktivität**

Die Carboligaseaktivität der potentiellen CvBFD wurde, wie in Kap. 4.1.1.4 mittels eines Schnelltests im Mikrotiterplatten-Format analysiert (TTC-Test, Kap. 3.6.8). Bei keiner Substratkombination konnte Produkt nachgewiesen werden. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass sterisch anspruchsvollere Aldehyde als Substrat für die Carboligation dienen könnten. Zudem könnten Ketone umgesetzt werden, wie für das ThDP-abhängige Enzym pigD aus *Serratia marcescens* gezeigt werden konnte (Müller *et al.*, 2007). Dieses Projekt wird derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller an der Universität Freiburg weitergeführt, ist aber bisher noch nicht abgeschlossen.

#### **4.1.3 Fazit: Neue ThDP-abhängige Enzyme**

Die Identifizierung neuer aktiver ThDP-abhängiger Enzyme mittels Datenbank-Recherche, stellte sich als schwierig dar. Über den konservierten ThDP-bindenden Bereich (ThDP-bindendes Motiv) werden viele potentielle Enzyme in die ThDP-Superfamilie eingeordnet. Jedoch können Enzyme im Laufe der Evolution durch den Austausch von Aminosäuren, die eine essentielle katalytische Funktion besitzen, zu katalytisch inaktiven Enzymen mutieren (Pils & Schultz, 2004) oder ihre Funktionen ändern. Dies kann unter anderem dadurch zustande kommen, dass sich Lebensbedingungen, wie Nahrungsquellen, von Organismen an neue Situationen anpassen. In einem solchen Fall unterliegt der Organismus einem Selektionsdruck und neue katalytische Eigenschaften können sich entwickeln. Auf einer solchen Grundlage fundiert wird auch angenommen, dass sich die Vielzahl ThDP-abhängiger Enzyme

## **ERGEBNISSE & DISKUSSION**

---

aus einem oder wenigen Vorläuferenzymen entwickelt hat (Frank *et al.*, 2007). Eine effektivere aber auch langwierigere Methode neue Enzyme zu identifizieren, ist wahrscheinlich der Ansatz über ein Aktivitäts-basiertes *Screening* (Henning, 2007). Jedoch ist diese Methodik durch die *Screening*-Methode beeinträchtigt und kann lediglich dann angewendet werden, wenn auf konkrete Produkte abgezielt werden kann.

Weiterführende Untersuchungen der *SpBAL* mittels instrumenteller Analytik werden derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller der Universität Freiburg durchgeführt. Erste Ergebnisse im TTC-Test zeigten eine deutliche Carboligaseaktivität mit einer Tendenz zu gemischten 2-Hydroxyketonen, wobei aliphatische länger-kettige Aldehyde präferiert wurden. Dies lässt vermuten, dass das aktive Zentrum der *SpBAL* größer als das der bisher bekannten ThDP-abhängigen Enzyme ist.

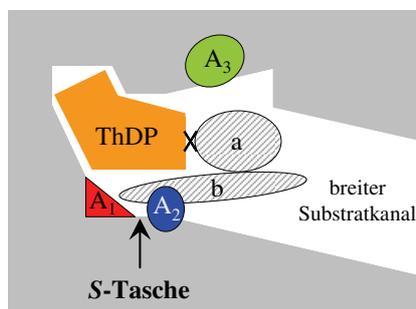
## 4.2 Konzepte für den Zugang zu (S)-2-Hydroxypropiofenon-Derivaten

Die *Toolbox* der ThDP-abhängigen Enzyme kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erweitert werden (Kap. 1.2). Der erste besteht darin neue Enzyme, wie beispielsweise die Benzaldehydlyase aus *Silicibacter pomeroyi* (*SpBAL*) (Kap. 4.1.1) hinzuzufügen, der zweite umfasst die Herstellung geeigneter Varianten von bereits gut charakterisierten Enzymen aus der *Toolbox*. Aufgrund struktureller Daten und einer daraus hervorgegangenen Kartierung der aktiven Zentren verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme, auf die in Kapitel 1.4.6.1 näher eingegangen wird (Tab. 5), können gezielt Konzepte für die Synthese spezieller Produkte erarbeitet werden (Pohl *et al.*, 2009). Der Ausgangspunkt für die Synthese von (S)-2-Hydroxypropiofenon- (2-HPP-) Derivaten liegt in der Beobachtung der (S)-2-HPP-Synthese mittels Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*PpBFD*, Iding *et al.*, 1998; Wilcocks *et al.*, 1992) (Kap. 1.4.6.1). Die Hypothese, dass sich bei der Bildung von (S)-2-HPP ein Acetaldehyd-Molekül antiparallel an ein Benzaldehyd-Molekül anlagern kann (Kap. 1.4.6.1), wird auf der Entdeckung eines strukturellen Elementes, der so genannten *S*-Tasche, gegründet (Knoll *et al.*, 2006). Bekräftigt wurde die Hypothese durch die Variante *PpBFD*M365L/L461S, bei der zwei Aminosäuren im aktiven Zentrum verkleinert wurden. So konnte das Substratspektrum erweitert und die Synthese von *ortho*-substituierten (S)-2-HPP-Derivaten gezeigt werden (Lingen *et al.*, 2003).

### 4.2.1 Optimierung der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* mittels zielgerichteter Mutagenese

#### Planung neuer *PpBFD*-Varianten anhand der Kristallstruktur

Spätestens seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur (Hasson *et al.*, 1998) konnten katalytisch oder strukturell wichtige Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums der *PpBFD*wt identifiziert werden. In diversen Studien wurden Strukturvergleiche durchgeführt und zahlreiche *PpBFD*-Varianten erzeugt (Iding *et al.*, 2000; Kneen *et al.*, 2005; Knoll *et al.*, 2006; Polovnikova *et al.*, 2003; Siegert, 2000; Siegert *et al.*, 2005). Grundsätzlich können zwei wichtige strukturelle Bereiche im aktiven Zentrum der *PpBFD* definiert werden (Abb. 26 a und b) (Knoll *et al.*, 2006).

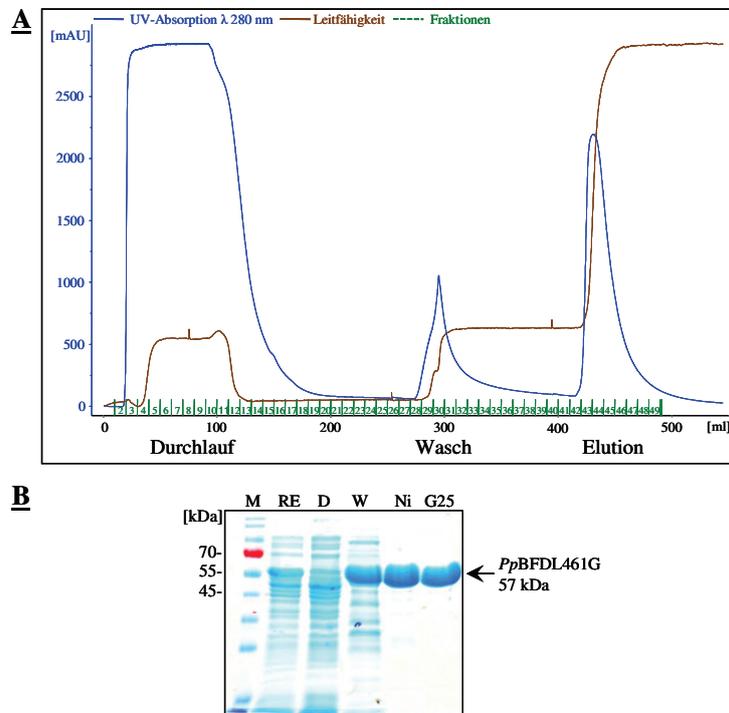


**Abb. 26: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der *PpBFD*.** Der Cofaktor ThDP ist in seiner typischen V-Konformation im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden. X stellt das C2-Atom des Thiazoliumrings dar, an das der Donor (2-Ketosäure oder Aldehyd) bindet. Dementsprechend wird die Donor-Bindestelle (a) von einer in Position  $A_3$  lokalisierten Aminosäure definiert. Die Akzeptoraldehyd-Bindestelle (b) wird durch zwei Positionen beeinflusst:  $A_1$  und  $A_2$ , wobei  $A_1$  maßgeblich die Größe der S-Tasche bestimmt und  $A_2$  den Eingang zur S-Tasche (Gocke, 2007; Knoll *et al.*, 2006).

Die Donor-Bindestelle (Abb. 26, Bereich a) wird in der *PpBFD*wt unter anderem von einem Histidin (His281) im Bereich  $A_3$  beeinflusst. Die Akzeptor-Bindestelle (Abb. 26, Bereich b) wird von den Positionen  $A_1$  und  $A_2$ , definiert. Die Position  $A_1$  beeinflusst die Größe der S-Tasche, die Position  $A_2$  die Zugänglichkeit, bzw. den Eingang zur S-Tasche. In der *PpBFD*wt wird der Bereich  $A_1$  durch ein Leucin (Leu461) und  $A_2$  durch ein Alanin (Ala460) besetzt. Der Austausch von Leucin in Position 461 zu Alanin resultierte in der Variante *PpBFDL461A* (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, 2008). Die Ligation von Benzaldehyd und Propanal mittels *PpBFDL461A* führte, mit einem Umsatz von 21,5%, zu einem (*S*)-2-HPP-Derivat (*ee* 93%). Wird selbige Reaktion mit der *PpBFD*wt durchgeführt, so erhält man mit lediglich 6% Umsatz das komplementäre (*R*)-2-HPP-Derivat (*ee* 21%, Gocke *et al.*, 2008). Die Kombination aus bereits existenten Varianten für weitere Interpretationen bezüglich der Struktur-Funktions-Beziehungen wird in Kapitel 4.3 ausführlich diskutiert.

#### Herstellung, Expression und Reinigung von *PpBFD*-Varianten

Die Herstellung von *PpBFD*-Varianten wurde mit der Methode der zielgerichteten Mutagenese durchgeführt (Kap. 3.3.2.4). Über speziell konstruierte Oligodesoxyribonukleotide (Kap. 3.1.6) konnten gezielt Punktmutationen in das kodierende Gen eingebracht werden. Alle in dieser Dissertation vorgestellten Varianten wurden im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgreich exprimiert (Kap. 3.2.3) und anschließend mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (Kap. 3.5.5) gereinigt. Exemplarisch ist die Reinigung der *PpBFDL461G*-Variante dargestellt (Abb. 27).



**Abb. 27: Affinitätschromatographische Reinigung der PpBFDL461G.** **A:** Chromatogramm der Reinigung: Elution des Durchlaufs mit Äquilibrierungspuffer; der Waschfraktion (Wasch) mit Waschpuffer und des Elutionspeaks mit Elutionspuffer. **B:** SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung: M: Marker (*Prestained Plus Protein ladder*, Fermentas); RE: Rohextrakt; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; Ni: Eluat der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule; G25: Eluat der Größenausschlusschromatographie.

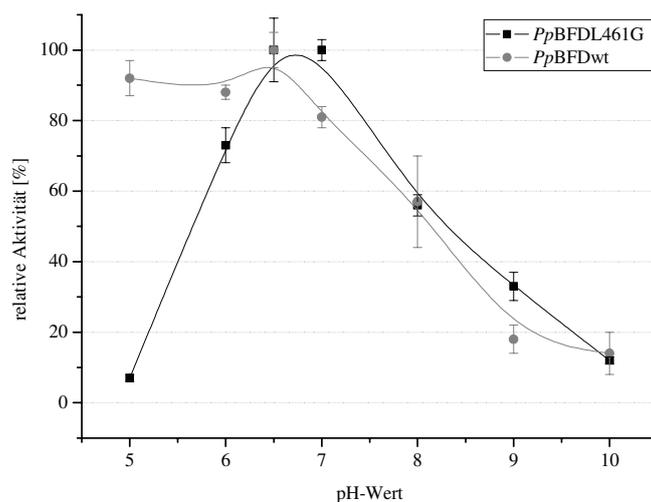
Die gereinigte PpBFDL461G-Variante lag mit einer Reinheit von  $\geq 99\%$  vor (Abb. 27 **B**). Die Proteinkonzentration von 70 ml Elutionsfraktion betrug 3,7 mg/ml, dementsprechend konnten aus ungefähr 10 g Zellen 259 mg reines Enzym erhalten werden. Die spezifische Aktivität gegenüber Benzoylformiat in der Elutionsfraktion wies mit 47 U/mg in etwa nur 12% der Aktivität der PpBFDwt auf (400 U/mg, Gocke *et al.*, 2008). Eine Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.5.6) wurde durchgeführt um die extrem hohe Imidazolkonzentration von 250 mM von der Proteinfraction zu trennen (nicht abgebildet). Die spezifische Aktivität der entsalzten Proteinprobe (Abb. 27 **B**, G25) lag bei 40 U/mg. So kann festgehalten werden, dass Imidazol keinen inhibierenden Effekt auf das Enzym ausübt. Im weiteren Verlauf wurden die Varianten gefriergetrocknet (Kap. 3.4.6) und das Lyophilisat bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Folgenden wurde die Variante PpBFDL461G genauer charakterisiert.

## 4.2.2 Biochemische Charakterisierung der *PpBFDL461G*-Variante

Bei der Herstellung der *PpBFDL461G*-Variante stand die Vergrößerung der *S*-Tasche im Vordergrund. Für eine optimale Charakterisierung der von der Variante katalysierten Reaktionen, wurden zu Beginn die optimalen Reaktionsbedingungen getestet. Alle nachfolgenden Versuche wurden in 50 mM Kpi-Puffer inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> (optional 20% DMSO) durchgeführt. So konnten Veränderungen der Aktivitäten in verschiedenen Puffer-Systemen ausgeschlossen werden.

### 4.2.2.1 Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der *PpBFDL461G*-Variante

#### Bestimmung des pH-Optimums



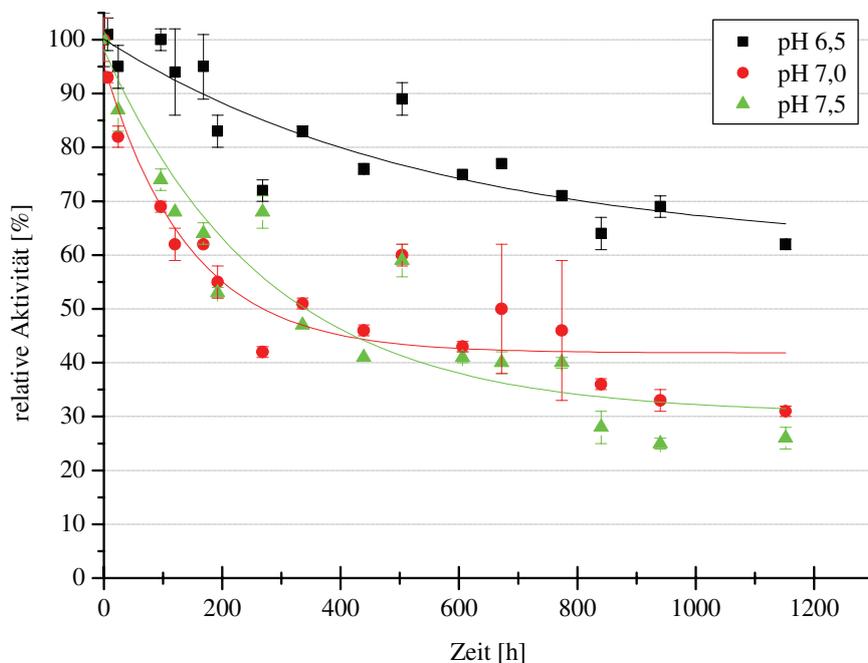
**Abb. 28: pH-Optima der *PpBFDL461G*-Variante und der *PpBFDwt*.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei 30°C mittels direkten Decarboxylasetest mit Benzoylformiat als Substrat (Kap. 3.6.4). Die pH-Werte der einzelnen Messungen wurden variiert. Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit  $n = 3$ ; 100% [*PpBFDL461G*] = 73 U/mg und 100% [*PpBFDwt*] = 431 U/mg.

Das pH-Optimum für die Decarboxylaseaktivität der *PpBFDL461G* liegt zwischen pH 6,5 und pH 7,0 (Abb. 28). Unterhalb von pH 6,5 ist ein starker Abfall der Aktivität auf 73% bei pH 6,0 und lediglich 7% bei pH 5,0 zu erkennen. Das pH-Optimum der *PpBFDwt* liegt bei pH 6,5. Die Daten des Wildtyps decken sich mit publizierten Daten (Iding *et al.*, 2000). Bei der Variante ist eine leichte Verschiebung zu basischeren pH-Werten erkennbar. Eventuell

kann durch eine basische Umgebung eine bessere Stabilisierung der deprotonierten Ylid- oder Enamin-Carbanion-Form gewährleistet werden (Kap. 1.4.4, Abb. 8) (Iding *et al.*, 2000; Kluger & Tittmann, 2008).

#### Bestimmung der pH-abhängigen Stabilität

Für biotechnologische Prozesse müssen Enzyme über Tage oder Wochen stabil sein. Da das pH-Optimum eines Enzyms auf Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten beruht, die in einem Zeitraum von 60 – 120 Sekunden gemessen werden, erhält man keine Aussage über eine längerfristige Stabilität des Enzyms bei bestimmten pH-Werten.



**Abb. 29: pH-Stabilität der PpBFDL461G-Variante.** Die Inkubation der Variante erfolgte 48 Tage in 50 mM Kpi-Puffer (inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) bei verschiedenen pH-Werten und 30°C. Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte mittels indirekten Decarboxylasetest mit Benzoylformiat als Substrat (Kap. 3.6.3.2). Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit n = 3; Anfangsaktivitäten zum Zeitpunkt t = 0: 100% [pH 6,5] = 86 U/ml, 100% [pH 7,0] = 102 U/ml und 100% [pH 7,5] = 105 U/ml.

Die PpBFDL461G-Variante ist über einen sehr langen Zeitraum stabil. Bei pH 6,5 ist nach 48 Tagen ein Aktivitätsverlust von lediglich 30% zu verzeichnen, die Halbwertszeit (Kap. 3.6.5)

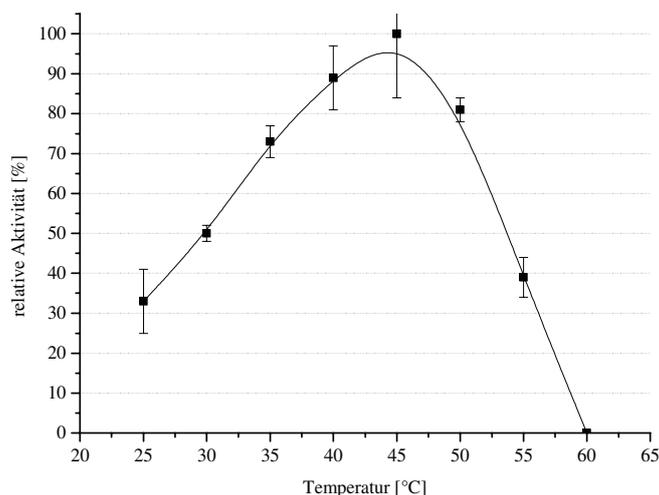
## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

liegt hier bei  $> 1152$  h. Im pH-Bereich von pH 7,0 und pH 7,5 wird eine deutlich schnellere Abnahme der Aktivität erkennbar. Die Halbwertszeiten liegen mit  $\sim 260$  Stunden bei pH 7,0, bzw. mit  $\sim 340$  Stunden bei pH 7,5 um 70 – 80% deutlich unter der Halbwertszeit bei pH 6,5. Insgesamt zeigt die *PpBFDL461G*-Variante im pH-Bereich von 6,5 – 7,5 eine gute Stabilität, die mit der *PpBFDwt* vergleichbar ist (Iding *et al.*, 2000). Es hat sich kein Verlust der pH-abhängigen Stabilität durch den Austausch einer Aminosäure im aktiven Zentrum gezeigt.

### Bestimmung des Temperatur-Optimums

Die Temperaturabhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *PpBFDL461G*-Variante wurde in einem Bereich von 25 – 60°C bestimmt.



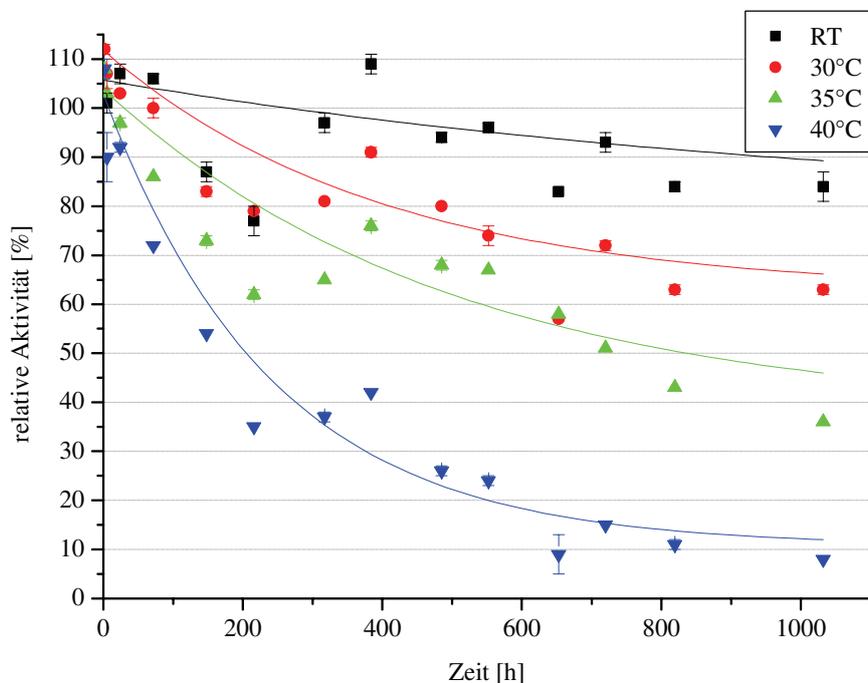
**Abb. 30: Temperatur-Optimum der *PpBFDL461G*-Variante.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 mittels direkten Decarboxylasetest bei pH 6,5 mit Benzoylformiat als Substrat (Kap. 3.6.4). Die Temperaturen der einzelnen Messungen wurden variiert. Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit  $n = 3$ ; 100% [*PpBFDL461G*] = 90 U/mg.

Die Ergebnisse in Abb. 30 zeigen eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 3 bei einer Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 45°C. Bei 45°C ist unter den gewählten Bedingungen das Maximum der Aktivität, das Temperatur-Optimum erreicht. Allgemein werden Proteinstrukturen durch ein komplexes Gleichgewicht von intramolekularen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie Wasserstoff-Brückenbindungen, hydrophoben-, ionischen- und Van der Waals-Kräften, zusammengehalten. Bei erhöhten Temperaturen (40 – 70°C) tendieren die

meisten Enzyme zu einer Entfaltung (Mayor *et al.*, 2000), wobei die intramolekularen Wechselwirkungen aufgrund der steigenden Entropie nicht mehr aufrechterhalten werden können. Bis zum Wendepunkt der Kurve bei 45°C überwiegt die Beschleunigung der Enzymreaktion die Deaktivierung. Dies geschieht aufgrund der Temperaturerhöhung. Über 45°C ist die thermische Inaktivierung so schnell, dass sie sich bereits innerhalb des Messbereiches des Decarboxylasetests bemerkbar macht. Die Aktivierungsenergie  $E_A$  der *PpBFDL461*-Variante beträgt für die Decarboxylierung von Benzoylformiat 45 kJ/mol. Die *PpBFDwt* besitzt eine Aktivierungsenergie  $E_A$  von 38 kJ/mol (Iding *et al.*, 2000) und die *BfdC* von 57 kJ/mol (Henning, 2007). Allgemein lässt sich sagen, dass die Werte für die Aktivierungsenergie  $E_A$  bei allen drei Enzymen im selben Bereich liegen.

#### Bestimmung der Temperatur-abhängigen Stabilität

Neben dem Temperatur-Optimum ist die Stabilität bei verschiedenen Temperaturen über einen längeren Zeitraum ebenso wichtig wie die pH-Stabilität. Die Tendenz einer schnelleren Deaktivierung bei höheren Temperaturen ist in Abb. 31 sehr deutlich zu erkennen. Die beste Stabilität zeigt die *PpBFDL461G*-Variante im untersuchten Temperaturbereich bei RT (~ 25°C). Je höher die Temperatur eingestellt wird, desto deutlicher wird der Aktivitätsverlust über die Zeit. Bei 40°C sind deutliche Verluste der Aktivität zu erkennen.



**Abb. 31: Temperatur-Stabilität der *PpBFDL461G*-Variante.** Die Inkubation der Variante erfolgte 43 Tage in 50 mM Kpi-Puffer (inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) bei verschiedenen Temperaturen und einem pH-Wert von 6,5. Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte mittels indirekten Decarboxylasetest mit Benzoylformiat als Substrat (Kap. 3.6.3.2). Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit n = 3; Anfangsaktivitäten zum Zeitpunkt t = 0: 100% [RT; ~ 25°C] = 69 U/ml, 100% [30°C] = 71 U/ml, 100% [35°C] = 74 U/ml und 100% [40°C] = 68,5 U/ml.

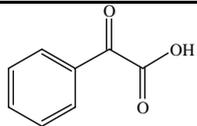
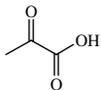
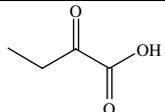
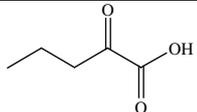
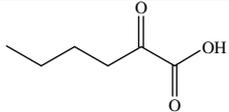
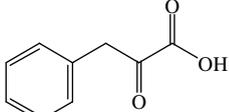
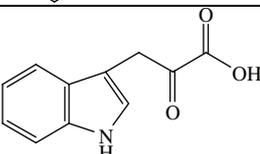
Für eine genauere Analyse der *PpBFDL461G*-Temperatur-Stabilität wurde die Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}$ ) der thermischen Inaktivierung bestimmt.

Die Deaktivierungsgeschwindigkeiten der *PpBFDL461G*-Variante sind bei den Temperaturen bis 35°C sehr gering und führen zu extrem hohen Halbwertszeiten von 3466 h bei RT, 1155 h bei 30°C und 770 h bei 35°C. Aufgrund der Streuung der Messwerte ist die Bestimmung der Halbwertszeiten jedoch verhältnismäßig ungenau und kann nur als Richtwert dienen. Bei 40°C, einer unter dem Optimum von 45°C gewählten Temperatur, liegt die Halbwertszeit bei 267 h. Dies macht deutlich, dass der Bereich des Temperatur-Optimums nicht zwangsläufig die bestmögliche Temperatur für eine längerfristige Anwendung darstellt.

**4.2.2.2 Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der *PpBDFL461G*-Variante**

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Decarboxylase-Substratspektrums tabellarisch aufgeführt.

**Tab. 13: Decarboxylase-Substratspektren der *PpBFDwt* und der *PpBFDL461G*-Variante.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylasetest mit verschiedenen Substraten und n = 3 (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.6). Die Substrate **1 – 6** wurden mit 30 mM, **7** wurde mit 1 mM in den Test eingesetzt. Bei manchen Substraten wurde lediglich der klare Überstand der gesättigten Lösung verwendet. Durch Zugabe der gereinigten Enzyme wurden die Reaktionen gestartet und photometrisch verfolgt. 100% [*PpBFDwt* mit Benzoylformiat] = 384 U/mg. Ugs.: umgangssprachlich.

| Nr. | 2-Ketosäure                                     | Strukturformel  | relative Aktivitäten [%] |                   |
|-----|---|---|--------------------------|-------------------|
|     |   |   | <i>PpBFD</i>             | <i>PpBFDL461G</i> |
| 1   | Phenylglyoxylsäure<br>(ugs.: Benzoylformiat)    |    | 100                      | 7,3               |
| 2   | 2-Ketopropansäure<br>(ugs.: Pyruvat)            |   | 0,03                     | 0                 |
| 3   | 2-Ketobutansäure                                |  | 1,5                      | 0,01              |
| 4   | 2-Ketopentansäure                               |  | 0,6                      | 0,01              |
| 5   | 2-Ketohexansäure                                |  | 2,4                      | 0,03              |
| 6   | 2-Keto-3-phenyl-propansäure                     |  | 0,01                     | 0,03              |
| 7   | Indol-3-glyoxylsäure<br>(ugs.: Indol-3-pyruvat) |  | 0                        | 0                 |

Es ist bekannt, dass der Wildtyp der *PpBFD* primär aromatische 2-Ketosäuren decarboxyliert. Neben dem Hauptsubstrat Benzoylformiat werden *para*-substituierte Benzoylformiat-Derivate

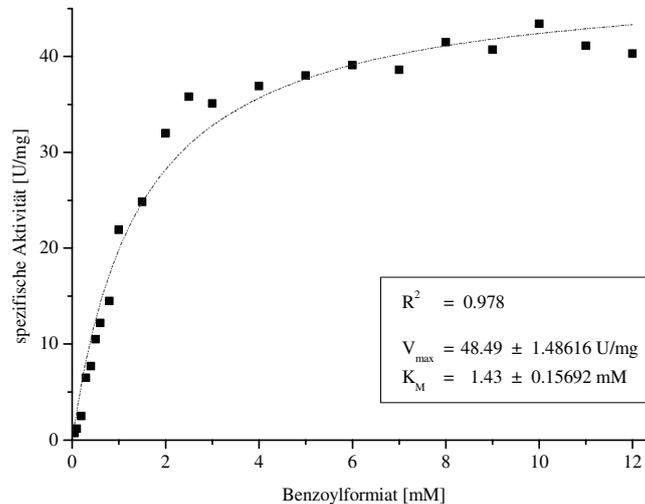
(Reynolds *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1988) aber auch aliphatische 2-Ketosäuren (Iding *et al.*, 2000) als Substrat akzeptiert.

Die Akzeptanz von Benzoylformiat (**1**) als Hauptsubstrat ist sowohl für die *PpBFDwt*, als auch für die Variante erkennbar. Aliphatische Ketosäuren (**2 – 5**) werden minimal umgesetzt. Im Falle der *PpBFDwt* zeigt sich, wie bereits publiziert (Iding *et al.*, 2000), die höchste Aktivität mit 2-Ketohexansäure. Die Variante weist gegenüber aliphatischen 2-Ketosäuren sehr geringe Aktivitäten auf. Dies lässt sich eventuell durch das vergrößerte aktive Zentrum erklären. Aus diesem Grund wurden zwei sterisch anspruchsvollere 2-Ketosäuren getestet: 2-Keto-3-phenyl-propansäure (**6**) und Indol-3-pyruvat (**7**). Allerdings zeigen die relativen Aktivitäten auch in diesem Fall keine signifikante Steigung der Decarboxylaseaktivität. Die spezifischen Aktivitäten in Bezug auf die Decarboxylierung von 2-Keto-3-phenyl-propansäure (**6**) zeigen einen Zuwachs von 0,03 U/mg für die *PpBFDwt* auf 0,13 U/mg für die *PpBFDL461G*-Variante.

Die Ergebnisse eines Substratspektrums sind lediglich qualitativ. Durch konstante Substratkonzentrationen kann nicht sichergestellt werden, dass unter den gegebenen Bedingungen der  $V_{\max}$ -Bereich erreicht wird, oder ob bereits eine Substratüberschussinhibierung vorlag. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die eingebrachte Mutation L461G lediglich einen Einfluss auf die Decarboxylaseaktivität hat. Das Decarboxylase-Substratspektrum bleibt mit Benzoylformiat als Hauptsubstrat unverändert (Gocke *et al.*, 2008).

### 4.2.2.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der *PpBFDL461G*-Variante

Wie aus dem Decarboxylase-Substratspektrum im vorherigen Kapitel hervorgeht, stellt Benzoylformiat das Hauptsubstrat der *PpBFDL461G*-Variante dar. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird ( $K_M$ ) wurden für die Variante *PpBFDL461G* bestimmt.



**Abb. 32: Benzoylformiat-Kinetik der PpBFDL461G-Variante.** Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylaseaktivitätstest (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.7) mit  $n = 3$  (Standardabweichung: 0,7 – 8,3%). Die Darstellung erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Programms Origin 7.0.

Das Ergebnis in Abb. 32 zeigt einen typischen hyperbolen Kurvenverlauf. Zu beobachten ist, dass die nicht-lineare Regressionskurve weiter ansteigt, obwohl mehrere Werte im Bereich der Sättigung liegen. Dies liegt vermutlich daran, dass einzelne Werte im Wendepunkt der Kurve Abweichungen zeigen.

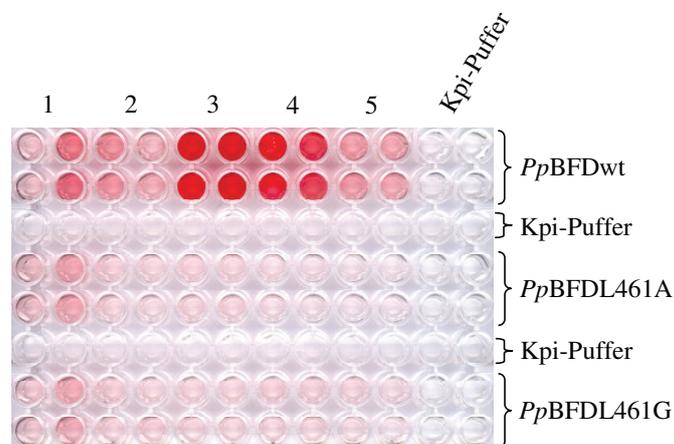
Die PpBFDL461G-Variante weist mit  $48,5 \pm 1,5 \text{ U/mg}$  einen etwa 12-fach niedrigeren Wert für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) relativ zur PpBFDwt (400 U/mg) (Gocke *et al.*, 2008) auf. Der  $K_M$ -Wert für Benzoylformiat ist mit  $1,4 \pm 0,16 \text{ mM}$  im Falle der PpBFDL461G-Variante etwa um den Faktor 3,8 relativ zur PpBFDwt ( $0,37 \pm 0,03 \text{ mM}$ ) erhöht. Interessanterweise liegen die  $K_M$ -Werte für andere Varianten, wie PpBFDP24A und PpBFDL461A (Gocke *et al.*, 2008), im selben Konzentrationsbereich wie die des Wildtyps. Die PpBFDL461V-Variante weist sogar einen 6-fach niedrigeren  $K_M$ -Wert auf (Gocke *et al.*, 2008). Die Bindung von Benzoylformiat im aktiven Zentrum der PpBFDL461G-Variante wird durch den Austausch von Alanin zu Glycin nur minimal beeinflusst. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Variante PpBFDA460G gemacht werden. Auch hier war lediglich eine minimale Steigerung des  $K_M$ -Wertes auf  $1,54 \pm 0,14 \text{ mM}$  zu beobachten (Gocke *et al.*, 2008).

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

Abweichungen der spezifischen Aktivitäten, wie zum Beispiel bei der Bestimmung des Substratspektrums im vorherigen Kapitel (28 U/mg für die *PpBFDL461G*-Variante), können unter anderem durch Messfehler aufgrund zu hoher Absorptionen des Substrates oder durch unterschiedliche (alte) Enzym-Chargen zustande kommen. Wird beispielsweise die von Iding und Mitarbeitern im Jahre 2000 publizierte maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die *PpBFDwt* von 320 U/mg (Iding *et al.*, 2000) in Vergleich mit der 2008 publizierten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 400 U/mg (Gocke *et al.*, 2008) gesetzt, wird deutlich das spezifische Aktivitäten schwanken können.

### 4.2.2.4 Carboligaseaktivität der *PpBFDL461G*-Variante

Ein erstes *Screening* auf Carboligaseaktivität der *PpBFDL461G*-Variante wurde mittels Tetrazoliumrot- (TTC)-Test (Kap. 3.6.8) durchgeführt. In diesem Rahmen wurden verschiedene Aldehydkombinationen (äquimolar, je 18 mM) gewählt, 18 h mit der Variante inkubiert und die entstandenen 2-Hydroxyketone kolorimetrisch nachgewiesen. Auffällig war eine relativ geringe 2-Hydroxyketon-Bildung im Falle der *PpBFDL461A/G*-katalysierten Reaktionen im Vergleich zur *PpBFDwt* (Abb. 33).

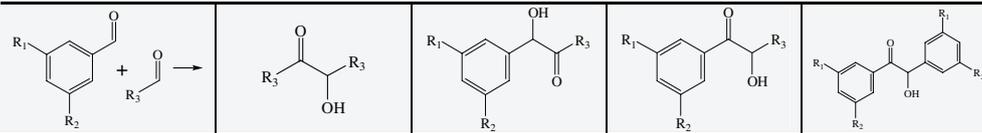


**Abb. 33: *PpBFDwt* und *PpBFDL461A/G*: Carboligaseaktivitäts-Screening.** Die zu untersuchenden Enzyme wurden neben einer Negativkontrolle (Kpi-Puffer) im TTC-Test auf Carboligaseaktivität hin untersucht. Als Substrate dienten Benzaldehyd (BA) und aliphatische Aldehyde in folgender Zusammensetzung: 1: BA + Acetaldehyd, 2: BA + Propanal, 3: BA + Butanal, 4: BA + Pentanal, 5: BA + Hexanal, 6: 50 mM Kpi-Puffer. Reaktionsbedingungen: 18 mM BA, 18 mM aliphatische Aldehyde, 50 mM Kpi-Puffer pH 7,0 mit 2,5 mM  $MgSO_4$  und 0,1 mM ThDP, 20% DMSO, 30°C, 130 UpM. Die Inkubation erfolgte über 18 h mit 0,3 mg/ml gereinigtem Enzym. Die Rotfärbung erfolgte nach Zugabe der TTC-Lösung in Anwesenheit von 2-Hydroxyketonen; die Platte wurde nach 1 min gescannt.

Die geringe Produktdetektion bei beiden Varianten kann an einer verminderten Carboligaseaktivität liegen. Die Produktumsätze, welche mittels instrumenteller Analytik detektiert werden konnten (Tab. 14) spiegeln sich im TTC-Test nicht wieder. Dies kann durch eine kürzere Inkubationszeit von 18 h im Gegensatz zu 72 h zustande gekommen sein. Möglich ist aber auch, dass bei der *PpBFDwt* ein Gemisch an Produkten eine stärkere Färbung bewirkt. Bei den Varianten hingegen könnte lediglich ein reines Produkt entstanden sein, welches bei geringen Umsätzen auch eine geringe Rotfärbung bewirken würde (Gocke, 2007). Aus diesem Grund und zur Bestimmung des Enantiomerüberschusses ist die Erhebung analytischer Daten anhand instrumenteller Analytik unumgänglich. Die analytischen Daten der *PpBFDL461A*-Variante haben eine Umkehrung der Enantioselektivität gezeigt (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, 2008). Bei der Ligation von Benzaldehyd und Propanal wurde bei der durch die *PpBFDwt* katalysierten Reaktion das (*R*)-2-Hydroxypropiofenon- (2-HPP)-Derivat und im Falle der *PpBFDL461A*-Variante das (*S*)-2-HPP-Derivat nachgewiesen (Gocke *et al.*, 2008). In Tab. 14 sind die Ergebnisse der instrumentellen Analytik der *PpBFDL461G*-Variante den Ergebnissen der *PpBFDwt* und der *PpBFDL461A*-Variante gegenüber gestellt. Relative Produktumsätze sind in mol% (bezogen auf den verbliebenen Benzaldehyd) (NMR, Kap. 3.7.2) angegeben; der Enantiomerüberschuss (*ee*) wurde mittels chiraler HPLC-Analyse detektiert (Kap. 3.5.2).

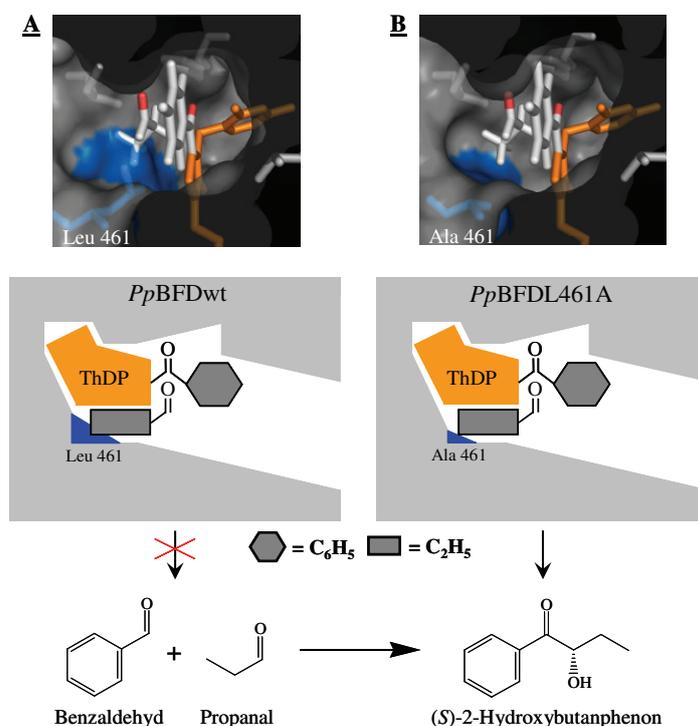
## ERGEBNISSE & DISKUSSION

**Tab. 14: Untersuchung der Carboligaseaktivität der PpBFDL461G-Variante.** Relative Produktsätze (in mol%, NMR) und Enantiomerenüberschüsse (*ee*, chirale HPLC) der Produkte der Ligation verschiedener Aldehyde. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Reaktionen mit 0,3 mg/ml Enzym in 50 mM Kpi-Puffer inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 % DMSO, pH 7,0 bei 30°C mit äquimolaren Aldehydkonzentrationen [18 mM] über 72 h durchgeführt. (<sup>a</sup> = pH 7,9; <sup>b</sup> = aliphatischer Aldehyd 54 mM; n.d. = nicht detektierbar; - = keine Daten).

|                                | Acetoin-Derivate    | PAC-Derivate                  | 2-HPP-Derivate                  | Benzoin-Derivate     |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>A</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>                              | <i>PpBFDwt</i>      |                               |                                 |                      |
|  | -                   | -                             | 81%; 92% (S)                    | 4%; 99% (R)          |
|  | <i>PpBFDL461A</i>   |                               |                                 |                      |
|  | -                   | -                             | 79%; 98% (S)                    | -                    |
| <i>PpBFDL461G</i>  |                     |                               |                                 |                      |
| -  | -                   | 74,5%; 98% (S)                | -                               | -                    |
| <b>B</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                | <i>PpBFDwt</i>      |                               |                                 |                      |
|  | 8%; <i>ee</i> n.d.  | 12%; 98% (R)                  | 6%; 21% (R)                     | 8%; 99% (R)          |
|  | <i>PpBFDL461A</i>   |                               |                                 |                      |
|  | 6%; <i>ee</i> n.d.  | -                             | 21,5%; 88%/93% <sup>a</sup> (S) | 1,5%; <i>ee</i> n.d. |
| <i>PpBFDL461G</i>  |                     |                               |                                 |                      |
| -  | -                   | 23%; 93%/97% <sup>a</sup> (S) | 0,5%; <i>ee</i> n.d.            | -                    |
| <b>C</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>                | <i>PpBFDwt</i>      |                               |                                 |                      |
|  | 34%; <i>ee</i> n.d. | 32%; 99% (R)                  | 2%; 66% (R)                     | 3%; 99% (R)          |
|  | <i>PpBFDL461A</i>   |                               |                                 |                      |
|  | 8%; <i>ee</i> n.d.  | 3%; >99% (R)                  | 1%; 63% (S)                     | 1%; 99% (R)          |
| <i>PpBFDL461G</i>  |                     |                               |                                 |                      |
| 6%; <i>ee</i> n.d.   | 2%; <i>ee</i> n.d.  | 1%; <i>ee</i> n.d.            | -                               | -                    |
| <b>D</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | <i>PpBFDwt</i>      |                               |                                 |                      |
|  | -                   | -                             | <1%; <i>ee</i> n.d.             | -                    |
|  | <i>PpBFDL461A</i>   |                               |                                 |                      |
|  | -                   | -                             | 7,5%/9% <sup>b</sup> ; >99% (S) | -                    |
| <i>PpBFDL461G</i>  |                     |                               |                                 |                      |
| -  | -                   | 31%; >99% (S)                 | -                               | -                    |
| <b>E</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> | <i>PpBFDwt</i>      |                               |                                 |                      |
|  | -                   | 26%; 80% (R)                  | -                               | 3%; <i>ee</i> n.d.   |
|  | <i>PpBFDL461A</i>   |                               |                                 |                      |
|  | -                   | -                             | -                               | -                    |
| <i>PpBFDL461G</i>  |                     |                               |                                 |                      |
| 2%; <i>ee</i> n.d.   | 26%; <i>ee</i> n.d. | 4%; <i>ee</i> n.d.            | -                               | -                    |
| <b>F</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> | <i>PpBFDwt</i>      |                               |                                 |                      |
|  | 18%; <i>ee</i> n.d. | 19%; <i>ee</i> n.d.           | -                               | -                    |
|  | <i>PpBFDL461A</i>   |                               |                                 |                      |
|  | -                   | -                             | -                               | -                    |
| <i>PpBFDL461G</i>  |                     |                               |                                 |                      |
| 6%; <i>ee</i> n.d.   | 4%; <i>ee</i> n.d.  | 11%; >90% (S)                 | -                               | -                    |

Bei der Ligation von Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd konnte beobachtet werden, dass 2-HPP von der *PpBFDwt* und von beiden Varianten in der (*S*)-enantiomeren Form gebildet wird (Tab. 14 **A**). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen vorangegangener Publikationen (Iding *et al.*, 1998; Wilcocks & Ward, 1992; Wilcocks *et al.*, 1992). Durch den Einsatz

der Varianten konnte der Enantiomerenüberschuss für (*S*)-2-HPP deutlich von 92% auf 98% angehoben werden. Der Umsatz von BA und Acetaldehyd liegt bei allen Enzymen in einer ähnlichen Größenordnung von 75 – 80%. Im weiteren Verlauf wurden die aliphatischen Akzeptoraldehyde vergrößert. Die Ligation von BA und Propanal führt bei der *Pp*BFDwt zur Bildung geringer Mengen aller möglichen Produkte in der (*R*)-enantiomeren Form (Tab. 14 **B**), da die Seitenkette des Propanals nicht mehr optimal in die *S*-Tasche hineinpasst. Dadurch wird nicht nur die Aktivität, sondern auch die Chemoselektivität der *Pp*BFDwt stark beeinträchtigt. Wie durch vorherige Modellierungen und anhand der *Pp*BFDL461A-Kristallstruktur bereits prognostiziert wurde, führte selbige Reaktion bei beiden Varianten zur Synthese des (*S*)-2-HPP-Derivates (Gocke *et al.*, 2008) (Abb. 34).



**Abb. 34: Strukturelle und schematische Darstellung der Ligation von Benzaldehyd und Propanal.** **A:** Benzaldehyd gebunden am C2-Atom des ThDP (orange). Propanal ist mit der Seitenkette  $-\text{C}_2\text{H}_5$  in die *S*-Tasche ausgerichtet. Durch das Leucin 461 (blau) ist kein Platz in der *Pp*BFDwt für die Seitenkette des Propanals vorhanden. (*S*)-Produkte können demnach nicht entstehen **B:** Anhand der Kristallstruktur der *Pp*BFDL461A-Variante wird ersichtlich, dass für die Propanal-Seitenkette  $-\text{C}_2\text{H}_5$  ausreichend Platz in der *S*-Tasche vorhanden ist.

Wie in Abb. 34 zu erkennen, ist bei der *Pp*BFDwt aufgrund eines Leucins im Bereich der *S*-Tasche nicht genügend Platz für die Seitenkette  $-\text{C}_2\text{H}_5$  des Propanals. Hingegen ist in der

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

*S*-Tasche der *Pp*BFDL461A genügend Platz für die Ethylseitenkette, was auch mittels 3D-Kristallstruktur der Variante bestätigt werden konnte (Gocke *et al.*, 2008). Die relativen Umsätze sind mit knapp über 20% moderat, allerdings lassen sich sehr gute Enantiomerenüberschüsse beobachten. Der Enantiomerenüberschuss für das (*S*)-2-HPP-Derivat beträgt bei der *Pp*BFDL461A-Variante 88% bei pH 7,0 und 93% bei pH 7,9. Durch den Einsatz der *Pp*BFDL461G-Variante konnte der Enantiomerenüberschuss erneut erhöht werden: pH 7,0: 93% (*S*)-; pH 7,9: 97% (*S*)-2-HPP-Derivat. So konnte die Enantioselektivität für diese spezielle Ligation durch nur einen Aminosäureaustausch komplett umgekehrt werden.

Bei der Ligation von BA und Butanal konnte bereits im TTC-Test beobachtet werden, dass die Produktbildung bei den Varianten im Vergleich zur *Pp*BFDwt sehr gering ausfällt (Abb. 33). Die Umsätze der Varianten liegen mit < 10% unter denen der *Pp*BFDwt. Aus diesem Grund konnte im Falle der *Pp*BFDL461G-Variante auch kein Enantiomerenüberschuss bestimmt werden (Tab. 14 **C**). Bei der *Pp*BFDwt wurde mit Umsätzen von über 30% Butanoin und das PAC-Derivat gebildet. Bei den *Pp*BFDL461A/G-Varianten wird kein Produkt bevorzugt gebildet. Dies wurde ebenfalls anhand der *Pp*BFDL461A-Struktur vorhergesagt (Gocke *et al.*, 2008).

Die analytischen Daten bezüglich der Ligation von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMB) und Propanal zeigen einen höheren Umsatz für die Varianten im Vergleich zur *Pp*BFDwt. Zusätzlich ist der Enantiomerenüberschuss von > 99% für die Bildung des (*S*)-2-HPP-Derivates, welches aus der Ligation von DMB und Propanal hervorgeht, bei beiden Varianten exzellent (Tab. 14 **D**). Durch den substituierten Benzaldehyd scheint eine Stabilisierung der Edukte als auch des Produktes im Bereich des aktiven Zentrums optimal zu verlaufen. Eventuell wird die Lokalisierung der Seitenkette des Propanals in der *S*-Tasche durch die Substituenten des DMB begünstigt, bzw. in die Tasche gedrängt.

Eine Verlängerung des aliphatischen Aldehyds, wie bei der Ligation von DMB und Butanal, führt zu einer Veränderung der Chemoselektivität (Tab. 14 **E**) (Kap. 1.4.5).

Ein kurzer Rückblick: stellen die aromatischen Aldehyde BA oder DMB den Donoraldehyd dar, entsteht 2-HPP oder Benzoin. Die Ligation von DMB und Butanal führt allerdings zur Bildung des Butanoin und des Phenylacetylcarbinol- (PAC-) Derivates. In diesem Fall ist der aliphatische Aldehyd Butanal der Donoraldehyd. Der Enantiomerenüberschuss konnte nicht detektiert werden, aber es handelt sich wahrscheinlich um die (*R*)-enantiomere Form des PAC-Derivates. Modellstudien haben gezeigt, dass die sterisch anspruchsvolle aromatische Seitenkette des DMB nicht in die *S*-Tasche der Variante passt.

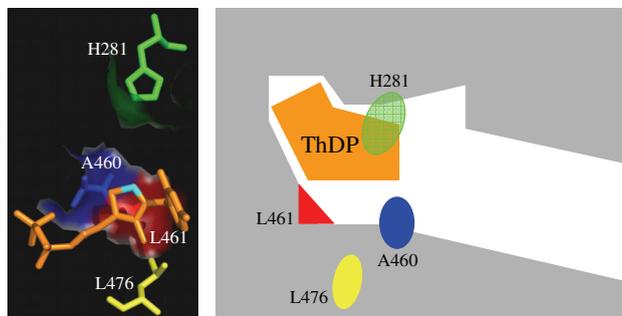
Ähnliches ist ebenfalls bei der Ligation von DMB und Pentanal zu beobachten (Tab. 14 **F**). Bei der *PpBFDwt* fungiert Pentanal als Donoraldehyd. Bei der *PpBFDL461G*-Variante zeigt sich interessanterweise mit einem Umsatz von 11% und einem Enantiomerenüberschuss von > 90% das (*S*)-2-HPP-Derivat; Pentanal ist hier also wieder Akzeptor und DMB der Donor. Eine denkbare Erklärung liegt in der Möglichkeit, dass die C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>-Seitenkette des Pentanals umklappen könnte und so in der *S*-Tasche optimal stabilisiert würde. Bei Butanal ist die Seitenkette möglicherweise zu kurz um umgeklappt in die *S*-Tasche zu passen.

#### **4.2.3 Fazit: Erweiterung der Enzym-*Toolbox* mit (*S*)-2-Hydroxypropio-phenon-Derivaten**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Enzym-*Toolbox* und zudem auch die 2-Hydroxyketon-*Toolbox*, durch den Einsatz der *PpBFDL461G*-Variante erweitert werden konnte. So konnte der Enantiomerenüberschuss für das (*S*)-2-HPP-Derivat, welches aus der Ligation von Benzaldehyd und Propanal hervorgeht, von 93% auf 97% durch den Einsatz der *PpBFDL461G*-Variante gesteigert werden. Zudem führte die weitere Vergrößerung der *S*-Tasche zu einem erweiterten Produktspektrum für (*S*)-2-Hydroxyketone, was mit der Ligation des sterisch anspruchsvollen 3,5-Dimethoxybenzaldehyds und Pentanal eindrucksvoll gezeigt werden konnte.

### 4.3 Kombination struktureller und funktionaler Informationen der *Pp*BFD

Im nachstehenden Kapitel werden bereits identifizierte Aminosäuren des aktiven Zentrums der *Pp*BFD beschrieben. In Abb. 35 sind die Bereiche dargestellt, welche interessante Ansatzpunkte für eine weitere Planung von Varianten darstellen. Anhand struktureller und funktionaler Informationen einzelner Aminosäuren, die im Folgenden beschrieben werden, wurden Doppelvarianten geplant.



**Abb. 35: Darstellung wichtiger Aminosäuren im aktiven Zentrum der *Pp*BFDwt.** Auf der linken Seite ist die räumliche Anordnung anhand der Kristallstruktur abgebildet, auf der rechten Seite wurde eine schematische Darstellung gewählt. Gemäß Abb. 26 entspricht L461 dem Bereich A<sub>1</sub>, A460 dem Bereich A<sub>2</sub> und H281 dem Bereich A<sub>3</sub>.

Der Einfluss von L461 auf Chemo- und Enantioselektivität wurde in Kap. 4.2 im Rahmen der *Pp*BFDL461A/G-Variante bereits ausführlich diskutiert.

Die Aminosäure Histidin in Position 281 ist in einer flexiblen Schleife des Enzyms lokalisiert und an der Protonierung des Enamin-Carbanion-Komplexes involviert (Hasson *et al.*, 1998; Polovnikova *et al.*, 2003). His 281 entspricht gemäß Abb. 26 dem Bereich A<sub>3</sub> und ist in Abb. 35 grün dargestellt. Durch die Position H281 wird sowohl die Donor- als auch die Akzeptor-Bindestelle beeinflusst (Knoll *et al.*, 2006). 2003 wurde die *Pp*BFDwt mit dem Inhibitor (*R*)-Mandelat co-kristallisiert und die Struktur konnte mit 2,8 Å gelöst werden (Polovnikova *et al.*, 2003).

H281 befindet sich 3,5 Å vom aromatischen Ring des (*R*)-Mandelats entfernt. Dies veranschaulicht die Relevanz des Einflusses von H281 vor allem auf die Donor-Bindestelle. Für ein besseres Verständnis dieser Position wurde bei der Variante *Pp*BFDH281A Histidin (basisch) gegen Alanin (neutral) ausgetauscht (Polovnikova *et al.*, 2003; Siegert, 2000). Die Decarb-

oxylaseaktivität war vermindert, aber die Carboligaseaktivität, bezogen auf die Synthese von (*R*)-Benzoin, zeigte eine 150-fach höhere Aktivität als bei der *PpBFDwt* (*PpBFDwt*: 0,34 U/mg; *PpBFDH281A*: 50 U/mg) (Knoll *et al.*, 2006; Polovnikova *et al.*, 2003; Siegert, 2000). Bei der asymmetrisch gekreuzten Benzoin-Kondensation werden *ortho*-substituierte Benzaldehyde als Akzeptoraldehyd bevorzugt (Dünelmann *et al.*, 2002). Eine Kombination von L461G und H281A könnte den Weg zu neuen interessanten 2-Hydroxyketonen öffnen.

Eine weitere Aminosäure, Leucin in Position 476 (Abb. 35, dargestellt in gelb) liegt in einer Schleife, welche das aktive Zentrum wie einen Deckel verschließt (Lingen *et al.*, 2003). Mutationen in diesem Bereich können sowohl den Eintritt des Substrates als auch den Austritt des Produktes beschleunigen (Lingen *et al.*, 2003). Mittels Zufalls-Mutagenese wurde eine Variante identifiziert, bei der Leucin gegen Glutamin ausgetauscht ist (*PpBFDL476Q*) (Lingen *et al.*, 2003). Die Variante *PpBFDL476Q* akzeptiert *o*-, *m*- und *p*-substituierte Benzaldehyde als Donoraldehyd (Lingen *et al.*, 2003). Die Carboligaseaktivität wird durch den Aminosäureaustausch positiv beeinflusst. So zeigt die Variante eine 4-fach schnellere Synthese von (*S*)-2-HPP (28 U/mg) als die *PpBFDwt* (7 U/mg) (Lingen *et al.*, 2003). Die katalytischen Parameter der Decarboxylierung werden durch diesen Austausch wenig beeinflusst. Die Kombination der *PpBFDL461G*- und der *PpBFDL476Q*-Variante könnten einen positiven Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese von (*S*)-2-HPP-Derivaten haben.

Die Aminosäure, welche in der *PpBFDwt* den Bereich A<sub>2</sub> (Abb. 26) definiert und in Abb. 35 blau dargestellt ist, stellt ein Alanin in Position 460 dar. Durch die Lokalisation direkt am Eingang zur *S*-Tasche beeinflusst das A460 die Akzeptoraldehyd-Bindestelle, sowie die Enantioselektivität (Knoll *et al.*, 2006). Alanin wurde gegen Isoleucin, die Aminosäure in der korrespondierenden Position der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (*ZmPDC*), ausgetauscht (Siegert, 2000; Siegert *et al.*, 2005). Die Ligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd durch die *PpBFDA460I*-Variante führt zu einem drastisch erniedrigten Enantiomerenüberschuss für (*S*)-2-HPP: *PpBFDwt* 90 – 92% und *PpBFDA460I* 10%. Die Entstehung von nahezu racemischen 2-HPP lässt sich durch das viel größere Isoleucin am Eingang zur *S*-Tasche der Variante erklären. Somit ist der Eingang zur *S*-Tasche enger und die Wahrscheinlichkeit der Carboligation über den (*S*)-Weg sinkt, da sich der Akzeptor Acetaldehyd aufgrund sterischer Hinderung bevorzugt parallel zum Donor anlagert und über den (*R*)-Weg reagiert. Die in vorangegangenen Studien erzeugte Variante *PpBFDA460G* hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Stereo- und Chemoselektivität (Gocke, 2007). Durch die

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

Herstellung der Doppelvariante *PpBFDA460G/L476Q* sollte das Carboligations-Potential erneut getestet werden.

### 4.3.1 Herstellung von *PpBFD*-Doppelvarianten

Folgende Doppelvarianten konnten erfolgreich mittels zielgerichteter Mutagenese (Kap. 3.3.2.4) hergestellt werden:

*PpBFDL461G/H281A*; *PpBFDL461G/L476Q* und *PpBFDA460G/L476Q*. Als Matrizen-DNA dienten die jeweiligen Einzelvarianten. Die zusätzlichen Mutationen konnten über speziell konstruierte Oligodesoxyribonukleotide (Kap. 3.1.6) in nur einer PCR eingefügt werden.

#### 4.3.1.1 Bestimmung der kinetischen Parameter der *PpBFD*-Doppelvarianten

**Tab. 15: Pyruvat-Kinetik der *PpBFD*-Doppelvarianten.** Als Referenz-Werte wurden die kinetischen Parameter der Einzelvarianten und der *PpBFDwt* mit aufgelistet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylaseaktivitätstest mit Benzoylformiat als Substrat [0,03 – 15 mM] (Hilfsenzym: HL-ADH<sub>rek.</sub>) (Kap. 3.6.7) und n = 3. Die Auswertung erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Programms Origin 7.0.

| Enzym<br>(Referenz)   | V <sub>max</sub><br>[U/mg]           | K <sub>M</sub><br>[mM]                       |
|---|--------------------------------------|--|
| <i>PpBFDwt</i><br>(Iding <i>et al.</i> , 2000) <sup>a</sup><br>(Gocke <i>et al.</i> , 2008) <sup>b</sup>  | 320 <sup>a</sup><br>400 <sup>b</sup> | 0,7 <sup>a</sup><br>0,37 ± 0,03 <sup>b</sup> |
| <i>PpBFDL461G</i><br>(diese Arbeit)<br>(Gocke <i>et al.</i> , 2008)   | 48,5 ± 1,5                           | 1,4 ± 0,16                                   |
| <i>PpBFDH281A</i><br>(Knoll <i>et al.</i> , 2006) <sup>a</sup><br>(Polovnikova <i>et al.</i> , 2003) <sup>b</sup><br>(Siegert, 2000) <sup>a</sup> | 35 <sup>a</sup>                      | 0,4 <sup>a</sup><br>1,68 ± 0,3 <sup>b</sup>  |
| <i>PpBFDL476Q</i><br>(Lingen <i>et al.</i> , 2003)  | 246 ± 16                             | 0,58 ± 0,07                                  |
| <i>PpBFDA460G</i><br>(Gocke, 2007)<br>(Gocke <i>et al.</i> , 2008)  | 300 ± 9                              | 1,54 ± 0,14                                  |
| <i>PpBFDL461G/H281A</i><br>(diese Arbeit)<br>(der Sättigungsbereich<br>wurde nicht erreicht)  | 1,35 ± 0,239                         | 17,74 ± 4,87                                 |
| <i>PpBFDL461G/L476Q</i><br>(diese Arbeit)   | 4,98 ± 0,244                         | 2,152 ± 0,369                                |
| <i>PpBFDA460G/L476Q</i><br>(diese Arbeit)   | 382,8 ± 14,137                       | 1,29 ± 0,206                                 |

Im Falle der *PpBFDL461G/H281A*-Kinetik konnte der Sättigungsbereich, aufgrund zu hoher Absorptionen des Benzoylformiat bei Konzentrationen > 15 mM, nicht erreicht werden.

Somit sind die Werte lediglich als Anhaltspunkte zu interpretieren. Dennoch kann aufgrund der geringen Aktivität von  $1,35 \pm 0,239$  U/mg und des sehr hohen  $K_M$ -Wertes von  $17,74 \pm 4,87$  mM für Benzoylformiat festgehalten werden, dass das Substrat im aktiven Zentrum der *PpBFD* durch die Aminosäureaustausche in den Positionen 461 und 281 aufgrund sterischer Bedingungen nicht mehr stabil gebunden werden kann. Bereits bei den Einzel-Varianten konnte eine Verminderung der spezifischen Aktivität beobachtet werden. Allerdings erhöhte sich der  $K_M$ -Wert lediglich um das 3,8- bzw. 4,5-fache und nicht um ein 50-faches. Die geringe Restaktivität und der hohe  $K_M$ -Wert gegenüber Benzoylformiat ermöglicht keine weitere biochemische Charakterisierung der Doppelvariante hinsichtlich der äußeren Einflüsse (pH-Werte und Temperaturen) auf die Decarboxylaseaktivität.

Die *PpBFDL461G/476Q*-Variante wies mit  $4,98 \pm 0,244$  U/mg lediglich 1,2% der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der *PpBFDwt* (400 U/mg) auf (Gocke *et al.*, 2008). Der  $K_M$ -Wert stieg um das 6-fache. Der Aminosäureaustausch in der Einzel-Variante *PpBFDL476Q* führte zu einer sehr geringen Veränderung der kinetischen Parameter (Kap. 4.3) (Lingen *et al.*, 2003), so dass die Verringerung der Aktivität und die Erhöhung des  $K_M$ -Wertes vorrangig vom Austausch des Leucins in Position 461 zu Glycin abhängig ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kombination beider Mutationen den Ausschlag gegeben hat. Die *PpBFDA460G/476Q*-Variante zeigt einen 3,5-fach erhöhten  $K_M$ -Wert relativ zum Wildtyp-Enzym. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit hat sich mit  $382,8 \pm 14,137$  U/mg zu 400 U/mg für die *PpBFDwt* (Gocke *et al.*, 2008) nicht signifikant verändert.

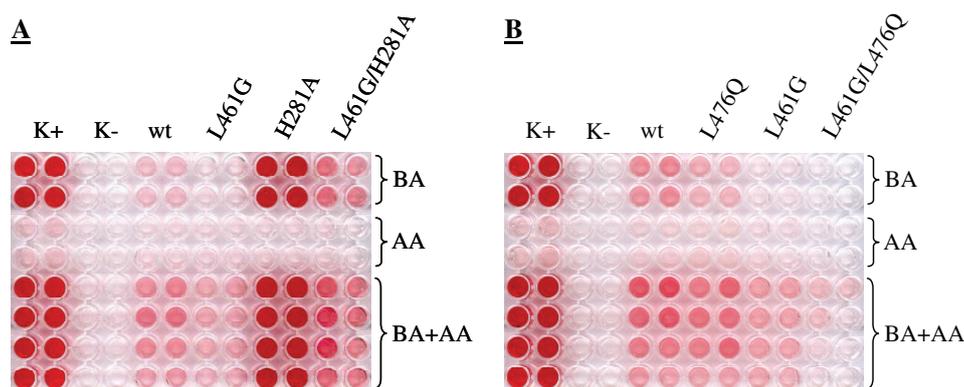
Allgemein kann festgehalten werden, dass die Kombination einer Mutation mit dem Austausch von Leucin in Position 461 zu Glycin einen klar erkennbaren Effekt auf die allgemeine Katalyse der Decarboxylierung von Benzoylformiat ausübt. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Substrat durch die Änderung der räumlichen Verhältnisse im aktiven Zentrum nicht mehr optimal stabilisiert wird. Demzufolge könnten die einzelnen Schritte des Katalysemechanismus verlangsamt worden sein. Eine weitere Erklärung könnte eine Veränderung der Chemo-selektivität sein, so könnten andere Substrate, welche sterisch anspruchsvoller sind als Benzoylformiat, von den Varianten besser umgesetzt werden.

#### **4.3.1.2 Carboligaseaktivität der *PpBFD*-Doppelvarianten**

Erste Hinweise auf Carboligaseaktivität der *PpBFD*-Doppelvarianten konnten mittels Tetrazoliumrot- (TTC)-Test (Kap. 3.6.8) erhalten werden. Aufgrund des theoretischen Hintergrundes (Kap. 4.3) wurden Substratkombinationen gewählt, bei denen Benzaldehyd, bzw.

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

*ortho*-substituierter Benzaldehyd als Donor und längerkettige aliphatische Aldehyde als Akzeptor fungieren sollten. Jede Doppelvariante wurde neben der *PpBFDwt* und, wenn verfügbar, neben der jeweiligen Einzelvarianten in den Test eingesetzt. Die besten Umsätze bei der Ligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd konnten mit der *PpBFDL461G/H281A*-Variante erzielt werden (Abb. 36 **A**).



**Abb. 36: *PpBFDL461G/H281A* (A) und *PpBFDL461G/L476Q* (B): Carboligaseaktivitäts-Screening.** Die zu untersuchenden Enzyme wurden neben einer Positivkontrolle (K+: *PpBALwt*) und einer Negativkontrolle (K-: Kpi-Puffer) im TTC-Test auf Carboligaseaktivität hin untersucht. Als Substrate dienten Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA) in folgender Zusammensetzung: BA: nur BA; AA: nur AA; BA+AA: Mischung beider Aldehyde. Reaktionsbedingungen: 18 mM BA, 18 mM Acetaldehyd, 50 mM Kpi-Puffer pH 7,0 mit 2,5 mM  $MgSO_4$  und 0,1 mM ThDP, 20% DMSO; 30°C und 130 UpM. Die Inkubation erfolgte über 18 h mit 0,3 mg/ml gereinigtem Enzym. Die Rotfärbung erfolgte nach Zugabe der TTC-Lösung in Anwesenheit von 2-Hydroxyketonen; die Platte wurde nach 1 min gescannt.

Die erhöhte Carboligaseaktivität der *PpBFDH281A*-Variante (Siegert, 2000) (Abb. 36 **A**) ist klar erkennbar. Im Gegensatz zur *PpBFDL461G/H281A*-Variante zeigt die *PpBFDL461G/L461Q*-Variante (Abb. 36 **B**) kaum oder keine Carboligaseaktivität. Dies konnte mittels instrumenteller Analytik bestätigt werden (Tab. 16 Reaktion **J**).

Da die Einzelvarianten *PpBFDH281A* und *PpBFDL476Q* *ortho*-substituierte Benzaldehyde als Donor akzeptieren (Dünelmann *et al.*, 2002; Lingen *et al.*, 2003) wurden 2-Chloro- und 2-Methoxybenzaldehyd in Kombination mit Acetaldehyd, bzw. Pentanal eingesetzt. Bei dieser Reaktion konnte bei keiner der drei Doppelvarianten Produkt nachgewiesen werden.

Für eine genauere Untersuchung der Carboligaseaktivität der *PpBFD*-Doppelvarianten wurden ausgewählte Reaktionen mittels instrumenteller Analytik am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Freiburg überprüft (Tab. 16).

**Tab. 16: Untersuchung der Carboligaseaktivität der PpBFD-Doppelvarianten.** Relative Produktsätze (in mol%, NMR) und Enantiomerenüberschüsse (*ee*, chirale HPLC) der Produkte der Ligation verschiedener Aldehyde. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Reaktionen mit 0,3 mg/ml Enzym in 50 mM Kpi-Puffer inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 % DMSO bei pH 7,0 und 30°C mit äquimolaren Aldehydkonzentrationen [18 mM] über 72 h durchgeführt. (n.d. = nicht detektierbar; - = keine Daten).

| <b>Produkte</b>  | <b>Acetoin-Derivate</b>  | <b>PAC-Derivate</b>            | <b>2-HPP-Derivate</b>    | <b>Benzoin-Derivate</b>      |  |
|--|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| <b>A</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>                              | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | -                        | -                              | <b>86%</b><br>96% (S)    | <b>13%</b><br><i>ee</i> n.d. |  |
| <b>B</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | -                        | <b>6%</b><br><i>ee</i> n.d.    | <b>10%</b><br>41,5% n.d. | <b>6%</b><br><i>ee</i> n.d.  |  |
| <b>C</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>                | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | <b>29%</b>               | <b>31%</b>                     |                          | <b>16%</b><br>73% (R)        |  |
|  |                          | 26% (R)                        | 84% (S)                  |                              |  |
| <b>D</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | <b>31%</b>               | <b>8%</b><br>15% (R)           | <b>19%</b><br>71% (S)    | <b>13%</b><br>74% (R)        |  |
| <b>E</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>               | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | -                        | -                              | <b>30,2%</b><br>95% (S)  | -                            |  |
| <b>F</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | -                        | -                              | -                        | -                            |  |
| <b>G</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | <b>12,3%</b>             | <b>10,6%</b><br>41% n.d.       | -                        | -                            |  |
| <b>H</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> | <i>Pp</i> BFDL461G/H281A |                                |                          |                              |  |
|  | <b>23,3%</b>             | <b>19,3%</b><br><i>ee</i> n.d. | -                        | -                            |  |
| <b>I</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>                              | <i>Pp</i> BFDA460G/L461G |                                |                          |                              |  |
|  | -                        | -                              | <b>81%</b><br>90% (S)    | -                            |  |
| <b>J</b><br>R <sup>1</sup> = Cl, R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>                          | <i>Pp</i> BFDL461G/L476Q |                                |                          |                              |  |
|  | zu wenig Umsatz          |                                |                          |                              |  |
| <b>K</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub> [500 mM]                     | <i>Pp</i> BFDL461G/L476Q |                                |                          |                              |  |
|  | zu wenig Umsatz          |                                |                          |                              |  |

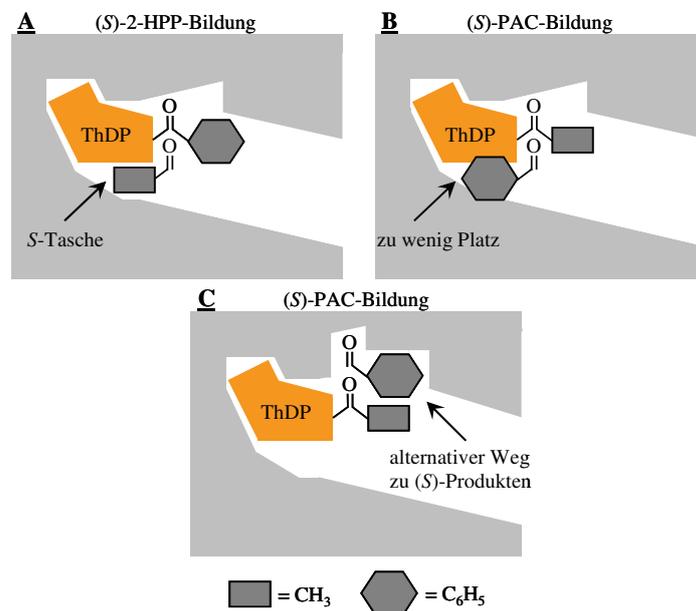
Auffällig ist, dass bei der Ligation von Benzaldehyd mit zunehmend länger-kettigen aliphatischen Aldehyden mittels der *Pp*BFDL461G/H281A-Variante der Enantiomeren-

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

überschuss für das (*S*)-2-HPP-Derivat von 96 % (Tab. 16 Reaktion **A**) auf 71% (Tab. 16 Reaktion **D**) sinkt. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei den *Pp*BFDL461A/G-Varianten gemacht (Tab. 14). Dementsprechend sinkt die Enantioselektivität durch die Vergrößerung der *S*-Tasche, allerdings bleibt die Umkehrung der Enantioselektivität von (*R*)- zu (*S*)-2-HPP erhalten. Des Weiteren lässt sich bei der Ligation von Benzaldehyd und Butanal, bzw. Pentanal eine geringere Chemo-selektivität beobachten. Die Verringerung der Chemo-selektivität wurde ebenfalls bereits bei den *Pp*BFDL461A/G-Varianten beobachtet (Tab. 14 Reaktion **C**). Wie bei der *Pp*BFDwt (Tab. 14 Reaktion **B**) entsteht bei der Substratkombination Benzaldehyd und Propanal auch im Falle der *Pp*BFDL461G/H281A-Variante erstmalig PAC-Produkt (Tab. 16 Reaktion **B**). Dementsprechend fungiert zunehmend der aliphatische Aldehyd als Donoraldehyd.

Der Enantiomerenüberschuss für (*R*)-PAC-Derivate sinkt ebenfalls von 26% in Reaktion **C** auf 15% in Reaktion **D**. Dies zeigt, dass größere Mengen der (*S*)-PAC-Derivate gebildet wurden (15% *ee* (*R*)-PAC entspricht 57,5% (*R*)-PAC-Derivat und 42,5% (*S*)-PAC-Derivat). Auf der Grundlage dieser Vermutung kann neben der (*S*)-2-Hydroxyketon-Bildung über die *S*-Tasche ein weiterer alternativer Weg zur Bildung von (*S*)-enantiomeren Produkten aufgestellt werden. Diese Hypothese ist in Abb. 37 dargestellt.



**Abb. 37:** Schematische Darstellung eines alternativen Weges zur Bildung von (*S*)-PAC. **A:** Ligation von Benzaldehyd (BA;  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ) als Donor und Acetaldehyd (AA;  $\text{CH}_3$ ) als Akzeptor. Die  $\text{CH}_3$ -Gruppe des AA passt in die *S*-Tasche, es entsteht (*S*)-2-HPP. **B:** Ligation von BA als Akzeptor und AA als Donor. In dieser Reihenfolge passt der aromatische Ring des Benzaldehyds nicht in die *S*-Tasche. Eine Bildung von (*S*)-PAC ist unmöglich. **C:** Hypothetische ‚zweite‘ *S*-Tasche, in welche der Benzaldehyd als Akzeptor Platz finden könnte und so in paralleler Anordnung zum AA zu (*S*)-PAC führen könnte.

Wie in Abb. 37 **A** zu erkennen, ist in der *S*-Tasche der *Pp*BFDwt ausreichend Platz für die  $\text{CH}_3$ -Gruppe des Acetaldehyds vorhanden. (*S*)-2-HPP kann entstehen. Bei einer Synthese von PAC (Kap. 1.4.5 und 1.4.6) muss der Acetaldehyd die Donor- und der Benzaldehyd die Akzeptoraldehyd-Funktion übernehmen. Für die (*S*)-enantiomere Form müsste allerdings der aromatische Ring des Benzaldehyds in der *S*-Tasche Platz finden. Modellierungen zeigten, dass dies aufgrund sterischer Gegebenheiten eher unwahrscheinlich ist (Abb. 37 **B**). Anhand der Beobachtung, dass bei *Pp*BFDL461G/H281A-katalysierten Reaktionen mit zunehmender Kettenlänge weniger (*R*)-PAC gebildet wird, dementsprechend mehr (*S*)-PAC vorhanden sein muss, ist eine mögliche Schlussfolgerung, dass ein alternativer Weg zur Bildung von (*S*)-enantiomeren Produkten in der *Pp*BFDL461G/H281A geöffnet worden sein muss. Da sterisch bedingt in der *S*-Tasche zu wenig Platz für den aromatischen Ring des Benzaldehyds ist, wird der Benzaldehyd mit zunehmender Kettenlänge des aliphatischen Aldehyds in eine andere Position gelenkt und dort stabilisiert (Abb. 37 **C**). Für die Entstehung des (*S*)-PAC-Derivates ist eine parallele Anlagerung des Benzaldehyds von der anderen Seite als für die Bildung des

(*R*)-PAC-Derivates relevant. Durch die Mutation von Histidin 281 zu Alanin wurde genau in diesem Bereich der benötigte Platz geschaffen.

### **4.3.2 Fazit: Hinweise auf einen alternativen Weg für die Synthese von (*S*)-2-Hydroxyketonen in der *Pp*BFD**

Die vorgestellten Doppelvarianten haben die Reaktionen in Bezug auf höhere Umsätze nicht wie erwartet (Kap. 4.3) optimiert. Neue Erkenntnisse konnten dennoch gewonnen werden. Allgemein hat sich gezeigt, dass der Austausch von zwei Aminosäuren im aktiven Zentrum der *Pp*BFD zu einer Verminderung der Chemo- und Stereoselektivität führt.

In Kap. 4.2.1 konnte anhand der *Pp*BFDL461G-Variante jedoch eindrucksvoll gezeigt werden, dass der gezielte Austausch einer Aminosäure durchaus einen positiven Einfluss auf speziell gewählte Reaktionen haben kann. Wahrscheinlich wurden durch den vergrößerten Raum im Bereich des aktiven Zentrums sterische Restriktionen aufgehoben. Auf diese Weise sind die geringeren Selektivitäten zu erklären. Anhand dieser Erkenntnisse können die Theorien bezüglich der Relevanz einer optimalen Stabilisierung eines Substrates im aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme untermauert werden. Mehr Platz ist dementsprechend nicht immer gleichbedeutend mit besserer Aktivität. Ein weiterer interessanter Punkt ist die Hypothese des alternativen (*S*)-Wegs. Auf diesem Weg könnten neue Ansätze für die Bildung von (*S*)-2-Hydroxyketonen gefunden werden.

#### 4.4 Konzepte für den Zugang zu (S)-Phenylacetylcarbinol-Derivaten

Das Konzept für den Zugang zu (S)-Phenylacetylcarbinol- ((S)-PAC)-Derivaten beruht auf dem S-Taschen-Konzept der *PpBFD* (Kap. 1.4.6.1 und 1.4.6.3). Bezogen auf das Proteinerückgrat bietet die Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus* (*ApPDC*) die größte S-Tasche. Allerdings ist diese S-Tasche durch eine sterisch anspruchsvolle Glutamat-Seitenkette in Position 469 ausgefüllt. Durch den Austausch zu Glycin wird die Seitenkette auf ein Wasserstoffatom reduziert. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit dass die S-Tasche der *ApPDC* geöffnet wird und der aromatische Ring eines Benzaldehyd-Moleküls darin Platz finden könnte. Auf diesem Wege könnte (S)-PAC entstehen.

##### 4.4.1 Optimierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus* mittels zielgerichteter Mutagenese

###### Planung neuer *ApPDC*-Varianten anhand der Kristallstruktur

Die Grundlage zur Auswahl von Varianten im Bereich der Donor-, bzw. Akzeptor-Bindestelle stellen Untersuchungen der Struktur-Funktions-Beziehungen der *ApPDC*wt beruhend auf den Ergebnissen der Kartierung mit anderen ThDP-abhängigen 2-Ketosäuredecarboxylasen dar (Kap. 1.4.6.1; Tab. 5). Analog zur *PpBFD*wt (Kap. 4.2.1) finden sich bei der *ApPDC*wt sowohl die Donor- als auch die Akzeptor-Bindestellen im aktiven Zentrum. Allerdings sind die Größen dieser Bindestellen verschieden, woraus unter anderem Unterschiede in der Substratspezifität hinsichtlich der Decarboxylierung von 2-Ketosäuren, als auch bezüglich der Donoren und Akzeptoren bei der Carboligation, resultieren (Kap. 1.4.6.1 , Abb. 12 **B**; a und b) (Gocke, 2007).

Sämtliche Varianten wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (Kap. 3.3.2.4) hergestellt (Gerhards, 2009). Als Matrizen-DNA diente der *ApPDC*wt (Gocke, 2007; Graf, 2005).

##### 4.4.2 Varianten im Bereich der *ApPDC*-Donor-Bindestelle

Aufgrund der positiven Effekte bezüglich der Optimierung der PAC-Synthese, die bei der verwandten *ZmPDC*wt durch den Austausch von W392 erzielt werden konnten (Kap. 1.4.6.2), wurden analoge Mutationen im aktiven Zentrum der *ApPDC* im Rahmen einer Diplomarbeit

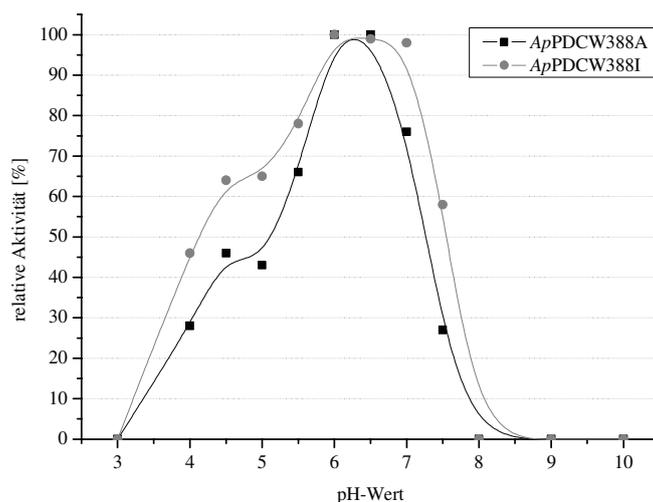
durchgeführt (Gerhards, 2009). Tryptophan in Position 388 der *ApPDC* wurde gegen Alanin bzw. Isoleucin ausgetauscht.

### 4.4.3 Biochemische Charakterisierung der *ApPDC*-Varianten im Bereich der Donor-Bindestelle (*ApPDCW388A/I*)

#### 4.4.3.1 Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der *ApPDCW388A/I*-Varianten

Für den theoretischen Hintergrund der einzelnen Versuche wird auf Kap. 4.2.2.1 und die verschiedenen Unterpunkte verwiesen.

#### Bestimmung des pH-Optimums



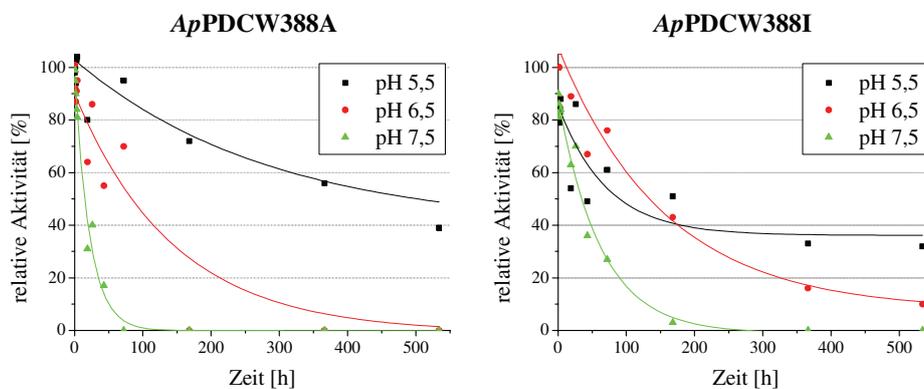
**Abb. 38: pH-Optima der *ApPDCW388A/I*-Varianten.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei 30°C mittels direkten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.4). Die pH-Werte der einzelnen Messungen wurden variiert. Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit  $n = 3$  (Standardabweichung: 0,5 – 1,8%); 100% [*ApPDCW388A*] = 49 U/mg und 100% [*ApPDCW388I*] = 36 U/mg.

Das pH-Optimum der *ApPDCW388A*-Variante liegt bei pH 6,0 – 6,5 und der *ApPDCW388I*-Variante bei pH 6,0 – 7,0. Die *ApPDCwt* zeigt demgegenüber ein deutlich breiteres pH-Optimum von pH 3,5 – 6,5 auf (Graf, 2005). Das Plateau im Bereich von pH 4 – 4,5 liegt außerhalb des Pufferbereichs des verwendeten Kpi-Puffers (Pufferbereich: pH 5,0 – 8,0). Die

abgebildete Stufe könnte durch eine Erhöhung des pH-Wertes innerhalb des Messzeitraumes, welche durch die Umsetzung der 2-Ketosäure Pyruvat zustande gekommen sein könnte, erklärt werden. So kann sich beispielsweise der pH-Wert von 4,5 auf 5,0 erhöhen, dementsprechend erhält man ähnliche Aktivitäten. Aus demselben Grund könnte das breite pH-Optimum für die *ApPDCwt* beobachtet worden sein (Graf, 2005).

#### Bestimmung der pH-abhängigen Stabilität

Die pH-abhängige Stabilität beider Varianten wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen verfolgt (Abb. 39).



**Abb. 39: pH-Stabilitäten der *ApPDCW388A/I*-Varianten.** Die Inkubation der Varianten erfolgte 21 Tage in 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer (inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) bei verschiedenen pH-Werten und 30°C. Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte mittels indirekten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.3.2). Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit n = 3 (Standardabweichungen: 0,1 – 5,9%); Anfangsaktivitäten zum Zeitpunkt t = 0: W388A: 100% [pH 5,5] = 25 U/mg, 100% [pH 6,5] = 39 U/mg und 100% [pH 7,5] = 27 U/mg; W388I: 100% [pH 5,5] = 17 U/mg, 100% [pH 6,5] = 33 U/mg und 100% [pH 7,5] = 27 U/mg (Gerhards, 2009).

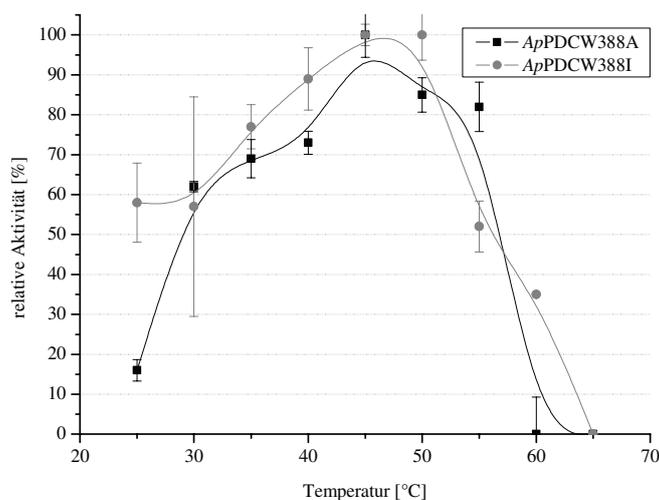
Bei der Variante *ApPDCW388A* lässt sich deutlich erkennen, dass die höchste Stabilität im schwach sauren Bereich bei pH 5,5 erreicht wird ( $\tau_{1/2}$ : > 534 h). Im Vergleich dazu ist die *ApPDCW388I*-Variante mit einer Halbwertszeit von 100 h bei pH 5,5 deutlich instabiler. Die Halbwertszeiten der *ApPDCW388A*-Variante betragen bei pH 6,5 96 h und bei pH 7,5 nur noch 16 h. In diesem pH-Bereich zeigt die *ApPDCW388I*-Variante eine bessere Stabilität: 126 h (pH 6,5) und 36 h (pH 7,5).

Bei pH 6,5 zeigen beide Varianten die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und eine gute Stabilität, aus diesem Grund wurde dieser pH-Wert für weitere Charakterisierungen genutzt. Die Stabilitäten bei pH 7,5 sind zwar die geringsten in der gesamten Messreihe,

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

jedoch sind die Varianten auch in diesem Bereich einige Stunden aktiv. Vorteilhaft könnte dies in Bezug auf die Carboligation sein. Dort wurde bereits häufiger ein relativ zur Decarboxylierung leicht basisch verschobenes pH-Optimum beobachtet (Gocke *et al.*, 2008; Goetz *et al.*, 2001; Iding *et al.*, 2000).

### Bestimmung des Temperatur-Optimums

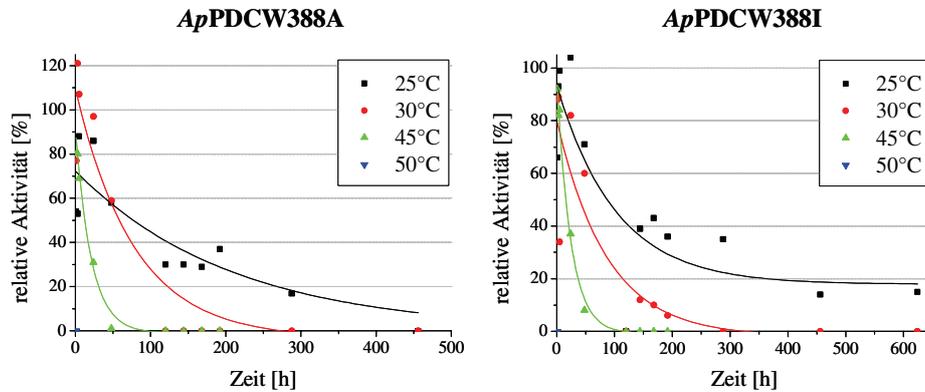


**Abb. 40: Temperatur-Optima der ApPDCW388A/I-Varianten.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 mittels direkten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.4). Die Temperaturen der einzelnen Messungen wurden variiert. Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit  $n = 3$ ; 100% [ApPDCW388A] = 75 U/mg und 100% [ApPDCW388I] = 74 U/mg.

Die Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 45°C hat eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 5 bei der ApPDCW388A-Variante und um den Faktor 1,7 bei der ApPDCW388I-Variante zur Folge (Abb. 40). Das Temperatur-Optimum liegt für beide Varianten bei 45°C, wobei die ApPDCW388I-Variante ebenfalls bei 50°C 100% relative Aktivität zeigt.

Aus den linearen Bereichen der Temperaturkurven in Abb. 41 wurden die Aktivierungsenergien  $E_A$  für die Decarboxylierung von Pyruvat beider Varianten bestimmt. Die Aktivierungsenergie  $E_A$  der ApPDCW388A-Variante hat sich mit 61 kJ/mol im Gegensatz zur ApPDCwt (27 kJ/mol; Graf, 2005) verdoppelt. Im Falle der ApPDCW388I-Variante ist die Aktivierungsenergie  $E_A$  mit 29 kJ/mol unverändert.

Bestimmung der Temperatur-abhängigen Stabilität



**Abb. 41: Temperatur-Stabilität der ApPDCW388A/I-Varianten.** Die Inkubation der Varianten erfolgte 19, bzw. 26 Tage in 50 mM Kpi-Puffer (inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) bei verschiedenen Temperaturen und einem pH-Wert von 6,5. Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte mittels indirekten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.3.2). Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit n = 3 (Standardabweichungen: 0,1 – 14,9%); Anfangsaktivitäten zum Zeitpunkt t = 0: W388A: 100% [25°C] = 40 U/mg, 100% [30°C] = 34 U/mg, 100% [45°C] = 39 U/mg und 100% [50°C] = 23 U/mg; W388I: 100% [25°C] = 36 U/mg, 100% [30°C] = 40 U/mg, 100% [45°C] = 42 U/mg und 100% [50°C] = 40 U/mg.

Im Bereich oberhalb des Temperatur-Optimums (50°C) weisen beide Varianten die geringste Stabilität auf (Abb. 41). Bereits nach 1 h Inkubation konnte bei beiden Varianten keine Restaktivität mehr detektiert werden. Die höchste Stabilität der Enzymvarianten war bei 25°C gegeben.

**Tab. 17: Halbwertszeiten ( $\tau_{1/2}$ ) der ApPDCW388A/I-Varianten.** Die Halbwertszeiten wurden wie in Kap. 3.6.5 beschrieben berechnet.  $\tau_{1/2}$  der ApPDCwt wurde zu Vergleichszwecken mit aufgeführt.

| Temperatur [°C] | $\tau_{1/2}$ [h] ApPDCW388A | $\tau_{1/2}$ [h] ApPDCW388I | $\tau_{1/2}$ [h] ApPDCwt (Graf, 2005) |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| 25              | 134                         | 207                         | 192 (bei 20°C)                        |
| 30              | 72                          | 54                          | 144                                   |
| 45              | 14                          | 15                          | 34 (bei 40°C)                         |
| 50              | < 1                         | < 1                         | 12                                    |

Bei 45°C, dem Temperatur-Optimum, sind die Halbwertszeiten ( $\tau_{1/2}$ ) beider Varianten identisch und liegen in einem ähnlichen Bereich wie  $\tau_{1/2}$  der ApPDCwt bei 40°C. Bei 30°C ist  $\tau_{1/2}$  im Falle der ApPDCW388A-Variante um den Faktor 5, bzw. um den Faktor 3,5 bei der

*ApPDCW388I* gestiegen. Allerdings ist die Stabilität beider Varianten im Vergleich zur *ApPDCwt* bei 30°C um den Faktor 2 – 2,7 gesunken.

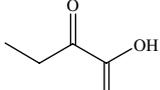
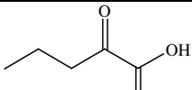
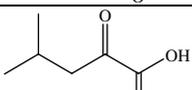
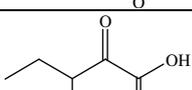
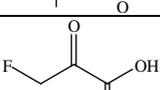
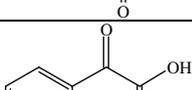
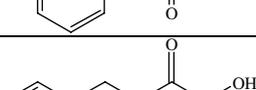
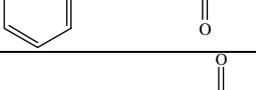
Die höchsten Halbwertszeiten der Varianten konnten bei 25°C beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Wildtyp-Enzym erzielt, bei dem die beste Stabilität bei einer Temperatur von 20°C beobachtet wurde (Graf, 2005). Im Vergleich zu den Halbwertszeiten der *ApPDCwt* (Graf, 2005) sind die der Varianten leicht erniedrigt. Für Versuche oder für technische Anwendungen scheint der Einsatz der Varianten über einen längeren Zeitraum bei Temperaturen zwischen 25°C und 30°C kein Problem darzustellen. Jedoch muss festgehalten werden, dass in Reaktionsansätzen weitere Faktoren, wie Substrate und/oder organische Lösungsmittelzusätze eine bedeutende Rolle für die Stabilität von Enzymen spielen können. In solchen komplexen Systemen müssen alle externen Einflüsse auf ein Enzym explizit überprüft werden.

### 4.4.3.2 Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der *ApPDCW388A/I*-Varianten

Die *ApPDCwt* decarboxyliert primär aliphatische 2-Ketosäuren (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, in Arbeit; Graf, 2005). Zusätzlich werden verzweigt-kettige aliphatische 2-Ketosäuren mit geringen Aktivitäten umgesetzt (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, in Arbeit; Graf, 2005). Das Substratspektrum der *ApPDCW388A/I*-Varianten sollte Auskunft über eine eventuelle Veränderung der Substratspezifität bezüglich der Decarboxylaseaktivität geben (Tab. 18).

ERGEBNISSE & DISKUSSION

**Tab. 18: Decarboxylase-Substratspektren der *ApPDC*wt und der *ApPDC*W388A/I-Varianten.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylasetest mit verschiedenen Substraten und n = 3 (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.6). Die Substrate **1 – 9** wurden mit 30 mM, **10** mit 1 mM in den Test eingesetzt. Durch Zugabe der gereinigten Enzyme wurden die Reaktionen gestartet und photometrisch verfolgt. 100% [*ApPDC*wt mit Pyruvat] = 98 U/mg. Ugs.: umgangssprachlich.

| Nr. | 2-Ketosäure                                     | Strukturformel  | relative Aktivitäten [%] |       |       |
|-----|---|---|--------------------------|-------|-------|
|     |   |   | wt                       | W388A | W388I |
| 1   | 2-Ketopropansäure<br>(ugs.: Pyruvat)            |    | 100,0                    | 41,2  | 32,9  |
| 2   | 2-Ketobutansäure                                |    | 43,1                     | 16,0  | 11,7  |
| 3   | 2-Ketopentansäure                               |    | 8,0                      | 1,7   | 1,4   |
| 4   | 2-Keto-4-methyl-pentansäure                     |   | 0,0                      | 0,0   | 0,0   |
| 5   | 2-Keto-3-methyl-pentansäure                     |  | 2,8                      | 0,2   | 0,1   |
| 6   | 2-Keto-3-fluoro-propionsäure                    |  | 0,0                      | 0,0   | 0,0   |
| 7   | Phenylglyoxyssäure<br>(ugs.: Benzoylformiat)    |  | 0,0                      | 0,0   | 0,0   |
| 8   | 2-Keto-4-phenyl-butansäure                      |  | 0,1                      | 0,4   | 0,4   |
| 9   | 2-Keto-5-phenyl-pentansäure                     |  | 0,1                      | 1,9   | 0,6   |
| 10  | Indol-3-glyoxyssäure<br>(ugs.: Indol-3-pyruvat) |  | 0,0                      | 0,0   | 0,0   |

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

Von beiden Varianten wird Pyruvat (**1**) am schnellsten umgesetzt. Die relativen Aktivitäten beider Varianten nehmen gegenüber den längerkettigen Substraten 2-Ketobutansäure (**2**) und 2-Ketopentansäure (**3**) vergleichbar zur *ApPDCwt* ab. 2-Keto-4-methyl-pentansäure (**4**) wird weder von der *ApPDCwt*, noch von den Varianten decarboxyliert. Trotz der Vergrößerung der Donor-Bindestelle in den Varianten stellt die Verzweigung durch eine Methylgruppe in Position 4 eine sterische Hinderung dar. Liegt die Verzweigung in Position 3, wie bei der 2-Keto-3-methyl-pentansäure (**5**), kann eine geringe relative Decarboxylaseaktivität von 2,8% bei der *ApPDCwt* gemessen werden. Im Vergleich dazu ist die Aktivität der Varianten gegenüber diesem Substrat geringer. Vermutlich bieten die sterischen Gegebenheiten der *ApPDCwt* ausreichend Platz um eine optimale Stabilisierung kurzkettiger, aliphatischer Substrate zu gewährleisten, wohingegen im aktiven Zentrum der Varianten wahrscheinlich zu viel Platz vorhanden ist. Ein wesentlicher Punkt bei Substratspektren dieser Art ist, dass die Substratkonzentrationen konstant gehalten werden. Dadurch bedingt ist nicht sicher gestellt, dass  $V_{\max}$  für alle Substrate erreicht wird. Zusätzlich kann es bei den gewählten Konzentrationen bereits zu einer Substratüberschussinhibierung kommen. In allen Fällen wäre die Aktivität geringer als unter optimalen Bedingungen.

Die Substrate **6** – **10** werden von der *ApPDCwt* kaum oder gar nicht umgesetzt. Bei den Substraten **8** und **9** konnten mit den *ApPDCW388A/I*-Varianten geringe aber messbare Umsätze gezeigt werden. Sowohl die *ApPDCW388A*-, als auch die *ApPDCW388I*-Variante können die Substrate 2-Keto-4-phenyl-butansäure (**8**) und 2-Keto-5-phenyl-pentansäure (**9**) umsetzen. Das aktive Zentrum der *ApPDCW388A*-Variante scheint wie vermutet durch den Austausch der sterisch sehr anspruchsvollen Aminosäure Tryptophan zu Alanin vergrößert worden zu sein und so eine verbesserte Stabilisierung des Substrates **9** sicher zu stellen.

Die Substratspektren der Varianten deuten auf eine erfolgreiche Erweiterung der Donor-Bindestelle hin (Bereich b in Abb. 12). Ob diese Veränderung ebenso einen Einfluss auf die Carboligaseaktivität hat wird in Kap. 4.4.3.4 diskutiert und dargestellt.

4.4.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der *ApPDCW388A/I*-Varianten

**Tab. 19: Pyruvat-Kinetik der *ApPDCW388A/I*-Varianten.** Als Referenz-Werte wurden die kinetischen Parameter der *ApPDCwt* mit aufgelistet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylaseaktivitätstest mit Pyruvat als Substrat [0,03 – 40 mM] (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.7) und n = 3. Die Auswertung erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Programms Origin 7.0.

| Enzym<br>(Referenz)   | V <sub>max</sub><br>[U/mg]   | K <sub>M</sub><br>[mM]  |
|---|--|---|
| <i>ApPDCwt</i><br>(Raj <i>et al.</i> , 2002) <sup>a</sup><br>(Gocke <i>et al.</i> , in Arbeit) <sup>b</sup> | 97 (pH 5,0) <sup>a</sup><br>79 (pH 7,0) <sup>a</sup><br>110 ± 1,9 <sup>b</sup> | 0,35 (pH 5,0) <sup>a</sup><br>5,1 (pH 7,0) <sup>a</sup><br>2,8 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| <i>ApPDCW388A</i><br>(Gerhards, 2009)   | 58,9 ± 1,7   | 5,8 ± 0,4   |
| <i>ApPDCW388I</i><br>(Gerhards, 2009)   | 87,5 ± 3,4   | 8,1 ± 0,8   |

Die Pyruvat-Kinetik der *ApPDCW388A/I*-Varianten wurde im Bereich des pH-Optimums (pH 6,5; Kap. 4.4.3.1) aufgenommen. Der V<sub>max</sub>-Wert von 87,5 U/mg der *ApPDCW388I*-Variante liegt um das 1,5-fache höher als der V<sub>max</sub>-Wert der *ApPDCW388A*-Variante (58,9 U/mg). Der V<sub>max</sub>-Wert der *ApPDCwt* liegt mit 110 U/mg am höchsten. Zusätzlich ist der K<sub>M</sub>-Wert für Pyruvat beim Wildtyp-Enzym mit 2,8 mM der niedrigste im Vergleich zu den K<sub>M</sub>-Werten der Varianten. Die leicht erhöhten K<sub>M</sub>-Werte der Varianten deuten auf eine verringerte Bindungsaffinität des Pyruvats an das aktive Zentrum. Dies könnte an einer geringeren Stabilisierung des Pyruvats aufgrund der größeren Donor-Bindestelle liegen. Bei der PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ScPDC*) befindet sich beispielsweise in vergleichbarer Position ein Alanin. Dieses Enzym weist im Vergleich zu bakteriellen PDCs einen geringeren V<sub>max</sub>-Wert (~ 40 U/mg) und einen höheren K<sub>M</sub>-Wert (S<sub>0,5</sub>: 21,6 mM) gegenüber Pyruvat auf (Gocke, 2007). Die Erhöhung des K<sub>M</sub>-Wertes liegt zu großen Teilen an der Substrataktivierung und einem sigmoiden Kurvenverlauf. Die Stabilisierung durch Tryptophan (W388) kann durch Isoleucin in der *ApPDCW388I*-Variante besser als durch Alanin in der *ApPDCW388A*-Variante ersetzt werden.

Insgesamt zeigen die *ApPDCW388A/I*-Varianten eine ähnlich Tendenz bezüglich der Änderung der kinetischen Parameter wie die Variante *ZmPDCW392A* (Bruhn *et al.*, 1995). Die pH-abhängige Veränderung der kinetischen Parameter, die durch Raj und Mitarbeiter festgestellt wurde (Raj *et al.*, 2002), zeigt eine bessere Umsetzung des Pyruvats bei pH 5,0. Aufgrund dieser Beobachtung könnten sich die kinetischen Parameter der Varianten bei eher sauren pH-Werten ebenfalls verändern. Dies wurde allerdings im Rahmen dieser Dissertation und der Diplomarbeit von Tina Gerhards nicht weiter behandelt.

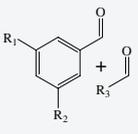
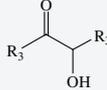
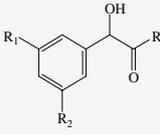
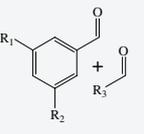
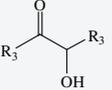
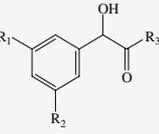
Weitere Untersuchungen wurden mit 2-Ketopentansäure (Tab. 18; **3**) und 2-Keto-5-phenylpentansäure (Tab. 18; **9**) durchgeführt (nicht abgebildet). Beide Substrate zeigten beim Wildtyp-Enzym und bei der *ApPDCW388A*-Variante eine Substratüberschussinhibierung. Im Falle der längerkettigen 2-Ketosäure **3** konnte für beide Enzyme eine vergleichbare maximale Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten, wie bereits im Substratspektrum beobachtet (Tab. 18), nachgewiesen werden ( $V_{\max}$  *ApPDCwt*:  $11,65 \pm 2,22$  U/mg;  $V_{\max}$  *ApPDCW388A*:  $1,53 \pm 0,15$  U/mg). Die  $K_M$ -Werte gegenüber 2-Ketopentansäure liegen mit 7,54 mM für die *ApPDCwt* und 5,36 mM bei der Variante in einem vergleichbaren Bereich.

Der Einsatz der sterisch sehr anspruchsvollen 2-Ketosäure **9** zeigte ebenfalls eine Substratüberschussinhibierung bei beiden Enzymen. Zudem konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit des Substrats der Sättigungsbereich nicht erreicht werden. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die *ApPDCW388A*-Variante das Substrat mit einem geringen  $K_M$ -Wert von 2,37 mM im Gegensatz zur *ApPDCwt* umsetzen kann ( $V_{\max}$  *ApPDCwt*:  $< 0,01$  U/mg;  $V_{\max}$  *ApPDCW388A*:  $3,02 \pm 0,18$  U/mg).

#### 4.4.3.4 Carboligaseaktivität der *ApPDCW388A/I*-Varianten

Eine erste Charakterisierung des Carboligase-Substratspektrums wurde mittels Tetrazoliumrot- (TTC)-Test (Kap. 3.6.8) durchgeführt (Gerhards, 2009). Es wurden diverse Aldehyde als Substrat für eine gemischte Carboligation getestet (nicht abgebildet). Allgemein zeigten die Ergebnisse des TTC-Tests, dass durch die Vergrößerung des aktiven Zentrums das Aldehyd-Substratspektrum verändert wurde. Die *ApPDCW388A*-Variante erwies sich im Gegensatz zur *ApPDCW388I*-Variante, die in keinem der Ansätze eine signifikant höhere Aktivität als das Wildtyp-Enzym zeigte, als interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen im Rahmen instrumenteller Analytik (Tab. 20).

**Tab. 20: Untersuchung der Carboligaseaktivität der ApPDCW388A/I-Varianten.** Relative Produktsätze (in mol%, NMR) und Enantiomerenüberschüsse (*ee*, chirale HPLC) der Produkte der Ligation verschiedener Aldehyde. Alle Reaktionen wurden mit 0,3 mg/ml Enzym in 50 mM Kpi-Puffer inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 % DMSO bei pH 7,0 und 30°C mit äquimolaren Aldehydkonzentrationen [18 mM] über 72 h inkubiert. (n.d. = nicht detektierbar; - = keine Daten).

|                   |  |  |                                  |  |  |
|--|---|---|---|---|---|
| Produkte   | Acetoin-Derivate  | PAC-Derivate  | Produkte  | Acetoin-Derivate  | PAC-Derivate  |
| <b>A</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>                | ApPDCwt   |   | <b>F</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>                | ApPDCwt   |   |
|  | 7%<br>n.d.  | 17%<br>93% (R)  |   | -   | 0%  |
|  | ApPDCW388A  |   |   | ApPDCW388A  |   |
|  | 11%<br>n.d.   | 62%<br>84% (R)  |   | -   | 0%  |
| ApPDCW388I   |   | ApPDCW388I  |   | -   | 0%  |
|  | < 2%<br>n.d.  | 37%<br>82% (R)  |   |   |   |
| <b>B</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | ApPDCwt   |   | <b>G</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | ApPDCwt   |   |
|  | 3%<br>n.d.  | 7%<br>96% (R)   |   | -   | 0%  |
|  | ApPDCW388A  |   |   | ApPDCW388A  |   |
|  | 6%<br>n.d.  | 18%<br>50% (R)  |   | -   | 6%<br>84% (R)   |
| ApPDCW388I   |   | ApPDCW388I  |   | -   | 0%  |
|  | < 1%<br>n.d.  | 9%<br>94% (R)   |   |   |   |
| <b>C</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | ApPDCwt   |   | <b>H</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | ApPDCwt   |   |
|  | < 1%<br>n.d.  | 7%<br>92% (R)   |   | -   | 0%  |
|  | ApPDCW388A  |   |   | ApPDCW388A  |   |
|  | 7%<br>n.d.  | 7%<br>29% (S)   |   | -   | 8%<br>90% (R)   |
| ApPDCW388I   |   | ApPDCW388I  |   | -   | 0%  |
|  | -   | 4%<br>97% (R)   |   |   |   |
| <b>D</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | ApPDCwt   |   | <b>I</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | ApPDCwt   |   |
|  | 9%<br>n.d.  | 2%<br>82% (R)   |   | -   | -   |
|  | ApPDCW388A  |   |   | ApPDCW388A  |   |
|  | 3%<br>n.d.  | 1%<br>69% (R)   |   | -   | 2%  |
| ApPDCW388I   |   | ApPDCW388I  |   | -   | 0%  |
|  | < 2%<br>n.d.  | 7%<br>95% (R)   |   |   |   |
| <b>E</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | ApPDCwt   |   | <b>J</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OCH <sub>3</sub><br>R <sup>3</sup> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | ApPDCwt   |   |
|  | -   | 0%  |   | -   | -   |
|  | ApPDCW388A  |   |   | ApPDCW388A  |   |
|  | -   | 2%<br>20% (R)   |   | -   | 11%<br>84% (R)  |
| ApPDCW388I   |   | ApPDCW388I  |   | -   | 0%  |
|  | -   | 15%<br>98% (R)  |   |   |   |

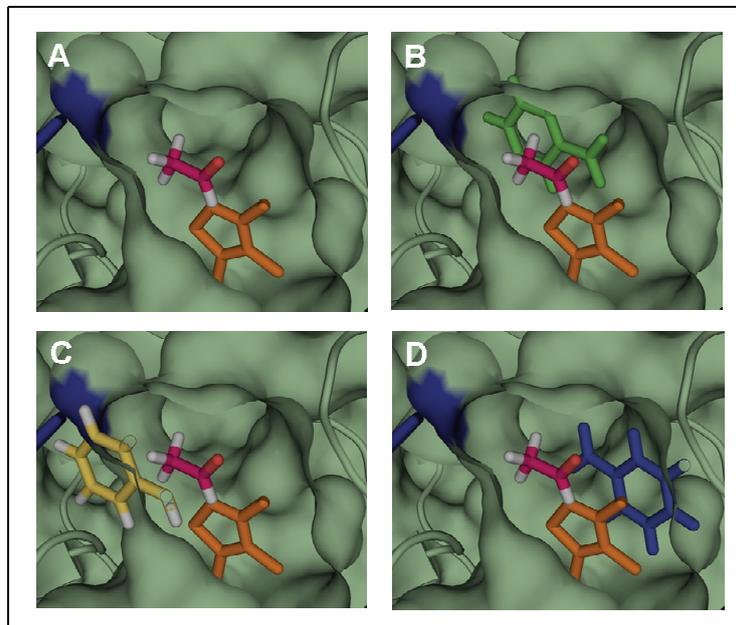
In Kap. 1.4.5 der Einleitung wurde beschrieben, wie bei einer gemischten Ligation von einem aromatischen und einem aliphatischen Aldehyd vier verschiedene 2-Hydroxyketone entstehen können. Die Analyse der Ansätze (Tab. 20) zeigte allerdings nur zwei dieser Produkte, die ausgehend von aliphatischen Donoraldehyden erhalten werden: das Selbstligationsprodukt des jeweiligen aliphatischen Aldehyds (Acetoin-Derivate) und als gemischtes Produkt Phenylacetylcarbinol- (PAC-) Derivate (Tab. 20). Die Chemoselektivität der *ApPDC* hat sich also durch die Vergrößerung der Donor-Bindestelle nicht in dem Maße verändert, dass aromatische Aldehyde als Donoren akzeptiert werden.

Bei der Selbstligation aliphatischer Aldehyde zeigen die Varianten keine deutliche Verbesserung des Umsatzes. Geringfügig bessere Umsätze konnten durch die *ApPDCW388A*-Variante für die Acetoin-Derivate aus den Reaktionen **A**, **B** und **C** erzielt werden. Bei der gemischten Ligation (Bildung der PAC-Derivate) konnten durch beide Varianten insbesondere mit BA deutliche Verbesserungen relativ zum Wildtyp erzielt werden. Mit DMB als aromatischen Aldehyd und Propanal (**G**), Butanal (**H**), Pentanal (**I**), bzw. Hexanal (**J**) als aliphatischen Aldehyd konnten lediglich mit der *ApPDCW388A*-Variante Umsätze detektiert werden. Der Umsatz für die Synthese von (*R*)-PAC konnte von 17% für die *ApPDCwt* auf 62% für die *ApPDCW388A*-Variante gesteigert werden (**A**). Dieser 3,5-fache Anstieg konnte nach 72 h Inkubation beobachtet werden und zeigt lediglich eine Zunahme von Produkt in diesem Zeitraum. Wahrscheinlich verhält sich die *ApPDCW388A*-Variante wie die entsprechende Variante *ZmPDCW392A*, durch welche die (*R*)-PAC-Synthese auf ein 4 – 5-faches gesteigert werden konnte (Bruhn *et al.*, 1995; Goetz *et al.*, 2001; Iding *et al.*, 1998; Iwan *et al.*, 2001; Pohl, 1997). Wahrscheinlich spielt die Vergrößerung dieser Position für die Produktfreisetzung eine wichtige Rolle, was sich gut anhand Abb. 12 (Kap. 1.4.6.1) erläutern lässt. Wird die Aminosäure in Position B verkleinert, so gewinnt nicht nur Bereich a an Platz. Durch den zusätzlich weiteren Substratkanal wird auch ist die Produktfreisetzung erleichtert.

Neben einem Anstieg der Umsätze mittels *ApPDCW388A*-Variante konnte eine Veränderung der Enantioselektivität festgestellt werden. Bei der Ligation von BA mit Acetaldehyd (**A**), bzw. Propanal (**B**) zeigt die *ApPDCwt* den höchsten Enantiomerenüberschuss von 93% und 96% für das (*R*)-PAC (-Derivat). Bei der *ApPDCW388I*-Variante bleibt der Enantiomerenüberschuss bei den weiteren (*R*)-PAC-Derivaten aus den Reaktionen (**C** – **E**) konstant bei  $\geq 95\%$ . Der deutlichste Effekt auf die Enantioselektivität wird mittels *ApPDCW388A*-Variante ausgeübt. Bei der Verknüpfung von BA mit Acetaldehyd (**A**) liegt der Enantiomerenüberschuss bei 84% für (*R*)-PAC. Mit zunehmender Kettenlänge des aliphatischen Aldehyds, wie bereits bei Propanal (**B**), sinkt der Enantiomerenüberschuss auf 50% für das

(*R*)-PAC-Derivat. Im Falle von Butanal (**C**) wird sogar das (*S*)-PAC-Derivat im Überschuss synthetisiert. Wird Pentanal (**D**) oder Hexanal (**E**) als aliphatischer Aldehyd eingesetzt, so entsteht wiederum das (*R*)-enantiomere Produkt.

Die Beobachtung der (*S*)-PAC-Derivat-Synthese war überraschend, da in den *Ap*PDCW388-Varianten die in der Einleitung beschriebene *S*-Tasche (Kap. 1.4.6) nicht vergrößert wurde. Dementsprechend könnte es in der *Ap*PDC, ebenso wie in der *Pp*BFD (Kap. 4.3.1.2 und Abb. 37) einen alternativen Weg zur Bildung von (*S*)-enantiomeren Produkten geben. Mit der folgenden Abbildung soll diese Theorie anhand der Ligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd erläutert werden.



**Abb. 42: Darstellung eines alternativen Weges zur Produktion von (*S*)-PAC in der *Ap*PDC.** Der sterische Bereich der Aminosäure W388 ist blau markiert. Acetaldehyd (pink) ist als Donor an das C2-Atom des ThDP (orange) gebunden. **A:** Acetaldehyd ohne Akzeptor. **B:** Benzaldehyd (grün) in paralleler Anordnung zum Acetaldehyd mit Orientierung im Substratkanal, (*R*)-PAC-Bildung. **C:** Aufgrund der sterischen Hinderung der Aminosäure W388 kann Benzaldehyd (gelb) sich nicht von der dem Substratkanal abgewandten Seite in paralleler Anordnung zum Acetaldehyd annähern, auf diese Weise ist keine (*S*)-PAC-Bildung in der *Ap*PDCwt möglich. **D:** Die minimale (*S*)-PAC-Bildung in der *Ap*PDCwt kommt durch die Möglichkeit zustande, dass sich der Benzaldehyd (blau) durch die *S*-Tasche antiparallel zum Acetaldehyd annähern kann. (Diese Bilder wurden von Dr. Michael Knoll erstellt, Gocke, 2007).

Nutzt man die *Ap*PDCwt als Biokatalysator für die Ligation von Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA), so fungiert AA gebunden an das C2-Atom des ThDPs als Donor (Abb. 42 A). BA lagert sich parallel an den AA an. Auf diese Weise entsteht (*R*)-PAC, welches mit

einem Enantiomerenüberschuss von 93% gebildet wird (Abb. 42 **B**). BA kann sich auch antiparallel zum ThDP-gebundenen AA ausrichten, so dass der aromatische Ring in Richtung *S*-Tasche zeigt und (*S*)-PAC resultiert (Abb. 42 **D**). Dies ist allerdings nur bedingt möglich und (*S*)-PAC wird daher nicht im Überschuss gebildet. Ein alternativer Weg der (*S*)-PAC-Synthese besteht in der Möglichkeit, dass sich der BA parallel von der dem Substratkanal abgewandten Seite des AA anlagert (Abb. 42 **C**). Wie aus Abb. 42 ersichtlich, wird dieser Weg durch die Seitenkette des Tryptophans in Position 388 sterisch blockiert. In der *ApPDCW388A*-Variante wurde dieser Rest gegen Alanin ausgetauscht. So konnte der Bereich vergrößert werden, wodurch die Synthese des (*S*)-PAC-Derivates aus BA und Butanal erklärt werden kann.

#### **4.4.4 Fazit: Hinweise auf einen alternativen Weg für die Synthese von (*S*)-2-Hydroxyketonen in der *ApPDC***

Obwohl der Bereich der Donor-Bindestelle vergrößert wurde, akzeptierten die *ApPDCW388A/I*-Varianten weiterhin lediglich aliphatische Aldehyde als Donoraldehyd. Im Bereich der Enantioselektivität konnten, wie auch bei der *PpBFD* (Kap. 4.3.2), Hinweise auf einen alternativen Weg zur Bildung von (*S*)-enantiomeren 2-Hydroxyketonen gefunden werden. Dieser kann durch einen Rückseitenangriff des Akzeptor-Aldehyds auf den ThDP-gebundenen Donor erklärt werden.

#### 4.4.5 Varianten im Bereich der *ApPDC*-Akzeptor-Bindestelle

Ausführliche Untersuchungen der Position A<sub>1</sub> des *PpBFD*-Enzyms wurden in Kap. 4.2.1, mit dem Ergebnis eines vergrößerten Akzeptoraldehyd-Substratspektrums zur Synthese von diversen (*S*)-2-HPP-Derivaten, erläutert (Gocke, 2007; Gocke *et al.*, 2008). Ziel ist die Übertragung des vorgestellten *S*-Taschen-Konzepts der *PpBFD* auf die *ApPDC*. In einer parallel durchgeführten Arbeit mit der verwandten *ZmPDC* wurde entdeckt, dass das Glutamat in dieser Position ausgetauscht werden kann und zu einer aktiven (*R*)-selektiven Variante bezogen auf die Carboligaseaktivität führt (Meyer, 2009). Durch den Austausch des Glutamats (E469, sauer) in Position 469 der *ApPDC* zu Aspartat (D, sauer), Glutamin (Q, neutral) und Glycin (G, neutral) könnte die Möglichkeit einer enzymatischen (*S*)-PAC-Synthese geebnet werden.

#### 4.4.6 Biochemische Charakterisierung der *ApPDC*-Varianten im Bereich der Akzeptor-Bindestelle (*ApPDCE469D/Q/G*; *ApPDCI468A*)

Das Decarboxylase-Substratspektrum, sowie die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$  mit Pyruvat als Substrat, wurden für alle hergestellten Varianten im Bereich der Akzeptor-Bindestelle aufgenommen. Eine weitere ausführliche Charakterisierung in Bezug auf den Einfluss der äußeren Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität wurde ausschließlich für die *ApPDCE469G*-Variante durchgeführt (Kap. 4.4.6.4).

##### 4.4.6.1 Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der *ApPDCE469D/Q/G*-Varianten

Die geringe spezifische Aktivität der *ApPDCE469G*-Variante gegenüber Pyruvat fiel bereits bei deren Reinigung mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie auf (Kap. 3.5.5). Vergleichbar mit den Varianten der *ZmPDC*, bei denen die zum Glutamat (Glu) 469 der *ApPDC* korrespondierende Aminosäure Glu473 ebenfalls mutiert wurde (Kap. 1.4.6.3) (Meyer, 2009; Pohl *et al.*, 1998), weisen die *ApPDCE469*-Varianten geringe Decarboxylaseaktivitäten von  $\sim 1$  U/mg auf. Das Decarboxylase-Substratspektrum wurde in einem indirekten Test (Kap. 3.6.6) mit verschiedenen 2-Ketosäuren untersucht. Die spezifischen Aktivitäten aller Varianten (*ApPDCE469D/Q/G*) lagen, wie erwartet, deutlich unter eins. Pyruvat blieb in allen Fällen das Hauptsubstrat.

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

**Tab. 21: Decarboxylase-Substratspektren der ApPDCwt und der ApPDCE469D/Q/G-Varianten.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylasetest mit verschiedenen Substraten und n = 3 (Hilfsenzym: HL-ADH<sub>rek.</sub>) (Kap. 3.6.6). Die Substrate **1 – 9** wurden mit 30 mM, **10** mit 1 mM in den Test eingesetzt. Durch Zugabe von gereinigtem Enzym wurden die Reaktionen gestartet und photometrisch verfolgt. Die spezifischen Aktivitäten mit Pyruvat eines jeden Enzyms wurden gleich 100% relative Aktivität gesetzt: 100% [ApPDCwt] = 98 U/mg, 100% [ApPDCE469D] = 0,12 U/mg, 100% [ApPDCE469Q] = 0,38 U/mg und 100% [ApPDCE469G] = 0,66 U/mg. Ugs.: umgangssprachlich.

| Nr.       | 2-Ketosäure                                     | Strukturformel | relative Aktivitäten [%] |       |       |       |
|-----------|---|----------------|--------------------------|-------|-------|-------|
|           |   |                | wt                       | E469D | E469Q | E469G |
| <b>1</b>  | 2-Ketopropansäure<br>(ugs.: Pyruvat)            |                | 100,0                    | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| <b>2</b>  | 2-Ketobutansäure                                |                | 43,1                     | 50,0  | 55,3  | 66,7  |
| <b>3</b>  | 2-Ketopentansäure                               |                | 8,0                      | 0,0   | 0,0   | 0,0   |
| <b>4</b>  | 2-Keto-4-methyl-pentansäure                     |                | 0,0                      | 0,0   | 2,6   | 0,0   |
| <b>5</b>  | 2-Keto-3-methyl-pentansäure                     |                | 2,8                      | 16,7  | 2,6   | 4,5   |
| <b>6</b>  | 2-Keto-3-fluoro-propionsäure                    |                | 0,0                      | 0,0   | 2,6   | 0,0   |
| <b>7</b>  | Phenylglyoxylsäure<br>(ugs.: Benzoylformiat)    |                | 0,0                      | 0,0   | 0,0   | 0,0   |
| <b>8</b>  | 2-Keto-4-phenyl-butansäure                      |                | 0,1                      | 0,0   | 0,0   | 0,0   |
| <b>9</b>  | 2-Keto-5-phenyl-pentansäure                     |                | 0,1                      | 0,0   | 2,6   | 0,0   |
| <b>10</b> | Indol-3-glyoxylsäure<br>(ugs.: Indol-3-pyruvat) |                | 0,0                      | 0,0   | 0,0   | 0,0   |

Neben Pyruvat (**1**), dem Hauptsubstrat, wird 2-Ketobutansäure (**2**) als zweitbestes Substrat sowohl von der *ApPDCwt* als auch von den *ApPDCE469D/Q/G*-Varianten akzeptiert. Mit dem verzweigt-kettigen Substrat **5** weisen zwar alle Varianten, vor allem die *ApPDCE469D*-Variante, im Vergleich zur *ApPDCwt* unter den gewählten Bedingungen höhere relative Aktivitäten auf, allerdings kommt dies dadurch zustande, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten mit Pyruvat einer jeden Versuchsreihe auf 100% relative Aktivität gesetzt wurden. Die absoluten Werte im Vergleich zeigen, dass alle Varianten mit einer spezifischen Aktivität von < 1 U/mg deutlich unter der der *ApPDCwt* mit 2,7 U/mg liegen.

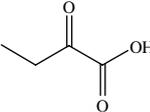
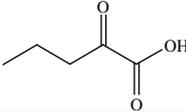
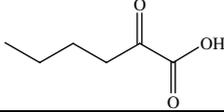
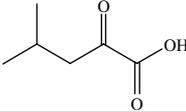
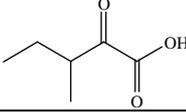
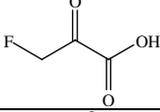
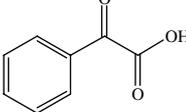
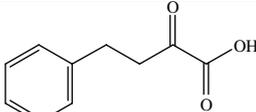
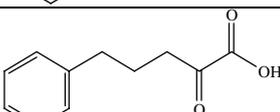
Anhand des Substratspektrums konnte gezeigt werden, dass sich die Veränderung der Aminosäure A<sub>1</sub> im Bereich der *S*-Tasche (Abb. 12) deutlich auf die Decarboxylierung von 2-Ketosäuren auswirkt. Die Aminosäure Glutamat in Position 469 scheint wie in der *ZmPDC* (E473, Chang *et al.*, 1999; Kluger & Tittmann, 2008; Meyer, 2009; Pohl *et al.*, 1998) und der *ScPDC* (E477, Liu *et al.*, 2001) auch in der *ApPDC* eine essentielle Rolle in der Decarboxylierung zu spielen. Das hoch konservierte Glutamat spielt wahrscheinlich eine essentielle Rolle in der Protonierung des Enamin-Carbanion-Komplexes (Tittmann *et al.*, 2003). Interessant ist, dass das Glutamat 469 wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die Donor-Bindestelle (Region a in Abb. 12) ausübt. Der Einfluss auf die Carboligaseaktivität, für welche der Bereich der *S*-Tasche eine bedeutende Rolle spielt, wird in Kap. 4.4.6.5 eingehend behandelt.

#### **4.4.6.2 Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der *ApPDCI468A*-Variante**

In der *ApPDCI468A*-Variante wurde ebenfalls im Bereich der Akzeptor-Bindestelle eine Mutation eingefügt und so der Eingang zur *S*-Tasche (Abb. 12 Aminosäure A<sub>2</sub>) vergrößert. Das für die Decarboxylierung essentielle Glutamat in Position 469 wurde nicht verändert.

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

**Tab. 22: Decarboxylase-Substratspektren der *ApPDCwt* und der *ApPDCI468A*-Variante.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylasetest mit verschiedenen Substraten und  $n = 3$  (Hilfsenzym: HL-ADH<sub>rek</sub>) (Kap. 3.6.6). Die Substrate **1** – **10** wurden mit 30 mM in den Test eingesetzt. Durch Zugabe von gereinigtem Enzym wurden die Reaktionen gestartet und photometrisch verfolgt. Die maximale Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *ApPDCwt* wurde auf 100% gesetzt: 100% [*ApPDCwt* mit Pyruvat] = 98 U/mg. ugs.: umgangssprachlich.

| Nr.       | 2-Ketosäure                                  | Strukturformel  | relative Aktivitäten [%]            |       |
|-----------|--|---|-------------------------------------|-------|
|           |  |   | wt                                  | I468A |
| <b>1</b>  | 2-Oxopropansäure<br>(ugs.: Pyruvat)          |    | 100,0                               | 32,4  |
| <b>2</b>  | 2-Ketobutansäure                             |    | 43,1                                | 33,4  |
| <b>3</b>  | 2-Ketopentansäure                            |    | 8,0                                 | 43,3  |
| <b>4</b>  | 2-Ketohexansäure                             |   | 13,0<br>(bezogen auf<br>Graf, 2005) | 19,4  |
| <b>5</b>  | 2-Keto-4-methyl-pentansäure                  |  | 0,0                                 | 0,1   |
| <b>6</b>  | 2-Keto-3-methyl-pentansäure                  |  | 2,8                                 | 0,6   |
| <b>7</b>  | 2-Keto-3-fluoro-propionsäure                 |  | 0,0                                 | 0,0   |
| <b>8</b>  | Phenylglyoxylsäure<br>(ugs.: Benzoylformiat) |  | 0,0                                 | 0,0   |
| <b>9</b>  | 2-Keto-4-phenyl-butansäure                   |  | 0,1                                 | 0,4   |
| <b>10</b> | 2-Keto-5-phenyl-pentansäure                  |  | 0,1                                 | 0,0   |

Im Gegensatz zu den *ApPDCE469D/Q/G*-Varianten zeigt die *ApPDCI468A*-Variante eine allgemein hohe Decarboxylaseaktivität. Mit Pyruvat (**1**) sind es zwar nur 30% relative Aktivität bezogen auf die *ApPDCwt*, wird allerdings die Kettenlänge um ein oder zwei Methylgruppen verlängert (Substrate **2** und **3**), so steigt die relative Aktivität auf bis zu 43% an. Dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 43 U/mg für die *ApPDCI468A*-Variante und knapp 8 U/mg für die *ApPDCwt*. Durch die Mutation in Position 468 von Isoleucin zu Alanin wurde mehr Platz in der Akzeptor-Bindestelle generiert, so dass länger-kettige aliphatische 2-Ketosäuren als Substrat akzeptiert werden. Dies kann zusätzlich durch eine erhöhte Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit 2-Ketohexansäure (**4**) durch die Variante belegt werden. Verzweigt-kettige und aromatische 2-Ketosäuren werden kaum oder nur sehr schlecht umgesetzt.

#### 4.4.6.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der *ApPDCE469D/Q/G*- und *ApPDCI468A*-Varianten

Im folgenden Kapitel werden die kinetischen Parameter der *ApPDC*-Varianten, welche Mutationen im Bereich der Akzeptor-Bindestelle tragen, dargestellt.

**Tab. 23: Pyruvat-Kinetik der *ApPDC*-Varianten im Bereich der Akzeptor-Bindestelle.** Als Referenz-Werte wurden die kinetischen Parameter der *ApPDCwt* mit aufgelistet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylaseaktivitätstest mit Pyruvat als Substrat [0,05 – 50 mM] (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.7) und n = 3. Die Auswertung erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Programms Origin 7.0.

| Enzym<br>(Referenz)   | V <sub>max</sub><br>[U/mg]   | K <sub>M</sub><br>[mM]  |
|---|--|---|
| <i>ApPDCwt</i><br>(Raj <i>et al.</i> , 2002) <sup>a</sup><br>(Gocke, 2007) <sup>b</sup> | 97 (pH 5,0) <sup>a</sup><br>79 (pH 7,0) <sup>a</sup><br>110 ± 1,9 <sup>b</sup> | 0,35 (pH 5,0) <sup>a</sup><br>5,1 (pH 7,0) <sup>a</sup><br>2,8 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| <i>ApPDCE469D</i><br>(diese Arbeit)   | 0,19 ± 0,003   | 0,153 ± 0,019   |
| <i>ApPDCE469Q</i><br>(diese Arbeit)   | 0,56 ± 0,006   | 2,047 ± 0,096   |
| <i>ApPDCE469G</i><br>(diese Arbeit)   | 2,07 ± 0,103   | 8,009 ± 1,083   |
| <i>ApPDCI468A</i><br>(diese Arbeit)<br>(Substratsättigung wurde<br>nicht erreicht)      | 50,6 ± 1,75  | 38,83 ± 2,27  |

Wie bereits erwartet liegen die Werte für V<sub>max</sub> bei ≤ 2 U/mg im Falle der *ApPDCE469D/Q/G*-Varianten. Der K<sub>M</sub>-Wert für Pyruvat der *ApPDCE469D*-Variante liegt mit 0,15 ± 0,019 mM in etwa in dem Bereich des K<sub>M</sub>-wertes der *ApPDCwt* bei pH 5,5. So scheint die Affinität zu Pyruvat durch den Austausch von Glutamat zu Aspartat nicht in Mitleidenschaft gezogen

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

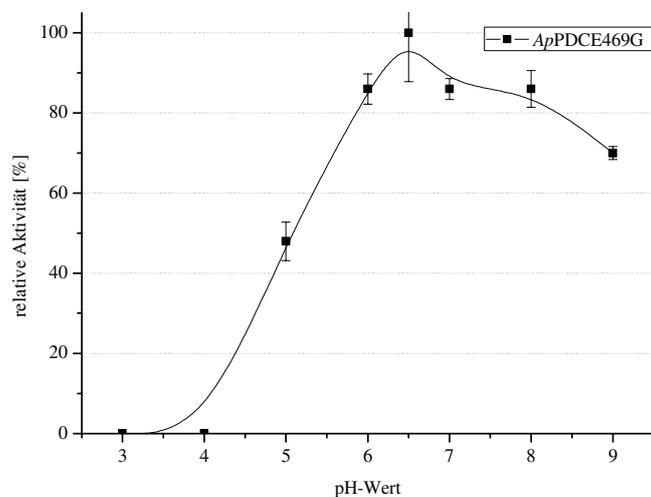
worden zu sein. So bleibt die Affinität gleich, jedoch ist die Aktivität sehr gering. Pyruvat wird gebunden, allerdings läuft die Katalyse sehr viel langsamer ab. Wahrscheinlich liegt das an der sauren Natur beider Aminosäuren. Durch einen Austausch zu neutralen Aminosäuren, wie in den Varianten *ApPDCE469Q/G* steigen die  $K_M$ -Werte auf bis zu  $8,009 \pm 1,083$  mM an. Die Affinität des Substrats zum aktiven Zentrum wird also merklich beeinträchtigt. Der Austausch des sauren Glutamatrests in Position 469 (E469) im Bereich der *S*-Tasche zum neutralen Glycin (G) hat wahrscheinlich, wie für die Variante *ZmPDCE473Q* beschrieben, eine Störung des Protonen-Relais-Systems zur Protonierung des Enamin-Carbanion-Komplexes zur Folge (Meyer, 2009). Dabei können die neutralen Aminosäuren Glutamin und Glycin in den *ApPDCE469Q/G*-Varianten und Glutamin in der *ZmPDCE473Q*-Variante keine Ladung tragen, mit der der basische Enamin-Carbanion-Komplex protoniert werden könnte (Kluger & Tittmann, 2008).

Bei der *ApPDCI468A*-Variante steigt der  $K_M$ -Wert für Pyruvat auf mindestens 38 mM an (der exakte Wert kann nicht berechnet werden, da im Rahmen der gewählten Bedingungen keine Substratsättigung erreicht werden konnte), allerdings weist diese Variante im Vergleich zu den *ApPDCE469D/Q/G*-Varianten einen 25 – 90-fach höheren  $V_{max}$ -Wert auf. Eine weitere Kinetik mit der länger-kettigen 2-Ketobutansäure sollte zeigen, ob der  $K_M$ -Wert sinkt und dementsprechend die Affinität zum Substrat steigt. Die kinetischen Parameter der *ApPDCE469G*-Variante gegenüber 2-Ketobutansäure lagen mit einem  $V_{max}$ -Wert von  $1,67 \pm 0,03$  U/mg in einem ähnlichen Bereich wie bei der Pyruvat-Kinetik. Jedoch ist die Affinität der 2-Ketobutansäure zum aktiven Zentrum tatsächlich um den Faktor 2,7 gegenüber der Pyruvat-Kinetik gesunken ( $K_M$ -Wert:  $2,92 \pm 0,17$  mM).

#### 4.4.6.4 Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der *ApPDCE469G*-Variante

Für den theoretischen Hintergrund der einzelnen Versuche wird auf Kap. 4.2.2.1 und 4.4.3.1 sowie die verschiedenen Unterpunkte verwiesen.

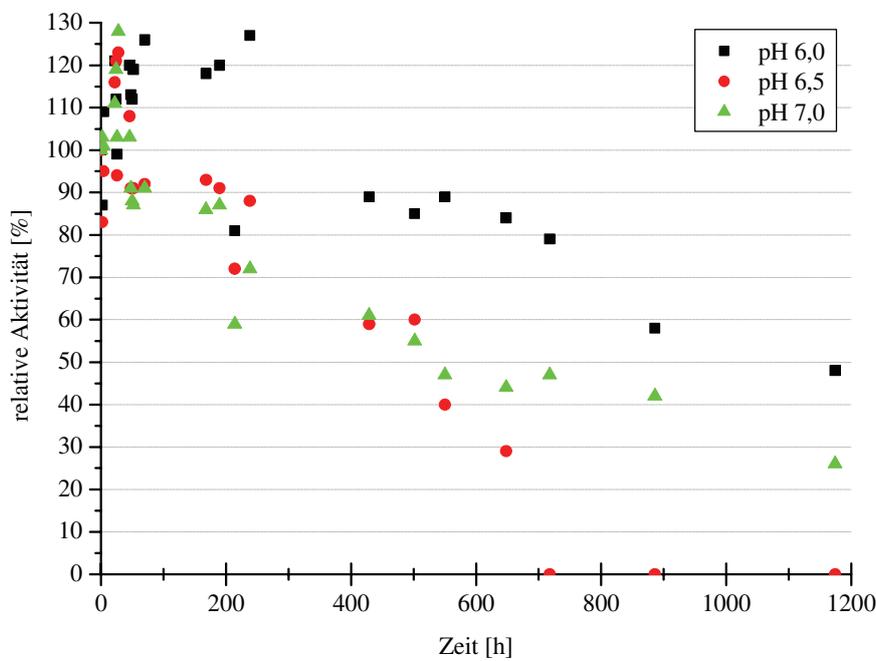
##### Bestimmung des pH-Optimums



**Abb. 43: pH-Optimum der *ApPDCE469G*-Variante.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei 30°C mittels direkten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.4). Die pH-Werte der einzelnen Messungen wurden variiert. Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit  $n = 3$ ; 100% [*ApPDCE469G*] = 3,15 U/mg.

Das pH-Optimum der Decarboxylierung von Pyruvat durch die *ApPDCE469G*-Variante liegt bei pH 6,5 (Abb. 43). Unterhalb von pH 6,5 ist ein starker Abfall der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Variante zu beobachten. So beträgt die relative Aktivität bei pH 6,0 86%, bei pH 5,5 nur noch 48% und bei pH 4,0 und pH 3,0 ist die Variante komplett inaktiviert. Die *ApPDCwt* weist, wie in Kap. 4.4.3.1 bereits erwähnt, ein breites pH-Optimum von pH 3,5 – 6,5 auf. So weist die *ApPDCE469G*-Variante in sauren pH-Werten eine geringere Stabilität auf als die *ApPDCwt*.

Bestimmung der pH-abhängigen Stabilität

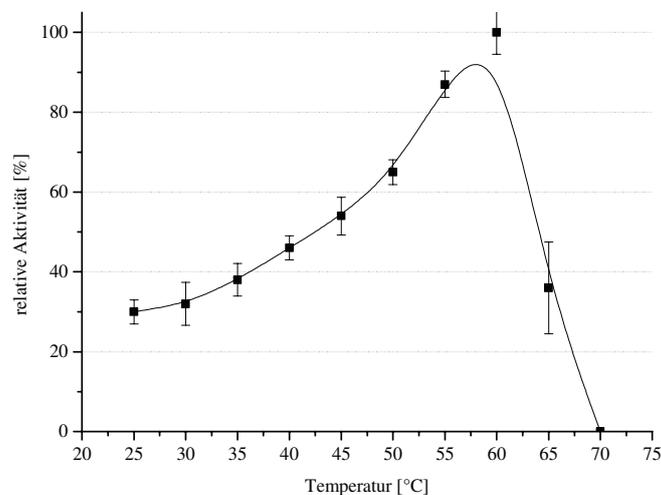


**Abb. 44: pH-Stabilität der ApPDCE469G-Variante.** Die Inkubation der Variante erfolgte 48 Tage in 50 mM Kpi-Puffer (inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) bei verschiedenen pH-Werten und 30°C. Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte mittels indirekten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.3.2). Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit n = 3 (Standardabweichungen: 0,2 – 12,7%); Anfangsaktivitäten zum Zeitpunkt t = 0: 100% [pH 6,0] = 0,71 U/ml, 100% [pH 6,5] = 0,79 U/ml und 100% [pH 7,0] = 0,77 U/ml.

Besonders auffällig bei der ApPDCE469G-Variante ist der Anstieg der Aktivität bei allen pH-Werten innerhalb der ersten 24 Stunden. Dieser könnte durch eine Reaktivierung des Enzyms nach der Gefriertrocknung erklärt werden. Durch den Vorgang der Lyophilisation kann es zu einer partiellen strukturellen Veränderung des Enzyms kommen. Vermutlich müssen sich die Seitenketten der Aminosäuren erst an die Umgebung anpassen und sich ausrichten, bevor die Reaktion unter normalen Umständen ablaufen kann. Die pH-Stabilität ist vergleichbar mit der der PpBFDL461G-Variante (Kap. 4.2.2.1), bei der in korrespondierender Position wie bei der ApPDCE469G-Variante ein Aminosäureaustausch zu Glycin vorgenommen wurde. Die ApPDCE469G-Variante weist im Bereich des pH-Optimums von 6,5 die vergleichsweise geringste Stabilität mit einer Halbwertszeit von ~ 330 h auf. Eine vergleichbare Stabilität zeigt die Variante bei einem pH-Wert von 7,0. Erstaunlich ist die enorm hohe Stabilität bei

pH 6,0. Erst nach 48 Tagen konnte ein Aktivitätsverlust von knapp über 50% beobachtet werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen bei den *ApPDCW388A/I*-Varianten (Kap. 4.4.3.1). Bei der *ApPDCwt* wurden bisher lediglich pH-Stabilitätsuntersuchungen über 2 h durchgeführt (Graf, 2005). Nach dieser kurzen Zeit konnte nur eine Tendenz festgestellt werden: die Stabilität der *ApPDCwt* ist im sauren Bereich von pH 4,0 am geringsten.

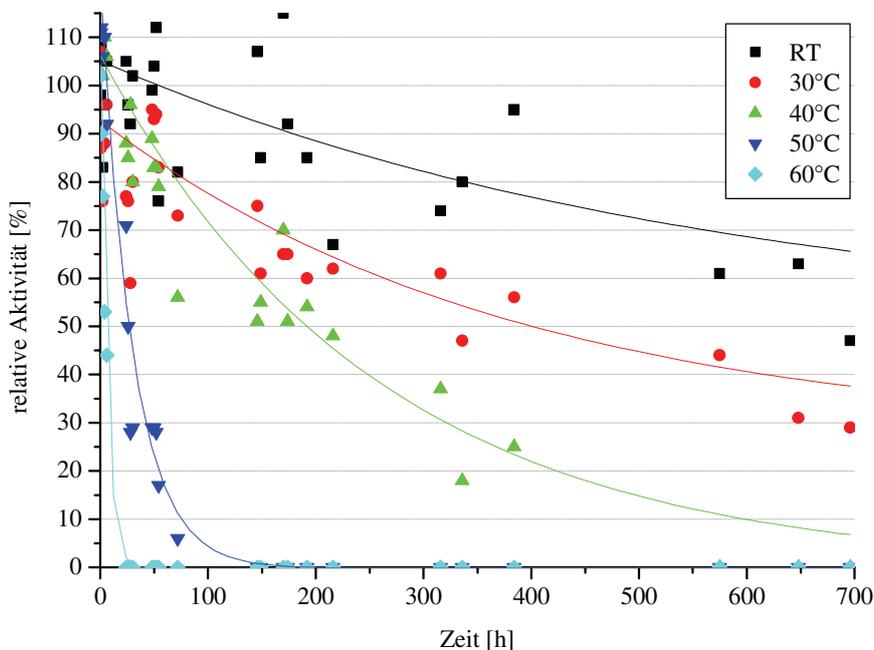
#### Bestimmung des Temperatur-Optimums



**Abb. 45: Temperatur-Optimum der *ApPDCE469G*-Variante.** Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte bei pH 6,5 mittels direkten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.4). Die Temperaturen der einzelnen Messungen wurden variiert. Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit  $n = 3$ ;  $100\% [ApPDCE469G] = 7,4 \text{ U/mg}$ .

Die Temperatur-Erhöhung von 25°C auf 60°C hat eine Aktivitäts-Steigerung um den Faktor 3,3 zur Folge. Das Temperatur-Optimum der *ApPDCE469G*-Variante liegt unter den gewählten Bedingungen bei 60°C. Bei der *ApPDCwt* liegt das Temperatur-Optimum bei 65°C und weist einen vergleichbaren Kurvenverlauf auf (Gocke, 2007; Graf, 2005). Die Aktivierungsenergien  $E_A$  für die Decarboxylierung von Pyruvat liegt für die *ApPDCE469G*-Variante bei 29 kJ/mol und entspricht der des Wildtyp-Enzyms (27,1 kJ/mol, Graf, 2005).

Bestimmung der Temperatur-abhängigen Stabilität



**Abb. 46: Temperatur-Stabilität der *ApPDCE469G*-Variante.** Die Inkubation der Variante erfolgte 29 Tage in 50 mM Kpi-Puffer (inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) bei verschiedenen Temperaturen und einem pH-Wert von 6,5. Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte mittels indirekten Decarboxylasetest mit Pyruvat als Substrat (Kap. 3.6.3.2). Die relativen Aktivitäten sind in Prozent angegeben mit n = 3 (Standardabweichungen: 0,8 – 15,6%); Anfangsaktivitäten zum Zeitpunkt t = 0: 100% [RT; ~ 25°C] = 0,82 U/ml, 100% [30°C] = 0,98 U/ml, 100% [40°C] = 0,89 U/ml, 100% [50°C] = 0,89 U/ml und 100% [60°C] = 1,1 U/ml.

Erwartungsgemäß sinkt die Stabilität der *ApPDCE469G*-Variante mit steigender Temperatur von 0,08%/h bei 25°C auf 9,3%/h am so genannten Temperatur-Optimum.

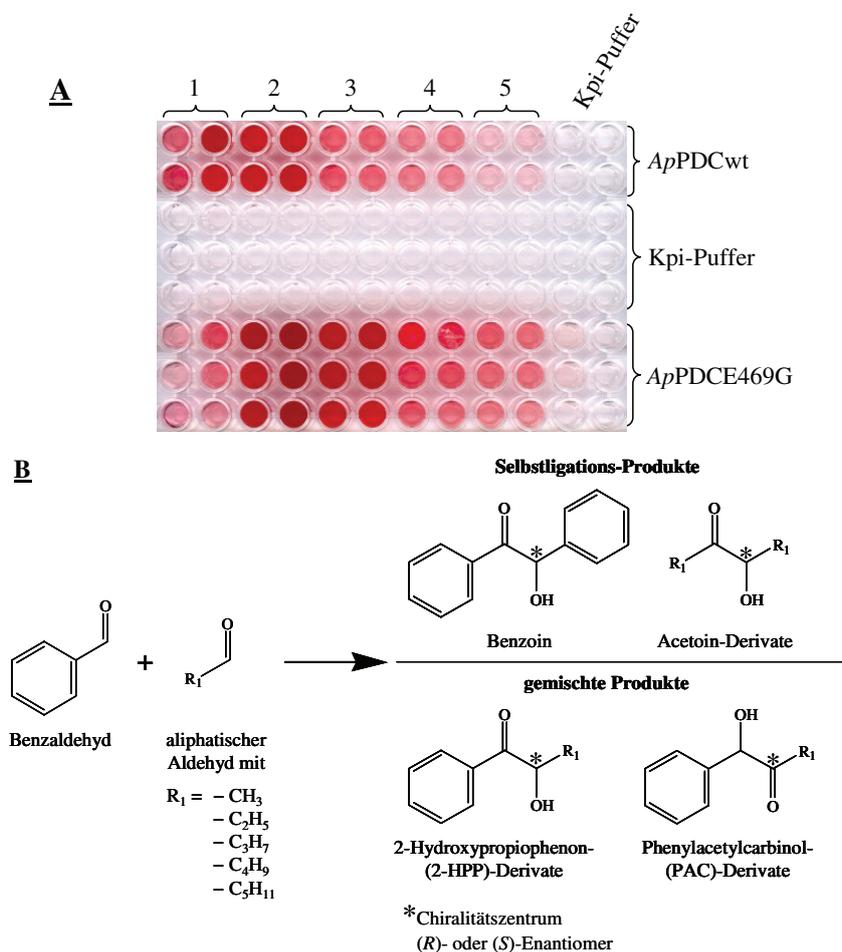
**Tab. 24: Halbwertszeiten ( $\tau_{1/2}$ ) der *ApPDCE469G*-Variante.** Die Halbwertszeiten wurden wie in Kap. 3.6.5 beschrieben berechnet.  $\tau_{1/2}$  der *ApPDCwt* wurde zu Vergleichszwecken mit aufgeführt.

| Temperatur [°C] | $\tau_{1/2}$ [h] <i>ApPDCE469G</i> | $\tau_{1/2}$ [h] <i>ApPDCwt</i> (Graf, 2005) |
|-----------------|------------------------------------|--|
| RT              | 837                                | 192 (bei 20°C)                               |
| 30              | 465                                | 144  |
| 40              | 179                                | 34   |
| 50              | 20                                 | 12   |
| 60              | 5                                  | 2  |

Von 20 h bei 50°C stieg die Halbwertszeit mit 179 h auf das 9-fache bei 40°C. Bei Temperaturen von 30°C und Raumtemperatur (RT = ~ 25°C) konnten Halbwertszeiten von 465, bzw. 837 h beobachtet werden. Auch bei dieser Variante scheint der Einfluss der Mutation keinen drastischen Effekt auf die Stabilität des Enzyms auszuüben. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Temperatur-Stabilität der Variante sich gegenüber der *ApPDCwt* sogar verbessert hat.

#### **4.4.6.5 Carboligaseaktivität der *ApPDCE469D/Q/G*- und *ApPDCI468A*-Varianten**

Die Varianten wurden mittels Tetrazoliumrot- (TTC-) Test (Kap. 3.6.8) einer ersten Charakterisierung der Carboligaseaktivität unterzogen. Das Standard-Substratspektrum mit Benzaldehyd (BA), bzw. 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMB) als aromatischen Aldehyd und Acetaldehyd bis Hexanal als aliphatische Aldehyde wurde getestet. Zusätzlich wurden verzweigt-kettige aliphatische Aldehyde wie Isobutyraldehyd und Isovaleraldehyd in eine gemischte Carboligation mit BA bzw. DMB eingesetzt. Exemplarisch ist das Ergebnis des TTC-Tests der Ligation von BA und aliphatischen Aldehyden steigender Kettenlänge mittels *ApPDCE469G*-Variante im Vergleich zur *ApPDCwt* dargestellt (Abb. 47).



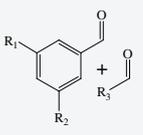
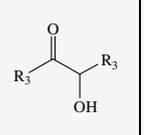
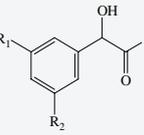
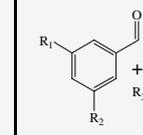
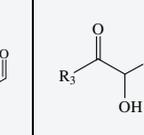
**Abb. 47: *ApPDCE469G* und *ApPDCwt*: Carboligaseaktivitäts-Screening.** **A:** Die zu untersuchenden Enzyme wurden neben einer Negativkontrolle (Kpi-Puffer) im TTC-Test auf Carboligaseaktivität hin untersucht. Als Substrate dienten Benzaldehyd (BA) und aliphatische Aldehyde in folgender Zusammensetzung: 1: BA + Acetaldehyd, 2: BA + Propanal, 3: BA + Butanal, 4: BA + Pentanal, 5: BA + Hexanal. Reaktionsbedingungen: 18 mM BA, 18 mM aliphatische Aldehyde, 50 mM Kpi-Puffer pH 7,0 mit 2,5 mM  $MgSO_4$  und 0,1 mM ThDP, 20% DMSO, 30°C, 130 UpM. Die Inkubation erfolgte 18 h mit 0,3 mg/ml gereinigtem Enzym. Die Rotfärbung erfolgte nach Zugabe der TTC-Lösung in Anwesenheit von 2-Hydroxyketonen; die Platte wurde nach 5 min gescannt. **B:** Darstellung der möglichen Produkte aus der Ligation von BA mit verschiedenen aliphatischen Aldehyden. Es können sowohl Selbstligationsprodukte, als auch gemischte Produkte entstehen (Kap. 1.4.5).

Wie aus Abb. 47 ersichtlich wird, nimmt die Produkt-Bildung im Falle der *ApPDCwt* mit zunehmender Kettenlänge des aliphatischen Aldehyds ab. Eine Überprüfung mittels TTC-Test auf Selbstligation des BA ergab, dass kein Benzoin entsteht (nicht abgebildet). Dementsprechend muss es sich bei den gebildeten 2-Hydroxyketonen um Produkte aus der Selbstligation der aliphatischen Aldehyde (Acetoin-Derivate) oder um gemischte Produkte (PAC- oder 2-HPP-Derivate) handeln (Abb. 47). Anhand vorangegangener Untersuchungen der

*ApPDCW388A/I*-Varianten (Kap. 4.4.3.4) konnte bereits gezeigt werden, dass die *ApPDC* lediglich aliphatische Donoraldehyde akzeptiert und so die Bildung von Benzoin und des 2-HPP-Derivates wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Im TTC-Test zeigte die *ApPDCE469G*-Variante relativ gesehen zum Wildtyp-Enzym eine Verbesserung der Produktbildung für längerkettige aliphatische Aldehyde. So ist der Umsatz von BA mit Propanal und Butanal im Vergleich zur *ApPDCwt* offensichtlich höher (Abb. 47). Die Ligation von Pentanal, bzw. Hexanal mit BA scheint mittels *ApPDCE469G*-Katalyse ebenfalls optimaler zu verlaufen. Weitere Untersuchungen bezüglich des Carboligationspotenzials der *ApPDC*-Varianten, die im Bereich der Akzeptor-Bindestelle eine Mutation tragen, wurden mittels NMR- und chiraler HPLC in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität durchgeführt (Tab. 25).

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

**Tab. 25: Untersuchung der Carboligaseaktivität der *ApPDCE469D/Q/G*- und *ApPDCI468A*-Varianten.** Relative Produktumsätze (in mol%, NMR) und Enantiomerenüberschüsse (*ee*, chirale HPLC) der Produkte der Ligation verschiedener Aldehyde. Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit 0,3 mg/ml Enzym in 50 mM Kpi-Puffer inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 % DMSO bei pH 7,0 und 30°C mit äquimolaren Aldehydkonzentrationen [18 mM] über 72 h durchgeführt. (n.d. = nicht detektierbar; - = kein Daten; <sup>a</sup> = 180 mM Acetaldehyd und 18 mM Benzaldehyd; <sup>b</sup> = semipräparativer Ansatz (15 ml)).

|                  |                       |  |  |  |                      |  |                  |  |  |
|---|-----------------------|---|--|---|----------------------|---|------------------|--|--|
| Produkte  | Acetoin-Derivate      | PAC-Derivate  | Produkte   | Acetoin-Derivate  | PAC-Derivate         | Produkte  | Acetoin-Derivate | PAC-Derivate   |  |
| <b>A</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>               | <i>ApPDCwt</i>        |   | <b>D</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | <i>ApPDCwt</i>  |                      |   |                  |  |  |
|   | 7%; <i>ee</i> n.d.    | 17%; 93% ( <i>R</i> )   |  | 2%; <i>ee</i> n.d.  | 2%; 85% ( <i>R</i> ) |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469D</i>     |   |  | <i>ApPDCE469D</i>   |                      |   |                  |  |  |
|   | 8%; <i>ee</i> n.d.    | 10%; 94% ( <i>R</i> )   |  | 7%; <i>ee</i> n.d.  | -                    |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469Q</i>     |   |  | <i>ApPDCE469Q</i>   |                      |   |                  |  |  |
|   | -                     | -   |  | -   | -                    |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469G</i>     |   |  | <i>ApPDCE469G</i>   |                      |   |                  |  |  |
|   | -                     | 2%; 61% ( <i>S</i> )<br>30%; 45% ( <i>S</i> ) <sup>a</sup>                        |  | 29%; <i>ee</i> n.d.   | < 2%; <i>ee</i> n.d. |   |                  |  |  |
| <i>ApPDCI468A</i>   |                       | <i>ApPDCI468A</i>   |  |   |                      |   |                  |  |  |
| 5,5%; <i>ee</i> n.d.  | 3%; <i>ee</i> n.d.    | 12%   | 41%; 94% ( <i>R</i> )  |   |                      |   |                  |  |  |
| <b>B</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | <i>ApPDCwt</i>        |   | <b>E</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | <i>ApPDCwt</i>  |                      |   |                  |  |  |
|   | 3%; <i>ee</i> n.d.    | 7%; 96% ( <i>R</i> )  |  | 7%; <i>ee</i> n.d.  | 1%; <i>ee</i> n.d.   |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469D</i>     |   |  | <i>ApPDCE469D</i>   |                      |   |                  |  |  |
|   | -                     | < 1%; <i>ee</i> n.d.  |  | 13%; <i>ee</i> n.d.   | 0,2%; <i>ee</i> n.d. |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469Q</i>     |   |  | <i>ApPDCE469Q</i>   |                      |   |                  |  |  |
|   | -                     | 5%; 99% ( <i>R</i> )  |  | -   | -                    |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469G</i>     |   |  | <i>ApPDCE469G</i>   |                      |   |                  |  |  |
|   | 9%; <i>ee</i> n.d.    | 33%; 89% ( <i>S</i> )<br>55%; 90% ( <i>S</i> ) <sup>b</sup>                       |  | 38%; <i>ee</i> n.d.   | 3%; 92% ( <i>R</i> ) |   |                  |  |  |
| <i>ApPDCI468A</i>   |                       | <i>ApPDCI468A</i>   |  |   |                      |   |                  |  |  |
| 1%; <i>ee</i> n.d.  | 2%; <i>ee</i> n.d.    | 12%   | 17%; <i>ee</i> n.d.  |   |                      |   |                  |  |  |
| <b>C</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> | <i>ApPDCwt</i>        |   | <i>ApPDCwt</i>   |   |                      |   |                  |  |  |
|   | 4%; <i>ee</i> n.d.    | 7%; 92% ( <i>R</i> )  | <i>ApPDCwt</i>   |   |                      |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469D</i>     |   | <i>ApPDCE469D</i>  |   |                      |   |                  |  |  |
|   | -                     | -   | <i>ApPDCE469D</i>  |   |                      |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469Q</i>     |   | <i>ApPDCE469Q</i>  |   |                      |   |                  |  |  |
|   | -                     | -   | <i>ApPDCE469Q</i>  |   |                      |   |                  |  |  |
|   | <i>ApPDCE469G</i>     |   | <i>ApPDCE469G</i>  |   |                      |   |                  |  |  |
|   | 31%; <i>ee</i> n.d.   | 20%; 85% ( <i>S</i> )<br>21%; 86% ( <i>S</i> ) <sup>b</sup>                       | <i>ApPDCE469G</i>  |   |                      |   |                  |  |  |
| <i>ApPDCI468A</i>   |                       | <i>ApPDCI468A</i>   |  |   |                      |   |                  |  |  |
| 0%  | 40%; 96% ( <i>R</i> ) | <i>ApPDCI468A</i>   |  |   |                      |   |                  |  |  |

Die *ApPDCwt* katalysiert die Ligation von Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (**A**) zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) lediglich mit einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 93%. Entsprechende Synthesen mit der *ZmPDCwt* führen zu einem *ee* von > 98% (Pohl *et al.*, 1998). Man kann dieses Ergebnis bereits dahingehend deuten, dass ein geringer Anteil an (*S*)-PAC bereits mit dem Wildtyp-Enzym der *ApPDC* gebildet wird. Obwohl die *S*-Tasche

hier durch das Glutamat 469 größtenteils blockiert ist, kann es aufgrund der Flexibilität der Proteinstruktur durchaus zur Ausrichtung des aromatischen Rings des Benzaldehyds in Richtung der *S*-Tasche kommen. Durch den Austausch von Glutamat zu Glycin in der Variante *Ap*PDCE469G wurde das zu (*R*)-PAC komplementäre (*S*)-PAC mit einem *ee* von 61% synthetisiert. Die *S*-Tasche der *Ap*PDCE wurde durch zielgerichtete Mutagenese so vergrößert, dass der aromatische Ring des BA in der *S*-Tasche Platz findet. Interessanterweise konnte der Umsatz durch eine Erhöhung der Acetaldehyd-Konzentration auf 180 mM von 2% auf 30% gesteigert werden. So zeigen diese Ergebnisse, dass durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen eine Verbesserung der Umsätze erzielt werden kann. Allerdings hat dies eine Erniedrigung des *ee*-Wertes für (*S*)-PAC auf 45% zur Folge. Durch den Austausch des E469 zu Aspartat (*Ap*PDCE469D) ergab sich kein signifikanter Unterschied zur *Ap*PDCEwt und die Glutamin-Variante (*Ap*PDCE469Q) erwies sich als inaktiv in der Carboxylierung.

Mit zunehmender Kettenlänge des aliphatischen Aldehyds verändert sich der *ee* bei der (*R*)-PAC-Synthese der *Ap*PDCEwt nicht, allerdings sinkt der Umsatz. Im Gegensatz dazu kann bei der *Ap*PDCE469G-katalysierten Ligation von BA mit Propanal (**B**), bzw. Butanal (**C**) ein Anstieg des Umsatzes verzeichnet werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus dem TTC-Test (Abb. 47). Der *ee* ist bei beiden Reaktionen ebenfalls gestiegen: BA + Propanal: 89% und BA + Butanal: 85%.

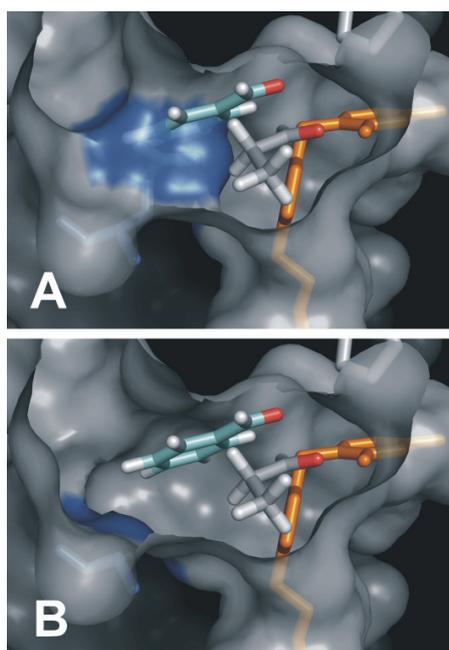
Wird die Seitenkette des aliphatischen Aldehyds weiter verlängert sinkt der Umsatz für PAC. Jedoch nimmt die Synthese von Acetoin-Derivaten zu (**D** und **E**). Bereits bei der Ligation von BA und Butanal (**C**) wurde ein Umsatz von 31% für das Selbstligationsprodukt detektiert. Die Ligation von BA und Isovaleraldehyd führte mittels *Ap*PDCE469G-Variante mit einem Umsatz von 33% zur Bildung des Selbstligationsproduktes von Isovaleraldehyd (nicht abgebildet). Die Bildung des gemischten PAC-Derivates konnte lediglich mit 2% Umsatz nachgewiesen werden. Durch die Öffnung des Zugangs zur *S*-Tasche durch die *Ap*PDCE468A-Variante wurde keine Synthese von (*S*)-PAC ermöglicht. Im Gegensatz dazu lässt sich eine Steigerung des *ee* für (*R*)-PAC im Vergleich zur *Ap*PDCEwt erkennen (**C** und **D**). Demzufolge könnte es sein, dass die Synthese von (*S*)-PAC durch das Vorhandensein von Isoleucin in Position 468 positiv beeinflusst wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der *Ap*PDCE469G-Variante um den ersten Biokatalysator für die Synthese von (*S*)-PAC-Derivaten handelt.

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

Eine mögliche Erklärung für die Bildung von (*S*)-PAC-Derivaten durch die *Ap*PDCE469G-Variante kann anhand struktureller Daten und Modellierungen gegeben werden. In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Knoll von der Universität Stuttgart konnten die räumlichen Verhältnisse des aktiven Zentrums der *Ap*PDCE469G-Variante veranschaulicht werden (Abb. 48).



**Abb. 48: Strukturelles Modell des aktiven Zentrums der *Ap*PDCwt (A) und der *Ap*PDCE469G-Variante (B).** Die Substrate Propanal (grau) und Benzaldehyd (BA, hellblau) wurden in das aktive Zentrum modelliert. Propanal ist an das C2-Atom des ThDP (orange) gebunden und fungiert als Donoraldehyd. BA ist der Akzeptoraldehyd. Das mögliche Produkt ist ein Phenylacetylcarbinol-Derivat. (Diese Bilder wurden von Dr. Michael Knoll erstellt).

In Abb. 48 ist Propanal am C2-Atom des ThDP gebunden und fungiert als Donoraldehyd. Die Seitenkette des Propanals zeigt in Richtung Substratkanal. Das Benzaldehyd-Molekül wurde so in das aktive Zentrum modelliert, dass die aromatische Seitenkette antiparallel zu der des Propanals liegt. Aus dieser Anordnung kann das (*S*)-PAC-Derivat entstehen (Kap. 1.4.6).

In Abb. 48 A ist der sterische Bereich, den die Aminosäure Glutamat in Position 469 beeinflusst, blau dargestellt. Der aromatische Ring des Benzaldehyds würde in diesen Bereich eintauchen. Aus diesem Grund ist die Bildung des (*S*)-PAC-Derivates in der *Ap*PDCwt unwahrscheinlich. Dass es trotzdem zu einem geringen Anteil auch beim Wildtyp-Enzym gebildet wird, zeigt der erniedrigte *ee*-Wert für (*R*)-PAC (Kap. 4.4.6.5). Der geringe Anteil

des (*S*)-PAC-Derivates kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass das aktive Zentrum keine starre Konformation besitzt, sondern ständig in Bewegung ist und so zu geringen Anteilen (*S*)-Produkt führen kann.

In Abb. 48 B wurde der Bereich der *S*-Tasche durch einen Aminosäureaustausch von Glutamat 469 zu Glycin verändert. Die Seitenkette des Glutamats wurde auf ein Wasserstoff-Atom reduziert und öffnet so die *S*-Tasche. Anhand des Modells ist klar zu erkennen, dass in diesem Fall ausreichend Platz für den aromatischen Ring des Benzaldehyds vorhanden ist.

Interessanterweise wurde jedoch der Weg zur Synthese von (*R*)-Produkten in der *Ap*PDCE469G-Variante nicht versperrt, so dass die Bildung von racemischem PAC-Produkt erwartet werden könnte. Das dies nicht passiert ist liegt wahrscheinlich an der optimalen Stabilisierung des aromatischen Ringsystems in der *S*-Tasche. Dementsprechend stellt die antiparallele Anlagerung des Akzeptoraldehyds den bevorzugten Weg dar.

Allgemein können (*S*)-PAC-Derivate zugänglich gemacht werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure Isoleucin in Position 468 (Eingang zur *S*-Tasche) keine sterische Hinderung darstellt, sondern eher einen positiven Einfluss ausübt (Aminosäure A<sub>2</sub>, Abb. 12).

#### 4.4.7 Fazit: Erstmalige enzymatische Synthese von (*S*)-Phenylacetylcarbinol möglich

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die 2-Hydroxyketon-*Toolbox* nicht nur durch die Vergrößerung des Substratspektrums für die Synthese von (*S*)-2-HPP-Derivaten (Kap. 4.2.2.4), sondern zusätzlich durch die erstmalige enzymatische Synthese von (*S*)-PAC-Derivaten, erweitert werden (Abb. 49).

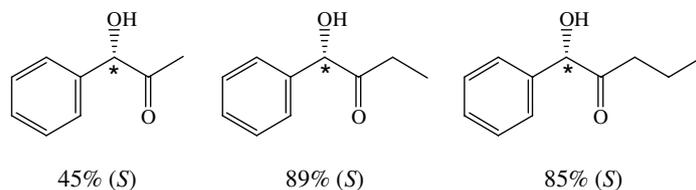


Abb. 49: Erstmals enzymatisch zugängliche (*S*)-PAC-Derivate. Die *ee*-Werte sind angegeben.

Die *S*-Tasche der *Ap*PDCC wurde mittels gerichteter Mutagenese vergrößert, so dass die aromatische Seitenkette des Benzaldehyds nun optimal hineinpasst. So konnten insbesondere

für die Ligation von Benzaldehyd und längerkettigen aliphatischen Aldehyden, wie Propanal und Butanal (*S*)-2-PAC-Derivate mit guten Enantiomerenüberschüssen zugänglich gemacht werden.

#### 4.5 Kombination struktureller und funktionaler Informationen der *ApPDC*

Zwei Aminosäure-Positionen im aktiven Zentrum der *ApPDC* wurden kombiniert und die daraus resultierende Doppelvariante wurde in Bezug auf die Decarboxylase- und Carboligaseaktivität untersucht. Die in Kapitel 4.4.3.1 ff. beschriebene Variante *ApPDCW388A* wurde mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Variante *ApPDCE469G* kombiniert. Auf diese Weise wurden zwei Wege zur Synthese von (*S*)-2-Hydroxyketonen miteinander verbunden. Das Decarboxylase-Substratspektrum zeigte, dass die Doppelvariante weiterhin Pyruvat als Hauptsubstrat bevorzugt. Anhand der kinetischen Parameter wird deutlich, dass die Kombination beider Mutationen zu einer extremen Verringerung des  $V_{\max}$ -Wertes für Pyruvat führt (Tab. 26). Vorrangig wird diese Verringerung durch die Mutation E469G hervorgerufen, wie anhand des  $V_{\max}$ -Wertes der *ApPDCE469G*-Variante ersichtlich wird.

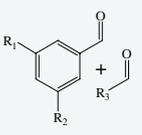
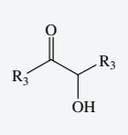
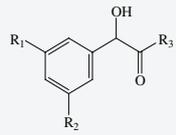
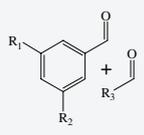
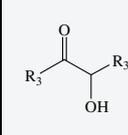
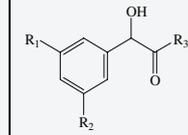
**Tab. 26: Pyruvat-Kinetik der *ApPDCW388A/E469G*.** Als Referenz-Werte wurden die kinetischen Parameter der Einzelvarianten und der *ApPDCwt* mit aufgelistet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten erfolgte bei pH 6,5 und 30°C mittels indirekten Decarboxylaseaktivitätstest mit Pyruvat als Substrat [0,05 – 50 mM] (Hilfsenzym: HL-ADH) (Kap. 3.6.7) und n = 3. Die Auswertung erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Programms Origin 7.0.

| Enzym<br>(Referenz)   | $V_{\max}$<br>[U/mg]   | $K_M$<br>[mM]   |
|---|--|---|
| <i>ApPDCwt</i><br>(Raj <i>et al.</i> , 2002) <sup>a</sup><br>(Gocke, 2007) <sup>b</sup> | 97 (pH 5,0) <sup>a</sup><br>79 (pH 7,0) <sup>a</sup><br>110 ± 1,9 <sup>b</sup> | 0,35 (pH 5,0) <sup>a</sup><br>5,1 (pH 7,0) <sup>a</sup><br>2,8 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| <i>ApPDCW388A/E469G</i><br>(diese Arbeit)   | 0,49 ± 0,01  | 1,193 ± 0,135   |
| <i>ApPDCW388A</i><br>(Gerhards, 2009)   | 58,9 ± 1,7   | 5,8 ± 0,4   |
| <i>ApPDCE469G</i><br>(diese Arbeit)   | 2,07 ± 0,103   | 8,009 ± 1,083   |

Die spezifischen Aktivitäten gegenüber Pyruvat fielen mit < 1 U/mg sehr gering aus. Anhand eines Decarboxylase-Substratspektrums konnte gezeigt werden, dass die spezifischen Aktivitäten gegenüber anderen Substraten im Bereich von ≤ 0,1 U/mg lagen (nicht abgebildet). Aufgrund der geringen Werte war eine Interpretation des Substratspektrums nicht möglich.

Die Daten bezüglich der Carboligaseaktivität der *ApPDCW388A*-Variante (Kap. 4.4.3.4) resultierten in einer Hypothese über einen zweiten Weg zur Synthese von (*S*)-2-Hydroxyketonen (Kap. 4.4.4). Die Kombination mit der Variante *ApPDCE469G* könnte auf der einen Seite zu einer Verbesserung der Synthese von (*S*)-PAC-Derivaten führen, oder aber zu einer Verschlechterung der Enantioselektivität aufgrund zu starker Veränderungen im aktiven Zentrum. Analysen mittels instrumenteller Analytik ergaben, dass die zweite Möglichkeit eintrat (Tab. 27).

**Tab. 27: Untersuchung der Carboligaseaktivität der *ApPDCW388A/E469G*-Variante.** Relative Produktumsätze (in mol%, NMR) und Enantiomerenüberschüsse (*ee*, chirale HPLC) der Produkte der Ligation verschiedener Aldehyde. Als Referenz wurden der *ApPDCwt* und die Einzelvarianten mit aufgeführt. Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit 0,3 mg/ml Enzym in 50 mM Kpi-Puffer inklusive 0,1 mM ThDP und 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 % DMSO bei pH 7,0 und 30°C mit äquimolaren Aldehydkonzentrationen [18 mM] über 72 h durchgeführt. (n.d. = nicht detektierbar; - = kein Daten; <sup>a</sup> = 180 mM Acetaldehyd und 18 mM Benzaldehyd; <sup>b</sup> = semipräparativer Ansatz (15 ml)).

|                 |  |  |                  |  |  |
|---|--|--|--|---|--|
| Produkte  | Acetoin-Derivate   | PAC-Derivate   | Produkte   | Acetoin-Derivate  | PAC-Derivate   |
| <b>A</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>               | <i>ApPDCwt</i>   |  | <b>D</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | <i>ApPDCwt</i>  |  |
|   | 7%; <i>ee</i> n.d.   | 17%; 93% ( <i>R</i> )  |  | 2%; <i>ee</i> n.d.  | 2%; 85% ( <i>R</i> )   |
|   | <i>ApPDCW388A</i>  |  |  | <i>ApPDCW388A</i>   |  |
|   | 11%; <i>ee</i> n.d.  | 62%; 84% ( <i>R</i> )  |  | 3%; <i>ee</i> n.d.  | 1%; 69% ( <i>R</i> )   |
|   | <i>ApPDCE469G</i>  |  |  | <i>ApPDCE469G</i>   |  |
|   | -  | 2%; 61% ( <i>S</i> )   |  | 29%; <i>ee</i> n.d.   | < 2%; <i>ee</i> n.d.   |
|   | -  | 30%; 45% ( <i>S</i> ) <sup>a</sup>   |  | <i>ApPDCW388A/E469G</i>   |  |
| <i>ApPDCW388A/E469G</i>   |  | <i>ApPDCW388A/E469G</i>  |  |   |  |
| -   | < 2%; <i>ee</i> n.d.   | 12%; <i>ee</i> n.d.  | 41%; 94% ( <i>R</i> )  |   |  |
| <b>B</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | <i>ApPDCwt</i>   |  | <b>E</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | <i>ApPDCwt</i>  |  |
|   | 3%; <i>ee</i> n.d.   | 7%; 96% ( <i>R</i> )   |  | 7%; <i>ee</i> n.d.  | 1%; <i>ee</i> n.d.   |
|   | <i>ApPDCW388A</i>  |  |  | <i>ApPDCW388A</i>   |  |
|   | 6%; <i>ee</i> n.d.   | 18%; 50% ( <i>R</i> )  |  | -   | 2%; 20% ( <i>R</i> )   |
|   | <i>ApPDCE469G</i>  |  |  | <i>ApPDCE469G</i>   |  |
|   | 9%; <i>ee</i> n.d.   | 33%; 89% ( <i>S</i> )<br>55%; 90% ( <i>S</i> ) <sup>b</sup>                        |  | 38%; <i>ee</i> n.d.   | 3%; 92% ( <i>R</i> )   |
|   | <i>ApPDCW388A/E469G</i>  |  |  | <i>ApPDCW388A/E469G</i>   |  |
| 6,5%; <i>ee</i> n.d.  | 12%; 23% ( <i>S</i> )  | 11%; <i>ee</i> n.d.  | 17%; <i>ee</i> n.d.  |   |  |
| <b>C</b><br>R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H<br>R <sup>3</sup> = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> | <i>ApPDCwt</i>   |  |  |   |  |
|   | 4%; <i>ee</i> n.d.   | 7%; 92% ( <i>R</i> )   |  |   |  |
|   | <i>ApPDCW388A</i>  |  |  |   |  |
|   | 7%; <i>ee</i> n.d.   | 7%; 29% ( <i>S</i> )   |  |   |  |
|   | <i>ApPDCE469G</i>  |  |  |   |  |
|   | 31%; <i>ee</i> n.d.  | 20%; 85% ( <i>S</i> )<br>21%; 86% ( <i>S</i> ) <sup>b</sup>                        |  |   |  |
|   | <i>ApPDCW388A/E469G</i>  |  |  |   |  |
| 20%; <i>ee</i> n.d.   | 6%; 37% ( <i>S</i> )   |  |  |   |  |

## ERGEBNISSE & DISKUSSION

---

Durch die Kombination beider Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum der *ApPDC* wurden die sterischen Gegebenheiten so stark beeinflusst, dass keine enantioselektive Synthese mehr erfolgen konnte. So führte die Ligation von Benzaldehyd mit Propanal, bzw. Butanal lediglich zu einem sehr geringen Enantiomerenüberschuss für das (*S*)-PAC-Derivat (*ee*: 23%, bzw. 37%; Tab. 27).

Bedingt durch die Öffnung des aktiven Zentrums in zwei Positionen ist ein bevorzugter Weg zur Bildung von (*R*)- oder (*S*)-enantiomeren 2-Hydroxyketonen nicht mehr gegeben. So konnte die oft genutzte Erklärung einer optimalen Stabilisierung von Substraten bedingt durch sterische Gegebenheiten im aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme bestätigt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei Wege zur Erweiterung einer *Toolbox* von Thiamindiphosphat- (ThDP)-abhängigen Enzymen verfolgt. Der erste Weg bestand in der Klonierung, Expression und Charakterisierung von potentiellen ThDP-abhängigen Enzymen, die anhand von Sequenzinformationen aus entsprechenden Datenbanken ausgewählt wurden. Leider zeigten weder die beiden potentiellen Benzaldehydlyasen aus *Silicibacter pomeroyi* (*SpBAL*) und *Francisella philomiragia* spp. *philomiragia* (*FpBAL*) noch die potentielle Benzoylformiatdecarboxylase aus *Chromobacterium violaceum* (*CvBFD*) Lyaseaktivität gegenüber Benzoin oder ausgewählten 2-Ketosäuren. Jedoch kann eine potentielle Aktivität dieser Enzyme nicht komplett ausgeschlossen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass das passende Substrat noch nicht getestet wurde oder dass die Reaktionsbedingungen nicht adäquat für das Enzym waren. Eine Carboligaseaktivität konnte bisher lediglich bei der *SpBAL* in einem kolorimetrischen TTC-Test detektiert werden. Eine hohe Aktivität wurde bei der Ligation von Benzaldehyd als Donor mit Butanal, bzw. Pentanal als Akzeptor festgestellt. Dies könnte ein Hinweis auf ein größeres aktives Zentrum als bei der bekannten Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* sein. Weiterführende Analysen zur Chemo- und Enantioselektivität und des allgemeinen katalytischen Potentials der *SpBAL*, welche derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Freiburg durchgeführt werden, werden zeigen ob dieses Enzym nützlich für die *Toolbox* ist.

Der zweite Weg bestand in der Optimierung von zwei bereits gut charakterisierten Enzymen, der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*PpBFD*) und der Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus* (*ApPDC*). Ziel war eine verbesserte Zugänglichkeit (*S*)-enantiomerer 2-Hydroxyketone, durch die Optimierung fast ausschließlich (*R*)-selektiver ThDP-abhängiger Enzyme.

Auf der Grundlage einer Kartierung der sterischen Bedingungen in den aktiven Zentren (Kap. 1.4.6.1) (Gocke *et al.*, 2008) wurden gezielt Positionen für Aminosäureaustausche im Bereich der Donor- und Akzeptor-Bindestelle ausgewählt und teilweise in Doppelvarianten kombiniert. Die Varianten wurden ausführlich sowohl bezüglich der Decarboxylaseaktivität als auch hinsichtlich der Carboligaseaktivität charakterisiert.

Neben kaum veränderten pH- und Temperatur-Optima im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen wiesen alle untersuchten *PpBFD*- und *ApPDC*-Varianten eine exzellente Stabilität bei

verschiedenen pH-Werten und Temperaturen über einen Zeitraum von mehreren Tagen auf. Die Analyse der Decarboxylase-Substratspektren zeigte geringe Veränderung gegenüber der *ApPDC*wt. Bei den Varianten *ApPDC*W388A/I, bei denen die Donor-Bindestelle vergrößert wurde, konnten 19-fach (W388A), bzw. 6-fach (W388I) höhere Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten mit länger-kettigen 2-Ketosäuren wie 2-Keto-5-phenyl-pentansäure beobachtet werden. Ähnliches fiel bei der *ApPDC*I468A-Variante auf, welche 2-Ketopentansäure besser umsetzt als Pyruvat. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass durch die Vergrößerung des aktiven Zentrums der *ApPDC* durch nur einen Aminosäureaustausch sterisch anspruchsvollere 2-Ketosäuren als Substrat akzeptiert werden können.

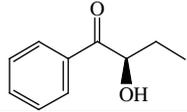
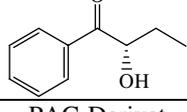
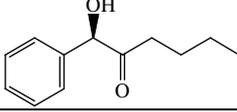
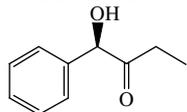
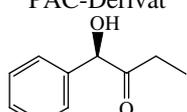
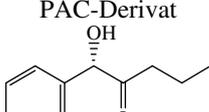
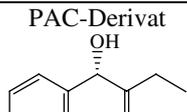
Die kinetischen Parameter der *ApPDC*-Varianten zeigten, dass die spezifischen Aktivitäten allgemein geringer waren als beim Wildtyp-Enzym. Der Austausch einer Aminosäure im Bereich der Akzeptor-Bindestelle der *PpBFDL*461G-Variante (12% spezifische Aktivität) so wie in den *ApPDCE*469D/Q/G-Varianten (0,2 – 1,8% spezifische Aktivität) zeigte die stärksten Auswirkungen auf die Decarboxylaseaktivität.

### Zugang zu neuen (S)-2-Hydroxyketonen

Basierend auf Vorarbeiten zur Vergrößerung der *S*-Tasche in der *PpBFD* durch eine Mutation von Leucin 461 zu Alanin (Gocke *et al.*, 2008), konnte durch eine weitere Vergrößerung der *S*-Tasche und eine Anhebung des pH-Wertes auf pH 7,9 der Enantiomerenüberschuss für das (S)-2-HPP-Derivat aus Benzaldehyd und Propanal beispielsweise von 93% (*PpBFDL*461A) auf 97% (*PpBFDL*461G) gesteigert werden (Tab. 28).

Zusätzlich konnten neben verschiedenen neuen (S)-2-HPP-Derivaten erstmals (S)-PAC-Derivate über den Weg der enzymatischen Synthese zugänglich gemacht werden (Abb. 50). Hierfür wurde das *S*-Taschen-Konzept der *PpBFD* erfolgreich auf die *ApPDC* übertragen. Bemerkenswerterweise war der Austausch von nur einer Aminosäure ausreichend um die Enantioselektivität der *ApPDC* von (*R*) zu (*S*) zu verändern. So führt der Einsatz der *ApPDCE*469G-Variante bei der Ligation von Benzaldehyd mit Propanal zu (*S*)-PAC-Derivat (*ee* 90%, Tab. 28), wohingegen die *ApPDC*wt (*R*)-selektiv ist (*ee* 96%, Tab. 28).

**Tab. 28: Ausgewählte Carboligasereaktionen verschiedener Enzyme.** Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Reaktionen mit 0,3 mg/ml Enzym bei pH 7,0, 30°C und 130  $\mu$ M durchgeführt (Reaktionszeit: 72 h). BA = Benzaldehyd; 2-HPP = 2-Hydroxypropiophenon; PAC = Phenylacetylcarbinol; *ee* = Enantiomerenüberschuss; \* = pH 7,9. Für Details wird auf die jeweiligen Kapitel aus dem Ergebnis- und Diskussionsteil verwiesen.

| Enzym                    | Reaktion       | Produkt   | <i>ee</i>        |
|--------------------------|----------------|---|------------------|
| <i>Pp</i> BFDwt          | BA + Propanal  | 2-HPP-Derivat<br> | 21% ( <i>R</i> ) |
| <i>Pp</i> BFDL461G       | BA + Propanal* | 2-HPP-Derivat<br> | 97% ( <i>S</i> ) |
| <i>Pp</i> BFDL461G/H281A | BA + Pentanal  | PAC-Derivat<br>   | 15% ( <i>R</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCwt          | BA + Propanal  | PAC-Derivat<br>  | 96% ( <i>R</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCW388A       | BA + Propanal  | PAC-Derivat<br> | 50% ( <i>R</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCW388A       | BA + Butanal   | PAC-Derivat<br> | 29% ( <i>S</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCE469G       | BA + Propanal  | PAC-Derivat<br> | 90% ( <i>S</i> ) |

Neben dem *S*-Taschen-Konzept wurden sowohl in der *Pp*BFD, als auch in der *Ap*PDC Hinweise auf einen alternativen (*S*)-Weg gefunden. Neben der antiparallelen Anlagerung des Akzeptoraldehyds über die *S*-Tasche kann eine parallele Anlagerung von der anderen Seite ebenfalls zu (*S*)-Produkten führen (Kap. 4.4.3.4, Abb. 42). Der Rückseitenangriff ist aufgrund sterischer Hinderungen in der *Ap*PDCwt nicht möglich. Ausreichend Platz ist in folgenden Varianten vorhanden: *Pp*BFDL461G/H281A (*ee* 15% für (*R*)-PAC-Derivat aus Benzaldehyd

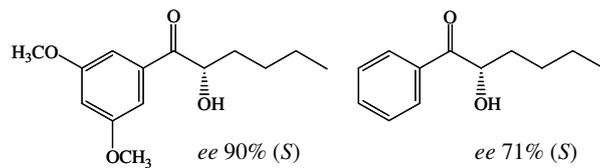
## ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

---

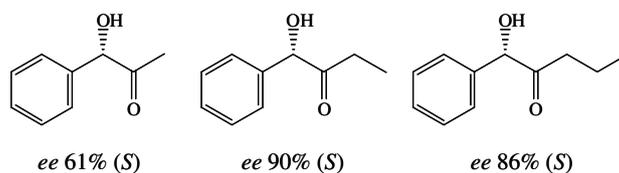
und Pentanal) und *ApPDCW388A* (*ee* 29% für (*S*)-PAC-Derivat aus Benzaldehyd und Butanal) (Gerhards, 2009).

### Zugang zu neuen (*S*)-2-Hydroxyketonen

Neue (*S*)-2-HPP-Derivate mittels *PpBFD*-Varianten



Neue (*S*)-PAC-Derivate mittels *ApPDC*-Varianten



**Abb. 50:** Mittels *PpBFD*-Varianten konnte das Spektrum an (*S*)-2-HPP-Derivaten erweitert werden. Der Einsatz von *ApPDC*-Varianten führte erstmalig zu einer enzymatischen Synthese verschiedener (*S*)-PAC-Derivate.

## 6 Conclusion and Outlook

In this dissertation two ways for the expansion of a toolbox of thiamine diphosphate-(ThDP)-dependent enzymes were studied. The first approach contained the cloning, expression and characterization of potential enzymes, which were selected from databases according to sequence homology to other ThDP-dependent enzymes. Neither the enzymes of *Silicibacter pomeroyi* (*SpBAL*) and *Francisella philomiragia* spp. *philomiragia* (*FpBAL*) which were annotated as putative benzaldehyde lyases, nor the putative benzoylformate decarboxylase from *Chromobacterium violaceum* (*CvBFD*), showed any lyase activity towards benzoin or 2-keto acids. However, a potential activity of these enzymes cannot generally be excluded, since there is the possibility that the matching substrates were not tested or the reaction conditions were not appropriate for these enzymes. Until now carboligase activity could only be shown with *SpBAL* using the colorimetric TTC-test, suggesting especially high activity for the carboligation of benzaldehyde as donor with butanal or pentanal as acceptors, which may hint to a larger active site compared to the well known benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*). Continuative analyses regarding chemo- and enantioselectivity and catalytic potential of the new enzyme, which are currently performed in the working group of Prof. Dr. Michael Müller from the Institute of Pharmaceutical Sciences, Albert-Ludwigs-University, Freiburg, will show if *SpBAL* is a valuable new enzyme for the toolbox.

The second approach is based on the optimization of two well characterized enzymes, the benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* (*PpBFD*) and the pyruvate decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus* (*ApPDC*). The goal of this approach was to improve the accessibility for (*S*)-enantiomeric 2-hydroxy ketones, through enzyme engineering of almost exclusively (*R*)-selective ThDP-dependent enzymes.

Based on the structural mapping of the active sites (chapter 1.4.6.1) (Gocke *et al.*, 2008), specific positions were chosen for amino acid exchanges. These exchanges were all located in the area of the donor- and acceptor-binding sites and some of them were combined in double variants. All variants were characterized in detail regarding their decarboxylase- as well as their carboligase activity.

pH- and temperature-optima were only slightly changed compared to the wild type enzymes, and all variants of *PpBFD* and *ApPDC* showed an excellent stability at different pH-values and temperatures for several days. Analysis of the decarboxylase substrate spectra of the *ApPDC* variants showed almost no difference compared to the wild type enzyme. Only the

## CONCLUSION & OUTLOOK

---

variants *ApPDCW388A/I*, with a larger donor binding site, showed a 19-fold (W388A) and 6-fold (W388I) higher initial rate activity for long chain 2-keto acids like 2-keto-5-phenylpentanoic acid. Similar observations were made with the variant *ApPDCI468A*, which prefers 2-ketopentanoic acid over pyruvate. These results demonstrate that *ApPDC* may be altered by only one single amino acid exchange to accept sterically more demanding aliphatic 2-keto acids as substrates.

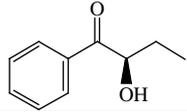
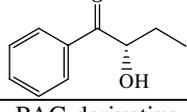
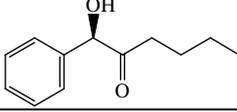
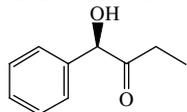
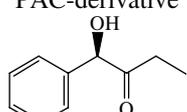
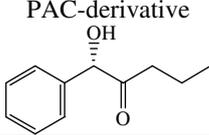
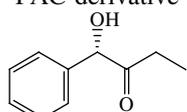
Investigation of the kinetic parameters of the *ApPDC* variants demonstrated a generally lower specific activity relative to the wild type enzyme. The amino acid exchange in the area of the acceptor binding site in the variant *PpBFDL461G* (12% specific activity) as well as in the variants *ApPDCE469D/Q/G* (0,2 – 1,8% specific activity) had the highest impact on the decarboxylase activity.

### Access to new (*S*)-2-hydroxy ketones

Based on the preliminary work to enlarge the *S*-pocket in *PpBFD* by an exchange of amino acid 461 from leucine to alanine (Gocke *et al.*, 2008), the further enlargement of the *S*-pocket of the *PpBFD* as well as a pH-adjustment to 7.9 lead to a further improvement of the enantioselectivity for (*S*)-2-HPP-derivative obtained by carbonylation of benzaldehyde and propanal (e.g. 93% for *PpBFDL461A* to 97% *PpBFDL461G*, Tab. 29).

In addition to new (*S*)-2-HPP-derivatives, new (*S*)-PAC-derivatives could be accessed by means of enzymatic synthesis for the first time (Fig. 51) by transferring the *S*-pocket concept of *PpBFD* successfully to *ApPDC*. Remarkably one amino acid exchange was sufficient to alter the enantioselectivity of *ApPDC* from (*R*) to (*S*). So the variant *ApPDCE469G* allows access to the (*S*)-PAC-derivative from the ligation of benzaldehyde with propanal with good enantioselectivity (*ee* 90%), whereas the wild type enzyme is (*R*)-selective (*ee* 96%) (Tab. 29).

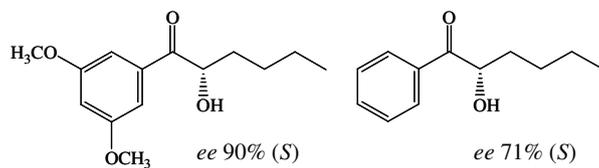
**Tab. 29: Selected carboligase reactions of different enzymes.** If not further noted, all reactions were performed with 0.3 mg/ml enzyme at pH 7.0, 30°C and 130 rpm (time of reaction 72 h). BA = benzaldehyde; 2-HPP = 2-hydroxypropiophenone; PAC = phenylacetylcarbinol; *ee* = enantiomeric excess; \* = pH 7.9. For details see corresponding section of discussion and results.

| Enzyme                   | Reaction       | Product  | <i>ee</i>        |
|--------------------------|----------------|--|------------------|
| <i>Pp</i> BFDwt          | BA + propanal  | 2-HPP-derivative<br> | 21% ( <i>R</i> ) |
| <i>Pp</i> BFDL461G       | BA + propanal* | 2-HPP-derivative<br> | 97% ( <i>S</i> ) |
| <i>Pp</i> BFDL461G/H281A | BA + pentanal  | PAC-derivative<br>   | 15% ( <i>R</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCwt          | BA + propanal  | PAC-derivative<br>  | 96% ( <i>R</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCW388A       | BA + propanal  | PAC-derivative<br> | 50% ( <i>R</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCW388A       | BA + butanal   | PAC-derivative<br> | 29% ( <i>S</i> ) |
| <i>Ap</i> PDCE469G       | BA + propanal  | PAC-derivative<br> | 90% ( <i>S</i> ) |

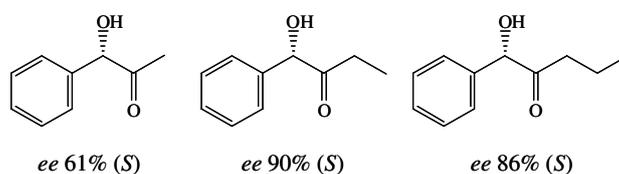
Beside the *S*-pocket concept the results also hint to an alternative way to generate (*S*)-products with variants of *Pp*BFD and *Ap*PDC, respectively. Besides the antiparallel approach of the acceptor aldehyde via the *S*-pocket a parallel approach from the alternate site also yields to (*S*)-products (chapter 4.4.3.4, Fig. 42). Whereas this backside attack is not possible in the wildtype enzyme due to steric reasons, enough space is available in appropriate variants: *Pp*BFDL461G/H281A (*ee* 15% (*R*)-PAC-derivate from pentanal and benzaldehyde) and *Ap*PDCW388A (29% *ee* (*S*)-PAC-derivate from butanal and benzaldehyde) (Gerhards, 2009).

Access to new (*S*)-2-hydroxyketones

New (*S*)-2-HPP-derivatives using *Pp*BFD-variants



New (*S*)-PAC-derivatives using *Ap*PDC-variants



**Fig 51:** Using *Pp*BFD variants the spectrum of (*S*)-2-HPP-derivatives could be enhanced. The use of *Ap*PDC variants leads for the first time to an enzymatic synthesis of divers (*S*)-PAC-derivatives.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abokitse, K. (2004).** Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Alkoholdehydrogenasen und einer Oxygenase aus *Rhodococcus* Spezies. Dissertation. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

**Adam, W., Fell, R.T., Mock-Knoblauch, C. & Saha-Möller, C.R. (1996).** Synthesis of optically active alpha-hydroxycarbonyl compounds by (Salen)Mn(III)-catalyzed oxidation of silyl enol ethers and silyl ketene acetals. *Tetrahedron Letters* **37**:6531-6534.

**Adam, W., Fell, R.T., Stegmann, V.R. & Saha-Möller, C.R. (1998).** Synthesis of optically active alpha-hydroxy carbonyl compounds by the catalytic, enantioselective oxidation of silyl enol ethers and ketene acetals with (Salen)Mn(III) complexes. *Journal of the American Chemical Society* **120**:708-714.

**Alvarez, M.E., Rosa, A.L., Temporini, E.D., Wolstenholme, A., Panzetta, G., Patrino, L. & Maccioni, H.J.F. (1993).** The 59 KDa Polypeptide Constituent of 8-10 nm Cytoplasmic Filaments in *Neurospora crassa* Is a Pyruvate Decarboxylase. *Gene* **130**:253-258.

**Amarante, G.W., Rezende, P., Cavallaro, M. & Coelho, F. (2008).** Acyloins from Morita-Baylis-Hillman adducts: an alternative approach to the racemic total synthesis of bupropion. *Tetrahedron Letters* **49**:3744-3748.

**Ansoerge-Schumacher, M.B., Greiner, L., Schroeper, F., Mirtschin, S. & Hischer, T. (2006).** Operational concept for the improved synthesis of (*R*)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase. *Biotechnol J* **1**:564-568.

**Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. & Jordan, F. (1996).** Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* **256**:590-600.

**Asano, Y. (2002).** Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis - selection and optimization of biocatalysts. *Journal of Biotechnology* **94**:65-72.

**Azerad, R. (1995).** Application of Biocatalysts in Organic-Synthesis. *Bulletin De La Societe Chimique De France* **132**:17-51.

**Barrowman, M.M. & Fewson, C.A. (1985).** Phenylglyoxylate Decarboxylase and Phenylpyruvate Decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Current Microbiology* **12**:235-239.

**Barrowman, M.M., Harnett, W., Scott, A.J., Fewson, C.A. & Kusel, J.R. (1986).** Immunological Comparison of Microbial Tpp-Dependent Nonoxidative Alpha-Keto Acid Decarboxylases. *Fems Microbiology Letters* **34**:57-60.

**Baykal, A., Chakraborty, S., Dodoo, A. & Jordan, F. (2006).** Synthesis with good enantiomeric excess of both enantiomers of alpha-ketols and acetolactates by two thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Bioorganic Chemistry* **34**:380-393.

**Berthold, C.L., Gocke, D., Wood, D., Leeper, F.J., Pohl, M. & Schneider, G. (2007).** Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carbonylation reaction. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **63**:1217-1224.

**Berzelius, J. (1836).** Jahres-Bericht über die Fortschritte der physischen Wissenschaften, pp 243 - 245. Heinrich Laupp, Tübingen.

**BMBF. (2009).** Die deutsche Biotechnologie-Branche. Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Bornemann, S., Crout, D.H.G., Dalton, H., Hutchinson, D.W., Dean, G., Thomson, N. & Turner, M.M. (1993).** Stereochemistry of the Formation of Lactaldehyde and Acetoin Produced by the Pyruvate Decarboxylases of Yeast (*Saccharomyces* Sp) and *Zymomonas mobilis* - Different Boltzmann Distributions between Bound Forms of the Electrophile, Acetaldehyde, in the 2 Enzymatic-Reactions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*:309-311.
- Bornemann, S., Crout, D.H.G., Dalton, H., Kren, V., Lobell, M., Dean, G., Thomson, N. & Turner, M.M. (1996).** Stereospecific formation of *R*-aromatic acyloins by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*:425-430.
- Brandt, G.S., Kneen, M.M., Chakraborty, S., Baykal, A.T., Nemeria, N., Yep, A., Ruby, D.I., Petsko, G.A., Kenyon, G.L., McLeish, M.J., Jordan, F. & Ringe, D. (2009).** Snapshot of a Reaction Intermediate: Analysis of Benzoylformate Decarboxylase in Complex with a Benzoylphosphonate Inhibitor. *Biochemistry* **48**:3247-3257.
- Breslow, R. (1957).** The Mechanism of Thiamine Action. 2. Rapid Deuterium Exchange in Thiazolium Salts. *Journal of the American Chemical Society* **79**:1762-1763.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R. & Zelinski, T. (2004).** Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie-International Edition* **43**:788-824.
- Breuer, M., Pohl, M., Hauer, B. & Linggen, B. (2002).** High-throughput assay of (*R*)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase. *Anal. Bioanal. Chem.* **374**:1069-1073.
- Bringer-Meyer, S., Schimz, K.L. & Sahm, H. (1986).** Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - Isolation and Partial Characterization. *Archives of Microbiology* **146**:105-110.
- Brosi, H. (2006).** Klonierung und Charakterisierung neuer Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Bruhn, H., Pohl, M., Grötzinger, J. & Kula, M.R. (1995).** The Replacement of Trp392 by Alanine Influences the Decarboxylase/Carbolygase Activity and Stability of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *European Journal of Biochemistry* **234**:650-655.
- Buchner, E. (1837).** Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. (Vorläufige Mitteilung). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **30**:117.
- Campbell, N.A. (2000).** 9. Zellatmung: Gewinnung chemischer Energie. Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin • Oxford.
- Candy, J.M. & Duggleby, R.G. (1994).** Investigation of the Cofactor-Binding Site of *Zymomonas mobilis* Pyruvate Decarboxylase by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemical Journal* **300**:7-13.
- Candy, J.M. & Duggleby, R.G. (1998).** Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1385**:323-338.
- Carey, F.A. & Sundberg, R.J. (2007).** Reactions of Carbon Nucleophiles with Carbonyl Compounds, pp. 114-125. Advanced Organic Chemistry - Part B: Reactions and Synthesis. Springer Science+Buisness Media, LLC, New York.
- Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. & Schomburg, D. (2009).** BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research* **37**:D588-D592.
- Chang, A.K., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (1999).** Aspartate-27 and glutamate-473 are involved in catalysis by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem J* **339** ( Pt 2):255-260.
- Chen, G.C. & Jordan, F. (1984).** Brewers' yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry* **23**:3576-3582.

Costelloe, S.J., Ward, J.M. & Dalby, P.A. (2008). Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family. *Journal of Molecular Evolution* **66**:36-49.

Damborsky, J. & Brezovsky, J. (2009). Computational tools for designing and engineering biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**:26-34.

Dawes, E.A., Ribbons, D.W. & Large, P.J. (1966). Route of Ethanol Formation in *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Journal* **98**:795-803.

de Almeida, D.F., Hungria, M., Guimaraes, C.T., Antonio, R.V., Almeida, F.C., de Almeida, L.G.P., de Almeida, R., Alves-Gomes, J.A., Andrade, E.M., Araripe, J., de Araujo, M.F.F., Astolfi, S., Azevedo, V., Baptista, A.J., Bataus, L.A.M., Batista, J.D., Belo, A., van den Berg, C., Bogo, M., Bonatto, S., Bordignon, J., Brigo, M.M., Brito, C.A., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Cardoso, D.D., Carneiro, N.P., Cavada, B.S., Chueire, L.M.O., Creczynski-Pasa, T.B., da Cunha, N.C., Fagundes, N., Falcao, C.L., Fantinatti, F., Farias, L.P., Felipe, M.S.S., Ferrari, L.P., Ferro, J.A., Ferro, M.T., Franco, G.R., de Freitas, N.S.A., Furlan, L.R., Gazzinelli, R.T., Gomes, E.A., Goncalves, P.R., Grangeiro, T.B., Grattapaglia, D., Grisard, E.C., Hanna, E.S., Jardim, S.N., Laurino, J., Leoi, L.C.T., Lima, L.F.A., Loureiro, M.D., de Lyra, M.D.C.P., Madeira, H.M.F., Manfio, G.P., Maranhao, A.Q., Martins, W.S., di Mauro, S.M.Z., de Medeiros, S.R.B., Meissner, R.D., Moreira, M.A.M., do Nascimento, F.F., Nicolas, M.F., Oliveira, J.G., Oliveira, S.C., Paixao, R.F.C., Parente, J.A., Pedrosa, F.D.P., Pena, S.D.J., Pereira, J.O., Pereira, M., Pinto, L.S.C., Pinto, L.D., Porto, J.I.R., Potrich, D.P., Ramalho-Neto, C.E., Reis, A.M.M., Rigo, L.U., Rondinelli, E., do Santos, E.B.P., Santos, F.R., Schneider, M.P.C., Seunanz, H.N., Silva, A.M.R., da Silva, A.L.D., Silva, D.W., Silva, R., Simoes, I.D., Simon, D., Soares, C.M.D., Soares, R.D.A., Souza, E.M., de Souza, K.R.L., Souza, R.C., Steffens, M.B.R., Steindel, M., Teixeira, S.R., et al. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:11660-11665.

de Smidt, O., du Preez, J.C. & Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *Fems Yeast Research* **8**:967-978.

Demir, A.S., Dünwald, T., Iding, H., Pohl, M. & Müller, M. (1999). Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase. *Tetrahedron-Asymmetry* **10**:4769-4774.

Demir, A.S., Pohl, M., Janzen, E. & Müller, M. (2001a). Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*:633-635.

Demir, A.S., Pohl, M., Janzen, E. & Müller, M. (2001b). Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage. *J Chem Soc Perkin Trans 1*:633-635.

Demir, A.S., Sesenoglu, O., Dunkelmann, P. & Müller, M. (2003). Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde. *Organic Letters* **5**:2047-2050.

Demir, A.S., Sesenoglu, O., Eren, E., Hosrik, B., Pohl, M., Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., Dunkelmann, P. & Müller, M. (2002). Enantioselective synthesis of alpha-hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction. *Advanced Synthesis & Catalysis* **344**:96-103.

Dickinson, F.M. & Dalziel, K. (1967). Specificities and Configurations of Ternary Complexes of Yeast and Liver Alcohol Dehydrogenases. *Biochemical Journal* **104**:165-&.

Dickinson, F.M. & Monger, G.P. (1973). Study of Kinetics and Mechanism of Yeast Alcohol-Dehydrogenase with a Variety of Substrates. *Biochemical Journal* **131**:261-270.

Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. & Lu, G.G. (1998). High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *Journal of Biological Chemistry* **273**:20196-20204.

Domínguez de Maria, P., Pohl, M., Gocke, D., Gröger, H., Trauthwein, H., Stillger, T., Walter, L. & Müller, M. (2007). Asymmetric synthesis of aliphatic 2-hydroxy ketones by enzymatic carbonylation of aldehydes. *European Journal of Organic Chemistry*:2940-2944.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Domínguez de María, P., Stillger, T., Pohl, M., Wallert, S., Drauz, K., Gröger, H., Trauthwein, H. & Liese, A. (2006).** Preparative enantio selective synthesis of benzoin and (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **38**:43-47.
- Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F. & Jaeger, K.E. (2006).** New biocatalysts for White Biotechnology. *Chemie Ingenieur Technik* **78**:239-248.
- Drewes, S.E., Malissar, D.G.S. & Roos, D.H.P. (1993).** Ephedrine-derived Imidazolidin-2-ones. Broad Utility Chiral Auxiliaries in Asymmetric Synthesis. *Chemische Berichte* **126**:2663-2673.
- Duggleby, R.G. (2006).** Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Accounts of Chemical Research* **39**:550-557.
- Dünelmann, P., Kolter-Jung, D., Nitsche, A., Demir, A.S., Siegert, P., Lingen, B., Baumann, M., Pohl, M. & Müller, M. (2002).** Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: The first asymmetric cross-benzoin condensation. *Journal of the American Chemical Society* **124**:12084-12085.
- Dünnwald, T., Demir, A.S., Siegert, P., Pohl, M. & Müller, M. (2000).** Enantioselective synthesis of (*S*)-2-hydroxypropanone derivatives by benzoylformate decarboxylase catalyzed C-C bond formation. *European Journal of Organic Chemistry*:2161-2170.
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. & Jordan, F. (1993).** Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **32**:6165-6170.
- Enders, D., Breuer, K. & Teles, J.H. (1996).** A novel asymmetric benzoin reaction catalyzed by a chiral triazolium salt - Preliminary Communication. *Helvetica Chimica Acta* **79**:1217-1221.
- Enders, D. & Kallfass, U. (2002).** An efficient nucleophilic carbene catalyst for the asymmetric benzoin condensation. *Angewandte Chemie-International Edition* **41**:1743-+.
- Entner, N. & Doudoroff, M. (1952).** Glucose and Gluconic Acid Oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* **196**:853-862.
- Fang, Q.K., Han, Z.X., Grover, P., Kessler, D., Senanayake, C.H. & Wald, S.A. (2000).** Rapid access to enantiopure bupropion and its major metabolite by stereospecific nucleophilic substitution on an alpha-ketotriflate. *Tetrahedron-Asymmetry* **11**:3659-3663.
- Flora, K., Hahn, M., Rosen, H. & Benner, K. (1998).** Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* **93**:139-143.
- Forlani, G. (1999).** Purification and properties of a pyruvate carboligase from *Zea mays* cultured cells. *Phytochemistry* **50**:1305-1310.
- Frank, R.A., Pratap, J.V., Pei, X.Y., Perham, R.N. & Luisi, B.F. (2005).** The molecular origins of specificity in the assembly of a multienzyme complex. *Structure* **13**:1119-1130.
- Frank, R.A.W., Leeper, F.J. & Luisi, B.F. (2007).** Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**:892-905.
- Frank, R.A.W., Titman, C.M., Pratap, J.V., Luisi, B.F. & Perham, R.N. (2004).** A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science* **306**:872-876.
- Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2007).** Enzymatic Reaction Mechanisms, pp 1 - 5. OXFORD University Press.
- Gala, D. & DiBenedetto, D.J. (1997).** Metal salts induced improved alpha-hydroxylation of ketones for the preparation of the key chiral intermediate ofazole antifungals. *Tetrahedron-Asymmetry* **8**:3047-3050.
- Gala, D., DiBenedetto, D.J., Clark, J.E., Murphy, B.L., Schumacher, D.P. & Steinman, M. (1996a).** Preparations of antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative chromatographic resolution, and total asymmetric synthesis via enzymatic preparation of chiral alpha-hydroxy arylketones. *Tetrahedron Letters* **37**:611-614.

- Gala, D., DiBenedetto, D.J., Mergelsberg, I. & Kugelman, M. (1996b).** Total chiral synthesis of azole antifungals via alpha-hydroxylation of ketones. *Tetrahedron Letters* **37**:8117-8120.
- Ganesan, A. (2008).** The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**:306-317.
- Gerhards, T. (2009).** Klonierung und Charakterisierung neuer Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Gocke, D. (2007).** New and optimised thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes for carbonylation - Creation of a toolbox for chiral 2-hydroxy ketones. Dissertation. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Gocke, D., Kolter, G., Gerhards, T., Berthold Siöberg, C.L., Gauchenova, E., Knoll, M., Pleiss, J., Müller, M., Schneider, G. & Pohl, M. (in Arbeit).** (S)-selective mixed benzoin condensation by rational design of the pyruvate decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus*.
- Gocke, D., Kolter, G., Müller, M. & Pohl, M. (eingereicht).** Entwicklung einer Enzym-Plattform für die biokatalytische C-C-Verknüpfung. *Chemie Ingenieur Technik*.
- Gocke, D., Nguyen, C.L., Pohl, M., Stillger, T., Walter, L. & Müller, M. (2007).** Branched-chain keto acid decarboxylase from *Lactococcus lactis* (KdcA), a valuable thiamine diphosphate-dependent enzyme for asymmetric C-C bond formation. *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**:1425-1435.
- Gocke, D., Walter, L., Gauchenova, E., Kolter, G., Knoll, M., Berthold, C.L., Schneider, G., Pleiss, J., Müller, M. & Pohl, M. (2008).** Rational protein design of ThDP-Dependent enzymes-engineering stereoselectivity. *Chembiochem* **9**:406-412.
- Goetz, G., Iwan, P., Hauer, B., Breuer, M. & Pohl, M. (2001).** Continuous production of (R)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor using a potent mutant of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Bioeng* **74**:317-325.
- González, B., Merino, A., Almeida, M. & Viciña, R. (1986).** Comparative Growth of Natural Bacterial Isolates on Various Lignin-Related Compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **52**:1428-1432.
- González, B. & Viciña, R. (1989).** Benzaldehyde Lyase, a Novel Thiamine Ppi-Requiring Enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* Biovar-I. *Journal of Bacteriology* **171**:2401-2405.
- González, J.M., Covert, J.S., Whitman, W.B., Henriksen, J.R., Mayer, F., Scharf, B., Schmitt, R., Buchan, A., Fuhrman, J.A., Kiene, R.P. & Moran, M.A. (2003).** *Silicibacter pomeroyi* sp nov and *Roseovarius nubinhibens* sp nov., dimethylsulfoniopropionate-demethylating bacteria from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1261-1269.
- Graf, T. (2005).** Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.
- Hashiyama, T., Morikawa, K. & Sharpless, K.B. (1992).** Alpha-Hydroxy Ketones in High Enantiomeric Purity from Asymmetric Dihydroxylation of Enol Ethers. *Journal of Organic Chemistry* **57**:5067-5068.
- Hasson, M.S., Muscate, A., McLeish, M.J., Polovnikova, L.S., Gerlt, J.A., Kenyon, G.L., Petsko, G.A. & Ringe, D. (1998).** The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 angstrom resolution: Diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry* **37**:9918-9930.
- Hawkins, C.F., Borges, A. & Perham, R.N. (1989).** A Common Structural Motif in Thiamin Pyrophosphate-Binding Enzymes. *Febs Letters* **255**:77-82.
- Hegeman, G.D. (1966).** Synthesis of Enzymes of Mandelate Pathway by *Pseudomonas putida*. 3. Isolation and Properties of Constitutive Mutants. *Journal of Bacteriology* **91**:1161-1167.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Hegeman, G.D., Rosenber.Ey & Kenyon, G.L. (1970).** Mandelic Acid Racemase from *Pseudomonas putida* - Purification and Properties of Enzyme. *Biochemistry* **9**:4029-4036.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D. & Loening, S.A. (1997).** Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **25**:3957-3958.
- Henning, H. (2007).** Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen durch Wachstum-basierte Selektion. Dissertation. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Henning, H., Leggewie, C., Pohl, M., Müller, M., Eggert, T. & Jaeger, K.E. (2006).** Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:7510-7517.
- Hieber, G. & Ditrach, K. (2001).** Introducing ChiPros (TM) - Biocatalytic production of chiral intermediates on a commercial scale. *Chimica Oggi-Chemistry Today* **19**:16-20.
- Hildebrand, F., Kuhl, S., Pohl, M., Vasic-Racki, D., Müller, M., Wandrey, C. & Lutz, S. (2007).** The production of (*R*)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* in a continuously operated membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **96**:835-843.
- Hischer, T., Gocke, D., Fernández, M., Hoyos, P., Alcántara, A.R., Sinisterra, J.V., Hartmeier, W. & Ansoerge-Schumacher, M.B. (2005).** Stereoselective synthesis of novel benzoin catalysed by benzaldehyde lyase in a gel-stabilised two-phase system. *Tetrahedron* **61**:7378-7383.
- Hochuli, E. (1988).** Large-Scale Chromatography of Recombinant Proteins. *Journal of Chromatography* **444**:293-302.
- Hollis, D.G., Weaver, R.E., Steigerwalt, A.G., Wenger, J.D., Moss, C.W. & Brenner, D.J. (1989).** *Francisella philomiragia* Comb Nov (Formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* Biogroup Novicida (Formerly *Francisella-Novicida*) Associated with Human-Disease. *Journal of Clinical Microbiology* **27**:1601-1608.
- Holloway, P. & Subden, R.E. (1993).** The Isolation and Nucleotide-Sequence of the Pyruvate Decarboxylase Gene from *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics* **24**:274-277.
- Holzer, H., Schultz, G., Villarpalasi, C. & Juntgensell, J. (1956).** Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen. *Biochemische Zeitschrift* **327**:331-344.
- Hopmann, R.F.W. (1980).** Hydroxyl-Ion-Induced Subunit Dissociation of Yeast Cytoplasmic Pyruvate Decarboxylase - a Circular-Dichroism Study. *European Journal of Biochemistry* **110**:311-318.
- Hossain, M.A., Huq, E., Grover, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. & Hodges, T.K. (1996).** Characterization of pyruvate decarboxylase genes from rice. *Plant Molecular Biology* **31**:761-770.
- Huang, C.Y., Chang, A.K., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (2001).** Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase: effect on activity and pH dependence. *Eur J Biochem* **268**:3558-3565.
- Huggett, B., Hodgson, J. & Lahteenmaki, R. (2009).** Public biotech 2008-the numbers. *Nature Biotechnology* **27**:710-721.
- Iding, H., Dünnwald, T., Greiner, L., Liese, A., Müller, M., Siegert, P., Grötzinger, J., Demir, A.S. & Pohl, M. (2000).** Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *Chemistry-a European Journal* **6**:1483-1495.
- Iding, H., Siegert, P., Mesch, K. & Pohl, M. (1998).** Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochim Biophys Acta* **1385**:307-322.
- Iwan, P., Goetz, G., Schmitz, S., Hauer, B., Breuer, M. & Pohl, M. (2001).** Studies on the continuous production of (*R*)-(-)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **11**:387-396.

- Jäckel, C., Kast, P. & Hilvert, D. (2008). Protein design by directed evolution. *Annual Review of Biophysics* 37:153-173.
- Janknecht, R., Demartynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A. & Stunnenberg, H.G. (1991). Rapid and Efficient Purification of Native Histidine-Tagged Protein Expressed by Recombinant Vaccinia Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:8972-8976.
- Janzen, E. (2002). Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*. doctoral thesis. Heinrich-Heine University, Duesseldorf.
- Janzen, E., Müller, M., Kolter-Jung, D., Kneen, M.M., McLeish, M.J. & Pohl, M. (2006). Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C-C bond formation. *Bioorganic Chemistry* 34:345-361.
- Jensen, W.I., Owen, C.R. & Jellison, W.L. (1969). *Yersinia philomiragia* Sp. N., a New Member of Pasteurella Group of Bacteria, Naturally Pathogenic for Muskrat (*Ondatra Zibethica*). *Journal of Bacteriology* 100:1237-&.
- Jordan, F. (2003). Current mechanistic understanding of thiamin diphosphatedependent enzymatic reactions. *Natural Product Reports* 20:184-201.
- Jordan, F., Zhang, Z. & Sergienko, E. (2002). Spectroscopic evidence for participation of the 1',4'-imino tautomer of thiamin diphosphate in catalysis by yeast pyruvate decarboxylase. *Bioorg Chem* 30:188-198.
- Takeya, H., Morishita, M., Koshino, H., Morita, T., Kobayashi, K. & Osada, H. (1999). Cytoazone: A novel cytokine modulator containing a 2-oxazolidinone ring produced by *Streptomyces* sp. *Journal of Organic Chemistry* 64:1052-1053.
- Kendrew, J.C. (1950). The Crystal Structure of Horse Met-Myoglobin .1. General Features - the Arrangement of the Polypeptide Chains. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* 201:62-&.
- Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. & Hubner, G. (1997). How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* 275:67-70.
- Kihumbu, D., Stillger, T., Hummel, W. & Liese, A. (2002). Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol. *Tetrahedron-Asymmetry* 13:1069-1072.
- Kirchhoff, G.S.C. (1811). *Mem. Acad. Imp. Sci., St. Petersburg* 4:27.
- Kitazaki, T., Tasaka, A., Hosono, H., Matsushita, Y. & Itoh, K. (1999). Optically active antifungal azoles. VIII. Synthesis and antifungal activity of 1-[(1R,2R)-2-(2,4-difluoro- and 2-fluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-3-(4-substituted phenyl)-2(1H,3H)-imidazolones and 2-imidazolidinones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 47:351-359.
- Kluger, R. & Tittmann, K. (2008). Thiamin diphosphate catalysis: Enzymic and nonenzymic covalent intermediates. *Chemical Reviews* 108:1797-1833.
- Kneen, M.M., Pogozheva, I.D., Kenyon, G.L. & McLeish, M.J. (2005). Exploring the active site of benzaldehyde lyase by modeling and mutagenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1753:263-271.
- Knight, R.L. & Leeper, F.J. (1998). Comparison of chiral thiazolium and triazolium salts as asymmetric catalysts for the benzoin condensation. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*:1891-1893.
- Knoll, M., Müller, M., Pleiss, J. & Pohl, M. (2006). Factors mediating activity, selectivity, and substrate specificity for the thiamin diphosphate-dependent enzymes benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase. *Chembiochem* 7:1928-1934.
- König, S. (1998). Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1385:271-286.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A. & Deckwer, W.-D. (1995).** Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **39**:59-65.
- Krix, G., Bommarius, A.S., Drauz, K., Kottenhahn, M., Schwarm, M. & Kula, M.R. (1997).** Enzymatic reduction of alpha-keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids. *Journal of Biotechnology* **53**:29-39.
- Kuboki, A., Yamamoto, T., Taira, M., Arishige, T. & Ohira, S. (2007).** Total synthesis of (+/-)-Nitidanin and novel procedures for determination of the location of the side chains on 1,4-benzodioxane. *Tetrahedron Letters* **48**:771-774.
- Kühl, S., Zehentgruber, D., Pohl, M., Müller, M. & Lutz, S. (2007).** Process development for enzyme catalysed asymmetric C-C-bond formation. *Chemical Engineering Science* **62**:5201-5205.
- Kühne, W.F. (1878).** Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. *Untersuchungen aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg* **1**:291-324.
- Kurlemann, N. & Liese, A. (2004).** Immobilization of benzaldehyde lyase and its application as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of a chiral 2-hydroxy ketone. *Tetrahedron-Asymmetry* **15**:2955-2958.
- Kutter, S., Wille, G., Relle, S., Weiss, M.S., Hübner, G. & König, S. (2006).** The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. *Febs Journal* **273**:4199-4209.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M.L., Pelletier, D.A., Beatty, J.T., Lang, A.S., Tabita, F.R., Gibson, J.L., Hanson, T.E., Bobst, C., Torres, J.L.T.Y., Peres, C., Harrison, F.H., Gibson, J. & Harwood, C.S. (2004).** Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology* **22**:55-61.
- Lee, K.J., Tribe, D.E. & Rogers, P.L. (1979).** Ethanol-Production by *Zymomonas mobilis* in Continuous Culture at High Glucose-Concentrations. *Biotechnology Letters* **1**:421-426.
- Liese, A., Seelbach, K., Buchholz, A. & Haberland, J. (2006).** Processes, pp 147-513. A. Liese, K. Seelbach and C. Wandrey (Eds.), Industrial Biotransformation. WILEY-VCH.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. & Sundstrom, M. (1992).** Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *Embo J.* **11**:2373-2379.
- Lingen, B., Grötzinger, J., Kolter, D., Kula, M.R. & Pohl, M. (2002).** Improving the carbonylase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis. *Protein Engineering* **15**:585-593.
- Lingen, B., Kolter-Jung, D., Dünkelfmann, P., Feldmann, R., Grötzinger, J., Pohl, M. & Müller, M. (2003).** Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution. *Chembiochem* **4**:721-726.
- Liu, M., Sergienko, E.A., Guo, F., Wang, J., Tittmann, K., Hübner, G., Furey, W. & Jordan, F. (2001).** Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 1. Site-directed mutagenesis and steady-state kinetic studies on the enzyme with the D28A, H114F, H115F, and E477Q substitutions. *Biochemistry* **40**:7355-7368.
- Lockington, R.A., Borlace, G.N. & Kelly, J.M. (1997).** Pyruvate decarboxylase and anaerobic survival in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **191**:61-67.
- Lohmann, K. & Schuster, P. (1937).** Examinations on cocarboxylase. *Biochemische Zeitschrift* **294**:188-214.
- Lowe, S.E. & Zeikus, J.G. (1992).** Purification and Characterization of Pyruvate Decarboxylase from *Sarcina ventriculi*. *Journal of General Microbiology* **138**:803-807.

- Ma, C.Y., Zhang, H.J., Tan, G.T., Van Hung, N., Cuong, N.M., Soejarto, D.D. & Fong, H.H.S. (2006). Antimalarial compounds from *Grewia bilamellata*. *Journal of Natural Products* **69**:346-350.
- Maraite, A., Schmidt, T., Ansoerge-Schumacher, M.B., Brzozowski, A.M. & Grogan, G. (2007). Structure of the ThDP-dependent enzyme benzaldehyde lyase refined to 1.65 angstrom resolution. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **63**:546-548.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N. & Bryant, S.H. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research* **37**:D205-D210.
- Mayor, U., Johnson, C.M., Daggett, V. & Fersht, A.R. (2000). Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13518-13522.
- McGill, D.J. & Dawes, E.A. (1971). Glucose and Fructose Metabolism in *Zymomonas-Anaerobia*. *Biochemical Journal* **125**:1059-&.
- Merril, C.R. (1990). Gel-Staining Techniques. *Methods in Enzymology* **182**:477-488.
- Mesch, K. (1997). Rationales Protein-Design an der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*. Dissertation. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Meyer, D. (2009). Kinetische und strukturelle Untersuchung der Katalysemechanismen ausgewählter Kofaktor-abhängiger Enzyme - Implikationen für die Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosauren durch Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Michaelis, L. & Menten, M.L. (1913). The kinetics of the inversion effect. *Biochemische Zeitschrift* **49**:333-369.
- Miczka, G., Vernau, J., Kula, M.R., Hofmann, B. & Schomburg, D. (1992). Purification and primary structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Appl Biochem* **15**:192-206.
- Mikolajek, R., Spiess, A.C. & Büchs, J. (2007a). Feasibility of gas/solid carboligation: Conversion of benzaldehyde to benzoin using thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Journal of Biotechnology* **129**:723-725.
- Mikolajek, R., Spiess, A.C., Pohl, M., Lamare, S. & Büchs, J. (2007b). An activity, stability and selectivity comparison of propionin synthesis by thiamine diphosphate-dependent enzymes in a solid/gas bioreactor. *Chembiochem* **8**:1063-1070.
- Mikolajek, R.J., Spiess, A.C., Pohl, M. & Büchs, J. (2009). Propionin Synthesis Using Thiamine Diphosphate-Dependent Enzymes. *Biotechnology Progress* **25**:132-138.
- Mizuhara, S. & Handler, P. (1954). Mechanism of Thiamine-Catalyzed Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **76**:571-573.
- Moller, K., Langkjaer, R.B., Nielsen, J., Piskur, J. & Olsson, L. (2004). Pyruvate decarboxylases from the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. *Molecular Genetics and Genomics* **270**:558-568.
- Morazzoni, R. & Bombardelli, E. (1965). *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* **66**:3-42.
- Mosbacher, T.G., Müller, M. & Schulz, G.E. (2005). Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *Febs Journal* **272**:6067-6076.
- Mücke, U., König, S. & Hübner, G. (1995). Purification and Characterization of Pyruvate Decarboxylase from Pea-Seeds (*Pisum sativum* Cv Miko). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**:111-117.
- Müller, M., Dresen, C. & Richter, M. (2007). Verwendung des PigD-Proteins zur Katalyse von 1,4-Additionen von 2-Oxoalkanoaten an  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketone. Deutschland.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Müller, M., Gocke, D. & Pohl, M. (2009). Thiamin diphosphate in biological chemistry: exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis. *Febs Journal* **276**:2894-2904.
- Muller, Y.A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G.E., Jordan, F. & Schneider, G. (1993). A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* **1**:95-103.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific Synthesis of DNA *in vitro* Via a Polymerase-Catalyzed Chain-Reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
- Myers, A.G., Yang, B.H., Chen, H. & Gleason, J.L. (1994). Use of Pseudoephedrine as a Practical Chiral Auxiliary for Asymmetric-Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **116**:9361-9362.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T., Kumada, Y., Imamura, K. & Imanaka, H. (2008). Recent Advances in Controlled Immobilization of Proteins onto the Surface of the Solid Substrate and Its Possible Application to Proteomics. *Current Proteomics* **5**:161-175.
- Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E. & Hoogenraad, N.J. (1987). Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:1024-1028.
- Neuberg, C. & Hirsch, J. (1921). The carbon chain of attached enzymes (carboligase). *Biochemische Zeitschrift* **115**:282-310.
- Neuser, F., Zorn, H. & Berger, R.G. (2000). Generation of odorous acyloins by yeast pyruvate decarboxylases and their occurrence in sherry and soy sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:6191-6195.
- Nguyen, T., Drotar, A.M., Monson, R.K. & Fall, R. (2009). A high affinity pyruvate decarboxylase is present in cottonwood leaf veins and petioles: A second source of leaf acetaldehyde emission? *Phytochemistry* **70**:1217-1221.
- Ogawa, J. & Shimizu, S. (2002). Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:367-375.
- Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., Kuraishi, H. & Yamasato, K. (1993). *Zymobacter palmae* Gen-Nov, Sp-Nov, a New Ethanol-Fermenting Peritrichous Bacterium Isolated from Palm Sap. *Archives of Microbiology* **160**:333-337.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G. & Guddat, L.W. (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J Mol Biol* **317**:249-262.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G., Schowen, R.L. & Guddat, L.W. (2004). The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **279**:2242-2253.
- Patel, R.N. (2006). Biocatalysis: Synthesis of chiral intermediates for drugs. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **9**:741-764.
- Patel, R.N. (2008). Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews* **252**:659-701.
- Payen & Persoz. (1834). Ueber die Diastase und das Dextrin und über die gewerbliche Anwendung dieser Substanzen. *Annalen der Physik* **108**:174 - 193.
- Pils, B. & Schultz, J. (2004). Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes. *Journal of Molecular Biology* **340**:399-404.
- Plietker, B. (2005). New oxidative pathways for the synthesis of alpha-hydroxy ketones - the alpha-hydroxylation and ketohydroxylation. *Tetrahedron-Asymmetry* **16**:3453-3459.

- Pohl, M. (1997).** Protein design on pyruvate decarboxylase (PDC) by site-directed mutagenesis. Application to mechanistical investigations, and tailoring PDC for the use in organic synthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **58**:15-43.
- Pohl, M., Gocke, D. & Müller, M. (2009).** Thiamine-Based Enzymes for Biotransformations, pp 75 - 114. P.T. Anastas and R.H. Crabtree (Eds.), Green Catalysis. WILEY-VCH.
- Pohl, M., Grötzinger, J., Wollmer, A. & Kula, M.R. (1994).** Reversible dissociation and unfolding of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur J Biochem* **224**:651-661.
- Pohl, M., Lingen, B. & Müller, M. (2002).** Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: New aspects of asymmetric C-C bond formation. *Chemistry-a European Journal* **8**:5289-5295.
- Pohl, M., Mesch, K., Rodenbrock, A. & Kula, M.R. (1995).** Stability Investigations on the Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **22**:95-105.
- Pohl, M., Siegert, P., Mesch, K., Bruhn, H. & Grötzinger, J. (1998).** Active site mutants of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - A site-directed mutagenesis study of L112, I472, I476, E473 and N482. *European Journal of Biochemistry* **257**:538-546.
- Pohl, M., Sprenger, G.A. & Müller, M. (2004).** A new perspective on thiamine catalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:335-342.
- Polovnikova, E.S., McLeish, M.J., Sergienko, E.A., Burgner, J.T., Anderson, N.L., Bera, A.K., Jordan, F., Kenyon, G.L. & Hasson, M.S. (2003).** Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry* **42**:1820-1830.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975).** Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. *Nature* **258**:598-599.
- Prosen, E. & Ward, O.P. (1994).** Optimisation of reaction conditions for production of S(-)-2-hydroxypropiofenone by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Ind. Microbiol.* **13**:287-291.
- Raj, K.C., Ingram, L.O. & Maupin-Furlow, J.A. (2001).** Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Archives of Microbiology* **176**:443-451.
- Raj, K.C., Talarico, L.A., Ingram, L.O. & Maupin-Furlow, J.A. (2002).** Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (pdc) and comparison to bacterial homologues. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2869-2876.
- Ralsler, M., Querfurth, R., Warnatz, H.J., Lehrach, H., Yaspo, M.L. & Krobitsch, S. (2006).** An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **347**:747-751.
- Reynen, M. & Sahm, H. (1988).** Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. *J Bacteriol* **170**:3310-3313.
- Reynolds, L.J., Garcia, G.A., Kozarich, J.W. & Kenyon, G.L. (1988).** Differential reactivity in the processing of [p-(halomethyl)benzoyl] formates by benzoylformate decarboxylase, a thiamin pyrophosphate dependent enzyme. *Biochemistry* **27**:5530-5538.
- Rivoal, J., Ricard, B. & Pradet, A. (1990).** Purification and Partial Characterization of Pyruvate Decarboxylase from *Oryza sativa* L. *European Journal of Biochemistry* **194**:791-797.
- Rogers, P.L., Lee, K.J. & Tribe, D.E. (1973).** Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnology Letters* **1**:165-170.
- Rosche, B., Breuer, M., Hauer, B. & Rogers, P.L. (2003).** Screening of yeasts for cell-free production of (R)-phenylacetylcarbinol. *Biotechnology Letters* **25**:841-845.
- Rosche, B., Leksawasdi, N., Sandford, V., Breuer, M., Hauer, B. & Rogers, P. (2002).** Enzymatic (R)-phenylacetylcarbinol production in benzaldehyde emulsions. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:94-100.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Roth, K. (2005).** Eine unendliche chemische Geschichte. *Chemie in Unserer Zeit* **3**:212 - 217.
- Rouhi, A.M. (2003).** Chirality at work. *Chemical & Engineering News* **81**:56-61.
- Rück, K. (1995).** Asymmetric Alkylation of Amide Enolates with Pseudoephedrine and Ephedrine as Chiral Auxiliaries - Unexpected Influence of Additives? *Angewandte Chemie-International Edition in English* **34**:433-435.
- Saehuan, C., Rojanarata, T., Wiyakrutta, S., McLeish, M.J. & Meeyootisom, V. (2007).** Isolation and characterization of a benzoylformate decarboxylase and a NAD(+)/NADP(+)-dependent benzaldehyde dehydrogenase involved in D-phenylglycine metabolism in *Pseudomonas stutzeri* ST 201. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1770**:1585-1592.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001).** Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition.
- Schellenberger, A. (1998).** Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1385**:177-186.
- Schmidt, T., Zavrel, M., Spiess, A. & Ansoerge-Schumacher, M.B. (2009).** Biochemical peculiarities of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I in the dependency on pH and cosolvent concentration. *Bioorganic Chemistry* **37**:84-89.
- Schmitt, H.D. & Zimmermann, F.K. (1982).** Genetic-Analysis of the Pyruvate Decarboxylase Reaction in Yeast Glycolysis. *Journal of Bacteriology* **151**:1146-1152.
- Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S. & Schneider, G. (2003).** Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* **270**:2312-2321.
- Shin, W., Pletcher, J., Blank, G. & Sax, M. (1977).** Ring Stacking Interactions between Thiamin and Planar Molecules as Seen in Crystal-Structure of a Thiamin Picrolonate Dihydrate Complex. *Journal of the American Chemical Society* **99**:3491-3499.
- Siegert, P. (2000).** Vergleichende Charakterisierung der Decarboxylase- und Carboligasereaktion der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* und der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* mittels gerichteter Mutagenese. Dissertation. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Siegert, P., McLeish, M.J., Baumann, M., Iding, H., Kneen, M.M., Kenyon, G.L. & Pohl, M. (2005).** Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Protein Engineering Design & Selection* **18**:345-357.
- Skory, C.D. (2003).** Induction of *Rhizopus oryzae* pyruvate decarboxylase genes. *Current Microbiology* **47**:59-64.
- Solladié-Cavallo, A., Lupattelli, P., Jierry, L., Bovicelli, P., Angeli, F., Antonioletti, R. & Klein, A. (2003).** Asymmetric oxidation of silyl enol ethers using chiral dioxiranes derived from alpha-fluoro cyclohexanones. *Tetrahedron Letters* **44**:6523-6526.
- Sopaci, S.B., Simsek, I., Tural, B., Volkan, M. & Demir, A.S. (2009).** Carboligation reactions with benzaldehyde lyase immobilized on superparamagnetic solid support. *Organic & Biomolecular Chemistry* **7**:1658-1664.
- Spiess, A., Mikolajek, R., Pohl, M. & Lamare, S. (2007).** Enantioselective enzymatic carboligation using thiamine diphosphate dependent enzymes in a solid/gas bioreactor. *Journal of Biotechnology* **131**:S92-S93.
- Sprenger, G.A. & Pohl, M. (1999).** Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **6**:145-159.
- Stanier, R.Y. & Ornston, L.N. (1973).** The b-Ketoadipate Pathway, pp 89 - 151. R. A.H. and T. D.W. (Eds.), *Advances in microbial physiology*. Academic Press Inc. (London).

- Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A. & Lewis, K. (2000).** Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydronecarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:1433-1437.
- Stillger, T. (2004).** Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen - Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn., Bonn.
- Stillger, T., Pohl, M., Wandrey, C. & Liese, A. (2006).** Reaction engineering of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* catalyzing enantioselective C-C bond formation. *Organic Process Research & Development* **10**:1172-1177.
- Straathof, A.J.J., Panke, S. & Schmid, A. (2002).** The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:548-556.
- Stürmer, R. & Breuer, M. (2006).** Enzymes as catalysts - Chemistry and biology hand in hand. *Chemie in Unserer Zeit* **40**:104-111.
- Sukumaran, J. & Hanefeld, U. (2005).** Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes. *Chemical Society Reviews* **34**:530-542.
- Sumner, J.B. (1926).** The isolation and crystallization of the enzyme urease. Preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry* **69**:435-441.
- Thayer, A.M. (2006).** Enzymes at work. *Chemical & Engineering News* **84**:15-+.
- Thomas, J.P., Baughn, C.O., Shepherd, R.G. & Wilkinson, R.G. (1961).** A New Synthetic Compound with Antituberculous Activity in Mice - Ethambutol (Dextro-2,2'-(Ethylene-diimino)-Di-1-Butanol). *American Review of Respiratory Disease* **83**:891-&.
- Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D.M., Duggleby, R.G. & Hübner, G. (2003).** NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* **42**:7885-7891.
- Tittmann, K., Proske, D., Spinka, M., Ghisla, S., Rudolph, R., Hubner, G. & Kern, G. (1998).** Activation of thiamin diphosphate and FAD in the phosphate-dependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry* **273**:12929-12934.
- Toukonitty, E., Maki-Arvela, P., Kuzma, M., Vilella, A., Neyestanaki, A.K., Salmi, T., Sjöholm, R., Leino, R., Laine, E. & Murzin, D.Y. (2001).** Enantioselective hydrogenation of 1-phenyl-1,2-propanedione. *Journal of Catalysis* **204**:281-291.
- Tsou, A.Y., Ransom, S.C., Gerlt, J.A., Buechter, D.D., Babbitt, P.C. & Kenyon, G.L. (1990).** Mandelate Pathway of *Pseudomonas putida* - Sequence Relationships Involving Mandelate Racemase, (S)-Mandelate Dehydrogenase, and Benzoylformate Decarboxylase and Expression of Benzoylformate Decarboxylase in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**:9856-9862.
- Ukai, T., Tanaka, S. & Dokawa, S. (1943).** New catalysts for acyloin condensation. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **63**:296-300.
- Vasic-Racki, D. (2006).** History of Industrial Biotransformations - Dreams and Realities, pp 26 - 29. A. Liese, K. Seelbach and C. Wandrey (Eds.), Industrial Biotransformation. WILEY-VCH.
- Versées, W., Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Steyaert, J. (2007).** The crystal structure of phenylpyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasilense* at 1.5 angstrom resolution - Implications for its catalytic and regulatory mechanism. *Febs Journal* **274**:2363-2375.
- Wackett, L.P. (2004).** Novel biocatalysis by database mining. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:280-284.
- Ward, O.P. & Singh, A. (2000).** Enzymatic asymmetric synthesis by decarboxylases. *Current Opinion in Biotechnology* **11**:520-526.

## LITERATURVERZEICHNIS

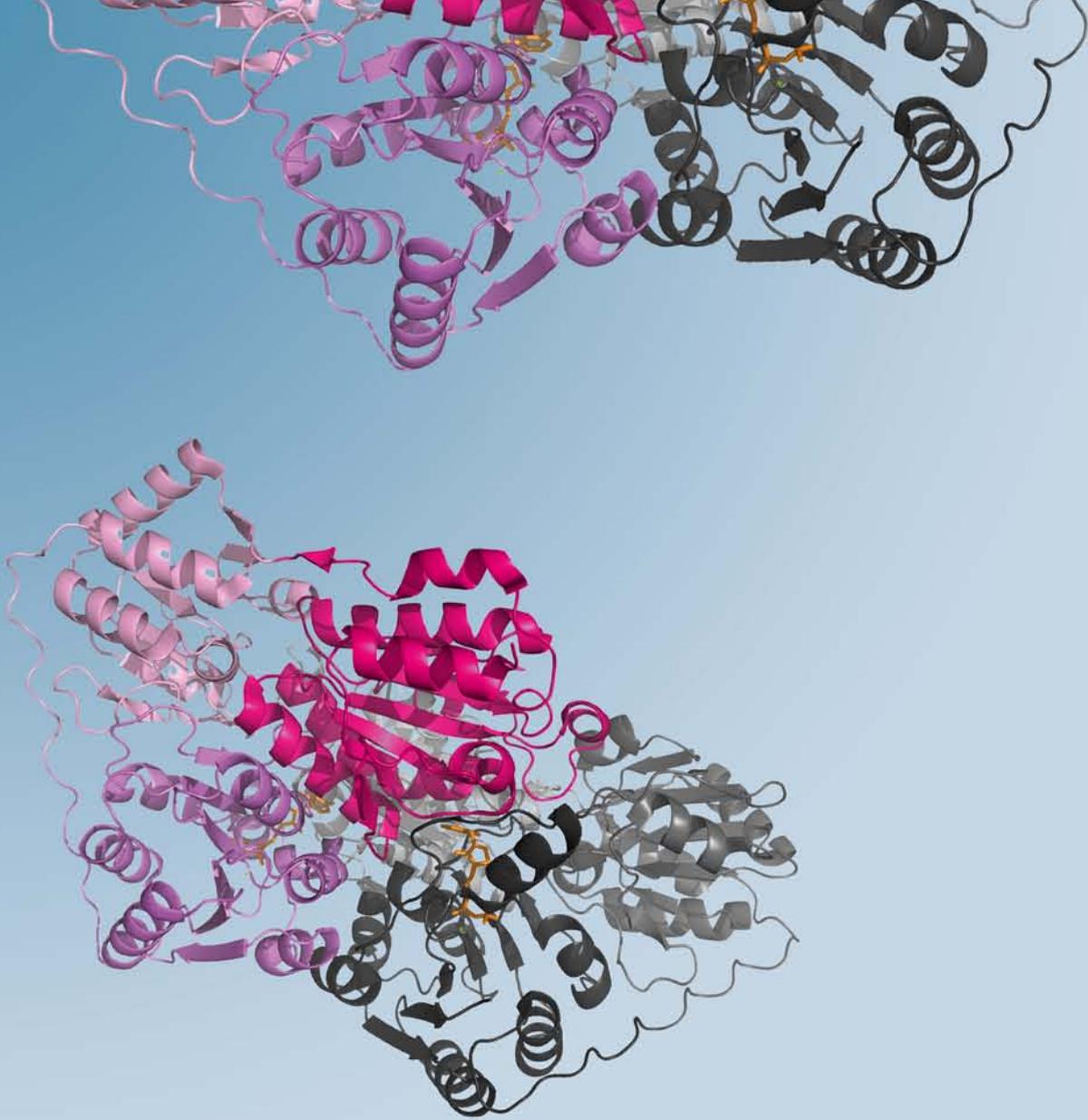
---

- Weiss, P.M., Garcia, G.A., Kenyon, G.L., Cleland, W.W. & Cook, P.F. (1988).** Kinetics and Mechanism of Benzoylformate Decarboxylase Using C-13 and Solvent Deuterium-Isotope Effects on Benzoylformate and Benzoylformate Analogs. *Biochemistry* **27**:2197-2205.
- Wendorff, M. (2006).** Neue Benzoylformiatdecarboxylasen für die Biokatalyse. Dissertation. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A.F. & Kula, M.R. (1981).** Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous Nad(H) Regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* **23**:2789-2802.
- Wilcocks, R. & Ward, O.P. (1992).** Factors Affecting 2-Hydroxypropiofenone Formation by Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering* **39**:1058-1063.
- Wilcocks, R., Ward, O.P., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y.P. & Prosen, E. (1992).** Acyloin Formation by Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:1699-1704.
- Wilkinson, R., Thomas, J.P., Shepherd, R.G. & Baughn, C. (1961).** Stereospecificity in a New Type of Synthetic Antituberculous Agent. *Journal of the American Chemical Society* **83**:2212-&.
- Williams, R.R. (1935).** Structure of vitamin B. *Journal of the American Chemical Society* **57**:229-230.
- Williams, R.R. (1936).** Structure of vitamin B-1. *Journal of the American Chemical Society* **58**:1063-1064.
- Wohlgemuth, R. (2009).** The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology* **25**:204-213.
- Wu, C.C. & Zhang, R.C. (2006).** An information-theoretic approach to the effective usage of auxiliary information from survey data. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics* **58**:499-509.
- Wu, Y.G., Chang, A.K., Nixon, P.F., Li, W. & Duggleby, R.G. (2000).** Mutagenesis at asp27 of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Effect on its ability to form acetoin and acetolactate. *Eur J Biochem* **267**:6493-6500.
- Xiang, S., Usunow, G., Lange, G., Busch, M. & Tong, L. (2007).** Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **282**:2676-2682.
- Yendapally, R. & Lee, R.E. (2008).** Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**:1607-1611.
- Yep, A., Kenyon, G.L. & McLeish, M.J. (2006).** Determinants of substrate specificity in KdcA, a thiamin diphosphate-dependent decarboxylase. *Bioorganic Chemistry* **34**:325-336.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**  
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**  
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**  
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***  
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**  
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**  
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**  
by S. Vossel (2008), XIV, 176 pages  
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***  
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**  
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-539-5

10. **Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***  
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-560-9
11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***  
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-561-6
12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**  
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)  
ISBN: 978-3-89336-563-0
13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**  
by T. Felder (2009), 97 pages  
ISBN: 978-3-89336-566-1
14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr<sup>67</sup> - Leu<sup>77</sup> des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**  
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-571-5
15. **Development of a Process for the Cleavage of a Mucin Fusion Protein by Enterokinase**  
by T. Kubitzki (2009), IV, 133 pages  
ISBN: 978-3-89336-575-3
16. **Children's health and RF EMF exposure**  
project coord. P. Wiedemann (2009), 49 pages  
ISBN: 978-3-89336-594-4
17. **Entwicklung einer Signalerfassungselektronik für eine Halbleiter-Photomultiplier (SiPM) Matrix**  
von C. Parl (2009), IV, 128 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-595-1
18. **Medienorientierung biomedizinischer Forscher im internationalen Vergleich**  
Die Schnittstelle von Wissenschaft & Journalismus und ihre politische Relevanz  
herausg. von H. P. Peters (2009), 364 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-597-5  
URN: urn:nbn:de: 0001-00542
19. **Identifizierung von Interaktionspartnern für HIV-1 Nef und ihre potentielle Relevanz bei der Entwicklung der HIV-assoziierten Demenz**  
von J. Mötter (2010), VI, 172 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-604-0

20. **Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen**  
von D. Zehentgruber (2010), XI, 147 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-605-7
21. **Studies on central carbon metabolism and respiration of *Gluconobacter oxydans* 621H**  
by T. Hanke (2010), 120 pages  
ISBN: 978-3-89336-607-1
22. **Prozessentwicklung zur Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure, einer Vitamin C- Vorstufe**  
von B. Osterath (2010), XXI, 213 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-612-5
23. **Visuell evozierte Antworten der corticalen Areale V1/V2 und V5/MT nach Schachbrettmusterumkehrreizung – Magnetenzephalographische Untersuchungen in Kombination mit cytoarchitektonischen Wahrscheinlichkeitskarten**  
von B. U. Barnikol (2010), III, 138 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-615-6
24. **Biochemische und regulatorische Analyse des TCA-Zyklus und Glyoxylat-Shunts in *Escherichia coli***  
von M. Kunze (2010), 191 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-620-0
25. **Metabolomanalyse als Grundlage für <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse und dynamischer Modellierung am Beispiel der Lysinbiosynthese**  
von M. G. Wellerdiek (2010), xvi, 182 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-621-7
26. **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone**  
von G. Kolter (2010), IX, 168 Seiten  
ISBN: 978-3-89336-626-2



**Gesundheit / Health**  
**Band / Volume 26**  
**ISBN 978-3-89336-626-2**