

**Molekulare Evolution der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus
Sinorhizobium morelense S-30.7.5. zu verbesserter Thermostabilität
und ihre Anwendung in der Synthese von D-Rhamnose und
D-Mannose mit *in situ*-Cosubstrat-Regenerierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der
Universität des Saarlandes

angefertigt am
Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB)

von
Martina Pitz

Saarbrücken,
im Juni 2013

Tag des Kolloquiums: 03.04.2013

Dekan: PROF. DR. VOLKHARD HELMS

Berichterstatter: PROF. DR. FRIEDRICH GIFFHORN

PROF. DR. MANFRED J. SCHMITT

Vorsitz: PROF. DR. ULI MÜLLER

Akad. Mitarbeiter: DR. KONSTANTIN SCHNEIDER

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden am Institut für Angewandte Mikrobiologie des Zentrums für Human- und Molekularbiologie (ZHMB) der Universität des Saarlandes durchgeführt und von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) im Rahmen des Forschungsnetzwerkes ChemBioTec (Schwerpunkt 2 „Neuartige Reaktionen und Reaktionskonzepte – Kopplung verschiedener Synthesestrategien“, Az 13195-32) und von der Europäischen Union im Rahmen des EU-Projektes ERUDES (Development of Electrochemical Reactors Using Dehydrogenases for Enantiopure Synthon Preparations, 7th Framework Program of the European Commission, Contact Reference CP-FP 213487-2) gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
1	Die Bedeutung der Kohlenhydrate	1
1.1	Biologische Bedeutung der D-Mannose	2
1.2	Biologische Bedeutung der D-Rhamnose	3
2	1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus <i>Sinorhizobium morelense</i> S-30.7.5	5
2.1	Reaktion und Substrate der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase	5
2.2	Funktion der 1,5-Anhydro-D-fructose im Stoffwechsel von Sinorhizobien	6
2.3	Die Tertiärstruktur der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase	9
3	Proteinengineering	11
3.1	Änderung der Cosubstrat-Spezifität der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase durch Proteinengineering	12
3.2	Erhöhung der Thermostabilität von Enzymen	13
4	Biokonversionen mit Cosubstrat-Regenerierung	14
4.1	Enzymatische Cofaktor-Regenerierung	15
4.1.1	Enzym-gekoppelte Regenerierung	16
5	Glucose-Oxidase aus <i>Aspergillus niger</i>	17
6	Ziele dieser Arbeit	18
II	MATERIAL UND METHODEN	19
1	Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer	19
2	Größenstandards, Enzyme und Kits	25
3	Chemikalien und Reagenzien	25
4	Antibiotika	25
5	Nährmedien	26
6	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	27
7	Gentechnische Standardmethoden	27
7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27

7.2	Restriktionsspaltung von DNA und Restriktionsendonukleasen.....	28
7.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
7.4	Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
7.5	Reinigung von DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
8	Ortsgerichtete Mutagenese durch KOD-QuikChange PCR	30
9	Gerichtete Evolution durch <i>error prone</i>-PCR	31
10	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	32
10.1	TOPO-TA Cloning®	32
10.2	Ligation.....	33
11	Ligationskontrolle durch <i>Colony</i>-PCR	33
12	Transformation	35
13	DNA-Sequenzierung.....	36
14	Klonierung und heterologe Expression der AFR	36
14.1	Isolierung der genomischen DNA aus <i>Sinorhizobium morelense</i> S-30.7.5.....	36
14.2	afr-Gen-Amplifikation aus der genomischen DNA von <i>Sinorhizobium morelense</i> S-30.7.5.....	37
14.3	Heterologe Expression der AFR-A13G in <i>E. coli</i>	38
15	Herstellung zellfreier Extrakte.....	40
15.1	Zellernte von <i>E. coli</i>	40
15.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	41
16	Anreicherung der AFR-A13G.....	41
16.1	Affinitätschromatographie an Nickelsepharose	42
16.2	Umpufferung mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC).....	42
17	Proteinbestimmung.....	42
18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
19	Bestimmung von Enzym-Aktivitäten	44
19.1	AFR-Aktivität.....	44
19.2	Glucose-Dehydrogenase-Aktivität	44
19.3	Glucose-Oxidase- und Pyranose-2-Oxidase-Aktivität: ABTS-Assay nach Danneel (Danneel et al. 1993).....	45

20	Screening nach AFR-A13G-Varianten mit erhöhter Thermostabilität	45
21	Biochemische Charakterisierung der AFR-A13G-Varianten	47
21.1	Erstellung von Strukturbildern der AFR-A13G.....	47
21.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	47
21.3	Bestimmungen der K_m -Werte und Berechnung von k_{cat}	48
21.4	Temperaturstabilität (T_{50}^{10} [°C]).....	48
21.5	pH-Optimum	48
22	Biokonversionen	49
22.1	Biokonversion mit Pyranose-2-Oxidase aus <i>Peniophora gigantea</i>	49
22.2	Biokonversion mit AFR-A13G und Cosubstrat-Regenerierung	49
22.3	Biokonversion mit Glucose Oxidase und Katalase zur Entfernung von D-Glucose und 6-Deoxy-D-glucose	50
23	Reinigung der D-Rhamnose und des D-Glucosons	50
24	Kohlenhydrat-Analytik	51
24.1	Produktbestimmung durch HPLC	51
24.2	Produktbestimmung durch Dünnschichtchromatographie (DC)	51
24.3	Produktbestimmung durch NMR	52
III	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	53
1	Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase-Variante AFR-A13G	53
1.1	Klonierung des Gens für die 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus <i>Sinorhizobium morelense</i> S-30.7.5. und Expression in <i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)	53
1.2	Reinigung der AFR-A13G.....	56
1.3	Substrat- und Cosubstrat-Spezifität der AFR-A13G.....	59
1.4	Temperaturstabilität und T_{50}^{10} [°C] der AFR-A13G.....	60
1.5	pH-Optimum der AFR-A13G	62
1.6	Isoelektrischer Punkt (pI) der AFR-A13G	62
2	Engineering der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase zu erhöhter Thermostabi- lität und biochemische Charakterisierung der Mutanten	64
2.1	Vergleich der Zellaufschlüsse von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	64
2.2	Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) mit KOD- <i>QuikChange</i> PCR.....	65
2.3	Ergebnisse des Screenings der ersten Mutageneserunde.....	66
2.3.1	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P	68

2.3.2	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-E208G-G209C	69
2.3.3	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-E165N-R166K.....	70
2.3.4	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-G209Q	71
2.3.5	Kombination von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-E165N-R166K.	72
2.3.6	Kombination von AFR-A13G-G209Q und AFR-A13G-E165N-R166K.....	73
2.3.7	Kombination von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-G209P.....	73
2.4	Ergebnisse des Screenings der zweiten Mutageneserunde	74
2.4.1	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P- E330V	75
2.4.2	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P- E165H-R166T.....	77
2.4.3	Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P- E165S-R166G	78
2.5	Zufallsmutagenese des <i>afr-a13g</i> -Gens	80
2.6	Ergebnisse des Screenings: Variante III4G12.....	80
2.7	Separation der Mutationen der AFR-G13A-M31V durch ortsgerichtete Mutagenese	82
2.8	Kombination der AFR-G13A-M31V mit K207P und E208P.....	85
2.9	Zusammenfassung	87
2.10	Reinigung der thermostabilsten Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V	88
3	Entwicklung biokatalytischer Verfahren für die Synthese von D-Mannose und D-Rhamnose.....	91
3.1	Herstellung von D-Glucoson aus D-Glucose mit P2OxB2H aus <i>Peniophora gigantea</i>	92
3.2	Herstellung von 6-Deoxy-D-Glucoson aus 6-Deoxy-D-Glucose mit P2OxB2H1 aus <i>Peniophora gigantea</i>	93
3.3	Herstellung von D-Mannose aus D-Glucoson mit AFR-A13G aus <i>S. morelense</i> S- 30.7.5.....	95
3.4	Herstellung von D-Rhamnose aus 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR-A13G aus <i>S. more- lense</i> S-30.7.5.	108
IV	DISKUSSION	117
1	Gerichtete Mutagenese und Zufallsmutagenese zur Erhöhung der Thermosta- bilität der AFR-A13G	117
1.1	Iterative Sättigungsmutagenese (ISM)	118
1.1.1	Screening der ersten ISM-Runde	120

1.1.2	Kombinationen.....	124
1.1.3	Screening der zweiten ISM-Runde	126
1.2	Zufallsmutagenese durch <i>error prone</i> -PCR.....	129
1.3	Aktivität der AFR-Varianten	132
2	Biokonversionen mit AFR-A13G und den thermostabil verbesserten AFR-Varianten	134
2.1	Biokonversion von D-Glucoson.....	135
2.2	Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson	136
2.3	Produkt-Reinigung.....	138
V	ZUSAMMENFASSUNG	141
VI	ABSTRACT.....	142
VII	LITERATURVERZEICHNIS	143
VIII	ANHANG.....	167
1	Verwendete Vektoren	167
2	DNA- und Proteinstandards	169
3	pH-Optima der AFR-Varianten.....	171
4	Isoelektrische Fokussierung der AFR-Varianten	172
5	Bestimmung der T_{50}^{10} [°C]	173
6	Enzymkinetische Graphen.....	175
7	Abkürzungsverzeichnis	181
	Danksagung.....	183
	Während dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen	185
	Lebenslauf	186
	Eidesstattliche Erklärung	187

I Einleitung

1 Die Bedeutung der Kohlenhydrate

Kohlenhydrate sind Bestandteil aller Lebensformen und stellen deshalb die am häufigsten vorkommenden organischen Verbindungen der Erde dar (Wang et al. 2002). Sie fungieren z. B. als Energiespeicher, Brennstoffe und Metabolite, Strukturelemente der Zellwand von Bakterien und Pflanzen sowie des Außenskeletts der Arthropoden. Kohlenhydrate können mit Proteinen und Lipiden assoziiert sein und sind Bestandteile des Grundgerüsts von DNA und RNA. Zudem sind sie für Zell-Zell-Erkennungsvorgänge, Signalübermittlung, Infektionen und Entzündungen essentiell (Brandley und Schnaar 1986; Bucior und Burger 2004; Dove 2001; Dwek 1996; Jessel et al. 1990; Spillmann 1994; Tisoncik et al. 2007; Wang et al. 2002). Kohlenhydrate machen 95% der jährlich nachwachsenden Biomasse von ca. 200 Milliarden Tonnen aus, ihr Potential wird bis jetzt aber nur zu 4% genutzt. Da die hauptsächlich verwendeten fossilen Rohstoffe aber limitiert und nicht erneuerbar sind und deshalb immer hochpreisiger werden, erlangt die Erforschung der potenziellen industriellen Nutzung von nachwachsenden Kohlenhydraten auch aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens zunehmend an Bedeutung (Ekholm 2012).

Kohlenhydrat-Derivate werden bereits als niedrig kalorische Zuckerersatzstoffe wie z. B. Isomalt, sowie als Emulgatoren in der Nahrungsmittelindustrie, als glykosidische Tenside, Gefrierschutzmittel und als Komponenten von Pharmazeutika und Antibiotika eingesetzt (Drueckhammer et al. 1991). Seltene Zucker sind dabei von besonderem Interesse, da sie z. B. Komponenten der antimikrobiell wirksamen Aminoglykoside sind oder zur Synthese von Herzglykosiden, Inhibitoren der Zellproliferation, Virostatika und als Glukosidase-Inhibitoren verwendet werden (Asano et al. 2003; Lu et al. 2004). Auch das Antikoagulum Heparin, das 2001 das weltweit meistverkaufte verschreibungspflichtige Medikament darstellte, das Polysaccharid Hyaluronsäure zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, der Impfstoff gegen *Haemophilus influenza* Typ b und die antiviralen Wirkstoffe Oseltamivir (Tamiflu[®], Roche) und Zanamivir (Relenza[®], GlaxoSmithKline) basieren auf Kohlenhydraten. Viele weitere Wirkstoffe, wie z. B. Vakzine gegen Tumor-assoziierte Antigene, befinden sich noch in der Testphase (Alper 2001; Liu und Ye 2012; Werz und Seeberger 2005; Dove 2001).

Die chemische Synthese dieser seltenen Zucker ist meistens sehr komplex, da eine selektive Modifikation von Kohlenhydraten durch ihren multifunktionellen und chiralen Charakter mit einer aufwändigen Schutzgruppenchemie verbunden ist und nur zu geringen Ausbeuten führt (Röper 1991; Stoppok et al. 1992; Whiteside und Wong 1985). Der Zugang zu seltenen Zuckern und ihrer Derivate erfolgt deshalb zunehmend durch die Kombination von chemischen und enzymatischen Synthesen, wozu jedoch geeignete Biokatalysatoren benötigt werden.

1.1 Biologische Bedeutung der D-Mannose

D-Mannose ist ein Bestandteil von Holz. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass D-Mannose in Querschnitten von *Pinus Radiata D. Don* nach D-Glucose den zweitgrößten Kohlenhydrat-Bestandteil darstellt und dass der Gehalt dieser Hexose mit zunehmendem Alter dieser Kiefern-Art von 9,5% (1-3 Jahre) auf 14,5% (26-30 Jahre) ansteigt, was in dem bei juvenilen Bäumen erhöhten Anteil an Druckholz begründet ist (Berrocal et al. 2004; Saka 2001). D-Mannose kommt außerdem in Glykoproteinen und auf Zelloberflächen vor (Taguchi et al. 2003). Die Hexose ist z. B. Bestandteil des O-Polysaccharids der Lipopolysaccharidschicht von *Providencia alcalifaciens*, einem gramnegativen, peritrich begeißelten, fakultativ anaeroben, Penicillin-resistenten Stäbchen, das nosokomiale Infektionen verursacht (Ovchinnikova et al. 2009). Zudem exponieren apoptotische Zellen wie die murinen Leukämie-Zellen L1210 im Mausmodell verstärkt α -D-Mannose- und β -D-Galactose-reiche Glykoproteine in ihrer Plasmamembran, weshalb die Verwendung von D-Mannose als selektiver Marker zur Identifizierung und Isolierung apoptotischer Zellen diskutiert wurde (Bilyy et al. 2005).

D-Mannose spielt eine wichtige Rolle bei der Protein-Glykosylierung. Es ist dokumentiert, dass einige angeborene Glykosylierungsdefekte (*Congenital disorders of glycosylation*, CDG) mit der Mutation von Enzymen des Mannose-Metabolismus assoziiert sind (Freeze und Sharma 2010; Jaeken et al. 1993). Bei diesen vererbten Multisystem-Störungen können Erkrankungen der Klasse CDG I, die durch Defekte im N-Glykan-Aufbau verursacht sind, und weiter zur Untergruppe Ib, die durch eine Phosphomannose-Isomerase-Defizienz (EC 5.3.1.8.) gekennzeichnet ist, durch die Einnahme von D-Mannose behandelt werden (Aebi et al. 1999; Niehues et al. 1998).

Mit der Bestimmung der D-Mannose-Konzentration im Blut ist die Diagnose von Diabetes mellitus und von chronischer Glomerulonephritis möglich, da die Serum-Konzentration der Hexose bei diesen Erkrankungen erhöht ist (Pitkänen et al. 1997).

In den ersten industriellen Syntheseprozessen wurde D-Mannose durch Säurehydrolyse aus Birken- bzw. Buchenholz oder durch Verarbeitung von Glucose unter Hochtemperatur in Gegenwart eines Molybdat-Katalysators hergestellt (Takasaki 2007). Da die Ausgangsmaterialien aber knapp und die Reagenzien teuer waren, wurden andere Prozesse entwickelt. Heute wird Mannose z. B. durch eine thermostabile Mannose-Isomerase aus *Pseudomonas spec.* in Gegenwart einer reduzierenden Schwefelsäureverbindung (z. B. Natriumsulfit, Natriummetabisulfit) bzw. Ammoniumverbindung (z. B. Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat) bei 40-60°C und pH 5-8 im großen Maßstab aus Fructose synthetisiert. Durch Zugabe einer Glucose-Isomerase kann D-Mannose auch aus D-Glucose gebildet werden, einem preiswerten *bulk*-Kohlenhydrat (Takasaki 2007). Außerdem ist ein Prozess zur Isolierung und Reinigung von D-Mannose aus Palmkernen dokumentiert. Dabei werden die Kerne zunächst mit Schwefelsäure bei 100°C hydrolysiert und dann mit Mannan-abbauenden Enzymen fermentiert.

tiert. Nach der Filtration über eine Säule mit Silicagel, Entsalzung durch Ionenaustauscher und Kristallisierung mittels Ethanol wird reine D-Mannose mit einer Ausbeute von 48,4% des Palmkern-Gewichts erhalten (Zhang et al. 2009).

D-Mannose wird unter anderem zur Mannitolsynthese verwendet und ist Bestandteil von Zellkulturmedien. Da die Hexose das Wachstum von *Salmonella spec.* hemmt, wurde ihre Verwendung als Trinkwasser- und Futtermittel-Zusatz in der Geflügelzucht diskutiert. Außerdem verbessert sie den Geschmack verschiedener Nahrungsmittel, weshalb ihr Einsatz als Lebensmittelsupplement ebenfalls diskutiert wurde (Takasaki 2007).

Neben der bereits angeführten Behandlung der CDG besteht eine große Nachfrage nach D-Mannose als Antibiotika-Ersatz in der Langzeit-Prävention von unkomplizierten Harnwegsinfekten (Abraham et al. 1985; Head 2008; Michaels et al. 1983; Tao et al. 2011; Toyota et al. 1989). Harnwegsinfekte werden initiiert durch die Bindung pathogener Bakterien an die Rezeptoren der Uroepithelzellen. Diese Bindung wird vermittelt durch bakterielle Adhäsine (Johnson 1991; Toyota et al. 1989). Typische Adhäsine uropathogener *E. coli*, die 90% der Harnwegsinfekte verursachen, sind Typ 1 Fimbrien, P-Fimbrien und X Adhäsine. Dabei kann die von Typ 1 Fimbrien vermittelte Adhärenz durch D-Mannose blockiert werden, weshalb der Mechanismus auch als Mannose-sensitive Adhäsion bezeichnet wurde (Salit und Gotschlich 1977). Außerdem blockiert D-Mannose im Mausmodell nicht nur die Adhäsion, sondern verhindert auch die Invasion des Erregers in die Blasenepithelzellen und die anschließende Biofilm-Bildung (Wellens et al. 2008). Bei *Pseudomonas aeruginosa*, einem anderen uropathogenen gram-negativen Stäbchen, wurden in einer Zellkultur durch Zugabe von 1-4% D-Mannose sogar 27-40% der Flagellen entfernt und die Beweglichkeit und somit auch die Virulenz des Bakteriums stark eingeschränkt (DeGraft-Hanson und Heath 1990).

Harnwegsinfekte stellen in den USA mit jährlich 8,3 Millionen Arztbesuchen und geschätzten Kosten von 1,6 Milliarden US-Dollar die zweit-häufigsten Infektionen dar und auch in Deutschland erkrankt jede zweite Frau mindestens einmal in ihrem Leben daran (Head 2008; Tao et al. 2011; Wagenlehner et al. 2011). Dabei ist die Rezidivrate mit 50% im ersten Jahr sehr hoch. Außerdem sind Harnwegsinfekte mit 155000 Fällen pro Jahr die häufigsten nosokomialen Infektionen in Deutschland (Gastmeier und Geffers 2008). Da sich die Antibiotika-Resistenz der auslösenden Pathogene allmählich erhöht und die Behandlung mit Antibiotika oft mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen einhergeht, steigt die Nachfrage nach D-Mannose stetig an (Head 2008).

1.2 Biologische Bedeutung der D-Rhamnose

Während L-Rhamnose eine in der Natur weit verbreitete 6-Deoxyhexose darstellt, die in zahlreichen Oligo- und Polysacchariden pflanzlichen oder mikrobiologischen Ursprungs vorkommt, ist das D-Enantiomer sehr selten (Giraud und Naismith 2000; Kneidinger et al. 2001;

Mäki et al. 2002; Webb et al. 2004). D-Rhamnose (6-Deoxy-D-mannose) ist eine Komponente des O-spezifischen Antigens der Lipopolysaccharidschicht (LPS-Schicht) von Gram-negativen Menschen- und Pflanzenpathogenen und ist für die Wirt-Bakterium-Interaktion sowie die Etablierung der Infektion verantwortlich. Deshalb besitzt D-Rhamnose Potential für die Entwicklung von Oligosaccharid-Impfstoffen (Arsenault et al. 1990; Fauré et al. 2007; Giraud und Naismith 2000; Knirel et al. 1988; Osman et al. 1988, Rocchetta et al. 1999; Sadovskaya et al. 2000; Webb et al. 2004). Die Bedeutung der D-Rhamnose für die Virulenz pathogener Bakterien konnte bei Pseudomonaden gezeigt werden. Die Synthese der LPS-Schicht ohne D-rhamnosyliertes O-Antigen führte zu einer starken Reduktion der Virulenz und darüber hinaus zu einer gesteigerten Sensitivität der Bakterien für Antibiotika und Serum-Komponenten (Ramm et al. 2003).

D-Rhamnose konnte u.a. auch als Komponente der O-spezifischen Oligosaccharide der LPS-Schicht der Phytopathogene *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* und *Xanthomonas campestris* (Hickman und Ashwell 1966; Smith et al. 1985), des extrazellulären Glykans von *Myxobacterium* 402 (Morrison et al. 1987), des S-Layer-Glykoproteins von *Aneurinibacillus thermoaerophilus* L420-91T und der LPS-Schicht von humanpathogenen Bakterien, wie *Burkholderia cepacia* (Cerantola und Montrozier 1997), *Campylobacter fetus* (Senchenkova et al. 1996), *Stenotrophomonas maltophilia* (Cerantola und Montrozier 1997, LiPuma 2000; Winn und Wilkinson 1998) und *Helicobacter pylori* (Kocharova et al. 2000) nachgewiesen werden. Zum ersten mal wurde D-Rhamnose 1962 aus den kapsulären Polysacchariden eines Gram-negativen motilen Bodenbakteriums, des sogenannten „Stamm GS“, isoliert (Markovitz 1962).

In Mikroorganismen ist die Vorstufe der natürlich vorkommenden D-Rhamnose die nukleotid-aktivierte GDP-D-Rhamnose, die in 2 enzymatischen Reaktionen aus GDP-D-Mannose gebildet wird (Currie et al. 1995; Lightfoot und Lam 1993; Webb et al. 2004). Zunächst setzt die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (Gmd) GDP-D-Mannose zu GDP-4-Keto-6-deoxy-D-mannose um, das anschließend durch die GDP-4-Keto-6-deoxy-D-mannose-Reduktase (Rmd) zu GDP-D-Rhamnose reduziert wird (Kneidinger et al. 2001; Mäki et al. 2002, Rocchetta et al. 1998). Dabei fungieren NADH und NADPH als Hydrid-Donoren (Kneidinger et al. 2001).

Da in Menschen und Tieren D-Rhamnose und das für die Synthese von D-Rhamnose erforderliche Schlüsselenzym Rmd nicht vorkommen, wurde Rmd als Target für die Entwicklung neuer Antibiotika diskutiert (Mäki et al. 2002; Ramm et al. 2003; Webb et al. 2004). Die Kristallstruktur der Rmd aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde bereits bestimmt, um das Design geeigneter Inhibitoren des Enzyms durch molekulares *Modelling* zu ermöglichen (Kneidinger et al. 2001).

Da Oligosaccharide aus der Artischocke (*Cyana scolymus*) ebenfalls D-Rhamnose enthalten, könnte die 6-Deoxyhexose auch als Antiallergikum und als Bestandteil von sogenanntem

„Health Food“ angewendet werden. Ester der D-Rhamnose werden bereits jetzt als entzündungshemmende Agenzien und Sonnenschutzfaktoren in Kosmetika und pharmazeutischen Präparaten verwendet. Aufgrund ihrer vielfältigen potentiellen Funktionen besteht zunehmendes Interesse an der industriellen Synthese dieser 6-Deoxyhexose (Giffhorn 2011).

2 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5

Das Enzym 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR, EC 1.1.1.292) wurde aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. isoliert, einem symbiontischen Stickstoff-fixierenden Bakterium, das zur Familie der *Rhizobiaceae* gehört (Kühn et al. 2006).

2.1 Reaktion und Substrate der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase

Die AFR katalysiert die stereoselektive Reduktion von 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) zum Polyol 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) bei gleichzeitiger Oxidation des Cosubstrates NADPH (vgl. Abbildung 1). Dabei findet ein Hydrid-Transfer vom Nicotinamid-Ring des Cosubstrates zum Substrat statt (Dambe et al. 2006). Neben einem geringen Anteil von Dimeren sind zwei Formen des Edukts 1,5-AF nachgewiesen worden, wobei das Gleichgewicht fast vollständig auf der Seite des Hydrates lag (Andersen et al. 2002; Broberg et al. 1999; Taguchi et al. 1993). Die AFR reduziert die Keto-Form der 1,5-AF (Dambe et al. 2006).

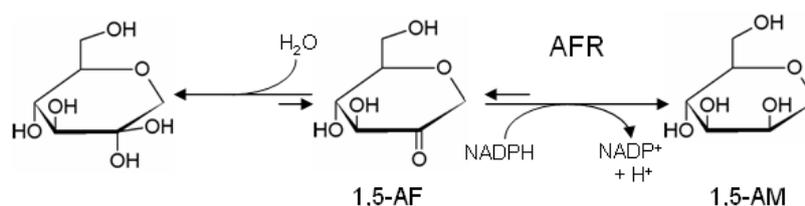


Abbildung 1: Reduktion der Keto-Form von 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) zu 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) durch 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5..

Das Substratspektrum der AFR ist sehr begrenzt. Neben 1,5-AF werden auch die Strukturanaloga D-Glucoson und 3-Keto-1,5-AF stereoselektiv zu den korrespondierenden manno-konfigurierten Produkten reduziert, allerdings mit einer viel geringeren Aktivität. Weitere 2-Ketoaldosen (Osone) werden zu Gemischen aus verschiedenen Anteilen manno- und gluco-konfigurierter Aldosen reduziert (Kühn 2004; Kühn et al. 2006). Osone sind seltene Verbindungen, die z. B. durch enzymatische Oxidation verschiedener Hexosen mit Pyranose-2-Oxidase (EC 1.1.3.10) synthetisiert werden können (Giffhorn 2000; Huwig et al. 1994). In der Pyranoseform sind Osone Strukturanaloga der 1,5-AF (Freimund und Köpper 2004). Diese

Pyran-Ringstruktur mit der C2-Carbonylgruppe ist für die Reduktion durch AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. essentiell (Kühn et al. 2006).

2.2 Funktion der 1,5-Anhydro-D-fructose im Stoffwechsel von Sinorhizobien

1,5-AF wurde bis jetzt unter anderem in Bakterien, Algen, höheren Pflanzen, Tiergeweben und menschlichen Zelllinien nachgewiesen, was auf ihr ubiquitäres Vorkommen hindeutet (Broberg et al. 1996; Kametangi et al. 1996; Konishi et al. 2000; Shiga et al. 1993; Yamanoouchi et al. 2003).

Während die Bedeutung dieses zyklischen Ethers für die Organismen bis jetzt noch nicht geklärt ist, konnte die Funktion der verschiedenen biologisch aktiven Metabolite bereits bestimmt werden. Bei Ratten wurde die 1,5-AF unter anderem in der Leber, den Adrenaldrüsen und der Milz nachgewiesen, wo sie analog zu ihrer Synthese in Pilzen und Algen durch eine α -1,4-Glucanlyase gebildet wird (Kametani et al. 1996). Der Katabolismus dieses Kohlenhydrats unterscheidet sich bei den Mitgliedern der verschiedenen Reiche jedoch grundlegend. In Säugerzellen wird 1,5-AF stereoselektiv durch eine AFR (EC 1.1.1.263) zu 1,5-Anhydro-D-glucitol (1,5-AG) reduziert, was den zweiten Schritt des *Third Glycogenolytic Pathways* darstellt, bei dem ausgehend von Glykogen in drei Enzym-katalysierten Schritten 1,5-AG-6-Phosphat gebildet wird (Kametani et al. 1996; Sakuma et al. 1998). 1,5-AG ist bei Säugern das häufigste Polyol des Blutplasmas und der Cerebrospinalflüssigkeit, wobei der individuelle Serumspiegel von 1,5-AG durch verschiedene Regulationsmechanismen konstant gehalten wird (Buse et al. 2003; Knowler 1994; Pitkanen 1973; Pitkanen und Pitkanen 1992; Servo und Pitkanen 1975). Dabei ist die 1,5-AG-Konzentration im Blut bei gesunden Individuen und Patienten mit Diabetes Typ II unterschiedlich, was 1,5-AG zu einem glykämischen Marker in der Diabetes-Kontrolle machte (Buse et al. 2003). 1,5-AG wird hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen und nur ein geringer Anteil wird durch Reduktion der 1,5-AF in der Leber synthetisiert (Yamanouchi und Akanuma 1994). In Säugern besteht die natürliche Funktion von 1,5-AG in einer Stimulation der Insulin-Sekretion, die zu einer gesteigerten Glucosetoleranz führt (Yamanouchi et al. 2003).

Ebenso gestaltet sich der Katabolismus von 1,5-AF in Pflanzen, wobei die zugehörige NADPH-abhängige AFR bis jetzt noch nicht isoliert werden konnte (Konishi et al. 2000).

Im Gegensatz dazu wurde in Rotalgen und Pilzen der *1,5-Anhydro-D-fructose-Pathway* nachgewiesen, der unter Stressbedingungen induziert wird (Bauté et al. 1991; Yu et al. 1995; Yu und Fiskesund 2006). Bei diesem *Pathway* entstehen durch Spezies-spezifische 1,5-AF-Dehydratasen Sekundärprodukte wie Microthecin, 5-Epipentomycin und die tautomeren Ascopyrone (Bauté et al. 1993; Bauté et al. 1991; Bauté et al. 1986; Bauté et al. 1988; Thomas et al. 2002; Yu 2005). Ascopyron wird seit einiger Zeit als potenzielles antimikrobielles Agens eingesetzt (Andersen et al. 2002; Elsser et al. 2003). Da es auf Gram-positive und Gram-

negative Bakterien wirkt, vermutet man, dass seine natürliche Funktion der Schutz der Pilze vor Bakterien ist (Thomas et al. 2002).

Der gleiche glykogenolytische Abbauweg wurde auch in Mikroorganismen nachgewiesen. In *E. coli* C600 wird unter Glucose-Mangel 1,5-AF zu 1,5-AG reduziert. 1,5-AG induziert anschließend die Glykogenolyse und gewährleistet so die Versorgung der Zelle mit Glucose. Sind Glucose oder 1,5-AG-Phosphat im Nährmedium vorhanden, wird der Glykogen-Abbau nicht angeregt (Shiga et al. 1999).

Die in Säugern, Pflanzen, Rotalgen, Pilzen und *E. coli* vorkommende AFR ist folglich ein regulatorisches Protein, dessen Produkt 1,5-AG eine Signalfunktion in der Glykogenolyse besitzt (Konishi et al. 2000; Sakuma et al. 1998; Shiga et al. 1999).

Da die AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. jedoch zum Wachstum auf 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle benötigt wird, handelt es sich bei dieser AFR um ein metabolisches Enzym. In *S. morelense* wurde ein alternativer *1,5-Anhydro-D-fructose-Pathway* nachgewiesen, bei dem aus 1,5-AF durch eine strikt NADPH-abhängige AFR 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) gebildet wird (Kühn 2004).

Der 1,5-Anhydro-D-fructose-Weg in Rhizobien

Beim *1,5-Anhydro-D-fructose-Pathway* handelt es sich um einen katabolischen Abbauweg der α -Glucane in Bakterien, Algen und Pilzen, der durch einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor induziert wird (Yu et al. 1995; Yu und Fiskesund 2006). Die erste Reaktion dieses Abbauwegs besteht in der Freisetzung der 1,5-AF vom nicht-reduzierenden Ende der Stärke oder des Glykogens durch die α -1,4-Glucanlyase (Yu et al. 1993; Yu und Pedersen 1993; Yu et al. 1995).

In Rhizobien wird 1,5-AF anschließend durch eine NADPH-abhängige AFR (EC 1.1.1.292) stereoselektiv zu 1,5-AM reduziert. Dabei ist eine Stimulation des Glykogenabbaus durch 1,5-AM, wie es für 1,5-AG bei *E. coli* C600 gezeigt wurde, denkbar (Shiga et al. 1999). 1,5-AM wird anschließend durch eine C1-Hydroxylierung zu D-Mannose umgesetzt, die in den Entner-Doudoroff-Weg eingeschleust werden und auf diese Weise als leicht verwertbare Kohlenstoffquelle in den Metabolismus der Bakterien eintreten kann. Im Zellextrakt von *S. morelense* S-30.7.5. wird die Hydroxylierung von 1,5-AM durch ein P450-Monooxygenase-System katalysiert (vgl. Abbildung 2, Kühn et al. 2006).

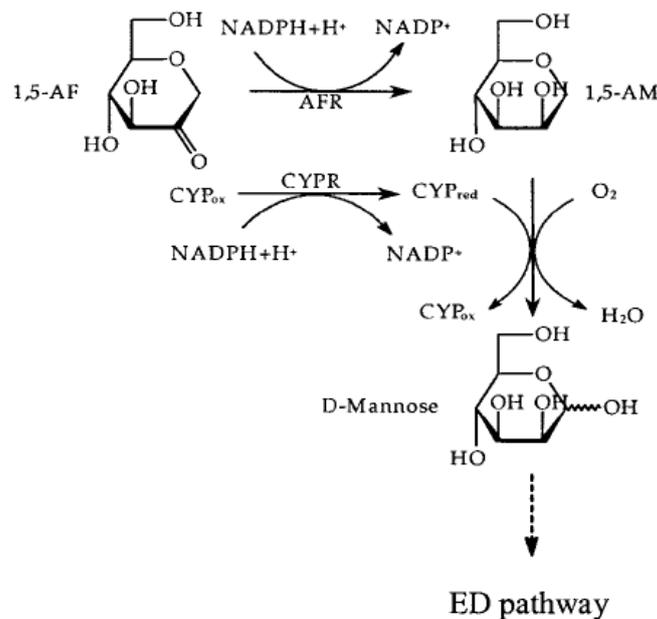


Abbildung 2: 1,5-Anhydro-D-fructose-Katabolismus in *S. morelense* S-30.7.5.. AFR: 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase, CYP: Cytochrom P450, CYPR: CYP-Reduktase, ED-pathway: Entner-Doudoroff-Weg (Kühn et al. 2006).

Die biologische Funktion dieses Abbauweges in Rhizobien konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Reduktion von 1,5-AF zu 1,5-AM könnte die Versorgung symbiontischer Gemeinschaften aus *S. morelense* S-30.7.5. und der Wirtspflanze mit Kohlenhydraten regulieren, bei denen 1,5-AF aus dem lytischen Glucan-Abbau gebildet werden könnte (Konishi et al. 2000). Es ist bekannt, dass in *S. morelense* S-30.7.5 durch 1,5-AF alle Enzyme des AF-Weges induziert werden (Kühn et al. 2006). Der Abbauweg wird nur aktiviert, wenn 1,5-AF die einzige Kohlenstoffquelle ist, sind D-Mannose oder D-Glucose vorhanden, kann keine AFR-Aktivität detektiert werden (Kühn et al. 2006). Die Oxidation von 1,5-AM zu D-Mannose durch eine P450-Monooxygenase könnte die Signalfunktion des Polyols auflösen und das Produkt D-Mannose könnte als bevorzugtes Wachstums substrat verwendet werden (Yu und Fiskesund 2006).

Stosik konnte in *S. meliloti* 1021 die Existenz der AFR und der von Kühn postulierten P450 Monooxygenase (CYP), die vom ORF Y01812 kodiert wird, nachweisen und die Reaktionen des in Abbildung 2 dargestellten *AF-Pathways in vitro* verifizieren, wobei die Monooxygenase-Aktivität durch Fusionierung mit den Elektronen-Transfer-Proteinen Putidaredoxin-Reduktase (*camA*) und Putidaredoxin (*camB*) aus *Pseudomonas putida* hergestellt werden konnte. Außerdem wurde die Enzymaktivität durch Deletionsexperimente, in denen *S. meliloti* 1021 die Fähigkeit zum Wachstum auf 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle verloren hatte, gezeigt (Stosik 2008).

In *S. meliloti* 1021 liegt das *afr*-Gen auf dem 3,65 Mb Hauptchromosom, das die Mehrheit der Gene enthält, die für metabolische Kern-Funktionen kodieren (Kühn et al. 2006). Dies

könnte darauf hindeuten, dass die AFR eine essentielle metabolische Funktion besitzt, besonders, da die korrespondierenden Gene auch in den intrazellulären Pathogenen *Brucella suis* und *B. melitensis* vorkommen, die eklatante metabolische Ähnlichkeiten mit Pflanzensymbionten wie *S. meliloti* und *M. loti* zeigen (DelVecchio et al. 2002; Paulsen et al. 2002). Die Gen-Region, die das *afr*-Gen in *S. meliloti* 1021 umgibt, lieferte jedoch keine weiteren Hinweise auf die AFR-Funktion (Kühn et al. 2006).

2.3 Die Tertiärstruktur der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase

Die AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. ist ein Monomer und besteht aus zwei strukturellen Domänen, zwischen denen in einer tiefen Spalte die Bindungstasche für den Dinukleotid-Cofaktor NADP(H) und das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade Lysin 94, Aspartat 176 und Histidin 180 liegen (vgl. Abbildung 3) (Dambe et al. 2006). Die größte strukturelle Homologie besitzt die AFR zu einer Untereinheit der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (GFOR, EC 1.1.99.28) aus *Zymomonas mobilis*, die zur GFO/IDH/MocA-Proteinfamilie gehört (Kühn et al. 2006). Obwohl die Aminosäuresequenzen nur zu 26% übereinstimmen, sind die sogenannten α -traces beider Proteine nahezu identisch (Dambe et al. 2006).

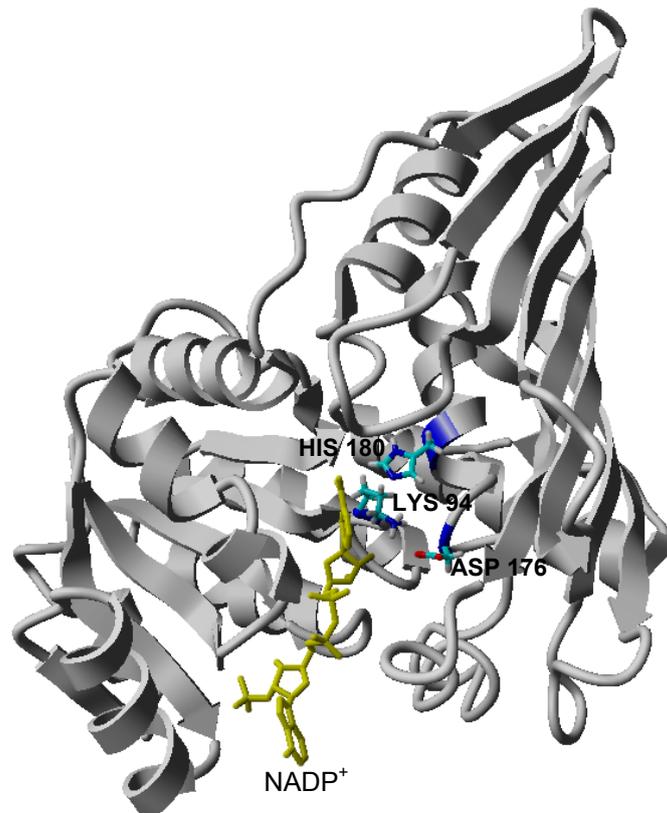


Abbildung 3: Tertiärstruktur der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase in Bänderdarstellung. Das Modell wurde anhand der Strukturdaten (Dambe et al. 2006) mit der Software YASARA Model erstellt. Die katalytische Triade ist im Stäbchenmodell mit Atomfarben dargestellt. Rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, türkis: Kohlenstoff. Gelbe Stäbchendarstellung: NADP⁺.

Die N-terminale Domäne der AFR (Aminosäurereste 1-120) zeigt ein typisches $\alpha\beta$ -Dinukleotid-Bindemotiv, die sogenannte Rossmann-Faltung, die aus einem zentralen β -Faltblatt besteht, das von sechs α -Helices umgeben ist, wobei eine Helix zur C-terminalen Domäne gehört (Dambe et al. 2006). Obwohl die Aminosäuresequenzen der Rossmann-Faltung unter den NAD(H)/NADP(H)-Bindeproteinen weit verbreitet ist, ist nur die sogenannte *fingerprint*-Region konserviert, die allgemein ca. 30 – 35 Aminosäurereste lang ist und aus den β -Faltblättern $\beta 1$ und $\beta 2$ und der verbindenden Helix $\alpha 1$ besteht (Bellamacina 1996; Wierenga et al. 1986). Bei der AFR wird diese Region von den Resten 3-33 gebildet. Das zentrale Motiv der *fingerprint*-Region stellt bei NADP(H)-Bindeproteinen eine Glycin-reiche Region mit der Konsensussequenz GxGxxA dar, wobei das erste Glycin wichtig für eine enge Kurve des *loops* zwischen β -Faltblatt $\beta 1$ und Helix $\alpha 1$ ist (Hanukoglu und Gutfinger 1989). Das konservierte Alanin liegt in der ersten Kurve von Helix $\alpha 1$ und seine Seitenkette ist gegen das β -Faltblatt gerichtet. Die Sequenz der *fingerprint*-Region der AFR lautet 8-GASTIA (vgl. Abbildung 4) (Dambe et al. 2006).

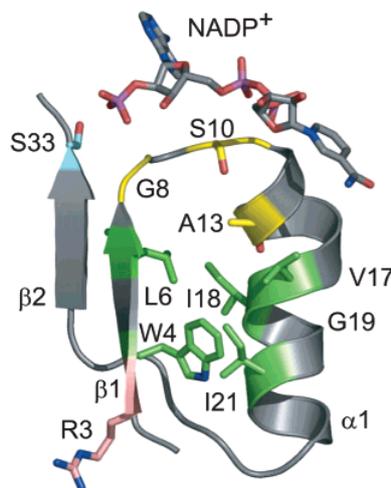


Abbildung 4: *Fingerprint*-Region der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase. Zentrales Motiv ist der *loop* zwischen β -Faltblatt $\beta 1$ und Helix $\alpha 1$ (gelb). Die Kontaktfläche zwischen dem zentralen β -Faltblatt und der Helix $\alpha 1$ ist grün dargestellt (Dambe et al. 2006).

Der Cofaktor ist dabei in einer gestreckten Konformation gebunden, wobei der Adenin-Ring und der Nicotinamid-Ring zueinander in *anti*-Position stehen. Dabei liegt der Adenin-Ring in einer anderen Orientierung vor als in der GFOR aus *Z. mobilis* (Gallivan und Dougherty 1999).

Die C-terminale Domäne (Aminosäurereste 121-333), die das aktive Zentrum enthält, besteht aus einem großen hauptsächlich antiparallel orientierten 8-strängigen β -Faltblatt, das die Struktur der AFR an einer Seite abschließt, und 5 α -Helices, wobei die Helices $\alpha 8$ und $\alpha 10$ in der bereits erwähnten tiefen Spalte zwischen den beiden Domänen lokalisiert und an Cosubstrat- und Substratbindung beteiligt sind. Helix $\alpha 6$ tritt in Wechselwirkung mit dem C-

terminalen β -Faltblatt und Helix $\alpha 9$ komplettiert die Rossmann-Faltung durch die Bindung an das β -Faltblatt der N-terminalen Domäne. Durch Aminosäuresubstitutionen konnte Kühn zeigen, dass mindestens die drei Aminosäurereste Lysin 94, Aspartat 176 und Histidin 180 an der Katalyse beteiligt sind (Dambe et al. 2006). Da Histidin 180 in äquivalenter Position zum Säure-Basen-Katalysator Tyrosin 217 in der GFOR liegt, fungiert dieser Rest wahrscheinlich ebenfalls als Säure-Basen-Katalysator und gewährleistet durch Polarisierung der Carbonylfunktion der 1,5-AF den Transfer des Hydrids von NADPH auf die *si*-Seite des Substrats (Cosgrove et al. 1998; Kühn et al. 2006). Dabei liegen die Reste Histidin 121 und Histidin 122 in der Tertiärstruktur nahe genug zu Histidin 180, um den Aufbau einer Wasserstoff-Brücken-Kaskade zu ermöglichen (Dambe et al. 2006).

Im aktiven Zentrum der Malat-Dehydrogenase, der Lactat-Dehydrogenase bzw. den Mitgliedern der GFO/IDH/MocA-Proteinfamilie Inositol-Dehydrogenase und MocA befinden sich ebenfalls Histidinreste (Birktoft und Banaszak 1983; Dambe et al. 2006).

Aufgrund des charakteristischen NADP(H)-Bindemotivs, dem konservierten Substrat-Bindemotiv und der katalytischen Triade wird die AFR zur GFO/IDH/MocA-Proteinfamilie gezählt (Kühn et al. 2006).

Die Primärstruktur der AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. zeigt keine Homologien zur hepatischen AFR (Dambe et al. 2006; Konishi et al. 2000; Sakuma et al. 1998). Die eukaryontische Variante bildet keine Rossmann-Faltung aus, zeigt strukturelle Homologien zu verschiedenen Mitgliedern der Aldose-Reduktase-Familie und besitzt vermutlich deren charakteristische α/β -Fass-Faltung (Harrison et al. 1994; Jez et al. 1997).

3 Proteinengineering

Im Laufe der Evolution wurden Enzyme optimal an ihre Aufgaben unter physiologischen Bedingungen angepasst. Dies hat oft eine eingeschränkte Stabilität und Aktivität zur Folge. Insbesondere die Anpassung an niedrige Temperaturen hat negative Auswirkungen auf den industriellen Einsatz dieser Enzyme. Außerdem sind viele Biokatalysatoren in Lösemitteln oder bei extremen pH-Bereichen wegen des fehlenden Selektionsdrucks in der Natur inaktiv (Sheldon 1999). Deshalb müssen die meisten natürlich vorkommenden Enzyme vor ihrer Anwendung durch verschiedene Mechanismen des Proteinengineerings an die speziellen Anforderungen des jeweiligen Syntheseprozesses angepasst werden. Durch Proteinengineering konnte bis jetzt unter anderem das Substratspektrum von Enzymen erweitert, ihre Enantioselektivität verändert, ihre Stabilität bei extremen Temperaturen, pH-Werten oder in organischen Lösemitteln verbessert oder ihre Cofaktor-Spezifität geändert werden (Carr et al. 2003; Glieder et al. 2002; Hao und Berry 2004; Joo et al. 1999; Kühn et al. 2006; May et al. 2000; Merz et al. 2000; Miyazaki et al. 2000; Moore und Arnold 1996; Reetz et al. 1997; Yoshikuni et al. 2006).

Enzymatische Eigenschaften können grundsätzlich durch zwei verschiedene Ansätze modifiziert werden: durch gerichtete Evolution oder rationales Design. Bei der gerichteten Evolution werden die Mechanismen der natürlichen Evolution nachgeahmt und es werden keine Strukturdaten des Enzyms benötigt (Chen und Arnold 1993; Stemmer 1994b). Einzige Voraussetzung ist ein effektives Selektions- oder Screeningsystem (Arnold et al. 2001; Chica et al. 2005; Shao und Arnold 1996). Bei diesem Ansatz werden durch Methoden wie *DNA-Shuffling*, *staggered extension* (StEP) oder *error prone-PCR* zufällig Mutationen in das Gen des Zielproteins eingeführt oder zwischen homologen Genen neu verteilt (Leung et al. 1989; Stemmer 1994a; Zhao et al. 1998). Bei der *error prone-PCR* bedient man sich der natürlichen Fehlerrate der *Taq*-Polymerase, die keine *proofreading*-Funktion besitzt. Diese Methode ist auf bestimmte Aminosäureaustausche, sogenannte *bias*, limitiert und es wird immer das komplette Gen zur Mutagenese eingesetzt (Jaeger und Reetz 2000; Wong et al. 2006; Zhou et al. 1996).

Liegen Strukturdaten vor oder sind Struktur-Funktions-Beziehungen des Zielproteins bekannt, kann ein rationales Proteindesign durchgeführt werden (Chica et al. 2005; Dalby 2007). Bei diesem Ansatz werden zunächst durch bioinformatische Analyse der Proteinstruktur einzelne Aminosäuren oder Genbereiche identifiziert, die die gewünschten Veränderungen der Enzym-Funktion bewirken könnten. Diese werden anschließend durch ortsgerichtete Mutagenese gezielt ausgetauscht (Dalby 2007).

In den letzten Jahren wurde eine Kombination aus rationalem und zufallsgerichtetem Proteindesign etabliert, bei der zufällig, z. B. durch DNA-Shuffling, eingeführte Mutationen im nächsten Schritt durch ortsgerichtete Mutagenese kombiniert werden (Cherry und Fidantsef 2003; Chica et al. 2005). Ein solcher semi-rationeller Ansatz ist z. B. die iterative Sättigungsmutagenese (ISM). Bei dieser Methode wird ein zufälliger Austausch einer vorher selektierten Aminosäure durchgeführt (Bartsch et al. 2008; Reetz et al. 2005).

3.1 Änderung der Cosubstrat-Spezifität der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase durch Proteinengineering

Nachdem die Kristallstruktur der AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. bestimmt worden war, konnten durch den Vergleich der Tertiärstruktur der AFR mit der strukturell homologen GFOR aus *Zymomonas mobilis* 5 Aminosäureaustausche in der *fingerprint*-Region des Enzyms identifiziert werden, die für die Cosubstrat-Spezifität des Enzyms essentiell sein könnten. Von diesen führte lediglich die Substitution von Alanin 13 gegen Glycin zu einem Enzym mit dualer Cosubstrat-Spezifität (Kühn et al. 2006).

In dieser Region ist die Umgebung des 2'-Phosphats der Adenin-Ribose für die Cofaktorspezifität, d. h. für die Präferenz des Enzyms für den phosphorylierten Cofaktor NADP(H), essentiell, da das Phosphat als sperrige Gruppe einerseits Platz braucht und seine negative

Ladung andererseits durch das Enzym kompensiert werden muss. Die Kompensation der Ladung findet bei AFR wahrscheinlich durch die Wechselwirkung des Phosphats mit dem Peptidbrücken-Stickstoff von Alanin 9 und den Seitenketten von Serin 33, Threonin 34 und Arginin 38 statt (vgl. Abbildung 4; Dambe et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass bei NADP(H)-bindenden Proteinen in der ersten Windung der Helix $\alpha 1$ ein Alanin-Rest konserviert ist (Hanukoglu und Gutfinger 1989; Scrutton et al. 1990). Da bei NAD(H)-bindenden Proteinen ein engerer Kontakt zwischen der Helix $\alpha 1$ und dem β -Faltblatt nötig ist, ist bei diesen stattdessen ein Glycinrest konserviert (Bellamacina 1996; Kleiger und Eisenberg 2002). Deshalb führte die Substitution von Alanin 13 gegen Glycin bei der AFR dazu, dass das ursprünglich strikt NADPH-abhängige Enzym auch NADH umsetzen konnte. Allerdings war die Affinität für NADH mit einem K_m -Wert von 1,1 mM um 550% höher als die für NADPH ($K_m = 0,02$ mM) (Kühn et al. 2006).

3.2 Erhöhung der Thermostabilität von Enzymen

In Syntheseprozessen werden bevorzugt thermostabile Biokatalysatoren eingesetzt (Chirumamilla et al. 2001; Schiraldi und De Rosa 2002). Das thermostabile, rekombinant exprimierte Enzym kann durch einen Hitzefällungsschritt einfacher und effektiver angereichert werden, da die thermolabilen Fremd-Proteine des Wirtsorganismus denaturieren (Young et al. 1999). Außerdem werden Syntheseprozesse bevorzugt bei erhöhten Temperaturen durchgeführt, um die Geschwindigkeit der Reaktion und dadurch die Raum-Zeit-Ausbeuten des Produktes zu steigern und mikrobielle Kontamination zu verhindern (Chirumamilla et al. 2001).

Allgemein wird die native Tertiärstruktur eines Proteins durch die Summe vieler Wechselwirkungen stabilisiert, z. B. durch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und den hydrophoben Effekt. Diese unterscheiden sich in der räumlichen Struktur, der Bindungsstärke und der Spezifität und werden vom umgebenden Milieu (z. B. dem pH-Wert) unterschiedlich beeinflusst (Creighton 1993). Elektrostatische Wechselwirkungen, die auch als Ionenbindung, Salzbrücke oder Ionenpaarbindung bezeichnet werden, treten zwischen elektrischen Ladungen auf, können attraktiv oder repulsiv sein und werden durch das Coulomb'sche Gesetz beschrieben. Wasserstoffbrücken sind ebenfalls elektrostatische Wechselwirkungen, die stark gerichtet sind und zwischen einem Protonendonator und einem partiell negativ geladenen Protonenakzeptor gebildet werden. Sie werden z. B. zwischen den Amid- und Carbonylgruppen des Peptidrückgrates gebildet und führen unter anderem zur Ausbildung von Sekundärstrukturen wie α -Helices und β -Faltblättern. Van-der-Waals-Wechselwirkungen entstehen aus der wechselseitigen Polarisierbarkeit dicht benachbarter Atome oder Atomgruppen zweier unpolarer hydrophober Aminosäuren, d. h. durch eine dicht gepackte Tertiärstruktur. Der hydrophobe Effekt bewirkt, dass hydrophobe Aminosäureseitenketten im Enzyminneren und polare und geladene Seitenketten hauptsäch-

lich an der Proteinoberfläche lokalisiert sind. Treibende Kraft ist der Entropiegewinn, der durch die Wassermoleküle hervorgerufen wird, die bei der Zusammenlagerung hydrophober Seitenketten freigesetzt werden (Delbrück 2003).

Strategien zur Erhöhung der Thermostabilität industriell relevanter Biokatalysatoren durch Proteinengineering zielten unter anderem auf die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken, die Verringerung konformatorischer Spannungen, die Verkürzung von Oberflächen-loops und damit assoziiert die Reduktion ihrer Flexibilität, die Ausbildung zusätzlicher Ionenbindungen und Disulfidbrücken, die Modulation der α -Helix-Dipol-Wechselwirkungen, die Veränderung der Neigung der α -Helix, die Optimierung der Entropie der α -Helix durch X-zu-Prolin-Austausche und die Verbesserung der Packungsdichte des Enzyms, der Hydrophobizität im Enzyminneren und der Oberflächenladung (Allen et al. 1998; Beeby et al. 2005; Chan et al. 2011; Chiu et al. 2006; Chothia und Finkelstein 1990; Fersht und Serrano 1993; Finkelstein und Ptitsyn 1987; Härd 2011; Jaenicke und Böhm 1998; Matthews 1993; Menendez-Arias und Argos 1989; Nicholson et al. 1991; Pace 2000; Perl et al. 2000; Spek et al. 1998; Strop und Mayo 2000; Vetriani et al. 1998; Vieille und Zeikus 1996; Vogt et al. 1997; Vogt und Argos 1997, Wintrode et al. 2001; Zhang et al. 1991). Dabei wurde gezeigt, dass bereits der Austausch einer einzelnen Aminosäure die Thermostabilität eines Proteins signifikant steigern kann. Das Ausmaß der Steigerung hängt von der Gesamtstruktur des Proteins und von der lokalen Umgebung der Aminosäureseitenketten ab (Numata et al. 2001).

Ein Beispiel für die signifikante Erhöhung der Thermostabilität eines Enzyms durch rationales Design ist die Thermolysin-ähnliche Protease (TLP) aus *Bacillus stearothermophilus*. Durch die Anpassung der Aminosäuresequenz des moderat stabilen Enzyms an ein thermophiles Homolog wurde eine Variante mit den 8 Aminosäureaustauschen A4T, T56A, G58A, T63F, S65P, A69P, G8C und N60C generiert, deren Halbwertszeit bei 100°C von unter 0,5 min auf 170 min anstieg. Diese Aminosäuresubstitutionen, die primär die Entropie des ungefalteten Stadiums der Protease durch einen Glycin-zu-Alanin-Austausch, zwei X-zu-Prolin-Austausche und eine zusätzliche Disulfidbrücke reduzierten, steigerten die Thermostabilität der Thermolysin-ähnlichen Protease um 340% (Van den Burg et al. 1998).

4 Biokonversionen mit Cosubstrat-Regenerierung

Cofaktor-abhängige Oxidoreduktasen wie die AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. kommen in der Industrie häufig zum Einsatz, um hochselektive Synthesen chiraler Alkohole, Hydroxysäuren oder Aminosäuren zu katalysieren (Hummel 1999). Bei diesen Redox-Biotransformationen dienen Nicotinamid-Cofaktoren wie NAD(H) und NADP(H) als Elektronenüberträger und werden theoretisch in stöchiometrischen Mengen benötigt (Liu et al. 2009). Aufgrund der hohen Kosten für diese Cosubstrate ist für eine wirtschaftliche Produktion in zellfreien Redoxprozessen ein effizientes System zur kontinuierlichen Cosubstrat-Regenerierung nötig.

Dieses System soll die Beschränkung der Reduktionsäquivalente auf katalytische Mengen ermöglichen, wobei die ökonomisch erforderliche Anzahl der Regenerierungszyklen vom monetären Wert des Produkts abhängig ist (Hummel 1997).

Bei der *in-situ*-Cosubstrat-Regenerierung unterscheidet man grundsätzlich zwischen biologischer, elektrochemischer, chemischer und photochemischer Cosubstrat-Regenerierung (Chenault et al. 1998; Fry et al. 1994; Morita et al. 1994; Ruppert et al. 1987; De Wildemann et al. 2007). Bei allen genannten Verfahren wird die Effizienz des Regenerierungssystems durch Berechnung der Zyklenanzahl oder *Total Turnover Number* (TTN) bestimmt. Die TTN gibt die Anzahl an Regenerierungszyklen an, d. h. wie oft ein Cosubstrat oxidiert und reduziert werden kann (Chenault und Whitesides 1987).

4.1 Enzymatische Cofaktor-Regenerierung

Da das Reduktionsmittel bei chemischen Cosubstrat-Regenerierungssystemen zu einer Inhibierung der Oxidoreduktase führen kann, elektro- bzw. photochemische Methoden nur über eine geringe Regioselektivität verfügen und mit diesen Regenerationssystemen allgemein nur geringe TTNs erreicht werden, bedient man sich bei präparativen Applikationen oft biologischen Methoden zur Cofaktor-Regenerierung. Weil es beim Einsatz ganzer Zellen ebenfalls zu Nebenreaktionen oder zu Substrat- bzw. Produkt-Inhibierungen kommen kann, werden häufig isolierte Enzyme zur Cosubstrat-Regenerierung eingesetzt (De Wildemann et al. 2007; Wong und Whitesides 1994). Die enzymatischen Verfahren erreichen hohe TTNs, setzen das Cosubstrat spezifisch um, ohne Nebenreaktionen zu verursachen, bieten selektive und milde Reaktionsbedingungen und wurden bereits intensiv erforscht (Liu et al. 2009; Steinsiek 2006). Sie werden unterteilt in Substrat-gekoppelte und Enzym-gekoppelte Regenerationssysteme (Peters 1998).

Bei der Substrat-gekoppelten Regeneration katalysiert ein Enzym sowohl die eigentliche Konversions- als auch die Cosubstrat-Regenerierungsreaktion, wobei ein zusätzliches Substrat zur Cofaktor-Regeneration dient. Nachteil des Substrat-gekoppelten Cosubstrat-Regenerierungssystems ist die mögliche Enzym-Inhibierung durch die hohe Zusatzsubstrat-Konzentration und die Akkumulation hoch reaktiver Carbonylspezies wie Acetaldehyd oder Cyclohexanon (Peters 1998). Die hohen Konzentrationen an Zusatzsubstrat sind jedoch nötig, um das Gleichgewicht dieser reversiblen Reaktion auf die gewünschte Seite zu verlagern (De Wildemann 2007). Außerdem kann eine Verlangsamung der Hauptkonversion eintreten, da sich die Aktivität des Enzyms auf beide Substrate verteilt und deshalb Teile der Enzymaktivität nicht für die Hauptsynthese zur Verfügung stehen (Seelbach et al. 1996).

4.1.1 Enzym-gekoppelte Regenerierung

Bei der Enzym-gekoppelten Regenerierung wird ein zweites Enzym mit zugehörigem Substrat eingesetzt, dessen Umsetzung den Cofaktor regeneriert. Bei dieser Methode ist essentiell, dass das zweite Enzym eine vom ersten Biokatalysator ausreichend abweichende Substratspezifität besitzt, um Beeinträchtigungen der Hauptkonversion zu vermeiden. Häufig werden kommerziell erhältliche Enzyme wie die Laktat-Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) zur Regenerierung von NAD^+ oder die Formiat-Dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) zur NADH -Regenerierung verwendet (Kragl et al. 1996; Lee und Whitesides 1985; Schütte et al. 1976).

Bei der Enzym-gekoppelten Cosubstrat-Regenerierung muss beachtet werden, dass die Hauptkonversion nicht durch die Anpassung der Reaktionsparameter (pH-Wert, Temperatur) an die Optima des zweiten Enzyms inhibiert wird (Peters 1998). Vorteilhaft bei der Enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung ist, dass das Reaktionsgleichgewicht beeinflusst werden kann (Schmidt et al. 1987). Dabei ist es jedoch nötig, die eingesetzte Enzymmenge für jedes Enzym paar zu optimieren, um weder einen Mangel noch einen Überschuss an Reduktionsäquivalenten zu erhalten (Peters 1998).

Biokonversionen mit 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase

Kühn et al. führten die ersten Biokonversionen mit AFR-(His)₆ aus *S. morelense* S-30.7.5. und NADPH -Regenerierung durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) und Glucose-6-Phosphat durch (Kühn et al. 2006). Dabei wurde eine TTN von 49 Zyklen erreicht. Diese Umsetzungen waren für die Herstellung größerer Produktmengen nicht vorgesehen, sondern dienten im Wesentlichen zur Identifizierung der Produkte.

Enzym-gekoppelte Cosubstrat-Regenerierung durch Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas spec.*

Die Glucose-Dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.47) aus *Pseudomonas spec.* ist eine Membran-gebundene Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängige Dehydrogenase, die zur Glucose/Quinat/Shikimat-Familie gehört und die wie alle Mitglieder dieser Familie über N-terminale Transmembranhelices verfügt. Sie katalysiert die regioselektive Oxidation von β -D-Glucose zu β -D-Gluconolacton unter gleichzeitiger Reduktion des Cosubstrats NADP^+ oder, in geringem Ausmaß, NAD^+ (Weckbecker und Hummel 2004). In wässriger Lösung hydrolysiert β -D-Gluconolacton unter Ringöffnung spontan zu β -D-Gluconat (vgl. Abbildung 5).

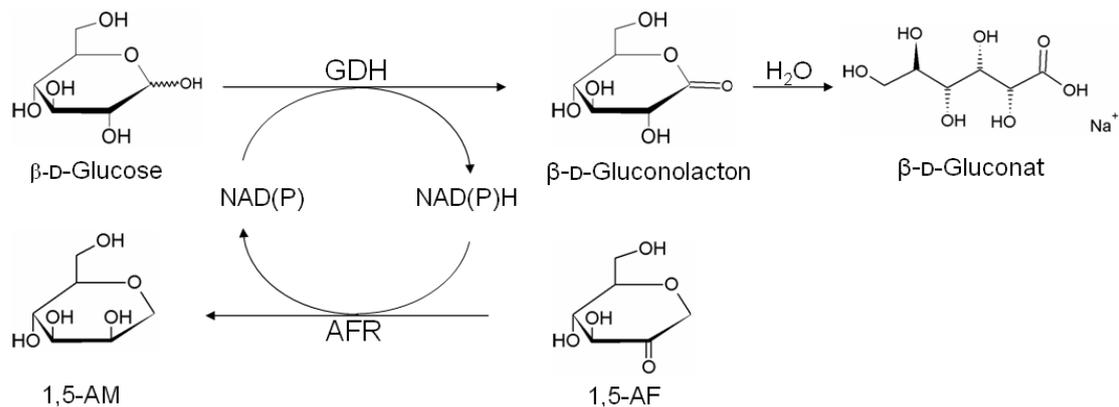


Abbildung 5: Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat durch die GDH mit NADPH-Regenerierung. Das NADPH steht als Cosubstrat für die Reduktion der 1,5-AF durch AFR zur Verfügung.

GDH kann zur Regeneration von NADPH und NADH eingesetzt werden. Während für die NADH-Regenerierung mit GDH aus *Pseudomonas spec.* in der Literatur einige Beispiele dokumentiert sind, ist die erste Etablierung einer NADPH-Regeneration mit dieser GDH ein Ziel dieser Arbeit (Hanson et al. 1999; Lin et al. 1999; Lisdat und Wollenberger 1998; Weckbecker und Hummel 2004).

Die GDH aus *Pseudomonas spec.* besitzt ein Molekulargewicht von 101 kDa und ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,5. Das Enzym verfügt sowohl über eine hohe Spezifität für β -D-Glucose als auch für 2-Deoxy-D-glucose und wird durch Silbernitrat, Quecksilberchlorid und Mono-Iod-Acetat inhibiert.

Für β -D-Glucose und $NADP^+$ als Cosubstrat hat GDH einen K_m -Wert von 12,5 mM, mit NAD^+ ist der Wert um 1,3 mM auf 13,8 mM erhöht. Für $NADP^+$ als Substrat ist der K_m -Wert 0,04 mM, der K_m -Wert für NAD^+ ist auf 0,31 mM erhöht (Sogabe et al. 1994).

5 Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger*

Die GOx ist ein gut charakterisiertes Glykoenzym, dessen Apoprotein aus zwei identischen Untereinheiten zu jeweils 583 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 80 kDa besteht. GOx gehört wie die AFR aus *S. morelense* zu den GMC-Oxidoreduktasen und wurde 1928 erstmals in Extrakten von *A. niger* entdeckt (Müller 1928). Jede der Untereinheiten hat ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) nicht-kovalent gebunden. Das Gen dieses Flavoproteins wurde bereits vollständig sequenziert, die Kristallstruktur ist ebenfalls verfügbar (Kriechbaum et al. 1989; Wohlfahrt et al. 1999).

Das Enzym katalysiert die Oxidation von β -D-Glucose zu β -D-Gluconolacton, das in wässriger Lösung unter Ringöffnung spontan zu β -D-Gluconat hydrolysiert. Dabei findet ein Elektronentransfer vom Substrat auf ein Sauerstoffmolekül unter Bildung von H_2O_2 statt (Kleppet 1966, vgl. Abbildung 6). Der Elektronenüberträger ist FAD (Wilson und Turner 1992).

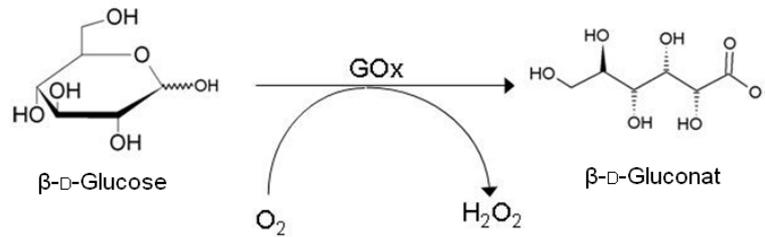


Abbildung 6: Regioselektive Oxidation von β-D-Glucose zu β-D-Gluconat durch die GOx.

GOx aus *A. niger* besitzt GRAS-Status und wird in der Industrie vielfach eingesetzt. Das Enzym wird beispielsweise zur Lebensmittelkonservierung, beim Backen, bei der Produktion von Trockenei-Puder, bei der Weinherstellung und bei der Gluconsäure-Produktion verwendet. Aufgrund ihrer elektrochemischen Aktivität ist GOx zudem eine wichtige Komponente in optischen Glucose-Sensoren zur Bestimmung des Glucose-Gehalts in Blutproben und Getränken (Chang 2010). Die Glucose-Oxidase ist sehr stabil (Falk 1999).

6 Ziele dieser Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten mit Methoden der molekularen Enzymevolution thermostabile Varianten des Enzyms AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. generiert und biochemisch charakterisiert werden. Dazu wurden 2 verschiedene Ansätze verfolgt: rationales Design durch iterative Sättigungsmutagenese (ISM) und Zufallsmutagenese durch *error prone*-PCR. Mit geeigneten Mutanten sollte im zweiten Teil dieser Arbeit ein Verfahren zur präparativen Umsetzung von 2-Keto-6-deoxy-D-glucose zu D-Rhamnose entwickelt werden. Da 2-Keto-6-deoxy-D-glucose aufwändig chemo-enzymatisch hergestellt werden musste, wurden die Reaktionsschritte mit einfach zugänglicher 2-Keto-D-glucose optimiert. Das Verfahren sollte auf einem Cosubstrat-Regenerierungssystem mit NADP⁺/NADPH basieren, um den Einsatz von NADPH auf katalytische Mengen zu reduzieren und die Wirtschaftlichkeit der Umsetzung gewährleisten zu können. Außerdem sollte ein Verfahren zur effizienten Reinigung von D-Rhamnose etabliert werden.

II Material und Methoden

1 Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer

Organismen

Tabelle 1: Verwendete Stämme (d. A. = diese Arbeit, X = Austausch durch alle 21 Aminosäuren).

Stamm	Genotyp/ Phänotyp	Quelle
<i>Sinorhizobium morelense</i> S.30.7.5.		Stamm- samm- lung*
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Stratage ne
<i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)pLysS	B F ⁻ <i>omp T hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte [pLysS Cam^r]</i>	Stratage ne
BL21Gold(DE3)-pET[A13G]	mit 6,3 kb Plasmid pA13G	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] ep	mit 6,3 kb Plasmid pA13G ep	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] K207X E208X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207X E208X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] G209X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - G209X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E165X R166X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E165X R166X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] P167X E168X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - P167X E168X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] H158X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - H158X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E330X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E330X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E208X G209X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E208X G209X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] K207P E208P	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G-K207P E208P] G209X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P -G209X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G-K207P E208P] E165X R166X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P -E165X R166X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] P167X E168X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P -P167X E168X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P]	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P	d. A.

H158X	E208P - H158X	
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E330X	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E330X	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] G209Q	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - G209Q	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E165N R166K	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E165N R166K	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] P167R E168G	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - P167R E168G	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] P167G E168A	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - P167G E168A	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] H158S	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - H158S	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] H158W	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - H158W	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] H158P	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - H158P	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] H158Y	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - H158Y	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] H158D	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - H158D	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E208T	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E208T	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E208G G209C	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E208G G209C	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E208F G209C	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E208F G209C	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E208H G209S	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E208H G209S	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] E208R G209N	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - E208R G209N	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E165N R166K	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E165N R166K	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- G209Q] E165N R166K	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - G209Q - E165N R166K	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] G209P	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - G209P	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E330K	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E330K	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E330N	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E330N	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E330V	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E330V	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E330H	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E330H	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E165H R166T	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E165H R166T	d. A.

BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E165S R166G	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E165S R166G	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- K207P E208P] E165G R166G	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - K207P E208P - E165G R166G	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] G13A M31V	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - G13A M31V	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] G13A	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - G13A	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G] M31V	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - M31V	d. A.
BL21Gold(DE3)pLysS-pET[A13G- G13A M31V] K207P E208P	mit 6,3 kb Plasmid pA13G - G13A M31V - K207P E208P	d. A.

*Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes

Vektoren und Plasmide

Tabelle 2: Eingesetzte Vektoren und Plasmide (d. A. = diese Arbeit, X = Austausch durch alle 21 Aminosäuren).

Vektor/ Plasmid	kb	Eigenschaften	Exprimiertes Enzym	Quelle
pET24a(+)	5,3	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , <i>Kan^R</i>	-	Novagen
pET [A13G]	6,3	pET24a(+) mit A13G	AFR-A13G	d. A.
pET [A13G] ep	6,3	pET24a(+) mit A13G ep	AFR-A13G ep	d. A.
pET [A13G] K207X E208X	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207X E208X	AFR-A13G - K207X E208X	d. A.
pET [A13G] G209X	6,3	pET24a(+) mit A13G- G209X	AFR-A13G - G209X	d. A.
pET [A13G] E165X R166X	6,3	pET24a(+) mit A13G- E165X R166X	AFR-A13G - E165X R166X	d. A.
pET [A13G] P167X E168X	6,3	pET24a(+) mit A13G- P167X E168X	AFR-A13G - P167X E168X	d. A.
pET [A13G] H158X	6,3	pET24a(+) mit A13G- H158X	AFR-A13G - H158X	d. A.
pET [A13G] E330X	6,3	pET24a(+) mit A13G- E330X	AFR-A13G - E330X	d. A.
pET [A13G] E208X G209X	6,3	pET24a(+) mit A13G- E208X G209X	AFR-A13G - E208X G209X	d. A.
pET [A13G] K207P E208P	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P	AFR-A13G - K207P E208P	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] G209X	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -G209X	AFR-A13G - K207P E208P - G209X	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E165X R166X	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P E165X R166X	AFR-A13G - K207P E208P E165X R166X	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] P167X	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P P167X E168X	AFR-A13G - K207P E208P P167X E168X	d. A.

E168X				
pET [A13G - K207P E208P] H158X	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P H158X	AFR-A13G - K207P E208P H158X	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E330X	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P E330X	AFR-A13G - K207P E208P E330X	d. A.
pET [A13G] G209Q	6,3	pET24a(+) mit A13G- G209Q	AFR-A13G - G209Q	d. A.
pET [A13G] E165N R166K	6,3	pET24a(+) mit A13G- E165N R166K	AFR-A13G - E165N R166K	d. A.
pET [A13G] P167R E168G	6,3	pET24a(+) mit A13G- P167R E168G	AFR-A13G - P167R E168G	d. A.
pET [A13G] P167G E168A	6,3	pET24a(+) mit A13G- P167G E168A	AFR-A13G - P167G E168A	d. A.
pET [A13G] H158S	6,3	pET24a(+) mit A13G- H158S	AFR-A13G - H158S	d. A.
pET [A13G] H158W	6,3	pET24a(+) mit A13G- H158W	AFR-A13G - H158W	d. A.
pET [A13G] H158P	6,3	pET24a(+) mit A13G- H158P	AFR-A13G - H158P	d. A.
pET [A13G] H158Y	6,3	pET24a(+) mit A13G- H158Y	AFR-A13G - H158Y	d. A.
pET [A13G] H158D	6,3	pET24a(+) mit A13G- H158D	AFR-A13G - H158D	d. A.
pET [A13G] E208T	6,3	pET24a(+) mit A13G- E208T	AFR-A13G - E208T	d. A.
pET [A13G] E208G G209C	6,3	pET24a(+) mit A13G- E208G G209C	AFR-A13G - E208G G209C	d. A.
pET [A13G] E208F G209C	6,3	pET24a(+) mit A13G- E208F G209C	AFR-A13G - E208F G209C	d. A.
pET [A13G] E208H G209S	6,3	pET24a(+) mit A13G- E208H G209S	AFR-A13G - E208H G209S	d. A.
pET [A13G] E208R G209N	6,3	pET24a(+) mit A13G- E208R G209N	AFR-A13G - E208R G209N	d. A.
pET [A13G- K207P E208P] E165N R166K	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E165N R166K	AFR-A13G - K207P E208P - E165N R166K	d. A.
pET [A13G - G209Q] E165N R166K	6,3	pET24a(+) mit A13G- G209Q - E165N R166K	AFR-A13G - G209Q - E165N R166K	d. A.
pET [A13G K207P E208P] G209P	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -G209P	AFR-A13G - K207P E208P - G209P	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E330K	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E330K	AFR-A13G - K207P E208P - E330K	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E330N	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P E330N	AFR-A13G- K207P E208P E330N	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E330V	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E330V	AFR-A13G - K207P E208P - E330V	d. A.

pET [A13G - K207P E208P] E330H	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E330H	AFR-A13G - K207P E208P - E330H	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E165S R166G	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E165S R166G	AFR-A13G - K207P E208P - E165S R166G	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E165H R166T	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E165H R166T	AFR-A13G - K207P E208P - E165H R166T	d. A.
pET [A13G - K207P E208P] E165G R166G	6,3	pET24a(+) mit A13G- K207P E208P -E165G R166G	AFR-A13G - K207P E208P - E165G R166G	d. A.
pET [A13G] G13A M31V	6,3	pET24a(+) mit A13G- G13A M31V	AFR-A13G - G13A M31V	d. A.
pET [A13G] G13A	6,3	pET24a(+) mit A13G- G13A	AFR-A13G - G13A	d. A.
pET [A13G] M31V	6,3	pET24a(+) mit A13G- M31V	AFR-A13G - M31V	d. A.
pET [A13G - G13A M31V] K207P E208P	6,3	pET24a(+) mit A13G- G13A M31V -K207P E208P	AFR-A13G - G13A M31V - K207P E208P	d. A.

Primer

Tabelle 3: Eingesetzte Primer (Sigma-Aldrich).

Bezeichnung	bp	Nucleotidsequenz (5' → 3')	T _m °C
T7*	20	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2
T7 term*	19	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	54,5
pET-gene-f	25	CGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCT	67,9
pET-gene-r	27	CCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGC	68,0
M13universalCS(-43)	23	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	62,4
M13reveseCS(-49)	24	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	61,0
AFR_for	22	ATGAATCGCTGGGGACTGATCG	59,8
AFR_rev	20	TCAAAGTCCCGTTTCGATCT	51,2
Mor-BamHI_for	35	GGATCCATGAATCGCTGGGGACTGATCGGCGCGAG	88,5
Mor-BamHI_for	35	GGATCCATGAATCGCTGGGGACTGATCGGCGCGAG	88,5
Mor-HindIII-His_rev	56	AAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGAAGTCCCGTTT CGATCTCGGCCGCCTGAC	93,9
AFR-A13G_for	27	GAGCACGATCGCGGGCGAATGGGTCAT	78,6
AFR-A13G_rev	27	ATGACCCATTCGCCCGCATCGTGCTC	78,6
ISM-A13G-A_for	44	CCATAGCGCCGGCATGGGCNNKNNKGGGGTGGAGGAC GGCGTCA	78,6

ISM-A13G-A_rev	44	TGACGCCGTCTCCACCCCMNNMNNGCCCATGCCGGC GCTATGG	78,6
ISM-A13G-B_for	33	GGCATGGGCAAGGAGNNKGTGGAGGACGGCGTC	78,1
ISM-A13G-B_rev	33	GACGCCGTCTCCACMNNCTCCTTGCCCATGCC	78,1
ISM-A13G-C_for	42	CTGCAGGGCTGGCGGCTGNNKNNKCCGGAAGCCGGTG GCGGC	79,5
ISM-A13G-C_rev	42	GCCGCCACCGGCTTCCGMNNMNNCAGCCGCCAGCCC TGCAG	79,5
ISM-A13G-D_for	42	GGCTGGCGGCTGGAGCGGNNKNNKGCCGGTGGCGGC GTCATT	78,5
ISM-A13G-D_rev	42	AATGACGCCGCCACCGGCMNNMNNCCGCTCCAGCCGC CAGCC	78,5
ISM-A13G-E_for	33	GTCTATCTGCCGCCGNNKCTGCAGGGCTGGCGG	79,3
ISM-A13G-E_rev	33	CCGCCAGCCCTGCAGMNNCGGCGGCAGATAGAC	79,3
ISM-A13G-F_for	35	TCAGGCGGCCGAGATCNNKACGGGACTTCACCACC	78,2
ISM-A13G-F_rev	35	GGTGGTGAAGTCCCGTMNNGATCTCGGCCGCCTGA	78,2
ISM-A13G-G_for	48	CATAGCGCCGGCATGGGCAAGNNKNNKGTGGAGGACG GCGTCATGGGG	79,7
ISM-A13G-G_rev	48	CCCCATGACGCCGTCTCCACMNNMNNCTTGCCCATGC CGGCGCTATG	79,7
A13G- E165NR166K_for	35	CAGGGCTGGCGGCTGAATAAGCCGGAAGCCGGTGG	78,9
A13G- E165NR166K_rev	35	CCACCGGCTTCCGGCTTATTCAGCCGCCAGCCCTG	78,9
A13G-G209P_for	28	CATGGGCCCTCCTCCGGTGGAGGACGGC	86,9
A13G-G209P_rev	28	GCCGTCCTCCACCGGAGGAGGGCCCATG	86,9
ISM-A13G-P207P208- B_for	33	GGCATGGGCCCTCCTNNKGTGGAGGACGGCGTC	86,1
ISM-A13G-P207P208- B_rev	33	GACGCCGTCTCCACMNNAGGAGGGCCCATGCC	86,1
A13G-G13A_for	25	CGAGCACGATCGCGCGCGAATGGGT	75,5
A13G-G13A_rev	25	ACCCATTCGCGCGCGATCGTGCTCG	75,5
A13G-M31V_for	31	GGCGAAGTGGTTTCGGTGATGAGCACCAGCG	76,1
A13G-M31V_rev	31	CGCTGGTGCTCATCACCGAAACCACTTCGCC	76,1

T_m = melting temperature = Schmelztemperatur; *zur Sequenzierung eingesetzt

2 Größenstandards, Enzyme und Kits

Größenstandards

Als Größenstandards wurde der GeneRuler 1kb-DNA-Leiter von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), der Dual Color Protein-Marker (10-250 kDa) von BioRad (München) und der Protein-Marker Servalyt Precotes 3-10 für die isoelektrische Fokussierung von Serva (Heidelberg) verwendet.

Enzyme

Die Enzyme DNase I, T4-DNA-Ligase und Peroxidase waren von Roche (Mannheim). Gelegentlich war T4-DNA-Ligase von AppliChem (Darmstadt). Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas spec.*, Katalase und gelegentlich Peroxidase waren von Sigma-Aldrich (München). Alkalische Phosphatase aus *Pandalus borealis* und die Restriktionsenzyme waren von Fermentas (St. Leon-Rot). FidelityTM-Polymerase war von GE Healthcare (Buckinghamshire). Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger* war von Serva (Heidelberg), KOD-Polymerase aus *T. kodakaraensis* war von Merck (Darmstadt) und Taq-Polymerase aus *T. aquaticus* war von Sigma-Aldrich (München).

Kits

Das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II und das peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit waren von Peqlab (Erlangen). Das Innuprep Bacteria DNA Kit und das Instant Bacteria DNA Kit waren von Analytik Jena (Jena). Das KOD HotStart DNA Polymerase Kit war von Novagen oder Merck (Darmstadt). Das HiYield[®] Plasmid Mini Kit war von Süd-Laborbedarf (Gauting).

3 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und Reagenzien entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad und wurden von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Monosaccharide waren von Sigma-Aldrich (München) bzw. toroma organics Ltd. (Saarbrücken) sowie Merck (Darmstadt).

4 Antibiotika

Antibiotika wurden den Nährmedien zur Anzucht der rekombinanten *E. coli*-Stämme zugesetzt (vgl. Kapitel II5). Sie wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Medien nach dem Abkühlen steril zugegeben.

Kanamycin (Kan, Serva, Heidelberg) wurde in einer Konzentration von 50 mg/ml H₂O_{deion} als Stammlösung angesetzt und den Medien in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Chloramphenicol (Cm, Boehringer) wurde in einer Konzentration von 30 mg/ml Ethanol als Stammlösung angesetzt und den Medium ebenfalls in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Lösungen zur molekularbiologischen Anwendung wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook und Mitarbeitern angesetzt (Sambrook et al. 1989).

5 Nährmedien

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Für Festmedien wurde 1,6% Agar (w/v) zugesetzt. Nicht autoklavierbare Zusätze, wie z. B. Antibiotika, Vitaminlösungen und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Minisart, Sartorius) und den Medien nach dem Autoklavieren zugegeben. IPTG (Roth, Karlsruhe) wurde in einer Konzentration von 100 mM in H₂O_{deion} als Stammlösung angesetzt und den Medien in einer Endkonzentration von 0,1 mM bzw. 1 mM zugesetzt.

Nährmedien für *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurden zwei Medien verwendet. Das LB-Medium enthielt 10 g Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 1 g Glucose pro 1 L H₂O_{deion}. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Das Pepton/Tryptonmedium bestand aus 2,5 g Glucose, 17,0 g Trypton/Pepton, 3,0 g Soja-Pepton, 5,0 g NaCl und 2,5 g K₂HPO₄ pro 1 L H₂O_{deion}. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Nährmedien für *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5.

Sinorhizobium morelense S-30.7.5. wurde in Nutrient Broth (NB)-Medium oder Mineral-Vitamin-Medium angezogen. Das NB-Medium bestand aus 3 g Fleischextrakt und 5 g Pepton aus Fleisch ad 1 L H₂O_{deion}. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Das Mineral-Vitamin (MV)-Medium enthielt 1,6 g 1,5-AF, 1,0 g KH₂PO₄, 0,5 g NH₄Cl, 0,4 g MgSO₄ * 7 H₂O, 0,4 g NaCl, 0,05 g CaCl₂ * 2 H₂O, 1,0 ml SL4-Lösung (10-fach) und 1,0 ml Vitaminlösung (10-fach) pro 1 L H₂O_{deion}. Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.

Die Vitaminlösung (10-fach) bestand aus 2 mg Biotin, 20 mg Nicotinsäure, 10 mg Thiamin, 10 mg 4-Aminobenzoessäure, 5 mg Panthothenat, 50 mg Pyridoxamin und 20 mg Cyanocobalamin ad 1 L H₂O_{deion}. (Pfennig, 1965). Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.

Die Spurenelementlösung SL4 (10-fach) enthielt 5,0 g EDTA, 2,0 g FeSO₄ * 7 H₂O, 0,1 g ZnSO₄ * 7 H₂O, 0,03 g MnCl₂ * 4 H₂O, 0,3 g H₃BO₃, 0,2 g CoCl₂ * 6 H₂O, 0,01 g CuCl₂ * 2 H₂O, 0,02 g NiCl₂ * 6 H₂O und 0,03 g Na₂MoO₄ * 2 H₂O pro 1 L H₂O_{deion}. (Pfennig und Lippert 1966).

6 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Bei der Kultivierung von *E. coli* wurde der Selektionsdruck durch Zugabe von Kanamycin (pET24a(+)) bzw. Chloramphenicol und Kanamycin (*E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS + pET24a(+)) erzeugt.

Zur Stammhaltung von *E. coli* BL21Gold(DE3) wurden Kolonien mit Hilfe steriler Zahnstocher bzw. 20 µl-Pipettenspitzen von LB_{Kan}-Agarplatten in 5 ml kanamycinhaltiges LB-Flüssigmedium überimpft (Rollrandröhrchen) und über Nacht (ü. N.) bei 37°C und 220 rpm auf einem Schüttler (Multitron-Schüttler, Infors) inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml der Zellsuspension bei 4000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert (Biofuge Pico, Heraeus), das Zellpellet in 350 µl LB_{Kan}-Medium resuspendiert, 500 µl 87% Glycerin zur Vermeidung von Kristallbildung zugesetzt, vermischt und bei -70°C gelagert.

Zur Stammhaltung von *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS in Mikrotiterplatten (Cryoplates) wurden die Kolonien mit Hilfe steriler Zahnstocher von LB_{Kan}-Agarplatten in 200 µl kanamycin- und chloramphenicolhaltiges Pepton/Tryptonmedium überimpft und die Mikrotiterplatte mit zwei BreathSeal™ (Greiner BioOne) abgedeckt. Alternativ dazu wurden 20 µl aus einer Mikrotiterplatten-Übernachtskultur in 180 µl kanamycin- und chloramphenicolhaltiges Pepton/Tryptonmedium in Cryoplates überimpft.

Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 37°C und 220 rpm auf dem Schüttler (Multitron-Schüttler, Infors). Anschließend wurden die Cryoplates bei 2000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert (Sigma 4K15, Rotor 11444, Braun), die Zellpellets in 100 µl einer LB_{Kan}-Glycerin-Mischung (1:1) resuspendiert und mit SilverSeal™ (Greiner BioOne) verschlossen bei -70°C gelagert.

7 Gentechnische Standardmethoden

7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine Kombination aus alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly und Phenol/Chloroform-Extraktion angewandt (Birnboim 1983). Es wurden 3 Puffer eingesetzt. Der Destabilisierungspuffer L1 enthielt 200 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl und 10 mM EDTA, der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt. Der Denaturierungspuffer L2 bestand aus 200 mM NaOH und 1 % SDS. Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt. Der Präzipitationspuffer L3 enthielt 3 M Kaliumacetat, der pH-Wert wurde auf 5,5 eingestellt.

1,5 ml bzw. 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 10 min bei 4000 rpm (Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugiert, das Bakterienpellet in 0,3 ml Destabilisierungspuffer L1 resuspendiert, 0,3 ml Denaturierungspuffer L2 zugeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 0,3 ml Präzipitationspuffer L3 zugesetzt, der Ansatz mehr-

mals invertiert und der Niederschlag 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge Pico, Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,45 ml Phenol/Chloroform extrahiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm zur Phasentrennung wurde die wässrige obere Phase abgenommen und mit 0,45 ml Chloroform extrahiert. Anschließend wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und 0,75 ml Isopropanol zugeben. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun) wurde das Pellet mit 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert, das Pellet bei 60°C getrocknet, in 50 µl H₂O_{dd} aufgenommen und bei -20°C gelagert. Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab) oder dem HiYield[®] Plasmid Mini Kit (Süd-Laborbedarf) isoliert. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Diese Kits kombinieren die alkalische Lyse mit einer Zentrifugationssäulenmethode.

7.2 Restriktionsspaltung von DNA und Restriktionsendonucleasen

Die eingesetzten Restriktionsendonucleasen und zugehörigen Puffer waren von Fermentas und wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt (vgl. Tabelle 4). Die Pfeile zwischen den Basen kennzeichnen die Schnittstelle.

Tabelle 4: Verwendete Restriktionsendonucleasen.

Enzym	Schnittstelle (5'→3')	Puffer	Dauer	Einsatz
<i>Bam</i> HI*	G↓GATCC	Y ⁺ /Tango	1 h	Genexzision 3'-Ende
<i>Hind</i> III*	A↓AGCTT	Y ⁺ /Tango	1 h	Genexzision 5'-Ende
<i>Dpn</i> I	GATC	---	2 h	Verdau von Template-DNA
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	10 x Puffer <i>Eco</i> RI	1 h	Linerarisierung
Fast digest [®] <i>Dpn</i> I	GATC	Fast digest [®] -Puffer	0,5 h	Verdau von Template-DNA
Fast digest [®] <i>Bam</i> HI [°]	G↓GATCC	Fast digest [®] -Puffer	5 min	Kontrollverdau
Fast digest [®] <i>Hind</i> III [°]	A↓AGCTT	Fast digest [®] -Puffer	5 min	Kontrollverdau

°/* = In Kombination verwendet

Für die Restriktion des *afr-a13g*-Inserts und des pET24a(+) Vektors mit *Bam*HI und *Hind*III wurden zwei Restriktionsansätze verwendet. Der erste Restriktionsansatz enthielt 5 µl Y⁺/Tango Puffer, 15 µl Insert- bzw. 10 µl Vektor-DNA und jeweils 2 µl *Bam*HI und *Hind*III pro 100 µl H₂O_{dd}. Der zweite Restriktionsansatz enthielt 1 µl Y⁺/Tango Puffer, 15 µl Insert- bzw. Vektor-DNA und jeweils 1 µl *Bam*HI und *Hind*III pro 20 µl H₂O_{dd}.

Die Inkubation erfolgte bei der jeweils angegebenen Dauer (vgl. Tabelle 4) bei 37°C. Außerdem wurde dem Vektoransatz zur Steigerung der Ausbeute an restringiertem Vektor unmittelbar nach der Restriktion mit *Bam*HI und *Hind*III 0,5 µl alkalische Phosphatase aus Eis-

meergarnelen (Fermentas) zugesetzt und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert, bevor das Enzym durch Einfrieren des Ansatzes bei -20°C oder durch 20 min Inkubation bei 80°C inaktiviert wurde.

DpnI wurde nach KOD *QuikChange*-PCR zum Verdau unmutierter Template-DNA verwendet. Mit *EcoRI* wurde nach TOPO-TA-Klonierung das *afI*-Insert aus dem TOPO®II-Vektor isoliert und konnte so in der anschließenden Fideli PCR als Template eingesetzt werden (vgl. Kapitel II10 und II14.2).

7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Länge von DNA-Fragmenten bzw. nach Restriktion (vgl. Kapitel II7.4) zur Reinigung der Insert- bzw. Vektorfragmente von Enzymen und Salzen durchgeführt.

Es wurde TBE-Puffer verwendet, der 90 mM Tris, 90 mM Borsäure und 2,5 mM EDTA pro 1 L H₂O_{deion} enthält. Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt. Der Probenpuffer (farbig) enthielt 5 ml 50%iges Glycerin, 100 mg Bromphenolblau, 5 ml TBE-Puffer und 4 ml H₂O_{deion}. Die DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt. Es wurden 35 ml Gele (7 x 10 cm) in BlueMarine 100-2-Elektrophoresekammern (Serva) eingesetzt.

Für 1% TBE-Kontrollgele wurde 1% Agarose in TBE aufgekocht und in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen, die DNA-Proben wurden mit ¼ Vol. Bromphenolblau-Probenpuffer versetzt und mit der 1 kb DNA-Leiter bei einer Spannung von 100 Volt aufgetrennt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Gel 15 min im Ethidiumbromidbad inkubiert, die gefärbte DNA im UV-Licht bei 312 nm detektiert (Geldokumentationssystem Universal Hood, BioRad) und auf dem Transilluminator abfotografiert.

Zur Reisolierung von DNA-Fragmenten wurden 1,4% Agarosegele hergestellt und die Elektrophorese bei einer Spannung von 60 Volt durchgeführt. Nach 10 min Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad wurde die DNA im UV-Licht detektiert und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert (vgl. Kapitel II7.4).

7.4 Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kits (Peqlab) nach den Herstellerangaben isoliert.

7.5 Reinigung von DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA wurde nach PCR, Doppelverdau des Vektors und des Inserts sowie nach Ligation beider gefällt, um Salze und Enzyme zu entfernen.

Der Ansatz wurde im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform gemischt und gevortext. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge Pico, Heraeus) wurde die obere Phase mit Ethanol gefällt und 1/10 des Volumens 4 M LiCl zugesetzt. Anschließend wurde das 2,5-fache des Volumens 98% Ethanol (-20°C) zugesetzt, 45 min bei -20°C gefällt und 30 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun). Danach wurde das DNA-Pellet 2 x 5 min mit 70% Ethanol gewaschen (Sigma 4K15, Braun), 10 min bei 60°C getrocknet und die DNA in 15 µl H₂O_{dd} resuspendiert.

Alternativ zur Fällung wurde die DNA zwischen Ligation und Transformation, nach KOD-*QuikChange* PCR und anschließendem *DpnI*-Verdau bzw. nach der Isolierung aus *E. coli* auf einem Dialyseplättchen (0,025 µm VSWP MFTM-Membran Filter, Millipore, Schwalbach) gegen sterile 10%ige Glycerin-Lösung 2 h – 4 h bei RT dialysiert, um Ausbeuteverluste, die mit der Reinigung der DNA durch Fällung einhergehen, zu vermeiden und die DNA aufzukonzentrieren.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration der isolierten Plasmide und der Vektoren bzw. Inserts nach Restriktion erfolgte nach 1:60 Verdünnung in H₂O in einem Gene Quant Photometer (Pharmacia Biotech) bei 260 nm. Dabei entspricht definitionsgemäß eine OD₂₆₀ von 1 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Ansatz (Sambrook et al. 1989). Zur Abschätzung der Reinheit und des Restproteingehaltes wurde die Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm in Relation gesetzt. Bei reiner DNA beträgt der Wert 1,8.

8 Ortsgerichtete Mutagenese durch KOD-*QuikChange* PCR

Mit Hilfe der KOD *Hot Start* DNA Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* (Novagen/Merck) wurde eine ortsgerechte Mutagenese, d. h. ein gezielter ligationsfreier *in vitro*-Austausch einzelner Basen bzw. Aminosäuren des *afr-a13g*-Gens durchgeführt. Diese Polymerase zeichnet sich durch eine sehr hohe Genauigkeit und Prozessivität aus, was besonders bei GC-reichen Sequenzen wie dem Gen der AFR mit einem GC-Gehalt von 64,8 mol% vorteilhaft ist (Kühn et al. 2006, Takagi et al. 1997).

Als Templates dienten die doppelsträngige zu mutierende Plasmid-DNA in *supercoiled* Konformation und zwei synthetische Oligonukleotidprimer, die die gewünschten Mutationen enthielten. Die KOD *Hot Start* DNA Polymerase replizierte beide Plasmidstränge im Thermocycler (MyCyclerTM, Biorad), wobei durch den Einbau der Oligonukleotidprimer ein mutiertes Plasmid mit Einzelstranglücken, sogenannten *staggered nicks*, generiert wurde. Vorteil dieser Methode ist, dass in fast allen *E. coli*-Stämmen die parentale Template-DNA methyliert

ist. Nach der PCR erfolgte deshalb die Behandlung des kompletten Ansatzes mit 1 μ l der Endonuclease *DpnI* (2 h bei 37°C), die selektiv die parentale, das heisst die unmutierte methylierte und hemimethylierte DNA abbaut. Das mutierte Plasmid wurde anschließend für den Einsatz im Mikrotiterplatten-Maßstab in *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS kloniert (vgl. Kapitel II12). Da dieser Stamm elektrokompent ist, musste der Ansatz vor Transformation durch Dialyse entsalzt werden (vgl. Kapitel II7.5).

Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm basierten auf dem KOD *Hot Start*-Manual (Novagen). Ein KOD-*QuikChange* PCR-Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 μ l 1 x KOD Reaktions-Puffer, jeweils 0,2 mM dNTPs, je 0,3 μ M *forward* und *reverse* Primer, 10 ng Template-DNA, 0,02 U/ μ l KOD *Hot Start* DNA Polymerase und 1,5 mM MgSO₄. Dabei waren Reaktionspuffer, dNTP-Mix, Polymerase und MgSO₄ im Kit enthalten.

Das folgende PCR-Programm (vgl. Tabelle 5) wurde zur Amplifikation im MyCycler™ (BioRad) verwendet.

Tabelle 5: PCR-Programm KOD-*QuikChange*. Die Schritte 2 - 4 wurden 20-mal im MyCycler™ (BioRad) durchgeführt. Nach Schritt 4 wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	98	10
2. Denaturierung	95	0,5
3. Annealing	63	1
4. Elongation	70	3,5*
5. Abkühlung	4	-

* 30 sec/ kbp

9 Gerichtete Evolution durch *error prone*-PCR

Um in das *afr-a13g*-Gen aus *S. morelense* S-30.7.5. zufällige Mutationen zur Erhöhung der Thermostabilität einzuführen wurde die *error prone*-PCR im MyCycler™ (BioRad) durchgeführt. Dazu wurde das Gen mit Hilfe der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Axon) amplifiziert. Diese Polymerase besitzt *in vitro* keine *proofreading* Funktion zur Korrektur fehlgepaarter Nukleotide und fügt deshalb bei der Amplifikation durchschnittlich alle 9000 Nukleotide eine Mutation ein (*error rate*). Um die Fehlerwahrscheinlichkeit der *Taq*-Polymerase zu steigern wurde dem Ansatz MgCl₂ in einer Endkonzentration von 6 mM – 8 mM bzw. MnCl₂ in einer Endkonzentration von 0,09 mM – 0,15 mM zugesetzt. Die in der Literatur dokumentierten Pipettierschemata wurden dazu leicht modifiziert (Jaeger et al. 2002, Jaeger und Eggert 2002, Leung et al. 1989).

Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 μ l 1 x MgCl₂-freien Puffer B, 1 μ l dNTP's, jeweils 1 μ l Primer Mor-Bam_for und Mor-HindIII-His_rev, 1 μ l Template DNA, 0,6 μ l *Taq*-

Polymerase und das entsprechende Volumen von $MgCl_2$ und $MnCl_2$ (Konzentration der Stammlösungen: 25 mM).

Tabelle 6: PCR-Programm *error prone*-PCR. Es wurden 35 Zyklen (Schritt 2 – 4) im MyCycler™ (BioRad) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	2
2. Denaturierung	95	0,5
3. Annealing	64	0,3
4. Elongation	72	0,6 - 1
5. Finale Elongation	72	7
6. Abkühlung	4	-

Nach der *error prone*-PCR wurden die Amplifikate zur Expression über die *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pET24a(+) ligiert (vgl. Kapitel II10.2) und zum Screening auf gesteigerte Thermostabilität im Mikrotiterplatten-Maßstab in *E. coli* BL21(DE3)pLysS kloniert (vgl. Kapitel II12).

10 Klonierung von PCR-Fragmenten

10.1 TOPO-TA Cloning®

Zur Regeneration der *E. coli*-Zellen nach Transformation durch Hitzeschritt bzw. durch Elektroporation (vgl. Kapitel II12) wurde SOC-Medium zugesetzt. Das SOC-Medium enthielt 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ und 20 mM Glucose pro 1 L $H_2O_{deion.}$

Um PCR-Amplifikate schnell und effizient zur Sequenzierung in einen Vektor klonieren zu können, wurde das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Bei der TOPO-TA-Klonierung handelt es sich um eine Ligase-freie Ligation. Voraussetzung hierfür sind TA-Überhänge der PCR-Produkte, so wie sie die *Taq*-Polymerase bereits während der *error prone*-PCR an das 3'-Ende des Gens anhängt. Nach PCRs mit anderen Polymerasen mussten vor der TOPO-TA-Klonierung TA-Überhänge generiert werden. Hierzu wurde jeder Ansatz nach der PCR mit 0,4 µl *Taq*-Polymerase versetzt und bei 72°C für 10 min inkubiert.

Der TOPO-TA Cloning®-Ansatz enthielt 4 µl PCR-Amplifikat, 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO®II-Vektor. Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* Top 10 One Shot-Zellen erfolgte durch Hitzeschritt (30 sec bei 42°C im Wasserbad) und abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Zellen mit dem kompletten Klonierungsansatz (6 µl) transformiert. Da-

nach wurden 250 μ l SOC-Medium zugesetzt und die Zellen auf dem Schüttler bei 220 rpm (Multitron, Infors, Bottmingen, Schweiz) und 37°C regeneriert. Die Inkubationsschritte erfolgten in der vorgeschriebenen Dauer. Anschließend wurden die Zellen auf LB_{Kan}/X-Gal-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Insert-tragende Klone wurden mittels Blau/Weiß-Screening selektiert und durch *Colony*-PCR (vgl. Kapitel II11) auf die Anwesenheit des korrekten Inserts untersucht.

10.2 Ligation

Die Ligation wurde zur Konstruktion rekombinanter Plasmide unter Verwendung einer T4-Ligase (Fermentas) durchgeführt. Das Insert wurde zuvor einer zufälligen Mutagenese durch *error prone*-PCR unterzogen und die DNA anschließend gefällt (vgl. Kapitel II9 und II7.5). Durch den vorhergehenden Verdau der AFR-A13G-Mutanten und des Vektors mit *Bam*HI und *Hind*III entstehen *sticky ends* im Doppelstrang der DNA, die von der Ligase durch Wiederherstellung der Phosphodiesterbindung zwischen zwei benachbarten Nukleotiden wieder verknüpft werden können.

Zur Optimierung des in der Ligationsreaktion eingesetzten Volumenverhältnisses von Insert und Vektor wurde nach Restriktion und erneuter Fällung der DNA zunächst die DNA-Konzentration [ng] in den beiden Ansätzen gemessen (vgl. Kapitel II7.5). Anschließend wurde das in der Ligation einzusetzende Volumen des Inserts mit folgender Formel berechnet.

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{ng Vektor} \cdot \text{kbp Insert}}{\text{kbp Vektor}}$$

Der Ligationsansatz wurde im Thermocycler (MyCycler™, Biorad) entweder über Nacht bei 16°C oder für 60 min bei 22°C inkubiert und in einem zweiten Schritt die Ligase 10 min bei 65°C inaktiviert. Danach wurde auf 4°C abgekühlt. Vor der Elektroporation (vgl. Kapitel II12) erfolgte eine Dialyse des Ligationsansatzes (vgl. Kapitel II7.5) zur Entsalzung der DNA.

11 Ligationskontrolle durch *Colony*-PCR

Mit Hilfe der *Colony*-PCR kann der Ligationserfolg kontrolliert werden, d. h. *E. coli*-Klone können auf Vorhandensein, Größe und Orientierung eines rekombinanten Inserts überprüft werden. Bei dieser Methode entfallen die einzelnen Arbeitsschritte der Anzucht, der DNA-Präparation und des Kontrollverdau, weshalb sie die schnelle und kostengünstige Kontrolle einer weit größeren Zahl von Kolonien ermöglicht (Luo und Mitchell 2002). Die *Colony*-PCR basiert auf der Methode von Gussow und Clackson (Gussow und Clackson 1989). Sie wird entweder mit vektorspezifischen Primern durchgeführt, die das Insert flankieren und das In-

sert zusammen mit einem kleinen Teil des Vektors amplifizieren (vgl. Tabelle 3) oder mit insertspezifischen Primern zur Analyse der Orientierung des Inserts im Vektor. In der PCR werden ganze Zellen in Form einer von einer LB_{Kan}-Platte gepickten Kolonie eingesetzt. Die Zellwände werden anschließend zum einen durch die Scherkräfte beim Durchmischen des Ansatzes, zum anderen während der PCR hitzebedingt destabilisiert. Das im Ansatz enthaltene DMSO steigert außerdem die Permeabilität der Membranen. Folglich tritt die Plasmid-DNA aus. War das gewünschte Plasmid mit dem korrekten Insert in der Zelle enthalten, wird es amplifiziert. Parallel zur *Colony*-PCR wird eine Masterplatte auf einer LB_{Kan}-Platte erstellt, so dass Klone mit korrektem Insert direkt weiter analysiert werden können.

Je nach Klonierungsart und Vektor wurden verschiedene Primer eingesetzt. Durch Blau/Weiß-Screening selektierte weiße Kolonien wurden mit M13-Primern auf ein erfolgreiches TOPO-TA-Cloning[®] untersucht, in den Expressionsvektor pET24a(+) inklonierte Inserts wurden durch pET-Primer analysiert. Durch PCR mit M13-Primern wurden die Inserts um 233 bp verlängert, mit pET-Primern waren es 126 bp. Bei der *Colony*-PCR wurde *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und 10 x Puffer der Firma Axon verwendet (vgl. Kapitel II2). Der *Colony*-PCR-Ansatz mit M13-Primern enthielt 0,5 µl Reaktionspuffer (10x), 0,3 µl MgCl₂ (Konzentration der Stammlösung: 25 mM), 0,1 µl dNTP-Mix, 0,4 µl DMSO, jeweils 0,1 µl der Primer M13universalCS und M13reverseCS und 0,04 µl *Taq*-DNA Polymerase pro 5 µl H₂O_{dd}. Beim *Colony*-PCR-Ansatz mit pET-Primern wurden nur 0,2 µl DMSO und die Primer pET-gene-f und pET-gene-r eingesetzt.

Jeweils 5 µl des Mastermixes wurden in 0,2 ml PCR-Eppendorfgefäße vorgelegt. Ein Klon wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf einer LB_{Kan}-Platte ausgestrichen. Der Mastermix wurde mit dem gleichen Zahnstocher angeimpft. Die LB_{Kan}-Platte wurde anschließend ü. N. bei 37°C bebrütet. Mit dem angeimpften Mastermix wurde die PCR durchgeführt. Nach der PCR wurden die Amplifikate mit je 1 µl Probenpuffer versetzt und in einem TBE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kapitel II7.3). Klone mit dem vollständigen Insert wurden weiter analysiert.

Das folgende PCR-Programm (vgl. Tabelle 7) wurde zur Amplifikation im MyCycler[™] (BioRad) verwendet.

Tabelle 7: PCR-Programm Colony-PCR. Die Schritte 2 – 4 wurden 25-mal durchgeführt. Die Annealing-Temperatur betrug für die M13-Primer 65°C, für die pET-Primer 62°C. Zur Kontrolle der Orientierung des Inserts im Vektor wurden die pET-Primer mit genspezifischen Gegenprimern eingesetzt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	5
2. Denaturierung	95	0,5
3. Annealing	62 / 65	0,5
4. Elongation	72	1,25
5. Finale Elongation	72	7
6. Abkühlung	4	-

12 Transformation

Herstellung elektrokompenter Zellen

E. coli BL21(DE3)-Zellen wurden ohne Antibiotikum angezogen, bei der Synthese elektrokompenter *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS-Zellen wurde dem Medium zur Selektion Chloramphenicol zugegeben, da das pLysS-Plasmid über eine Chloramphenicol-Resistenz verfügt.

400 ml LB-Medium wurden mit 1/100 Volumen einer frischen Übernachtskultur angeimpft, bei 37°C und 220 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert (Multitron-Schüttler, Infors), dann auf Eis gekühlt und 15 min zentrifugiert (4°C, 4000 x g, Sorvall® Evolution™ RC, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Anschließend wurde das Bakteriensediment zuerst in 400 ml und dann in 200 ml eiskaltem sterilem H₂O_{dd} resuspendiert und jeweils 15 min zentrifugiert (4°C, 4000 x g). Danach wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, 15 min zentrifugiert (4°C, 4000 x g) und in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert. Der Zelltitel sollte etwa 3 x 10¹⁰ Zellen/ml betragen. Aliquots der Zellen von 50 µl wurden bei -70°C gelagert (Hanahan 1983).

Elektroporation

Zur Regeneration der *E. coli*-Zellen nach Transformation durch Elektroporation bzw. durch Hitzeschritt (vgl. Kapitel II10.1) wurde SOC-Medium zugesetzt. Das SOC-Medium enthielt 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose pro 1 L H₂O_{deion.}

Bei der Elektroporation wurden die entsalzten elektrokompenten *E. coli*-Expressionsstämme in einem MicroPulser™ (BioRad) mit den Plasmiden transformiert (Hanahan et al. 1991).

Zellen, Ligationsmix, Elektroporationsküvetten und Eppendorfgefäße wurden auf Eis gekühlt. 50 µl elektrokompetente Zellen wurden mit dem kompletten Ligations- bzw. ISM-Ansatz (ca. 30 µl) in die eisgekühlte, trockene Elektroporationsküvette pipettiert und die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω durchgeführt. Anschließend wurden direkt 0,5 ml SOC-Medium zur Regeneration der Zellen zugesetzt, die Zellen für 60 min bei 37°C und 220 rpm regeneriert und auf LB_{Kan}-Platten ausplattiert, die Transformanten wurden durch die Kanamycin-Resistenz des Expressionsvektors pET24a(+) selektiert.

Wurde eine Retransformation mit durch Minipräparation (vgl. Kapitel II.7.1) aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen isolierter Plasmid-DNA durchgeführt, wurden lediglich 0,5 µl der DNA zu 50 µl elektrokompetenten Zellen gegeben.

13 DNA-Sequenzierung

Alle Plasmid-Proben mit den zu sequenzierenden afr-a13g-Varianten als Insert wurden nach Isolation aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (vgl. Kapitel II.7.1) entweder zu GATC Biotech AG (Konstanz) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt. Als Primer wurden die dort vorrätigen Standardprimer für den TOPO[®]II-Vektor bzw. das pET24a(+)-Plasmid verwendet. Alternativ wurden genspezifische Primer mitversendet. Beide Sequenzierservices führen die DNA-Sequenzanalyse nach Sanger auf ABI 3730XL-Sequenzierern (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien) durch (Sanger et al. 1977).

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Softwarepakets *DNASTAR* (Lasergene, Madison, Wisconsin, USA) oder mit dem *Contig-Express* von *Vector NTI* (Informax 9.0 bzw. 10.0 Advance, Invitrogen, Karlsruhe) analysiert. Die so ausgewerteten Sequenzdaten wurden anschließend durch *blastn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) nach dem BLAST-Algorithmus (Altschul et al. 1997) mit den in der NCBI (*National Center for Biotechnological Information*) - Datenbank hinterlegten Nucleotidsequenzen verglichen.

14 Klonierung und heterologe Expression der AFR

14.1 Isolierung der genomischen DNA aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5.

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. wurden 4 Lösungen verwendet (Kieser 1984). Die Lösung L1 enthielt 1,5 g Tris, 3,7 g EDTA (pH 8,0) und 51,3 g Saccharose pro 50 ml H₂O_{deion.} Die Lösung L2 bestand aus 2,0 g NaOH und 12,5 ml SDS-Lösung (20%) ad 250 ml H₂O_{deion.} Lösung L3 bestand aus 73,6 ml Kaliumacetat pro 250 ml H₂O_{deion.} Der pH wurde auf 5,5 eingestellt. Die 10% SDS-Lösung enthielt 10 g SDS pro 100 ml H₂O_{deion.}

200 ml NB- oder MV-Medium wurden mit 20 ml einer frischen Vorkultur angeimpft und ü. N. bei 28°C und 220 rpm auf dem Schüttler (Multitron-Schüttler, Infors) inkubiert. Dann wurden 100 ml der Zellsuspension 15 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun), das Zellpellet in 12,5 ml L1-Lösung resuspendiert, 2,5 ml L1-Lösung mit 10 mg/ml Lysozym (sterilfiltriert) zugesetzt und 1 h bei 37°C und 220 rpm auf dem Schüttler (Multitron-Schüttler, Infors) inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml 10% SDS-Lösung zugesetzt und durch vorsichtiges Invertieren gemischt, 30 min bei 65°C inkubiert, 5 ml L3-Lösung zugesetzt und mindestens 1 h auf Eis gekühlt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 x g (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun) wurde der klare DNA-haltige Überstand mit dem halben Volumen Phenol/Chloroform (P/Cl) (25:24:1) versetzt und 15 min bei 13000 x g (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun) zentrifugiert. Diese beiden Schritte wurden einmal wiederholt. Der klare Überstand wurde in ein 50 ml Falcon überführt und mit dem 1,5-fachen Volumen Isopropanol (-20°C) versetzt. Dann wurde die DNA mindestens 1 h bei -70°C gefällt, in 70% Ethanol (-20°C) aufgenommen und 10 min bei 5000 x g (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun) abzentrifugiert. Diese beiden Schritte wurden einmal wiederholt. Anschließend wurde die DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß 5 min bei 60°C getrocknet, 50 µl TE-Puffer bzw. H₂O_{deion} zugeben und ü. N. bei 4°C gelöst.

Alternativ dazu wurde die genomische DNA mit dem Innuprep Bacteria DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena) oder dem Instant Bacteria DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Diese Kits beruhen auf der Kombination der alkalischen Lyse mit einer Zentrifugationssäulenmethode.

14.2 afr-Gen-Amplifikation aus der genomischen DNA von *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5.

Das afr-Gen wurde aus der genomischen DNA von *S. morelense* S-30.7.5. mit Hilfe der FidelityTaq™ Polymerase (GE Healthcare) und der Primer AFR_for und AFR_rev amplifiziert. Die FidelityTaq™ Polymerase zeichnet sich durch eine sehr hohe Amplifikations-Genauigkeit aus, da sie sowohl über 5'→3'- als auch über 3'→5'-Exonuklease-Aktivität verfügt. Dadurch werden bei der Amplifikation keine unerwünschten Mutationen in das Gen eingeführt.

Ein Fidelity PCR Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 µl 1 x FidelityTaq™ Buffer, 0,24 mM dNTP Mix, jeweils 0,3 µM AFR_for und AFR_rev Primer, 10 ng Template-DNA und 0,5 U FidelityTaq™ DNA Polymerase.

Das folgende PCR-Programm (vgl. Tabelle 8) wurde zur Amplifikation im MyCycler™ (Bio-Rad) verwendet.

Tabelle 8: PCR-Programm Fideli PCR. Die Schritte 2 - 4 wurden 35-mal im MyCycler™ (BioRad) durchgeführt. Nach Schritt 5 wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	2
2. Denaturierung	95	0,5
3. Annealing	64	0,5
4. Elongation	68	1
5. Finale Elongation	68	7
6. Abkühlung	4	-

Die PCR-Amplifikate wurden anschließend in *E. coli* TOP10 kloniert (vgl. Kapitel II10.1) und sequenziert (vgl. Kapitel II13). Die Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI* verdaut (vgl. Kapitel II7.2) und im 1,4%-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II7.3). Anschließend wurde das Fragment mit dem peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit (Peqlab) reisoliert. Das gereinigte Amplifikat wurde in einer nachfolgenden Fideli PCR mit den Primern *Mor-Bam_for* und *Mor-HindIII-His_rev* als Template eingesetzt. Auf diese Weise wurde das *afr*-Gen mit Klonierungsschnittstellen und einem N-terminalen (His)₆ tag versehen. Bei dieser PCR wurde das gleiche Programm verwendet (vgl. Tabelle 8). Die Amplifikate wurden anschließend ebenfalls in einem 1,4%igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II7.3), mittels peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit (Peqlab) reisoliert und über die *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den linearisierten Expressionsvektor pET24a(+) ligiert (vgl. Kapitel II10.2). Anschließend erfolgte die Transformation in die *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen (vgl. Kapitel II12). Der Ligationserfolg wurde durch *Colony*-PCR (vgl. Kapitel II11) überprüft und das erhaltene Konstrukt wurde sequenziert (vgl. Kapitel II13).

Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert (vgl. Kapitel II7.1) und in das *afr*-Gen wurde die A13G-Mutation durch KOD-*QuikChange* PCR mit den Primern *AFR-A13G_for* und *AFR-A13G_rev* eingeführt (vgl. Kapitel II8). Nach *DpnI* Verdau und Dialyse wurde das Plasmid mit dem *afr-a13g*-Gen in *E. coli* BL21Gold(DE3) kloniert, sequenziert und das angereicherte Enzym charakterisiert (vgl. Kapitel II12, II13, II16 und II21). Außerdem wurde das Plasmid anschließend für das Screening im Mikrotiterplatten-Maßstab in *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS kloniert (vgl. Kapitel II12). Diese AFR-Variante mit der A13G-Mutation diente als Ausgangsvariante für alle Experimente dieser Arbeit.

14.3 Heterologe Expression der AFR-A13G in *E. coli*

Die heterologe Expression der AFR-A13G erfolgte in verschiedenen Maßstäben. Die zu induzierenden *E. coli*-Zellen wurden je nach Bedarf in Erlenmeyerkolben mit 1 L Volumen oder

zum Screening nach optimierten Varianten zuerst in Mikrotiterplatten (Greiner BioOne) und anschließend in Erlenmeyerkolben mit 100 ml Volumen angezogen.

Der Stamm *E. coli* BL21Gold(DE3) verfügt über eine chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5*-Promoters, der durch IPTG induziert wird.

E. coli BL21Gold(DE3)pLysS weist die gleichen Eigenschaften wie *E. coli* BL21Gold(DE3) auf, allerdings enthält dieser Stamm zusätzlich das pLysS-Plasmid. Dieses Plasmid kodiert für intrazelluläres Lysozym und trägt eine Chloramphenicol-Resistenz. Lysozym kann die Zellwand von *E. coli* schwächen, indem es im Peptidoglykan die 1,4-glykosidischen Bindungen zwischen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure spaltet. Auf diese Weise kann Wasser in die Zelle diffundieren, diese schwillt an und platzt. Solange die Cytoplasmamembran der Zellen intakt ist, wird das Lysozym jedoch im Zellinneren zurückgehalten. Erst durch die Zugabe des Tensids Triton X-100, das die Zellmembran von außen destabilisiert, kann das Lysozym zur Mureinschicht gelangen und die Zellyse herbeiführen. Diese Methode der Zellyse durch die Zugabe von Triton X-100 in den Puffer ermöglichte die Isolierung der AFR-A13G aus den Zellen im Mikrotiterplatten-Maßstab. Bezüglich Anzucht und Induktion verhielten sich beide Stämme gleich.

Expression in 30 ml Hauptkulturen

Nach dem Screening im Mikrotiterplatten-Maßstab (Greiner BioOne) wurden die Zellen, die AFR-A13G-Varianten mit erhöhter Thermostabilität exprimierten, zur ersten eingehenderen Charakterisierung der Mutanten in 30 ml Hauptkulturen kultiviert. Zur Anzucht der Zellen im 30 ml-Maßstab wurden 5 ml einer frischen Vorkultur in 25 ml Pepton/Tryptonmedium mit Kanamycin in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurden die Erlenmeyerkolben bei 37 °C (220 rpm) auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem die Zellen eine OD₆₀₀ von 2,6 erreicht hatten, erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM). Die Kolben wurden anschließend zur Expression der AFR-A13G für weitere 24 h bei 20°C und 200 rpm (RC-406, Infors AG) inkubiert. Durch die niedrige Temperatur wurde das Zellwachstum verlangsamt und so die Bildung von *inclusion bodies* verringert (Schein und Noteborn 1988).

Expression in 250 ml Hauptkulturen

Zur weiteren Charakterisierung der in 30 ml Hauptkulturen analysierten AFR-A13G-Varianten mit verbesserter Thermostabilität und zur Anreicherung von AFR-A13G und AFR-A13G-Varianten zur kinetischen Charakterisierung bzw. für Biokonversionen (vgl. Kapitel II22.2 und II21) wurde die 25 ml Vorkultur in 250 ml Pepton/Tryptonmedium mit Kanamycin und Chloramphenicol (Cm) in einem 1 L Erlenmeyerkolben überführt. Die anschließende Kultivierung erfolgte analog zur Expression im 30 ml-Maßstab.

Expression in Mikrotiterplatten

Vor Anzucht der *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS-Zellen im Mikrotiterplatten-Maßstab wurden zunächst zur Erhöhung der Zelldichte Masterplatten angefertigt. Dazu wurde jede Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher auf einer LB_{Kan}-Platte ausgestrichen, über Nacht bei 37°C kultiviert und am nächsten Tag in das mit 200 µl LB_{Kan+Cm} gefüllte Well einer Mikrotiterplatte (Greiner BioOne) umgeimpft. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 37°C auf dem Schüttler (220 rpm) inkubiert. Nach 2 h wurden zuerst jedem Well 20 µl Zellsuspension zum Beimpfen der Cryoplates für die Glycerinkulturen entnommen (vgl. Kapitel II6), dann erfolgte die Induktion der restlichen Zellsuspension mit 20 µl IPTG (10 mM in LB_{Kan}) pro Well. Die Expression der AFR-A13G-Varianten erfolgte ü. N. bei 20°C auf dem Rotationsschüttler (RC-406, Infors AG) bei 200 rpm.

15 Herstellung zellfreier Extrakte

Für den Zellaufschluss mit Ultraschall wurden die Pellets entweder in 100 mM KH₂PO₄ (pH 7,0) oder in 20 mM BisTris (pH 7,0) resuspendiert. Jeder Ansatz wurde mit 0,5 mg DNase I versetzt. Der BisTris-Puffer wurde ebenfalls beim Zellaufschluss mit Glasbeads eingesetzt. Der Puffer für den Aufschluss in Mikrotiterplatten enthielt 100 mM KH₂PO₄ (pH 7,0), 0,5 mg DNase I und 0,06% Triton X.

15.1 Zellernte von *E. coli*

24 h nach der Induktion erfolgte die Zellernte der in den Erlenmeyerkolben gewachsenen Zellen. Dazu wurde die Zellsuspension in Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 4000 x g und 4°C (Evolution RC, Sorvall) zentrifugiert. 1 g Bakterienpellet wurde anschließend für die weitere Anreicherung der AFR-A13G-Varianten durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (vgl. Kapitel II16.1) entweder in 3 ml (Ultraschall, *Glasbeads*) oder 1 ml (*French Press*) 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 7,0) mit DNase I, bzw. zur ersten eingehenderen Charakterisierung der AFR-A13G-Varianten im Rohextrakt in 3 ml 20 mM BisTris Puffer (pH 7,0) mit DNase I resuspendiert.

Die Zellernte der in den Mikrotiterplatten gewachsenen Zellen erfolgte ebenfalls nach 24 h durch zehnmünütige Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C (Sigma 4K15, Rotor 11444, Braun). Diese Zellpellets wurden anschließend in 100 µl 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 7,0) mit DNase I und 0,06% Triton-X 100 resuspendiert.

15.2 Zellaufschluss von *E. coli*

Ultraschallaufschluss

Die resuspendierten Zellpellets aus 30 ml bzw. 250 ml Kulturen wurden fünfmal 15 s mit 22 microns im Eiswasserbad beschallt und dazwischen für 30 s auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 23000 x g und 4°C (Evolution RC, Sorvall) zentrifugiert.

Aufschluss mit Triton-X 100

Die Mikrotiterplatten wurden 10 min bei 4°C mit 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets jeweils in 100 µl 100 mM KH₂PO₄ (pH 7,0) mit DNase I und 0,06 % Triton-X 100 resuspendiert. Nach 45 min Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurden die Mikrotiterplatten 10 min bei 4°C mit 2000 rpm zentrifugiert.

Aufschluss mit *French Press*

Der Aufschluss der Proben erfolgte mit Hilfe der *French*[®] *Pressure Cell press* (Polytec GmbH). Insgesamt wurden die Zellsuspensionen je dreimal bei 120 MPa passagiert und anschließend 10 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert.

Aufschluss mit Glasbeads

Zur Erhöhung des Screening-Durchsatzes der AFR-A13G-Varianten im 30 ml Kultivierungsmaßstab (vgl. Kapitel II14.3) wurden die Zellen mechanisch mit Glasperlen in einer Schwingmühle (MM 301, Retsch) aufgeschlossen, da auf diese Weise 20 Proben gleichzeitig behandelt werden konnten. Außerdem wird die Probe bei dieser Aufschlussmethode kaum erwärmt, d. h. die freigesetzten Proteine denaturieren nicht (Schütte und Kula 1988).

2 ml Eppendorfgefäße wurden bis zur 0,5 ml-Markierung mit Glasbeads (Durchmesser 0,1 - 0,25 mm) gefüllt und 1 ml der Zellsuspension zupipettiert. Der Zellaufschluss erfolgte in auf -20°C vorgekühlten Toneinsätzen in der Schwingmühle zweimal 5 min mit einer Frequenz von 30 Schwingungen pro s, dazwischen wurden die Suspensionen 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Suspensionen 15 min bei 13000 rpm und 4°C (Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugiert.

16 Anreicherung der AFR-A13G

Die weiterführenden Beschreibungen der verschiedenen Aufreinigungsschritte beginnen mit dem Rohextrakt, der nach Zellaufschluss und Zentrifugation erhalten wurde (vgl. Kapitel II15). Die Aufreinigungen wurden mit Hilfe des FPLC-Systems Äkta Purifier (GE Healthcare) durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm (UV900, GE Healthcare). Die Fraktionen wurden im Fraktionensammler Frac950 (GE Healthcare) aufgefangen.

16.1 Affinitätschromatographie an Nickelsepharose

Für die Affinitätschromatographie wurden 2 Puffer verwendet. Der Bindepuffer bestand aus 0,02 M NaH_2PO_4 und 0,5 M NaCl. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 0,5 M Imidazol und der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Die Aufreinigung der $(\text{His})_6$ -getaggtten Proteine erfolgte an 5 ml bzw. 1 ml Ni-Sepharose *Crude Fast Flow*-Säulen (GE Healthcare). Die Säule wurde mit Bindepuffer äquilibriert und nach dem Auftragen der Probe wurde zuerst mit Bindepuffer gespült. Die AFR-A13G wurde als $(\text{His})_6$ -Fusionsprotein mit Elutionspuffer, der 500 mM Imidazol enthielt, eluiert. Die Flußrate betrug bei der 5 ml-Säule 5 ml/min, bei der 1 ml-Säule 1 ml/min. Die Fraktionsgröße betrug jeweils 4 ml.

16.2 Umpufferung durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) wurden 20 mM BisTris (pH 7,0) und Azidpuffer aus 50 mM BisTris (pH7,0) und 0,03% NaN_3 ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ eingesetzt.

Nach Anreicherung der AFR-A13G über Nickelsepharose (vgl. Kapitel II16.1) wurde durch die HIC zum einen das Imidazol aus dem Ansatz entfernt, das bereits in geringer Konzentration die Proteinbestimmung und die isoelektrische Fokussierung stört, und zum anderen eine schnelle Umpufferung der AFR-A13G in ihren Lagerpuffer gewährleistet, in dem sie am stabilsten ist (Kühn 2004).

Es wurde eine mit 50 mM BisTris (pH 7,0) äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule (XK 26/20_G_25; 58,4 ml Säulenvolumen) verwendet. In diesem Puffer fand auch der Lauf und die anschließende Elution statt. Die Flussrate betrug 9 ml/min, die Fraktionsgröße 8 ml. Danach wurde die Säule bis zur nächsten Verwendung in Azidpuffer gelagert.

17 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce). Dabei handelt es sich um eine Modifikation der Lowry-Methode (Hartree 1972).

Als Arbeitslösung für die Proteinbestimmung wurden 50 Teile BCA mit einem Teil einer vierprozentigen Cu_2SO_4 -Lösung gemischt. Als Referenz diente eine Eichgerade mit Rindersealbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Hartree 1972). Die Proben wurden in drei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt und behandelt wie die Standards. Es wurden jeweils 25 μl Eichgerade bzw. Probe pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Dann wurden 200 μl Arbeitslösung zugeben und die Mikrotiterplatte sofort bei 37°C im Microplate Reader 680 XR (BioRad) inkubiert. Nach 30 min wurde die Reduktionsreaktion bei 562 nm detektiert und die Ergebnisse mit Hilfe des Programms Microsoft Excel ausgewertet.

18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reinheit der angereicherten AFR-A13G-Varianten wurde durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem engmaschigen Trenngel (pH 8,8) und einem saureren weitmaschigen Sammelgel (pH 6,8) überprüft (Laemmli 1970, Tulchin et al. 1976). Folgende Puffer und Lösungen wurden für die SDS-PAGE verwendet (Laemmli 1970):

Acrylamidstammlösung (40%) und TEMED wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Trenngel-Puffer enthielt 18,5 g Tris und 0,4 g SDS ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$. Der pH-Wert wurde auf pH 8,8 eingestellt. Der Sammelgel-Puffer bestand aus 3 g Tris und 0,2 g SDS pro 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$, der pH-Wert wurde auf pH 6,8 eingestellt. Der Elektrodenpuffer enthielt 3 g Tris, 14,4 g Glycin und 1 g SDS pro 1 L H_2O . Der pH-Wert wurde auf 8,3 eingestellt. Der Solubilisierungspuffer bestand aus 0,5 ml Glycerin, 3-4 Kristallen Bromphenolblau und 1 ml Lösung F. Die Lösung F enthielt 2,4 g Tris, 0,15 g SDS und 0,4 ml β -Mercaptoethanol ad 40 ml H_2O . Die APS-Lösung bestand aus 0,1 g Ammoniumpersulfat pro 1 ml H_2O . Der Fixierer enthielt 300 ml Methanol und 75 ml Essigsäure (in H_2O) pro 1 L H_2O . Die Färbelösung bestand aus 1% Coomassie Brilliant Blue R-250 und Fixierer.

Das 10%ige Trenngel bestand aus 2,5 ml Acrylamidstammlösung (40%), 2,5 ml Trenngel-Puffer, 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$, 50 μl APS-Lösung und 5 μl TEMED. Das 5%ige Sammelgel bestand aus 1,25 ml Acrylamidstammlösung (40%), 2,5 ml Sammelgel-Puffer, 6,25 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$, 50 μl APS-Lösung und 5 μl TEMED.

Die APS-Lösung wurde vor jeder SDS-PAGE frisch angesetzt, alle anderen Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Die Trenngellösung wurde bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol durch die Sammelgel-Lösung ersetzt.

Probenvorbereitung

Jeweils 20 μl Probe wurden mit 10 μl Solubilisierungspuffer versetzt und 10 min bei 100°C im Thermoblock (Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik) erhitzt. Anschließend wurden 20 μl Probe bzw. 7 μl Marker (Protein Ladder, 11-170 kDa, Fermentas) in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese mit 150 V (250 mA) gestartet (Mini-Protean3 Cell, Serva). Nach dem Eindringen der Proben in die Trenngele wurde die Stromstärke auf 200 V erhöht. Die Trennung wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte.

Coomassie-Färbung

Bei der Färbung und Fixierung durch Coomassie werden die im Gel aufgetrennten Proteine in einem Schritt fixiert und gefärbt (Zehr et al. 1989). Anschließend wird solange entfärbt, bis das Gel im Hintergrund der Proteinbanden farblos ist (Weber und Osborn 1969).

Zum Färben wurden die Gele entweder 2 h in Fixierer/Färbelösung bei RT auf dem Kipp-schüttler (GFL) inkubiert oder mit Fixierer/Färbelösung bedeckt und für 3 x 30 s bei 360 Watt in der Mikrowelle (FM411, Moulinex) inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit Fixierer entfärbt, dabei wurde die Lösung alle 30 min erneuert. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag bei 2 – 35 µg pro Bande.

19 Bestimmung von Enzym-Aktivitäten

19.1 AFR-Aktivität

Die AFR katalysiert die stereoselektive Reduktion von 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) zu 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) mit NADPH als Cosubstrat (Kühn et al. 2006).

Die Aktivität des Enzyms wurde in einem spektralphotometrischen Test in 1 ml Küvetten bei 30°C und 365 nm ($\epsilon_{\text{mM}} = 3,5 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) bzw. 340 nm ($\epsilon_{\text{mM}} = 6,3 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) gemessen (Bergmeyer 1983, Kühn et al. 2006). Die Aktivitäten von AFR-Mutanten, die NADH akzeptierten, wurden mit diesem Cosubstrat bestimmt (Kühn et al. 2006).

Der Küvettenansatz hatte in einem Volumen von 1 ml folgende Zusammensetzung: 100 mM BisTris (pH 6,5), 0,28 mM NADPH (in 1% NaHCO_3), 0,1 – 0,2 U Enzym (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$) und 28,3 mM 1,5-AF. Nach der Aktivitätsmessung wurde die Volumenaktivität und daraus resultierend die spezifische Aktivität nach Bergmeyer und Gawehn berechnet (Bergmeyer und Gawehn 1977).

Für den AFR-Aktivitätstest in Mikrotiterplatten wurde der Ansatz auf ein Volumen von 18,56 ml pro Platte umgerechnet. Nachdem in jedes Well mit 20 µl Rohextrakt 180 µl dieses Ansatzes pipettiert worden sind, wurde sofort die Aktivitätsmessung im Reader 680 XR (Bio-rad) bei 340 nm und 30°C für 66 sec durchgeführt. Die mit der Software Microplate Manager aufgezeichneten Rohdaten wurden anschließend mit Microsoft Excel ausgewertet. Da ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktionsänderung (ΔE) und Zeit (t) bestand, ließ sich $\Delta E/\text{min}$ für jedes Well über die Berechnung der Steigung der Gerade ermitteln.

Die 1,5-AF wurde von Dr. Yu (DANISCO Cultor Innovation, Kopenhagen) zur Verfügung gestellt.

19.2 Glucose-Dehydrogenase-Aktivität

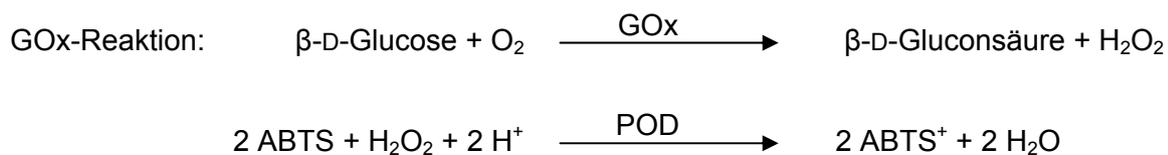
Die Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas spec.* (GDH, EC 1.1.1.47) katalysiert in Gegenwart von NAD die Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconolacton, das spontan zu Gluconsäure hydrolysiert (Xu et al. 2007). Die GDH-Aktivität wurde spektralphotometrisch in Makroküvetten bei 340 nm ($\epsilon_{\text{mM}} = 6,3 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) und 30°C gemessen. Dabei wurde das Protokoll von Sigma-Aldrich befolgt. Der Testansatz hatte in einem Volumen von 3 ml folgende

Zusammensetzung: 60 mM KH_2PO_4 (pH 7,6), 0,7 mM NAD (in 1% NaHCO_3), 0,1-0,2 U Enzym (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$) und 333,3 mM D-Glucose.

19.3 Glucose-Oxidase- und Pyranose-2-Oxidase-Aktivität: ABTS-Assay nach Danneel (Danneel et al. 1993)

Die Glucose-Oxidase (GOx, EC 1.1.3.4) aus *Aspergillus niger* katalysiert die Oxidation von β -D-Glucose zu β -D-Gluconolacton, das spontan zu β -D-Gluconsäure hydrolysiert (Kleppet 1966). Die Pyranose-2-Oxidase (P2Ox, EC 1.1.3.10) aus *Peniophora gigantea* katalysiert die Oxidation einer Reihe von Kohlenhydraten zu ihren entsprechenden 2-Keto-Derivaten (Freimund et al. 1998). Elektronenakzeptor ist sowohl bei der durch GOx als auch bei der durch P2Ox katalysierten Oxidation O_2 , das zu H_2O_2 reduziert wird.

Da das H_2O_2 in stöchiometrischen Mengen gebildet wird, kann es als Basis für ein photometrisches Testverfahren genutzt werden, indem in einer Konversionsreaktion das Chromogen ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) mit Hilfe von POD zum grünen ABTS^+ oxidiert wird, das bei 420 nm detektiert werden kann (Danneel et al. 1993).



Da das ABTS^+ -Kation im sauren pH-Bereich (pH 4,5) über einen Zeitraum von 83 h stabil ist, wird es durch die Bildung von D-Gluconsäure nicht deaktiviert (Cano et al. 1998).

Die spektralphotometrischen Messungen wurden in 1 ml Küvetten bei 420 nm (ϵ_{mM} von ABTS = $43,2 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) und 30°C durchgeführt (Michal et al. 1983). Der Testansatz hatte folgende Zusammensetzung: 2 mM ABTS (in 100 mM KH_2PO_4 , pH 7,0), 20 U/ml POD (in 100 mM KH_2PO_4 , pH 7,0), 0,1-0,2 U Enzym und 100 mM D-Glucose.

Analog zur GOx-Aktivität wurde auch die Aktivität der P2Ox vor ihrem Einsatz in Biokonversionen von D-Glucose und 6-Deoxy-D-glucose bestimmt.

20 Screening nach AFR-A13G-Varianten mit erhöhter Thermostabilität

Um die verschiedenen durch *error prone*- oder KOD-*QuikChange*-PCR (vgl. Kapitel II9 und II8) generierten AFR-A13G-Varianten auf erhöhte Thermostabilität untersuchen zu können, wurden die PCR-Amplifikate nach *DpnI*-Verdau dialysiert (vgl. Kapitel II7.5), der vollständige Ansatz zur Erhöhung der DNA-Konzentration zunächst in 50 μl elektrokompetente *E. coli* BL21Gold(DE3) kloniert (vgl. Kapitel II12) und die transformierten Zellen in 5 ml Trypton/

Peptonmedium über Nacht bei 37°C und 220 rpm angezogen. Die rekombinante Plasmid-DNA wurde am folgenden Tag durch Minipräparation (vgl. Kapitel II7.1) aus den Zellen isoliert, dann dialysiert und 50 µl elektrokompetente BL21Gold(DE3)pLysS-Zellen wurden ebenfalls mit dem vollständigen Ansatz transformiert.

Das erste Screening fand im Mikrotiterplatten-Maßstab (Greiner BioOne) statt, um möglichst viele Kolonien gleichzeitig auf die tendenzielle Erhöhung der Thermostabilität testen zu können. Die Zellen mit verbesserten AFR-A13G-Varianten wurden in einem zweiten Screeningsschritt zur präziseren Bestimmung der Thermostabilitätssteigerung in 30 ml Hauptkulturen angezogen (vgl. Kapitel II14.3).

Screening im Mikrotiterplatten-Maßstab

Nach Anzucht von AFR-A13G-Varianten in Mikrotiterplatten wurden durch Zugabe von Triton-X 100 Rohextrakte hergestellt und bei 85°C im Trockenschrank erhitzt. Nach 10 min Inkubation der Mikrotiterplatten hatten die Rohextrakte in den *Wells* (ca. 80 µl) eine mittlere Temperatur von 54°C. Dann wurden denaturierte Proteine 15 min bei 4°C und 2000 rpm abzentrifugiert. Vor und nach diesem Hitzeschritt wurde die Aktivität der AFR-A13G in den einzelnen Wells im Microplate Reader 680 XR (BioRad) durch die Abnahme der NADPH-Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 66 sec gemessen. Dazu wurden jeweils 20 µl des Rohextraktes in eine neue Mikrotiterplatte pipettiert und die Aktivität der AFR-A13G-Varianten gemessen (vgl. Kapitel II19.1).

Die Temperatur des Hitzeschritts im Mikrotiterplatten-Maßstab wurde so gewählt, dass die unmutierte AFR-A13G eine Restaktivität von 26% besaß. In jeder Mikrotiterplatte wurde zur Kontrolle mindestens in einem Well das Ausgangsenzym AFR-A13G mitgeführt. AFR-A13G-Varianten mit einer Restaktivität nach Hitzeschritt $\geq 80\%$ wurden selektiert, in 30 ml Hauptkulturen angezogen und die Steigerung der Thermostabilität präziser bestimmt.

Screening nach Kultivierung der Zellen im 30 ml-Maßstab

Zur präziseren Bestimmung der Thermostabilität wurden Zellen mit den besten AFR-A13G-Varianten aus den Mikrotiterplatten im 30 ml-Maßstab angezogen und abzentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils in 2 ml 20 mM BisTris (pH 7,0) resuspendiert und mit Ultraschall in Gegenwart von Glasperlen aufgeschlossen. Dann wurde 1 h bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden für den Hitzeschritt und die anschließende Aktivitätsbestimmung (vgl. Kapitel II19.1) verwendet.

Der Hitzeschritt dieser AFR-A13G-Varianten wurde in 1,5 ml-Eppendorffgefäßen bei 45,2°C im Thermoblock (Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik) durchgeführt. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass nach 10 min in jedem Eppendorffgefäß mit 1 ml Rohextrakt (oder 1 ml Verdünnung des Rohextraktes mit 20 mM BisTris (pH 7,0)) eine Temperatur von 45°C vorlag. Danach hatte im Kontrollansatz die nicht mutierte AFR-A13G nur noch 3,6%

Restaktivität. Varianten mit einer Restaktivität > 4% wurden selektiert und erneut *error prone* PCR oder KOD-*QuikChange* PCR ausgesetzt (vgl. Kapitel II9 und II8).

In der zweiten ISM-Runde mit AFR-A13G-K207P-E208P als Template waren die Varianten mit einer Restaktivität > 36% im Vergleich zur Ausgangsvariante thermostabil verbessert.

21 Biochemische Charakterisierung der AFR-A13G-Varianten

21.1 Erstellung von Strukturbildern der AFR-A13G

Modelle der AFR-A13G-Struktur wurden anhand der Strukturdaten der AFR aus *S. moreletense* S-30.7.5. mit dem Swiss-PdbViewer Version 4.0.1 und der *Modelling*-Software YASARA Version 7.9.3 erstellt (Dambe et al. 2006, Guex und Peitsch 1997, Krieger et al. 2002).

21.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die isoelektrische Fokussierung wurden folgende Lösungen verwendet:

Die Fixierlösung enthielt 20 % Trichloressigsäure (TCA) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$. Als Kühlmittel wurde Petroleumbenzin (reinst) eingesetzt. Die Anodenlösung 3 (Serva) bestand aus 0,17 g L-Asparaginsäure und 0,18 g L-Glutaminsäure pro 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$. Die Kathodenlösung 10 (Serva) enthielt 0,22 g L-Arginin, 0,18 g L-Lysin und 6 g Ethylendiamin ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$. Die Färbelösung bestand aus 4 Serva Blue-R-Tabletten à 50 mg ad 250 ml Entfärbelösung. Die Entfärbelösung enthielt 100 ml Essigsäure, 400 ml Methanol und 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$.

Als Gele wurden Servalyt Precotes pH 3-10 (150 μm , 125 mm x 125 mm, Serva) und als Marker der Proteinstandard P9 (IEF-Marker 3 – 10, Serva) verwendet. Die angereicherten Proben lagen nach Zentrifugation über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 15R, Sartorius) bzw. hydrophobe Interaktionschromatographie (vgl. Kapitel II16.2) als wässrige und entsalzte Lösungen vor. Nach Auftragen der Elektrodenflüssigkeiten wurde zunächst das Gel im elektrischen Feld bis zu einer Spannung von 500 V unter den folgenden Bedingungen vorfokussiert: low range, $U_{\text{Grenze}} = 2000 \text{ V}$, $P_{\text{Grenze}} = 6 \text{ W}$ (IEF Multiphor II, LKB Bromma). Anschließend wurden 10 - 20 μl der Proben bzw. 10 μl des Markers aufgetragen und die Fokussierung bis zur Spannungskonstanz durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese inkubierte das Gel mindestens 20 min in der Fixierlösung. Nach 1 min Waschen des Gels in 200 ml Entfärbelösung wurde es 5 - 7 min in Färbelösung inkubiert und zweimal 10 min in Entfärbelösung gewaschen, bis der Hintergrund entfärbt war.

Alternativ dazu wurde der pI mit dem "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" vom European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) berechnet (<http://www3.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl>).

21.3 Bestimmungen der K_m -Werte und Berechnung von k_{cat}

Die Michaelis-Konstante (K_m) hat die Dimension einer Substratkonzentration [mol/l]. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der das Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht (Stryer 2003). Für die AFR-Varianten wurde der jeweilige K_m -Wert für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson im Standardtest ermittelt, indem vier Enzymkonzentrationen eingesetzt wurden und jeweils die Substratkonzentration variiert wurde. Aus den Auftragungen $1/v$ gegen $1/S$ wurden aus den resultierenden Geraden die K_m -Werte bestimmt und gemittelt.

Der k_{cat} -Wert (auch Wechselzahl oder *turnover number* genannt) berechnet sich aus der spezifischen Aktivität V_{max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] multipliziert mit dem Molekulargewicht [g/mol], wobei V_{max} zunächst in die Einheit $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ umgerechnet werden muss. Es gilt:

$$V_{max} \cdot \text{mw} \left[\frac{\text{g} \cdot \text{mol}}{\text{g} \cdot \text{mol} \cdot \text{s}} \right] = k_{cat} \left[\text{s}^{-1} \right] \quad \text{und} \quad \frac{k_{cat}}{K_m} \left[\frac{1}{\text{M} \cdot \text{s}} \right] = \text{katalytische Effizienz}$$

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Excel.

21.4 Temperaturstabilität (T_{50}^{10} [°C])

Zur genauen Bestimmung der Temperaturstabilität der AFR-A13G-Varianten wurde die T_{50}^{10} [°C] bestimmt, das ist die Temperatur, bei der nach 10 min Inkubation des Enzyms noch 50% seiner Anfangsaktivität vorhanden ist (Reetz et al. 2006a; Reetz und Carballeira 2007). Dazu wurden Aliquots der über Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (vgl. Kapitel II16.1) und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie (vgl. Kapitel II16.2) angereicherten Proben 10 min bei 30°C, 35°C, 40°C oder 45°C im Thermoblock inkubiert und die AFR-Aktivität nach 10 min Inkubation bei 10000 rpm und 4°C im Standardassay gemessen (vgl. Kapitel II19.1). Alle Messwerte stellten Doppelbestimmungen dar. Durch Extrapolation konnte die T_{50}^{10} [°C] bestimmt werden.

21.5 pH-Optimum

Für die Bestimmung der pH-Optima der verschiedenen AFR-A13G-Varianten wurde der Aktivitätstest in verschiedenen Puffer-Systemen (Citrat, Acetat, BisTris, Tris-HCl) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 3,5 - pH 9,0) durchgeführt. Dabei wurden die Enzymverdünnungen ebenfalls in dem jeweiligen Puffer angesetzt. Die photometrischen Messungen wurden in 1 ml Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm im Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) durchgeführt. Sowohl der Küvettenblock als auch die ver-

wendeten Lösungen wurden auf 30°C temperiert. Aus der Extinktionsänderung wurde automatisch $\Delta E/\text{min}$ bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung verifiziert.

22 Biokonversionen

22.1 Biokonversion mit Pyranose-2-Oxidase aus *Peniophora gigantea*

Für die Reduktion von D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G und AFR-A13G-Varianten wurden zunächst quantitative Oxidationen von D-Glucose bzw. 6-Deoxy-D-glucose mit Pyranose-2-Oxidase (P2Ox, EC 1.1.3.10) aus *Peniophora gigantea* durchgeführt. Die Umsetzungen fanden unter Begasung mit reinem Sauerstoff (500 ml/min) in einem 1 L Titrationsgefäß (Metrum) bei einer Rührgeschwindigkeit von 500 rpm und 22°C statt (Mantelkühlung). Zur Entfernung von H₂O₂ wurde Katalase aus Rinderleber (Sigma-Aldrich) zugesetzt.

Die Biokonversionen wurden in einem Volumen von 500 ml H₂O_{deion} mit 600 mM Substrat durchgeführt. Es wurden 840 U P2Ox und 220 000 U Katalase eingesetzt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M (NH₄)₂CO₃ zwischen pH 6,5 und 7,0 eingestellt.

Der Verlauf der Umsetzungen wurde mit HPLC bestimmt. Es wurde die RCM Monosaccharid Ca²⁺-Säule (Phenomenex) mit Wasser als Fließmittel verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Vivaspin 500-Zentrifugalkonzentratoren (10000 MWCO, Sartorius) filtriert. Nach dem Umsatz wurde zur Abtrennung der Proteine eine Ultrafiltration (YM10-Membran, Amicon) durchgeführt, das Filtrat anschließend in Rundkolben bei -70°C eingefroren und im Lyophilisator Alpha 1-4 LD_{plus} (Christ) getrocknet. Da die Produkte hygroskopisch waren, wurden sie im Exsikkator über Trockenmittel bei 4°C aufbewahrt.

22.2 Biokonversion mit AFR-A13G und Cosubstrat-Regenerierung

Mit AFR-A13G und AFR-A13G-Varianten wurden Reduktionen von D-Glucoson oder 6-Deoxy-D-glucoson als Substrat durchgeführt. Zur Regenerierung von NADPH wurden D-Glucose und Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas spec.* (GDH, EC 1.1.1.47) verwendet.

Der Umsatz im 20 ml-Maßstab fand in einem 150 ml Titrationsgefäß (Metrum) bei 300 rpm und 30°C (Mantelheizung) statt. Der Reaktionsansatz nach Peters wurde modifiziert (Peters 1998). Er enthielt in einem Volumen von 20 ml 0,4 mmol BisTris (pH 6,5), 4 mmol D-Glucoson bzw. 6-Deoxy-D-glucoson, 4 mmol D-Glucose, 1,2 µmol NADPH (in 1% NaHCO₃), 0,024 mmol NADP⁺ (in 1% NaHCO₃), 760 U bzw. 800 U AFR-A13G bzw. AFR-A13G-Variante und 250 U GDH (in H₂O_{dd}).

Der Verlauf der Umsetzungen wurde mit HPLC (vgl. Kapitel II24.1) und DC bestimmt (vgl. Kapitel II24.2). Als HPLC-Säule wurde die RHM Monosaccharide H⁺ (Phenomenex) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden von den Enzymen mit Ultrafiltration durch eine

YM10-Membran (Amicon) getrennt, die Proben wurden vor HPLC (vgl. Kapitel II24.1) und DC (vgl. Kapitel II24.2) mit Vivaspin 500- Ultrafiltrationseinheiten (10000 MWCO, Sartorius) filtriert.

Nachdem die Reduktion quantitativ abgeschlossen war, wurden die Enzyme aus dem Ansatz durch Ultrafiltration (YM 30, Amicon) entfernt. Der Filter hatte eine Ausschlussgröße von 30 kDa.

22.3 Biokonversion mit Glucose Oxidase und Katalase zur Entfernung von D-Glucose und 6-Deoxy-D-glucose

Nach der Umsetzung von 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR mussten D-Glucose und 6-Deoxy-D-glucose aus dem Reaktionsmedium entfernt werden. Dazu wurden zunächst GOx und Katalase mit Hilfe von Vivaspin 2 oder Vivaspin 15R Ultrafiltrationseinheiten (5000 und 30000 MWCO, Sartorius) in 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,0) umgepuffert. Dann wurden im Filtrat des Biokonversionsansatzes D-Glucose und 6-Deoxy-D-glucose mit GOx zu den entsprechenden Gluconsäuren oxidiert (Pazur und Kleppe 1963). Der Reaktionsansatz wurde in einem 150 ml Titrationsgefäß (Metrum) bei 300 rpm und 30°C (Mantelheizung) inkubiert und mit O_2 (1 L/min) begast. Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung: 300 U GOx und 350000 U Katalase. Titriert wurde mit 2 M NaOH.

Der Verlauf der Umsetzungen wurde mit HPLC (vgl. Kapitel II24.1) und DC (vgl. Kapitel II24.2) verfolgt. Als HPLC-Säule wurde die RHM Monosaccharide H^+ (Phenomenex) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden von den Proteinen mit Ultrafiltration (YM10-Membran, Amicon) getrennt, Proben wurden vor HPLC (vgl. Kapitel II24.1) und DC (vgl. Kapitel II24.2) mit Vivaspin 500-Ultrafiltrationseinheiten (10000 MWCO, Sartorius) filtriert.

23 Reinigung der D-Rhamnose und des D-Glucosons

Gemischter Ionenaustauscher

Nach GOx/Katalase-Reaktion (vgl. Kapitel II22) wurde der 20 ml Ansatz zur Entfernung von geladenen Bestandteilen 10 min bei 28°C und 220 rpm mit 8 g Serdolit[®] MB-2 inkubiert. Anschließend wurde der gemischte Ionenaustauscher durch Vakuumfiltration über einen Filter mit 0,2 µm Porengröße (Sartorius) entfernt und die vollständige Eliminierung geladener Komponenten durch die Messung der Extinktion bei 260 nm (NADP(H)) und der Leitfähigkeit verifiziert. Die vollständige Eliminierung von D-Gluconat wurde durch HPLC (vgl. Kapitel II24.1) überprüft.

Produkt-Trocknung durch Lyophilisierung

Zum Abschluss wurden die Reaktionsprodukte in Rundkolben bei -70°C eingefroren und im Lyophilisator Alpha 1-4 LD_{plus} (Christ) getrocknet. Hygroskopische Produkte wurden im Exsikkator unter Vakuum bei 4°C aufbewahrt.

24 Kohlenhydrat-Analytik

24.1 Produktbestimmung durch HPLC

Die Bestimmung des Substratumsatzes, der Produktbildung und –reinigung erfolgte an einer H^+ - oder Ca^{2+} -beladenen Ligandenaustauschmatrix aus Polystyrolharz (Rezex ROA-Organic Acid H^+ , Rezex RHM Monosaccharid H^+ und Rezex RCM Monosaccharid Ca^{2+} , 300 mm x 7,8 mm, Phenomenex). Als isokratischer Eluent diente vakuumfiltriertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ mit einer Flussrate von 0,25 bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde auf 80°C temperiert (HPLC Oven, Knauer, Berlin). Die Detektion erfolgte mit einem auf 35°C erwärmten Brechungsindexdetektor (Beckmann 156 Refractive Index Detektor) mit angeschlossenem Integrator (Shimadzu C-RCA Chromatopac). Nachdem die HPLC mit Probenstandards in einer Konzentration von 5 – 50 mM kalibriert worden ist, konnte durch den Vergleich der Retentionszeiten sowie durch die Integration der Peakflächen eine qualitative und quantitative Bestimmung von Produkt und Substrat erfolgen. Die Proben wurden zuvor mittels Zentrifugalkonzentratoren filtriert (Vivaspin 500, 10000 MWCO, Sartorius) und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf maximal 10 mM verdünnt. Die verschiedenen Kohlenhydrate hatten, soweit nicht anders angegeben, bei einem Fluss von 0,5 ml/min folgende Retentionszeiten:

- 1) Rezex RCM Monosaccharid Ca^{2+} -Säule (Fluss: 0,66 ml/min): D-Glucose 13,91 min; D-Glucoson 15,07 min
- 2) Rezex RHM Monosaccharid H^+ -Säule: D-Gluconat 8,7 min; D-Glucose 12,6 min; 6-Deoxy-D-glucoson 12,95 min; 6-Deoxy-D-glucose 13,59 min; D-Rhamnose 14,1 min
- 3) Rezex RHM Monosaccharid H^+ -Säule (Fluss: 0,25 ml/min): D-Gluconat 20 min; D-Glucose 24,94 min; 6-Deoxy-D-glucoson 25,74 min; 6-Deoxy-D-glucose 27,12 min; D-Rhamnose 28,06 min
- 4) Rezex ROA-Organic Acid H^+ -Säule: D-Gluconat 8,57 min; D-Glucose 12,48 min; 6-Deoxy-D-glucoson 12,46 min; 6-Deoxy-D-glucose 13,12 min; D-Rhamnose 13,59 min

24.2 Produktbestimmung durch Dünnschichtchromatographie (DC)

Als Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie diente 800 g Phenol ad 1 L H_2O (Brechtel 2002). Die Sprühreagenz enthielt 0,5 ml *p*-Anisaldehyd, 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{conc}}$ (Huwig et al. 1994).

Durch DC-Analytik wurden die Reaktionsprodukte der Reduktion von D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson identifiziert und die Produktreinigung durch GOx/Katalase-Reaktion und gemischten Ionenaustauscher verfolgt. Hierzu wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien (20 x 20 cm, Kieselgel 60, Merck) verwendet. 5-10 µl der Probe bzw. der 1:10 mit H₂O_{deion} verdünnten Standards wurden am markierten Start aufgetragen und in einer mit dem Laufmittel Phenol/Wasser (4:1) gesättigten Kammer aufsteigend aufgetrennt (Brechtel 2002). Nach Beendigung der Trennung wurden die DC-Aluminiumfolien getrocknet und mit *p*-Anisaldehyd besprüht (Huwig et al. 1994). *p*-Anisaldehyd bildet mit Aldehyden und Alkoholen nach Erhitzen einen violetten Niederschlag, der nach wenigen Sekunden >100°C verkohlt.

24.3 Produktbestimmung durch NMR

Zur Identifizierung der D-Rhamnose und zur Bestimmung ihres Reinheitsgrads wurden von kommerziell erhältlicher L-Rhamnose und der durch die Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR gebildeten und anschließend gereinigten und lyophilisierten D-Rhamnose (vgl. Kapitel II22.2) Proben auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer (Bruker Avance 500/Bruker DRX 500) analysiert. Dazu wurden 20 mg jeder Probe in schwerem Wasser (D₂O) gelöst. Die aufgenommenen ¹³C und ¹H-Spektren wurden mit den Literaturwerten abgeglichen (Freimund et al. 1998).

III Experimente und Ergebnisse

1 Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase-Variante AFR-A13G

Die AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. katalysiert die stereoselektive Reduktion von 1,5-AF zu 1,5-AM bei gleichzeitiger Oxidation des Cosubstrates NADPH, wobei das Reaktionsgleichgewicht nahezu vollständig auf der Seite des Polyols 1,5-AM liegt. Vor dieser Arbeit lag die AFR bereits mit einem C-terminalen (His)₆-Tag versehen in *E. coli* kloniert vor. Außerdem wurde Alanin 13 gegen Glycin ausgetauscht, was dazu führte, dass das ursprünglich strikt NADPH-abhängige Enzym auch NADH als Cosubstrat akzeptierte. Dabei war der K_m -Wert für NADH jedoch mit 1,1 mM um 550% höher als für NADPH ($K_m = 0,02$ mM). Der K_m -Wert der AFR-A13G für ihr Hauptsubstrat 1,5-AF wurde mit 8,5 mM bestimmt (Kühn et al. 2006). Da die Effizienz der von Kühn mit dem *afr-a13g*-Gen transformierten *E. coli*-Stämme aufgrund der langen Lagerzeit der Glycerinkulturen jedoch nicht mehr ausreichend war, wurden die oben angeführten Arbeitsschritte zunächst wiederholt. Anschließend wurde die AFR-A13G biochemisch charakterisiert, um Referenzwerte für die Charakterisierung der Enzymvarianten mit erhöhter Thermostabilität zu definieren.

1.1 Klonierung des Gens für die 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. und Expression in *E. coli* BL21Gold(DE3)

Die genomische DNA wurde gemäß Kapitel II14.1 aus *S. morelense* S-30.7.5. isoliert. Zur Isolation des Gens für die 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR) aus der genomischen DNA wurden zunächst Primer von der in der NCBI Datenbank hinterlegten *afr*-Gensequenz abgeleitet (Kühn et al. 2006). Mit diesen Primern wurde eine Fidelity PCR gemäß Kapitel II14.2 durchgeführt. Das PCR-Amplifikat wurde anschließend in einem 1%igen Agarosegel überprüft (vgl. Abbildung 7).

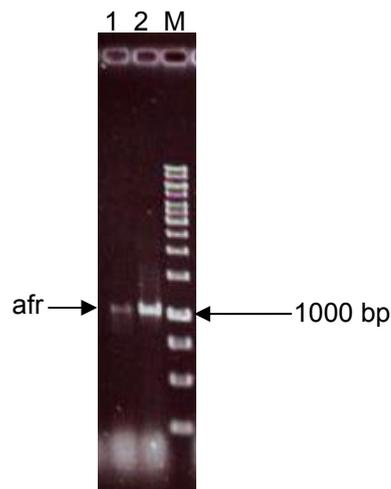


Abbildung 7: afr-Gen-Amplifikation aus der genomischen DNA von *S. morelense* S-30.7.5.. Im 1%igen Agarosegel wurden in den Spuren 1 und 2 ca. 0,5 µg Amplifikat nach der Fideli PCR mit den Primern AFR_for und AFR_rev aufgetragen. In Spur M wurden 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder dargestellt.

Das 1 kb große Amplifikat wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits in den TOPO®II-Vektor kloniert (vgl. Kapitel II10.1). Nach Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Top 10 One Shot-Zellen durch Hitzeschritt wurde die Plasmid-DNA eines weißen Klon mittels peqGold Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab) isoliert und ein Aliquot mit den Primern M13universalCS und M13reverseCS sequenziert (vgl. Kapitel II13; GATC, Konstanz). Der Sequenzabgleich mit der von Kühn in der NCBI Datenbank hinterlegten Sequenz bestätigte die vollständige und fehlerfreie Amplifikation des afr-Gens (Kühn et al. 2006).

Nach Restriktion der restlichen Plasmid-DNA mit *EcoRI* wurde die Elektrophorese im 1,4% Agarosegel durchgeführt und das 1 kb-Fragment mittels peqGOLD Microspin Gel Extraktion Kit isoliert. Das gereinigte afr-Gen wurde in einer zweiten Fideli PCR mit den Primern Mor-Bam_for und Mor-HindIII-His_rev amplifiziert. So wurde direkt vor das Startcodon des afr-Gens eine *Bam*HI-Schnittstelle und direkt hinter das Stoppcodon eine *Hind*III-Schnittstelle eingefügt, um die gerichtete Klonierung in einen Expressionsvektor zu ermöglichen. Außerdem wurde vor das Stoppcodon ein C-terminaler (His)₆-Tag eingefügt, um die Reinigung des Enzyms effizienter und einfacher zu gestalten (Kühn et al. 2006). Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, das afr-Gen auf einer Höhe von 1 kb isoliert und mit *Bam*HI und *Hind*III restringiert (vgl. Kapitel II7.2). Danach erfolgte die Ligation mit dem ebenfalls durch *Bam*HI und *Hind*III linearisierten und durch Auftrennung in einem 1,4%igen Agarosegel gereinigten Expressionsvektor pET24a(+) (vgl. Kapitel II7.3 und II10.2). Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wurden 2 µl des Ligationsansatzes durch Restriktion mit *Hind*III linearisiert und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Abbildung 8).

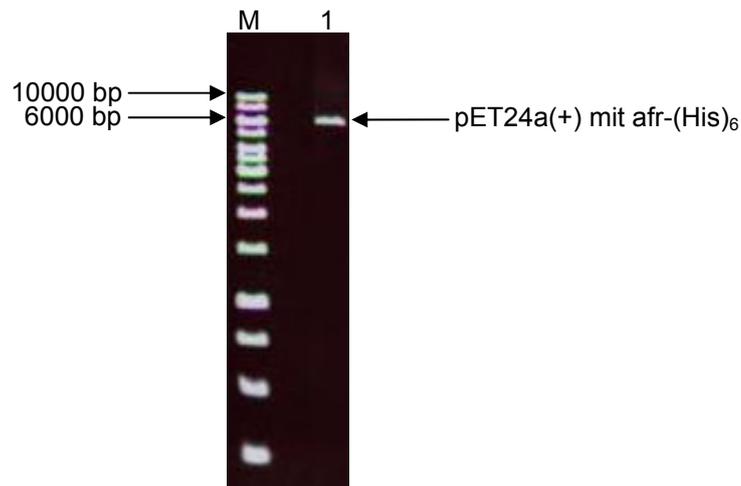


Abbildung 8: Ligationskontrolle nach der Klonierung des *afr*-(His)₆-Gens in den Vektor pET24a(+). Im 1%igen Agarosegel wurden in Spur M 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder aufgetragen. In Spur 1 sind ca. 0,5 µg des linearisierten Konstrukts aus pET24a(+) mit *afr*-(His)₆-Insert aufgetragen.

In Spur 1 lief der linearisierte Vektor mit *afr*-(His)₆-Insert auf Höhe der 6 kb-Bande. Nach Entsalzung durch Dialyse wurde das Konstrukt in elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3) kloniert (Variante *afr*-(His)₆). Die auf LB_{Kan}-Platten selektierten Plasmid-tragenden Klone wurden durch *Colony*-PCR gemäß Kapitel II11 auf die Anwesenheit des Inserts untersucht. Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein 1%iges Agarosegel nach *Colony*-PCR.

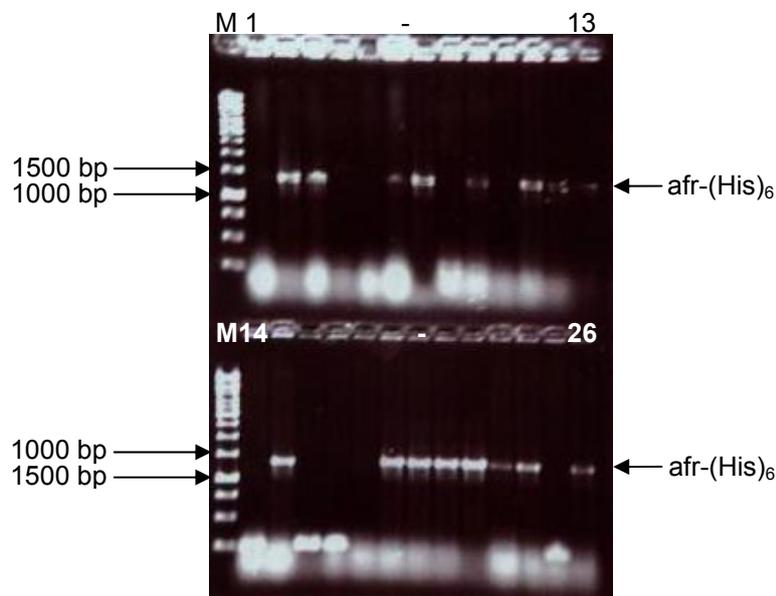


Abbildung 9: *Colony*-PCR nach der Klonierung des *afr*-(His)₆-Gens in den pET24a(+)-Vektor. Im 1%igen Agarosegel wurden in den M-Spuren 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder aufgetragen. In den Spuren 1 - 26 wurden 5 µl PCR-Produkt nach Amplifikation mit den Primern pET-gene-f und pET-gene-r dargestellt.

In 16 der 26 Spuren war die Bande des *afr*-(His)₆-Gens auf einer Höhe von 1,3 kb zu sehen. Dies entsprach einer Ligationseffizienz von 61,5%. Anschließend wurde diese *afr*-Gen-Variante mit den Primern pET-T7 und pET-RP sequenziert (vgl. Kapitel II13, GATC Konstanz).

Um den von Kühn in das *afr*-Gen aus *S. morelense* S-30.7.5. eingefügten Aminosäureaustausch A13G in dieses *afr*-(His)₆-Gen einzufügen (Kühn et al. 2006), wurde die aus *E. coli* BL21Gold(DE3) isolierte Plasmid-DNA in einer KOD-*QuikChange* PCR gemäß Kapitel II8 mit den Primern A13G_for und A13G_rev als Template eingesetzt und die Amplifikation in einem 1%igen Agarosegel überprüft (vgl. Kapitel II7.3, vgl. Abbildung 10).

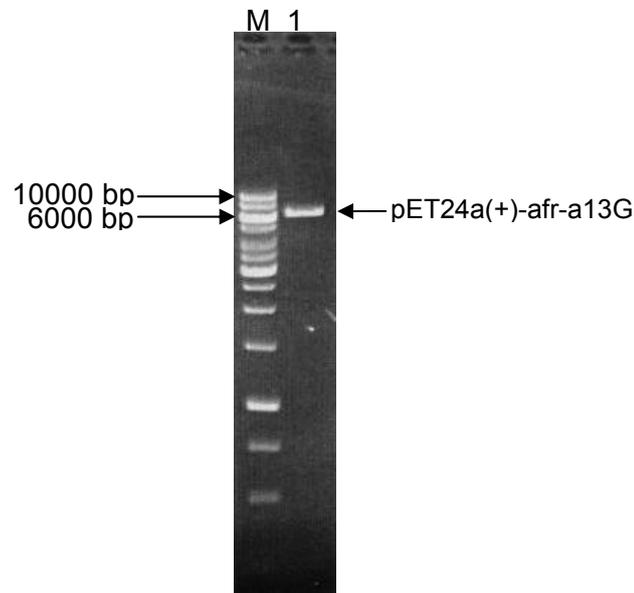


Abbildung 10: KOD-*QuikChange* PCR des *afr*-(His)₆-Gens. Im 1%igen Agarosegel wurden in Spur M 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder aufgetragen. In Spur 1 sind ca. 0,5 µg des PCR-Amplifikates nach KOD-*QuikChange* PCR mit den Primern A13G_for und A13G_rev dargestellt.

In Spur 1 lief auf Höhe von 6,2 kb der amplifizierte Vektor mit *afr*-a13g-Insert. Nach *DpnI*-Verdau und Dialyse wurde das *afr*-a13g-Gen in *E. coli* BL21Gold(DE3) kloniert und der Erfolg des Austausches der Nukleotide an Position 37-39 von GCG (Alanin) nach GGG (Glycin) durch Sequenzierung bestätigt. Das Gen weist eine Größe von 1002 bp auf und wird charakterisiert durch einen GC-Gehalt von 64,8 mol%. Das von diesem Gen codierte Enzym wird im Folgenden als AFR-A13G bezeichnet.

1.2 Reinigung der AFR-A13G

Die AFR-A13G wurde in *E. coli* BL21Gold(DE3) heterolog exprimiert (vgl. Kapitel II14.3) und die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurde die AFR-A13G durch ihren (His)₆-Tag mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-Sepharose-Säule angereichert (vgl. Kapitel II16.1). Im nachfolgenden Reinigungsschritt wurde nicht wie von Kühn eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Kühn et al. 2006), sondern das Enzym mittels HIC über eine Phenyl-Sepharose-Säule in 20 mM BisTris (pH 7,0) umgepuffert (vgl. Kapitel II16.2). Das Elutionsdiagramm der Ni-Sepharose-Säule ist in Abbildung 11 dargestellt.

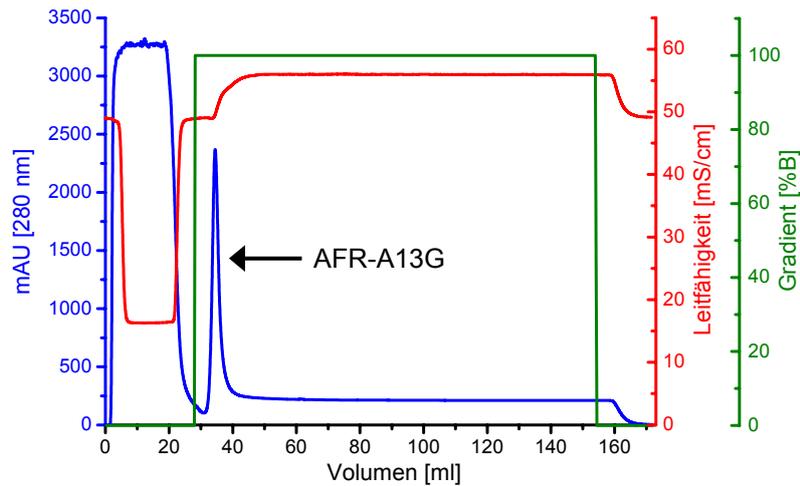


Abbildung 11: Reinigung der AFR-A13G an Nickelsepharose. Absorption bei 280 nm (blau), Leitfähigkeit (rot), Stufengradient (grün). Die AFR-A13G wurde in 4 ml Fraktionen eluiert. Pfeil: AFR-A13G-Peak.

Die Elution der AFR-A13G erfolgte mit Imidazol in einem Puffer aus 0,5 M Imidazol, 0,02 M NaH_2PO_4 und 0,5 M NaCl. Das Protein wurde in 4 ml-Fraktionen aufgefangen und anschließend auf die Phenyl-Sepharose-Säule aufgetragen. Das Elutionsdiagramm der Umpufferung ist in Abbildung 12 dargestellt.

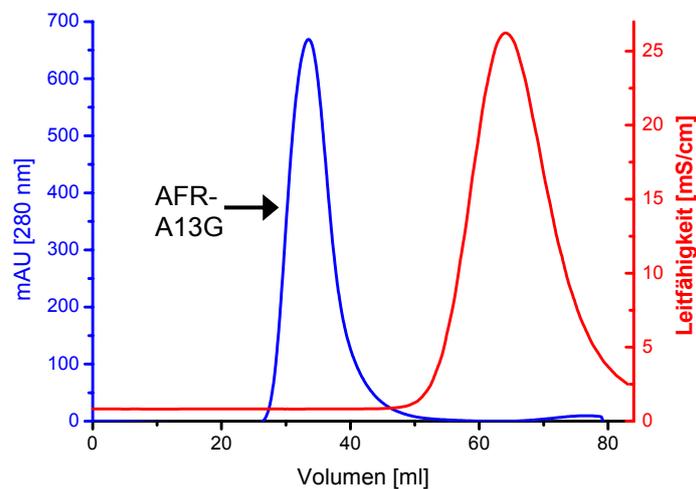


Abbildung 12: Umpufferung der AFR-A13G an Phenyl-Sepharose. Absorption bei 280 nm (blau), Leitfähigkeit (rot). AFR-A13G wurde in 8 ml Fraktionen eluiert. Pfeil: AFR-A13G-Peak.

In Tabelle 9 ist die Reinigung des Enzyms aus einer 250 ml-Schüttelkultur dargestellt, die Aktivitätsmessungen wurden mit 1,5-AF und NADPH als Cofaktor bei 365 nm (Standardtest) durchgeführt (vgl. Kapitel II19.1).

Tabelle 9: Anreicherungstabelle der AFR-A13G. Der Proteingehalt der Ni-Sepharose-Probe konnte wegen des im Elutionspuffer enthaltenen Imidazols nicht bestimmt werden.

Reinigungs-schritt	Volumen [ml]	Gesamt-aktivität [U]	Gesamt-protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [-fach]
Rohextrakt	19	3463,5	175	19,8	100	1,0
Ni-Sepharose	8	3108,6	-	-	89,8	-
Phenyl-Sepharose	16	2722,3	3,4	803,6	78,6	40,6

Durch eine 40,6-fache Anreicherung mittels Ni-Sepharose und Phenyl-Sepharose konnte die rekombinante AFR-A13G mit einer Ausbeute von 78,6% zu einer spezifischen Aktivität von 803,6 U/mg aufgereinigt werden.

Um die Reinheit der AFR-A13G zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE mit einem 10%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel durchgeführt (vgl. Kapitel II18). Das Ergebnis der Elektrophorese ist in Abbildung 13 dargestellt.

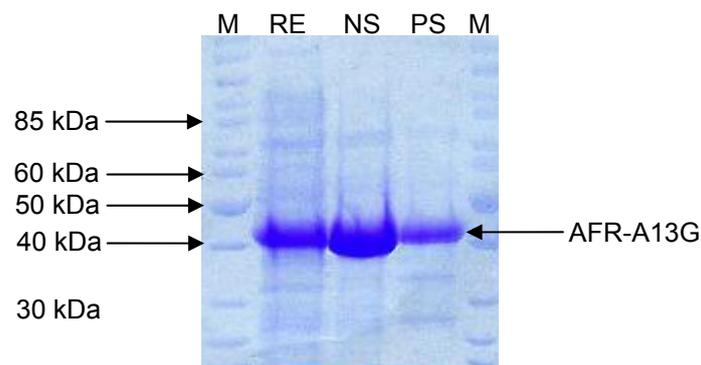


Abbildung 13: SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsfractionen der AFR-A13G. Es wurden denaturierte Proben von Rohextrakt (RE, 46 µg), Ni-Sepharose und Phenyl-Sepharose (PS, 1,1 µg) aufgetragen, als Marker wurde die Page Ruler® Unstained Protein Ladder verwendet (Fermentas). Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Die Banden der in den Aliquots enthaltenen Fremdproteine nahmen sowohl in Anzahl als auch in Intensität mit den drei Reinigungsschritten ab. Die AFR-A13G-Bande lief auf einer Höhe von 42 kDa. Nach der Phenyl-Sepharose-Säule lag die AFR-A13G nicht vollständig von Fremdproteinen gereinigt vor, es waren noch Proteinbanden in Höhe von 35 kDa und 27 kDa zu sehen.

Alle Experimente dieser Arbeit basieren auf dieser in *E. coli* heterolog exprimierten, über Ni-Sepharose und Phenyl-Sepharose angereicherten und im Folgenden nur noch als AFR-A13G bezeichneten Variante. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Enzymaktivität mit dem Standardtest gemäß Kapitel II19.1 gemessen.

1.3 Substrat- und Cosubstrat-Spezifität der AFR-A13G

Für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden neben den relativen Aktivitäten die Michaeliskonstanten der Reduktionsreaktion bestimmt (vgl. Kapitel II19.1 und II21.3). Außerdem wurde der Proteingehalt der Proben mit dem BCA Protein Assay (vgl. Kapitel II17) gemessen, um die spezifische Aktivität des Enzyms bestimmen zu können. Die daraus resultierenden katalytischen Effizienzen der AFR-A13G wurden ebenfalls berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Kinetische Daten der AFR-A13G. * Von Kühn et al. übernommener Wert (Kühn et al. 2006).

Substrat	Spezifische Aktivität [U/mg]	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
1,5-AF	803,6	8,50 ± 0,02*	56639
D-Glucoson	135,0	11,00 ± 0,1	7180
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	17,02 ± 0,8	5544

Die spezifische Aktivität der AFR-A13G für die Reduktion von 1,5-AF ergab einen Wert von 803,6 U/mg, für D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson betrug sie 135 U/mg und 161,3 U/mg. Analog zu den spezifischen Aktivitäten gestalteten sich auch die Michaeliskonstanten und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G: für 1,5-AF betrug der K_m -Wert 8,5 mM, für D-Glucoson 11 mM und für 6-Deoxy-D-glucoson 17,02 mM, für die katalytischen Effizienzen ergaben sich die Werte 56639 [M⁻¹·s⁻¹] für 1,5-AF, 7180 [M⁻¹·s⁻¹] für D-Glucoson und 5544 [M⁻¹·s⁻¹] für 6-Deoxy-D-glucoson als Substrat.

Die AFR-A13G verfügte durch den Austausch von Alanin 13 gegen Glycin über eine duale Cosubstrat-Spezifität. Die K_m -Werte der AFR-A13G für die Cosubstrate NADPH bzw. NADH wurden mit 1,5-AF als Substrat auf 0,02 mM (± 0,01) und 1,1 mM (± 0,04) bestimmt (Kühn et al. 2006).

Als nächstes wurden die Substrate 1,5-AF und D-Glucoson jeweils mit NADPH oder NADH als Cosubstrat verwendet, um die Auswirkungen des erhöhten K_m -Wertes der AFR-A13G für NADH zu analysieren und ein geeignetes Cosubstrat-Regenerierungssystem für Biokonversionen mit AFR-A13G etablieren zu können.

Tabelle 11: Aktivitäten der AFR-A13G für 1,5-AF, D-Glucoson und NAD(P)H.

Substrat	Cosubstrat	Volumenaktivität [U/ml]
1,5-AF	NADPH	1020,0
1,5-AF	NADH	25,7
D-Glucoson	NADPH	171,3
D-Glucoson	NADH	0,7

Die Volumenaktivität der AFR-A13G für D-Glucoson und NADPH betrug mit 171,3 U/ml noch 16,8% der Aktivität mit 1,5-AF. Mit NADH als Cosubstrat sank die Volumenaktivität auf 0,7 U/ml. Die Enzymaktivität mit 1,5-AF und NADH erreichte mit 25,7 U/ml nur 2,5% der Ausgangsaktivität des Enzyms.

Wegen der geringen Aktivität der AFR mit NADH ist dieses Cosubstrat für die Etablierung eines Cosubstrat-Regenerierungssystems nicht geeignet.

1.4 Temperaturstabilität und T_{50}^{10} [°C] der AFR-A13G

Zur Messung der Temperaturstabilität der AFR-A13G in 2 mmol BisTris wurden Aliquots des Enzyms im Thermoblock bei 30°C bis 50°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Restaktivität gemessen (vgl. Abbildung 14).

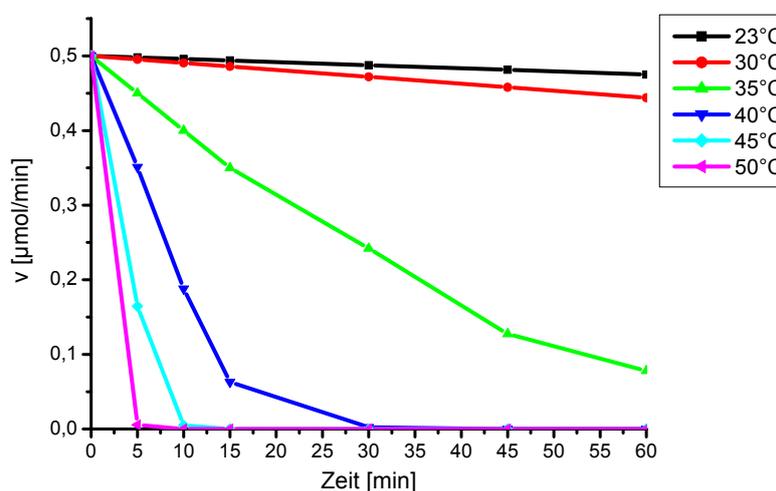


Abbildung 14: Temperaturstabilität der AFR-A13G. Die Aktivität der AFR wurde über einen Zeitraum von bis zu 60 min bei den angegebenen Temperaturen verfolgt.

War die Aktivität der AFR-A13G bei 23°C über 60 min noch stabil, reduzierte sie sich bereits bei 30°C um 11,2%.

Aus den Restaktivitäten der AFR-A13G wurden die Halbwertszeiten (HWZ) des Enzyms bei den verschiedenen Temperaturen berechnet (Mukhopadhyay 1992). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kühn, die die Thermostabilität der nativen AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. analysierte (Kühn 2004), zeigte sich, dass Inkubationstemperaturen von über 40°C zu einem raschen Aktivitätsverlust führten, wobei die Halbwertszeit bei 50°C 2,5 min betrug und bei 45°C bzw. 40°C mit 3,8 min bzw. 8,0 min bestimmt wurde. Eine Restaktivität von 50% war nach 30 minütiger Inkubation bei 35°C messbar.

Bestimmung der T_{50}^{10} [°C]

Unter der T_{50}^{10} versteht man die Temperatur [°C], bei der nach 10 min Inkubation noch 50% der Anfangsaktivität eines Enzyms vorhanden sind (Reetz et al. 2006a; Reetz und Carbalreira 2007). Dieser Wert ermöglichte eine präzisere Bestimmung der Temperaturstabilität der AFR-A13G als mit den vorher gezeigten Methoden und einen exakteren Vergleich der Thermostabilität der Ausgangsvariante AFR-A13G mit den Enzymvarianten.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch die relative Aktivität der AFR-A13G nach 10 minütiger Inkubation bei 30°C bis 45°C. Durch Extrapolation konnte anschließend die T_{50}^{10} bestimmt werden.

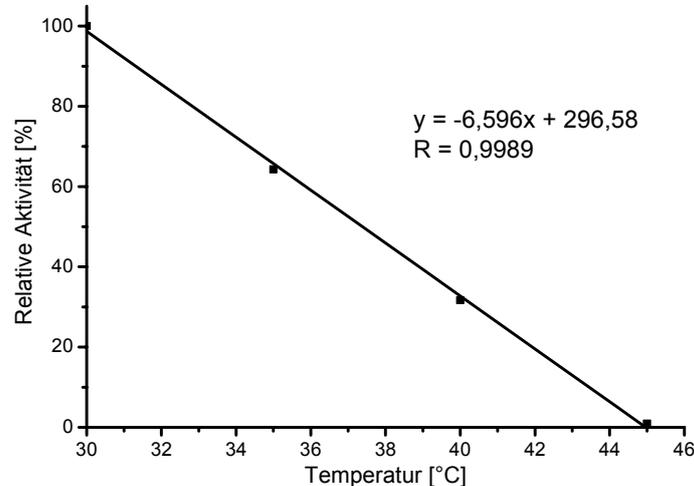


Abbildung 15: Bestimmung der T_{50}^{10} [°C] der AFR-A13G. 10 U AFR wurden in 1 ml 50 mM BisTris (pH 7,0) bei 30°C, 35°C, 40°C oder 45°C 10 min lang im Thermoblock inkubiert und die Aktivität nach Zentrifugation (10 min bei 9838 x g und 4°C) gemessen. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten nach Inkubation bei den verschiedenen Temperaturen, wobei die Aktivität vor Inkubationsstart gleich 100% gesetzt wurde.

Die T_{50}^{10} [°C] war für die AFR-A13G 36,7°C.

1.5 pH-Optimum der AFR-A13G

Das pH-Optimum wurde durch die Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten im Bereich von pH 4,0 bis pH 9,0 ermittelt. Gleichzeitig wurde der Effekt verschiedener Puffersysteme auf die Enzymaktivität untersucht. Hierzu wurden die Puffer im Standardtest gemäß Kapitel II19.1 verwendet und die Enzymverdünnungen darin angesetzt (vgl. Abbildung 16).

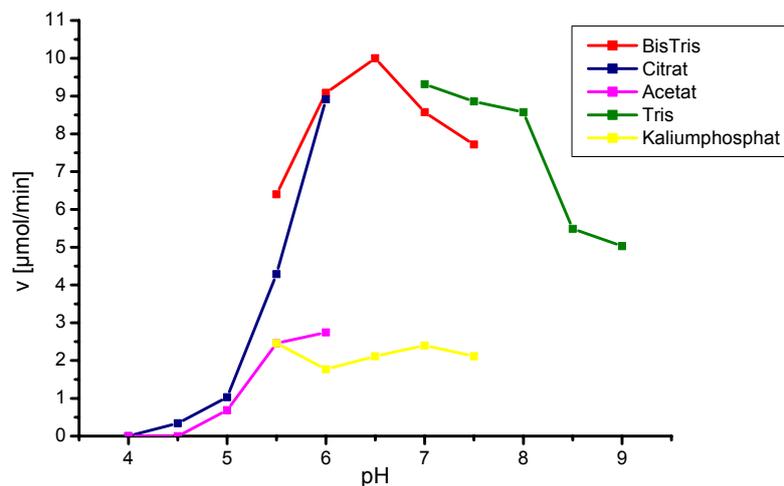


Abbildung 16: pH-Optimum der AFR-A13G. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0; Acetat von pH 4,0 bis 6,0 und Kaliumphosphat von pH 5,5 bis 7,5. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 10000 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt.

Das pH-Optimum des Enzyms lag in 0,1 M BisTris-Puffer bei pH 6,5.

Im Folgenden wurde der Einfluss des Kaliumphosphatpuffers nicht mehr analysiert, da die AFR-Aktivität in diesem Puffersystem bei allen analysierten pH-Werten nur maximal 20% der höchsten Aktivität erreichte. Damit hatte die AFR-A13G das gleiche pH-Optimum wie die rekombinant in *E. coli* exprimierte und mit einem (His)₆-Tag versehene AFR von Kühn (Kühn 2004).

1.6 Isoelektrischer Punkt (pI) der AFR-A13G

Der isoelektrische Punkt (pI) der AFR-A13G, d. h. der pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Enzyms gleich Null ist, wurde durch isoelektrische Fokussierung (IEF) gemäß Kapitel II21.2 bestimmt. Das angereicherte und in H₂O_{dd} umgepufferte Enzym wurde in die Spur eines Polyacrylamidgels mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 aufgetragen und der pI nach erfolgter Fokussierung durch Vergleich mit den Eichproteinen des Standards P9 (IEF-Marker 3 - 10, Serva) bestimmt (vgl. Abbildung 17).

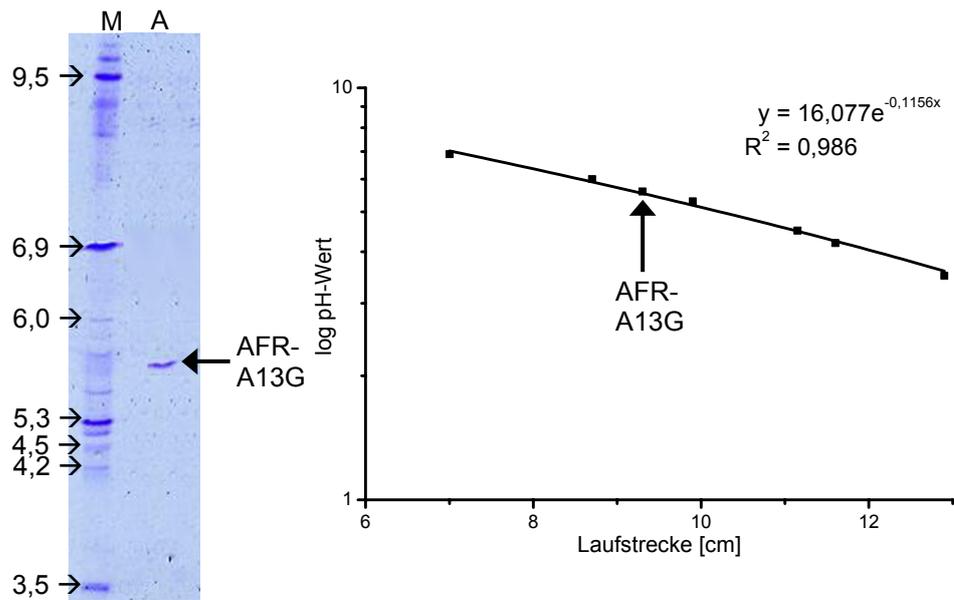


Abbildung 17: Isoelektische Fokussierung der AFR-A13G im pH-Bereich von 3 bis 10. Im Servalyt Precotes[®] Gel (pH 3 – 10) wurden 10 µl Proteinstandard P9 (IEF-Marker 3 – 10, Serva) (M) und 9 µg angereicherte und in H₂O_{dd} umgepufferte AFR-A13G (A) bis zu einer Spannung von 2000 V, 3,7 mA und 6,0 W fokussiert.

Der pI der AFR-A13G lag bei pH 5,5. Alternativ zur IEF wurde der pI mit der Software "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" vom European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) berechnet. Mit dieser Methode lag der pI für die AFR-A13G bei pH 5,6.

2 Engineering der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase zu erhöhter Thermostabilität und biochemische Charakterisierung der Mutanten

Syntheseprozesse werden hauptsächlich bei hohen Temperaturen durchgeführt, um die Substratlöslichkeit und die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, die Viskosität des Mediums und das Risiko für mikrobielle Kontamination zu reduzieren und/oder höhere Umsatzraten gleichzeitig ablaufender nicht-enzymatischer Reaktionen zu gewährleisten. Der Einsatz von Enzymen ermöglicht aufgrund ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität, der hohen katalytischen Effizienz und der Reaktivität in wässrigen Lösungen eine effizientere und selektivere Katalyse, als die Verwendung von konventionellen Katalysatoren (Chirumamilla et al. 2001; Powell et al. 2001). Aufgrund der hohen Temperatur werden in der Weißen Biotechnologie bevorzugt Enzyme aus (hyper-) thermophilen Bakterien eingesetzt, da sie Biokonversionen bei hohen Temperaturen katalysieren, ohne zu denaturieren. Im Gegensatz dazu verfügen mesophile Enzyme bei erhöhten Temperaturen nur über eine begrenzte operative Stabilität (Minagawa et al. 2007). Dies trifft auch auf die 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. zu.

In dieser Arbeit sollte deshalb die Thermostabilität der AFR-A13G für den Einsatz in Biokonversionen erhöht werden. Das Ergebnis sollte ein thermostabileres Enzym mit unverändertem katalytischem Profil sein, d. h. mit einer hohen katalytischen Aktivität im mesophilen Temperaturbereich, wie es in der Natur nicht selektiert wird (Arnold et al. 2001). Obwohl die anschließenden Umsetzungen bei 30°C, d. h. bei moderaten Temperaturen, durchgeführt wurden, war das primäre Selektionskriterium eine möglichst hohe Thermostabilität der AFR-Varianten, da bereits bekannt war, dass Enzyme mit einer hohen Thermostabilität auch bei mittleren Temperaturen robuster sind als ihre thermolabilen Homologe (Heinzelman et al. 2009).

Zu Steigerung der Thermostabilität der AFR-A13G wurden zwei Methoden verwendet: gerichtete Mutagenese durch iterative Sättigungsmutagenese (ISM) und Zufallsmutagenese durch *error prone*-PCR (vgl. Kapitel II8 und II9). Um beim Screening der AFR-Mutanten auf erhöhte Thermostabilität nach Kultivierung der *E. coli* im 30 ml-Maßstab einen höheren Durchsatz zu gewährleisten, wurde zunächst die Effektivität verschiedener Aufschlussarten verglichen.

2.1 Vergleich der Zellaufschlüsse von *E. coli* BL21(DE3)pLysS

E. coli BL21(DE3)pLysS-AFR-A13G wurden aus 30 ml-Hauptkulturen bei 5000 rpm und 4°C 10 min geerntet und die Zellpellets entsprechend der verschiedenen Aufschlussprotokolle in

20 mM BisTris-Puffer (pH 7,0) resuspendiert (vgl. Kapitel II15.1). Dann erfolgte der Zellaufschluss gemäß des Kapitels II15.2 entweder durch Ultraschall, durch Glasbeads in der Schwingmühle oder durch Triton-X 100. Nach 15 min bei 9838 x g und 4°C wurde die AFR-A13G-Aktivität gemessen (vgl. Kapitel II19.1 und Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der verschiedenen Zellaufschluss-Arten von *E. coli* BL21(DE3)pLysS. OD₆₀₀ = Absorption der Hauptkultur unmittelbar vor der Zellernte. Pellet = Feuchtgewicht des Zellpellets nach der Zellernte in Gramm.

Aufschluss	OD ₆₀₀	Pellet [g]	Volumenaktivität [U/ml]
Ultraschall	4,1	0,48	621,7
Glasbeads	3,8	0,46	569,7
0,6% Triton-X 100	4,2	0,50	76,9
1% Triton-X 100	3,7	0,40	128,6

Aus Tabelle 12 geht hervor, dass der Ultraschallaufschluss die effizienteste Methode zur Präparation der AFR aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS war. Der Zellaufschluss mit Glasbeads war vergleichbar effektiv. Die Verwendung von Detergenz war wegen der geringen Ausbeute für AFR-Präparationen aus 30 ml Hauptkulturen ungeeignet. Da sich die Triton-X 100-Behandlung beim Aufschluss in Mikrotiterplatten jedoch als praktikabel erwiesen hat (Dorscheid 2009), wurde sie in diesem Kultivierungsmaßstab auch im weiteren Verlauf der Arbeit angewandt.

Beim Screening der AFR-A13G-Varianten nach Kultivierung der Zellen im 30 ml-Maßstab (vgl. Kapitel II20) wurden die Zellen in dieser Arbeit mit Glasbeads aufgeschlossen. Diese Art des Zellaufschlusses ermöglichte die gleichzeitige Behandlung von 20 Proben in 15 min und gewährleistete so einen höheren Durchsatz als der Ultraschall-Aufschluss, bei dem jede Probe 3,25 min aufgeschlossen werden musste (vgl. Kapitel II15.2).

2.2 Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) mit KOD-QuikChange PCR

Da die Röntgenkristallstruktur der AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. zu Beginn dieser Arbeit bereits vorlag, war es möglich, die Mutagenese auf vorher festgelegte Stellen im Enzym zu beschränken und so den Screening-Aufwand durch Verkleinerung des Sequenzraumes zu reduzieren (Dambe et al. 2006; Reetz et al. 2007).

Als Grundlage diente die Tatsache, dass (hyper-) thermophile Enzyme eine festere Struktur und damit eine dichtere Packung ihres hydrophoben Kerns besitzen als ihre mesophilen Homologe (Reetz et al. 2007, Lehmann et al. 2000). Deshalb wurden zunächst die Abschnitte der AFR, die die höchste Flexibilität besaßen, ausgehend von der Kristallstruktur des Enzyms mit der Software B-FITTER (B-Faktor Iterativer Test) identifiziert (Reetz und Carballera 2007; Reetz et al. 2008). Das Programm berechnet die atomaren Dislokationspara-

meter jeder Aminosäure, die sogenannten B-Faktoren, die das maximale Verwischen der Elektronendichten der einzelnen Atome bezogen auf deren Gleichgewichtsposition als Ergebnis thermaler Teilchenbewegung (Karplus und Schulz 1985; Radivojac et al. 2004; Vihiinen 1987) charakterisieren. Bei der nachfolgenden iterativen Sättigungsmutagenese (ISM) wurden eine oder zwei direkt benachbarte Aminosäuren mit den höchsten B-Faktoren, d. h. mit der höchsten Flexibilität, durch den Einsatz degenerierter Primer in der KOD-*QuikChange*-PCR ausgetauscht. Dadurch entstanden Variantenbibliotheken, die im Anschluss mit einem geeigneten Screeningsystem durchsucht wurden.

Herstellung einer Variantenbibliothek

Zuerst wurde von jeder der 333 Aminosäuren der AFR der B-Faktor berechnet. Abbildung 18 zeigt exemplarisch die 20 Aminosäuren mit den höchsten B-Faktoren.

```
Chain identifier of chain no. 1 : A
```

Residue Name	Residue seq. no.	B value	Rank
GLU A	208	67.05	1
GLU A	168	61.03	2
LYS A	207	58.61	3
GLY A	209	54.90	4
ARG A	166	53.15	5
PRO A	167	52.69	6
GLU A	165	49.77	7
HIS A	158	48.31	8
GLU A	330	47.23	9
GLU A	37	46.64	10
LYS A	50	46.63	11
GLY A	206	46.44	12
GLU A	45	45.85	13
GLU A	328	44.52	14
ARG A	3	44.38	15
GLN A	325	44.18	16
ALA A	169	43.55	17
GLU A	270	43.50	18
VAL A	210	42.76	19
GLU A	295	42.10	20

Abbildung 18: Die 20 Aminosäuren der AFR-A13G aus *Sinorhizobium morelense* S.-30.7.5. mit den höchsten B-Faktoren. Die B-Faktoren wurden auf Grundlage der Kristallstruktur des Enzyms mit der Software B-Fitter berechnet (Reetz und Carballeira 2007; Reetz et al. 2008).

Anschließend wurden die 9 Aminosäuren mit den höchsten B-Faktoren (in Abbildung 18 gekennzeichnet) für den Austausch durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese in sieben Loci (A-G) mit jeweils einer oder zwei zu ersetzenden Aminosäuren zusammengefasst. Für diese Positionen wurden Primer mit degenerierten Codons entworfen, die anstatt des Codons für die auszutauschende Aminosäure das Basentriplett NNK trugen (N = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; K = Guanin, Thymin). Dieses Basentriplett ermöglichte den zufälligen Einbau aller 20 Aminosäuren, schloss aber die Entstehung zweier Stoppcodons aus.

2.3 Ergebnisse des Screenings der ersten Mutageneserunde

In der ersten Mutageneserunde wurde die KOD-*QuikChange* PCR mit AFR-A13G als Template durchgeführt.

Im Mikrotiterplatten-Maßstab wurden 9600 Klone getestet, davon zeigten 537 Klone nach Hitzeschritt eine höhere Restaktivität als AFR-A13G. Die Zellen, die diese Varianten exprimierten, wurden anschließend im 30 ml-Maßstab kultiviert. In Tabelle 13 sind die vier Varianten dargestellt, die im 30 ml-Maßstab nach Hitzeschritt die höchsten Restaktivitäten zeigten. Die Benennung erfolgte nach Mutagenesemethode (ISM), Charge (I, II usw.), Mutagenesestelle (A bis G), Mikrotiterplattennummer (z. B. 4) und Wellbezeichnung (z. B. G12). Die Restaktivität der AFR-A13G betrug unter diesen Bedingungen 3,6%.

Tabelle 13: Restaktivitäten selektierter AFR-A13G-Varianten nach Hitzeschritt. Die Restaktivitäten wurden nach 10 min Inkubation der Rohextrakte bei 45°C mit dem Standardassay (vgl. Kapitel II 19.1) gemessen und mit der Restaktivität der AFR-A13G verglichen.

Variante	Restaktivität [%]
AFR-A13G	3,6
I ISM A2-F4	30,4
I ISM G5-C11	26,1
I ISM C7-C4	19,6
I ISM B13-B9	13,4

Die Gene dieser Varianten, die im Vergleich zur AFR-A13G eine auf 370% bis 844% erhöhte Restaktivität und daraus folgend eine verbesserte Thermostabilität zeigten, wurden anschließend sequenziert (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese der AFR-A13G in der ersten Mutageneserunde eingeführte Aminosäureaustausche.

Variante	Position(en)	Nukleotidaustausch (Position + Austausch)	Aminosäureaustausch
A2-F4	K207-	620-622: AAG → CCT	K207P
	E208	623-625: GAG → CCT	E208P
B13-B9	G209	626-628: GGG → CAG	G209Q
C7-C4	E165-	494-496: GAG → AAT	E165N
	R166	497-499: CGG → AAG	R166K
G5-C11	E208-	623-625: GAG → GGT	E208G
	G209	626-628: GGG → TGT	G209C

Im folgenden werden diese Varianten anhand ihrer in Tabelle 14 dargestellten Aminosäureaustausche bezeichnet.

2.3.1 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P

Zur biochemischen Charakterisierung der AFR-A13G-K207P-E208P wurden die *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen, die diese Variante exprimierten, im 250 ml-Maßstab angezogen (vgl. Kapitel II14.3) und das Enzym angereichert.

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Für die AFR-A13G-K207P-E208P konnte eine T_{50}^{10} von 42,0°C bestimmt werden, im Vergleich zur AFR-A13G war der Wert um 5,3°C erhöht (vgl. Abbildung 80).

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

In dieser Arbeit wurden die pH-Optima aller AFR-A13G-Varianten bestimmt, um bei ihrem Einsatz in Biokonversionen durch Anpassung des pH-Wertes bzw. Puffersystems die höchste Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen und so optimale Raum-Zeit-Ausbeuten der Produkte zu gewährleisten.

Die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-A13G-K207P-E208P ergab, dass dieses im Vergleich zum Ausgangsenzym unverändert bei pH 6,5 in 0,1 M BisTris lag (vgl. Abbildung 78).

Der isoelektische Punkt (pI) der AFR-A13G-K207P-E208P, der durch isoelektrische Fokussierung (IEF) (vgl. Kapitel II21.2) bestimmt wurde, war ebenfalls unverändert zum Ausgangsenzym und lag bei pH 5,5 (vgl. Abbildung 79). Eine alternative Messung des pI mit Hilfe der Software "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" lieferte einen Wert von pH 5,6.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-K207P-E208P für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden gemäß Kapitel II19.1 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 im Vergleich zur AFR-A13G dargestellt.

Tabelle 15: Kinetische Daten der AFR-A13G-K207P-E208P. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardtest bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung überprüft.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P
1,5-AF	803,6	766,4	8,30 ± 0,2	6,6 ± 0,13	56639	67931
D-Glucoson	135,0	67,4	11,00 ± 0,1	30,4 ± 0,11	7180	1297
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	29,9	17,02 ± 0,8	17,6 ± 0,20	5544	994

War die spezifische Aktivität der AFR-A13G-K207P-E208P bei der Reduktion des Hauptsubstrates 1,5-AF mit 766,4 U/mg vergleichbar hoch wie die spezifische Aktivität der AFR-A13G

mit 803,6 U/mg, zeigte die Variante einen deutlichen Abfall bei der Verwertung der beiden Substrate D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson. Wurde bei der Reduktion von D-Glucoson noch die Hälfte der spezifischen Aktivität der AFR-A13G erreicht, reduzierte sich die Aktivität der Variante mit 6-Deoxy-D-glucoson als Substrat im Vergleich zum Ausgangsenzym auf 20%.

Der K_m -Wert der AFR-A13G-K207P-E208P für 1,5-AF war im Vergleich zur AFR-A13G um 1,8 mM verbessert, was in einer Erhöhung der katalytischen Effizienz auf 120% resultierte. Im Gegensatz dazu war der K_m -Wert für D-Glucoson stark erhöht, die katalytische Effizienz sank folglich auf 18% ab. Obwohl der K_m -Wert von AFR-A13G-K207P-E208P für 6-Deoxy-D-glucoson praktisch identisch zu dem K_m -Wert der AFR-A13G war, wurde aufgrund der reduzierten spezifischen Aktivität dieser Variante die katalytische Effizienz ebenfalls bis auf 18% herabgesetzt.

2.3.2 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-E208G-G209C

Die AFR-A13G-E208G-G209C wurde exprimiert und angereichert (vgl. Kapitel II14.3, II15 und II16).

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Die Aktivität der angereicherten Variante AFR-A13G-E208G-G209C wurde nach 10 min Inkubation bei 35°C – 45°C gemessen (vgl. Kapitel II19.1). Für AFR-A13G-E208G-G209C konnte eine T_{50}^{10} von 40,2°C bestimmt werden, im Vergleich zur AFR-A13G war der Wert um 3,5°C erhöht (vgl. Abbildung 80).

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

Die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-A13G-E208G-G209C ergab, dass dieses im Vergleich zum Ausgangsenzym unverändert bei pH 6,5 in 0,1 M BisTris lag (vgl. Abbildung 78). Mit Hilfe der Software "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) konnte ein pI von 5,68 bestimmt werden.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-E208G-G209C wurden gemäß Kapitel II19.1 bestimmt (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: Kinetische Daten der AFR-A13G-E208G-G209C. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardtest bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung überprüft.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-E208G-G209C	AFR-A13G	AFR-A13G-E208G-G209C	AFR-A13G	AFR-A13G-E208G-G209C
1,5-AF	803,6	263,1	8,30 ± 0,2	8,8 ± 0,05	56639	17490
D-Glucoson	135,0	62,9	11,00 ± 0,1	18,9 ± 0,15	7180	1947
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	34,2	17,02 ± 0,8	27,6 ± 0,1	5544	725

Die spezifischen Aktivitäten der AFR-A13G-E208G-G209C waren im Vergleich zur AFR-A13G für die drei Substrate stark reduziert. Für 1,5-AF war sie auf 33%, für D-Glucoson auf 47% und für 6-Deoxy-D-glucoson auf 21% reduziert. Der K_m -Wert der Variante für 1,5-AF war verglichen mit AFR-A13G um 0,5 mM erhöht, die K_m -Werte für D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson um 7,9 mM bzw. 10,6 mM gesteigert. Die katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-E208G-G209C verschlechterten sich folglich auf 13% bis 31%.

Aufgrund des stark erhöhten K_m -Wertes und der stark verminderten katalytischen Effizienz für 6-Deoxy-D-glucoson war die AFR-A13G-E208G-G209C trotz einer T_{50}^{10} von 40,2°C ungeeignet für den Einsatz in Biokonversionen.

2.3.3 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-E165N-R166K

Die AFR-A13G-E165N-R166K wurde exprimiert und angereichert (vgl. Kapitel II14.3, II15 und II16).

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Nach 10 min Inkubation der angereicherten Variante AFR-A13G-E165N-R166K bei 35°C – 45°C wurde die Enzym-Aktivität mit dem Standardtest gemessen (vgl. Kapitel II19.1). Für AFR-A13G-E165N-R166K konnte eine T_{50}^{10} von 38,8°C ermittelt werden, im Vergleich zur AFR-A13G war der Wert um 2,1°C erhöht (vgl. Abbildung 80).

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

Die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-A13G-E165N-R166K ergab, dass dieses im Vergleich zum Ausgangsenzym unverändert bei pH 6,5 in 0,1 M BisTris lag (vgl. Abbildung 78). Der "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) berechnete einen pI von pH 5,76.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, Michaeliskonstanten und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-E165N-R166K für die drei Substrate wurden gemessen (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Kinetische Daten der AFR-A13G-E165N-R166K. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardassay gemessen. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung verifiziert.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-E165N-R166K	AFR-A13G	AFR-A13G-E165N-R166K	AFR-A13G	AFR-A13G-E165N-R166K
1,5-AF	803,6	672,4	8,30 ± 0,2	6,1 ± 0,2	56639	64484
D-Glucoson	135,0	116,4	11,00 ± 0,1	14,3 ± 0,15	7180	4762
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	158,7	17,02 ± 0,8	18,3 ± 0,1	5544	5073

Im Vergleich zur AFR-A13G waren die spezifischen Aktivitäten der Variante für 1,5-AF und D-Glucoson um 16% und 14% verschlechtert. Mit 6-Deoxy-D-glucoson als Substrat war die spezifische Aktivität der AFR-A13G-E165N-R166K praktisch identisch zu derjenigen der AFR-A13G.

Verglichen mit AFR-A13G war der K_m -Wert der AFR-A13G-E165N-R166K für 1,5-AF um 2,2 mM reduziert, für D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson war der Wert um 3,3 mM und 1,28 mM erhöht. Die katalytische Effizienz für 1,5-AF war auf 114% gesteigert. AFR-A13G-E165N-R166K erreichte für 6-Deoxy-D-glucoson 92% der katalytischen Effizienz der AFR-A13G.

2.3.4 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-G209Q

Die AFR-A13G-G209Q wurde gemäß der Kapitel II14.3, II15 und II16 exprimiert und angereichert.

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Nach 10 min Inkubation der angereicherten Variante AFR-A13G-G209Q bei 30°C – 45°C wurde die Aktivität gemäß Kapitel II19.1 gemessen und die T_{50}^{10} [°C] bestimmt (vgl. Kapitel II21.4). Für die AFR-A13G-G209Q konnte eine T_{50}^{10} von 37,8°C ermittelt werden (vgl. Abbildung 80), im Vergleich zur AFR-A13G war der Wert um 0,7°C erhöht.

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

Die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-A13G-G209Q ergab, dass dieses im Vergleich zum Ausgangsenzym unverändert bei pH 6,5 in 0,1 M BisTris lag (vgl. Abbildung 78). Der "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) berechnete einen pI von pH 5,6.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-G209Q für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden bestimmt (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: Kinetische Daten der AFR-A13G-G209Q. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardtest bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung überprüft.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-G209Q	AFR-A13G	AFR-A13G-G209Q	AFR-A13G	AFR-A13G-G209Q
1,5-AF	803,6	701,08	8,30 ± 0,2	7,3 ± 0,21	56639	56182
D-Glucoson	135,0	110,10	11,00 ± 0,1	16,8 ± 0,05	7180	3834
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	156,30	17,02 ± 0,8	19,8 ± 0,1	5544	4618

Die spezifischen Aktivitäten der Variante für die Reduktion von 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson waren im Vergleich zur AFR-A13G um 13%, 18,4% und 3% reduziert. AFR-A13G-G209Q verfügte mit 156,3 U/mg für 6-Deoxy-D-glucoson über die höchste spezifische Aktivität der durch ISM generierten AFR-A13G-Varianten.

Verglichen mit AFR-A13G war der K_m -Wert der AFR-A13G-G209Q für 1,5-AF 1 mM verbessert, die K_m -Werte für D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson waren um 5,8 mM und 2,8 mM verschlechtert. Bedingt durch die hohe spezifische Aktivität der AFR-A13G und den reduzierten K_m -Wert war die katalytische Effizienz der AFR-A13G-G209Q für 1,5-AF praktisch identisch zur katalytischen Effizienz der AFR-A13G. Die katalytischen Effizienz dieser Variante erreichte für 6-Deoxy-D-glucoson 83% des Wertes des Ausgangsenzyms.

Ein wichtiger Aspekt der gerichteten Evolution ist die *in vitro*-Kombination selektierter nützlicher Mutationen (Lehmann et al. 2000). Deshalb wurden anschließend die Mutationen der Varianten mit den höchsten T_{50}^{10} -Werten kombiniert, um die Mutationen auf einen kooperativen Effekt zu analysieren (vgl. Kapitel II8, Reetz et al. 2007).

2.3.5 Kombination von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-E165N-R166K

Es wurde die thermostabilste Variante der ersten ISM Runde, AFR-A13G-K207P-E208P, mit AFR-A13G-E165N-R166K kombiniert, da jene Variante mit einer katalytischen Effizienz für 6-Deoxy-D-glucoson von $5073 M^{-1}\cdot s^{-1}$ die höchste katalytische Effizienz dieser Arbeit besaß, bei gleichzeitiger Steigerung der T_{50}^{10} um $2,1^\circ C$ (vgl. Tabelle 17 und Abbildung 80).

Eine Kombinationsmutante mit den vier Aminosäureaustauschen A13G, E165N, R166K K207P und E208P wurde durch KOD-*QuikChange* PCR generiert (vgl. Kapitel II8). Zur Verifi-

zierung der Mutationen wurde eine DNA-Sequenzanalyse der Plasmide durchgeführt (vgl. Kapitel II13; Eurofins, Ebersberg).

Die Aktivität der AFR-A13G-E165N-R166K-K207P-E208P wurde mittels Standardtest vor und nach dem Hitzeschritt bestimmt und mit den Aktivitäten der beiden Ausgangsenzyme verglichen (vgl. Kapitel II19.1).

Mit einem Wert von 17,5% war die Restaktivität der Kombinationsmutante AFR-A13G-K207P-E208P-E165N-R166K nach Hitzeschritt 2,1% niedriger als die der Variante AFR-A13G-E165N-R166K und 12,9% niedriger als die der Variante AFR-A13G-K207P-E208P.

2.3.6 Kombination von AFR-A13G-G209Q und AFR-A13G-E165N-R166K

Aufgrund der guten Enzymkinetiken von AFR-A13G-G209Q und AFR-A13G-E165N-R166K sollte eine Kombinationsvariante mit diesen drei Aminosäureaustauschen durch KOD-*Quik Change* PCR (vgl. Kapitel II8) generiert und die Auswirkungen auf die Thermostabilität analysiert werden. Die Restaktivität der Kombinationsvariante nach Hitzeschritt wurde ebenfalls mit denen der Ausgangsvarianten und mit AFR-A13G verglichen.

Mit 3,4% war die Restaktivität der Kombinationsmutante AFR-A13G-G209Q-E165N-R166K nach dem Hitzeschritt 16,2% niedriger als die der Variante AFR-A13G-E165N-R166K und 10% niedriger als die der Variante AFR-A13G-G209Q. Die Restaktivität sank auch 0,3% unter die der AFR-A13G.

2.3.7 Kombination von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-G209P

Dass die beiden thermostabilsten Varianten der ersten ISM-Runde, AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-E208G-G209C, Aminosäureaustausche an den Positionen 207 bis 209 trugen und für diese Aminosäuren die höchsten B-Faktoren berechnet worden waren, deutete an, dass diese Positionen essentiell für die Enzymstabilität waren. Diese Aminosäuren sollten nun mittels KOD-*QuikChange* PCR in einer AFR-A13G-Variante durch Prolin ersetzt werden. Es war bekannt, dass Prolinreste einem Protein durch ihre rigide Struktur Festigkeit verleihen, da die freie Drehbarkeit der Bindung zwischen dem Stickstoff und dem C α wegen der *cis*-Stellung von C α und C α -1 aufgehoben und so die Anzahl möglicher Konstellationen des Peptidrückgrates verringert wird (MacArthur und Thornton 1991). Durch diese Festigkeit sollte die Thermostabilität der AFR-A13G verbessert werden.

Nach der Mutagenese wurden die Aminosäureaustausche durch Sequenzierung überprüft und die Restaktivität dieser Variante nach Hitzeschritt mit den Restaktivitäten von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G verglichen.

Mit 4,95% war die Restaktivität der AFR-A13G-K207P-E208P-G209P nach Hitzeschritt 25,45% niedriger als die der Variante AFR-A13G-K207P-E208P und nur 1,25% höher als die der Wildtyp-AFR-A13G.

2.4 Ergebnisse des Screenings der zweiten Mutageneserunde

In der zweiten Mutageneserunde wurde AFR-A13G-K207P-E208P als Template eingesetzt, da diese Mutante mit einer T_{50}^{10} von 42,0°C die thermostabilste Variante der ersten Mutageneserunde war. Die Aminosäuren an den verbleibenden sechs Loci wurden ebenfalls durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese mittels KOD-*QuikChange* PCR und degenerierter Primer ausgetauscht.

Im Mikrotiterplatten-Maßstab wurden 4992 Klone getestet, davon zeigten 137 Klone nach Hitzeschritt eine höhere Restaktivität als AFR-A13G-K207P-E208P. Die Zellen, die diese Varianten exprimierten, wurden anschließend im 30 ml-Maßstab kultiviert. Tabelle 19 zeigt die drei Varianten, die nach 10 min Inkubation bei 45°C die höchsten Restaktivitäten besaßen. Sie wurden nach Mutagenesemethode (ISM), Charge (I, II usw.), Mutagenesestellen (A-G), Mikrotiterplatte (z. B. 4) und Wellnummer (z. B. G12) benannt.

Tabelle 19: Restaktivitäten selektierter AFR-A13G-K207P-E208P-Varianten nach Hitzeschritt. Die Restaktivitäten wurden nach 10 min Inkubation der Rohextrakte bei 45°C mit dem Standardassay (vgl. Kapitel II 19.1) gemessen und mit der Restaktivität der AFR-A13G verglichen.

Variante	Restaktivität [%]
AFR-A13G-K207P-E208P	30,4
II ISM F3-D7	52,1
II ISM C3-C2	45,6
II ISM C2-C7	44,7

Die drei Varianten zeigten im Vergleich zur AFR-A13G-K207P-E208P eine um 47% bis 71% erhöhte Restaktivität und damit eine verbesserte Thermostabilität. Die Varianten wurden anschließend näher charakterisiert. Zuerst wurden die Plasmide isoliert und sequenziert (vgl. Kapitel II 7.1 und II 13, Tabelle 20).

Tabelle 20: Aminosäureaustausche nach ortsgerichteter Sättigungsmutagenese der AFR-A13G-K207P-E208P in der zweiten ISM-Runde.

Variante	Position(en)	Nukleotidaustausch (Position + Austausch)	Aminosäureaustausch
II ISM F3-D7	E330	989-991: GAA → GTT	E330V
III ISM C2-C7	E165-	494-496: GAG → CAT	E165H
	R166	497-499: CGG → ACT	R166T
III ISM C3-C2	E165-	494-496: GAG → TCT	E165S
	R166	497-499: CGG → GGG	R166G

Im Folgenden werden diese Varianten anhand des Ausgangsenzyms und ihrer in Tabelle 20 gezeigten Aminosäureaustausche bezeichnet.

2.4.1 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V

Die AFR-A13G-K207P-E208P-E330V wurde exprimiert, angereichert und umgepuffert (vgl. Kapitel II14.3, II15 und II16).

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Nach 10 min Inkubation der angereicherten Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V bei 30°C – 50°C wurde die Enzym-Aktivität mit dem Standardtest gemessen (vgl. Kapitel II19.1 und II21.4).

Die AFR-A13G-K207P-E208P-E330V war mit einer T_{50}^{10} von 49,2°C die thermostabilste Variante dieser Arbeit (vgl. Abbildung 80). Im Vergleich zur AFR-A13G war der Wert um 12,5°C erhöht, im Vergleich zur thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde, AFR-A13G-K207P-E208P, war der Wert um 7,2°C gesteigert.

pH-Optimum

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Puffersystem gemessen und ist in Abbildung 19 dargestellt.

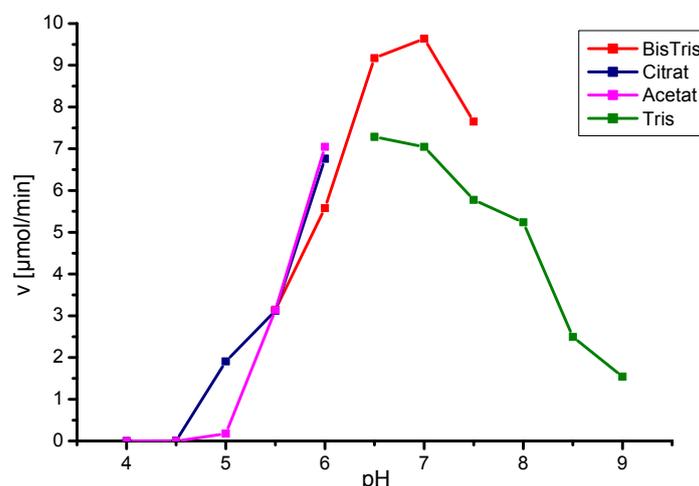


Abbildung 19: pH-Optimum der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0 und Acetat von pH 4,0 bis 6,0. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 9630 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt.

Im Gegensatz zum Ausgangsenzym lag das pH-Optimum der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V bei pH 7,0 in 0,1 M BisTris.

Isoelektrischer Punkt (pI)

Der isoelektrische Punkt (pI) der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V wurde gemäß Kapitel II21.2 durch isoelektrische Fokussierung (IEF) mit pH 5,62 bestimmt (vgl. Abbildung 79).

Alternativ bestimmte der "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) einen Wert von pH 5,68.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden gemäß Kapitel II19.1 bestimmt (vgl. Tabelle 21).

Tabelle 21: Kinetische Daten der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardassay gemäß Kapitel II19.1 gemessen. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung verifiziert.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E330V	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E330V	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E330V
1,5-AF	803,6	776,0	8,30 ± 0,2	3,3 ± 0,14	56639	137567
D-Glucoson	135,0	55,9	11,00 ± 0,1	8,7 ± 0,17	7180	3757
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	24,8	17,02 ± 0,8	18,5 ± 0,12	5544	785

Erreichte die spezifische Aktivität der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V für 1,5-AF 97% der spezifischen Aktivität der AFR-A13G, waren die Werte für D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson verglichen mit AFR-A13G auf 41% und 15% verschlechtert.

Durch den im Vergleich zur AFR-A13G um 5 mM verbesserten K_m -Wert der Variante für 1,5-AF wurde die katalytische Effizienz für dieses Substrat auf 243% erhöht. Auch der K_m -Wert für D-Glucoson war verbessert, die schlechtere spezifische Aktivität resultierte aber in einer Senkung der katalytischen Effizienz der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V um die Hälfte. Die Verschlechterung des K_m -Wertes für 6-Deoxy-D-glucoson um 1,48 mM bewirkte mit der niedrigeren spezifischen Aktivität eine Abnahme der katalytischen Effizienz der Variante auf 14% verglichen mit der katalytischen Effizienz der AFR-A13G.

2.4.2 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T

Die AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T wurde analog der Kapitel II14.3, II15 und II16 exprimiert, angereichert und umgepuffert.

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Nach 10 min Inkubation der angereicherten Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T bei 30°C – 45°C wurde die Enzym-Aktivität gemessen (vgl. Kapitel II19.1).

Die T_{50}^{10} der AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T war zwar im Vergleich zur AFR-A13G um 3,2°C erhöht (vgl. Abbildung 80), im Vergleich zur Template-Variante AFR-A13G-K207P-E208P jedoch um 2,1°C reduziert.

pH-Optimum

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert und Puffersystem gemessen (vgl. Abbildung 20).

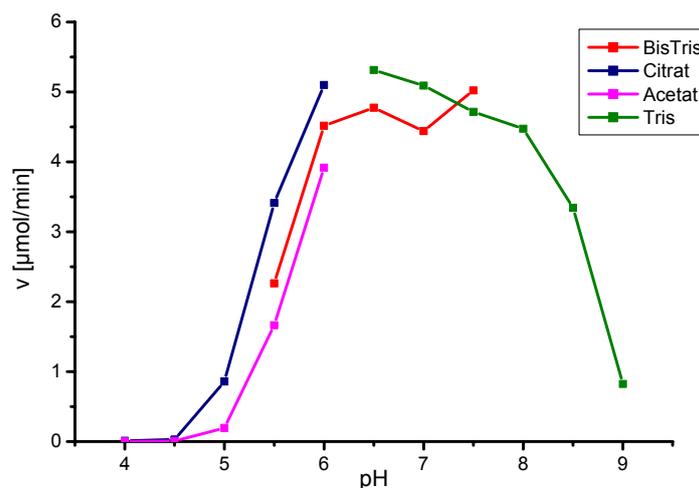


Abbildung 20: pH-Optimum der AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0 und Acetat von pH 4,0 bis 6,0. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 5314 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt.

Das pH-Optimum der Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T lag bei pH 6,5 in 0,1 M Tris-Puffer.

Isoelektrischer Punkt (pI)

Der isoelektrische Punkt (pI) der AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T wurde gemäß Kapitel II21.2 durch isoelektrische Fokussierung (IEF) mit pH 5,58 bestimmt (vgl. Abbildung 79).

Die Software "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) lieferte einen Wert von pH 5,66.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T für die drei Substrate wurden analog Kapitel II19.1 gemessen (vgl. Tabelle 22).

Tabelle 22: Kinetische Daten der AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardtest gemessen. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung überprüft.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T
1,5-AF	803,6	731,8	8,30 ± 0,2	7,0 ± 0,12	56639	61158
D-Glucoson	135,0	60,0	11,00 ± 0,1	30,1 ± 0,14	7180	1166
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	27,8	17,02 ± 0,8	18,5 ± 0,13	5544	879

Die spezifischen Aktivitäten der Variante reduzierten sich verglichen mit AFR-A13G, für 1,5-AF auf 91%, für D-Glucoson auf 44% und für 6-Deoxy-D-glucoson auf 17%.

Da für 1,5-AF die spezifische Aktivität der AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T nur um 9% niedriger war als für AFR-A13G und der K_m -Wert um 1,3 mM reduziert war, war die katalytische Effizienz der Variante im Vergleich zum Ausgangsenzym um 10% erhöht. Der K_m -Wert für D-Glucoson war um 19,1 mM gesteigert, die katalytische Effizienz der Variante war auf 16% des Wertes der AFR-A13G herabgesetzt. Der K_m -Wert für 6-Deoxy-D-glucoson war um 1,48 mM höher als bei AFR-A13G, durch die ebenfalls verschlechterte spezifische Aktivität wurde die katalytische Effizienz auf 16% reduziert.

2.4.3 Biochemische Charakterisierung der Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G

Die Expression, Reinigung und Umpufferung der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G wurde gemäß der Kapitel II14.3, II15 und II16 durchgeführt.

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Nach 10 min Inkubation der angereicherten Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G bei 35°C – 45°C wurde die Enzym-Aktivität mit dem Standardtest gemessen (vgl. Kapitel II19.1 und II21.4). Mit 41,8°C war die T_{50}^{10} für AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G

im Vergleich zur AFR-A13G zwar um 5,1°C erhöht (vgl. Abbildung 81), lag aber 0,2°C unter dem Wert der thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde.

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

Die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G ergab, dass dieses im Vergleich zum Ausgangsenzym unverändert bei pH 6,5 in 0,1 M BisTris lag (vgl. Abbildung 78).

Der isoelektrische Punkt (pI) der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G wurde gemäß Kapitel II21.2 durch isoelektrische Fokussierung (IEF) mit pH 5,55 bestimmt (vgl. Abbildung 79). Die Berechnung des pI mit der Software "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) ergab einen Wert von pH 5,6.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, Michaeliskonstanten und katalytischen Effizienzen der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G wurden gemäß Kapitel II19.1 bestimmt (vgl. Tabelle 23).

Tabelle 23: Kinetische Daten der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardassay nach Kapitel II19.1 bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung verifiziert.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G	AFR-A13G	AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G
1,5-AF	803,6	726,3	8,30 ± 0,2	16,1 ± 0,12	56639	26390
D-Glucoson	135,0	61,0	11,00 ± 0,1	40,4 ± 0,13	7180	883
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	30,5	17,02 ± 0,8	26,7 ± 0,14	5544	668

Die spezifischen Aktivitäten der Variante für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson waren verglichen mit AFR-A13G auf 90%, 45% und 19% verschlechtert.

Die K_m -Werte der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G waren für diese drei Substrate im Vergleich zur AFR-A13G 7,8 mM, 29,4 mM und 9,68 mM erhöht, die katalytischen Effizienzen der Variante waren deshalb auf 47% (1,5-AF) bis 12% (D-Glucoson, 6-Deoxy-D-glucoson) reduziert.

2.5 Zufallsmutagenese des *afr-a13g*-Gens

Über die gesamte Gen-Länge der AFR-A13G wurden durch *error prone*-PCR zufällig Mutationen eingeführt (vgl. Kapitel II9). Da mit steigender Mutationsrate das Einführen einer Vorteilsmutation unwahrscheinlicher wird (Arnold und Moore 1997), wurden die Konzentrationen der divalenten Kationen $MgCl_2$ und $MnCl_2$ so variiert, dass die statistische Mutationsrate der Polymerase 1-3 bp pro Sequenz pro Generation betrug. Dies wurde durch stichprobenartige Sequenzanalyse überprüft (vgl. Kapitel II13). Die höchste Mutationsrate mit ausreichenden Mengen an PCR-Produkt für die anschließende Klonierung wurde mit der Kombination aus 8,0 mM $MgCl_2$ und 0,15 mM $MnCl_2$ erreicht. Bei geringeren Konzentrationen enthielt die Variantenbibliothek vermehrt unmutierte Gene, bei höheren Salzkonzentrationen kam es zu einer Hemmung der *Taq*-Polymerase-Aktivität und es wurde nicht mehr ausreichend Amplifikat für die folgende Klonierung amplifiziert.

2.6 Ergebnisse des Screenings: Variante III4G12

Im Mikrotiterplatten-Maßstab wurden 1632 Klone gemäß Kapitel II20.1 getestet, davon zeigten 231 Klone eine höhere Thermostabilität als AFR-A13G. Die Zellen, die diese Klone exprimierten, wurden im 30 ml-Maßstab angezogen. Die Varianten wurden nach Screeningrunde (z. B. III), Mikrotiterplatte (z. B. 4) und Wellnummer (z. B. G12) benannt.

Die Variante III4G12 zeigte im 30 ml-Maßstab mit einer Restaktivität nach Hitzeschritt von 87,3% die höchste Thermostabilität. Das Plasmid der Variante wurde präpariert und das Gen sequenziert (vgl. Kapitel II7.1 und II13, Tabelle 24).

Tabelle 24: Aminosäureaustausche der Variante III4G12 nach *error prone*-PCR.

Variante	Position	Nukleotidaustausch (Position + Austausch)	Aminosäureaustausch
III4G12	G13	38-40: GGG → GCG	G13A
	M31	92-94: ATG → GTG	M31V

Gemäß der in Tabelle 24 dargestellten Aminosäureaustausche wurde die Variante III4G12 in AFR-G13A-M31V umbenannt. Anschließend wurden die *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen, die AFR-G13A-M31V exprimierten, im 250 ml-Maßstab angezogen (vgl. Kapitel II14.3) und das Enzym angereichert (vgl. Kapitel II16).

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Zur Bestimmung der T_{50}^{10} wurden Aliquots des Enzyms 10 min bei 30°C - 50°C inkubiert und die AFR-Aktivität gemessen (vgl. Kapitel II19.1 und II21.4). Die T_{50}^{10} für AFR-G13A-M31V war 46,6°C (vgl. Abbildung 81), im Vergleich zur AFR-A13G war der Wert um 9,9°C erhöht.

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Variante AFR-G13A-M31V in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Puffersystem wurde gemäß Kapitel II19.1 gemessen und ist in Abbildung 21 dargestellt.

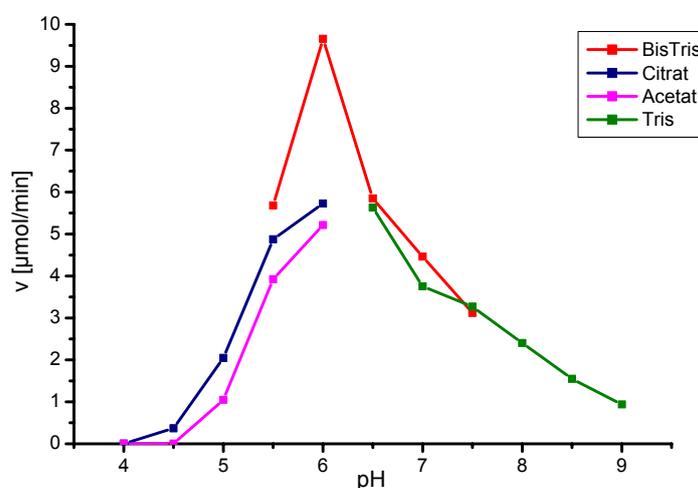


Abbildung 21: pH-Optimum der AFR-G13A-M31V. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0 und Acetat von pH 4,0 bis 6,0. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 57930 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt.

Das pH-Optimum der AFR-G13A-M31V lag bei pH 6,0 in 0,1 M BisTris.

Der "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) berechnete für AFR-G13A-M31V einen pI von pH 5,61.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-G13A-M31V für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden gemäß Kapitel II19.1 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 im Vergleich zur AFR-A13G dargestellt.

Tabelle 25: Kinetische Daten der AFR-G13A-M31V. Die AFR-Aktivität wurde mit dem Standardassay gemessen. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung verifiziert.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-G13A-M31V	AFR-A13G	AFR-G13A-M31V	AFR-A13G	AFR-G13A-M31V
1,5-AF	803,6	750,4	8,30 ± 0,2	3,01 ± 0,2	56639	145842
D-Glucoson	135,0	179,3	11,00 ± 0,1	24,30 ± 0,12	7180	4316
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	133,6	17,02 ± 0,8	16,95 ± 0,3	5544	4611

Für 1,5-AF war die spezifische Aktivität der AFR-G13A-M31V im Vergleich zur AFR-A13G auf 93%, für 6-Deoxy-D-glucoson auf 83% reduziert. Für die Reduktion von D-Glucoson war die spezifische Aktivität der Variante um 33% erhöht.

Bedingt durch den um 5,2 mM reduzierten K_m -Wert der AFR-G13A-M31V für 1,5-AF war die katalytische Effizienz verglichen mit AFR-A13G auf 257% erhöht. War der K_m -Wert für 6-Deoxy-D-glucoson praktisch identisch zum K_m -Wert der AFR-A13G, wurden aufgrund der niedrigeren spezifischen Aktivität 83% der katalytischen Effizienz des Ausgangsenzyms erreicht. Die Erhöhung des K_m -Werts für D-Glucoson um 13,3 mM bewirkte eine auf 60% verschlechterte katalytische Effizienz der AFR-G13A-M31V.

Um das Verständnis der Mechanismen zu vertiefen, die die Thermostabilität der AFR-A13G erhöhen, wurden die beiden Mutationen der AFR-G13A-M31V anschließend einzeln in zwei AFR-Varianten eingeführt und diese Einzelmutanten angereichert und charakterisiert (Reetz et al. 2007).

2.7 Separation der Mutationen der AFR-G13A-M31V durch ortsgerichtete Mutagenese

Durch KOD-*QuikChange* PCR (vgl. Kapitel II8) wurden zwei AFR-Varianten hergestellt, die jeweils nur einen der beiden durch *error prone*-PCR zufällig eingefügten Nukleotidaustausche enthielten (Kapitel II9). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Es wurden Aliquots von AFR-G13A und AFR-A13G-M31V 10 min bei 30°C - 50°C inkubiert und die AFR-Aktivität mit dem Standardtest gemessen (vgl. Kapitel II19.1 und II21.4).

Lag die T_{50}^{10} [°C] der AFR-G13A bei 40,2°C, war diese Temperatur bei der Variante AFR-A13G-M31V um 8,2°C auf 44,9°C erhöht (vgl. Abbildung 81).

pH-Optima und isoelektrische Punkte (pIs)

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Varianten AFR-G13A und AFR-A13G-M31V wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Puffersystem analog Kapitel II19.1 bestimmt (vgl. Abbildung 22).

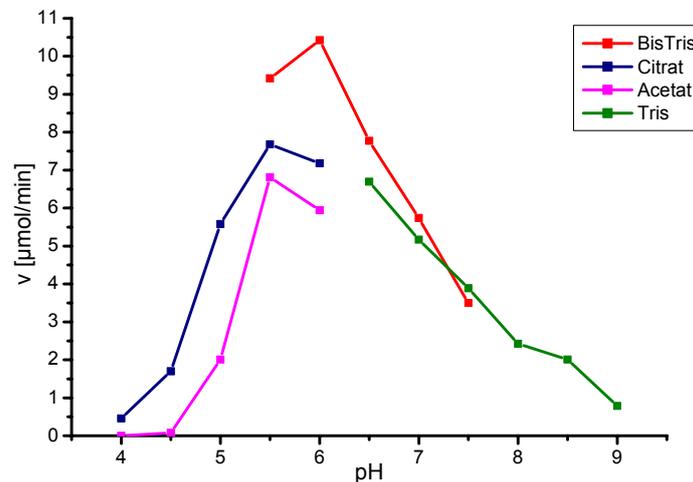


Abbildung 22: pH-Optimum der AFR-G13A. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0 und Acetat von pH 4,0 bis 6,0. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 1042 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt.

Das pH-Optimum der AFR-G13A lag bei pH 6,0 in 0,1 M BisTris.

Die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-A13G-M31V ergab, dass dieses im Vergleich zum Ausgangsenzym unverändert bei pH 6,5 in 0,1 M BisTris lag (vgl. Abbildung 78).

Der isoelektrische Punkt beider Varianten wurde mittels "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" (EMBL, Heidelberg) berechnet. Er veränderte sich im Vergleich zur Doppelmutante AFR-G13A-M31V nicht und lag ebenfalls bei pH 5,6.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten der AFR-G13A und AFR-A13G-M31V für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden gemäß Kapitel II19.1 gemessen (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: Spezifische Aktivitäten der AFR-G13A und AFR-A13G-M31V. Die AFR-Aktivitäten wurden mit dem Standardtest bestimmt. Die Substrate lagen im Reaktionsansatz im Überschuss vor, die Werte wurden durch Doppelbestimmung überprüft.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		
	AFR-A13G	AFR-G13A	AFR-A13G-M31V
1,5-AF	803,6	731,92	963,14
D-Glucoson	135,0	147,52	112,69
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	163,22	78,98

Mit 163,22 U/mg war die spezifische Aktivität der AFR-G13A für 6-Deoxy-D-glucoson praktisch identisch zur spezifischen Aktivität der AFR-A13G. Diese Variante besaß für 6-Deoxy-D-glucoson die höchste spezifische Aktivität dieser Arbeit. Für D-Glucoson war die spezifische Aktivität verglichen mit AFR-A13G auf 110% erhöht, für 1,5-AF auf 91% reduziert.

Im Vergleich zur AFR-A13G war die spezifische Aktivität der AFR-A13G-M31V für 1,5-AF auf 120% erhöht. Für 6-Deoxy-D-glucoson als Substrat war die spezifische Aktivität der Variante halbiert. Anschließend wurden die K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der Separationsmutanten für die drei Substrate gemessen (vgl. Kapitel II21.3 und Tabelle 27).

Tabelle 27: Kinetische Daten der AFR-G13A und der AFR-A13G-M31V.

Substrat	K_m [mM]			k_{cat}/K_m [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]		
	AFR-A13G	AFR-G13A	AFR-A13G-M31V	AFR-A13G	AFR-G13A	AFR-A13G-M31V
1,5-AF	8,30 ± 0,2	6,4 ± 0,05	2,9 ± 0,11	56639	66902	194289
D-Glucoson	11,00 ± 0,1	11,0 ± 0,2	9,4 ± 0,1	7180	7845	7013
6-Deoxy-D-glucoson	17,02 ± 0,8	25,8 ± 0,2	13,8 ± 0,15	5544	3701	3348

Bei der Variante AFR-G13A war der K_m -Wert für 1,5-AF um 1,9 mM niedriger als der K_m -Wert der AFR-A13G, der K_m -Wert für 6-Deoxy-D-glucoson war um 8,8 mM erhöht. Für D-Glucoson erreichten AFR-G13A und AFR-A13G den gleichen K_m -Wert. Die katalytischen Effizienzen waren für 1,5-AF und D-Glucoson auf 118% und 110% gesteigert, für 6-Deoxy-D-glucoson um 33% reduziert.

Die K_m -Werte der AFR-A13G-M31V waren verglichen mit AFR-A13G für 1,5-AF um 5,4 mM, für D-Glucoson um 1,6 mM und für 6-Deoxy-D-glucoson um 3,2 mM verbessert. Die katalytische Effizienz der Variante war für 1,5-AF auf 343% erhöht. Dies stellte die höchste katalytische Effizienz der in dieser Arbeit generierten AFR-Varianten dar. Bei der Reduktion von D-

Glucoson wurden 98% der katalytischen Effizienz des Ausgangsenzyms erreicht, für 6-Deoxy-D-glucoson war die katalytische Effizienz auf 60% reduziert.

2.8 Kombination der AFR-G13A-M31V mit K207P und E208P

Durch KOD-*QuikChange* PCR wurde eine AFR-Variante hergestellt, bei der die Aminosäureaustausche der thermostabilsten Varianten aus *error-prone* PCR und erster ISM-Runde kombiniert waren (vgl. Kapitel II8, III2.3.1 und III2.6). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (vgl. Kapitel II13; Eurofins, Ebersberg) überprüft.

Temperaturstabilität T_{50}^{10} [°C]

Die Kombinationsmutante AFR-G13A-M31V-K207P-E208P wurde 10 min bei 30°C - 50°C inkubiert und die Aktivität mit dem Standardtest gemessen (vgl. Kapitel II19.1 und II21.4).

Die T_{50}^{10} der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P war mit 47,2°C im Vergleich zur durch *error-prone*-PCR generierten Ausgangsvariante AFR-G13A-M31V um 0,6°C erhöht (vgl. Abbildung 81). Im Vergleich zur thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde, AFR-A13G-K207P-E208P wurde die T_{50}^{10} um 4,8°C gesteigert (vgl. Abbildung 80).

pH-Optimum und isoelektrischer Punkt (pI)

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Kombinationsvariante AFR-G13A-M31V-K207P-E208P wurde abhängig von pH-Wert und Puffersystem gemessen (vgl. Kapitel II19.1, vgl. Abbildung 23).

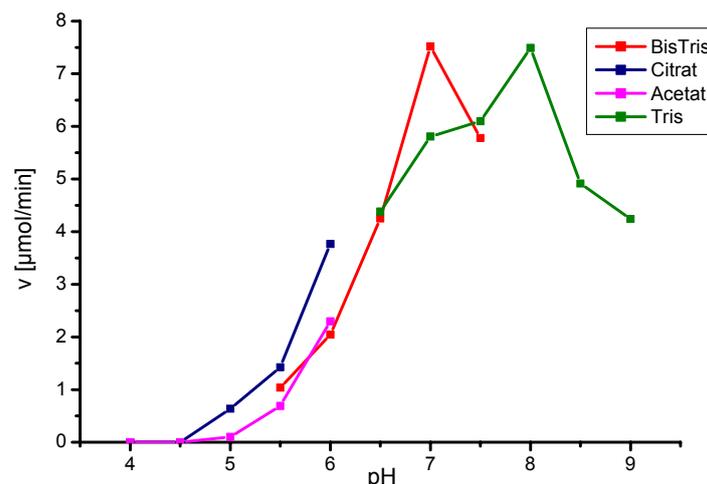


Abbildung 23: pH-Optimum der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0 und Acetat von pH 4,0 bis 6,0. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 75191 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt.

Die Variante AFR-G13A-M31V-K207P-E208P besaß ein pH-Optimum bei pH 7,0 in 0,1 M BisTris und ein pH-Optimum bei 8,0 in 0,1 M Tris, wobei die beiden Reaktionsgeschwindigkeiten nahezu identisch waren.

Der vom "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" kalkulierte isoelektrische Punkt der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P lag bei pH 5,6.

Enzymkinetik

Die spezifischen Aktivitäten, K_m -Werte und katalytischen Effizienzen der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson wurden gemäß Kapitel II19.1 bestimmt und sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Kinetische Daten der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P. Die AFR-Aktivitäten wurden mit dem Standardassay bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung überprüft.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]		K_m [mM]		k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	
	AFR-A13G	AFR-G13A-M31V-K207P-E208P	AFR-A13G	AFR-G13A-M31V-K207P-E208P	AFR-A13G	AFR-G13A-M31V-K207P-E208P
1,5-AF	803,6	380,00	8,30 ± 0,2	6,94 ± 0,2	56639	32032
D-Glucoson	135,0	30,78	11,00 ± 0,1	14,45 ± 0,4	7180	1246
6-Deoxy-D-glucoson	161,3	11,78	17,02 ± 0,8	23,54 ± 0,2	5544	293

Die spezifischen Aktivitäten der Kombinationsmutante waren für die Reduktion der drei Substrate im Vergleich zur AFR-A13G auf 7,3% für 6-Deoxy-D-glucoson bis 47% für 1,5-AF verschlechtert. War der K_m -Wert der Variante für 1,5-AF verglichen mit AFR-A13G um 1,4 mM verbessert, war die katalytische Effizienz der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P durch die verschlechterte spezifische Aktivität auf 57% reduziert. Die katalytische Effizienz der Variante für D-Glucoson war um 82% reduziert, der K_m -Wert um 3,45 mM erhöht. Für 6-Deoxy-D-glucoson war die katalytische Effizienz der AFR-G13A-M31V-K207P-E208P auf 5,3% reduziert.

2.9 Zusammenfassung

Die wichtigsten kinetischen Daten aller dargestellter AFR-Varianten dieser Arbeit sind zusammen mit ihren jeweiligen T_{50}^{10} -Werten im Vergleich zur AFR-A13G in nachfolgender Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Kinetische Daten und T_{50}^{10} -Werte aller in dieser Arbeit generierter Varianten. Werte, die mindestens 90% der für AFR-A13G bestimmten Werte erreichen, sind hervorgehoben.

Variante	T_{50}^{10} [°C]	1,5-AF		D-Glucoson		6-Deoxy-D-glucoson	
		K_m [mM]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
AFR-A13G	36,7	8,3	56639	11,0	7180	17,02	5544
Erste ISM-Runde							
AFR-A13G-K207P-E208P	42,0	6,6	67931	30,4	1297	17,6	994
AFR-A13G-E208G-G209C	40,2	8,8	17490	18,9	1947	27,6	725
AFR-A13G-E165N-R166K	38,8	6,1	64484	14,3	4762	18,3	5073
AFR-A13G-G209Q	37,4	7,3	56182	16,8	3834	19,8	4618
Zweite ISM-Runde							
AFR-A13G-K207P-E208P-E330V	49,2	3,3	137567	8,7	3757	18,5	785
AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T	39,9	7,0	61158	30,1	1166	18,5	879
AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G	41,8	16,1	26390	40,4	883	26,7	668
Error prone-PCR							
AFR-G13A-M31V	46,6	3,0	145842	24,3	4316	16,95	4611
Separations-Varianten (ortsgerichtete Mutagenese)							
AFR-G13A	40,2	6,4	66902	11,0	7845	25,8	3701
AFR-A13G-M31V	44,9	2,9	194289	9,4	7013	13,8	3348
Kombinationsmutante (ortsgerichtete Mutagenese)							
AFR-G13A-M31V-K207P-E208P	47,2	6,9	32032	14,5	1246	23,5	293

Aufgrund der Zielsetzung dieser Arbeit wurden bei quantitativen Umsetzungen von 6-Deoxy-D-glucoson mit *in situ*-Cosubstrat-Regenerierung die thermostabilsten Varianten mit einer $T_{50}^{10} \geq 42^\circ\text{C}$ eingesetzt. Es wurden die Varianten AFR-A13G-K207P-E208P, AFR-A13G-K207P-E208P-E330V, AFR-G13A-M31V, AFR-A13G-M31V und AFR-G13A-M31V-K207P-

E208P verwendet. Diese hatten im Vergleich zum Ausgangsenzym für 1,5-AF um 7% bis 243% erhöhte katalytische Effizienzen und um 1,4 mM bis 5,9 mM reduzierte K_m -Werte.

AFR-G13A-M31V und AFR-A13G-M31V waren besonders vielversprechend, da sie für 6-Deoxy-D-glucoson hohe katalytischen Effizienzen und die niedrigsten K_m -Werte besaßen. AFR-G13A-M31V erreichte 83% der katalytischen Effizienz der AFR-A13G, bei fast identischem K_m -Wert.

Anschließend wurde die thermostabilste Variante dieser Arbeit, AFR-A13G-K207P-E208P-E330V, mittels eines zusätzlichen Hitzefällungsschritts gereinigt. Die katalytische Effizienz der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V für 1,5-AF war im Vergleich zur Ausgangsvariante um 143% gesteigert (vgl. Tabelle 29).

2.10 Reinigung der thermostabilsten Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V

Durch die hohe T_{50}^{10} der Variante von 49,2°C sollten thermolabile Fremdproteine von *E. coli* durch Hitzefällung aus dem Rohextrakt ausgefällt und die spezifische Aktivität des Enzyms gesteigert werden können. Ohne den zusätzlichen Reinigungsschritt wurde die AFR-A13G-K207P-E208P-E330V zu einer spezifischen Aktivität von 776,02 U/mg angereichert (vgl. Tabelle 21).

Die Anreicherung der AFR-A13G wurde bereits in Tabelle 9 dargestellt. Das Enzym konnte durch eine 40,6-fache Anreicherung mit einer Ausbeute von 78,6% zu einer spezifischen Aktivität von 803,6 U/mg gereinigt werden.

Die AFR-A13G-K207P-E208P-E330V wurde exprimiert (vgl. Kapitel II14.3) und der Rohextrakt wurde in zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt, um den Einfluss zweier Temperaturen auf diese Variante analysieren zu können. Die Hitzefällung wurde anschließend entweder für 10 Minuten bei 40°C oder für 5 Minuten bei 45°C durchgeführt. Nach Zentrifugation wurde das Enzym über Nickel-Sepharose und Phenyl-Sepharose angereichert (vgl. Tabelle 30 und Tabelle 31).

Tabelle 30: Anreicherungstabelle der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V. Die Hitzefällung wurde 10 min bei 40°C durchgeführt.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtaktivität [U]	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [-fach]
Rohextrakt	9,5	646,9	29,3	22,1	100,0	1,0
Hitzefällung (40°C)	9,0	526,6	21,4	24,6	81,4	1,1
Ni-Sepharose	8,0	487,8	-	-	75,4	-
Phenyl-Sepharose	16,0	410,1	0,52	788,7	63,4	35,7

Durch die 10 min Hitzefällung bei 40°C wurde die AFR-A13G-K207P-E208P-E330V mit einer Ausbeute von 63,4% 35,7-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 788,7 U/mg angereichert. Im Vergleich zur Reinigung dieser Variante ohne Hitzefällung erhöhte sich die spezifische Aktivität um 12,7 U/mg, bezogen auf AFR-A13G war die spezifische Aktivität der Variante um 14,9 U/mg reduziert.

Tabelle 31: Anreicherungstabelle der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V. Die Hitzefällung wurde 5 min bei 45°C durchgeführt.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtaktivität [U]	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [-fach]
Rohextrakt	9,5	651,2	29,7	21,9	100,0	1,0
Hitzefällung (45°C)	9,0	625,8	15,0	41,7	96,1	1,9
Ni-Sepharose	8,0	558,7	-	--	85,8	-
Phenyl-Sepharose	16,0	472,8	0,56	844,3	72,6	38,6

Durch die 5 min Hitzefällung bei 45°C wurde die AFR-A13G-K207P-E208P-E330V mit einer Ausbeute von 72,6% 38,6-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 844,3 U/mg angereichert. Im Vergleich zur Reinigung dieser Variante ohne Hitzefällung verbesserte sich die spezifische Aktivität um 68,3 U/mg (vgl. Tabelle 21), bezogen auf AFR-A13G war die spezifische Aktivität der Variante um 40,7 U/mg erhöht (vgl. Tabelle 9).

Im Anschluss wurde eine SDS-PAGE mit einem 10%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel durchgeführt (vgl. Kapitel II18). Das Ergebnis der Elektrophorese ist in Abbildung 24 dargestellt.

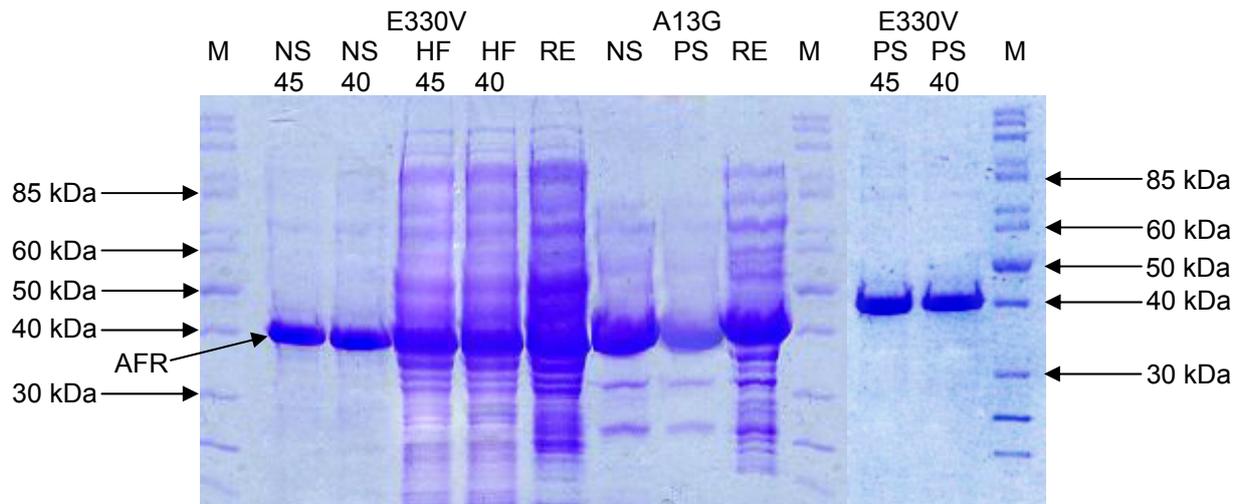


Abbildung 24: SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsfractionen der AFR-A13G und der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V. Es wurden denaturierte Proben von Rohextrakt (RE, 55-56 µg), Hitzefällung (HF, 30-43 µg), Ni-Sepharose (NS) und Phenyl-Sepharose (PS, 0,6-1,4 µg) aufgetragen, als Marker wurde die Page Ruler® Unstained Protein Ladder verwendet (Fermentas). E330V: AFR-A13G-K207P-E208P-E330V, A13G: AFR-A13G, 40: 40°C, 45: 45°C. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Anzahl und Intensität der Banden nahmen von der Rohextrakt- bis hin zur Phenyl-Sepharoseprobe ab. In der Phenyl-Sepharoseprobe der AFR-A13G waren neben der AFR-A13G-Bande, die auf einer Höhe von 38 kDa lief, noch Verunreinigungen von 35 kDa, 27 kDa und von 50 kDa bis 80 kDa Größe zu sehen. Die Phenyl-Sepharoseproben der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V zeigten außer der AFR keine weiteren Banden.

Bei der Reinigung der thermostabilen AFR-A13G-K207P-E208P-E330V war eine 5-minütige Inkubation bei 45°C geeignet, um thermolabile Fremdproteine von *E. coli* BL21Gold(DE3) aus dem Ansatz auszufällen, die Variante rein darzustellen (vgl. Abbildung 24) und ihre spezifische Aktivität um 68,3 U/mg zu erhöhen (vgl. Tabelle 21 und Tabelle 31). Die Steigerung der spezifischen Aktivität der gereinigten Variante im Vergleich zur AFR-A13G um 40,7 U/mg verdeutlicht die größere Effektivität der Reinigung thermostabiler Varianten mit einer zusätzlichen Hitzefällung.

3 Entwicklung biokatalytischer Verfahren für die Synthese von D-Mannose und D-Rhamnose

Kühn et al. zeigten, dass AFR D-Glucoson (2-Keto-D-glucose) stereoselektiv und quantitativ zu D-Mannose reduziert (Kühn et al. 2006). Die Autoren wiesen auch darauf hin, dass sich D-Mannose einfach aus dem „bulk“-Kohlenhydrat D-Glucose durch zwei biokatalytische Redoxreaktionen herstellen ließe (vgl. Abbildung 25).

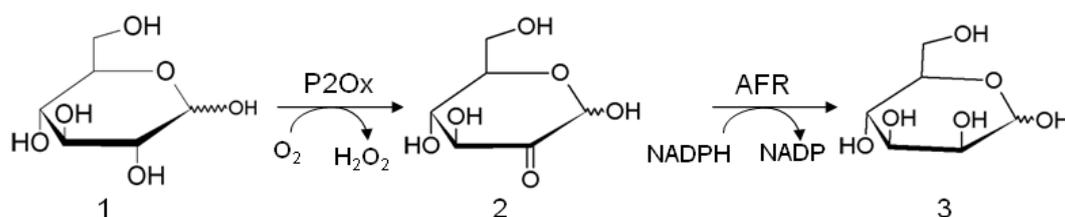


Abbildung 25: Schema der biokatalytischen Synthese von D-Mannose aus D-Glucose (Kühn et al. 2006). D-Glucose 1 wird durch Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) zu D-Glucoson 2 oxidiert, das durch 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR) zu D-Mannose 3 reduziert werden kann.

Nach diesem Reaktionsschema wird zunächst D-Glucose mit P2Ox zu D-Glucoson umgesetzt, was als Substrat der AFR fungiert. Da die Herstellung von D-Glucoson durch Verwendung einer verbesserten P2Ox (P2OxB2H) gut etabliert war (Huwig et al. 1994; Bastian et al. 2005), konzentrierten sich die Untersuchungen auf die von AFR katalysierte Reaktion. Die zunächst erhoffte Verwendung von NADH anstelle von NADPH als Cofaktor in einem System mit Cosubstrat-Regenerierung war für die Reduktion von D-Glucoson zu D-Mannose wegen der im Vergleich zu NADPH ungünstigeren k_{cat} - bzw. $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte nicht möglich (Dambe et al. 2006). Da Versuche zur Verbesserung dieser Werte für NADH fehlschlugen, sollte für die präparativen Umsetzungen ein geeignetes Cosubstrat-Regenerierungssystem für den Cofaktor NADPH entwickelt werden. Da D-Glucoson von AFR mit NADPH effizient umgesetzt wurde (Dambe et al. 2006) stellte sich die Frage, ob auf einem entsprechenden Reaktionsweg (vgl. Abbildung 25) aus 6-Deoxy-D-glucose D-Rhamnose (6-Deoxy-D-mannose) hergestellt werden kann. Damit wäre ein einfacher biokatalytischer Zugang zu diesem pharmarelevanten Zucker möglich. Da 6-Deoxy-D-glucose ein hochpreisiges Kohlenhydrat ist, wurde in einem gemeinsamen Projekt von dem Start-up Unternehmen toroma organics Ltd. eine effiziente Synthese für 6-Deoxy-D-glucose aus D-Glucose entwickelt (Giffhorn 2011), die für nachfolgend beschreibende Umsetzungen verwendet wurde.

3.1 Herstellung von D-Glucoson aus D-Glucose mit P2OxB2H aus *Peniophora gigantea*

Die Biokonversionen von D-Glucose wurden mit der Pyranose-2-Oxidase-Variante (P2Ox, EC 1.1.3.10) P2OxB2H durchgeführt. P2OxB2H unterscheidet sich von der nativen P2Ox aus *Peniophora gigantea* durch die Aminosäureaustausche E540K zur Steigerung der Thermo- und pH-Stabilität und K312E zur Erhöhung der katalytischen Effizienzen für zahlreiche Pyranosen. Außerdem verfügt sie über einen C-terminalen (His)₆-tag und konnte somit einfach mit Hilfe eines Hitzeschritts und Affinitätschromatographie isoliert werden (Bannwarth et al. 2004; Bastian et. al 2005; Giffhorn 2000).

Abbildung 26 zeigt exemplarisch einen Umsatz von D-Glucose zu D-Glucoson mit P2OxB2H.

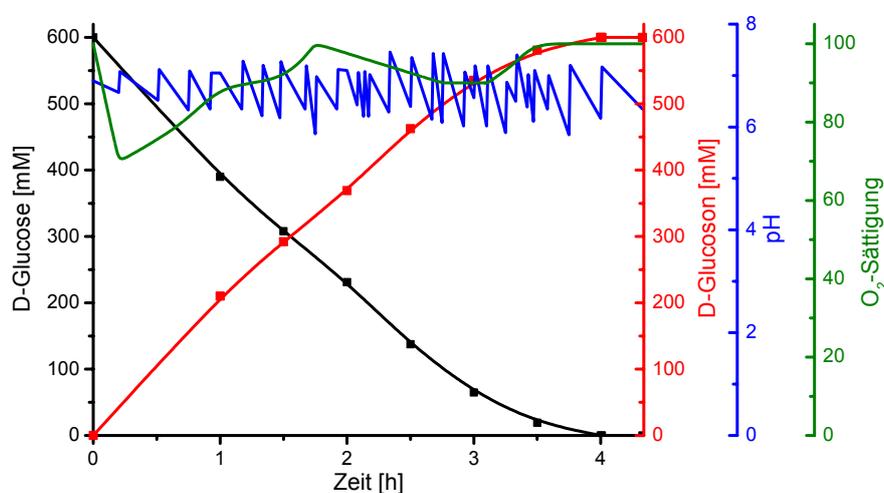


Abbildung 26: Biokonversion von 300 mmol D-Glucose zu D-Glucoson mit P2OxB2H. Die Biokonversion fand in 500 ml H₂O_{deion} unter Zufuhr von reinem Sauerstoff (500 ml/min) bei 500 rpm und 22°C statt. Verfolgt wurden O₂-Sättigung und pH-Wert. Es wurden 1 U P2OxB2H (in H₂O_{deion}) und 440 U Katalase (in 0,1 M KH₂PO₄, pH 7,0) pro ml Reaktionsvolumen eingesetzt. Titriert wurde mit 1 M (NH₄)₂CO₃.

Der Umsatz war nach 4 h komplett.

Während der Oxidation von D-Glucose durch P2OxB2H wurden Substratabnahme und Produktbildung durch HPLC verfolgt (vgl. Kapitel II24.1). Abbildung 27 zeigt exemplarisch das HPLC-Chromatogramm mit den gut differenzierbaren Peaks für D-Glucose und D-Glucoson nach 2 h.

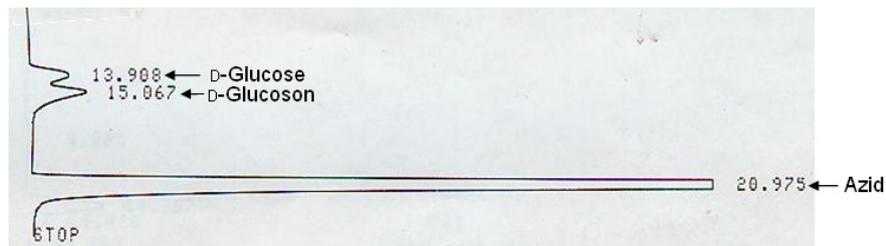


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramm der Rezex RCM Monosaccharid Ca^{2+} -Säule (Phenomenex). Flussrate: 0,66 ml/min.

Danach wurden die Enzyme mit Ultrafiltration abgetrennt und das Filtrat lyophilisiert (vgl. Kapitel II23). Die Ausbeute betrug im Vergleich zur eingesetzten Substratmenge 89%. Abbildung 28 zeigt das lyophilisierte Produkt.



Abbildung 28: Lyophilisat von reinem D-Glucoson.

Die Reinheit des lyophilisierten D-Glucosons wurde durch HPLC (vgl. Kapitel II24.1) bestätigt.

3.2 Herstellung von 6-Deoxy-D-Glucoson aus 6-Deoxy-D-Glucose mit P2OxB2H1 aus *Peniophora gigantea*

Für die Umsetzung von 6-Deoxy-D-Glucose zu 6-Deoxy-D-Glucoson wurde nicht P2OxB2H, sondern eine auf diesem Enzym basierende Mutante verwendet, die 6-Deoxy-D-Glucose 33% effizienter umsetzte. Diese Mutante wurde P2OxB2H1 bezeichnet und enthielt die Substitutionen T378K, A379S, G385G, T395S und S398P (Dorscheid 2009).

Abbildung 29 zeigt exemplarisch einen Umsatz von 6-Deoxy-D-glucose zu 6-Deoxy-D-glucoson mit P2OxB2H1.

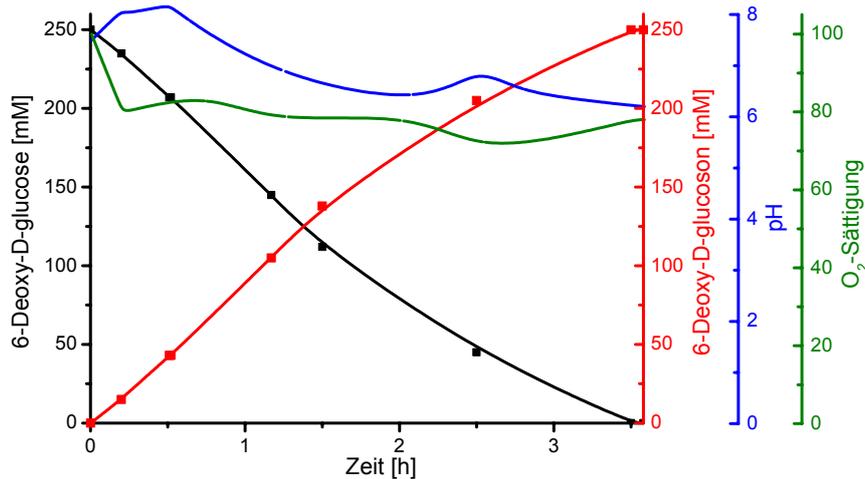


Abbildung 29: Biokonversion von 25 mmol 6-Deoxy-D-glucose zu 6-Deoxy-D-glucoson mit P2OxB2H1. Die Biokonversion fand in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ unter Zufuhr von reinem Sauerstoff (500 ml/min) bei 500 rpm und 22°C statt. Verfolgt wurden O_2 -Sättigung und pH-Wert. Es wurden 0,5 U P2OxB2H1 (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$) und 1800 U Katalase (in 0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,0) pro ml Reaktionsvolumen eingesetzt. Titriert wurde mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Der Umsatz war nach 3,5 h komplett.

Da bei der bisher eingesetzten Rezex RCM Monosaccharid Ca^{2+} -Säule (Phenomenex) 6-Deoxy-D-glucoson und 6-Deoxy-D-glucose dieselbe Retentionszeit besaßen, wurden Substratabnahme und Produktbildung bei der Oxidation von 6-Deoxy-D-glucose mit der Rezex RHM Monosaccharid H^+ -Säule (Phenomenex) verfolgt.

In Abbildung 30 ist exemplarisch ein HPLC-Chromatogramm mit den gut differenzierbaren Peaks für 6-Deoxy-D-glucose und 6-Deoxy-D-glucoson gezeigt.

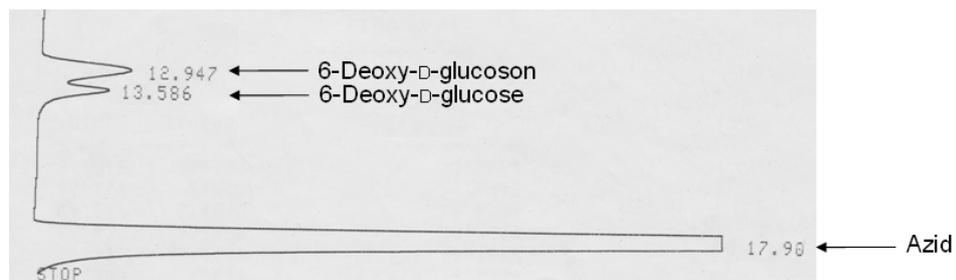


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm der Rezex RHM Monosaccharid H^+ -Säule (Phenomenex). Flussrate: 0,5 ml/min.

Nach der Umsetzung wurden P2Ox und Katalase durch Ultrafiltration (Amicon) abgetrennt und das Filtrat lyophilisiert (vgl. Kapitel II23). Reines 6-Deoxy-D-glucoson wurde mit einer Ausbeute von 87,5% erhalten (vgl. Abbildung 31).



Abbildung 31: Lyophilisat von reinem 6-Deoxy-D-glucoson aus einer Biokonversion mit P2OxB2H1 (Abbildung aus Dorscheid 2009).

3.3 Herstellung von D-Mannose aus D-Glucoson mit AFR-A13G aus *S. morelense* S-30.7.5.

Obwohl AFR-A13G über eine duale Cosubstrat-Spezifität verfügt, wurden die Biokonversionen von D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson in dieser Arbeit mit NADPH als Cofaktor durchgeführt. Da der K_m -Wert des Enzyms für NADH bereits mit dem Hauptsubstrat 1,5-AF im Vergleich zum K_m -Wert für NADPH um zwei Größeneinheiten erhöht war, ergaben sich für die Reduktion von D-Glucoson mit NADH in den Vorversuchen signifikant reduzierte Enzymaktivitäten bzw. katalytische Effizienzen (vgl. Tabelle 11; Dambe et al. 2006; Kühn et al. 2006).

Die Regenerierung des NADPH erfolgte in dieser Arbeit durch Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas spec.*, da sowohl das Enzym als auch sein Substrat D-Glucose kostengünstig erworben werden konnten (vgl. Abbildung 32). Dabei wurden die Konzentrationen der verschiedenen Biokonversionskomponenten ausgehend von den von Kühn in Biokonversionen mit AFR und NADPH-Regenerierung durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eingesetzten Mengen optimiert (Kühn 2004).

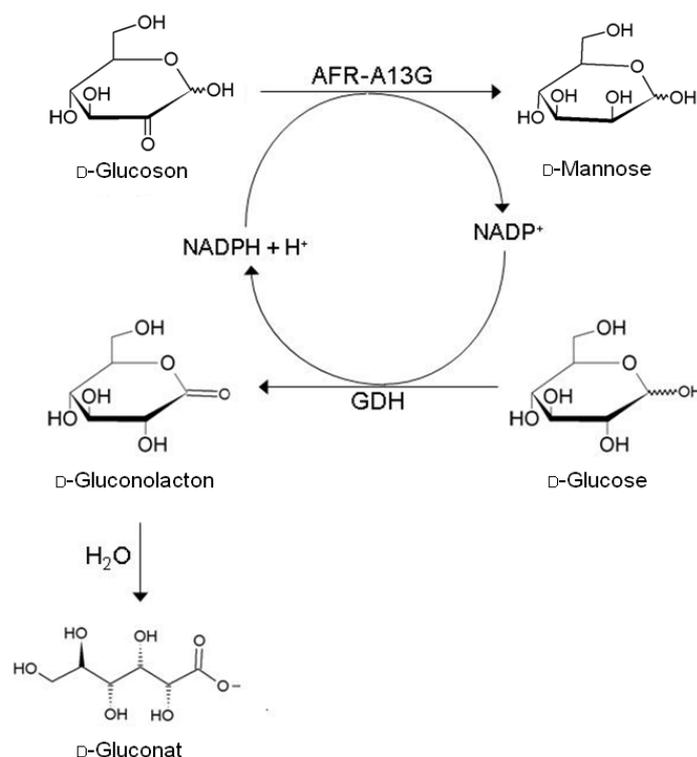


Abbildung 32: Stereoselektive Reduktion von D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G und Cosubstrat-Regenerierung durch GDH aus *Pseudomonas spec.*

Die Biokonversionen wurden bei pH 6,5 bis 7,0 durchgeführt. Dieser pH-Wert stellte einen Kompromiss für die beteiligten Enzyme dar. Die AFR-A13G hat ihr pH-Optimum im BisTris-Puffer bei pH 6,5, die GDH besitzt ein breites pH-Spektrum im alkalischeren Bereich von pH 6 – 10, wobei ihr pH-Optimum bei pH 8,5 – 9 liegt (Sogabe et al. 1994). Alle Biokonversionen wurden bei 30°C durchgeführt.

Die erste Biokonversion von D-Glucoson wurde analog zu den Umsetzungen von Kühn in einem Volumen von 10 ml zusammengesetzt (Kühn 2004). Die Wechselzahl, auch Total Turn-over Number (TTN) genannt, betrug für die Mengenverhältnisse dieser Biokonversion 48,78 Zyklen.

Sofern nicht anders angegeben, wurde zum Erhalt des pH mit 1 M NaOH titriert und Substratabnahme und Produktbildung mit HPLC verfolgt. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 33 dargestellt.

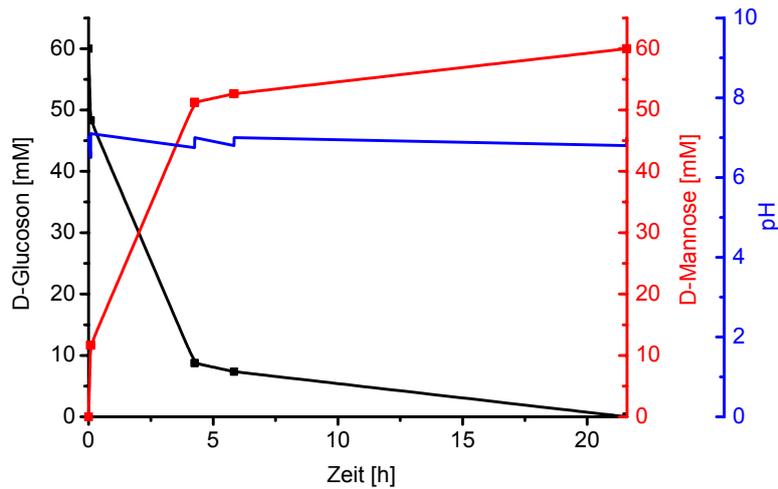


Abbildung 33: Biokonversion von 0,6 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 10 ml H_2O_{dd} enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,2 mmol BisTris, 0,6 mmol D-Glucoson, 0,3 mmol D-Glucose, 0,3 μ mol NADPH, 0,012 mmol $NADP^+$, 150 U GDH und 150 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Die Biokonversion war nach 21,6 h komplett.

Abbildung 34 zeigt exemplarisch HPLC-Chromatogramme einer Reduktion von D-Glucoson durch AFR-A13G. Zwar hatten D-Glucose und D-Gluconat dieselben Retentionszeiten, doch konnte die Vollständigkeit des Umsatzes durch die distinkten D-Glucoson- und D-Mannose-Peaks terminiert werden.

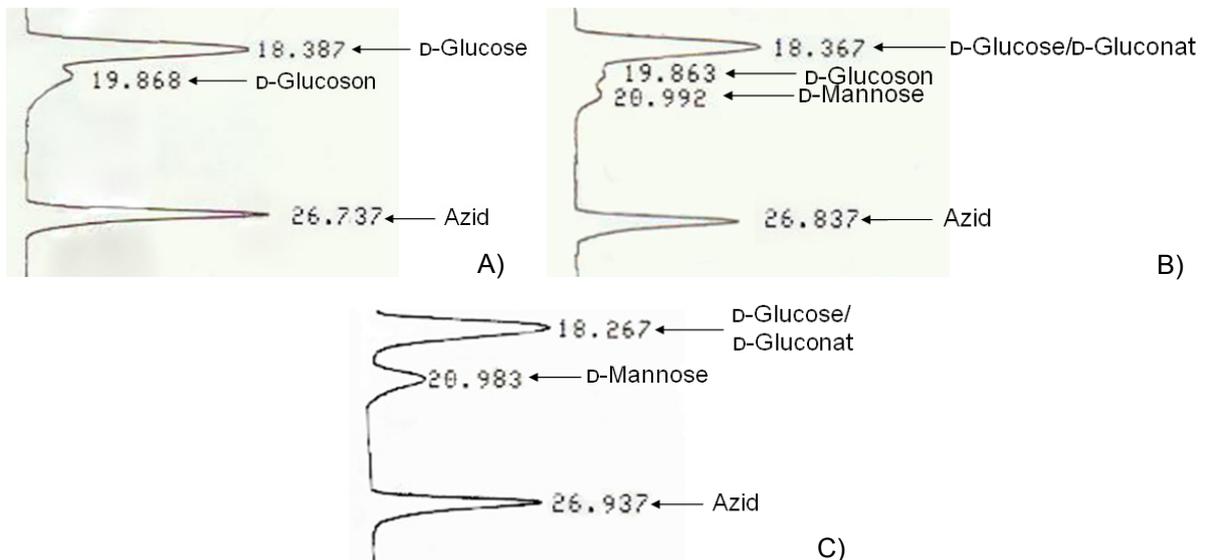


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme der Rezex RCM Monosaccharid Ca^{2+} -Säule (Phenomenex). Flussrate: 0,5 ml/min. Ausgangskonzentrationen: 2 mmol D-Glucoson und 6 mmol D-Glucose. A) Probe vor der Biokonversion; B) nach 1,7 h; C) Abschluss der Biokonversion.

Um die Reaktion zu beschleunigen, wurden in der nächsten Biokonversion mehr Enzyme und äquimolare Mengen von D-Glucoson und D-Glucose eingesetzt. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 35 gezeigt.

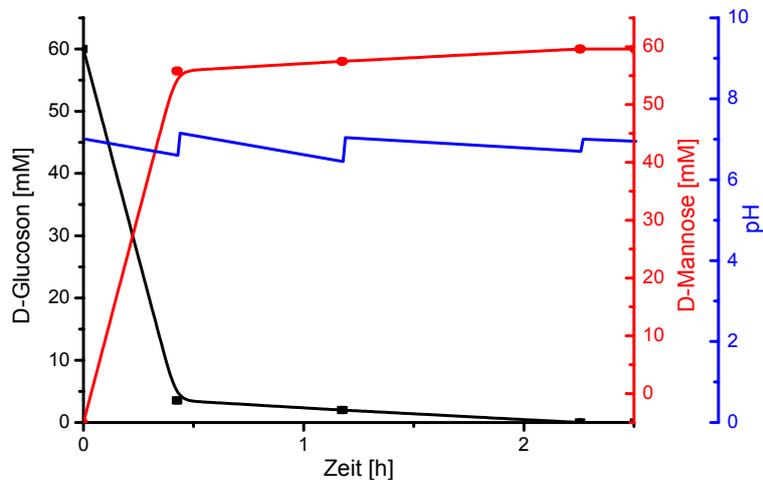


Abbildung 35: Biokonversion von 0,6 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 10 ml enthält der Ansatz folgende Komponenten: 0,2 mmol BisTris, 0,6 mmol D-Glucoson, **0,6 mmol D-Glucose**, 0,3 μmol NADPH, 0,012 mmol NADP^+ , **300 U GDH** und **285 U AFR-A13G**. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Nach 2,25 h waren 0,6 mmol D-Glucoson quantitativ zu D-Mannose reduziert. Als nächstes sollte der Einfluss der Enzymkonzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht werden. Hierzu wurde die Menge an A13G auf 32 U/ml erhöht und der Anteil an GDH auf 5 U/ml reduziert. Zudem sollte eine Kostenreduktion vorgenommen werden, da A13G in großen Mengen mit geringem Arbeitsaufwand angereichert werden konnte (vgl. Kapitel II16), die GDH aber kommerziell erworben werden musste. Der Verlauf ist in Abbildung 36 dargestellt.

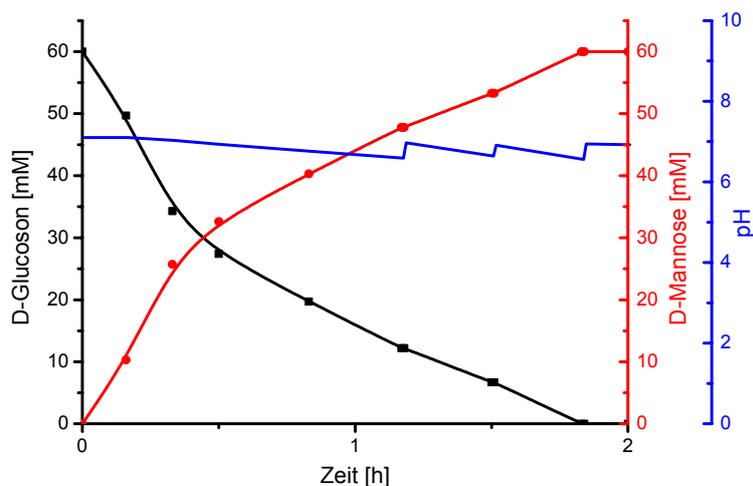


Abbildung 36: Biokonversion von 0,6 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 10 ml enthält der Ansatz folgende Komponenten: 0,2 mmol BisTris, 0,6 mmol D-Glucoson, 0,6 mmol D-Glucose, 0,3 μmol NADPH, 0,012 mmol NADP^+ , **50 U GDH** und **320 U AFR-A13G**. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Diese Biokonversion war bereits nach 1,83 h quantitativ abgeschlossen. Damit konnte in dieser Biokonversions-Zusammensetzung der A13G-Gehalt als limitierender Faktor für die Reaktionsgeschwindigkeit identifiziert werden. Anschließend wurde der GDH-Gehalt erneut reduziert (3 U/ml) und die Auswirkungen analysiert. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 37 dargestellt.

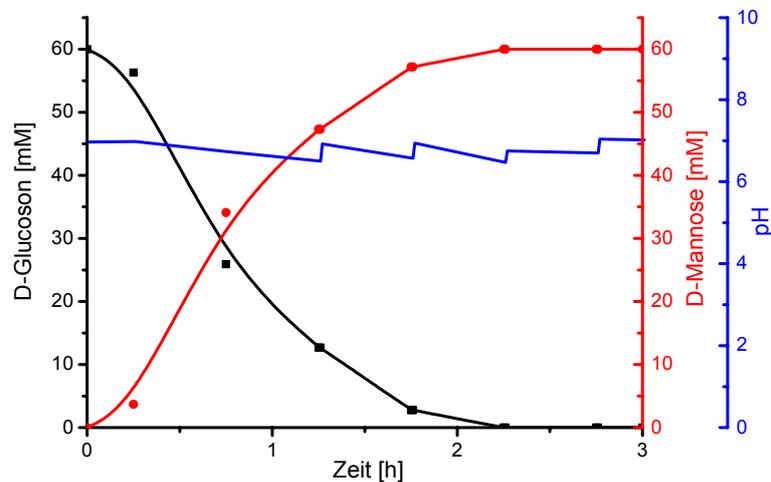


Abbildung 37: Biokonversion von 0,6 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 10 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,2 mmol BisTris, 0,6 mmol D-Glucoson, 0,6 mmol D-Glucose, 0,3 μmol NADPH, 0,012 mmol NADP⁺, **30 U GDH** und 320 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Die Biokonversion war nach 2,25 h komplett, d. h. sie lief um 0,42 h langsamer ab, als die Umsetzung mit 5 U GDH/ml Reaktionsvolumen (vgl. Abbildung 36).

Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen wurden die nächsten Biokonversionen mit dem Enzym-Verhältnis 6,4:1 (AFR-A13G:GDH) durchgeführt. Außerdem wurde das Reaktionsvolumen auf 50 ml erhöht. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 38 dargestellt.

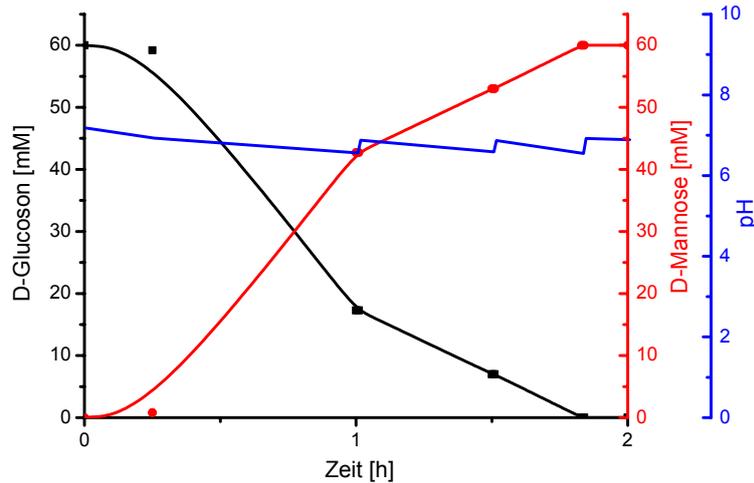


Abbildung 38: Biokonversion von 3 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 50 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 1,0 mmol BisTris, 3,0 mmol D-Glucoson, 3,0 mmol D-Glucose, 1,5 μ mol NADPH, 0,06 mmol NADP⁺, 250 U GDH und 1600 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Die Biokonversion von 3 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit 32 U AFR-A13G und 5 U GDH pro ml Reaktionsvolumen war nach 1,83 h komplett. Als nächstes wurde der Maßstab auf 100 ml Reaktionsvolumen verdoppelt, um die Menge gebildeter D-Mannose zu erhöhen und die Reproduzierbarkeit nachzuweisen (vgl. Abbildung 39).

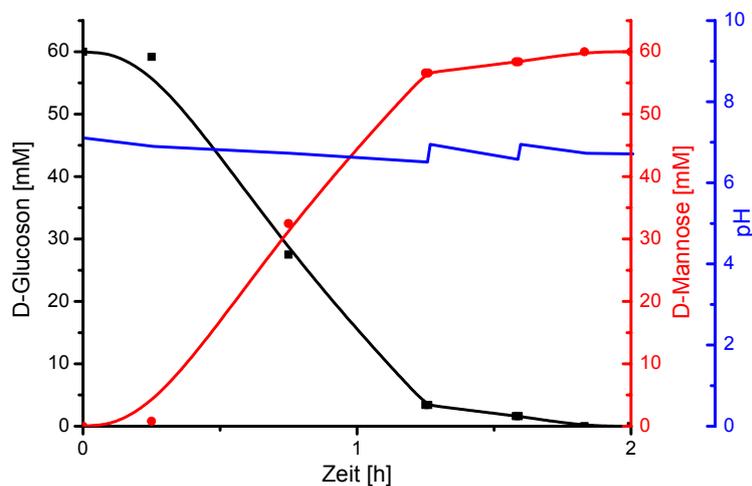


Abbildung 39: Biokonversion von 6 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 100 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 2,0 mmol BisTris, 6,0 mmol D-Glucoson, 6,0 mmol D-Glucose, 3,0 μ mol NADPH, 0,12 mmol NADP⁺, 500 U GDH und 3200 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Bei dieser Biokonversion waren 6 mmol D-Glucoson ebenfalls nach 1,83 h quantitativ zu D-Mannose reduziert. Es war somit möglich, den Maßstab der D-Mannose-Synthese mit repro-

duzierbarem Reaktionsverlauf zu vergrößern. Dies sollte die effiziente Synthese von D-Mannose und D-Rhamnose in größeren Mengen ermöglichen.

Alle nachfolgenden Biokonversionen wurden im 20 ml Maßstab mit weniger Enzymen pro ml Reaktionsvolumen durchgeführt, um bei der Optimierung der weiteren Umsatz-Zusammensetzung kosteneffektiv arbeiten zu können. Zum Ausgleich der erhöhten Substratmengen wurde das Verhältnis von AFR-A13G zu GDH zunächst von 6,4:1 auf 8:1 erhöht.

Für die Biokonversion von 2 mmol D-Glucoson konnte eine TTN von 81,3 Zyklen berechnet werden. Sie war im Vergleich zu den bisher durchgeführten Umsetzungen um 70% erhöht. Abbildung 40 zeigt den Reaktionsverlauf.

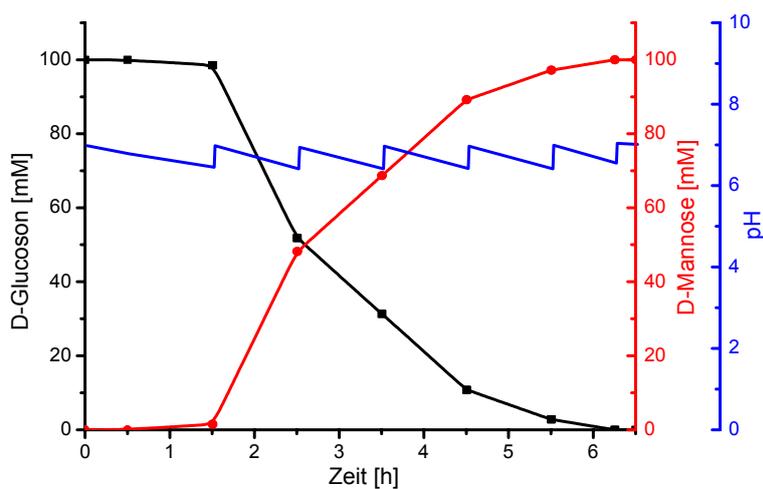


Abbildung 40: Biokonversion von 2 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 2,0 mmol D-Glucoson, 2,0 mmol D-Glucose, 0,6 μ mol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺, 50 U GDH und 400 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Die Biokonversion von 2 mmol D-Glucoson war nach 6,25 h quantitativ abgeschlossen. Als nächstes wurde D-Glucose mit 4 mmol Überschuss eingesetzt, um die Umsatzgeschwindigkeit zu erhöhen, da die durch GDH katalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellte und D-Glucose mit 20 €/kg die kostengünstigste Komponente des Biokonversionsansatzes darstellte. Alle anderen Umsetzungs-Komponenten wurden analog der vorherigen Biokonversion konzentriert.

Die TTN betrug aufgrund der gleichen Mengenverhältnisse, wie sie in der vorher gezeigten Biokonversion eingesetzt wurden, ebenfalls 81,3 Zyklen. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 41 dargestellt.

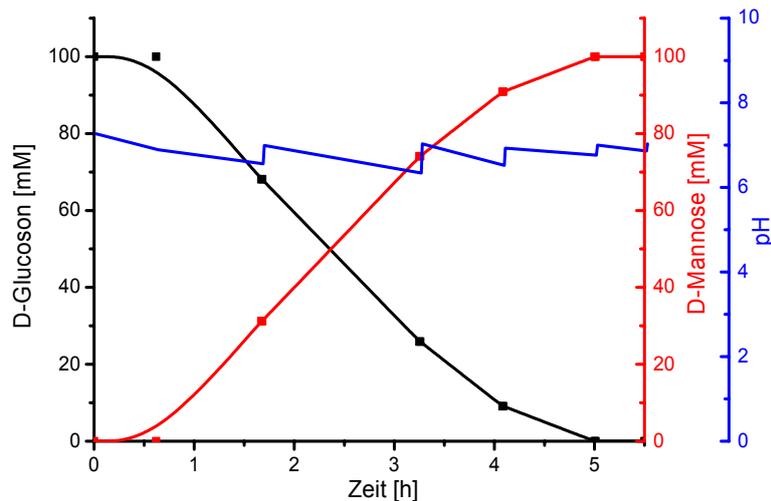


Abbildung 41: Biokonversion von 2 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 2,0 mmol D-Glucoson, **6,0 mmol D-Glucose**, 0,6 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP^+ , 50 U GDH und 400 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C .

Die Biokonversion mit 4 mmol Überschuss an D-Glucose war nach 5 h komplett, d. h. sie lief 1,25 h schneller ab als beim Einsatz äquimolarer Konzentrationen von D-Glucoson und D-Glucose (vgl. Abbildung 40). Eine weitere Erhöhung der D-Glucose-Konzentration auf 10 mmol bewirkte keine weitere Senkung der Reaktionszeit (Daten nicht gezeigt). Damit war beim Einsatz von 2,5 U/ml GDH bei 6 mmol D-Glucose und 2 mmol D-Glucoson mit 20 U/ml A13G in einem Reaktionsvolumen von 20 ml die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der GDH erreicht, das Enzym lag gesättigt vor.

Als nächstes wurden 4 mmol D-Glucoson zu D-Mannose reduziert. In dieser Konzentration sollte später 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G reduziert werden. Eine Verdopplung von D-Glucose auf 12 mmol war nicht möglich, da im HPLC-Chromatogramm mit allen verfügbaren Säulen und Flussraten von 0,5 ml/min und 0,25 ml/min der vergrößerte D-Gluconat-Peak alle anderen Peaks überlagerte und eine Quantifizierung von D-Glucoson und D-Mannose nicht gewährleistet war. Deshalb konnte der D-Glucose-Gehalt nur auf maximal 10 mmol erhöht werden. Analog zur Verdopplung der D-Glucoson-Konzentration wurden auch die AFR-A13G- und GDH-Units und die NADPH-Konzentration verdoppelt.

Durch Steigerung der D-Glucoson-Konzentration wurde die TTN auf 158,73 Zyklen erhöht. Verglichen mit der Wechselzahl der vorher gezeigten Biokonversion von D-Glucoson war der Wert fast verdoppelt, bezogen auf die TTN aller vorherigen Biokonversionen war der Wert auf 325% erhöht. Diese Substrat- und NADP(H)-Konzentration und damit auch die TTN wurde bei allen anschließend durchgeführten Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson beibehalten. In Abbildung 42 ist der Reaktionsverlauf dokumentiert.

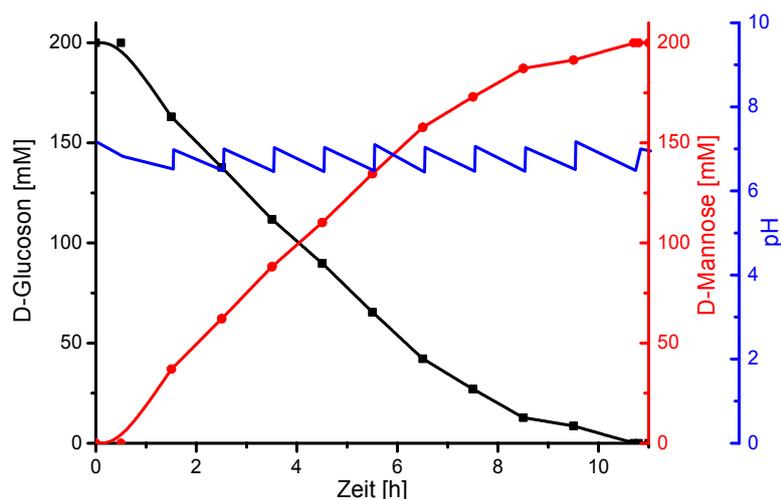


Abbildung 42: Biokonversion von 4 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol D-Glucoson, 10,0 mmol D-Glucose, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺, 100 U GDH und 800 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

4 mmol D-Glucoson waren nach 10,7 h quantitativ zu D-Mannose umgesetzt. Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde in der nächsten Biokonversion der AFR-A13G-Gehalt auf 73,5 U/ml erhöht. Der Umsatz war nach 10 h quantitativ (Daten nicht gezeigt). Durch die Steigerung der AFR-A13G-Menge um 368% wurde die Reaktionsgeschwindigkeit nicht signifikant beschleunigt. Das bedeutet, dass die GDH den limitierenden Faktor darstellte. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Titration des pH bei den Biokonversionen zwischen 6,5 und 7,0 erfolgte, das Optimum der GDH aber bei pH 8,5 – 9 liegt (Sogabe et al. 1994).

Deshalb wurden bei der nächsten Biokonversion die GDH-Units um das 250% auf 5 U/ml erhöht. Die Enzyme wurden in einem Verhältnis von 1 U/ml GDH zu 3,04 U/ml AFR-A13G eingesetzt. Durch die gesteigerte GDH-Menge konnte weniger D-Glucose eingesetzt werden, da die Nebenreaktion zur Regenerierung von NADP⁺ viel schneller ablief. Durch die Reduktion des D-Glucose-Anteils auf 5 mmol wurde die D-Mannose-Reinigung vereinfacht. Die Titration erfolgte mit 2 M NaOH. Abbildung 43 zeigt den Reaktionsverlauf.

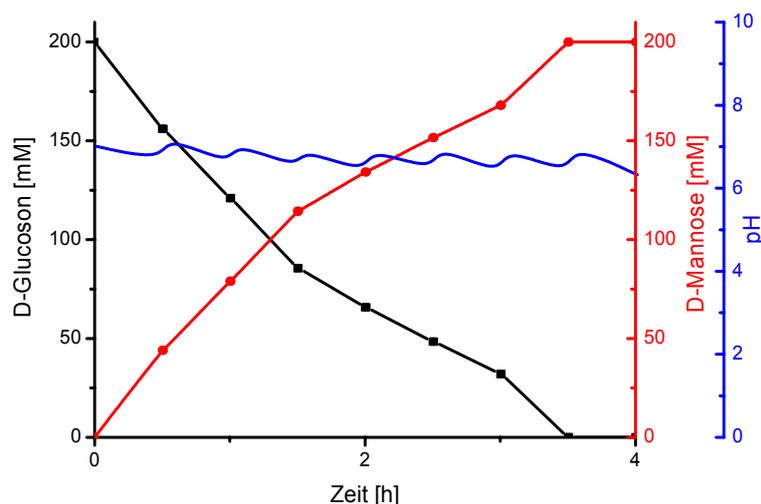


Abbildung 43: Biokonversion von 4 mmol D-Glucoson zu D-Mannose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol D-Glucoson, **5,0 mmol D-Glucose**, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺, **250 U GDH** und 760 U AFR-A13G. Änderungen zu vorherigen Biokonversion sind hervorgehoben. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Die Biokonversion von 4 mmol D-Glucoson mit 15,2 U/ml AFR-A13G, 5 U/ml GDH und 5 mmol D-Glucose in einem Reaktionsvolumen von 20 ml war nach 3,5 h komplett. Mit diesem Konversionsansatz wurde die Reinigung der D-Mannose durchgeführt (vgl. Kapitel II23).

Reinigung der D-Mannose

Nach dem quantitativen Umsatz von D-Glucoson zu D-Mannose wurde die D-Mannose gereinigt. Die Abtrennung der Proteine wurde einfach durch Ultrafiltration mit einem YM 30-Filter (Amicon) durchgeführt, da das Molekulargewicht der beteiligten Enzyme größer als 30 kDa war (Hatzinikolaou et al. 1996; Kühn et al. 2006; Schroeder et al. 1982; Sogabe et al. 1994). Im Filtrat wurde dann die restliche D-Glucose mit GOx vollständig zu D-Gluconsäure oxidiert (vgl. Kapitel II22.3) und diese zusammen mit anderen geladenen Komponenten des Reaktionsansatzes wie NADP(H) und BisTris an einen gemischten Ionenaustauscher gebunden. Die ungeladene D-Mannose wurde anschließend mit H₂O eluiert. Abbildung 44 zeigt schematisch den Ablauf der Produkt-Reinigung.

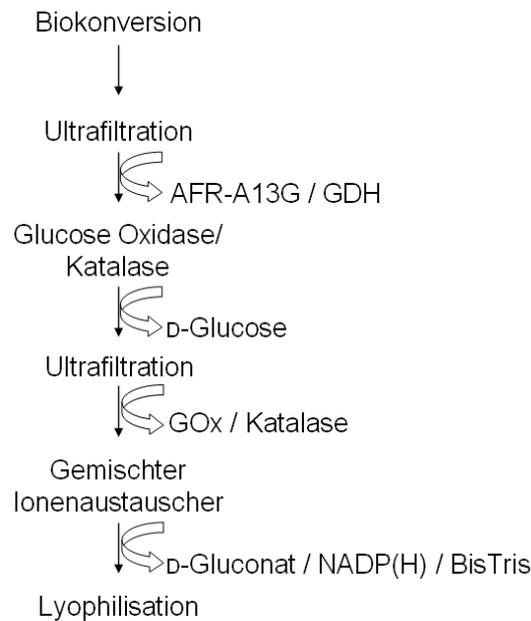


Abbildung 44: Schematischer Ablauf der Produkt-Reinigung.

Die Produkt-Reinigung wurde als erstes mit der in Abbildung 43 dargestellten Biokonversion von D-Glucoson durchgeführt, d. h. in 20 ml Reaktionsvolumen waren neben 4 mmol D-Mannose noch 0,4 mmol BisTris, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP^+ , 4 mmol D-Gluconat und 1 mmol D-Glucose enthalten.

Zuerst wurden AFR-A13G und GDH durch Ultrafiltration (Amicon) aus der Reaktionslösung entfernt. Dann erfolgte die Eliminierung von überschüssiger D-Glucose durch die Glucose-Oxidase (GOx)/Katalase-Reaktion, wobei die Katalase zuvor in 100 mM KH_2PO_4 umgepuffert worden war (vgl. Kapitel II16.2). Es wurden 7,5 U GOx und 10000 U Katalase pro ml Reaktionslösung eingesetzt. Diese Umsetzung wurde bei 30°C und 330 rpm unter Sauerstoffbegasung durchgeführt. Titriert wurde mit 2 M NaOH. Die Substratabnahme und Produktbildung konnten nicht durch HPLC verfolgt werden, da der Peak des D-Gluconats bereits am Ende der Biokonversion mit AFR-A13G und GDH den D-Glucose-Peak überlagerte. Deshalb sollte die Reaktion gestoppt werden, wenn keine pH-Absenkung mehr erfolgte, da dann die D-Glucose vollständig zu D-Gluconat oxidiert worden ist. Zum Test auf die Vollständigkeit der Konversion von D-Glucose wurden zu diesem Zeitpunkt bei der ersten Reinigung der D-Mannose erneut GOx und Katalase zugegeben und der pH-Wert weiter verfolgt (vgl. Abbildung 45).

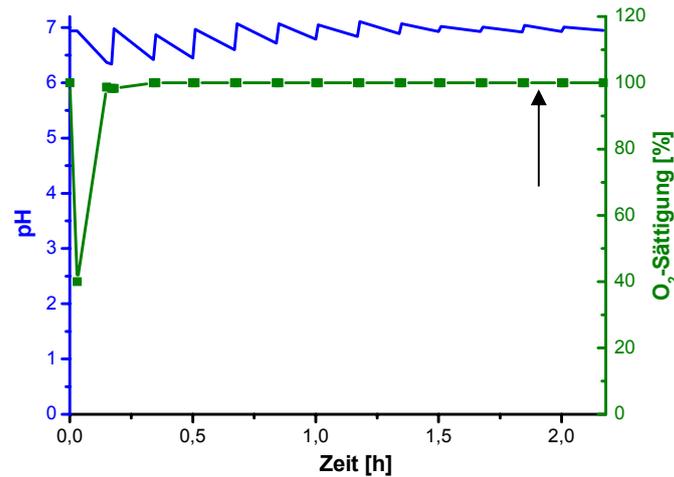


Abbildung 45: Biokonversion von 1 mmol D-Glucose zu D-Gluconat mit 7,5 U/ml GOx und 10000 U/ml Katalase. Der pH-Wert und die O₂-Sättigung wurden verfolgt. Pfeil: Erneute Zugabe von 3 U/ml GOx und 5000 U/ml Katalase.

1 mmol D-Glucose waren nach 1,84 h vollständig zu D-Gluconolacton oxidiert. Eine erneute Zugabe von GOx und Katalase nach 1,9 h bewirkte keine signifikante Änderung des pH, ein Abstoppen der Reaktion durch Inaktivierung der Enzyme konnte damit ausgeschlossen werden. Die Enzyme wurden im Anschluss durch Ultrafiltration (Amicon) entfernt.

Dann erfolgte die Entfernung der geladenen Bestandteile durch 10 min Inkubation mit 8 g gemischtem Ionenaustauscher im *batch* bei 28°C und 220 rpm. Die Bestimmung des NADP(H)- und des BisTris-Gehalts erfolgte vor und nach Inkubation mit gemischtem Ionenaustauscher mit dem Äkta Purifier System (GE Healthcare, vgl. Abbildung 46). Der D-Mannose- und der D-Gluconat-Gehalt wurde durch HPLC-Analytik bestimmt.

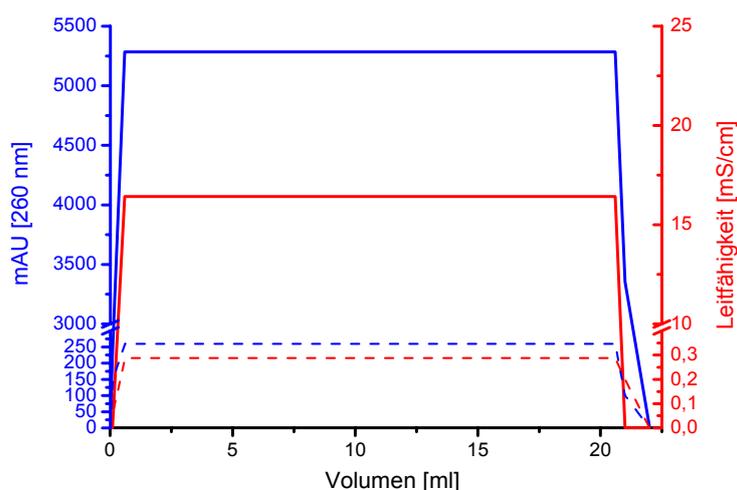


Abbildung 46: Entfernung von NADP(H) und BisTris durch 10 min Inkubation mit gemischtem Ionenaustauscher. Mit dem Äkta Purifier System (GE Healthcare) wurden die NADP(H)-Extinktion bei 260 nm und die Leitfähigkeit verfolgt. Durchgezogene Linien: vor Inkubation mit gemischtem Ionenaustauscher. Unterbrochene Linien: nach 10 min Inkubation mit 8 g gemischtem Ionenaustauscher.

Betrug die Extinktion vor Inkubation mit 8 g gemischtem Ionenaustauscher bei einer Wellenlänge von 260 nm 5150 mAU, war diese nach 0,17 h Inkubation um 95% auf 260 mAU gesunken. Vor Zugabe des gemischten Ionenaustauschers betrug die Leitfähigkeit 14,4 mS/cm, nach 0,17 h Inkubation war sie um 1/50 auf 0,29 mS/cm reduziert. Diese Ergebnisse sind zusammen mit dem D-Mannose- und D-Gluconat-Gehalt in Abbildung 47 zusammengefasst.

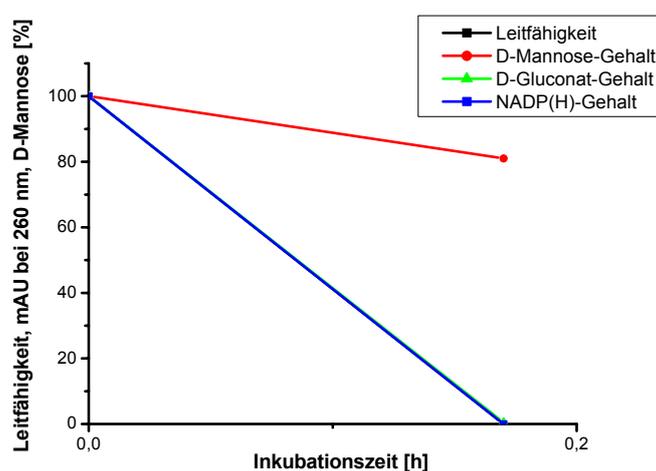


Abbildung 47: Zusammenfassung der Reinigung der D-Mannose durch die GOx-Reaktion und anschließender Inkubation mit gemischtem Ionenaustauscher. Ausgangskonzentrationen: 4 mmol D-Mannose, 0,4 mmol BisTris, 1,2 μ mol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺ und 4 mmol D-Gluconat.

Nach 0,17 h Inkubation mit 8 g gemischtem Ionenaustauscher waren noch 81% D-Mannose enthalten, D-Gluconat, NADP(H) und BisTris waren nicht mehr detektierbar.

Der Verlauf der Produkt-Reinigung wurde durch HPLC- und DC-Analytik verfolgt (vgl. Abbildung 48 und Abbildung 49).

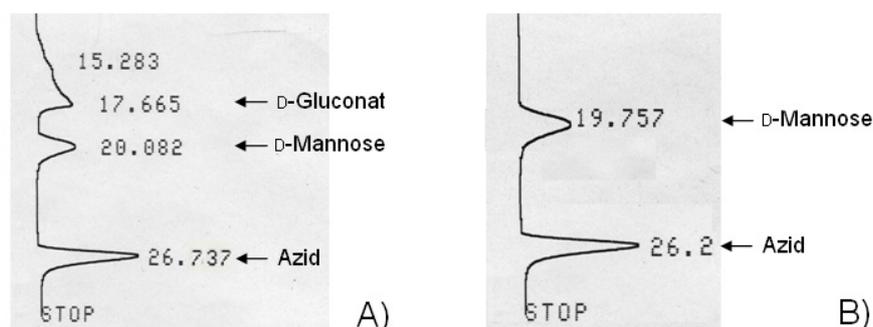


Abbildung 48: HPLC-Chromatogramme der Rezex RCM Monosaccharid Ca²⁺-Säule (Phenomenex) während und nach erfolgter Reinigung der D-Mannose. Flussrate: 0,5 ml/min. A) Nach GOx/Katalase-Reaktion, B) Nach gemischtem Ionenaustauscher.

Nach Inkubation mit 8 g gemischtem Ionenaustauscher war im HPLC-Chromatogramm nur noch der D-Mannose-Peak mit einer Retentionszeit von 19,76 min zu sehen.

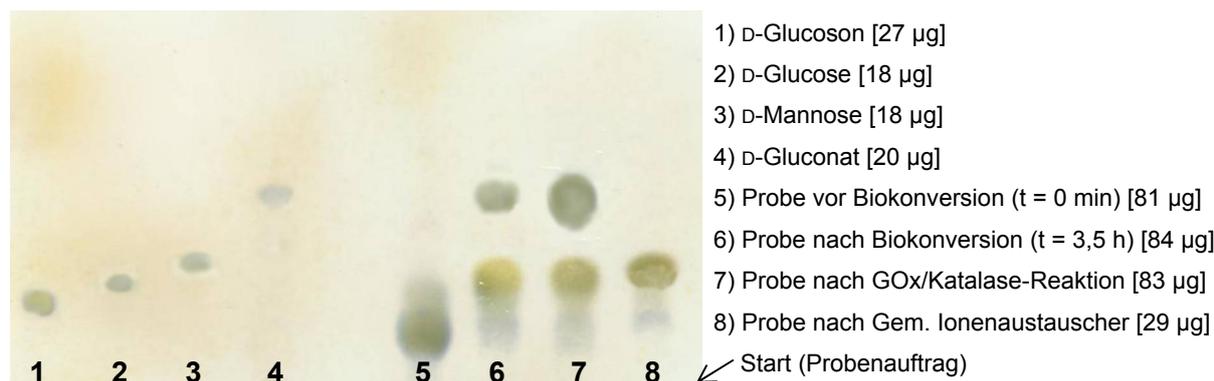


Abbildung 49: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von D-Glucoson, D-Glucose, D-Mannose, D-Gluconat und Proben der Biokonversion bzw. der anschließenden Reinigung. Laufmittel: Phenol/Wasser 4:1. Detektion: ρ -Anisaldehyd/Methanol/Eisessig/ H_2SO_4 + Hitze. Zeitpunkt der Probennahme: siehe Legende. Es wurden 10 μl der Standards bzw. der 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ verdünnten Probe aufgetragen.

In der Probe vor Biokonversion (d. h. ohne Enzyme) in Spur 5 war nur ein großer Spot zu sehen, der die beiden Substrate D-Glucoson und D-Glucose enthielt. Nach Biokonversion (Spur 6) waren die beiden Produkte D-Gluconat und D-Mannose zu sehen. Nach der GOx/Katalase-Reaktion (Spur 7) war der D-Gluconat-Spot stark vergrößert. Nach gemischtem Ionenaustauscher (Spur 8) war nur noch der D-Mannose-Spot zu erkennen.

Das HPLC-Chromatogramm und die dünnschichtchromatographische Auftrennung der nach dem gemischten Ionenaustauscher entnommenen Probe wiesen die Reinheit der D-Mannose nach, welche durch die in dieser Arbeit etablierten Methoden mit einer Ausbeute von 81% von allen anderen Biokonversions-Komponenten gereinigt werden konnte.

3.4 Herstellung von D-Rhamnose aus 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR-A13G aus *S. morelense* S-30.7.5.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Biokonversionen von D-Glucoson und der Reinigung von D-Mannose wurden Reduktionen von 6-Deoxy-D-glucoson zur Synthese von D-Rhamnose durchgeführt.

Da die AFR 6-Deoxy-D-glucoson aufgrund der durch die Methylgruppe am C6 hervorgerufene Konformationsänderung nicht stereoselektiv reduzierte, entstanden bei dieser Umsetzung die beiden Epimere 6-Deoxy-D-glucose und 6-Deoxy-D-mannose (D-Rhamnose) in einem Verhältnis von 1,2 zu 1 (Kühn et al. 2006).

Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G

Die erste Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G erfolgte in einem Reaktionsansatz von 20 ml. Dabei wurden 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson durch 16 U/ml AFR-A13G reduziert und zur Cosubstrat-Regenerierung 4 mmol D-Glucose durch 5 U/ml GDH oxidiert.

Verglichen mit der in Abbildung 43 gezeigten Umsetzung von D-Glucoson durch AFR-A13G wurde der AFR-A13G-Gehalt um 0,8 U/ml erhöht und die D-Glucose-Konzentration um 1 mmol reduziert, um die Komponenten der Umsatzrate anzupassen. Zuvor wurde gezeigt, dass ein D-Glucose-Überschuss von 1 mmol keine Beschleunigung bewirkt (Daten nicht gezeigt).

Die Biokonversion wurde bei 30°C durchgeführt, titriert wurde mit 2 M NaOH. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 50 dargestellt.

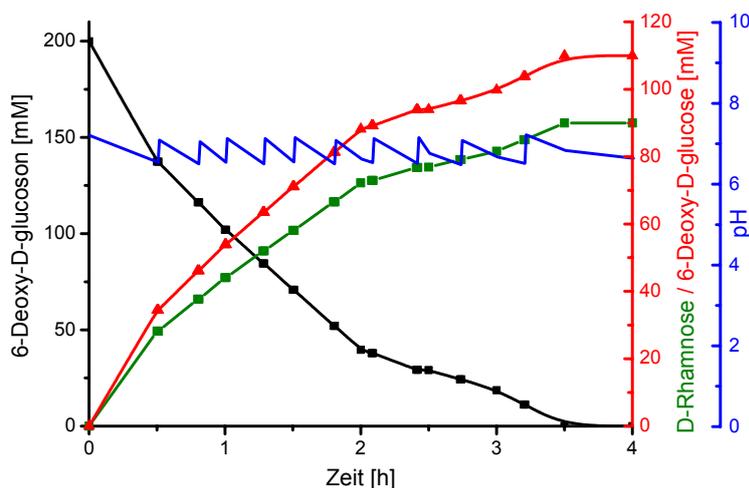


Abbildung 50: Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson zu D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose mit AFR-A13G im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol 6-Deoxy-D-glucoson, 4,0 mmol D-Glucose, 1,2 μ mol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺, 250 U GDH und 800 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Diese Biokonversion war nach 3,5 h quantitativ abgeschlossen, es wurden 45 mol% (1,8 mmol) D-Rhamnose und 55 mol% (2,2 mmol) 6-Deoxy-D-glucose gebildet. Damit lief die Umsetzung genauso schnell ab wie die vorherige Reduktion von 4 mmol D-Glucoson durch 15,2 U/ml AFR-A13G mit 1 mmol Überschuss von D-Glucose (vgl. Abbildung 43). Durch den im Vergleich zu D-Glucoson um 50% erhöhten K_m -Wert für 6-Deoxy-D-glucoson war mit einer niedrigeren Reaktionsgeschwindigkeit zu rechnen, die durch die Steigerung der AFR-A13G-Menge um 0,8 U/ml ausgeglichen werden konnte.

Da bei den bisher verwendeten HPLC-Säulen verschiedene Komponenten der Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucose durch AFR-A13G mit Cosubstrat-Regenerierung durch GDH die gleichen Retentionszeiten besaßen, wurde die Rezex RHM Monosaccharid H⁺-Säule (Phenomenex) eingesetzt, um Substratverbrauch und Produktbildung und die anschließende Produktreinigung verfolgen zu können (vgl. Abbildung 51).

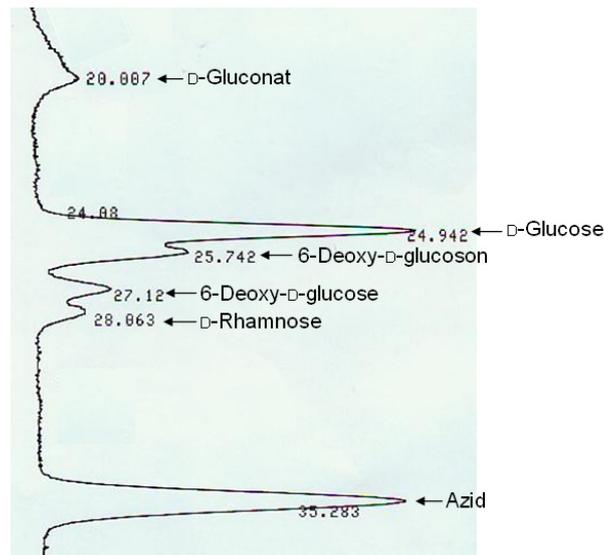


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm der Rezex RHM Monosaccharid H⁺-Säule (Phenomenex). Probe nach 0,88 h. Zur besseren Darstellung der einzelnen Peaks wurde der Fluss auf 0,25 ml/min reduziert und der Papiervorschub (*Speed*) des Shimadzu C-RCA Chromatopac von 4 auf 6 erhöht.

Die Konzentrationen der Komponenten dieser ersten Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G dienten als Standards für anschließende Biokonversionen mit den thermostabilsten AFR-A13G-Varianten.

Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-G13A-M31V-K207P-E208P

Diese AFR-A13G-Variante wurde durch Kombination der Mutationen der thermostabilsten durch *error prone*-PCR generierten Variante (AFR-G13A-M31V) mit denen der thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde (AFR-A13G-K207P-E208P) durch KOD-*QuikChange* PCR erhalten (vgl. Kapitel III.2.8). Der pH-Wert wurde bei dieser Biokonversion zwischen 7,0 und 7,5 titriert, da eines der beiden pH-Optima der Kombinationsmutante in BisTris-Puffer bei pH 7,0 lag (vgl. Abbildung 23). Der Verlauf der Biokonversion ist in Abbildung 52 dargestellt.

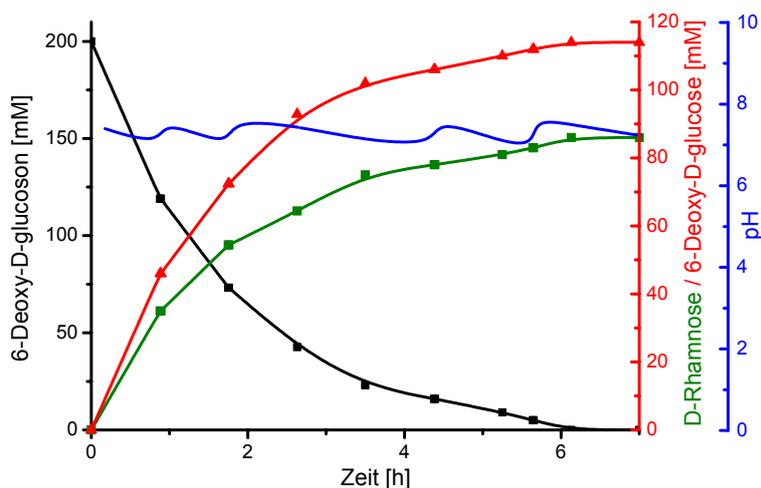


Abbildung 52: Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson zu D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose mit AFR-G13A-M31V-K207P-E208P im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson, 4,0 mmol D-Glucose, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺, 250 U GDH und 800 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Die Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR-G13A-M31V-K207P-E208P war nach 6,1 h quantitativ abgeschlossen. Die Reaktion lief im Vergleich zur Standard-Biokonversion mit AFR-A13G (vgl. Abbildung 50) 0,74-fach langsamer ab, was durch die verschlechterten Enzymkinetiken dieser AFR-Variante für 6-Deoxy-D-glucoson (vgl. Tabelle 28) zu erklären ist. Es wurden 2,28 mmol 6-Deoxy-D-glucose und 1,72 mmol D-Rhamnose gebildet.

Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G-K207P-E208P-E330V

AFR-A13G-K207P-E208P-E330V wurde in der zweiten ISM-Runde mit AFR-A13G-K207P-E208P als Template (vgl. Kapitel III 2.4.1) durch ortsgerechte Sättigungsmutagenese mit KOD-*QuikChange* PCR und degenerierten Primern erhalten (vgl. Kapitel II8). Der pH wurde bei dieser Biokonversion zwischen 7,0 und 7,5 titriert, da das pH-Optimum der Variante im BisTris-Puffer bei pH 7,0 lag (vgl. Abbildung 19). Abbildung 53 zeigt den Reaktionsverlauf.

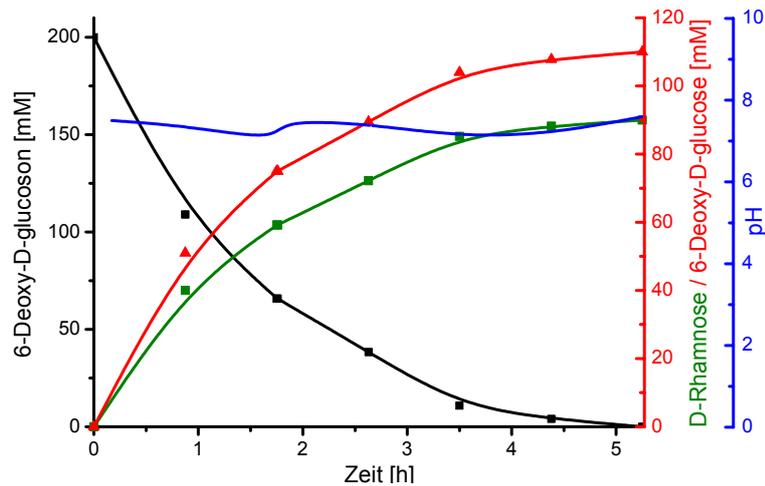


Abbildung 53: Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson zu D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose mit AFR-A13G-K207P-E208P-E330V im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson, 4,0 mmol D-Glucose, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP^+ , 250 U GDH und 800 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Mit AFR-A13G-K207P-E208P-E330V wurden 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson in 5,25 h quantitativ umgesetzt. Diese Biokonversion lief 1,5 h langsamer ab als mit AFR-A13G, aber 0,85 h schneller als bei der Variante AFR-G13A-M31V-K207P-E208P. Es wurden 1,8 mmol D-Rhamnose und 2,2 mmol 6-Deoxy-D-glucose gebildet.

Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G-M31V

Die Variante AFR-A13G-M31V entstand durch Separation der beiden Mutationen der durch Zufallsmutagenese erhaltenen thermostabilsten Variante AFR-G13A-M31V (vgl. Kapitel III.2.7). Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 54 gezeigt.

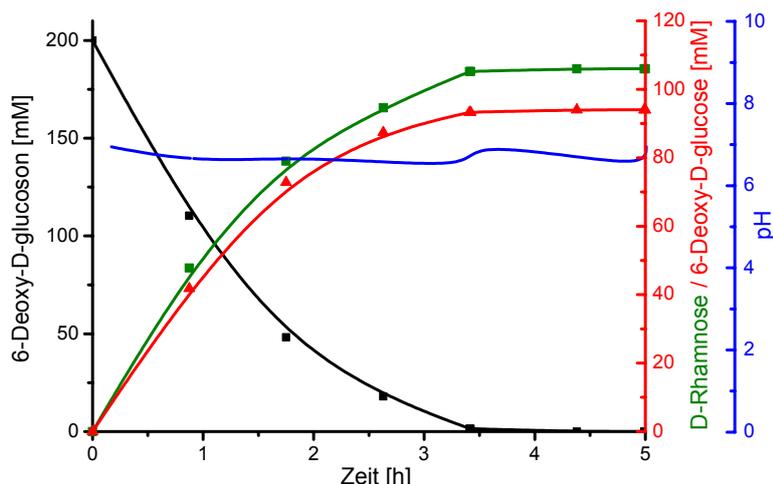


Abbildung 54: Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson zu D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose mit AFR-A13G-M31V im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson, 4,0 mmol D-Glucose, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP^+ , 250 U GDH und 800 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Nach 3,4 h waren in der Biokonversion mit AFR-A13G-M31V nur noch 0,03 mmol 6-Deoxy-D-glucoson vorhanden, nach 4,38 h waren 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson quantitativ umgesetzt. Somit verlief die Reaktion vergleichbar schnell ab wie die Standard-Biokonversion mit AFR-A13G.

AFR-A13G-M31V war die einzige Variante dieser Arbeit, bei der sich über den gesamten Reaktionsverlauf hinweg das Verhältnis der gebildeten Epimere auf die Seite der D-Rhamnose verlagerte. Es wurden 2,12 mmol D-Rhamnose (53 mol%) und 1,88 mmol 6-Deoxy-D-glucose (47 mol%) gebildet. Die Ausbeute an D-Rhamnose war verglichen mit allen anderen in dieser Arbeit durchgeführten Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson um 8 mol% erhöht.

Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G-K207P-E208P

Bei AFR-A13G-K207P-E208P handelte es sich um die thermostabilste Variante der ersten ISM-Runde. Sie wurde durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese mit KOD-*QuikChange* PCR und degenerierten Primern mit AFR-A13G als Template erhalten (vgl. Kapitel III.2.3.1). Der Verlauf dieser Umsetzung ist in Abbildung 55 dargestellt.

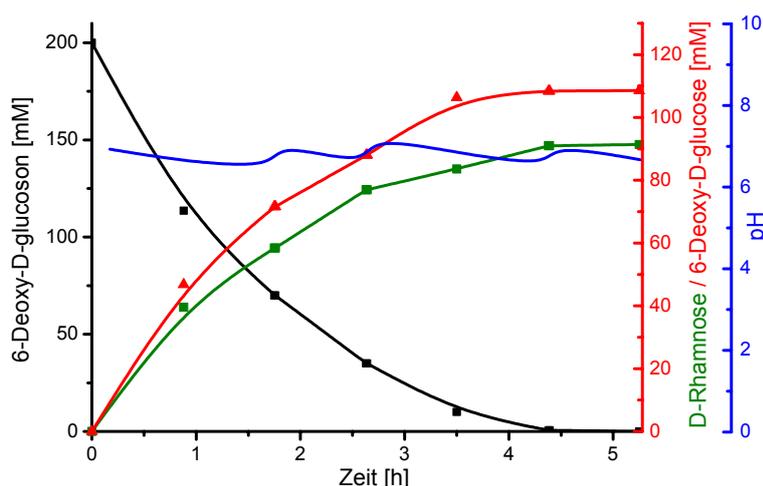


Abbildung 55: Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson zu D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose mit AFR-A13G-K207P-E208P im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson, 4,0 mmol D-Glucose, 1,2 μ mol NADPH, 0,024 mmol NADP⁺, 250 U GDH und 800 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C.

Bei der Umsetzung von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR-A13G-K207P-E208P waren nach 4,4 h noch 0,012 mmol 6-Deoxy-D-glucoson vorhanden, die nach 5,3 h quantitativ reduziert wurden. Es wurden 2,2 mmol 6-Deoxy-D-glucose und 1,8 mmol D-Rhamnose gebildet.

Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-G13A-M31V

Bei den Biokonversionen mit AFR-G13A-M31V, der thermostabilsten durch *error prone*-PCR erhaltenen Variante, wurde der pH zwischen 6,0 und 6,5 titriert, da das pH-Optimum dieser Variante im BisTris-Puffer bei 6,0 lag (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 56).

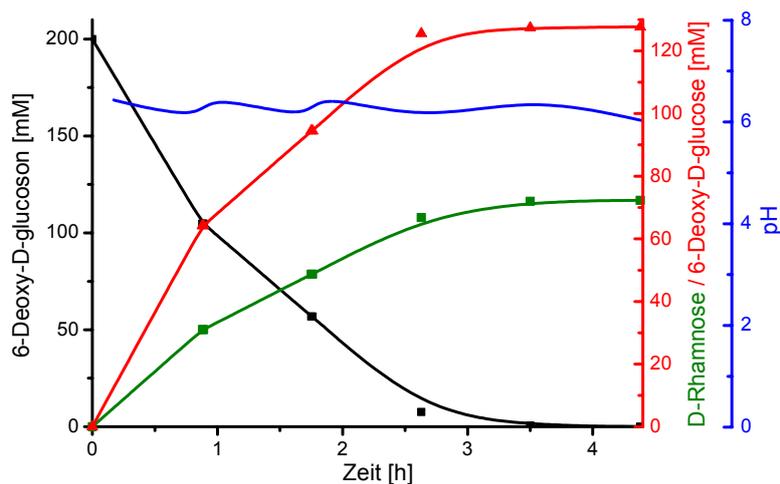


Abbildung 56: Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson zu D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose mit AFR-G13A-M31V im Cosubstrat-Regenerierungssystem. In einem Volumen von 20 ml enthielt der Ansatz folgende Komponenten: 0,4 mmol BisTris, 4,0 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson, 4,0 mmol D-Glucose, 1,2 μmol NADPH, 0,024 mmol NADP^+ , 250 U GDH und 800 U AFR-A13G. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C .

Bei der Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-G13A-M31V lag nach 3,5 h noch lediglich 0,012 mmol 6-Deoxy-D-glucoson vor. Damit war diese Umsetzung fast genauso schnell abgeschlossen wie mit der Ausgangsvariante AFR-A13G (vgl. Abbildung 50). Nach 4,38 h war das Substrat komplett reduziert. Damit war von allen AFR-A13G-Varianten mit verbesserter Thermostabilität die Reduktion durch AFR-G13A-M31V am schnellsten quantitativ abgeschlossen. Jedoch wurde aufgrund der neu eingeführten Basenaustausche die Stereoselektivität des Enzyms für die D-Rhamnose-Produktion negativ beeinflusst, es wurden 2,55 mmol (63,85 mol%) 6-Deoxy-D-glucose und nur 1,45 mmol (36,15 mol%) D-Rhamnose gebildet.

Aufgrund der Ergebnisse ist die Variante AFR-A13G-M31V am meisten für den Einsatz in Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson geeignet. Die Umsetzung lief nur 0,25-fach langsamer ab als mit dem Ausgangsenzym AFR-A13G und es wurden 8 mol% mehr D-Rhamnose gebildet.

Reinigung der D-Rhamnose

Im Folgenden ist exemplarisch die Reinigung der D-Rhamnose nach einer Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR-A13G gezeigt. Die Reinigung der D-Rhamnose wurde gemäß des mit D-Mannose optimierten Protokolls durchgeführt.

Dies war möglich, da die eingesetzte Glucose-Oxidase aus *A. niger* das Epimer 6-Deoxy-D-glucose mit einer relativen Aktivität von 10% zu 6-Deoxy-D-gluconsäure oxidierte, das aufgrund seiner Ladung im Anschluss ebenfalls durch gemischten Ionenaustauscher aus dem Ansatz entfernt werden konnte (Pazur und Kleppe 1964).

Die Reinheit der D-Rhamnose nach GOx-Reaktion und gemischtem Ionenaustauscher wurde durch HPLC- und DC-Analytik überprüft (vgl. Kapitel II24.1 und II24.2, Abbildung 57 und Abbildung 58).

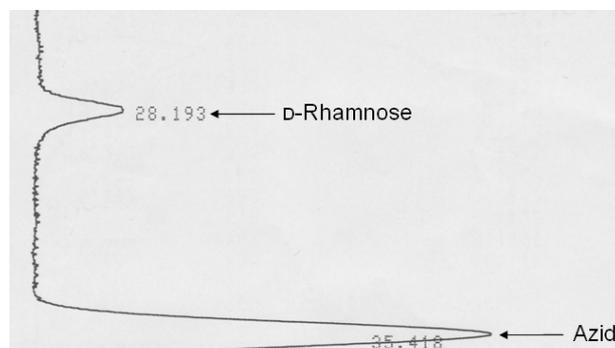


Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm der Rezex RHM Monosaccharide H⁺-Säule (Phenomenex) der Probe nach gemischtem Ionenaustauscher. Fluss: 0,25 ml/min.

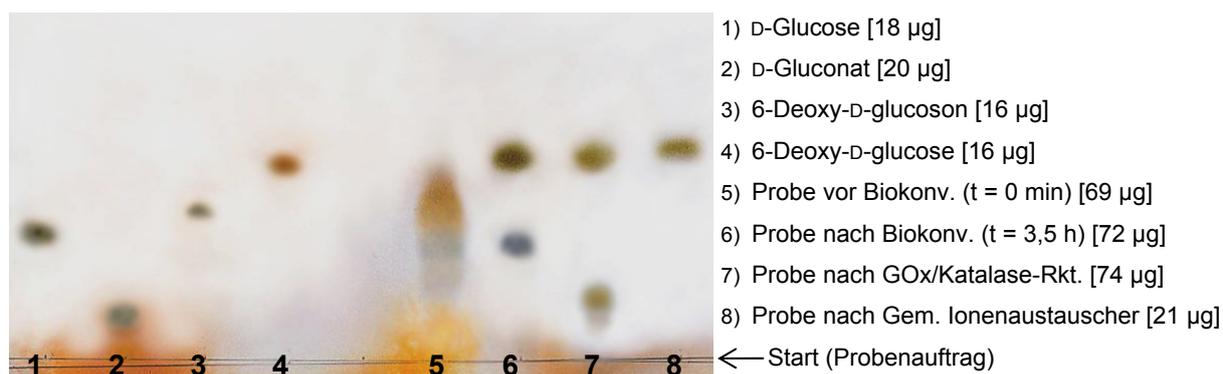


Abbildung 58: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von D-Glucose (1), D-Gluconat (2), 6-Deoxy-D-glucoson (3), 6-Deoxy-D-glucose (4) und Proben der Biokonversion bzw. der D-Rhamnose-Reinigung (5-8). Laufmittel: Phenol/Wasser 4:1. Detektion: ρ -Anisaldehyd/Methanol/Eisessig/H₂SO₄ + Hitze. Zeitpunkt der Probennahme: siehe Legende. Es wurden 10 µl der Standards und 10 µl bzw. 5 µl der 1:10 mit H₂O_{deion} verdünnten Proben aufgetragen.

Bei der Probe vor Biokonversion (d. h. ohne Enzyme) in Spur 5 war nur ein großer Spot zu sehen, der die beiden Substrate 6-Deoxy-D-glucoson und D-Glucose enthielt. Nach Biokonversion (Spur 6) waren die beiden Produkte D-Rhamnose und 6-Deoxy-D-glucose in einem Spot zu sehen mit einem zusätzlichen Spot von nicht oxidierte Rest-Glucose. Die Auftrennung von 6-Deoxy-D-glucose und D-Rhamnose konnte mit dieser Methode nicht durchgeführt werden, da durch DC keine Detektion der verschiedenen Epimere möglich ist. D-Gluconat konnte in dieser Probe ebenfalls nicht detektiert werden, da die Menge an während der Biokonversion gebildetem D-Gluconat zu gering war. Nach der GOx/Katalase-Reaktion (Spur 7) waren ein verkleinerter Produkt-Spot, der nur noch D-Rhamnose enthielt und der D-Gluconat-Spot zu sehen. Nach gemischtem Ionenaustauscher war nur noch der D-Rhamnose-Spot

detektierbar, der etwas höher verlief, als der 6-Deoxy-D-glucose-Standard in der vierten Spur.

Durch GOx-Reaktion, gemischten Ionenaustauscher und Lyophilisierung konnte die D-Rhamnose als gelblich harzige Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 72% von den anderen Biokonversions-Komponenten gereinigt werden. Um nachzuweisen, dass es sich bei dem Produkt tatsächlich um D-Rhamnose handelt, wurde eine Probe mit NMR-Spektroskopie analysiert (vgl. Kapitel II24.3). Außerdem wurde kommerziell erworbene L-Rhamnose als Referenz analysiert. Die erhaltenen NMR-Spektren sind in Abbildung 59 dargestellt.

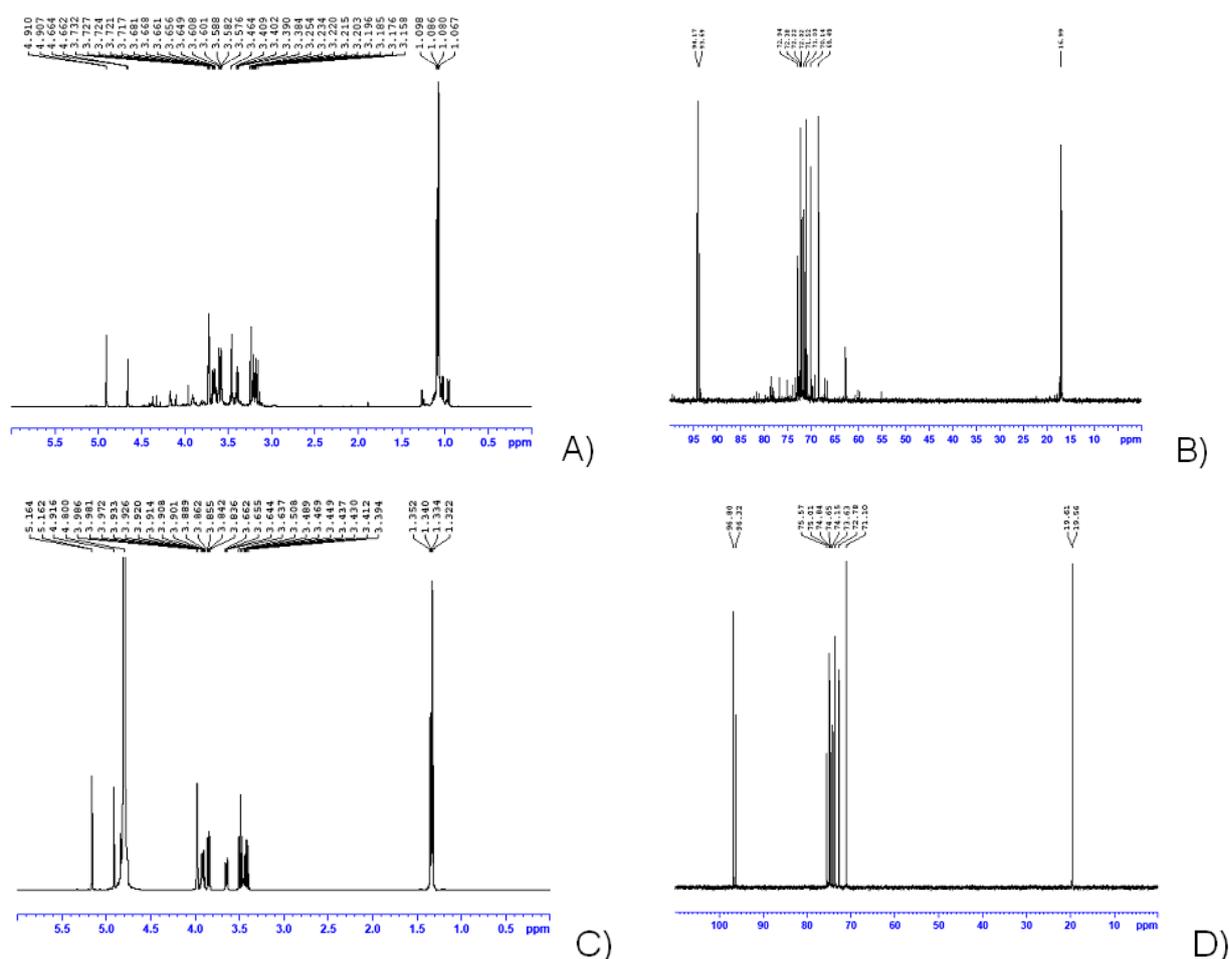


Abbildung 59: NMR-Spektroskopie lyophilisierter Rhamnose in D₂O. A) ¹H-NMR der D-Rhamnose, B) ¹³C-NMR der D-Rhamnose, C) ¹H-NMR der L-Rhamnose, D) ¹³C-NMR der L-Rhamnose.

Das NMR-Spektrum der gereinigten Probe war nahezu identisch zum Referenz-Spektrum der L-Rhamnose, das Produkt wurde somit eindeutig identifiziert. Die Reinheit der D-Rhamnose konnte nachgewiesen werden.

IV Diskussion

Kohlenhydrate sind grüne nachhaltige Rohstoffe mit einem großen Potenzial für die chemische Industrie (Lichtenthaler und Peters 2004). Die chemische Konversion von Kohlenhydraten erfordert jedoch eine aufwändige Schutzgruppen- und Aktivierungschemie, bei der große Lösemittelmengen eingesetzt werden müssen. Deshalb werden seit dem Konzept der „Grünen Chemie“ in vielen Bereichen der organischen und pharmazeutischen Industrie bevorzugt chemo- und regioselektive Biokatalysatoren zur Modifikation von chiralen und multifunktionalen Verbindungen eingesetzt (Anastas und Warner 1998; Breuer et al. 2004; Chirumamilla et al. 2001; Jones 1986; Pollard und Woodley 2007; Schmid et al. 2001; Turner 1989; Whiteside und Wong 1985).

Die Natur liefert eine große Anzahl verschiedenster Biokatalysatoren, die zwar sehr gut dazu geeignet sind, Leben unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen, die aber in der organischen Synthesechemie von Kohlenhydraten z. B. wegen eines begrenzten Substratspektrums, einer niedrigen pH- und Thermostabilität, einer niedrigen Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln oder der Enantioselektivität nicht eingesetzt werden können (Arnold 2001; Arnold und Moore 1997; Asako et al. 2008; Powell et al. 2001). Diese Enzyme müssen vor ihrer Anwendung zunächst durch Mutagenese mit anschließendem Screening bzw. Selektion an die Anforderungen des Prozesses angepasst werden.

1 Gerichtete Mutagenese und Zufallsmutagenese zur Erhöhung der Thermostabilität der AFR-A13G

Für den Einsatz der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. in Biokonversionen sollte in dieser Arbeit die operative Thermostabilität des Enzyms gesteigert werden bei unverändertem katalytischem Profil. Es kamen zwei Methoden zur Anwendung: Gerichtete Mutagenese durch iterative Sättigungsmutagenese (ISM) und Zufallsmutagenese durch *error prone*-PCR. Die hier eingesetzten Screening-Methoden haben im Gegensatz zu Selektions-basierten Methoden den Vorteil, dass die Enzym-Varianten in einer genau definierten und nicht-physiologischen Umgebung analysiert werden können (Hibbert et al. 2005).

Beim Screening mutierter Enzymlibliotheken auf thermostabilere Varianten wurde die Restaktivität nach Inkubation bei einer Temperatur gemessen, die hoch genug war, um das Ausgangsenzym größtenteils zu inaktivieren, und der Wert mit der Initial-Aktivität verglichen. Da die Aktivitätsmessungen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, ergab sich eine Selektion auf Enzyme, die thermostabil und gleichzeitig bei niedrigen Temperaturen hoch aktiv sind (Arnold et al. 2001). Dies stellt einen Vorteil im Vergleich zu natürlich vorkommenden

thermophilen Enzymen dar, bei denen die katalytische Aktivität bei mittleren und niedrigen Temperaturen mit zunehmender Thermostabilität sinkt (Fontana et al. 1998; Jaenicke 1981; Wrba et al. 1990; Zavodszky et al. 1998). Die natürliche Evolution vermeidet vermutlich sehr stabile und hoch aktive Enzyme, da ein zu stabiles Enzym resistent gegen seinen Abbau in der Zelle wäre und so nachfolgende Reaktionen, die eigentlich selektiv von anderen Enzymen katalysiert werden, inhibieren würde (Arnold et al. 2001; Reetz et al. 2009b). Außerdem könnte ein thermophiles Enzym mit einer hohen Aktivität bei moderaten Temperaturen bei hohen Temperaturen in einem solchen Ausmaß aktiv sein, dass es die natürlichen zellulären Stoffwechselwege hemmt (Arnold et al. 2001).

1.1 Iterative Sättigungsmutagenese (ISM)

Bei der gerichteten Evolution wie der in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzten *error prone*-PCR müssen die Mutationsraten niedrig sein, um die seltenen nützlichen Mutationen identifizieren zu können. Deshalb ist ein großer Teil des Protein-Sequenzraumes mit dieser Methode nicht zugänglich. Außerdem generieren einzelne Basenaustausche allgemein eher konservative Aminosäuresubstitutionen, bei denen eine Aminosäure gegen eine andere mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften, wie z. B. einer ähnlichen Hydrophobizität oder Ladungsgruppe, ausgetauscht wird (Miyazaki und Arnold 1999). Größere Sequenz-Diversität wird durch Sättigungsmutagenese einer oder mehrerer spezifischer Stellen im Enzym mit degenerierten Oligonukleotiden erhalten, die potenziell für alle 20 Aminosäuren kodieren. Dabei ist es möglich, jede Aminosäureposition von Interesse systematisch und unabhängig von den anderen zu mutieren, um die optimalen Aminosäurereste an jeder Stelle zu identifizieren (Delcourt 2006).

Da die Röntgenkristallstruktur der AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. zu Beginn dieser Arbeit bereits vorlag, konnte die Mutagenese auf vorher festgelegte Aminosäurepositionen beschränkt und der zu screenende Protein-Sequenzraum reduziert werden (Kühn et al. 2006; Reetz und Carballeira 2007; Reetz et al. 2006b; Reetz 2007). Bei diesem molekularen *Modelling* wurden mit der von Reetz und Mitarbeitern programmierten Software B-FITTER (B-Faktor Iterativer Test) die flexibelsten Abschnitte der Enzymstruktur durch Berechnung der B-Faktoren jeder Aminosäure identifiziert und anschließend die Aminosäuren mit den höchsten B-Faktoren, die definitionsgemäß wenig Kontakte zu anderen Aminosäuren ausbilden, ausgetauscht (Radivojac et al. 2004; Reetz et al. 2009a). Abbildung 60 zeigt das AFR-Monomer mit den 9 Aminosäuren, für die die höchsten B-Faktoren berechnet wurden.

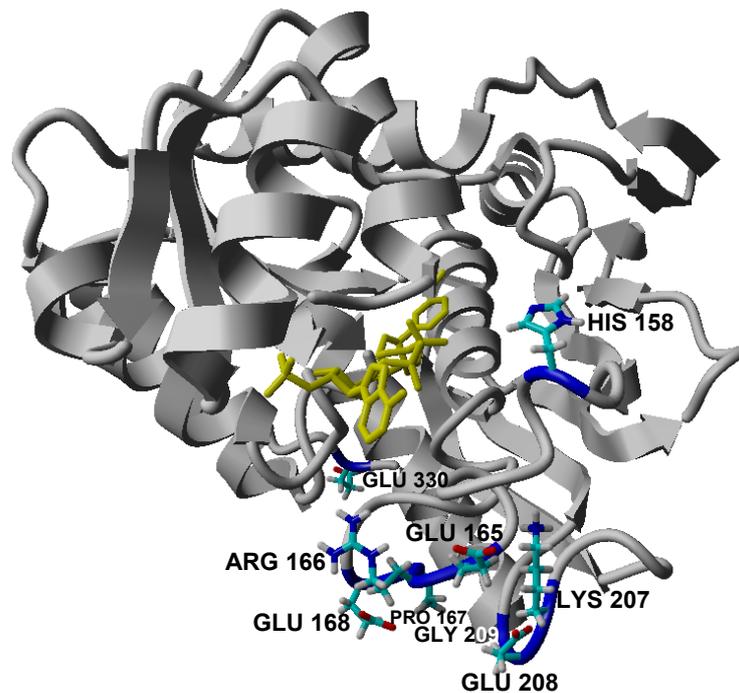


Abbildung 60: Aminosäuren der AFR-A13G mit den höchsten B-Faktoren. Diese Aminosäuren sind im Stäbchenmodell mit Atomfarben dargestellt. Das Modell wurde anhand der Strukturdaten mit YASARA Model erstellt (Dambe et al. 2006). Gelbe Stäbchendarstellung: NADP⁺. Rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff.

Diese Aminosäuren befinden sich alle in *loops* an der Enzymoberfläche der C-terminalen Domäne, ihre Seitenketten sind exponiert und bilden keine stabilisierenden Wasserstoffbrücken aus.

Loops verbinden die regulären Sekundärstrukturen wie β -Faltblätter und α -Helices, sind hauptsächlich an der Enzymoberfläche lokalisiert und machen in den meisten globulären Proteinen mehr als 30% der Enzymstruktur aus (Thornton et al. 1988). Sie sind aber im Gegensatz zu α -Helices oder β -Faltblättern sehr flexible Strukturen, da in ihrem Peptidrückgrat weniger stabilisierende Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Deshalb sind die Dihedralwinkel der Aminosäurereste im Rückgrat von *loops* sehr variabel, was auch im Ramachandran Plot zu sehen ist, wo sie eine signifikant größere Fläche einnehmen, als die Dihedralwinkel der in α -Helices oder β -Faltblättern lokalisierten Aminosäurereste (Nagi und Regan 1997; Ramachandran und Sasisekharan 1968). Aus diesem Grund setzen *loops* die Entropie des ungefalteten Stadiums eines Enzyms signifikant herab (Stemmer 1994a). Es wurde bereits gezeigt, dass die Gesamtstabilität eines Enzyms durch das Einfügen zusätzlicher Wasserstoffbrücken in *loops* an der Proteinoberfläche gesteigert wird (Numata et al. 2001; Pokkuluri et al. 2002; Predki et al. 1996; Spiller et al. 1999; Stemmer 1994a; Takano et al. 1999; Zhou et al. 1996). Dabei ist es von Vorteil, dass die stabilisierenden Mutationen in *loops* nicht die dreidimensionale Enzymstruktur zerstören und dass die Oberfläche eines Proteins allgemein toleranter gegenüber Aminosäuresubstitutionen ist als das Enzyminnere (Miyazaki und Arnold 1999; Vieille und Zeikus 1996; Voigt et al. 2001).

Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass an der Enzym-Oberfläche lokalisierte Mutationen eher die Thermostabilität beeinflussen als Mutationen im Enzyminneren (Agarwal et al. 2002; Arnold et al. 2001; Horsman et al. 2003; Iffland et al. 2000; Kumar et al. 2002; Lehmann et al. 2000; Oue et al. 1999; Yu et al. 2009; Zhao und Arnold 1999). Die an der Oberfläche eingeführten Wasserstoffbrücken führen zur Stabilisierung der *long range*-Interaktionen, d. h. der Interaktionen zwischen Bereichen der Polypeptidkette, die im gefalteten Protein einige Angström voneinander entfernt, essentiell für die Faltung eines Proteins in seine Tertiärstruktur und damit für seine Stabilität sind. Es konnte gezeigt werden, dass 85% der Aminosäurereste an der Ausbildung dieser Interaktionen beteiligt sind (Gromiha und Selvaraj 1999). Wird die Temperatur erhöht, werden diese *long range*-Interaktionen als erstes geschwächt. Die Proteinstruktur wird flexibler und es werden viele Aminosäureseitenketten aus dem Inneren des Proteins exponiert. Wird die Temperaturerhöhung fortgesetzt, brechen die kooperativen Wasserstoffbrücken auf. Der Amid-Stickstoff und die Carbonyl-Sauerstoffe des Peptidrückgrats bilden neue Wasserstoffbrücken zu dem umgebenden Lösemittel aus. Die Anwesenheit des Lösemittels schwächt auch benachbarte Wasserstoffbrücken durch Steigerung ihrer effektiven dielektrischen Konstante. Wenn die Tertiärstruktur vollständig aufbricht, werden hydrophobe Aminosäureseitenketten zum wässrigen Lösemittel exponiert, das Protein denaturiert irreversibel und aggregiert (Archana 2009; Kenklies 2004). Die Erhöhung der Thermostabilität durch die Stärkung der *long range*-Effekte konnte bereits u.a. für die *p*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden (Spiller et al. 1999).

Unter den in Abbildung 60 gezeigten 9 Aminosäureresten der AFR-A13G mit den höchsten B-Faktoren sind 4 Glutamatreste. Es ist dokumentiert, dass die Verringerung der Anzahl von Glutamatresten die Thermostabilität von Proteinen durch die Aufhebung der sterischen Hinderung erhöhen kann (Sriprapundh et al. 2000).

Diese 9 auszutauschenden Aminosäuren wurden in sieben Loci zusammengefasst und in einer ortsgerichteten Sättigungsmutagenese mit degenerierten Primern ausgetauscht. Die Primer trugen an den Positionen dieser Aminosäuren das Basentriplett NNK (N: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; K: Guanin, Thymin), das aus 32 Codons besteht und zum Einbau aller 20 proteinogenen Aminosäuren führt (Reetz et al. 2008).

Die erhaltenen Varianten wurden anschließend im Mikrotiterplatten- bzw. 30 ml-Maßstab auf erhöhte Thermostabilität gescreent. Beim Mikrotiterplatten-Screening wurde die Temperatur so gewählt, dass nach 10-minütiger Inkubation der Platten das Medium in den Wells auf 54°C temperiert war. Diese Screening-Temperatur diente bereits zur Differenzierung von mesophilen und thermophilen Enzymen (Ma et al. 2010).

1.1.1 Screening der ersten ISM-Runde

Die große Anzahl von 9600 AFR-A13G-Varianten, die in der ersten ISM-Runde gescreent werden musste, um die 5 Mutanten mit deutlich erhöhter Thermostabilität zu erhalten, bestä-

tigte, dass bei einer Mutagenese allgemein destabilisierende Mutationen sehr viel häufiger sind als stabilisierende (Daniel 1996). Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass beim Mikrotiterplatten-Screening manche Klone bereits vor dem Hitzeschritt keine Aktivität zeigten.

AFR-A13G-K207P-E208P

AFR-A13G-K207P-E208P war mit einer T_{50}^{10} von 42,0°C die thermostabilste Variante der ersten ISM-Runde. Der Austausch von Lysin 207 und Glutamat 208 durch Prolinreste ist in Abbildung 61 dargestellt.

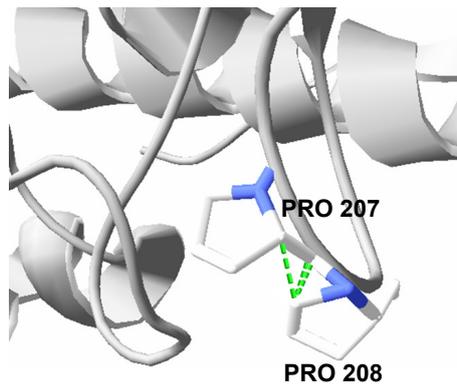


Abbildung 61: Ausschnitt aus der AFR-A13G-K207P-E208P. Das Modell wurde anhand der Strukturdaten mit dem Swiss-PDB-Viewer 4.0.1 erstellt. Blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, grün gestrichelte Linie: Wasserstoffbrücke.

Die δ -Methylengruppe des Prolins 208 bildet zwei Wasserstoffbrücken zur Carboxylgruppe von Prolin 207 aus und wechselwirkt zusätzlich mit dem $C\alpha$ von Prolin 207. Prolin ist die einzige natürlich vorkommende Aminosäure, die N-substituiert ist und einen 5-gliedrigen Pyrrolidinring ausbildet (Williamson 1994; Zarrinpar et al. 2003). Der Ring dieser Iminosäure beschränkt die Rotation der N- $C\alpha$ -Bindung, setzt die konformatorische Entropie des Proteinerückgrates in der ungefalteten Form des Proteins im Vergleich zu anderen natürlich vorkommenden Aminosäuren herab und erhöht so die Proteinstabilität (MacArthur und Thornton 1991; Matthews et al. 1987; Némethy et al. 1966). Die Beschränkung der Rotation der N- $C\alpha$ -Bindung führt dazu, dass die die Peptidbindung flankierenden Kohlenstoffatome $C\alpha$ und $C\alpha-1$ vor Prolin hauptsächlich in cis-Stellung vorliegen. In globulären Proteinen liegt dieses Isomer mit einer Häufigkeit von 5,7% vor (MacArthur und Thornton 1991). Der positive Einfluss von Prolinresten auf die konformatorische Proteinstabilität war bereits bekannt (Barzegar et al. 2009; Matthews et al. 1987; Suzuki et al. 1987; Ueda et al. 1993; Watanabe et al. 1994; Watanabe et al. 1991; Yutani et al. 1991). Die stabilisierende Wirkung von Prolin auf die Enzymstruktur wurde u.a. dadurch gezeigt, dass in Lösungsmittel-exponierten Enzymbereichen wie *loops*, *turns*, N-terminalen ersten *turns* von Helices und *random coils* natürlicherweise viele Prolinreste lokalisiert sind (Tchernychev et al. 1997). Zudem war dokumentiert, dass eine erhöhte Thermostabilität allgemein mit mehr Prolin- und weniger Glutamatresten einher-

geht, was durch den Austausch E208P dieser thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde bestätigt werden konnte (Sriprapundh et al. 2000).

Durch diese Variante wurde bestätigt, dass Prolinreste in *loops* von Enzymen, wo sie nicht die Sekundärstruktur stören, zu deren Stabilisierung führen (Bogin et al. 1998; Choi und Mayo 2006; Haney et al. 1997; He und Falany 2006; Kumar et al. 2000; Lee et al. 2003; Suzuki 1999; Watanabe et al. 1997; Zarrinpar et al. 2003).

AFR-A13G-E208G-G209C

Die Aminosäureaustausche der Variante AFR-A13G-E208G-G209C sind in Abbildung 62 dargestellt.

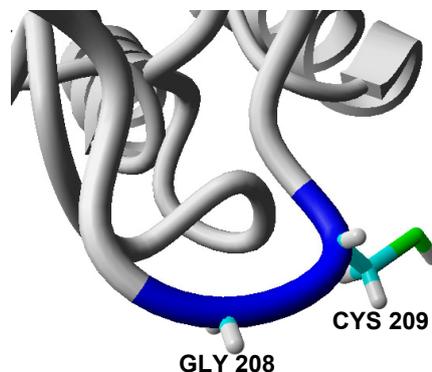


Abbildung 62: Ausschnitt aus der AFR-A13G-E208G-G209C. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Grün: Schwefel, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff.

Glycin besitzt keine Seitenkette, das Aminosäure-Volumen an Position 208 wird deshalb von $155,1 \text{ \AA}^3$ (Glutamat) auf $66,4 \text{ \AA}^3$ (Glycin) verkleinert und eine mögliche sterische Hinderung von Glutamat 208 mit benachbarten Aminosäuren könnte abgebaut werden (Chothia 1975; Kenklies 2004; Numata et al. 2001; Vieille und Zeikus 1996). Befinden sich saure Reste wie Glutamat an der Proteinoberfläche, besteht außerdem die Möglichkeit, dass es wie auch bei Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V zu Ladungsabstoßungen kommt, die die Destabilisierung der Proteinstruktur bewirken könnten (Siddiqui et al. 2006).

Zudem können Glycinreste durch die fehlende Seitenkette einzigartige Torsionswinkel annehmen (Numata et al. 2001). Der Verlauf des *loops* könnte dadurch enger werden, die Distanz der Wasserstoffbrücken, die im Peptidrückgrat ausgebildet werden, würde sich verkleinern und die Struktur des *loops* stabilisieren. Die Erhöhung der Thermostabilität durch sogenannte *large-to-small*-Mutationen und die damit einhergehende Reduktion ungünstiger Konformationen wurde u.a. bereits von Yin und Mitarbeitern an 5 strukturell völlig unterschiedlichen Proteinen gezeigt (Yin et al. 2007). Auch andere Beispiele sind in der Literatur beschrieben (Kim et al. 2008; Ma et al. 2001; Minagawa et al. 2003).

AFR-A13G-E165N-R166K

Die Aminosäureaustausche von AFR-A13G-E165N-R166K sind in Abbildung 63 dargestellt.

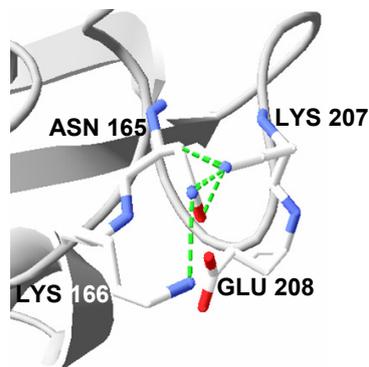


Abbildung 63: Ausschnitt aus der AFR-A13G-E165N-R166K. Das Modell wurde mit dem Swiss-PDB-Viewer 4.0.1 erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Wasserstoff, weiß: Kohlenstoff, grüne gestrichelte Linie: Wasserstoffbrücke.

Aus der Modellrechnung ergibt sich, dass die δ^2 -Aminogruppe von Asparagin 165 mit der Aminogruppe von Lysin 166 wechselwirkt und dass die α -Methylengruppe von Lysin 207 eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff der Carbonylgruppe des Asparagins 165 ausbildet. Außerdem kommt es zu weiteren Wechselwirkungen zwischen der γ -Carbonyl bzw. β -Methylengruppe von Asparagin 165 mit der Aminogruppe und der α -Methylengruppe von Lysin 207. Diese stabilisierenden Wechselwirkungen könnten die T_{50}^{10} dieser Variante im Vergleich zur AFR-A13G um 2,1°C erhöhen.

AFR-A13G-G209Q

Die Aminosäuresubstitution der Variante AFR-A13G-G209Q zeigt Abbildung 64.

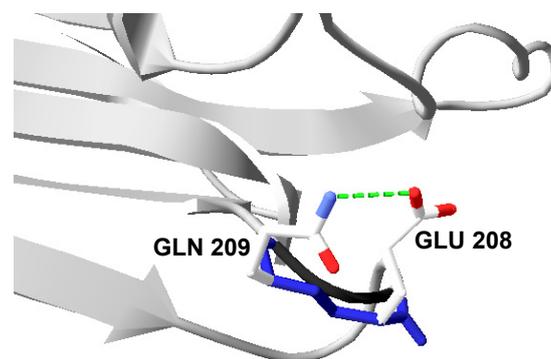


Abbildung 64: Ausschnitt aus der AFR-A13G-G209Q. Das Modell wurde mit dem Swiss-PDB-Viewer 4.0.1 erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, weiß: Kohlenstoff, grüne gestrichelte Linie: Wasserstoffbrücke.

Die α^2 -Aminogruppe des Glutamins 209 könnte eine Wasserstoffbrücke zur Carboxylgruppe des Glutamats 208 ausbilden. Dieser Effekt würde durch den Zwitterionencharakter des Glu-

tamins verstärkt werden. Außerdem hat Glycin einen Hydropathizitätsindex nach Kyte und Doolittle von nur -0,4, Glutamin ist mit einem Hydropathizitätsindex von -3,5 sehr viel hydrophiler (Kyte und Doolittle 1982). Da dieser hydrophilere Aminosäurerest an der Enzymperipherie lokalisiert ist, könnte die Agglutination des Proteins bei Temperaturerhöhung reduziert werden, was in einer erhöhten Thermostabilität resultieren würde (Longo und Combes 1997).

1.1.2 Kombinationen

Die Kombination von „nützlichen“ Mutationen führt im Allgemeinen zu additiven Effekten bezüglich der Ziel-Eigenschaft eines Proteins, auch wenn die einzelnen Mutationen nicht in räumlicher Nähe zueinander liegen (Aita et al. 2002; Chen et al. 1991; Cherry et al. 1999; Hamamatsu et al. 2005; Hamamatsu et al. 2006; Hoseki et al. 2003; Kuchner und Arnold 1997; Lehmann et al. 2000; Ma et al. 2001; Numata et al. 2001; Shih und Kirsch 1995; Wells 1990). Verschiedene Methoden zur Kombination einzelner Mutationen wurden etabliert, die den Sequenzraum, der gescreent werden kann, erweitern (Cramer et al. 1998; Kikuchi et al. 1999; Ness et al. 1999; Shao et al. 1998; Stemmer 1994a; Stemmer 1994b, Volkov et al. 1999; Zhao et al. 1998). Schmidt-Dannert und Mitarbeiter fassten die „nützlichsten“ Mutationen der frühen Mutagenese-Runden durch ortsgerichtete Mutagenese in einer Variante zusammen (Schmidt-Dannert 2001). Diese Kombinationsmethode wurde in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt.

Kombination von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-E165N-R166K

Abbildung 65 stellt die eingeführten Aminosäureaustausche der Variante AFR-A13G-E165N-R166K-K207P-E208P dar.

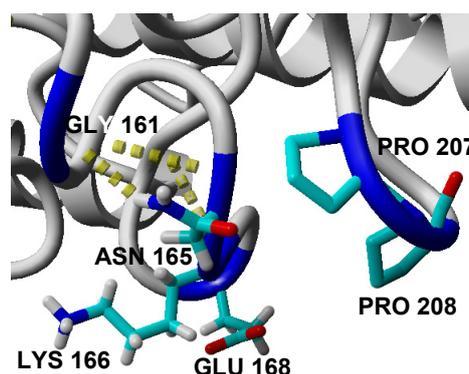


Abbildung 65: Ausschnitt aus der AFR-A13G-E165N-R166K-K207P-E208P. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff, gelbe gestrichelte Linie: Wasserstoffbrücke.

Aus der Modellrechnung ergibt sich, dass die Aminosäureaustausche bei der AFR-A13G-E165N-R166K-K207P-E208P in direkter räumlicher Nähe liegen, dies könnte zu einer sterischen Hinderung führen. Dadurch könnte Lysin 166 in dieser Variante in einem anderen Ro-

tamer vorliegen als bei der Ausgangsvariante AFR-A13G-E165N-R166K. Folglich könnte keine neue Wasserstoffbrücke zur Carboxylgruppe des Glutamats 168 ausgebildet werden. Die stabilisierende Wirkung der Wasserstoffbrücke von der δ^2 -Aminogruppe des Asparagins 165 zum Carbonylsauerstoff des Peptidrückgrats von Glycin 161 und die der Prolinreste 207 und 208 würde aber erhalten bleiben. Aus diesem Grund könnte die Rest-Aktivität nach Hitzeschritt immer noch um 13,9% höher als die der AFR-A13G sein. Durch die sterische Hinderung würden die Aminosäureaustausche aber eine reprimierende Wirkung aufeinander ausüben, im Vergleich zu den Ausgangsmutanten AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-E165N-R166K wird die Rest-Aktivität der Kombinationsmutante um 12,9% bzw. um 2,1% reduziert.

Kombination von AFR-A13G-G209Q und AFR-A13G-E165N-R166K

Die Aminosäureaustausche der Variante AFR-A13G-E165N-R166K-G209Q sind in Abbildung 66 gezeigt.

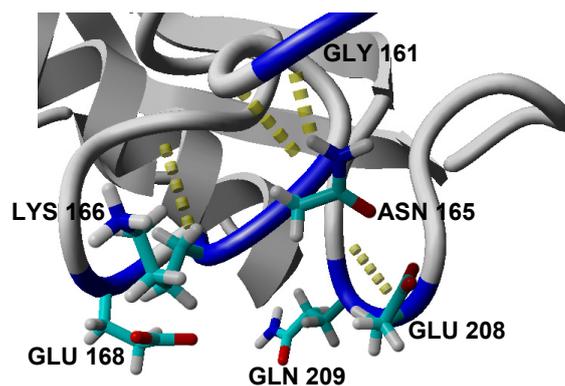


Abbildung 66: Ausschnitt aus der AFR-A13G-E165N-R166K-G209Q. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff, gelbe gestrichelte Linie: Wasserstoffbrücke.

Auch die Aminosäureaustausche der Variante AFR-A13G-E165N-R166K-G209Q liegen in der Tertiärstruktur in unmittelbarer Nähe zueinander, es könnte zu einer sterischen Hinderung kommen, da die Seitenkette von Glutamin 209 um $94,7 \text{ \AA}^3$ größer ist als die von Glycin (Chothia 1975; Kenklies 2004). Deshalb könnte Lysin 166 bei dieser Variante in einem anderen Rotamer vorliegen und keine Wasserstoffbrücke zur Carboxylgruppe des Glutamats 168 ausbilden. Ebenso könnte keine Wasserstoffbrücke zwischen der Aminogruppe des Glutamins 209 und der Carboxylgruppe des Glutamats 208 entstehen. Die Wasserstoffbrücke der δ^2 -Aminogruppe des Asparagins 165 bliebe zwar erhalten, die Enzymstruktur würde aber im Vergleich zur AFR-A13G nicht in höherem Ausmaß stabilisiert, die Rest-Aktivität nach Hitzeschritt wurde im Vergleich mit der AFR-A13G sogar um 0,2% reduziert. Damit wurde die stabilisierende Wirkung der Aminosäureaustausche der Einzelmutanten durch ihre räumliche Nähe vollständig aufgehoben.

Kombination von AFR-A13G-K207P-E208P und AFR-A13G-G209P

Die erhöhte Thermostabilität der Variante AFR-A13G-K207P-E208P bestätigte die stabilisierende Wirkung von Prolinen in Oberflächen-*loops* durch Steigerung der Rigidität und Erhaltung der Integrität der Sekundärstruktur der AFR-A13G (Barzegar et al. 2009; Sakaguchi et al. 2007). Deshalb wurde durch ortsgerichtete Mutagenese eine Variante generiert, deren Aminosäuren an den Positionen 207 bis 209 durch Prolinreste ersetzt waren (vgl. Abbildung 67).

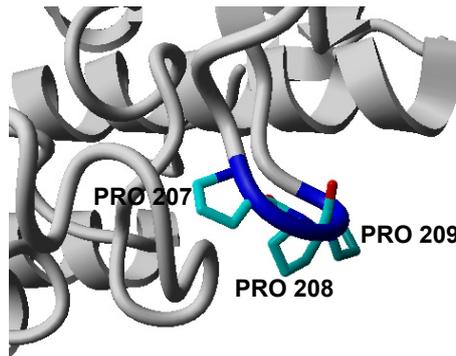


Abbildung 67: Ausschnitt aus der AFR-A13G-K207P-E208P-G209P. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, türkis: Kohlenstoff.

Durch die drei aufeinanderfolgenden Prolinreste wird wahrscheinlich das Peptidrückgrat stark gespannt, der *loop* könnte deshalb breiter und die Wasserstoffbrücken im Peptidrückgrat des *loops* könnten länger werden. Dies würde zu einem Verlust von Festigkeit an der Enzymoberfläche führen. Im Vergleich zur AFR-A13G-K207P-E208P wurde die Rest-Aktivität nach Hitzeschritt um 25,5% reduziert und ist damit nur 1,3% höher als die der AFR-A13G. Die Ergebnisse der Kombinationsmutanten belegen, dass es schwierig ist, synergistische Effekte verschiedener Einzelmutationen auf die Thermostabilität eines Kombinationsenzym vorauszusagen (Nishiya und Kishimoto 2009; Wakabayashi et al. 2008).

1.1.3 Screening der zweiten ISM-Runde

In der zweiten ISM-Runde wurde AFR-A13G-K207P-E208P als Template eingesetzt, da diese Variante die thermostabilste Variante der ersten ISM-Runde war. Die Mutagenese wurde an den verbleibenden sechs Loci durchgeführt, es wurden 4992 Klone gescreent.

AFR-A13G-K207P-E208P-E330V

Mit einer T_{50}^{10} von 49,2°C war AFR-A13G-K207P-E208P-E330V die thermostabilste Variante dieser Arbeit, im Vergleich zur AFR-A13G war die T_{50}^{10} um 12,5°C erhöht (vgl. Abbildung 68).

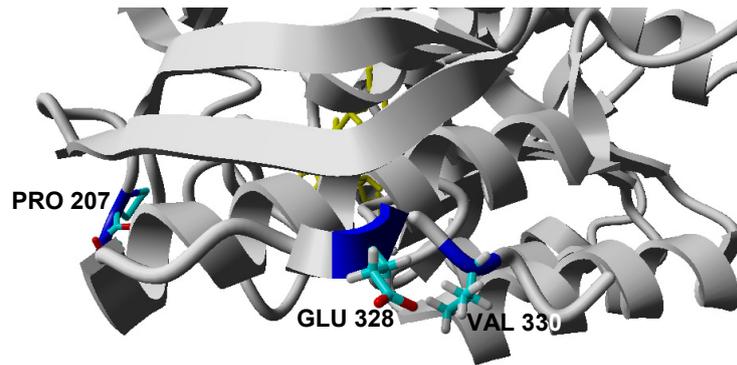


Abbildung 68: Ausschnitt aus der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Gelbe Stäbchendarstellung: NADP⁺. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff.

Durch den Austausch E330V könnte die elektrostatische Repulsion zwischen den bei AFR-A13G und AFR-A13G-K207P-E208P direkt benachbarten negativ geladenen Carboxylgruppen von Glutamat 328 und Glutamat 330 aufgehoben sein, was zu einer Stabilisierung des C-Terminus und folglich zu einer höheren Thermostabilität des Enzyms führen würde (Dorscheid 2005; Minagawa et al. 2002; Minagawa et al. 2003). Die Aminosäureaustausche K207P-E208P und E330V liegen in der Tertiärstruktur weit voneinander entfernt, so dass keine sterische Hinderung entsteht und ihre stabilisierende Wirkung additiv und nicht reprimierend ist, wie es z. B. für die Kombinationsmutanten gezeigt wurde (vgl. Kapitel IV1.1.2).

Der Umstand, dass diese Variante in der zweiten ISM-Runde generiert wurde zeigt, dass bei der gerichteten Evolution von Proteinen durch eine Akkumulation geringer Veränderungen über mehrere Mutantengenerationen hinweg große Veränderungen der Enzymeigenschaften erzielt werden können (Arnold 2001).

Die hohe Thermostabilität der AFR-A13G-K207P-E208P-E330V ermöglichte als zusätzlichen Schritt während ihrer Anreicherung die Hitzefällung (5 min bei 45°C bzw. 10 min bei 40°C). Dabei wurden sämtliche rekombinante AFRs in dieser Arbeit anders angereichert als bei Kühn. Der Reinigungsschritt über Affinitätschromatographie stimmte prinzipiell noch überein, wobei von Kühn eine andere Säule eingesetzt wurde. Anschließend wurde die AFR bei Kühn jedoch durch Anionenaustauscher angereichert und in dieser Arbeit erfolgte die Umpufferung der AFR durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) über Phenyl-Sepharose. Dies resultierte in anderen Werten für die spezifische Aktivität des Enzyms und für die katalytischen Effizienzen, als sie von Kühn beschrieben wurden (Dambe et al. 2006).

Die zusätzliche Eliminierung von Fremdproteinen durch die 5-minütige Inkubation bei 45°C resultierte in einer im Vergleich zur AFR-A13G um 40,7 U/mg erhöhten spezifischen Aktivität nach Chromatographie über Ni- und Phenyl-Sepharose. Die anschließende SDS-PAGE bestätigte die höhere Reinheit der Variante. In den Proben nach Phenyl-Sepharose waren keine Banden außer der AFR-Bande auf einer Höhe von ca. 38 kDa zu sehen (vgl. Abbildung 24).

AFR-A13G-E165H-R166T-K207P-E208P

Die Aminosäuresubstitutionen von AFR-A13G-E165H-R166T-K207P-E208P sind in Abbildung 69 dargestellt.

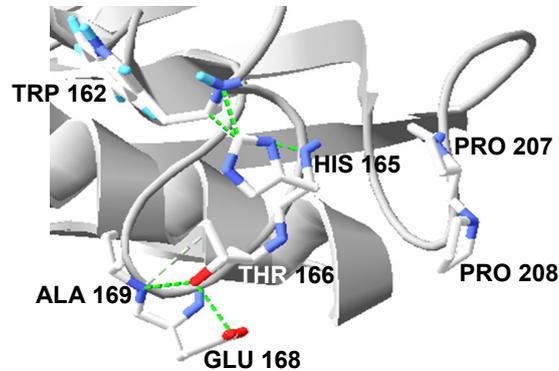


Abbildung 69: Ausschnitt aus der AFR-A13G-E165H-R166T-K207P-E208P. Das Modell wurde mit dem Swiss-PDB-Viewer 4.0.1 erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, weiß: Kohlenstoff, grüne gestrichelte Linie: Wasserstoffbrücke.

Aus der Modellrechnung ergibt sich, dass bei der AFR-A13G-E165H-R166T-K207P-E208P die Hydroxylgruppe von Threonin 166 Wasserstoffbrücken zur Carboxylgruppe des Glutamins 168 ausbilden und mit der Amidgruppe des Peptidrückgrats von Alanin 169 wechselwirken kann. Die π -1-Methin-Gruppe des Histidins 165 könnte mit dem C α und der Aminogruppe des Peptidrückgrats von Tryptophan 162 wechselwirken. Verglichen mit der Ausgangsvariante AFR-A13G-K207P-E208P nahm die T_{50}^{10} aber um 2,1°C ab, wahrscheinlich waren die Aminosäureaustausche in der Tertiärstruktur der AFR ebenfalls zu dicht benachbart und es kam zu konformatorischen Spannungen des Peptidrückgrats.

AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G

Die Aminosäureaustausche von AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G sind in Abbildung 70 gezeigt.

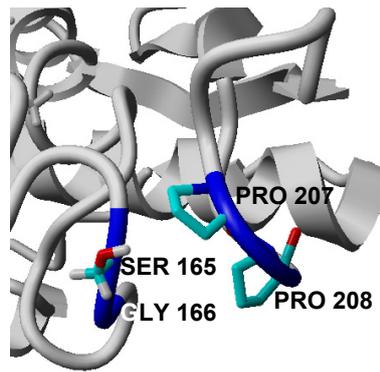


Abbildung 70: Ausschnitt aus der AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff.

Der Austausch von Glutamat 165 gegen Serin ist ebenfalls ein *large-to-small*-Austausch, der eine sterische Hinderung zwischen den in direkter Nähe lokalisierten Aminosäuren Prolin 207 / Prolin 208 und Glutamat 165 / Arginin 166 abbauen könnte (Chothia 1975; Kenkies 2004). Da aber von den Seitenketten des Serins 165 und Glycins 166 keine neuen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, wird diese Variante im Vergleich zur AFR-A13G-K207P-E208P nicht in höherem Ausmaß stabilisiert. Die T_{50}^{10} wird um 0,2% auf 41,8°C reduziert.

1.2 Zufallsmutagenese durch *error prone*-PCR

Die im vorherigen Kapitel gezeigte Reduktion der Thermostabilität der drei Kombinationsmutanten AFR-A13G-E165N-R166K-K207P-E208P, AFR-A13G-E165N-R166K-G209Q und AFR-A13G-K207P-E208P-G209P im Vergleich zu den Ausgangsmutanten hat gezeigt, dass sich die Auswirkungen von Mutationen nur schwierig vorhersagen lassen (Kim et al. 2008; LiCata und Ackers 1995; Nishiya und Kishimoto 2009; Tobin et al. 2000; Wakabayashi et al. 2008). Deshalb wurden in dieser Arbeit neben der Methode der ISM durch *error prone*-PCR auch zufällige Punktmutationen in das *afr-a13g*-Gen eingeführt (Cadwell und Joyce 1992; Cadwell und Joyce 1994; Leung et al. 1989; Reetz et al. 2008). Dabei wurden die PCR-Bedingungen so gewählt, dass pro Gen und Generation 1-3 Basen substituiert wurden (Miyazaki und Arnold 1999). 1632 Klone wurden gescreent.

Die mit einer T_{50}^{10} von 46,6°C thermostabilste durch *error prone*-PCR erhaltene Variante AFR-G13A-M31V zeigte übereinstimmend mit den Angaben in der Literatur unerwartete Mutationen (Lei 2003).

AFR-G13A-M31V

Die beiden Aminosäureaustausche, die durch 2 Basensubstitutionen hervorgerufen wurden, sind in Abbildung 71 dargestellt. Sie liegen in der *fingerprint*-Region der N-terminalen Dinukleotid-Bindedomäne, die von den Aminosäureresten 3-33 gebildet wird, die Stränge $\beta 1$

und $\beta 2$ sowie die verbindende Helix $\alpha 1$ einschließt und die an der Cosubstrat-Bindung beteiligt ist. Der von Kühn zur Änderung der Cosubstrat-Spezifität eingeführte Austausch von Alanin 13 gegen Glycin wurde in dieser Variante revidiert, das Phosphat-Bindungsmotiv aus Glycin 8, Serin 10 und Alanin 13 wurde wieder hergestellt (Dambe et al. 2006). Durch diesen Austausch vergrößert sich das Volumen der Aminosäure an Position 13 um $25,1 \text{ \AA}^3$. Der Abstand zwischen der α A-Helix und dem $\beta 1$ -Faltblatt könnte dadurch vergrößert und die Bindung von NADPH verbessert werden (Chothia 1975; Kenklies 2004, Kühn 2004). Außerdem könnte durch die von M31V hervorgerufene Volumenverkleinerung eine sterische Hinderung aufgehoben werden, wodurch die Wasserstoffbrücke zwischen dem Serin 33 und der 2'-Phosphatgruppe des Adenosins von NADPH verkürzt werden könnte, was die NADPH-Bindung zusätzlich verbessern würde (Kühn 2004).

Da in dieser Arbeit ausschließlich NADPH als Cosubstrat eingesetzt wurde, stellte der durch G13A hervorgerufene Verlust der dualen Cosubstrat-Spezifität keinen Nachteil dar.

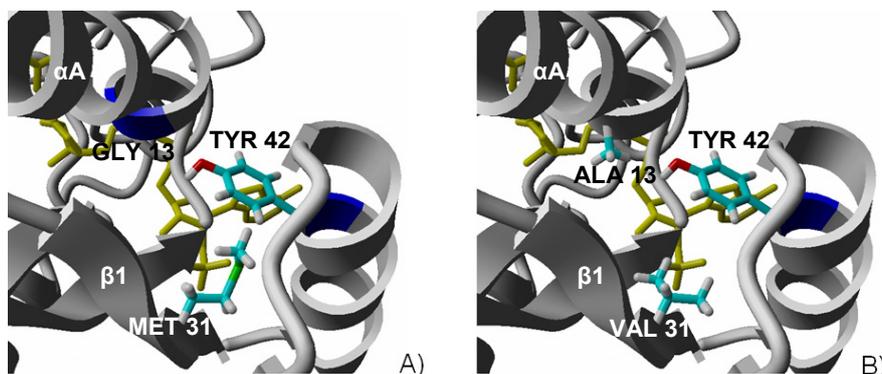


Abbildung 71: Ausschnitt aus den *fingerprint*-Regionen der AFR-A13G und der AFR-G13A-M31V. A) AFR-A13G und B) AFR-G13A-M31V. Die Modelle wurden mit YASARA Model erstellt. Gelbe Stäbchendarstellung: NADP⁺. Rot: Sauerstoff, grün: Schwefel, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff.

Durch den Austausch G13A wird der mit einem Hydrophathizitätsindex von -0,4 leicht hydrophile Glycinrest durch ein hydrophobes Alanin (1,8) ersetzt. Der Austausch von Methionin 31 gegen Valin erhöht den Hydrophathizitätsindex von 1,9 auf 4,2 (Kyte und Doolittle 1982). Da diese Aminosäureseitenketten im Enzyminneren liegen, könnte wie in der Literatur dokumentiert die Steigerung der Hydrophobizität des Enzym-Inneren zu einer erhöhten Thermostabilität dieser Variante führen (Priyakumar 2012).

Außerdem ist bei der Ausgangsvariante AFR-A13G die aliphatische Seitenkette des Methionins 31 mit einem Volumen von $170,8 \text{ \AA}^3$ sperrig und bildet keine stabilisierenden Disulfid- oder Wasserstoffbrücken zu benachbarten Aminosäuren aus, es kommt wahrscheinlich zu einer sterischen Hinderung mit Tyrosin 42. Durch die um $29,1 \text{ \AA}^3$ verkleinerte Seitenkette von Valin 31 könnte diese sterische Hinderung teilweise abgebaut werden (Chothia 1975; Kenklies 2004).

Durch *error prone*-PCR konnte die T_{50}^{10} der AFR-A13G mit nur 2 Aminosäureaustauschen um 9,9°C auf 46,6°C erhöht werden, womit bestätigt wurde, dass Enzyme unter starkem Selektionsdruck schnell an veränderte Umweltbedingungen adaptieren können (Miyazaki et al. 2000). Es wurde auch bereits gezeigt, dass der Austausch nur zweier Aminosäuren die Thermostabilität eines industriell relevanten Enzyms signifikant verbessern kann (Xie et al. 2006).

Separation beider Mutationen

Zur Analyse der beiden Mutationen der Doppelmutante AFR-G13A-M31V auf einen kumulativen Effekt hin wurden beide Mutationen anschließend durch ortsgerichtete Mutagenese in 2 Varianten separiert (Giver et al. 1998; Reetz et al. 2007). Da die Thermostabilität der beiden Varianten AFR-G13A ($T_{50}^{10} = 40,2^{\circ}\text{C}$) und AFR-A13G-M31V ($T_{50}^{10} = 44,9^{\circ}\text{C}$) im Vergleich zur AFR-G13A-M31V ($T_{50}^{10} = 46,6^{\circ}\text{C}$) reduziert war, konnte der additive Effekt der beiden Aminosäureaustausche gezeigt werden. Die Erhöhung der Thermostabilität durch additive oder synergistische Effekte wurde bereits in der Literatur beschrieben (Lehmann et al. 2002; Pantoliano et al. 1989; Schumann et al. 1993; Serrano et al. 1993).

Zur Analyse auf weitere kumulative Effekte wurden die Aminosäureaustausche der AFR-G13A-M31V mit denen der thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde kombiniert.

Kombination von AFR-G13A-M31V mit K207P-E208P

Die Aminosäuresubstitutionen von AFR-G13A-M31V-K207P-E208P sind in Abbildung 72 dargestellt.

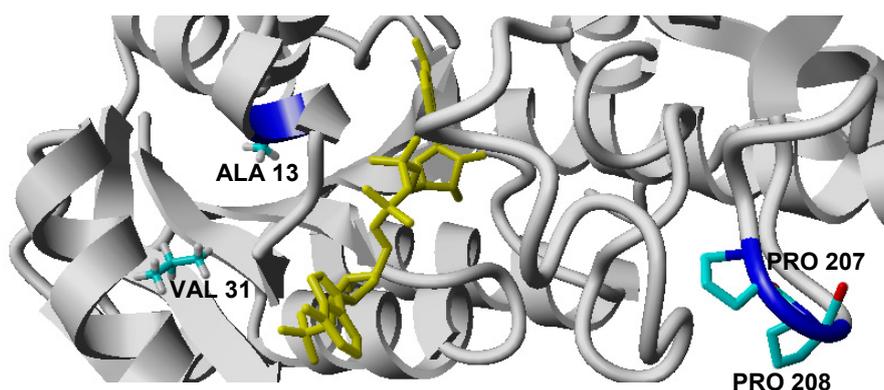


Abbildung 72: Ausschnitt aus AFR-G13A-M31V-K207P-E208P. Das Modell wurde mit YASARA Model erstellt. Gelbe Stäbchendarstellung: NADP⁺. Rot: Sauerstoff, türkis: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff.

Im Gegensatz zu vielen in dieser Arbeit generierten Kombinationsmutanten liegen die Aminosäureaustausche G13A-M31V und K207P-E208P in der Tertiärstruktur dieser Variante weit voneinander entfernt und bauen wahrscheinlich keine sterische Hinderung zueinander auf. Die T_{50}^{10} wird aber im Vergleich zur AFR-G13A-M31V nur um 0,6°C auf 47,2°C erhöht,

die Stabilität der Enzymstruktur wird durch die beiden Prolinreste an den Positionen 207 und 208 nur geringfügig gesteigert. Dennoch ist diese Kombinationsmutante die zweitstabilste Variante dieser Arbeit.

Obwohl die Aminosäureaustausche der thermostabilsten Ausgangsvarianten in der Tertiärstruktur der Kombinationsmutante nicht unmittelbar benachbart sind und deshalb nicht repulsiv aufeinander wirken können, wurde die Thermostabilität der Kombinationsmutante nur marginal erhöht. Dieses Phänomen zeigt ebenfalls, dass die Effekte eines rationalen Aminosäureaustauschs nur schwer vorherzusagen sind. Deshalb ist es, auch wenn die Kristallstruktur eines Enzyms vorliegt, unwahrscheinlich, dass die in den Experimenten gefundenen geeignetsten Mutationen hätten vorhergesagt werden können (Dorscheid 2009; Lehmann et al. 2000). Aus diesem Grund konnten bis jetzt auch noch keine allgemeingültigen Regeln zur Erhöhung der Thermostabilität generiert werden, weshalb die Zufallsmutagenese z. B. durch *error prone*-PCR zur Optimierung von Enzymen immer noch standardmäßig zur Generierung von Enzymvarianten mit verbesserten Ziel-Eigenschaften eingesetzt wird (Zhao und Arnold 1999).

Da Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen momentan intensiv erforscht und bioinformatische Methoden allgemein ständig weiter entwickelt werden, ist aber die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es zukünftig zuverlässigere Modelle zur Vorhersage der Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen auf die Enzym-Eigenschaften geben wird.

1.3 Aktivität der AFR-Varianten

Bei allen durch ISM generierten AFR-A13G-Varianten außer bei AFR-A13G-G209Q und AFR-A13G-E165N-R166K war die Verbesserung der Thermostabilität mit einer deutlichen Reduktion der katalytischen Effizienz für 6-Deoxy-D-glucoson assoziiert, da wegen der niedrigen relativen Aktivität der Ausgangsvariante AFR-A13G für 6-Deoxy-D-glucoson beim Screening im Mikrotiterplatten Maßstab 1,5-AF als Substrat eingesetzt werden musste. Deshalb wurde der Selektionsdruck nicht gleichzeitig auf erhöhte Thermostabilität und gesteigerte katalytische Effizienz für dieses Substrat ausgeübt. Es war bereits bekannt, dass die erfolgreiche Veränderung der Ziel-Eigenschaft eines Enzyms zunächst mit der Verschlechterung einer anderen assoziiert sein kann, wenn nicht auf beide Eigenschaften gleichzeitig gescreent wird (Arnold 2001 A, Giver et al. 1998, Hamamatsu et al. 2006; You und Arnold 1996).

Die katalytischen Effizienzen von AFR-A13G-G209Q und AFR-A13G-E165N-R166K waren bei der Umsetzung von 6-Deoxy-D-glucoson annähernd gleich hoch wie die der AFR-A13G. Dass bei diesen Varianten die T_{50}^{10} im Vergleich zur AFR-A13G nur um 0,4°C bzw. 2,1°C erhöht war, deutet darauf hin, dass die Enzymstruktur der AFR zur effektiven Katalyse dieses Substrates flexibel sein muss, was in einer reduzierten Thermostabilität resultiert. Die

Möglichkeit einer starken inversen Relation von Thermostabilität und katalytischer Effizienz durch die reduzierte konformatorische Dynamik eines Enzyms war bereits bekannt (Hamamatsu et al. 2006; Lehmann et al. 2000; Shoichet et al. 1995; Somero 1975; Varley und Pain 1991).

Da aber drei der thermostabilsten Varianten dieser Arbeit, AFR-A13G-K207P-E208P, AFR-A13G-K207P-E208P-E330V und AFR-A13G-M31V, für das Substrat 1,5-AF im Vergleich zur AFR-A13G eine um 20%, 140% bzw. 160% gesteigerte katalytische Effizienz besaßen, kann davon ausgegangen werden, dass bei der AFR eine hohe katalytische Aktivität bei moderaten Temperaturen und eine hohe operative Thermostabilität nicht grundsätzlich invers korreliert sind, sondern nur bei der Katalyse des ohnehin schlechter verwerteten Substrates 6-Deoxy-D-glucoson. Der Grund für die inverse Korrelation von katalytischer Aktivität für 6-Deoxy-D-glucoson und Thermostabilität bei gleichzeitig hoher Aktivität für 1,5-AF könnte in einem anderen Bindemechanismus von 6-Deoxy-D-glucoson im aktiven Zentrum liegen, der durch die gesteigerte Enzymrigidität inhibiert wird.

Es ist schwer zu begründen, warum die an der Enzympерipherie der AFR-A13G eingeführten Aminosäureaustausche, die in der Tertiärstruktur weit vom aktiven Zentrum mit der katalytischen Triade Lys 94, Asp 176 und His 180 und von der NADP(H)-bindenden *fingerprint*-Region entfernt liegen, Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben (Kühn 2004). Solche Veränderungen, die sich durch geringfügige Strukturveränderungen von der Enzympерipherie bis ins aktive Zentrum fortpflanzen, wurden bereits unter anderem für die P2OxB2H beschrieben und werden als *relais effects* bezeichnet (Bastian 2005; Bastian et al. 2005; Oue et al. 1999; Raman et al. 2004; Wongtrakul et al. 2003).

Obwohl die katalytische Effizienz der thermostabilsten Variante der ersten ISM-Runde für 6-Deoxy-D-glucoson deutlich verschlechtert war, wurde AFR-A13G-K207P-E208P in der zweiten Runde als Template eingesetzt, da bereits bekannt war, dass in den ersten Screening-Generationen die Erhöhung der Thermostabilität eines Enzyms zwar mit erhöhten K_m -Werten und reduzierten k_{cat} im mesophilen Temperaturbereich (30°C) assoziiert sein kann, dass aber die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass die Enzymaktivität in nachfolgenden Screening-Generationen wieder auf Wildtyp-Höhe ansteigt (Giver et al. 1998). Dies wurde durch die Verdopplung der katalytischen Effizienz für 1,5-AF bei der in der zweiten ISM-Runde generierten thermostabilsten Variante AFR-A13G-K207P-E208P-E330V im Vergleich zur AFR-A13G-K207P-E208P bestätigt. Deshalb konnte auch davon ausgegangen werden, dass die katalytische Aktivität für 6-Deoxy-D-glucoson ebenfalls in den nächsten Screening-Generationen wieder ansteigen würde.

Da die Thermostabilität der Varianten im Vergleich zur AFR-A13G zum Teil deutlich erhöht war, musste in den Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson die zugesetzte Enzymmenge

im Vergleich zur AFR-A13G wegen der verschlechterten katalytischen Effizienzen für dieses Substrat jedoch nicht erhöht werden (vgl. Kapitel III.3.4).

AFR-G13A-M31V zeigt mit der im Vergleich zur AFR-A13G auf 260% erhöhten katalytischen Effizienz für 1,5-AF und der nur um 17% reduzierten katalytischen Effizienz für 6-Deoxy-D-glucoson das große Potential der *error prone*-PCR zur Generierung von Enzymvarianten mit signifikant erhöhter Thermostabilität bei gleichzeitig signifikant hoher katalytischer Aktivität im mesophilen Temperaturbereich.

Aus diesem Grund könnte die *error prone*-PCR im nächsten Schritt mit den thermostabilsten AFR-Varianten dieser Arbeit als Templates durchgeführt werden, um sowohl die Thermostabilität als auch die katalytische Effizienz der Varianten für 6-Deoxy-D-glucoson noch weiter zu steigern.

2 Biokonversionen mit AFR-A13G und den thermostabil verbesserten AFR-Varianten

Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren ausschließlich chemische Verfahren zur D-Rhamnose-Synthese in der Literatur dokumentiert. Eines dieser Verfahren basierte auf der Umsetzung von D-Mannose, die um den Faktor 1000 teurer ist, als die in dem hier beschriebenen neuen Prozess eingesetzte D-Glucose (Nishio et al. 1996). Bei einem anderen Verfahren wurde die chemische Konfigurationsumkehr am C2 der 6-Deoxy-D-glucose mit Hilfe eines teuren, die Umwelt belastenden und deshalb nicht mehr zeitgemäßen Schwermetall-Katalysators durchgeführt (Tanase et al. 1986, Anastas und Warner 1998).

Die vom Kooperationspartner toroma organics Ltd. aus D-Glucose synthetisierte 6-Deoxy-D-glucose wurde in dieser Arbeit zunächst durch Biokonversion mit P2Ox zu 6-Deoxy-D-glucoson oxidiert (vgl. Kapitel II.2.1 und III.3.2). Für die nachfolgende Reduktion durch AFR-A13G sollte ein effektives und effizientes *in situ*-Cosubstrat-Regenerierungssystem etabliert werden, um die wirtschaftliche Synthese der D-Rhamnose zu ermöglichen (Johannes et al. 2007).

Zur Cosubstrat-Regenerierung wurde die GDH aus *Pseudomonas spec.* verwendet, da dieses Enzym ebenso wie sein Hauptsubstrat D-Glucose kommerziell günstig und zudem hoch aktiv und stabil ist (Sogabe et al. 1994). Außerdem ist die von GDH katalysierte Reaktion wegen der spontanen Hydrolyse des D-Gluconolactons zu D-Gluconsäure nahezu irreversibel und das Reaktionsgleichgewicht liegt hauptsächlich auf der Seite der NADP⁺-Reduktion (Goldberg et al. 2007).

Bei der Prozessoptimierung sollten die günstigsten Konditionen gefunden werden, um hohe Umsatzgeschwindigkeiten bei hoher Selektivität und niedrigem Enzymverbrauch zu erhalten. Vom ökonomischen Standpunkt aus sollte dabei ein Kompromiss gefunden werden zwischen

der Raum-Zeit-Ausbeute und der Zyklenzahl (TTN), die direkt die Kosten für das Cosubstrat bestimmt. Das Ziel war dabei, möglichst niedrige Cosubstrat-Konzentrationen einzusetzen, um bei möglichst hohen TTNs überschüssiges Cosubstrat zu vermeiden. Die NADP(H)-Konzentration sollte aber so hoch sein, dass nicht schon bei geringfügiger Deaktivierung der Enzyme die Raum-Zeit-Ausbeute abfällt (Kragl et al. 1992).

2.1 Biokonversion von D-Glucoson

Die Prozessentwicklung erfolgte in Vorversuchen mit D-Glucoson als Substrat, um den Verbrauch an 6-Deoxy-D-glucoson einzuschränken. Dies wurde durch die Ähnlichkeit der kinetischen Konstanten der AFR-A13G für D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson ermöglicht (vgl. Tabelle 10).

Die Zusammensetzung des Biokonversionsansatzes mit AFR und *in situ*-Cosubstrat-Regenerierung durch GDH wurde empirisch ermittelt, wie es häufig für das Design von Bioprozessen beschrieben wurde (Carinhas 2011; Larrosa 2008; Lee und Gilmore 2006). Dabei ist bekannt, dass mit steigender Cosubstrat-Konzentration die Biokonversion früher quantitativ abgeschlossen ist, während die Zyklanzahl (TTN) abnimmt und dass eine abnehmende Cosubstrat-Konzentration zu einem Anstieg der Zyklanzahl bei gleichzeitiger Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt, da es zunehmend zur Cofaktor-Limitierung kommt (Kragl et al. 1992). Dies konnte durch die verschiedenen Biokonversionsansätze bestätigt werden. Um den experimentellen Aufwand einzugrenzen, wurden die Konzentrationen der verschiedenen Biokonversionskomponenten ausgehend von den von Kühn eingesetzten Konzentrationen optimiert (Kühn 2004).

In den Vorversuchen wurden die Raum-Zeit-Ausbeuten von D-Mannose von $11,88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ auf $244,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ erhöht, bei gleichzeitiger Steigerung der TTN von 48,78 auf 158,73 Zyklen. Die TTN war damit höher, als für andere etablierte NADP(H)-Regenerierungsmethoden beschrieben, wie z. B. die für die *batch* Produktion von (R)-Phenylethanol mit einer durch Protein *Engineering* in ihrer Aktivität und Stabilität verbesserten Variante der Phosphit Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* und *in situ*-Cosubstrat-Regenerierung mit Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* mit einer TTN von 100 Zyklen (Johannes et al. 2007).

Da bei effizienten Syntheseprozessen die Produkt-Konzentrationen hoch und die Konzentration der Enzyme und Coenzyme niedrig sein sollen, wurde im Verlauf der Vorversuche der AFR-Gehalt von 32 U/ml auf 15,2 U/ml und der GDH-Gehalt von 30 U/ml auf 5 U/ml reduziert (Chisti 1998). Die letzte Biokonversion von 4 mmol D-Glucoson wurde mit einer Enzym-Rate von 3:1 (AFR-A13G:GDH) und einer D-Glucoson-zu-D-Glucose-Rate von 1:1,3 durchgeführt und war nach 3,5 h quantitativ abgeschlossen.

2.2 Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson

Da mit der bisher in Biokonversionen von D-Glucoson eingesetzten HPLC-Säule die Separation sämtlicher Komponenten der Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson nicht gewährleistet war, musste zunächst empirisch eine geeignete HPLC-Säule gefunden und die Flussrate des Fließmittels und die Einstellungsparameter des Integrators ermittelt werden (Carinhas 2011; Larrosa 2008; Lee und Gilmore 2006). Es zeigte sich, dass alle Reaktionsbestandteile durch die Rezex RHM Monosaccharid H⁺-Säule mit einem Fluss von 0,25 ml/min und einem Papiervorschub von 6 mm/min erfolgreich durchgeführt werden konnten.

Bei Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson wurde die AFR-Konzentration auf 16 U/ml erhöht, um die im Vergleich zu D-Glucoson leicht reduzierte katalytische Effizienz der AFR-A13G für dieses Substrat auszugleichen. Die Enzym-Rate wurde auf 3,2:1 (AFR:GDH) gesteigert. Außerdem wurde die D-Glucosemenge um 1 mmol reduziert, um die mit D-Glucoson etablierten Produkt-Reinigungsmethoden an die erhöhten Anforderungen bei der Umsetzung von 6-Deoxy-D-glucoson anzupassen. Denn bei der Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR-A13G entstehen 55 mol% 6-Deoxy-D-glucose, die in der nachfolgenden GOx/Katalase-Reaktion zu 6-Deoxy-D-gluconsäure oxidiert und mittels Ionenaustauscher entfernt werden müssen. Die Biokonversion von 4 mmol 6-Deoxy-D-Glucoson, die mit einer Enzym-Rate von 3,2:1 durchgeführt wurde, war ebenfalls nach 3,5 h quantitativ abgeschlossen, die leicht reduzierte katalytische Effizienz der AFR für dieses Substrat konnte also durch die Erhöhung der Enzymmenge um 5,3% erfolgreich kompensiert werden.

Die Zyklenanzahl betrug für alle Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson analog der Vorversuche mit D-Glucoson 158,73. Die Raum-Zeit-Ausbeute der beiden Epimere 6-Deoxy-D-glucose und D-Rhamnose mit AFR-A13G betrug analog zu den Vorversuchen mit D-Glucoson 222,37 g·L⁻¹·d⁻¹, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von 100,1 g·L⁻¹·d⁻¹ für D-Rhamnose entsprach.

Bei den Biokonversionen von 6-Deoxy-D-glucoson ist die durch ortsgerichtete Mutagenese generierte Separationsmutante AFR-A13G-M31V hervorzuheben. Da nach 3,4 h 3,97 mmol des 6-Deoxy-D-glucosons umgesetzt waren, war die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Variante vergleichbar zur AFR-A13G, bei der die Reduktion nach 3,5 h quantitativ abgeschlossen war. AFR-A13G-M31V verfügte jedoch über eine veränderte Selektivität, es wurden 8 mol % mehr D-Rhamnose gebildet als durch die AFR-A13G.

Im Gegensatz dazu wurden bei der durch *error prone*-PCR generierten thermostabilsten Variante AFR-G13A-M31V lediglich 36,2 mol% D-Rhamnose gebildet. Die verschiedenen Mol-Verhältnisse der Ausgangsvarianten im Vergleich zu den in dieser Arbeit erzeugten Mutanten zeigt Tabelle 32.

Tabelle 32: Selektivität ausgewählter AFR-Varianten. Gezeigt ist der Anteil gebildeter D-Rhamnose bei der Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson in mol%. *: Kühn et al. 2006

Variante	AFR-Variante/Quelle	D-Rhamnose [mol%]
AFR-G13A	Wildtyp-AFR aus <i>S. morelense</i> S-30.7.5	45*
AFR-A13G	ortsgerichtete Mutagenese (Kühn 2004)	45
AFR-G13A-M31V	<i>error prone</i> -PCR (d. A.)	36
AFR-A13G-M31V	ortsgerichtete Mutagenese (d. A.)	53

Damit konnte Methionin 31 als ein *hot spot* für die Selektivität der durch AFR gebildeten Epimere identifiziert werden (Reetz et al. 2007). Bei der Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch die Wildtyp-AFR (AFR-G13A) und die Variante AFR-A13G wurden 55 mol% 6-Deoxy-D-glucose gebildet. Während der Austausch von M31V in Kombination mit G13A zu 64 mol% 6-Deoxy-D-glucose führte und sich somit negativ auf die D-Rhamnose-Ausbeute auswirkte, wurden mit der Kombination von M31V und A13G 53 mol% D-Rhamnose gebildet. Diese Aminosäureaustausche führten vermutlich zu einer Verschiebung des NADP(H) in der *finger-print*-Region und in der Folge zu einer veränderten Ausrichtung des Substrates in der direkt benachbarten Substratbindestelle, so dass das Hydrid vom Nicotinamidring des Cosubstrats über den Säure-Basen-Katalysator Histidin 180 vermehrt axial (D-Rhamnose) oder äquatorial (6-Deoxy-D-glucose) auf die C2-Carbonylgruppe des Substrates übertragen werden könnte (Dambe et al. 2006).

Zur Verbesserung der Selektivität von Enzymen wurden die Methoden der gerichteten Evolution ebenfalls schon eingesetzt, wobei auch hier *relais effects* von distal gelegenen Aminosäureaustauschen beschrieben wurden (Bornscheuer und Pohl 2001; Jaeger et al. 2001; Jaeger und Eggert 2002; Liebeton et al. 2000; Reetz et al. 1997; Reetz et al. 2007; Reetz und Jaeger 2002).

Im Vergleich zu dem von Kühn verwendeten *in situ*-Cosubstrat-Regenerierungssystem mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) wurde in dieser Arbeit ein System etabliert, das eine auf 330% erhöhte *Total Turnover Number* für NADP(H) und damit eine gesteigerte Wirtschaftlichkeit besitzt. Die TTN dieses Systems könnte zukünftig noch weiter gesteigert werden, z. B. durch die systematische Reduktion der eingesetzten NADP⁺-Konzentration oder durch die in der Literatur dokumentierte Methode des *substrate feeds*. Mit GDH aus *Pseudomonas spec.* wurde ein sehr vielversprechendes NADP(H)-Regenerationssystem im Vergleich zu etablierten enzymatischen Systemen entwickelt (Johannes et al. 2007). Außerdem wurde die Variante AFR-A13G-M31V generiert, die aufgrund ihrer Reaktionsgeschwindigkeit und des zugunsten der D-Rhamnose-Synthese verschobenen Epimerverhältnisses über ein großes Potenzial für den Einsatz in Biokonversionen von D-Rhamnose verfügt.

Zukünftig könnte an der in dieser Arbeit als *hot spot* der D-Rhamnose-Synthese identifizierten Position 31 eine ortsgerichtete Sättigungsmutagenese durchgeführt werden. Durch den Austausch des Methionin 31 gegen alle 20 proteinogenen Aminosäuren könnten Varianten generiert werden, die sich bei der Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson durch einen noch höheren Epimerenüberschuss zugunsten der D-Rhamnose auszeichnen.

2.3 Produkt-Reinigung

Ziel war es, die in Biokonversionen durch AFR gebildete D-Rhamnose durch physikalisch-chemische Verfahren von den anderen Komponenten zu separieren und so ihre Reinheit und Konzentration zu steigern (Chisti 1998; Liu et al. 2004). Beim Design der Produkt-Reinigung müssen empirisch aus einer Vielzahl zur Verfügung stehender Methoden, wie Fest-Flüssig-Separationen, Membran-Separationen (z. B. Ultrafiltration), Extraktionen, chromatographischen Methoden (z. B. Ionenaustausch-Chromatographie) und thermalen Operationen (z. B. Lyophilisierung) für jede Produkt-Reinigung die geeignetsten Verfahren selektiert und diese in möglichst wenig individuellen Prozessschritten ausgeführt werden, um eine hohe Produkt-Ausbeute zu gewährleisten (Chisti und Moo-Young 1990; Chisti und Moo-Young 1991; Gyure 1992; Snowman 1988; Wheelwright 1991).

Auch die Schritte der Produkt-Reinigung wurden zunächst in Vorversuchen mit D-Mannose optimiert. Die fünf in dieser Arbeit etablierten Separationsschritte aus zweimaliger Ultrafiltration, GOx/Katalase-Reaktion, gemischtem Ionenaustauscher und Lyophilisierung stellten zwei Schritte weniger dar, als standardmäßig bei Biosynthesen durchgeführt werden (Chisti 1998). Durch Verwendung der GOx aus *Aspergillus niger* entfällt ein zusätzlicher Schritt der Produkt-Reinigung, da das Enzym nicht nur D-Glucose zu D-Gluconat, sondern auch mit einer relativen Aktivität von 10% die bei der Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR gebildete 6-Deoxy-D-glucose zu 6-Deoxy-D-gluconat oxidierte, das im Anschluss einfach durch Ionenaustauscher entfernt werden konnte (Pazur und Kleppe 1964). In den Vorversuchen mit D-Mannose konnte zudem gezeigt werden, dass GOx und Katalase unter den gewählten Reaktionsparametern (Enzyme umgepuffert in 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,0), 30°C, 300 rpm, 1 L/min Sauerstoff, Titration mit 2 M NaOH) innerhalb von 2 Stunden nicht inaktiviert wurden. Dies stimmte mit den in der Literatur beschriebenen hohen Enzymstabilitäten überein. Danach besaß die GOx aus *A. niger* bei 30°C und pH 6,0 – pH 7,0 nach 24 h noch 80% - 100% Restaktivität (Hartmeier und Tegge 1979). Die Rinderleber-Katalase ist aufgrund ihres Ursprungs bei 37°C über einen langen Zeitraum stabil, es konnte sogar gezeigt werden, dass sie nach 45 min bei 60°C noch 40% ihrer Ausgangsaktivität besitzt und in einem pH-Bereich von 4,0 – 8,5 konstant ist (Chance 1952; Zeng et al. 2011).

Da in den Vorversuchen getrennte Anionen- und Kationenaustauscher ineffektiv zur Entfernung von D-Gluconat, NADP(H) und BisTris waren und gleichzeitig eine große Menge des

Produkts D-Mannose absorbiert wurde (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Reinigung der D-Rhamnose durch gemischten Ionenaustauscher. Nach 10-minütiger Inkubation der Biokonversionsansätze waren D-Gluconat, NADP(H) und BisTris nicht mehr detektierbar und 81% des Produktes lagen gelöst vor. Durch Verwendung des gemischten Ionenaustauscher-Harzes war ein zusätzlicher Reinigungsschritt weniger nötig.

Die Separationseffizienz ist dann am höchsten, wenn die aufeinanderfolgenden Trennmethode auf unterschiedlichen physikalischen bzw. chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten basieren (Chisti 1998). Deshalb wurden in dieser Arbeit die verschiedenen Bestandteile sowohl mittels Ultrafiltration nach ihrem Molekulargewicht als auch durch gemischten Ionenaustauscher nach ihrer Ladung getrennt. Die im ersten Schritt der Reinigung stattfindende Trennung von festen und flüssigen Komponenten, hier durch Ultrafiltration, stimmt mit der typischen Vorgehensweise bei *large scale* Produkt-Reinigungen überein (Chisti und Moo-Young 1991).

Da die Stabilität eines Produktes während der Reinigung durch viele Faktoren negativ beeinflusst werden kann, wie z. B. durch abbauende Enzyme, mechanische Kräfte, mikrobielle Kontamination, Oxidantien oder andere denaturierende Chemikalien, sollte die Expositionsdauer unter diesen Bedingungen minimiert werden (Chisti 1998; Chisti und Moo-Young 1994). Deshalb wurden alle Reinigungsschritte der D-Rhamnose direkt nacheinander durchgeführt und die ersten vier Reinigungsschritte waren nach 2,7 h abgeschlossen. Beim anschließenden Einfrieren der D-Rhamnose bei -70°C mit nachfolgender Lyophilisierung wurden viele der oben angeführten potenziell destabilisierenden Faktoren inaktiviert, weshalb die eintägige Inkubation im Lyophilisator keine Auswirkungen auf die D-Rhamnose-Stabilität zeigte.

Die Wirtschaftlichkeit der durchgeführten Produkt-Reinigung musste ebenfalls beachtet werden, um eine spätere Übertragung der etablierten Reinigungsschritte in einen größeren Maßstab gewährleisten zu können.

Primär hängen die Produktionskosten eines biologisch hergestellten Produktes von den Substratkosten ab (Deckwer 1995; Hermann und Patel 2007). Durch die von toroma organics Ltd. durchgeführten Synthesewege konnte D-Rhamnose ausgehend von D-Glucose synthetisiert werden. Da die Kosten für D-Glucose mit ca. 20 €/kg (Stand 08/2011) vernachlässigbar gering sind und aufgrund des Cosubstrat-Regenerierungssystems mit GDH aus *Pseudomonas spec.* nur stöchiometrische Mengen von NADP(H) eingesetzt werden mussten, machten die Kosten der Produktreinigung einen Großteil der Gesamtkosten aus. Chisti und Mitarbeiter zeigten, dass in Syntheseprozessen die Kosten der Produkt-Reinigung sogar bis zu 80% der Gesamtkosten des Prozesses ausmachen konnten (Chisti 1998). Auch aus diesem Grund wurde die Anzahl der Reinigungsschritte auf das Minimum beschränkt. Eine weitere Reduktion der Kosten wurde durch den Einsatz von Polysulfon-Membranen zur Ultrafiltration

erreicht, die regeneriert werden konnten und deshalb nur selten ausgetauscht werden mussten. Solche Polymer-Membranen werden auch bei *large-scale* Produkt-Reinigungen bevorzugt eingesetzt (Chisti 1998). Dabei wurde für die Ultrafiltrationsmembran allgemein ein spezifischer Energieverbrauch von 5 kWh/m³ berechnet, der damit geringer ist als z. B. für Nanofiltrationsmembranen (7 kWh/m³) oder Membranen für die reverse Osmose (9 kWh/m³) (Xiu und Zeng 2008). Auch das Harz des gemischten Ionenaustauschers konnte in wenigen einfachen Schritten regeneriert werden. Der in der Literatur dokumentierte Nachteil einer häufigen Regeneration des Austauscher-Harzes durch dessen niedrige Selektivität und Kapazität wurde aufgrund des vorherigen Entfernens der Proteine aus der Lösung umgangen (Xiu und Zeng 2008). Zusätzliche Kostensenkung wurde durch die Verwendung der Katalase aus Rinderleber erreicht, da dieses Enzym kostengünstig ist und in der Arbeitsgruppe bereits seit einigen Jahren erfolgreich zur Entfernung von H₂O₂ eingesetzt wurde. Ein solches Retrofitting eines existierenden Prozesses, bei dem in dieser Arbeit lediglich die Oxidase (Pyranose-2-Oxidase gegen GOx) ausgetauscht wurde, ist viel ökonomischer, als die Etablierung eines neuen Prozesses, besonders, um zeitnah Ergebnisse zu erhalten. Die Antikorrosion der Ausstattung durch Acidität des Ansatzes z. B. durch das in der GOx/Katalase-Reaktion gebildete D-Gluconat und 6-Deoxy-D-gluconat wurde durch Titration des pHs zwischen 6,5 und 7,0 verhindert. Damit wurde ein Hauptproblem der *large scale* Produkt-Reinigungen vermieden (Liu et al. 2004).

Es wurde eine kosten- und zeiteffiziente Produkt-Reinigung entwickelt, mit der es möglich war, die in Biokonversionen mit AFR gebildete D-Rhamnose von allen anderen Komponenten zu reinigen. Die Reinheit der D-Rhamnose wurde durch DC, HPLC und ¹³C- bzw. ¹H-NMR bestätigt.

Die in dieser Arbeit etablierte Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson durch AFR mit *in situ*-Cosubstrat-Regenerierung durch GDH und die nachfolgenden Schritte der Produkt-Reinigung besitzen aufgrund ihrer Effektivität zur Synthese und Reinigung der D-Rhamnose und ihrer Kosteneffizienz prinzipiell das Potential zur Übertragung in einen größeren Maßstab. Außerdem könnten beide Verfahren zur Synthese anderer seltener Zucker oder wichtiger Vorstufen seltener Zucker durch AFR eingesetzt werden.

V Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die biokatalytische Synthese von D-Mannose und D-Rhamnose durch zwei Redoxreaktionen entwickelt werden. Zuerst wurden D-Glucose/6-Deoxy-D-glucose mit Pyranose-2-Oxidase zu D-Glucoson/6-Deoxy-D-glucoson umgesetzt. Nach Reinigung wurden beide Osone mit 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR) aus *S. morelense* S-30.7.5. zu D-Mannose/D-Rhamnose reduziert. Da AFR NADPH-abhängig ist, wurde ein Cosubstrat-Regenerierungssystem mit Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas spec.* etabliert. Im Vergleich zu Regenerierungen mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde die Zyklenzahl auf 325% gesteigert. Es wurden $244 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ D-Mannose synthetisiert.

Dieses System ist die erste dokumentierte quantitative Biokonversion von 6-Deoxy-D-glucoson mit AFR. Durch Glucose-Oxidase aus *A. niger* und gemischten Ionenaustauscher konnte die D-Rhamnose anschließend mit einer Ausbeute von 72% gereinigt werden.

Für einen effizienteren Einsatz der AFR sollte ihre Thermostabilität erhöht werden. Durch iterative Sättigungsmutagenese wurden die Aminosäureaustausche K207P, E208P und E330V eingeführt, die die T_{50}^{10} um $12,5^\circ\text{C}$ auf $49,2^\circ\text{C}$ erhöhten. Mittels *error prone*-PCR entstand die Variante AFR-G13A-M31V mit einer T_{50}^{10} von $46,6^\circ\text{C}$.

Der durch ortsgeriichtete Mutagenese innerhalb der *fingerprint*-Region erzeugte Austausch M31V führte bei der Reduktion von 6-Deoxy-D-glucoson zu einer um 8 mol% erhöhten Ausbeute an D-Rhamnose bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ und einer T_{50}^{10} von $44,9^\circ\text{C}$.

VI Abstract

In this work the biocatalytic synthesis of D-mannose and D-rhamnose should be developed via two redox reactions. First, D-glucose/6-deoxy-D-glucose were oxidized with pyranose-2-oxidase to D-glucosone/6-deoxy-D-glucosone. After their purification, both osones were reduced to D-mannose/D-rhamnose with 1,5-anhydro-D-fructose reductase (AFR) from *S. morelense* S-30.7.5.. Since AFR is NADPH-dependent, a cosubstrate regeneration system with glucose dehydrogenase from *Pseudomonas spec.* was established. Compared to the regeneration with glucose-6-phosphate dehydrogenase, the number of NADPH-regeneration cycles raised to 325%. Besides 244 g·L⁻¹·d⁻¹ D-mannose were synthesized.

This system is the first documented quantitative bioconversion of 6-deoxy-D-glucosone with AFR. By glucose oxidase from *A. niger* and mixed bed ion exchanger, D-rhamnose was subsequently purified with a yield of 72%.

For a more efficient application of the enzyme its thermostability should be increased. The amino acid substitutions K207P, E208P and E330V, which were introduced by iterative saturation mutagenesis, enhanced AFR's T_{50}^{10} by 12.5°C up to 49.2°C. The variant AFR-G13A-M31V was generated via *error prone*-PCR and reached a T_{50}^{10} of 46.6°C.

The exchange M31V that is located within AFR's fingerprint region was then introduced by site-directed mutagenesis and resulted in an 8% molar increment of D-rhamnose during the reduction of 6-deoxy-D-glucosone, with a space-time yield of 94 g·L⁻¹·d⁻¹ and a T_{50}^{10} of 44.9°C.

VII Literaturverzeichnis

Abraham, S. N., J. P. Babu, C. S. Giampapa, D. L. Hasty, W. A. Simpson, and E. H. Beachey. 1985. Protection against *Escherichia coli*-induced urinary tract infections with hybridoma antibodies directed against type 1 fimbriae or complementary D-mannose receptors. *Infect. Immun.* 48:625-628.

Aebi, M., A. Helenius, B. Schenk, R. Barone, A. Fiumara, E. G. Berger, T. Hennet, T. Imbach, A. Stutz, C. Bjursell, A. Uller, J. G. Wahlstrom, P. Briones, E. Cardo, P. Clayton, B. Winchester, V. Cormier-Dalre, L. P. de, M. Cuer, T. Dupre, N. Seta, K. T. de, L. Dorland, L. F. de, L. Kupers et al.. 1999. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj. J* 16:669-671.

Agarwal, P. K., S. R. Billeter, P. T. Rajagopalan, S. J. Benkovic, and S. Hammes-Schiffer. 2002. Network of coupled promoting motions in enzyme catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:2794-2799.

Aita, T., N. Hamamatsu, Y. Nomiya, H. Uchiyama, Y. Shibanaka, and Y. Husimi. 2002. Surveying a local fitness landscape of a protein with epistatic sites for the study of directed evolution. *Biopolymers* 64:95-105.

Allen, M. J., P. M. Coutinho, and C. F. Ford. 1998. Stabilization of *Aspergillus awamori* glucoamylase by proline substitution and combining stabilizing mutations. *Protein Eng* 11: 783-788.

Alper, J. 2001. Searching for medicine's sweet spot. *Science* 291:2338-2343.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Anastas, P. and J. Warner. 1998. Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press.

Andersen, S. M., I. Lundt, J. Marcussen, and S. Yu. 2002. 1,5-Anhydro-D-fructose; a versatile chiral building block: biochemistry and chemistry. *Carbohydr. Res.* 337:873-890.

Archana, M. 2009. Stabilization of cytochrome c reductase using osmolytes. Masterarbeit. National Institute of Technology, Rourkela. Indien.

Arnold, F. H. 2001. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409:253-257.

Arnold, F. H. and J. C. Moore. 1997. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 58:1-14.

Arnold, F. H., P. L. Wintrode, K. Miyazaki, and A. Gershenson. 2001. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* 26:100-106.

Arsenault, T., D. W. Hughes, D. B. MacLean, W. A. Szarek, A. M. Kropinski, and J. S. Lam. 1990. Structural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Can. J. Chem.* 69:1273-1280.

- Asako, H., M. Shimizu, and N. Itoh. 2008.** Engineering of NADPH-dependent aldo-keto reductase from *Penicillium citrinum* by directed evolution to improve thermostability and enantioselectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:805-812.
- Asano, T., K. Ishihara, T. Morota, S. Takeda, and M. Aburada. 2003.** Permeability of the flavonoids liquiritigenin and its glycosides in licorice roots and davidigenin, a hydrogenated metabolite of liquiritigenin, using human intestinal cell line Caco-2. *J. Ethnopharmacol.* 89: 285-289.
- Bannwarth, M., S. Bastian, D. Heckmann-Pohl, F. Giffhorn, and G. E. Schulz. 2004.** Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora sp.*. *Biochemistry* 43:11683-11690.
- Bartsch, S., R. Kourist, and U. T. Bornscheuer. 2008.** Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47:1508-1511.
- Barzegar, A., A. A. Moosavi-Movahedi, J. Z. Pedersen, and M. Miroliaei. 2009.** Comparative thermostability of mesophilic and thermophilic alcohol dehydrogenases: stability-determining roles of proline residues and loop conformations. *Enzyme Microb. Technol.* 45:73-79.
- Bastian, S. 2005.** Herstellung von Pyranose-2-Oxidase Enzymvarianten mit erhöhter Reaktivität und Stabilität. Dissertation. Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Deutschland.
- Bastian, S., M. J. Rekowski, K. Witte, D. M. Heckmann-Pohl, and F. Giffhorn. 2005.** Engineering of pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea* towards improved thermostability and catalytic efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:654-663.
- Bauté, M. A., R. Bauté, and G. Deffieux. 1988.** Fungal enzymic activity degrading 1,4-a-D-glucans to 1,5-D-anhydrofructose. *Phytochem.* 27:3403.
- Bauté, M. A., G. Deffieux, and R. Bauté. 1986.** Bioconversion of carbohydrates to unusual pyrone compounds in fungi: occurrence of microthecin in morels. *Phytochem.* 25:1473.
- Bauté, M. A., G. Deffieux, R. Bauté, A. Badoc, J. Vercauteren, J. M. Leger, and A. Neveu. 1991.** Fungal enzymic activity degrading 1,4-a-D-glucans to echinosporin (5-Epipentomycin I). *Phytochem.* 5:1423.
- Bauté, M. A., G. Deffieux, J. Vercauteren, R. Bauté, and A. Badoc. 1993.** Fungal enzymic activity degrading 1,4-a-D-glucans to ascopyrones P and T in *Pezizales* and *Tuberales*. *Phytochem.* 33:41-45.
- Beeby, M., B. D. O'Connor, C. Ryttersgaard, D. R. Boutz, L. J. Perry, and T. O. Yeates. 2005.** The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS. Biol.* 3:e309.
- Bellamacina, C. R. 1996.** The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J* 10:1257-1269.
- Bergmeyer, H. U. 1983.** *Methods of enzymatic analysis.*, 3 ed. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bergmeyer, H. U. and K. Gawehn. 1977.** *Grundlagen der enzymatischen Analyse.* Verlag Chemie, Weinheim.
- Berrocal, A., J. Baeza, J. Rodríguez, M. Espinosa, and J. Freer. 2004.** Effect of tree age on variation of *Pinus radiata* D. Don chemical composition. *J Chil Chem Soc* 49:252-256.

- Bilyy, R., Y. Kit, U. Hellman, V. Tryndyak, V. Kaminsky, and R. Stoika. 2005.** *In vivo* expression and characteristics of novel alpha-D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells. *Cell Biol. Int.* 29:920-928.
- Birktoft, J. J.; and L. J. Banaszak. 1983.** The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 258:472-482.
- Birnboim, H. C. 1983.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-255.
- Bogin, O., M. Peretz, Y. Hacham, Y. Korkhin, F. Frolow, G. Kalb, and Y. Burstein. 1998.** Enhanced thermal stability of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase after strategic substitution of amino acid residues with prolines from the homologous thermophilic *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase. *Protein Sci.* 7:1156-1163.
- Bornscheuer, U. T. and M. Pohl. 2001.** Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:137-143.
- Brandley, B. K. and R. L. Schnaar. 1986.** Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response. *J. Leukoc. Biol.* 40:97-111.
- Brechtel, E., A. Huwig, and F. Giffhorn. 2002.** L-glucitol catabolism in *Stenotrophomonas maltophilia* *Ac. Appl. Environ. Microbiol.* 68:582-587.
- Breuer, M., K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Sturmer, and T. Zelinski. 2004.** Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 43:788-824.
- Broberg, A., L. Kenne, and M. Pedersen. 1999.** Analysis of 1,5-anhydro-D-fructose, microthecin, and 4-deoxy-glycero-hexo-2,3-diulose in algae using gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal. Biochem.* 268:35-42.
- Bucior, I. and M. M. Burger. 2004.** Carbohydrate-carbohydrate interaction as a major force initiating cell-cell recognition. *Glycoconj. J* 21:111-123.
- Buse, J. B., J. L. Freeman, S. V. Edelman, L. Jovanovic, and J. B. McGill. 2003.** Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark): a short-term glycemic marker. *Diabetes Technol. Ther.* 5: 355-363.
- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce. 1992.** Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2:28-33.
- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce. 1994.** Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* 3:S136-S140.
- Cano, A., J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, M. Acosta, and M. B. Arnao. 1998.** An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* 9:196-202.
- Carinhas, N. E. B. 2011.** Systems biotechnology of Baculovirus-producing insect cells. Dissertation. Universidade Nova de Lisboa. Lissabon, Portugal.
- Carr, R., M. Alexeeva, A. Enright, T. S. Eve, M. J. Dawson, and N. J. Turner. 2003.** Directed evolution of an amine oxidase possessing both broad substrate specificity and high enantioselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 42:4807-4810.

- Cerantola, S. and H. Montrozier. 1997.** Structural elucidation of two polysaccharides present in the lipopolysaccharide of a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Eur. J Biochem* 246:360-366.
- Chan, C. H., T. H. Yu, and K. B. Wong. 2011.** Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding. *PLoS. One.* 6:e21624.
- Chance, B. 1952.** Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase. *J. Biol. Chem.* 194:471-481.
- Chang, G., Y. Tatsu, T. Goto, H. Imaishi, and K. Morigaki. 2010.** Glucose concentration determination based on silica sol-gel encapsulated glucose oxidase optical biosensor arrays. *Talanta* 83:61-65.
- Chang, W. W. 2010.** The development of an implantable enzyme glucose sensor. Dissertation. University of New Mexico. New Mexiko, USA.
- Chen, K. and F. H. Arnold. 1993.** Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:5618-5622.
- Chen, K. Q., A. C. Robinson, M. E. Van Dam, P. Martinez, C. Economou, and F. H. Arnold. 1991.** Enzyme engineering for nonaqueous solvents. II. Additive effects of mutations on the stability and activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnol. Prog.* 7:125-129.
- Chenault, H. K., L. F. Chafin, and S. Liehr. 1998.** Kinetic chiral resolutions of 1,2-diols and desymmetrization of glycerol catalyzed by glycerol kinase. *J. Org. Chem.* 63:4039-4045.
- Chenault, H. K. and G. M. Whitesides. 1987.** Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol* 14:147-197.
- Cherry, J. R. and A. L. Fidantsef. 2003.** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol* 14:438-443.
- Cherry, J. R., M. H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones, and A. H. Pedersen. 1999.** Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17:379-384.
- Chica, R. A., N. Doucet, and J. N. Pelletier. 2005.** Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol* 16:378-384.
- Chirumamilla, R. R., R. Muralidhar, R. Marchant, and P. Nigam. 2001.** Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol. Cell Biochem.* 224:159-168.
- Chisti, Y. 1998.** Strategies in downstream processing., pp. 3-30 *In G. Subramanian* [ed.], *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook.* Wiley-VCH, New York.
- Chisti, Y. and M. Moo-Young. 1990.** Large scale protein separations: engineering aspects of chromatography. *Biotechnol. Adv.* 8:699-708.
- Chisti, Y. and M. Moo-Young. 1991.** Fermentation technology: bioprocessing, scale-up and manufacture., pp. 167-209 *In V. Moses and R. E. Cape* [eds.], *Biotechnology: the science and the business.* Harwood Academic Publishers, New York.

- Chiu, W. C., J. Y. You, J. S. Liu, S. K. Hsu, W. H. Hsu, C. H. Shih, J. K. Hwang, and W. C. Wang. 2006.** Structure-stability-activity relationship in covalently cross-linked N-carbamoyl D-amino acid amidohydrolase and N-acylamino acid racemase. *J. Mol. Biol.* 359:741-753.
- Choi, E. J. and S. L. Mayo. 2006.** Generation and analysis of proline mutants in protein G. *Protein Eng Des Sel* 19:285-289.
- Chothia, C. 1975.** Structural invariants in protein folding. *Nature* 254:304-308.
- Chothia, C. and A. V. Finkelstein. 1990.** The classification and origins of protein folding patterns. *Annu. Rev. Biochem.* 59:1007-1039.
- Cosgrove, M. S., C. Naylor, S. Paludan, M. J. Adams, and H. R. Levy. 1998.** On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 37:2759-2767.
- Cramer, A., S. A. Raillard, E. Bermudez, and W. P. Stemmer. 1998.** DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391:288-291.
- Creighton, T. E. 1993.** *Proteins*. W. H. Freeman & Co.
- Currie, H. L., J. Lightfoot, and J. S. Lam. 1995.** Prevalence of *gca*, a gene involved in synthesis of A-band common antigen polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 2:554-562.
- Dalby, P. A. 2007.** Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Pat Biotechnol* 1:1-9.
- Dambe, T. R., A. M. Kühn, T. Brossette, F. Giffhorn, and A. J. Scheidig. 2006.** Crystal structure of NADP(H)-dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochemistry* 45:10030-10042.
- Daniel, R. M. 1996.** The upper limits of enzyme thermostability. *Enzyme Microb. Technol.* 19:74-79.
- Danneel, H. J., E. Rossner, A. Zeeck, and F. Giffhorn. 1993.** Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products. *Eur. J. Biochem.* 214(3):795-802.
- De Wildeman, S. M., T. Sonke, H. E. Schoemaker, and O. May. 2007.** Biocatalytic reductions: from lab curiosity to "first choice". *Acc. Chem. Res.* 40:1260-1266.
- Deckwer, W. D. 1995.** Microbial conversion of glycerol production to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:143-149.
- DeGraft-Hanson, J. A. and J. L. Heath. 1990.** Effect of D-mannose on motility, presence of flagella, and attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to chicken skin cells. *Poult. Sci.* 69:1404-1409.
- Delbrück, H. 2003.** Thermostabilität und funktionelle Vielfalt ubiquitärer Proteinfaltungsdomänen. Dissertation. Freie Universität Berlin. Berlin, Deutschland.
- Delcourt, M.** Systematic directed mutagenesis method. [027471]. 2006.
Ref Type: Patent
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M.**

- D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P. H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides, and R. Overbeek. 2002.** The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99:443-448.
- Dorscheid, S. 2005.** Optimierung der katalytischen Effizienzen der Pyranose-2-Oxidase aus *Peniophora gigantea* für das Substrat 2-Desoxy-D-glucose durch ortsgerichtete und Zufallsmutagenese. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Deutschland.
- Dorscheid, S. 2009.** Molekulare Evolution der Pyranose-2-Oxidase aus *Peniophora gigantea* zur effizienten Anwendung in der Biokatalyse. Dissertation. Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Deutschland.
- Dove, A. 2001.** The bittersweet promise of glycobiology. Nat. Biotechnol 19:913-917.
- Drueckhammer, D. G., W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas, C. M. Gautheron, T. Krach, and C. H. Wong. 1991.** Enzyme catalysed in synthetic chemistry. Synthesis 7:499-525.
- Dwek, R. A. 1996.** Glycobiology: toward understanding the function of sugars. Chem. Rev. 96:683-720.
- Ekholm, F. 2012.** Episodes in carbohydrate chemistry: from b-linked mannosides to glycoconjugates. Dissertation. Abo Akademi University. Abo, Finland.
- Elsser, D., A. J. Morgan, S. Yu, and L. V. Thomas. 2003.** Ascopyrone: Antimicrobial agent. US Pat. Appl. 20030203963.
- Falk, U. B. 1999.** Glucose-Oxidase-haltige Liposomen zur Therapie der septischen Granulomatose. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Freiburg, Deutschland.
- Fauré, R., T. C. Shiao, D. Lagnoux, D. Giguere, and R. Roy. 2007.** *En route* to a carbohydrate-based vaccine against *Burkholderia cepacia*. Org. Biomol. Chem. 5:2704-2708.
- Fersht, A. R. and L. Serrano. 1993.** Principles of protein stability derived from protein engineering experiments. Curr. Opin. Struct. Biol. 3:75-83.
- Finkelstein, A. V. and O. B. Ptitsyn. 1987.** Why do globular proteins fit the limited set of folding patterns? Prog. Biophys. Mol. Biol. 50:171-190.
- Fontana, A., V. De Filippis, P. Poverino de Laureto, E. Scaramella, and M. Zambonin. 1998.** Rigidity of thermophilic enzymes., pp. 277-294 *In* A. Ballesteros [ed.], Stability and stabilisation of biocatalysts. Elsevier Science, München.
- Freeze, H. H. and V. Sharma. 2010.** Metabolic manipulation of glycosylation disorders in humans and animal models. Semin. Cell Dev. Biol. 21:655-662.
- Freimund, S., A. Huwig, F. Giffhorn, and S. Köpper. 1998.** Rare Keto-Aldoses from Enzymatic Oxidation: Substrates and Oxidation Products of Pyranose 2-Oxidase. Chem. Eur. J 4: 2442-2455.
- Freimund, S. and S. Köpper. 2004.** The composition of 2-keto aldoses in organic solvents as determined by NMR spectroscopy. Carbohydr. Res. 339:217-220.
- Fry, A. J., S. B. Sobolov, M. D. Leonida, and K. I. Voivodov. 1994.** Electroenzymatic synthesis (regeneration of NADH coenzyme) - use of nafion ionexchange films for immobilization of enzyme and redox mediator. Tetrahedron Lett. 35:5607-5610.

- Gallivan, J. P. and D. A. Dougherty. 1999.** Cation- π interactions in structural biology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:9459-9464.
- Gastmeier, P. and C. Geffers. 2008.** Nosocomial infections in Germany. What are the numbers, based on the estimates for 2006? Dtsch. Med. Wochenschr. 133:1111-1115.
- Giffhorn, F. 2000.** Fungal pyranose oxidases: occurrence, properties and biotechnical applications in carbohydrate chemistry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54:727-740.
- Giffhorn, F. 2011.** DBU AZ 13195-32 Abschlussbericht.
- Giffhorn, F., S. Kopper, A. Huwig, and S. Freimund. 2000.** Rare sugars and sugar-based synthons by chemo-enzymatic synthesis. Enzyme Microb. Technol. 27:734-742.
- Giraud, M. F. and J. H. Naismith. 2000.** The rhamnose pathway. Curr. Opin. Struct. Biol. 10:687-696.
- Giver, L., A. Gershenson, P. O. Freskgard, and F. H. Arnold. 1998.** Directed evolution of a thermostable esterase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95:12809-12813.
- Glieder, A., E. T. Farinas, and F. H. Arnold. 2002.** Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. Nat. Biotechnol 20:1135-1139.
- Goldberg, K., K. Schroer, S. Lutz, and A. Liese. 2007.** Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:237-248.
- Gromiha, M. M. and S. Selvaraj. 1999.** Importance of long-range interactions in protein folding. Biophys. Chem. 77:49-68.
- Guex, N. and M. C. Peitsch. 1997.** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18:2714-2723.
- Gussow, D. and T. Clackson. 1989.** Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 17:4000.
- Gyure, D. C. 1992.** Set realistic goals for cross-flow filtration. Chem. Eng. Prog. 88:60-66.
- Hamamatsu, N., T. Aita, Y. Nomiya, H. Uchiyama, M. Nakajima, Y. Husimi, and Y. Shibana. 2005.** Biased mutation-assembling: an efficient method for rapid directed evolution through simultaneous mutation accumulation. Protein Eng Des Sel 18:265-271.
- Hamamatsu, N., Y. Nomiya, T. Aita, M. Nakajima, Y. Husimi, and Y. Shibana. 2006.** Directed evolution by accumulating tailored mutations: thermostabilization of lactate oxidase with less trade-off with catalytic activity. Protein Eng Des Sel 19:483-489.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Hanahan, D., J. Jessee, and F. R. Bloom. 1991.** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Methods Enzymol. 204:63-113.
- Haney, P., J. Konisky, K. K. Koretke, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. 1997.** Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus *Methanococcus*. Proteins 28:117-130.

- Hanson, R. L., M. D. Schwinden, A. Banerjee, D. B. Brzozowski, B. C. Chen, B. P. Patel, C. G. McNamee, G. A. Kodersha, D. R. Kronenthal, R. N. Patel, and L. J. Szarka. 1999.** Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine. *Bioorg. Med. Chem.* 7:2247-2252.
- Hanukoglu, I. and T. Gutfinger. 1989.** cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur. J Biochem* 180:479-484.
- Hao, J. and A. Berry. 2004.** A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents. *Protein Eng Des Sel* 17:689-697.
- Härd, T. 2011.** Protein engineering to stabilize soluble amyloid beta-protein aggregates for structural and functional studies. *FEBS J.* 278:3884-3892.
- Harrison, D. H., K. M. Bohren, D. Ringe, G. A. Petsko, and K. H. Gabbay. 1994.** An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry* 33:2011-2020.
- Hartmeier, W. and G. Tegge. 1979.** Versuche zur Glucoseoxidation in Glucose-Fructose-Gemischen mittels fixierter Glucoseoxidase und Katalase. *Starch* 31:348-353.
- Hartree, E. F. 1972.** Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422-427.
- Hatzinikolaou, D. G., O. C. Hansen, B. J. Macris, A. Tingey, D. Kekos, P. Goodenough, and P. Stougaard. 1996.** A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:371-381.
- He, D. and C. N. Falany. 2006.** Characterization of proline-serine-rich carboxyl terminus in human sulfotransferase 2B1b: immunogenicity, subcellular localization, kinetic properties, and phosphorylation. *Drug Metab Dispos.* 34:1749-1755.
- Head, K. A. 2008.** Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract. *Altern. Med. Rev.* 13:227-244.
- Heinzelmann, P., C. D. Snow, I. Wu, C. Nguyen, A. Villalobos, S. Govindarajan, J. Minshull, and F. H. Arnold. 2009.** A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *PNAS.* 106(14):5610-5615.
- Hermann, B. G. and M. Patel. 2007.** Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: a techno-economic analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136:361-388.
- Hibbert, E. G., F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley, and P. A. Dalby. 2005.** Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol. Eng* 22:11-19.
- Hickman, J. and G. Ashwell. 1966.** Isolation of a bacterial lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* containing 3-acetamido-3,6-dideoxy-D-galactose and D-rhamnose. *J Biol. Chem.* 241:1424-1428.
- Horsman, G. P., A. M. Liu, E. Henke, U. T. Bornscheuer, and R. J. Kazlauskas. 2003.** Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl-3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl-3-phenylbutyrate. *Chemistry.* 9:1933-1939.
- Hoseki, J., A. Okamoto, N. Takada, A. Suenaga, N. Futatsugi, A. Konagaya, M. Taiji, T. Yano, S. Kuramitsu, and H. Kagamiyama. 2003.** Increased rigidity of domain structures en-

hances the stability of a mutant enzyme created by directed evolution. *Biochemistry* 42: 14469-14475.

Hummel, W. 1997. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol* 58:145-184.

Hummel, W. 1999. Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol* 17:487-492.

Huwig, A., H. J. Danneel, and F. Giffhorn. 1994. Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea*. *J. Biotechnol* 32:309-315.

Iffland, A., P. Tafelmeyer, C. Saudan, and K. Johnsson. 2000. Directed molecular evolution of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 39:10790-10798.

Jaeger, K. E. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.

Jaeger, K. E., T. Eggert, A. Eipper, and M. T. Reetz. 2001. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:519-530.

Jaeger, K. E. and M. T. Reetz. 2000. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:68-73.

Jaeger, K. E., M. T. Reetz, and B. W. Dijkstra. 2002. Directed evolution to produce enantioselective biocatalysts. *ASM News* 68:556-562.

Jaeken, J., H. Carchon, and H. Stibler. 1993. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: pre-Golgi and Golgi disorders? *Glycobiology* 3:423-428.

Jaenicke, R. 1981. Enzymes under extremes of physical conditions. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10:1-67.

Jaenicke, R. and G. Böhm. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:738-748.

Jessel, M. A., M. A. Hynes, and J. Dodd. 1990. Carbohydrates and carbohydrate binding proteins in the nervous systems: Expression and possible functions. *Ann. Rev. Neurosci.* 13: 227-255.

Jez, J. M., M. J. Bennett, B. P. Schlegel, M. Lewis, and T. M. Penning. 1997. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 326 (Pt 3):625-636.

Johannes, T. W., R. D. Woodyer, and H. Zhao. 2007. Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.* 96:18-26.

Johnson, J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:80-128.

Jones, J. B. 1986. Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron* 42:3351-3403.

Joo, H. 1999. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation.

Kametani, S., Y. Shiga, and H. Akanuma. 1996. Hepatic production of 1,5-anhydrofructose and 1,5-anhydroglucitol in rat by the third glycogenolytic pathway. *Eur. J. Biochem.* 242:832-838.

- Karplus, P. A. and G. E. Schulz. 1985.** Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72:212-213.
- Kenklies, J. 2004.** Walk Through Rekombination: Entwicklung einer neuen Methode zur homologen *in vitro* Rekombination und Optimierung des diagnostischen Enzyms Creatinase. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle, Deutschland.
- Kieser, T. 1984.** Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12:19-36.
- Kikuchi, M., K. Ohnishi, and S. Harayama. 1999.** Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene* 236:159-167.
- Kim, M. S., J. D. Weaver, and X. G. Lei. 2008.** Assembly of mutations for improving thermostability of *Escherichia coli* AppA2 phytase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79:751-758.
- Kleiger, G., and D. Eisenberg. 2002.** GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C(alpha)-H...O hydrogen bonds and van der waals interactions. *J. Mol. Biol.* 323:69-76.
- Kleppet, K. 1966.** The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 5:139-143.
- Kneidinger, B., M. Graninger, G. Adam, M. Puchberger, P. Kosma, S. Zayni, and P. Messner. 2001.** Identification of two GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductases synthesizing GDP-D-rhamnose in *Aneurinibacillus thermoaerophilus* L420-91T. *J. Biol. Chem.* 276: 5577-5583.
- Knirel, Y. A., G. M. Zdrovenko, A. S. Shashkov, N. Y. Gubanov, L. M. Yakovleva, and R. I. Gvozdyak. 1988.** Antigenic polysaccharides of bacteria. 27. Structure of the O-specific polysaccharide chain of lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* 2399, *phaesolica* 120a and *Pseudomonas holci* 8299 belonging to serotype VI. *Bioorg. Chim.* 14:92-99.
- Knowler, W. C. 1994.** Screening for NIDDM. Opportunities for detection, treatment, and prevention. *Diabetes Care* 17:445-450.
- Kocharova, N. A., Y. A. Knirel, G. Widmalm, P. E. Jansson, and A. P. Moran. 2000.** Structure of an atypical O-antigen polysaccharide of *Helicobacter pylori* containing a novel monosaccharide 3-C-methyl-D-mannose. *Biochemistry* 39:4755-4760.
- Konishi, Y., K. Hashima, and K. Kishida. 2000.** Increases in 1,5-anhydroglucitol levels in germinating amaranth seeds and in ripening banana. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 64:2462-2465.
- Kragl, U., W. Kruse, W. Hummel, and C. Wandrey. 1996.** Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. *Biotechnol. Bioeng.* 52:309-319.
- Kragl, U., D. Vasic-Racki, and C. Wandrey. 1992.** Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen. *Chem. Ing. Tech.* 64:499-509.
- Kriechbaum, M., H. J. Heilmann, F. J. Wientjes, M. Hahn, K. D. Jany, H. G. Gassen, F. Sharif, and G. Alaeddinoglu. 1989.** Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *FEBS Lett.* 255:63-66.
- Krieger, E., G. Koraimann, and G. Vriend. 2002.** Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - a self-parameterizing force field. *Proteins* 47:393-402.

- Kuchner, O. and F. H. Arnold. 1997.** Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* 15:523-530.
- Kühn, A., S. Yu, and F. Giffhorn. 2006.** Catabolism of 1,5-anhydro-D-fructose in *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5: discovery, characterization, and overexpression of a new 1,5-anhydro-D-fructose reductase and its application in sugar analysis and rare sugar synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1248-1257.
- Kühn, A. M. 2004.** 1,5-Anhydro-D-fruktose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5.: Isolierung, Charakterisierung, Überexpression in *E. coli* sowie Verwendung als neuer Biokatalysator. Dissertation. Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Deutschland.
- Kumar, M., K. K. Kannan, M. V. Hosur, N. S. Bhavesh, A. Chatterjee, R. Mittal, and R. V. Hosur. 2002.** Effects of remote mutation on the autolysis of HIV-1 PR: X-ray and NMR investigations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:395-401.
- Kumar, S., C. J. Tsai, and R. Nussinov. 2000.** Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* 13:179-191.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larrosa, J. A. E. 2008.** New heuristics for global optimization of complex bioprocesses. Dissertation. Universidade de Vigo. Vigo, Spanien.
- Lee, K. A., H. Fuda, Y. C. Lee, M. Negishi, C. A. Strott, and L. C. Pedersen. 2003.** Crystal structure of human cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in the presence of pregnenolone and 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate. Rationale for specificity differences between prototypical SULT2A1 and the SULT2BG1 isoforms. *J. Biol. Chem.* 278:44593-44599.
- Lee, K. M. and D. F. Gilmore. 2006.** Statistical experimental design for bioprocess modeling and optimization analysis: repeated-measures method for dynamic biotechnology process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 135:101-116.
- Lee, L. G. and G. M. Whitesides. 1985.** Enzyme-catalyzed organic synthesis: a comparison of strategies for *in situ* regeneration of NAD from NADH. *J. Am. Chem. Soc.* 107:6999-7008.
- Lehmann, M., C. Loch, A. Middendorf, D. Studer, S. F. Lassen, L. Pasamontes, A. P. van Loon, and M. Wyss. 2002.** The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng* 15:403-411.
- Lehmann, M., L. Pasamontes, S. F. Lassen, and M. Wyss. 2000.** The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1543:408-415.
- Lei, X.** Phosphatases with improved phytase activity. [US 2003/0072844 A1]. 2003.
Ref Type: Patent
- Leung, D. W., E. Y. Chen, and D. V. Goeddel. 1989.** A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* [1]:11-15.
- LiCata, V. J. and G. K. Ackers. 1995.** Long-range, small magnitude nonadditivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry* 34:3133-3139.

- Lichtenthaler, F. W. and S. Peters. 2004.** Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. *CR Chimie* 7:65-90.
- Liebeton, K., A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, and K. E. Jaeger. 2000.** Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* 7:709-718.
- Lightfood, J. and J. S. Lam. 1993.** Chromosomal mapping, expression and synthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for guanosine diphospho (GDP)-D-mannose. *Mol. Microbiol.* 8:771-782.
- Lin, S. S., O. Miyawaki, and K. Nakamura. 1999.** Continuous production of L-carnitine with NADH regeneration by a nanofiltration membrane reactor with coimmobilized L-carnitine dehydrogenase and glucose dehydrogenase. *J Biosci. Bioeng.* 87:361-364.
- LiPuma, J. J. 2000.** Expanding microbiology of pulmonary infection in cystic fibrosis. *Pediatr. Infect. Dis. J* 19:473-474.
- Lisdat, F. and U. Wollenberger. 1998.** Trienzyme amplification system for the detection of catechol and catecholamines using internal co-substrate regeneration. *Analytical Letters* 31:1275-1285.
- Liu, J., L. T. Fan, P. Seib, F. Friedler, and B. Bertok. 2004.** Downstream process synthesis for biochemical production of butanol, ethanol, and acetone from grains: generation of optimal and near-optimal flowsheets with conventional operating units. *Biotechnol. Prog.* 20:1518-1527.
- Liu, W., S. Zhang, and P. Wang. 2009.** Nanoparticle-supported multi-enzyme biocatalysis with *in situ* cofactor regeneration. *J. Biotechnol.* 139:102-107.
- Liu, C. C., and X. S. Ye. 2012.** Carbohydrate-based cancer vaccines: target cancer with sugar bullets. *Glycoconj. J.* 29(5-6):259-271.
- Longo, M. A. and D. Combes. 1997.** Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J Biotechnol* 58:21-32.
- Lu, W., M. Oberthur, C. Leimkuhler, J. Tao, D. Kahne, and C. T. Walsh. 2004.** Characterization of a regiospecific epivancosaminyl transferase GtfA and enzymatic reconstitution of the antibiotic chloroeremomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:4390-4395.
- Luo, G., and T. G. Mitchell. 2002.** Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2860-2865.
- Ma, B. G., A. Goncarenco, and I. N. Berezovsky. 2010.** Thermophilic adaptation of protein complexes inferred from proteomic homology modeling. *Structure.* 18:819-828.
- Ma, Y. F., D. E. Evans, S. J. Logue, and P. Langridge. 2001.** Mutations of barley beta-amylase that improve substrate-binding affinity and thermostability. *Mol. Genet. Genomics* 266:345-352.
- MacArthur, M. W. and J. M. Thornton. 1991.** Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218:397-412.
- Mäki, M., N. Jarvinen, J. Rabina, C. Roos, H. Maaheimo, and R. Renkonen. 2002.** Functional expression of *Pseudomonas aeruginosa* GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose reductase which synthesizes GDP-rhamnose. *Eur. J. Biochem.* 269:593-601.

- Markovitz, A. 1962.** Isolation of D-talomethylose (6-deoxy-D-talose) and D-rhamnose (6-deoxy-D-mannose) from capsular polysaccharide of a gram-negative bacterium. *J. Biol. Chem.* 237:1767-1771.
- Matthews, B. W. 1993.** Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem.* 62:139-160.
- Matthews, B. W., H. Nicholson, and W. J. Becktel. 1987.** Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:6663-6667.
- May, O., P. T. Nguyen, and F. H. Arnold. 2000.** Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol* 18:317-320.
- Menendez-Arias, L. and P. Argos. 1989.** Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in alpha-helices. *J Mol. Biol.* 206:397-406.
- Merz, A., M. C. Yee, H. Szadkowski, G. Pappenberger, A. Cramer, W. P. Stemmer, C. Yanofsky, and K. Kirschner. 2000.** Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39:880-889.
- Michaels, E. K., J. S. Chmiel, B. J. Plotkin, and A. J. Schaeffer. 1983.** Effect of D-mannose and D-glucose on *Escherichia coli* bacteriuria in rats. *Urol. Res.* 11:97-102.
- Michal, G. Möllering, H. and J. Siedel. 1983.** Chemical design for indicator reactions in the visible range. In *Methods of enzymatic analysis.*, ed. Bergmeyer HU, Weinheim: Verlag Chemie. 197-232.
- Minagawa, H., H. Kaneko, and J. Shimada. 2002.** Thermostabilization of enzymes for improvement of computer-aided protein engineering. *Nec. Res. Dev.* 43:251-255.
- Minagawa, H., J. Shimada, and H. Kaneko. 2003.** Effect of mutations at Glu160 and Val198 on the thermostability of lactate oxidase. *Eur. J. Biochem.* 270:3628-3633.
- Minagawa, H., Y. Yoshida, N. Kenmochi, M. Furuichi, J. Shimada, and H. Kaneko. 2007.** Improving the thermal stability of lactate oxidase by directed evolution. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 77-81.
- Miyazaki, K. and F. H. Arnold. 1999.** Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.* 49:716-720.
- Miyazaki, K., P. L. Wintrode, R. A. Grayling, D. N. Rubingh, and F. H. Arnold. 2000.** Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* 297:1015-1026.
- Moore, J. C. and F. H. Arnold. 1996.** Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat. Biotechnol* 14:458-467.
- Morita, Y., H. Furui, H. Yoshii, R. Matsuno, and T. Kometani. 1994.** NADP(H) regeneration using ethanol as an energy source in baker's yeast-mediated bioreduction. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77:13-16.
- Morrison, I. M., R. Young, M. B. Perry, and G. A. Adams. 1987.** The exocellular glycan produced by *Myxobacterium* 402. *Canadian Journal of Chemistry* 45:1987-1990.
- Mukhopadhyay, A. 1992.** A novel technique for determining half life of alpha amylase enzyme during liquefaction of starch., pp. 507-510 *Biotechnology techniques.*

- Müller, D. 1928.** Oxidation von Glukose mit Extrakten aus *Aspergillus niger*. Biochem. Z. 199:136-170.
- Nagi, A. D. and L. Regan. 1997.** An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. Fold. Des 2:67-75.
- Némethy, G., S. J. Leach, and H. A. Scheraga. 1966.** The influence of amino acid side chains on the free energy of helix-coil transitions. J. Phys. Chem. 70:998-1004.
- Ness, J. E., M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J. R. Cherry, T. V. Borchert, W. P. Stemmer, and J. Minshull. 1999.** DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. Nat. Biotechnol. 17:893-896.
- Nicholson, H., D. E. Anderson, S. Dao-pin, and B. W. Matthews. 1991.** Analysis of the interaction between charged side chains and the alpha-helix dipole using designed thermostable mutants of phage T4 lysozyme. Biochemistry 30:9816-9828.
- Niehues, R., M. Hasilik, G. Alton, C. Korner, M. Schiebe-Sukumar, H. G. Koch, K. P. Zimmer, R. Wu, E. Harms, K. Reiter, F. K. von, H. H. Freeze, H. K. Harms, and T. Marquardt. 1998.** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. J Clin. Invest 101:1414-1420.
- Nishio, T., Y. Miyake, K. Kuta, M. Yamai, S. Miki, T. Ito, and T. Oku. 1996.** Synthesis of 4-, 6-deoxy, and 4,6-dideoxy derivatives of D-mannose. Carbohydr. Res. 280:357-363.
- Nishiya, Y. and T. Kishimoto. 2009.** Improvement of thermal stability of *Saccharomyces pastorianus* hexokinase by random mutagenesis and a structural interpretation. J. Anal. Bio-Science 32:307-312.
- Numata, K., Y. Hayashi-Iwasaki, J. Kawaguchi, M. Sakurai, H. Moriyama, N. Tanaka, and T. Oshima. 2001.** Thermostabilization of a chimeric enzyme by residue substitutions: four amino acid residues in loop regions are responsible for the thermostability of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 1545:174-183.
- Osman, S. F., W. F. Fett, and K. B. Hicks. 1988.** Structure of the O-antigen of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* strain NPS 3121. Carbohydr. Res. 176:205-210.
- Oue, S., A. Okamoto, T. Yano, and H. Kagamiyama. 1999.** Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non-active site residues. J. Biol. Chem. 274:2344-2349.
- Ovchinnikova, O. G., N. A. Kocharova, A. S. Shashkov, M. Bialczak-Kokot, Y. A. Knirel, and A. Rozalski. 2009.** Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O31 containing an ether of D-mannose with (2R,4R)-2,4-dihydroxypentanoic acid. Carbohydr. Res. 344:683-686.
- Pace, C. N. 2000.** Single surface stabilizer. Nat. Struct. Biol. 7:345-346.
- Pantoliano, M. W., M. Whitlow, J. F. Wood, S. W. Dodd, K. D. Hardman, M. L. Rollence, and P. N. Bryan. 1989.** Large increases in general stability for subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding. Biochemistry 28(18):7205-7213.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, W. C. Nelson, B. Ayodeji, M. Kraul, J. Shetty, J. Malek, S. E. Van Aken, S. Riedmuller, H. Tettelin, S. R. Gill, O. White, S. L. Salzberg, D. L. Hoover, L. E. Lindler, S. M. Halling, S. M. Boyle, and C. M. Fraser. 2002.** The *Brucella*

suis genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99:13148-13153.

Pazur, J. H. and K. Kleppe. 1964. The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Biochemistry 3:578-583.

Perl, D., U. Mueller, U. Heinemann, and F. X. Schmid. 2000. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. Nat. Struct. Biol. 7:380-383.

Peters, J. 1998. Dehydrogenase-characteristics, design of reaction conditions, and application., In H. J. Rehm, G. Reed, and D. R. Kelley [eds.], Biotechnology Vol. 8a Biotransformation I. Wiley-VCH, Weinheim.

Pfennig, N. 1965. Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. Zbl. Abt. , I. Abt. Orig. Suppl. 1:179-189.

Pfennig, N. and K. D. Lippert. 1966. Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Microbiol. 55:245-256.

Pitkänen, E. 1973. Occurrence of 1,5-anhydroglucitol in human cerebrospinal fluid. Clin. Chim. Acta 48:159-166.

Pitkänen, E., O. Pitkänen, and L. Uotila. 1997. Enzymatic determination of unbound D-mannose in serum. Eur. J Clin. Chem Clin. Biochem 35:761-766.

Pitkänen, E. and O. M. Pitkänen. 1992. Renal tubular reabsorption of 1,5-anhydro-D-glucitol and D-mannose *in vivo* in the rat. Pflugers Arch. 420:367-375.

Pollard, D. J. and J. M. Woodley. 2007. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. Trends Biotechnol. 25:66-73.

Powell, K. A., S. W. Ramer, S. B. Del Cardayre, W. P. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, and G. W. Huisman. 2001. Directed evolution and biocatalysis. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 40:3948-3959.

Predki, P. F., V. Agrawal, A. T. Brunger, and L. Regan. 1996. Amino-acid substitutions in a surface turn modulate protein stability. Nat. Struct. Biol. 3:54-58.

Priyakumar, U. D. 2012. Role of hydrophobic core on the thermal stability of proteins - molecular dynamics simulations on a single point mutant of sso7d. J Biomol. Struct. Dyn. 29:961-971.

Radivojac, P., Z. Obradovic, D. K. Smith, G. Zhu, S. Vucetic, C. J. Brown, J. D. Lawson, and A. K. Dunker. 2004. Protein flexibility and intrinsic disorder. Protein Sci. 13:71-80.

Ramachandran, G. N. and V. Sasisekharan. 1968. Conformation of polypeptides and proteins. Adv. Protein Chem. 23:283-438.

Raman, J., K. Sumathy, R. P. Anand, and H. Balaram. 2004. A non-active site mutation in human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase expands substrate specificity. Arch. Biochem. Biophys. 427:116-122.

Ramm, M., M. Lobe, and M. Hamburger. 2003. A simple method for preparation of D-rhamnose. Carbohydr. Res. 338:109-112.

- Reetz, M. T., M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, and A. Vogel. 2005.** Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44:4192-4196.
- Reetz, M. T. and J. D. Carballeira. 2007.** Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* 2:891-903.
- Reetz, M. T., J. D. Carballeira, and A. Vogel. 2006a.** Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:7745-7751.
- Reetz, M. T. and K. E. Jaeger. 2002.** Directed evolution as a means to create enantioselective enzymes for use in organic chemistry., pp. 245-279 *In S. Brakman and K. Johnsson* [eds.], *Directed molecular evolution of proteins or how to improve enzymes for biocatalysis.* Wiley-VCH, Weinheim.
- Reetz, M. T., D. Kahakeaw, and R. Lohmer. 2008.** Addressing the numbers problem in directed evolution. *Chembiochem.* 9:1797-1804.
- Reetz, M. T., D. Kahakeaw, and J. Sanchis. 2009a.** Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis. *Mol. Biosyst.* 5:115-122.
- Reetz, M. T., M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K. E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Bocola, and N. Otte. 2007.** Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *Chembiochem.* 8: 106-112.
- Reetz, M. T., P. Soni, and L. Fernandez. 2009b.** Knowledge-guided laboratory evolution of protein thermostability. *Biotechnol. Bioeng.* 102:1712-1717.
- Reetz, M. T., L. W. Wang, and M. Bocola. 2006b.** Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:1236-1241.
- Reetz, M. T., A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, and K. E. Jaeger. 1997.** Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 36:2830-2832.
- Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, and J. S. Lam. 1999.** Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:523-553.
- Rocchetta, H. L., J. C. Pacan, and J. S. Lam. 1998.** Synthesis of the A-band polysaccharide sugar D-rhamnose requires Rmd and WbpW: identification of multiple AlgA homologues, WbpW and ORF488, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 29:1419-1434.
- Röper, H. 1991.** Selective oxidation of D-glucose: chiral intermediates for industrial utilization., pp. 267-288 *In F. W. Lichtenthaler* [ed.], *Carbohydrates as organic raw materials.* Verlag Chemie, Weinheim.
- Ruppert, R., S. Herrmann, and E. Steckhan. 1987.** Efficient indirect electrochemical *in situ* regeneration of NADH: electrochemical driven enzymatic reduction of pyruvate catalyzed by D-LDH. *Tetrahedron Lett.* 28:6583-6586.
- Sadovskaya, I., J. R. Brisson, P. Thibault, J. C. Richards, J. S. Lam, and E. Altman. 2000.** Structural characterization of the outer core and the O-chain linkage region of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur. J Biochem* 267:1640-1650.

- Saka, S. 2001.** Chemical composition and distribution., pp. 51-82 *In D. N. S. Hon and N. Shiraishi* [eds.], Wood and cellulosic chemistry. Marcel Dekker, New York, USA.
- Sakaguchi, M., M. Matsuzaki, K. Niimiya, J. Seino, Y. Sugahara, and M. Kawakita. 2007.** Role of proline residues in conferring thermostability on aqualysin I. *J. Biochem.* 141:213-220.
- Sakuma, M., S. Kametani, and H. Akanuma. 1998.** Purification and some properties of a hepatic NADPH-dependent reductase that specifically acts on 1,5-anhydro-D-fructose. *J Biochem.* 123:189-193.
- Salit, I. E. and E. C. Gotschlich. 1977.** Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *J Exp. Med.* 146:1169-1181.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:5463-5467.
- Schein, C. H. and H. M. Noteborn. 1988.** Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth and temperature. *Biotechnology* 6:291-294.
- Schiraldi, C. and M. De Rosa 2002.** The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol* 20:515-521.
- Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt. 2001.** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258-268.
- Schmidt, E., W. Hummel, C. Wandrey, and M. R. Kula. 1987.** Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvate using isolated L-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus sp.*, pp. 487-490 *In H. Chmiel, W. P. Hammes, and J. E. Bailey* [eds.], Biochemical - A challenge for interdisciplinary cooperation.
- Schmidt-Dannert, C. 2001.** Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses. *Biochemistry* 40:13125-13136.
- Schroeder, W. A., J. R. Shelton, J. B. Shelton, B. Robberson, G. Apell, R. S. Fang, and J. Bonaventura. 1982.** The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 214:397-421.
- Schumann, J., G. Böhm, G. Schumacher, R. Rudolph, and R. Jaenicke. 1993.** Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis. *Protein Sci.* 2(10):1612-1620.
- Schütte, H., J. Flossdorf, H. Sahm, and M.-R. Kula. 1976.** Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 62:151-160.
- Schütte, H. and M.-R. Kula. 1988.** Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme Microb. Technol.* 10:552-558.
- Scrutton, N. S., A. Berry, M. P. Deonarain, and R. N. Perham. 1990.** Active site complementation in engineered heterodimers of *Escherichia coli* glutathione reductase created *in vivo*. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 242:217-224.

- Seelbach, K., B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, A. M. Egorov, C. Wandrey, and U. Kragl. 1996.** A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Lett.* 37:1377-1380.
- Senchenkova, S. N., A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, J. J. McGovern, and A. P. Moran. 1996.** The O-specific polysaccharide chain of *Campylobacter fetus* serotype B lipopolysaccharide is a D-rhamnan terminated with 3-O-methyl-D-rhamnose (D-acofriose). *Eur. J Biochem* 239:434-438.
- Serrano, L., A. G. Day, and A. R. Fersht. 1993.** Step-wise mutation of barnase to binase. A procedure for engineering increased stability of proteins and an experimental analysis of the evolution of protein stability. *J Mol. Biol.* 233(2):305-312.
- Servo, C. and E. Pitkanen. 1975.** Variation in polyol levels in cerebrospinal fluid and serum in diabetic patients. *Diabetologia* 11:575-580.
- Shao, Z. and F. H. Arnold. 1996.** Engineering new functions and altering existing functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:513-518.
- Shao, Z., H. Zhao, L. Giver, and F. H. Arnold. 1998.** Random-priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 26:681-683.
- Sheldon, R. 1999.** Enzymes. Picking a winner. *Nature* 399:636-637.
- Shiga, Y., S. Kametani, T. Kadokura, and H. Akanuma. 1999.** 1,5-Anhydroglucitol promotes glycogenolysis in *Escherichia coli*. *J Biochem.* 125:166-172.
- Shiga, Y., H. Mizuno, and H. Akanuma. 1993.** Conditional synthesis and utilization of 1,5-anhydroglucitol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175:7138-7141.
- Shih, P. and J. F. Kirsch. 1995.** Design and structural analysis of an engineered thermo-stable chicken lysozyme. *Protein Sci.* 4:2063-2072.
- Shoichet, B. K., W. A. Baase, R. Kuroki, and B. W. Matthews. 1995.** A relationship between protein stability and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:452-456.
- Siddiqui, K. S., A. Poljak, M. Guilhaus, F. D. De, P. M. Curmi, G. Feller, S. D'Amico, C. Gerday, V. N. Uversky, and R. Cavicchioli. 2006.** Role of lysine versus arginine in enzyme cold-adaptation: modifying lysine to homo-arginine stabilizes the cold-adapted alpha-amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Proteins* 64:486-501.
- Smith, A. R., S. E. Zamze, S. M. Munro, K. J. Carter, and R. C. Hignett. 1985.** Structure of the sidechain of lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* C28. *Eur. J Biochem* 149:73-78.
- Snowman, J. W. 1988.** Lyophilization techniques, equipment and practice. *Adv. Biotechnol. Process* 8:315-351.
- Sogabe, A., M. Minami, Y. Sogabe, and S. Emi.** Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas*. [US 5.298.411]. 1994.
Ref Type: Patent
- Somero, G. N. 1975.** Temperature as a selective factor in protein evolution: the adaptational strategy of "compromise". *J. Exp. Zool.* 194:175-188.
- Spek, E. J., A. H. Bui, M. Lu, and N. R. Kallenbach. 1998.** Surface salt bridges stabilize the GCN4 leucine zipper. *Protein Sci.* 7:2431-2437.

- Spiller, B., A. Gershenson, F. H. Arnold, and R. C. Stevens. 1999.** A structural view of evolutionary divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:12305-12310.
- Spillmann, D. 1994.** Carbohydrates in cellular recognition: from leucine-zipper to sugar-zipper? *Glycoconj. J* 11:169-171.
- Sriprapundh, D., C. Vieille, and J. G. Zeikus. 2000.** Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis. *Protein Eng* 13:259-265.
- Steinsiek, S. 2006.** Charakterisierung und Optimierung gel-stabilisierter 2-Phasen-Systeme zur stereospezifischen Reduktion hydrophober Verbindungen mit der Carbonyl-Reduktase aus *Candida parapsilosis*. Dissertation. Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule. Aachen, Deutschland.
- Stemmer, W. P. 1994a.** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:10747-10751.
- Stemmer, W. P. 1994b.** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.
- Stoppok, E., K. Matalla, and K. Buchholz. 1992.** Microbial modification of sugars as building blocks for chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:604-610.
- Stosik, B. 2008.** Untersuchungen zu einem neuartigen Abbauweg der 1,5-Anhydro-D-fructose in Rhizobien an dem Modellorganismus *Sinorhizobium meliloti* 1021, Klonierung und Charakterisierung der beteiligten Enzymsysteme. Dissertation. Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Deutschland.
- Strop, P. and S. L. Mayo. 2000.** Contribution of surface salt bridges to protein stability. *Biochemistry* 39:1251-1255.
- Stryer, L. 2003.** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag.
- Suzuki, Y. 1999.** The proline rule - a strategy for protein thermal stabilization. *Proc. Japan Acad.* 75:133-137.
- Suzuki, Y., K. Oishi, H. Nakano, and T. Nagayama. 1987.** A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:546-551.
- Taguchi, T., M. Haruna, and J. Okuda. 1993.** Effects of 1,5-anhydro-D-fructose on selected glucose-metabolizing enzymes. *Biotechnol Appl. Biochem.* 18 (Pt 3):275-283.
- Taguchi, T., I. Miwa, T. Mizutani, H. Nakajima, Y. Fukumura, I. Kobayashi, M. Yabuuchi, and I. Miwa. 2003.** Determination of D-mannose in plasma by HPLC. *Clin. Chem* 49:181-183.
- Takagi, M., M. Nishioka, H. Kakihara, M. Kitabayashi, H. Inoue, B. Kawakami, M. Oka, and T. Imanaka. 1997.** Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus sp.* strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4504-4510.
- Takano, K., Y. Yamagata, M. Kubota, J. Funahashi, S. Fujii, and K. Yutani. 1999.** Contribution of hydrogen bonds to the conformational stability of human lysozyme: calorimetry and X-ray analysis of six Ser --> Ala mutants. *Biochemistry* 38:6623-6629.

- Takasaki, Y. and C. Matsudo-shi.** Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Mannose. [DE60028783T2]. 2007.
Ref Type: Patent
- Tanase, T., F. Shimizu, S. Yano, and S. Yoshikawa. 1986.** Novel C-2 epimerization of aldoses and stereoselective uptake of one of the epimeric aldoses by nickel(II) complexes. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* 1001-1003.
- Tao, Y., P. A. Pinzon-Arango, A. B. Howell, and T. A. Camesano. 2011.** Oral consumption of cranberry juice cocktail inhibits molecular-scale adhesion of clinical uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med. Food* 14:739-745.
- Tchernychev, B., S. Cabilly, and M. Wilchek. 1997.** The epitopes for natural polyreactive antibodies are rich in proline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:6335-6339.
- Thomas, L. V., S. Yu, R. E. Ingram, C. Refdahl, D. Elsser, and J. Delves-Broughton. 2002.** Ascopyrone P, a novel antibacterial derived from fungi. *J Appl. Microbiol.* 93:697-705.
- Thornton, J. M., B. L. Sibanda, M. S. Edwards, and D. J. Barlow. 1988.** Analysis, design and modification of loop regions in proteins. *Bioessays* 8:63-69.
- Tisoncik, M., S. Hoffmann, and D. Demirjian. 2007.** Synthesis of rare sugar molecules: utilizing fermentation biotechnology for the production of L-Ribose. Dissertation. Illinois Wesleyan University and Zuchem, Inc. Illinois, USA.
- Tobin, M. B., C. Gustafsson, and G. W. Huisman. 2000.** Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:421-427.
- Toyota, S., Y. Fukushi, S. Katoh, S. Orikasa, and Y. Suzuki. 1989.** Anti-bacterial defense mechanism of the urinary bladder. Role of mannose in urine. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 80:1816-1823.
- Tulchin, N., L. Ornstein, and B. J. Davis. 1976.** A microgel system for disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 72:485-490.
- Turner, N. J. 1989.** Recent advances in the use of enzyme-catalysed reactions in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 6:625-644.
- Ueda, T., T. Tamura, Y. Maeda, Y. Hashimoto, T. Miki, H. Yamada, and T. Imoto. 1993.** Stabilization of lysozyme by the introduction of Gly-Pro sequence. *Protein Eng* 6:183-187.
- Van den Burg, B., G. Vriend, O. R. Veltman, G. Venema, and V. G. H. Eijsink. 1998.** Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2056-2060.
- Varley, P. G. and R. H. Pain. 1991.** Relation between stability, dynamics and enzyme activity in 3-phosphoglycerate kinases from yeast and *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* 220: 531-538.
- Vetriani, C., D. L. Maeder, N. Tolliday, K. S. Yip, T. J. Stillman, K. L. Britton, D. W. Rice, H. H. Klump, and F. T. Robb. 1998.** Protein thermostability above 100°C: a key role for ionic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:12300-12305.
- Vieille, C. and J. G. Zeikus. 1996.** Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends Biotechnol.* 14:183-190.
- Vihinen, M. 1987.** Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Eng* 1:477-480.

- Vogt, G. and P. Argos. 1997.** Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? *Fold. Des* 2:S40-S46.
- Vogt, G., S. Woell, and P. Argos. 1997.** Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol.* 269:631-643.
- Voigt, C. A., S. L. Mayo, F. H. Arnold, and Z. G. Wang. 2001.** Computational method to reduce the search space for directed protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:3778-3783.
- Volkov, A. A., Z. Shao, and F. H. Arnold. 1999.** Recombination and chimeragenesis by *in vitro* heteroduplex formation and *in vivo* repair. *Nucleic Acids Res.* 27:e18.
- Wagenlehner, F. M., U. Hoyme, M. Kaase, R. Funfstuck, K. G. Naber, and G. Schmiemann. 2011.** Uncomplicated urinary tract infections. *Dtsch. Arztebl. Int.* 108:415-423.
- Wakabayashi, H., F. Varfaj, J. Deangelis, and P. J. Fay. 2008.** Generation of enhanced stability factor VIII variants by replacement of charged residues at the A2 domain interface. *Blood* 112:2761-2769.
- Wang, Q., J. S. Dordick, and R. J. Linhardt. 2002.** Synthesis and application of carbohydrate-containing polymers. *Chem. Mater.* 14:3232-3244.
- Watanabe, K., K. Chishiro, K. Kitamura, and Y. Suzuki. 1991.** Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.* 266: 24287-24294.
- Watanabe, K., Y. Hata, H. Kizaki, Y. Katsube, and Y. Suzuki. 1997.** The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.* 269:142-153.
- Watanabe, K., T. Masuda, H. Ohashi, H. Mihara, and Y. Suzuki. 1994.** Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur. J. Biochem.* 226:277-283.
- Webb, N. A., A. M. Mulichak, J. S. Lam, H. L. Rocchetta, and R. M. Garavito. 2004.** Crystal structure of a tetrameric GDP-D-mannose 4,6-dehydratase from a bacterial GDP-D-rhamnose biosynthetic pathway. *Protein Sci.* 13:529-539.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412.
- Weckbecker, A. and W. Hummel. 2004.** Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH., *In J. L. Barredo* [ed.], *Methods in Biotechnology, Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Wellens, A., C. Garofalo, H. Nguyen, G. N. Van, R. Slattegard, J. P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, G. H. De, S. Hultgren, and J. Bouckaert. 2008.** Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligo-mannose-3 complex. *PLoS. One.* 3:e2040.
- Wells, J. A. 1990.** Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry* 29:8509-8517.
- Werz, D. B., and P. H. Seeberger. 2005.** Total synthesis of antigen bacillus anthracis tetrasaccharide -- creation of an anthrax vaccine candidate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44(9):6315-6318.

- Wheelwright, S. M. 1991.** Protein purification: design and scale up of downstream processing. Hanser Publishers, New York.
- Whiteside, G. M. and C. H. Wong. 1985.** Enzyme in der organischen Synthese. *Angewandte Chemie* 97:617-638.
- Wierenga, R. K., P. Terpstra, and W. G. Hol. 1986.** Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol. Biol.* 187:101-107.
- Williamson, M. P. 1994.** The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297 (Pt 2):249-260.
- Wilson, R. and A. P. F. Turner. 1992.** Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens. Bioelectron.* 7:165-185.
- Winn, A. M. and S. G. Wilkinson. 1998.** The O7 antigen of *Stenotrophomonas maltophilia* is a linear D-rhamnan with a trisaccharide repeating unit that is also present in polymers for some *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 166:57-61.
- Wintrode, P. L., K. Miyazaki, and F. H. Arnold. 2001.** Patterns of adaptation in a laboratory evolved thermophilic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1549:1-8.
- Wohlfahrt, G., S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz, and H. J. Hecht. 1999.** 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55:969-977.
- Wong, C. H. and G. M. Whitesides. 1994.** Enzymes in synthesis organic chemistry. Pergamon, Elsevier Science Inc., New York.
- Wong, T. S., D. Roccatano, M. Zacharias, and U. Schwaneberg. 2006.** A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J Mol. Biol.* 355: 858-871.
- Wongtrakul, J., R. Udomsinprasert, and A. J. Ketterman. 2003.** Non-active site residues Cys69 and Asp150 affected the enzymatic properties of glutathione S-transferase AdGSTD3-3. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:971-979.
- Wrba, A., A. Schweiger, V. Schultes, R. Jaenicke, and P. Zavodszky. 1990.** Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 29:7584-7592.
- Xie, H., J. Flint, M. Vardakou, J. H. Lakey, R. J. Lewis, H. J. Gilbert, and C. Dumon. 2006.** Probing the structural basis for the difference in thermostability displayed by family 10 xylanases. *J. Mol. Biol.* 360:157-167.
- Xiu, Z. L. and A. P. Zeng. 2008.** Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 917-926.
- Xu, Z., K. Jing, Y. Liu, and P. Cen. 2007.** High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:83-90.
- Yamanouchi, T. and Y. Akanuma. 1994.** Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 24 Suppl:S261-S268.

- Yamanouchi, T., T. Inoue, K. Ichiyanagi, T. Sakai, and N. Ogata. 2003.** 1,5-Anhydroglucitol stimulates insulin release in insulinoma cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1623:82-87.
- Yin, S., F. Ding, and N. V. Dokholyan. 2007.** Modeling backbone flexibility improves protein stability estimation. *Structure*. 15:1567-1576.
- Yoshikuni, Y., V. J. Martin, T. E. Ferrin, and J. D. Keasling. 2006.** Engineering cotton (+)-delta-cadinene synthase to an altered function: germacrene D-4-ol synthase. *Chem. Biol.* 13: 91-98.
- You, L. and F. H. Arnold. 1996.** Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng* 9:77-83.
- Young, L. S., C. H. Yeh, Y. M. Chen, and C. Y. Lin. 1999.** Molecular characterization of *Oryza sativa* 16.9 kDa heat shock protein. *Biochem. J* 344 Pt 1:31-38.
- Yu, H., J. Li, D. Zhang, Y. Yang, W. Jiang, and S. Yang. 2009.** Improving the thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by *error-prone* PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:279-285.
- Yu, S. 2005.** Enzymatic description of the anhydrofructose pathway of glycogen degradation II. Gene identification and characterization of the reactions catalyzed by aldose-2-epimerase that converts 1,5-anhydro-D-fructose to microthecin with ascopyrone M as the intermediate. *Biochim. Biophys. Acta* 1723:63-73.
- Yu, S., T. Ahmad, L. Kenne, and M. Pedersen. 1995.** alpha-1,4-Glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. III. Substrate specificity, mode of action, and cleavage mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1244:1-9.
- Yu, S. and R. Fiskesund. 2006.** The anhydrofructose pathway and its possible role in stress response and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1760:1314-1322.
- Yu, S., L. Kenne, and M. Pedersen. 1993.** Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I. Efficient purification and characterization from red seaweeds. *Biochim. Biophys. Acta* 1156:313-320.
- Yu, S. and M. Pedersen. 1993.** Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen-degrading enzyme. II. Subcellular localization and partial amino-acid sequence. *Planta* 191: 137-142.
- Yutani, K., S. Hayashi, Y. Sugisaki, and K. Ogasahara. 1991.** Role of conserved proline residues in stabilizing tryptophan synthase alpha subunit: analysis by mutants with alanine or glycine. *Proteins* 9:90-98.
- Zarrinpar, A., R. P. Bhattacharyya, and W. A. Lim. 2003.** The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE*. 2003:RE8.
- Zavodszky, P., J. Kardos, Svingor, and G. A. Petsko. 1998.** Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:7406-7411.
- Zehr, B. D., T. J. Savin, and R. E. Hall. 1989.** A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 182:157-159.
- Zeng, H. W., Y. J. Cai, X. R. Liao, F. Zhang, and D. B. Zhang. 2011.** Production, characterization, cloning and sequence analysis of a monofunctional catalase from *Serratia marcescens* SYBC08. *J. Basic Microbiol.* 51:205-214.

Zhang, T., Z. Pan, C. Qian, and X. Chen. 2009. Isolation and purification of D-mannose from palm kernel. *Carbohydr. Res.* 344:1687-1689.

Zhang, X. J., W. A. Baase, and B. W. Matthews. 1991. Toward a simplification of the protein folding problem: a stabilizing polyalanine alpha-helix engineered in T4 lysozyme. *Biochemistry* 30:2012-2017.

Zhao, H. and F. H. Arnold. 1999. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng* 12:47-53.

Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, and F. H. Arnold. 1998. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.* 16:258-261.

Zhou, H. X., R. H. Hoess, and W. F. DeGrado. 1996. *In vitro* evolution of thermodynamically stable turns. *Nat. Struct. Biol.* 3:446-451.

Zhou, Y. H., X. P. Zhang, and R. H. Ebright. 1991. Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 19:6052.

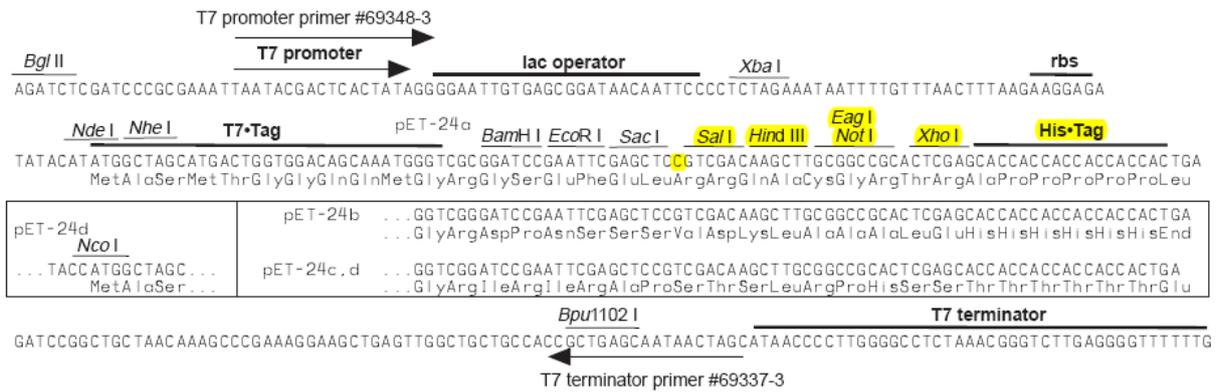
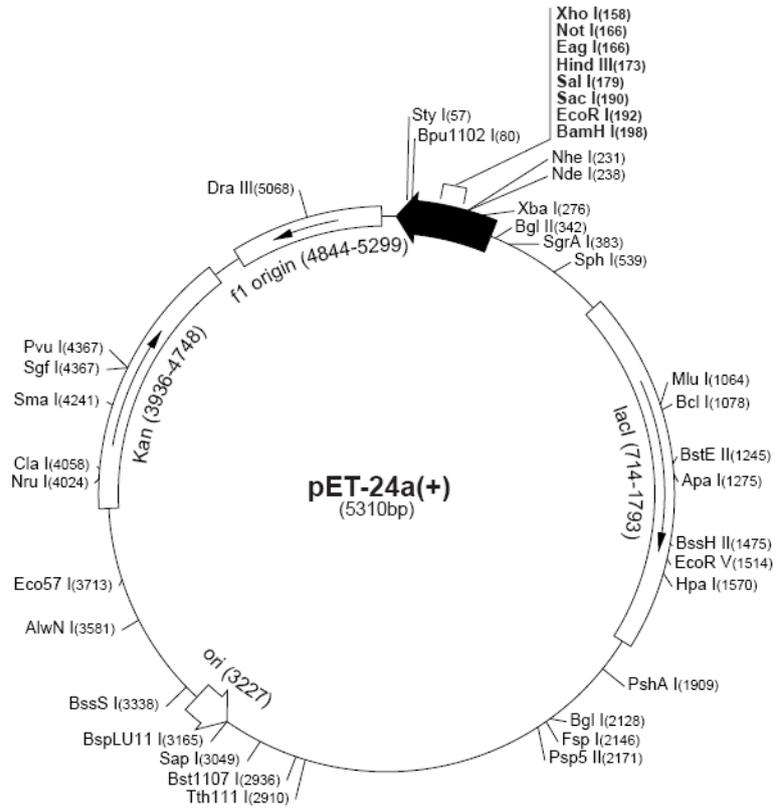
VIII Anhang

1 Verwendete Vektoren

Expressionsvektor pET24a(+)

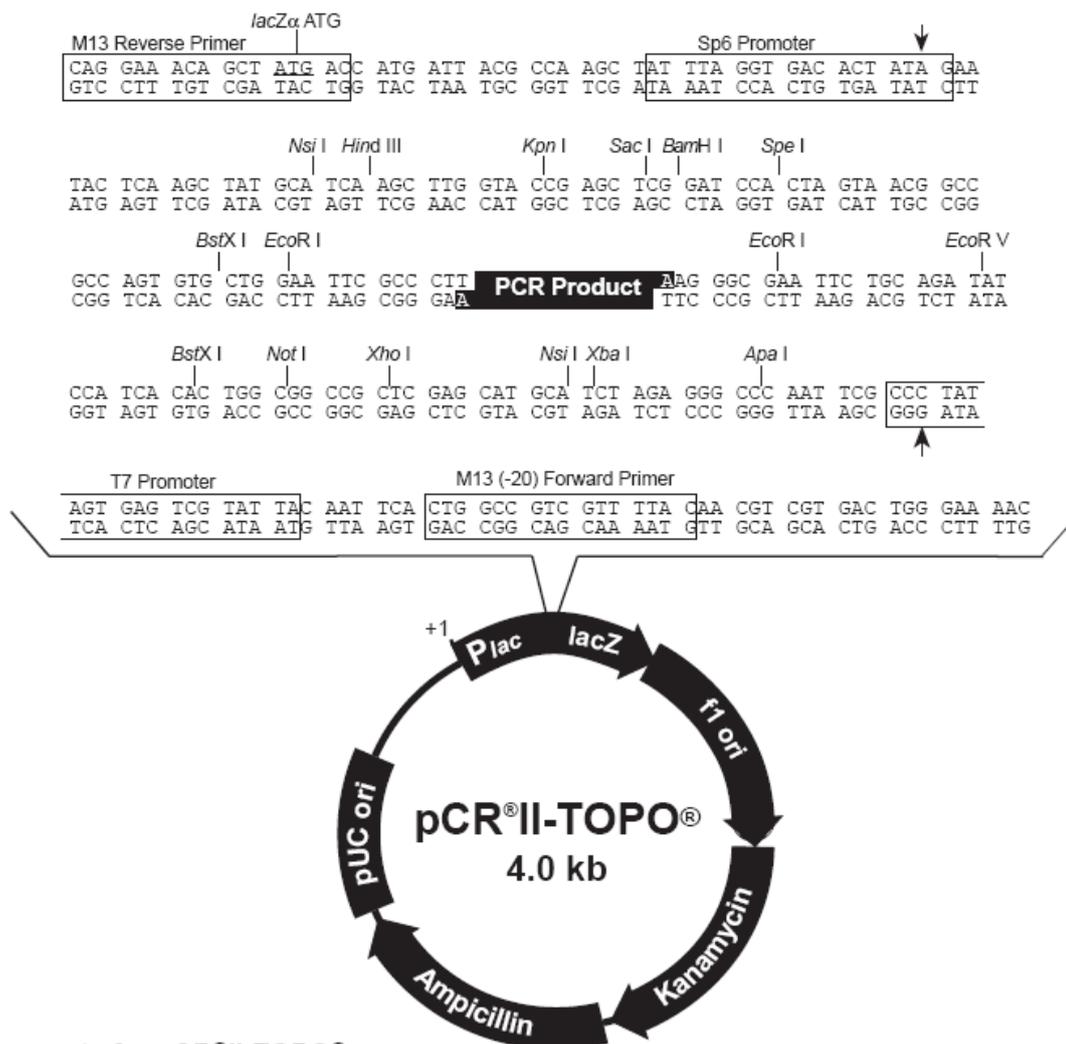
pET-24a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7• Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His• Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
Kan coding sequence	3936-4748
f1 origin	4844-5299

The maps for pET-24b(+), pET-24c(+) and pET-24d(+) are the same as pET-24a(+) (shown) with the following exceptions: pET-24b(+) is a 5309bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24c(+) is a 5308bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24d(+) is a 5307bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-24c(+). An *Nco*I site is substituted for the *Nde*I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-24c(+). As a result, *Nco*I cuts pET24d(+) at 234, and *Nhe*I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-24a(+). *Nde*I does not cut pET-24d(+). Note also that *Sty*I is not unique in pET-24d(+).



pET-24a-d(+) cloning/expression region

Abbildung 73: Vektorkarte von pET24a(+) (Novagen).

pCR[®] II-TOPO[®]-VektorComments for pCR[®]II-TOPO[®]

3973 nucleotides

LacZ α gene: bases 1-589

M13 Reverse priming site: bases 205-221

Sp6 promoter: bases 239-256

Multiple Cloning Site: bases 269-383

T7 promoter: bases 406-425

M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448

f1 origin: bases 590-1027

Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155

Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033

pUC origin: bases 3178-3851

Abbildung 74: Vektorkarte von pCR[®] II-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe).

2 DNA- und Proteinstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter

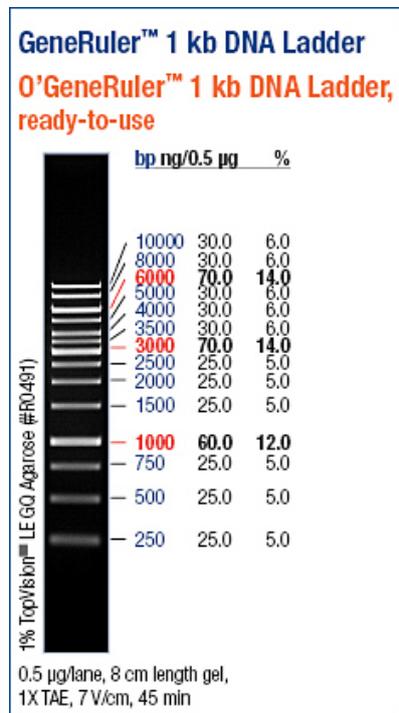


Abbildung 75: GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot).

Protein Leiter 10-200 kDa

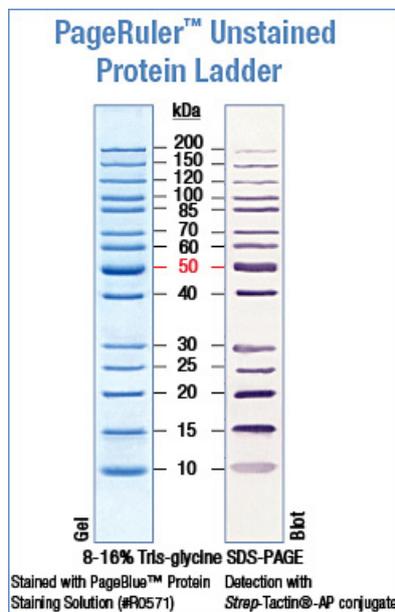


Abbildung 76: Protein-Marker Page Ruler® Unstained Protein Leiter für SDS-PAGE (Fermentas).

Protein-Marker für isoelektrische Fokussierung

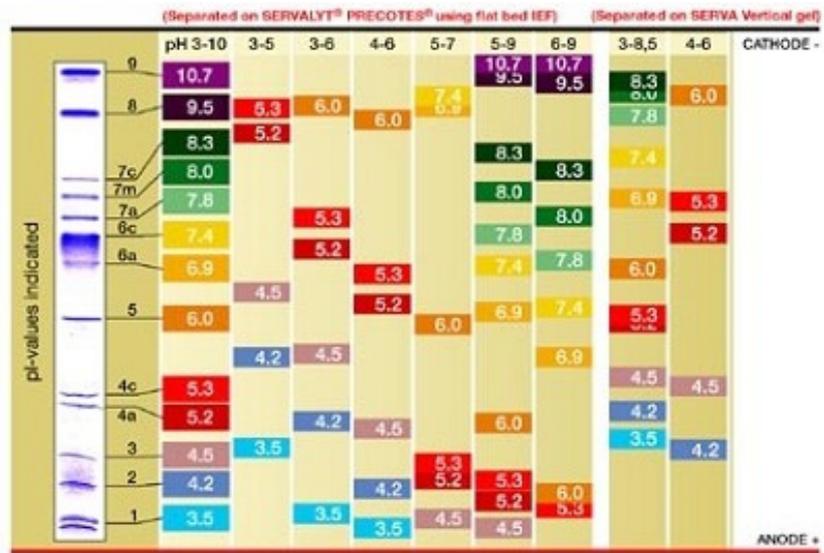


Abbildung 77: Protein-Marker Servalyt™ Precotes™ 3-10 für die isoelektrische Fokussierung (Serva).

3 pH-Optima der AFR-Varianten

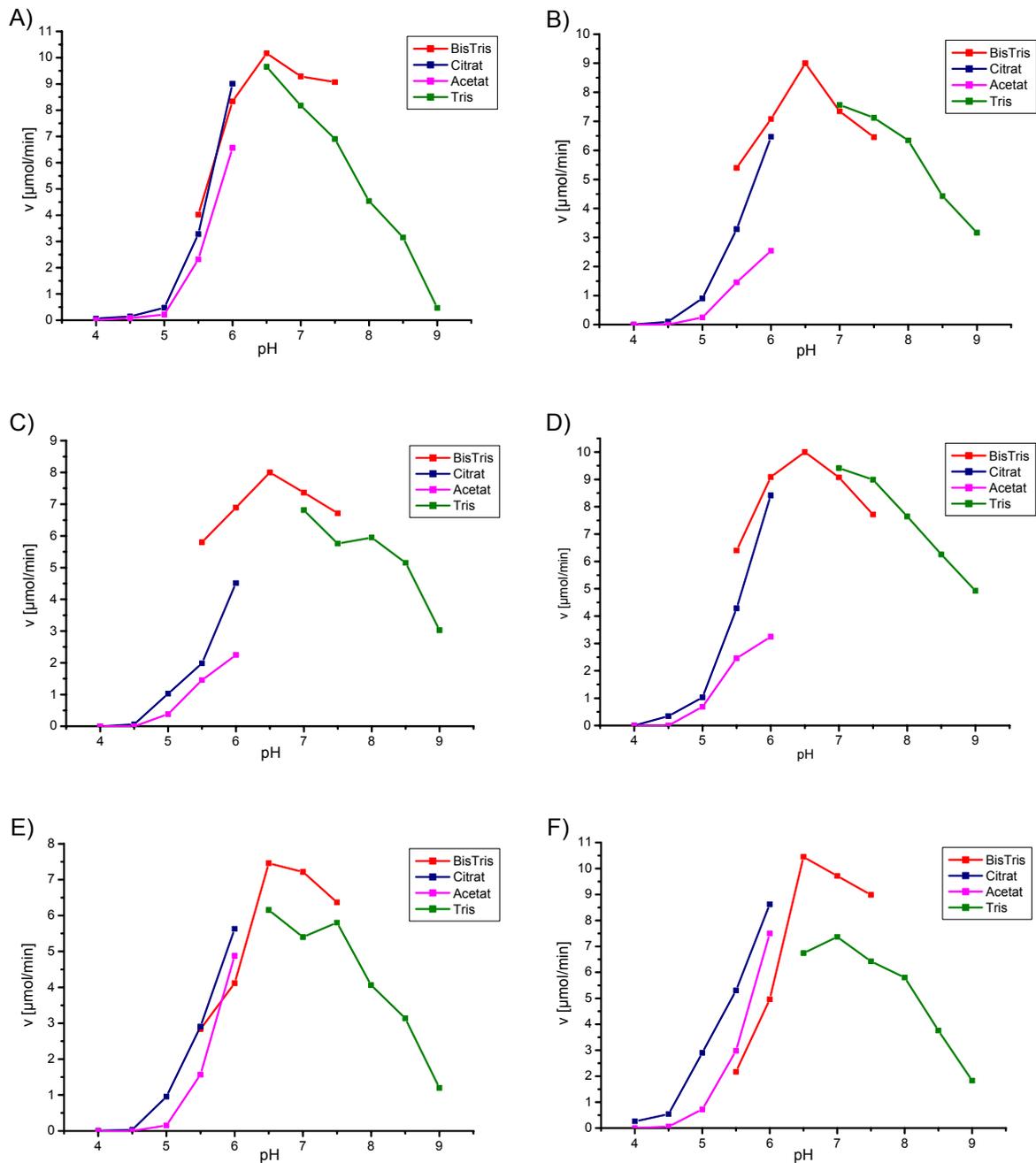


Abbildung 78: pH-Optima der AFR-Varianten. Folgende Puffersysteme wurden für die Messungen verwendet: BisTris von pH 5,5 bis 7,5; Tris von pH 6,5 bis 9,0; Citrat von pH 4,0 bis 6,0 und Acetat von pH 4,0 bis 6,0. In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 7457 U AFR bei 30°C umgesetzt und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt. A) AFR-A13G-K207P-E208P, B) AFR-A13G-E208G-G209C, C) AFR-A13G-E165N-R166K, D) AFR-A13G-G209Q, E) AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G, F) AFR-A13G-M31V.

4 Isoelektrische Fokussierung der AFR-Varianten

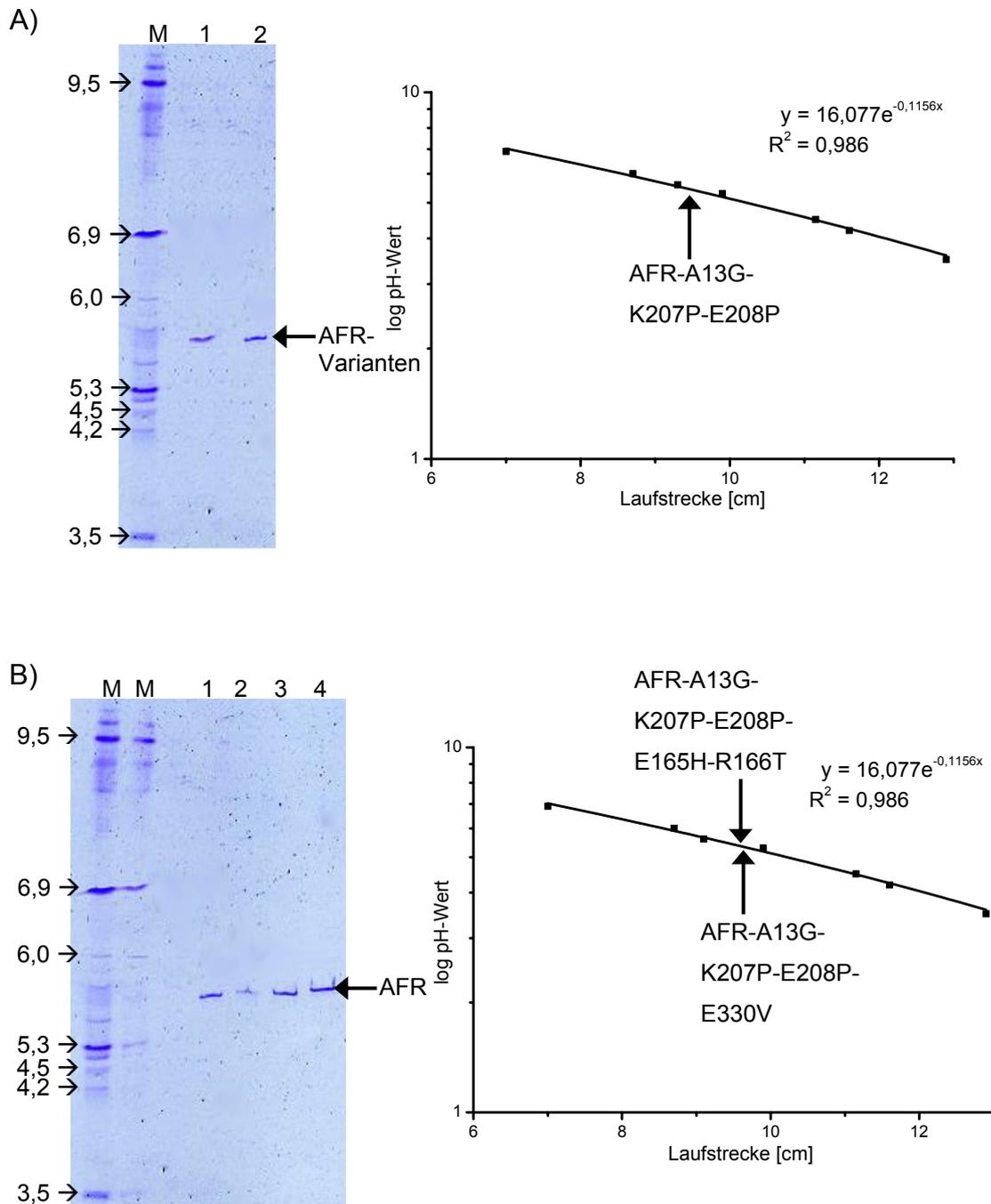


Abbildung 79: Isoelektrische Fokussierung der AFR-Varianten im pH-Bereich von 3 bis 10. Im Servalyt Precotes® Gel (pH 3 – 10) wurden 10 µl Proteinstandard P9 (IEF-Marker 3 – 10, Serva) (M) und 9 µg angereicherte und in H₂O_{dd} umgepufferte AFR-Varianten bis zu einer Spannung von 2000 V, 3,7 mA und 6,0 W fokussiert. **A)** AFR-A13G (Spur 1) und AFR-A13G-K207P-E208P (Spur 2); **B)** AFR-A13G-K207P-E208P (Spur 1), AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T (Spur 2), AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G (Spur 3) und AFR-A13G-K207P-E208P-E330V (Spur 4).

5 Bestimmung der T_{50}^{10} [°C]

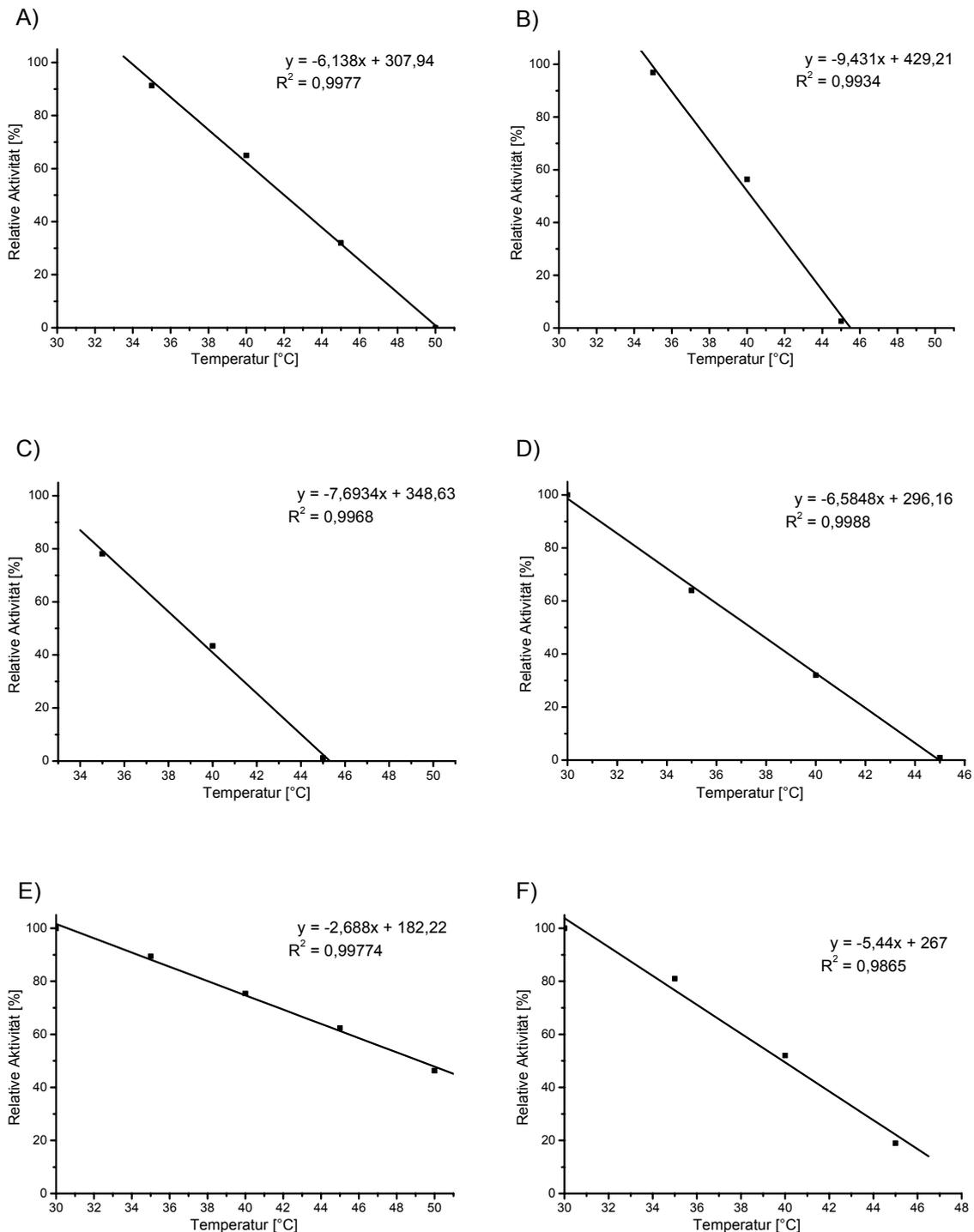


Abbildung 80: Bestimmung der T_{50}^{10} [°C]. 10 U AFR wurden in 1 ml 50 mM BisTris (pH 7,0) bei 30°C, 35°C, 40°C oder 45°C 10 min lang im Thermoblock inkubiert und die Enzymaktivität nach Zentrifugation (10 min bei 9838 x g und 4°C) gemessen. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten nach Inkubation bei den verschiedenen Temperaturen, wobei die Aktivität vor Inkubationsstart gleich 100% gesetzt wurde. A) AFR-A13G-K207P-E208P, B) AFR-A13G-E208G-G209C, C) AFR-A13G-E165N-R166K, D) AFR-A13G-G209Q, E) AFR-A13G-K207P-E208P-E330V, F) AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T.

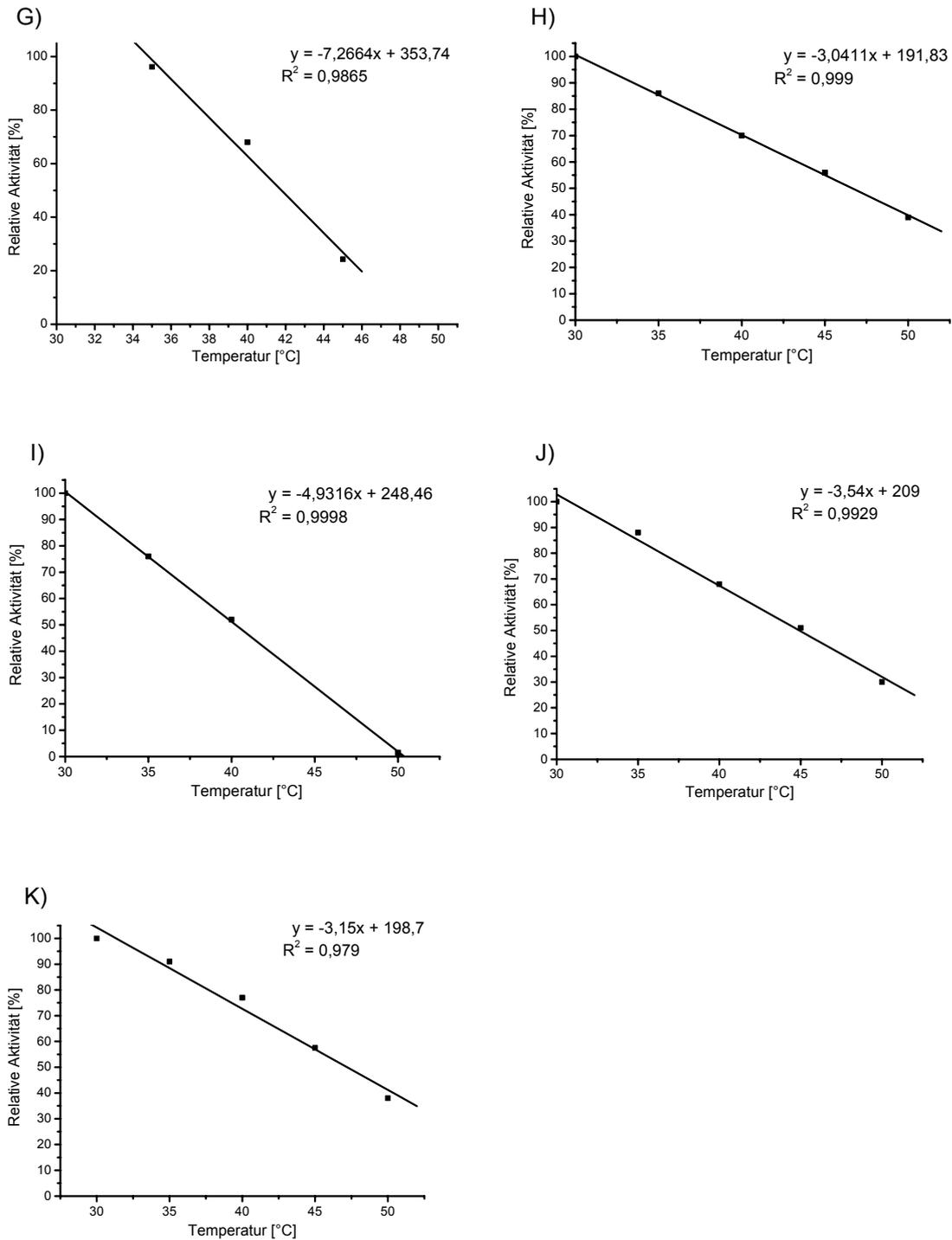


Abbildung 81: Bestimmung der T_{50}^{10} [°C]. G) AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G, H) AFR-G13A-M31V, I) AFR-G13A, J) AFR-A13G-M31V, K) AFR-G13A-M31V-K207P-E208P.

6 Enzymkinetische Graphen

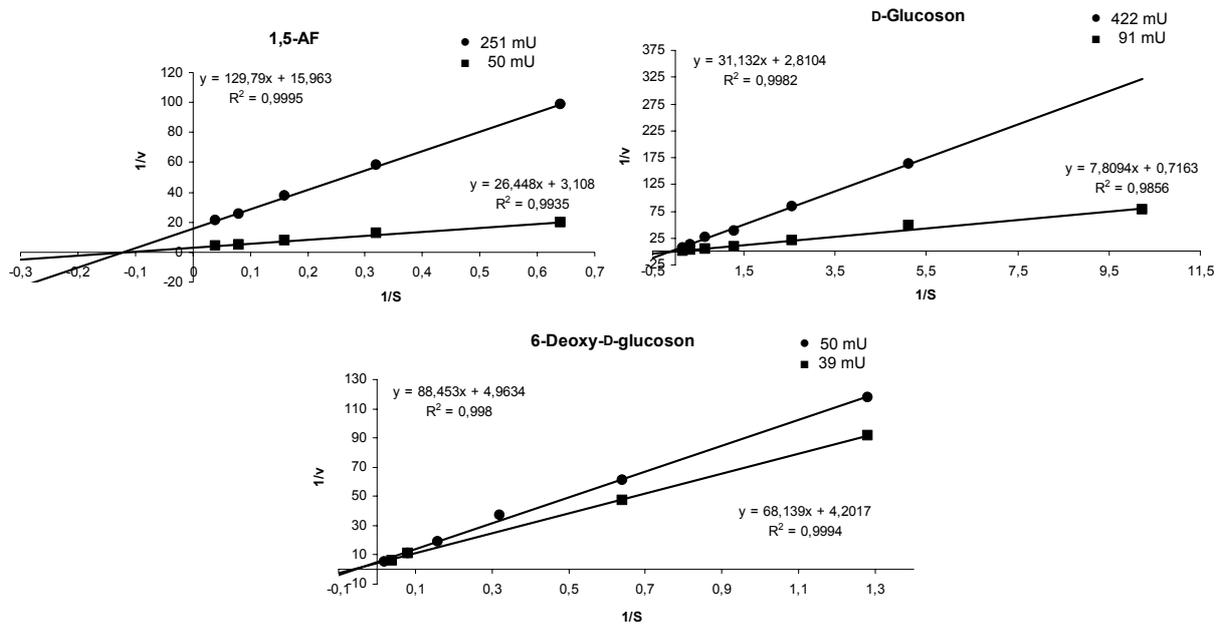


Abbildung 82: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

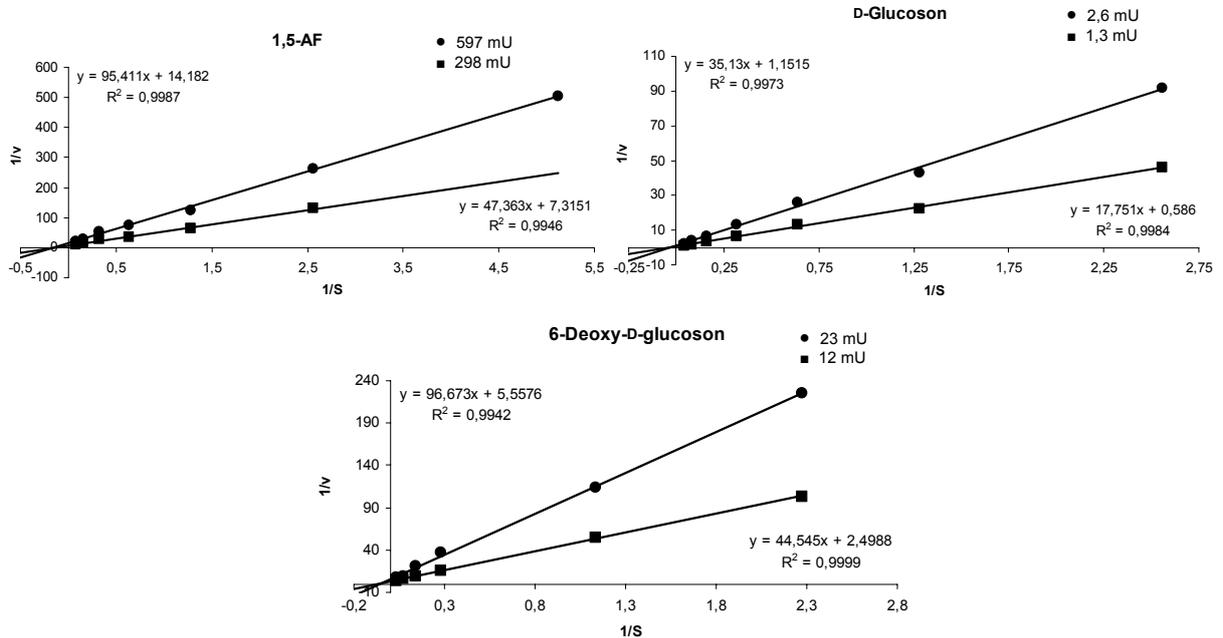


Abbildung 83: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-K207P-E208P für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

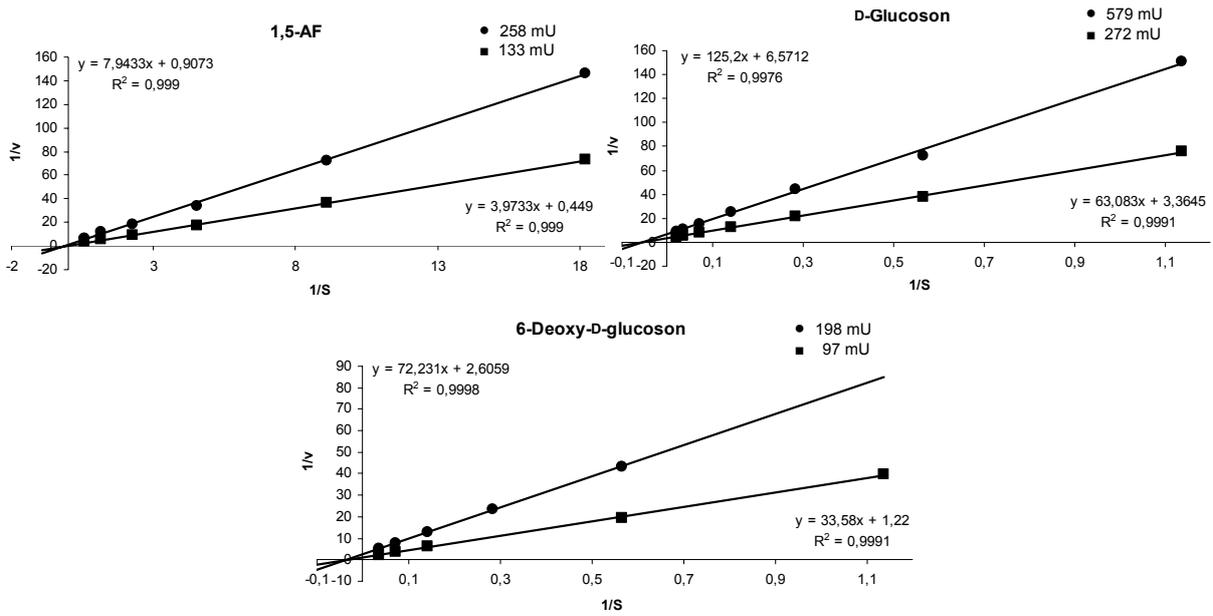


Abbildung 84: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-E208G-G209C für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

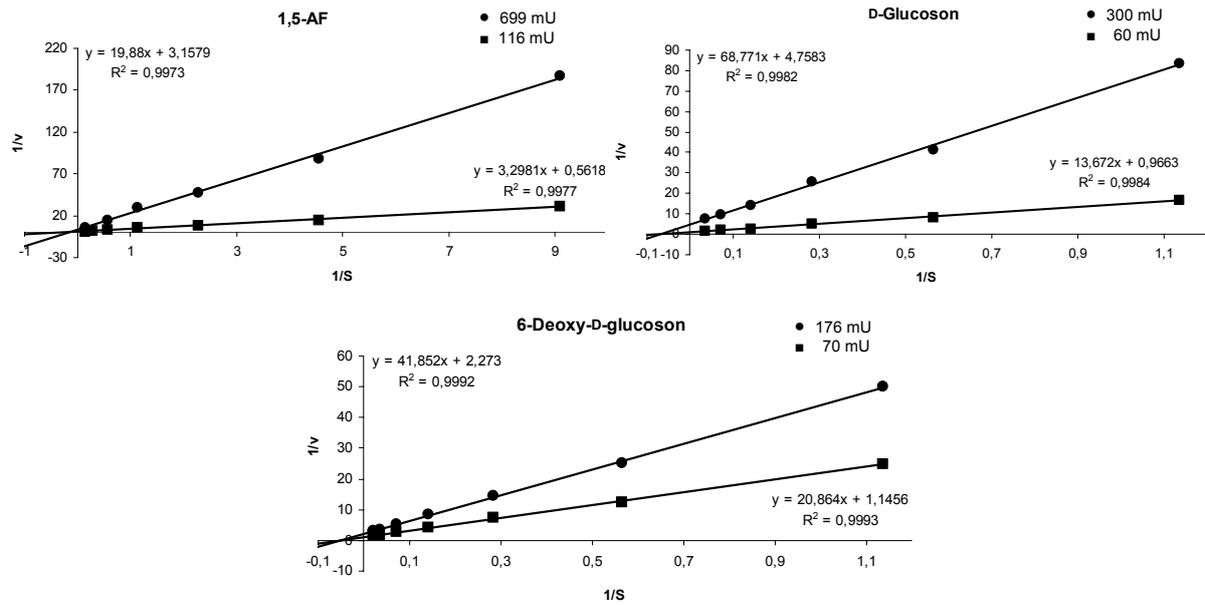
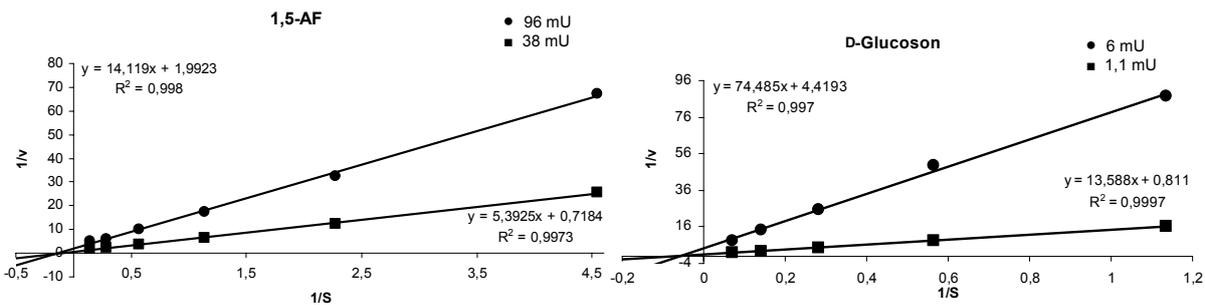


Abbildung 85: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-E165N-R166K für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.



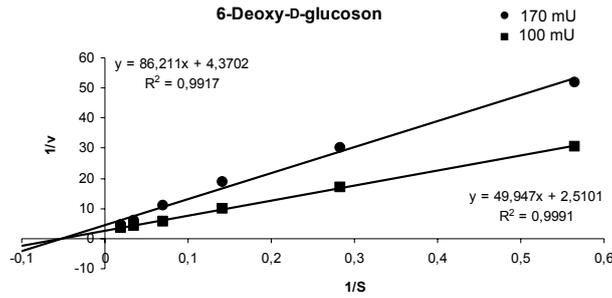


Abbildung 86: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-G209Q für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

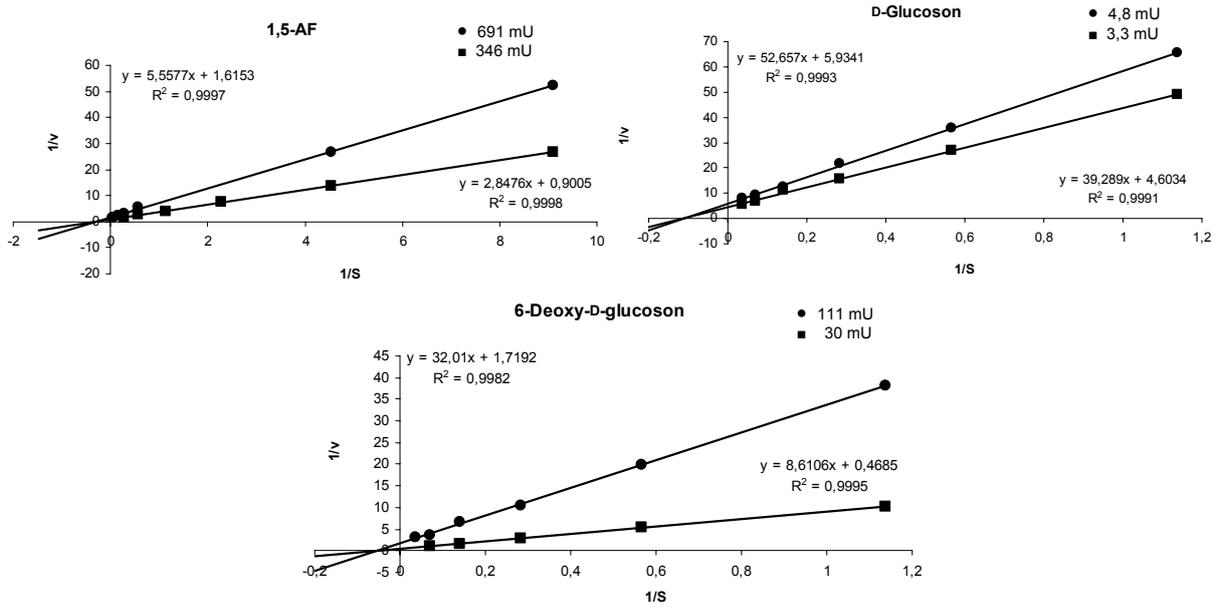


Abbildung 87: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-K207P-E208P-E330V für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

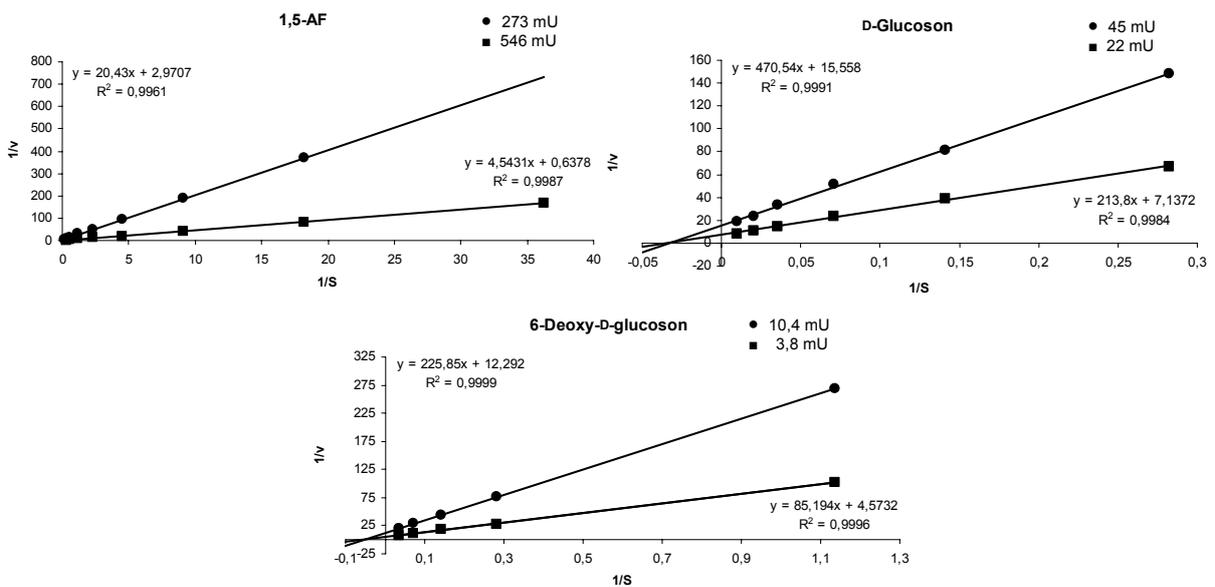


Abbildung 88: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-K207P-E208P-E165H-R166T für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

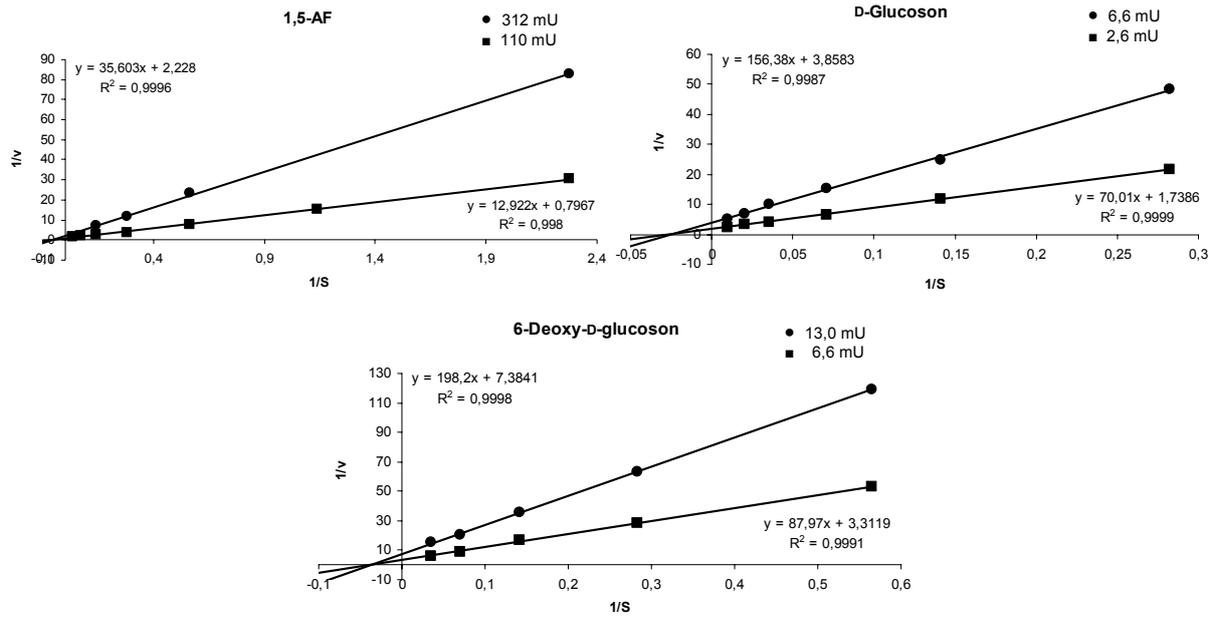


Abbildung 89: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-K207P-E208P-E165S-R166G für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

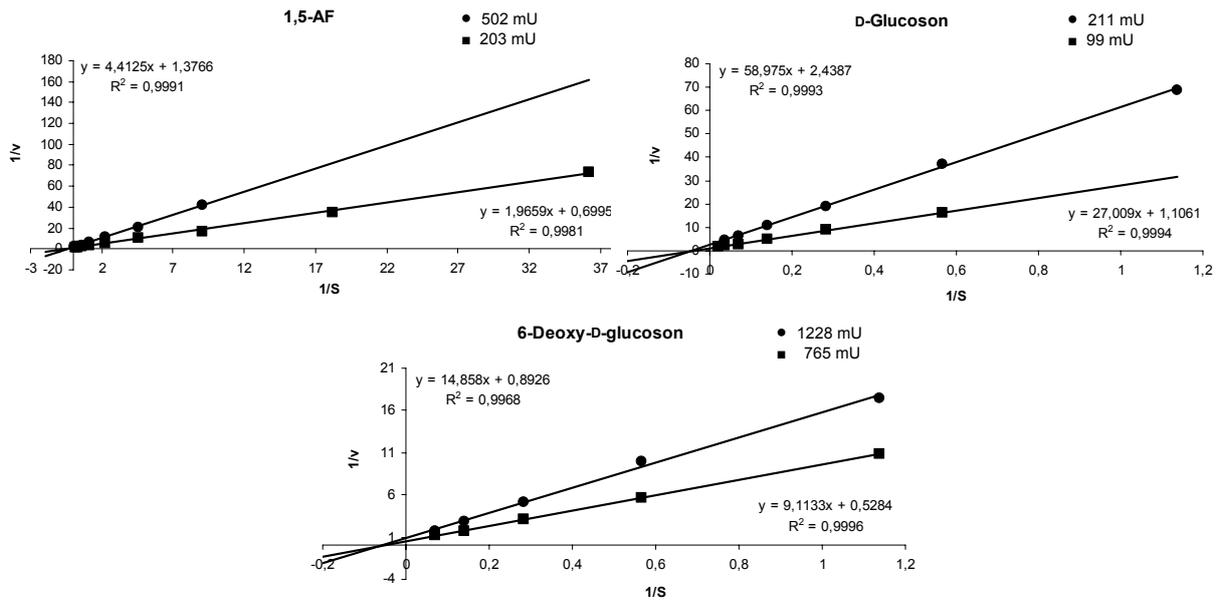
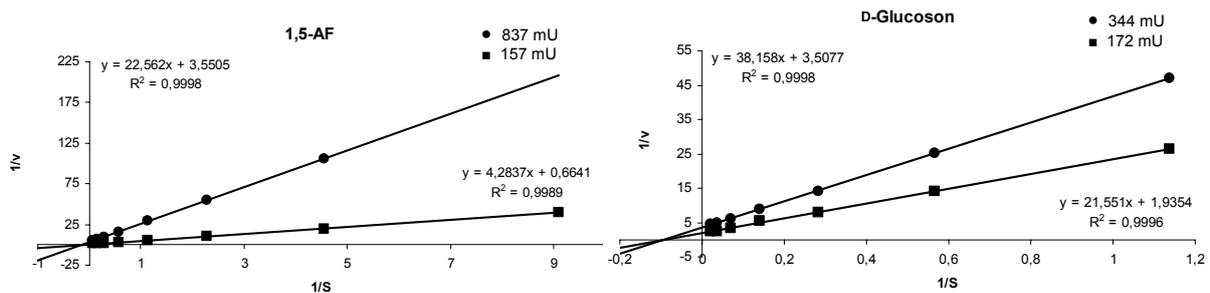


Abbildung 90: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-G13A-M31V für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.



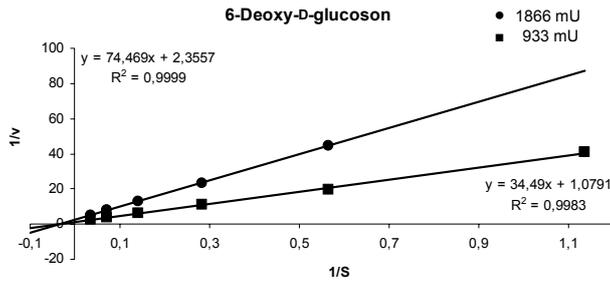


Abbildung 91: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-G13A für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

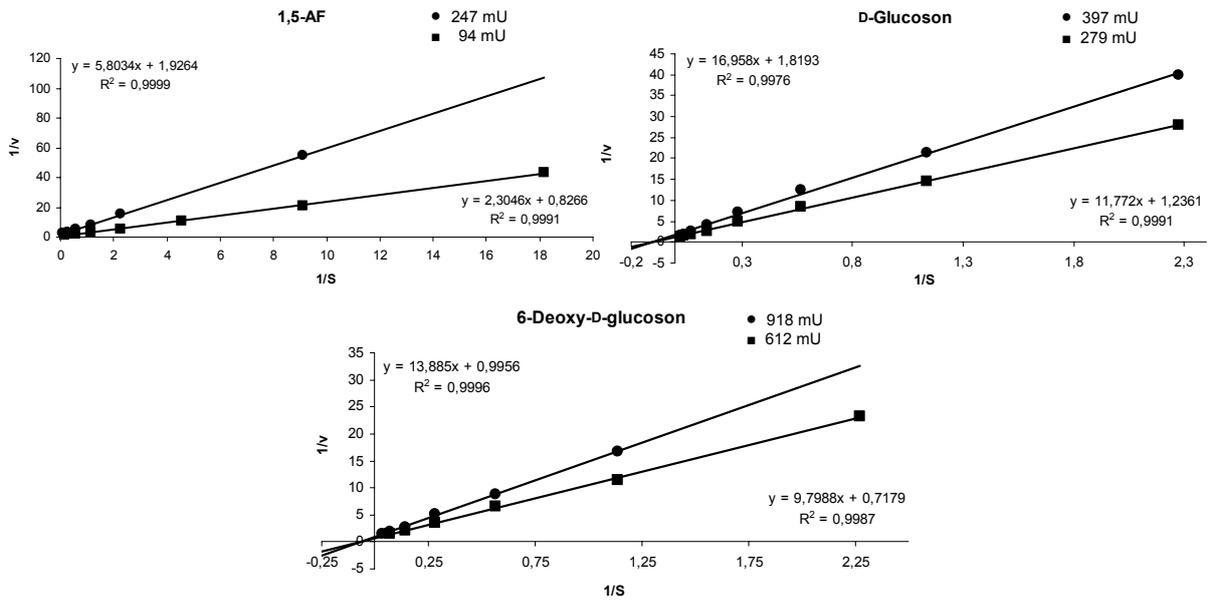
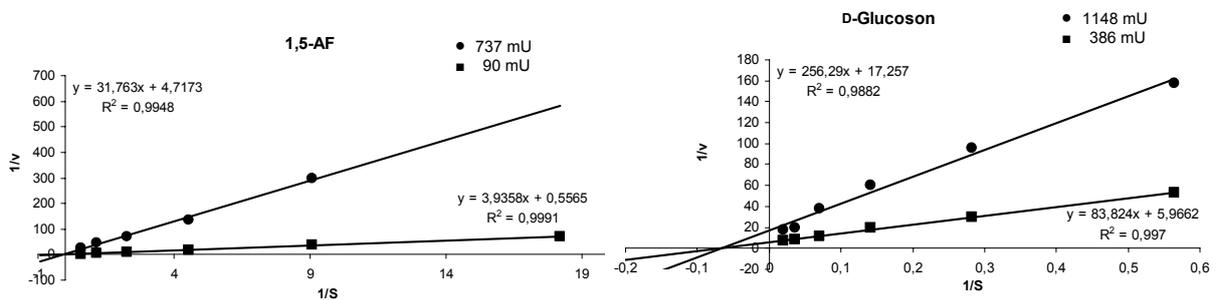


Abbildung 92: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-A13G-M31V für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.



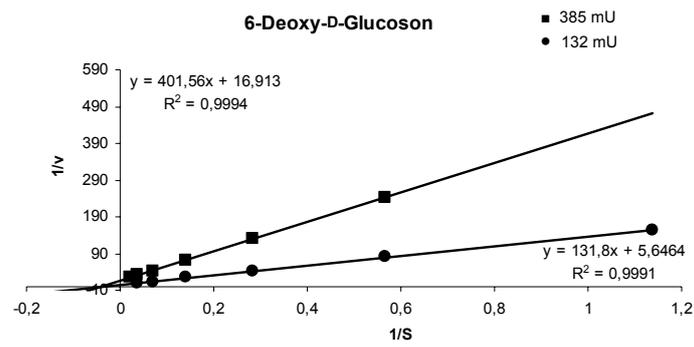


Abbildung 93: Lineweaver-Burk-Diagramme von AFR-G13A-M31V-K207P-E208P für 1,5-AF, D-Glucoson und 6-Deoxy-D-glucoson.

7 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Differenz	deion	Deionisiert
ΔE	Extinktionsdifferenz	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
μg	Mikrogramm	$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$	deionisiertes Wasser
μl	Mikroliter	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	deionisiertes, destilliertes, autoklaviertes Wasser
μM	Mikromolar	DMSO	Dimethylsulfoxid
μS	Mikrosiemens	DNA	Desoxyribonukleinsäure
A	Adenin oder Alanin	DNase	Desoxyribonuklease
Å	Angström	E	Glutaminsäure
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethyl- benzathia- zolin-6-sulfonsäure)	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AFR	1,5-Anhydro-D-fructose- Reduktase	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ala	Alanin	EtOH	Ethanol
Amp	Ampicillin	ϵ	Extinktionskoeffizient
APS	Ammoniumpersulfat	F	Phenylalanin
Arg	Arginin	f oder for	forward (Primerrichtung)
Asn	Asparagin	FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Asp	Asparaginsäure	FDH	Formiat-Dehydrogenase
AU (a.u.)	Absorptionseinheiten	g	Gramm
BCA	Bicinchoninsäure	G	Guanin oder Glycin
bp	Basenpaare	GDH	Glucose-Dehydrogenase
BSA	Rinderserumalbumin	Gln	Glutamin
Bzgl.	Bezüglich	Glu	Glutaminsäure
C	Cystein oder Cytosin	Gly	Glycin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	GRAS	Generally recognized as safe
Cm	Chloramphenicol	h	Stunde
C-Terminus	Carboxylterminus	H/ His	Histidin
cv	Column volume (Säulenvolumen)	His_6	Poly(6)-Histidin-Rest
Cys	Cystein	HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssig- chromatographie)
D	Asparaginsäure	I/ Ile	Isoleucin
Da	Dalton	IEF	isoelektrische Fokussierung
dATP	Desoxyadensintriphosphat	IP, pI	isoelektrischer Punkt
DC	Dünnschichtchromatographie	IPTG	Isopropylthiogalactosid
DH	Dehydrogenase	ISM	Iterative Sättigungsmutagenese
dNTP's	Desoxyribo nukleotidtriphosphat	K	Lysin
		Kan	Kanamycin

kb	Kilobasen	P/ Pro	Prolin
kbp	Kilobasenpaare	PAGE	Polyacrylamid
k_{cat}	<i>turnover number</i> (Wechselzahl)	PCR	gelelektrophorese <i>Polymerase chain reaction</i>
kDa	Kilodalton	Phe	Phenylalanin
K_m	Michaelis-Menten-Konstante	pmol	Picomol
L	Liter	POD	Peroxidase
L/ Leu	Leucin	P2Ox	Pyranose-2-Oxidase
LDH	Laktat-Dehydrogenase	PQQ	Pyrrolochinolinchinon
LB	Lauria-Bertani	Q	Glutamin
Lsg	Lösung	R	Arginin
Lys	Lysin	r oder rev	reverse (Primerrichtung)
M	Molar o. Methionin	rDNA	ribosomale DNA
mA	Milliampere	RNA	Ribonukleinsäure
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation</i>	RNase	Ribonuklease
mAU	Milliabsorption Units	rpm	Umdrehungen pro min
Met	Methionin	RT	Raumtemperatur
mg	Milligramm	S/ Ser	Serin
min	Minuten	s/ sec	Sekunde
ml	Milliliter	SDS	Natriumdodecylsulfat
mM	Millimolar	T/ Thr	Threonin
mmol	Millimol	TBE	Tris-Borat-EDTA
MW	<i>molecular weight</i>	TCA	Trichloressigsäure
Mut	Mutation	TE	Tris-EDTA
m/z	Masse/Ladung	TEMED	N'N'N',N'-Tetramethyl- Ethylendiamin
N	Asparagin	T_m	Schmelztemperatur
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid	Tris	Tris(hydroxymethyl)- Amino-Methan
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid- Adenin-Dinukleotid	Trp	Tryptophan
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat	Tyr	Tyrosin
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat	U	Unit (Enzymeinheit)
n. b.	nicht bestimmbar	UV	Ultraviolett
nm	Nanometer	v/v	Volumen pro Volumen
nmol	Nanomol	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl- β -D-Galactopyranosid
N-Terminus	Aminoterminus	V	Volt oder Valin
OD	Optische Dichte	Val	Valin
ORF	<i>open reading frame</i>	Vis	visible (UV/Vis-Spektren)
		W	Tryptophan
		Y	Tyrosin

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Friedrich Giffhorn für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation sowie für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Dr. Manfred Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herzlichsten Dank an Professor Dr. Gert-Wieland Kohring, der mir mit seinem unermüdlichen Einsatz ermöglichte, weiter an meiner Promotion zu arbeiten, nachdem der Kooperationspartner uns unvorhergesehen und sehr kurzfristig hängen ließ. Danke auch für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen sonstigen auftretenden Schwierigkeiten.

Herrn Dr. Josef Zapp danke ich für die Durchführung des NMRs sowie seine Hilfe bei der Analyse der Daten.

Der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Elmar Heinzle danke ich für die fachlichen Diskussionen, die Hilfsbereitschaft und das Ausleihen der Schwingmühle. Außerdem danke ich Andreas Neuner, Konstantin Schneider, Sabrina Schmeer, Tobias Klein und Vassilis Delis für die gemeinsamen Mensabesuche und die Sparrings- bzw. Feier-Einheiten am Samstag Abend. Dafür auch ein Dankeschön an Metty Segrog.

Der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Manfred Schmitt danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen Pizza-Bestellungen.

Ich danke allen Mitarbeitern der AG Giffhorn/Römisch für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Dr. Sabrina Gauer dafür, dass sie mir geduldig jede noch so oft gestellte fachliche Frage beantwortet hat, wenn mein Gedächtnis einmal mehr ein Sieb war, für die gemeinsame Schwärmerei in den Inkubationspausen und die Exkursionen in den Saarbasar.

Marie-Luise Kaiser und Nina Tran danke ich dafür, dass sie im letzten Jahr meine Stimmen im Rücken waren und dass sie geduldigst meine vielen Finnland-und-Co.-Gespräche ertragen haben. Danke auch an Marie-Christine Klein dafür, dass auch sie ab und zu eine liebe und ruhige Stimme in meinem Rücken war.

Carmen Clemens und Birgit Hasper möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die nützlichen Tipps und die vielen netten Gespräche danken.

Vielen Dank auch an die guten Seelen Nicole Jundel und Juncal Z. González, die uns den Weg durch die Uni-Bürokratie geebnet haben, uns stets mit Rat und Tat zur Seite standen und dabei immer optimistisch, herzlich und aufmunternd waren. Ein zusätzliches Danke an Nicole Jundel für ihre Hilfsbereitschaft, sogar nachdem sie offiziell nicht mehr für uns zuständig war.

Mein Dank gilt auch anderen „Ehemaligen“ der AG Giffhorn: die Zusammenarbeit mit Euch hat sehr viel Spaß gemacht und war eine Bereicherung für mich.

Herrn Klaus Witte möchte ich dafür danken, dass er sein unerschöpfliches Wissen über Bio-konversionen und *Downstream Processing* mit mir geteilt hat, für seine stetige Geduld und für die vielen heiteren Gespräche, unter anderem über schwarz-humorige Filme/Serien.

Dankeschön auch an Dr. Beata Stosik, die mir sowohl in fachlicher als auch in modischer Hinsicht immer ein Vorbild sein wird.

Vielen Dank an Dr. Petra Kornberger für ihre liebe Art und dafür, dass sie mich im schönen München nicht vergisst.

Tausend Dank an Dr. Susanne Dorscheid, die beste Kükenmama aller Zeiten, fürs Korrekturlesen dieser Arbeit, für die fachlichen Diskussionen und für ihre Freundschaft. Ihre kompetente Hilfe hat den größten Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Danke auch an Marc Bettscheider, Anne-Maria Pöhler, Sebastian Dörffel und Thomas Tretter für das gemeinsame Bewältigen des Studiums und die schönen Ablenkungen zwischendurch.

Meinen lieben und zum Großteil langjährigen Wegbegleiterinnen Cathrin Altmeyer, Christine App, Jessica Korn, Katja Fischer, Nicole Baltés, Susanne Peiffer und Tanja Fey danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind, für ihr Vertrauen, ihr Verständnis meine Schreib-Isolations-Haft im letzten Jahr betreffend und dafür, dass sie sich manchmal doch nicht haben abwimmeln lassen. Und ein extragroßes Dankeschön an Christine dafür, dass es mir vorkommt, als seien Nürnberg und Saarbrücken nur 5 Minuten voneinander entfernt.

Meinem Lebensgefährten Jochen Schneider danke ich für seine Liebe, Unterstützung und Geduld in über 10 gemeinsam verbrachten Jahren. Ein Extra-Dankeschön fürs Korrekturlesen dieser Arbeit und für seine unermüdliche Diskutierfreude.

Meinen Zweit-Eltern Mechtild und Günter Schneider danke ich für die seelische und moralische Unterstützung, die vielen Einladungen zu leckerem Essen während der „heißen Schreibphase“ und für alle weiteren Annehmlichkeiten, die das Wohnen im gleichen Haus mit sich bringt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern Margit und Jürgen Pitz danken. Dafür, dass sie immer für mich da sind, dass sie mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützen, dass sie immer an mich glauben und für die vielen schönen und einzigartigen gemeinsamen Erlebnisse, die wir bis jetzt hatten und die wir noch haben werden.

Während dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen

Poster:

M. Pitz, F. Giffhorn

Improving the thermostability of 1,5-Anhydro-D-fructose-Reductase by directed evolution

VAAM-Jahrestagung, Bochum (2009)

M. Pitz, F. Giffhorn

Increasing the thermostability of 1,5-Anhydro-D-fructose-Reductase by Iterative Saturation Mutagenesis (ISM)

VAAM-Jahrestagung, (2010)

M. Pitz, S. Dorscheid, F. Giffhorn

Effective biocatalytic synthesis of D-rhamnose, a major building block of carbohydrate-based vaccines

VAAM-Jahrestagung, Karlsruhe (2011)

Lebenslauf

Geburtsdatum und –ort:	26.10.1981 in 66125 Saarbrücken
09/1988 – 06/1992	Albert-Schweitzer-Grundschule, 66125 Saarbrücken
09/1992 - 06/2001	Gymnasium am Rotenbühl, 66123 Saarbrücken
06/2001	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/2001 – 12/2007	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
12/2007	Abschluss: Diplom
01/2008 – 06/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität des Saarlandes, ZHMB, Institut für Angewandte Mikrobiologie
seit 01/2008	Promotion am Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den