

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

**Charakterisierung und funktionelle Optimierung von  
Enzymen für die biotechnologische Synthese  
von Polyamid-12-Bausteinen**

Ludwig Kirmair

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

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Scherer

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

Die Dissertation wurde am 12.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 10.07.2017 angenommen.







## Danksagung

Ohne zahlreiche Unterstützung wäre das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen, weshalb ich allen, die zum Gelingen dieses spannenden Projekts beigetragen haben ausdrücklich meinen Dank aussprechen möchte.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra. Auch während der Durststrecke zu Beginn des Projekts hat er mir weiter vertraut und wissenschaftliche Freiräume im Rahmen dieses spannenden Themas gestattet. Ohne sein stetes Interesse am Fortgang des Projekts sowie seine konstruktiven Hilfestellungen in vielerlei Belangen wäre die Anfertigung meiner Doktorarbeit so nicht möglich gewesen. Ein herzliches Dankeschön dafür.

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

Für zahlreiche Ratschläge, Diskussionen, neue Blickwinkel – aber vor allem für eine tolle Zusammenarbeit sowie eine kurzweilige Zeit – möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Lars Friedrich, Dr. Lukas Eisoldt und Dr. Stefan Gilch bedanken. Die gemeinsame Zeit im Labor, bei Projekttreffen, am Grill und auch an der Tischtennisplatte hat die Forschungsarbeit unglaublich bereichert. Ebenso danke ich Antonia Richter für die stete Hilfsbereitschaft, insbesondere in der Einarbeitungsphase sowie Dr. Alexander Jarasch für die Anfertigung und Überlassung des AlkJ-Homologiemodells. Darüber hinaus sei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gedankt für das angenehme Klima im Kollegium. Vielen Dank insbesondere an Resi und Martina für das Bereitstellen von wahrhaft erstklassigen Kulturmedien & Agarplatten – ohne euch hätte so manches Experiment wohl erst deutlich verspätet stattfinden können.

Bei Daniel Seiler und Julia Martin bedanke ich mich für deren Beiträge im Rahmen Ihrer Abschlussarbeiten sowie für das hervorragende Teamwork inner- und außerhalb der Projekte.

Dieses Kooperationsprojekt war nur möglich durch die Bereitstellung von Gerätschaften und Chemikalien durch die Evonik Industries. Vielen Dank für die Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für deren Teilnahme bedanken. Ohne euren Beistand wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Insbesondere euer stetes Beispiel an bayerischer Zuversicht gemäß dem Motto „Es hängt ned immer auf oa Seitn“ hat mir in den schwierigeren Phasen meiner Arbeit sehr geholfen.

Ein riesiges Dankeschön an Katrin. Du hast während meiner Dissertationszeit so manche Hochs aber auch des Öfteren Tiefs erlebt und letztere klaglos mitgetragen. Danke für Deine ausdauernde Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen kann.

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

- 1) **Kirmair, L. & Skerra, A.** (2014) Biochemical analysis of recombinant AlkJ from *Pseudomonas putida* reveals a membrane-associated, flavin adenine dinucleotide-dependent dehydrogenase suitable for the biosynthetic production of aliphatic aldehydes. *Appl Environ Microbiol.* 80, 2468–2477.
- 2) **Kirmair, L., Seiler L. D. & Skerra, A.** (2015) Stability engineering of the *Geobacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase and application for the synthesis of a polyamide 12 precursor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99, 10501–10513.
- 3) **Skerra, A., Kirmair, L. et al.** Muteins of the monooxygenase AlkB with improved substrate/product specificity. Zum Patent angemeldet.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Industrielle Herstellung von Chemikalien mit Hilfe von Biotechnologie .....	1
1.2 Biotechnologische Synthese von Polyamidbausteinen .....	3
1.3 $\omega$ -Aminolaurinsäure (ALS) als biobasierter Vorläufer für Polyamid-12 .....	4
1.4 Biokatalytische Herstellung von ALS-Methylester mit der Monooxygenase AlkB.....	5
1.5 Eine nichtkanonische Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus <i>Pseudomonas putida</i> .....	8
1.6 BsADH – eine thermostabile Oxidoreduktase aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ...	10
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Material .....	13
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	13
2.1.2 Oligodesoxynukleotide .....	14
2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine.....	15
2.1.4 Chemikalien .....	16
2.1.5 Enzysubstrate, Standards und Kits .....	18
2.1.6 Geräte.....	20
2.1.7 Verbrauchsmaterial .....	22
2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen.....	24
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	27
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	27
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	28
2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA.....	28
2.2.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA .....	29
2.3 <i>In-vitro</i> -Modifizierung von DNA.....	30
2.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	30
2.3.2 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA .....	30
2.3.3 Ligierung von DNA-Fragmenten.....	30
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen .....	31
2.3.5 Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese durch <i>Crossover</i> PCR.....	31
2.3.6 Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange PCR.....	32
2.3.7 Randomisierung von Genabschnitten in AlkB durch <i>Error-Prone</i> PCR .....	32
2.3.8 Herstellung von AlkB-Genbibliotheken .....	32

2.4	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	33
2.4.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im 2 l-Maßstab.....	33
2.4.2	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im 1 ml-Maßstab.....	34
2.4.3	Anreicherung und Solubilisierung von Membranproteinen.....	35
2.5	Proteinchemische Methoden.....	35
2.5.1	Affinitätschromatographie an <i>Strep</i> -Tactin Sepharose .....	35
2.5.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie .....	36
2.5.3	Anionenaustauschchromatographie .....	37
2.5.4	Größenausschlusschromatographie .....	37
2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	37
2.5.6	Konzentrierung von Proteinen .....	38
2.5.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	38
2.6	Enzymatische Aktivitätsanalysen .....	39
2.6.1	NADH-gekoppelte Aktivitätsbestimmung von AlkB und AlkT.....	39
2.6.2	Parallelisierter Screening-Assay für AlkB-Mutanten .....	41
2.6.3	NADH-gekoppelte Aktivitätsbestimmung von BsADH.....	42
2.6.4	Optischer Aktivitätsnachweis von AlkJ .....	43
2.6.5	Irreversible thermische Denaturierung.....	45
2.6.6	Lagerstabilität von BsADH.....	46
2.6.7	ADH-katalysierte Biokatalyse im ml-Maßstab .....	46
2.6.8	Probenvorbereitung für die Gaschromatographie (GC).....	47
2.6.9	Produktnachweis mittels GC .....	48
2.7	Biophysikalische Methoden .....	48
2.7.1	Photometrischer Nachweis von FAD .....	48
2.7.2	Circulardichroismus-Spektroskopie .....	49
2.8	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken .....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1	<i>Enzyme-Engineering</i> von AlkB .....	52
3.1.1	Konstruktion eines Topologiemodells .....	52
3.1.2	Produktion in <i>E. coli</i> und Anreicherung von AlkB.....	55
3.1.3	Produktion und Reinigung der Helferproteine AlkG und AlkT.....	57
3.1.4	Aktivitätsnachweis von AlkBGT .....	59
3.1.5	Modellbasierte rationale Punktmutationen.....	63
3.1.6	Produktion und Screening von AlkB-Mutanten im Mikrotiter- plattenmaßstab .....	65
3.1.7	Randomisierung von AlkB mittels <i>Error-Prone</i> PCR und ortsgerichteter Sättigungsmutagenese .....	66

---

3.2	Reinigung und Charakterisierung von AlkJ .....	72
3.2.1	Klonierung, Produktion und Reinigungsstrategie.....	72
3.2.2	Etablierung eines Redoxfarbstoff-gekoppelten Aktivitätstests.....	75
3.2.3	Identifizierung von FAD und Ubichinon als Cofaktoren von AlkJ.....	77
3.2.4	Untersuchung des Substratspektrums von AlkJ.....	80
3.2.5	Bestimmung der Chemoselektivität der Biokatalyse durch AlkJ .....	81
3.2.6	Solventoleranz und pH-Optimum .....	82
3.2.7	Untersuchungen zur Thermostabilität.....	84
3.2.8	Einfluss der C-terminalen Aminosäuren auf die Membranassoziation .....	85
3.3	Charakterisierung und Stabilitäts- <i>Engineering</i> der BsADH .....	88
3.3.1	Klonierung, Produktion und Reinigung.....	88
3.3.2	Enzymkinetische Parameter .....	90
3.3.3	Erhöhung der Enzymstabilität durch strukturbasierte rationale Mutagenese .....	92
3.3.4	Semipräparative enzymatische Synthese von OLSMe mit Enzym- gekoppelter Cofaktorregenerierung .....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
4.1	Anwendungspotential der Enzyme aus dieser Arbeit für die biotechnologische Herstellung von ALS.....	99
4.2	Molekulare Optimierung der Alkanmonooxygenase AlkB .....	100
4.3	Biotechnologische Synthese von Aldehyden mit AlkJ .....	109
4.4	BsADH als thermostabiler Biokatalysator .....	114
4.5	Alternative biotechnologische Syntheserouten zu $\omega$ -Oxocarbonsäuren .....	119
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>127</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Industrielle Herstellung von Chemikalien mit Hilfe von Biotechnologie

In Anbetracht der begrenzten fossilen Ressourcen hat die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen sowie von Abfall- und Nebenprodukten der Landwirtschaft durch biotechnologische Stoffumwandlungen in den vergangenen Jahrzehnten beständig zugenommen (de Jong *et al.*, 2012). Dabei wird grundsätzlich unterschieden zwischen der sogenannten energetischen Konversion und der stofflichen Verwendung. Während bei der energetischen Verwertung vorwiegend die Substitution erdölbasierter Energieträger durch biotechnologisch erzeugte Treibstoffe wie Methan, Ethanol, Butanol, Biodiesel oder auch Biokerosin im Vordergrund steht (Antoni *et al.*, 2007), wird bei der stofflichen Umwandlung die Erzeugung von Grund-, Fein-, sowie Spezialchemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen angestrebt (Bozell & Petersen, 2010). Die Nutzung organischer Biosubstanz eröffnet die Möglichkeit, in absehbarer Zukunft die Nachfrage an bisher petrochemisch basierten Bedarfschemikalien durch umweltverträglich produzierte *Drop In*-Grundstoffe oder sogar neue, verbesserte Synthesebausteine schrittweise zu decken (Straathof, 2014).

Einen biochemischen Ansatzpunkt zur biotechnologischen Synthese von organischen Stoffen durch Mikroorganismen stellt der Tricarbonsäure-/Zitronensäurezyklus dar, welcher als ubiquitär verbreiteter Stoffwechselweg in vielen Organismen die Schlüsselrolle im Kohlenstoffmetabolismus einnimmt (Van Dien, 2013). Der dabei aus der namensgebenden Zitronensäure bzw. Acetyl-CoA gebildeten dibasischen Bernsteinsäure ( $\alpha,\omega$ -Butandisäure) wird dabei enormes Potential als nachhaltiges Vorläufermolekül für eine Vielzahl an Grund- und Spezialchemikalien zugeschrieben (Peters, 2007). Bio-Bernsteinsäure gilt unter anderem als nachhaltiges Substitutionsprodukt für die Plattformchemikalie Maleinsäureanhydrid, von welcher jährlich über eine Megatonne (Mt) produziert wird, kann aber auch als Vorläufer für 1,4-Butandiol, Polymer-Synthesebausteine sowie eine Vielzahl an Derivaten verwendet werden (eine eingehende Übersicht hierzu findet sich in Zeikus *et al.*, 1999).

So investieren mehrere Konsortien und große Industrieunternehmen wie BASF, Mitsubishi oder DSM beträchtlichen Aufwand in die Entwicklung großtechnisch umsetzbarer fermentativer Prozesse für die Herstellung von Bernsteinsäure aus zuckerhaltigen Substraten. Dabei wird nach unterschiedlichen Strategien verfahren, sowohl was den verwendeten Herstellungsorganismus angeht (*Basfia succiniciproducens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*), als auch bei der folgenden, die Prozessökonomie mitbestimmenden Produktaufarbeitung durch Kristallisation, Elektrodialyse oder Fällung, nach fundamental unterschiedlichen Strategien verfahren (Scholten & Dägele, 2008; Raab *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2012). Diese Diversifizierung bei der Herstellung desselben Moleküls

unterstreicht eindrucksvoll die vielfältigen Möglichkeiten und Chancen der industriellen synthetischen Biotechnologie.

Das Marktvolumen petrochemisch basierter Bernsteinsäure wird derzeit im Bereich von 16 Kilotonnen pro Jahr (kt/a) eingeschätzt (Sauer *et al.*, 2008). Mit einer prognostizierten Marktkapazität von 275 kt/a stellt die Bernsteinsäure damit alleine aufgrund des hohen Handelsvolumens neben dem vorwiegend für die energetische Nutzung verwendeten Bio-Ethanol den ersten nachhaltig produzierten Stoff dar, der in für petrochemische *Bulk*-Produkte übliche Dimensionen vorstößt und derzeit das größte Wachstumspotential aller erneuerbaren Plattformchemikalien birgt (Van Dien, 2013). Derzeit sollen seitens verschiedener Hersteller insgesamt neun biotechnologische Produktionsanlagen mit einer Kapazität  $\leq 10$  kt/a bis zum Jahr 2017 realisiert werden (Cok *et al.*, 2014). Mit Erreichen dieser Jahresproduktion könnte Bio-Bernsteinsäure die Akzeptanz von biotechnologischen Produktionsmethoden in der Chemieindustrie weiter steigern.

Ein weiteres Beispiel für die großtechnische Umsetzung eines vorteilhaften biotechnologischen Herstellungsprozesses ist die von dem Konsortium DuPont/Tate & Lyle implementierte auf Maiszucker basierte fermentative Produktion der Plattformchemikalie 1,3-Propandiol (PDO, Nakamura & Whited, 2003). Die petrochemische Herstellung von PDO erfolgt ausgehend von Ethylenoxid oder Acrolein unter Einsatz kostenintensiver Metallkatalysatoren unter hohem Druck und ebenfalls hohen Temperaturen mit Ausbeuten von 40 % bzw. 80 % (Saxena *et al.*, 2009). Mit Hilfe des Einbringens bzw. der Modifikation von insgesamt 36 Genen in *Escherichia coli* konnte in rund 15 Jahren Entwicklungsarbeit durch Integration heterologer Stoffwechselwege ein Biokatalysator erzeugt werden, welcher unter Nutzung von Glucose den Energiebedarf im Vergleich zu den traditionellen chemischen Prozessen um 40 % und die CO<sub>2</sub>-Belastung um 20 % senkt (Steverding, 2010). Das im Vergleich zur chemischen Synthese bei verminderten Kosten produzierte Bio-PDO wird unter anderem für die Herstellung von Hautpflegeprodukten, Kühlmitteln sowie Hochleistungs-Polyestern eingesetzt (Kurian, 2005).

Die dargestellten Beispiele wie auch weitere vielversprechende, in der Demonstrationsphase befindliche Bioprozesse belegen eindrucksvoll das synthetische Potential der industriellen Biotechnologie für die nachhaltige Herstellung von Chemikalien (Green, 2011; Mahmoudian, 2014; Erickson *et al.*, 2012). Während die derzeit ausgereiftesten biotechnologischen Produktionsprozesse vorwiegend auf der fermentativen Herstellung von hauptsächlich aus dem zelleigenen Zentralmetabolismus abgeleiteten Verbindungen basieren, greifen aktuelle Entwicklungen darüber hinaus die Möglichkeit der zielgerichteten Funktionalisierung exogen zugegebener Substrate durch ein oder mehrere Enzyme als sogenannte Biotransformation, auf (Otte & Hauer, 2015).

Die enormen Fortschritte bei der zielgerichteten Produktionsstammentwicklung durch *Metabolic-Engineering* sowie der Einsatz maßgeschneiderter Enzyme mittels *Protein-Engineering* ermöglichen die Zusammenführung und Optimierung diverser modularer mikrobieller StoffwechsellLeistungen in einem biokatalytischen Herstellungsprozess. Dabei kann die synthetische Leistung der Enzyme grundsätzlich sowohl in zellfreier Form genutzt werden als auch in Form eines rekombinanten Ganzzellbiokatalysators (Lopez-Gallego & Schmidt-Dannert, 2010; Schrewe *et al.*, 2013). Dadurch muss sich die biotechnologische Herstellung von Chemikalien in Zukunft nicht mehr an im zentralen Zellmetabolismus vorherrschenden Verbindungen orientieren sondern kann sich durch *Pathway-Design* um komplexere Synthesen erweitern (Prather & Martin, 2008; Chen & Nielsen, 2013), was zu einer breiteren Produktvielfalt bei den nachhaltig produzierten Chemikalien führen wird.

## 1.2 Biotechnologische Synthese von Polyamidbausteinen

Von den zahlreichen Möglichkeiten der stofflichen Nutzung stellt die Einspeisung erneuerbarer Ressourcen in die Herstellung von Polymerbausteinen aufgrund der hohen Bedeutung für den Gesamtchemikalienmarkt (Marktvolumen: 12 % weltweit, 24 % innerhalb der EU) eine besonders attraktive Strategie dar (Schaffer & Haas, 2014). Neben den mengenmäßig dominierenden Polyestern stellen Polyamide (PA) dabei den zweitgrößten Sektor dar, wobei Polyamide mit einer Kettenlänge von sechs Kohlenstoffatomen (Nylon<sup>®</sup>, Perlon<sup>®</sup>) mit einem Marktvolumen von 93 % wiederum den weitaus größten Teil ausmachen (Brehmer, 2013). Das am stärksten wachsende Marktsegment innerhalb der Polymere stellen jedoch die sogenannten Spezialpolyamide dar, d.h. langkettige Polyamide mit Kettenlängen von zehn, elf oder insbesondere zwölf Kohlenstoffatomen (Yu, 2013).

Die Herstellung von Polyamiden kann entweder durch Polymerisierung von Amino-carbonsäuren, wie z.B.  $\omega$ -Amino-Hexansäure im Fall von Perlon<sup>®</sup>, oder aber auch durch Kondensation von Diaminen und Dicarbonsäuren erfolgen. Im ersteren Fall spricht man von Homopolyamiden (Nomenklatur: Polyamid C<sub>n</sub>), beim Einsatz von zwei Bausteinen dagegen von Copolyamiden (Nomenklatur: Polyamid C<sub>n</sub> Diamin, C<sub>n</sub> Disäure, Brehmer, 2013). Für Monomere beider Kondensationstypen sind in der jüngeren Vergangenheit deutliche Fortschritte bezüglich des Einsatzes biotechnologischer Verfahren mit der Zielsetzung eines Wechsels hin zu einer biobasierten Rohstoffbasis erzielt worden.

Vor allem für die nachhaltige Herstellung funktioneller Dicarbonsäuren konnten durch innovative Forschungsansätze in den letzten Jahren bereits industrielle Verfahren implementiert werden. So wird die für die Herstellung der jeweiligen Copolymere PA X,10 benötigte Sebazinsäure ( $\alpha,\omega$ -Dekandisäure) aus der im Öl des Wunderbaumes (*Ricinus communis*) mengenmäßig dominierenden Rizinolsäure (Anteil ca. 85 %, [9Z,12R]-12-Hydroxy-9-octadecensäure) gewonnen, weshalb z.B. Polyamid 4,10, PA 6,10 oder auch

PA 10,10 von mehreren Herstellern schon als Bio-Polyamide vermarktet werden (de Jong *et al.*, 2012). Für die Herstellung der quantitativ am häufigsten in Co-PAs verwendeten Adipinsäure ( $\alpha,\omega$ -Hexandisäure) wurde eine kommerzielle Biotransformation vorgestellt (Beardslee & Picataggio, 2012), in welcher durch zielgerichtete Anpassung des Zellstoffwechsels eines Hefe-Biokatalysators die hochselektive Synthese von Adipinsäure aus einem komplexen Pflanzenöl gelungen ist (Bart & Cavallaro, 2015). Jenseits dieser auf bestimmte Kettenlängen festgelegten Verfahren wurde die großtechnische Produktion von  $\alpha,\omega$ -Dodekandisäure aus *n*-Dodekan oder Dodekansäure durch Biotransformation mit einem maßgeschneiderten *Candida tropicalis*-Hefestamm durch Cathay Biotech sowie Cognis (jetzt BASF) beschrieben (Kroha, 2004). Momentan wird bereits die Hälfte des aktuellen Weltbedarfs von etwa 20 kt/a durch fermentativ hergestellte  $\alpha,\omega$ -Dodekandisäure gedeckt, wobei ein Wachstum des Marktes auf 60 kt prognostiziert wird (Cyranoski, 2012).

Während einige Strategien für die biotechnologische Produktion von Dicarbonsäuren bereits marktreif sind, befinden sich Bestrebungen zur nachhaltigen Erzeugung von Diamin-Monomeren derzeit noch im Stadium von Machbarkeitsstudien. So konnte gezeigt werden, dass die zellfreie enzymatische *in vitro*-Synthese von kurzkettigen aliphatischen Diaminen bis hin zum  $\alpha,\omega$ -Dekandiamin ausgehend von den entsprechenden Dialkoholen durch Kopplung einer Alkohol-Dehydrogenase mit einer Transaminase im Gramm-Maßstab möglich ist (Sattler *et al.*, 2012). Auch für die Erzeugung sterisch gehinderter Diamine aus dem dicyclischen Kohlenhydratderivat Isosorbid, welche neben ihrem Einsatz bei der Herstellung von Polyamiden auch das bisher gebräuchliche petrochemisch basierte Isophorondiamin als Crosslinker-Reagenzien ersetzen könnten (Hong *et al.*, 2014; Raum & Thukral, 1971), wurde erst kürzlich eine enzymatische Reaktionskaskade etabliert (Lerchner *et al.*, 2013; Lerchner *et al.*, 2015). Dabei konnten unter Einsatz einer für sekundäre Alkohole spezifischen Alkohol-Dehydrogenase sowie einer für räumlich anspruchsvolle Substrate geeigneten Transaminase die Kohlenhydrat-Diole in Diamine umgewandelt werden.

### 1.3 $\omega$ -Aminolaurinsäure (ALS) als biobasierter Vorläufer für Polyamid-12

Im Gegensatz zu den Copolyamidbausteinen werden Homopolyamide aus  $\omega$ -Aminocarbonsäuren bzw. deren Lactamen hergestellt (Ladkau *et al.*, 2011). Insbesondere die Produktion des Monomerbausteins  $\omega$ -Aminolaurinsäure, welche als freie Säure wie auch als Methylester zur Herstellung des Hochleistungspolyamids PA 12 dienen kann (Coffman *et al.*, 1948), ist angesichts der prognostizierten Verknappung des für die konventionelle Synthese benötigten Vierkohlenstoff-Bausteins Butadien (Sushkevich *et al.*, 2015) für PA 12-Produzenten von hohem Interesse. PA 12 ist ein teilkristalliner, thermoplastischer Kunststoff mit dem geringsten Amidgruppen-Gehalt aller bisher kommerziell gebräuchlichen Polyamide,

wodurch es eine Reihe an besonderen Eigenschaften erhält, wie geringe Wasseraufnahme, außergewöhnlich hohe Schlagzähigkeit sowie Beständigkeit gegen Fette, Öle sowie Lösungsmittel.

Aufgrund seiner vorteilhaften Charakteristika stellt PA 12 daher für viele Anwendungen im Sportsektor, bei Konsumprodukten sowie in der Öl- und Automobilindustrie einen bevorzugten und oftmals derzeit nicht substituierbaren Werkstoff dar, was sich in dem für ein Spezialpolymer ungewöhnlich hohen Marktvolumen von 60 kt/a und Wachstumsmargen von etwa 8 % p.a. äußert (Yu, 2013). Die bisherige industrielle Produktion erfolgt ausgehend von petrochemisch gewonnenem Butadien, welches katalytisch zu Dodekatrien trimerisiert wird. Nach Hydrierung und anschließender Oxidation zum Cyclododekanol, erfolgt eine Dehydrierung, gefolgt von einer Oximierung zu Cyclododekan-Oxim. In Gegenwart von Ziegler-Katalysatoren wird dieses zum Laurinlactam umgelagert, welches das Edukt für die Polymerisierungsreaktion darstellt (Taber & Straney, 2010).

Im Hinblick auf den politisch wie gesellschaftlich geforderten Wechsel zu einer biologisch basierten Rohstoffbasis werden Lipide – und dabei vor allem deren Fettsäurebestandteile – aufgrund ihrer den Alkanen ähnlichen physikochemischen Charakteristika als besonders vorteilhafte Ausgangssubstrate für die Synthese von industriell relevanten Kohlenstoff-Synthons angesehen (Metzger & Bornscheuer, 2006). Auch die derzeit im Pilotmaßstab befindliche biotechnologische Herstellung des PA 12-Vorläufermoleküls  $\omega$ -Aminolaurinsäure-Methylester der Evonik Industries basiert auf pflanzlichen Fetten (Dr. Steffen Schaffer, persönliche Mitteilung). Als Ausgangsmaterialien erwiesen sich insbesondere Kokosnuss- oder Palmkernöl, welche jeweils zu ca. 50 % aus Laurinsäure bestehen, als besonders geeignet, da sie bereits als Rohmaterial die für eine Synthese von PA 12 benötigte Kettenlänge von zwölf Kohlenstoffatomen aufweisen (Hilditch, 1949). Durch Umesterung der bei der Ernte gewonnenen Triacylglyceride mit Methanol werden die im Pflanzenöl enthaltenen Fettsäuren in eine leichter fraktionierbare Form gebracht. Darüber hinaus werden die Carboxylgruppen der Fettsäuren als Ester aber auch geschützt, was zum einen deren Toxizität für den Ganzzellbiokatalysator verringert und diese zum anderen vor dem Abbau durch  $\beta$ -Oxidation im Produktionsorganismus schützt (Helwani *et al.*, 2009).

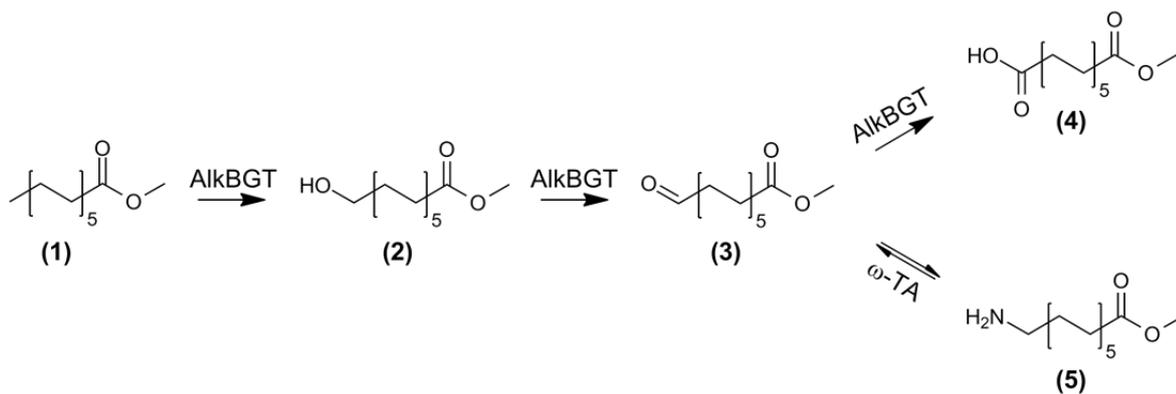
## 1.4 Biokatalytische Herstellung von ALS-Methylester mit der Monooxygenase AlkB

Ein geeignetes Enzymsystem für die biokatalytische  $\omega$ -Funktionalisierung von Laurinsäure-Methylester (LSMe) hin zum Monomerbaustein ALS-Methylester bietet ein Drei-Komponenten-Hydroxylasesystem namens AlkBGT aus *Pseudomonas putida* GPo1 (früher bekannt als *Pseudomonas oleovorans*). Dieses im Alkan-metabolisierenden *alk*-Operon codierte Enzym-Set ist seit geraumer Zeit ein beliebtes Forschungsobjekt in der industriellen

Biotechnologie sowohl für biotechnologisch-mechanistische als auch biosynthetische Fragestellungen (van Beilen *et al.*, 1994; Bosetti *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 2009). Der auf einem 34 kb großen Plasmid codierte Stoffwechselweg umfasst insgesamt bis zu zehn Enzyme sowie die dazugehörigen Helferproteine und ermöglicht die  $\omega$ -Oxidation von Alkanen zu Fettsäuren, was es dem Bakterium gestattet, Acetyl-Coenzym A aus nicht-aktivierten Kohlenwasserstoffen zu generieren (van Beilen *et al.*, 2001).

Der zentrale Schritt bei der terminalen Aktivierung von LSMe, die energetisch aufwändige  $\omega$ -Hydroxylierung, erfolgt durch die in der inneren Zellmembran des Produktionsorganismus lokalisierte aus 401 Aminosäuren bestehende Monooxygenase AlkB. Im Gegensatz zu in der Biotechnologie häufig gebräuchlichen Cytochrom(CYP)-P450-Enzymen der Klasse III (Torres Pazmiño *et al.*, 2010) handelt es sich bei AlkBGT um ein aus unlöslichen und löslichen Proteinkomponenten zusammengesetztes Hydroxylasesystem. So wird AlkB von einem diffusiblen Rubredoxin-Elektronenüberträger (AlkG) mit Elektronen versorgt, welcher seinerseits von der NADH-abhängigen Rubredoxin-Reduktase (AlkT) mit Elektronen aus dem Zellstoffwechsel reduziert wird (Peterson *et al.*, 1966).

Die Alkanmonooxygenase katalysiert sowohl die initiale  $\omega$ -Hydroxylierung von LSMe, was zu  $\omega$ -Hydroxy-LSMe (HLSMe) führt, kann aber auch weitere Oxidationsschritte zum  $\omega$ -Oxo-LSMe (OLSMe) und sogar zum Dodekandisäure-Monomethylester (DDSMe) katalysieren (Schrewe *et al.*, 2013). Das eigentlich gewünschte Produkt,  $\omega$ -Aminolaurinsäure-Methylester (ALSMe), kann durch reduktive Transaminierung von OLSMe durch eine aus *Chromobacter violaceum* stammende  $\omega$ -Transaminase aus dem Alk-Oxidationspfad mit einer Ausbeute von ca. 50 % abgezweigt werden (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Biokatalytische Herstellung eines biobasierten Polyamid-12-Bausteins. Das Schema zeigt die durch AlkBGT katalysierte terminale Oxidation von Laurinsäure-Methylester (1) über  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (2) und  $\omega$ -Oxo-laurinsäure-Methylester (3) zu  $\alpha,\omega$ -Dodekandisäure-Monomethylester (4). Das gewünschte Produkt  $\omega$ -Aminolaurinsäure-Methylester (5) kann durch eine  $\omega$ -Transaminase ( $\omega$ -TA) abgezweigt werden.

Für die Einführung von sauerstoffhaltigen Gruppen an der  $\omega$ -Position von langkettigen Carbonsäuren werden in der industriellen Biotechnologie häufig eisenhaltige Oxygenasen, wie z.B. CYP-P450-Enzyme, aber auch nicht-Häm-Monooxygenasen, wie z.B. AlkB, eingesetzt (van Beilen *et al.*, 2003; Scheps *et al.*, 2013; Julsing *et al.*, 2008). Beide Enzymtypen können die aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität des endständigen Kohlenstoffs chemisch anspruchsvolle Hydroxylierung der  $sp^3$ -hybridisierten Methylgruppe katalysieren, wobei AlkB aufgrund seiner im Vergleich zu CYP-P450-Enzymen wesentlich stringenteren Regioselektivität einen besonders vielversprechenden Biokatalysator darstellt (Koch *et al.*, 2009; Whitehouse *et al.*, 2012).

Jedoch birgt die für die Reaktion aufgebrauchte hohe Aktivierungsenergie Herausforderungen für einen gezielten Einsatz dieser Enzyme: Oftmals zeigen Monooxygenasen nur unzureichende Produktselektivität, was – wie oben beschrieben – bis zur Überoxidation zur (Di-)Carbonsäure als unerwünschtes Nebenprodukt führen kann (Grant *et al.*, 2012). Im Fall der enzymatischen Synthese von ALSMe bewirkte diese fehlgeleitete Oxidation ein nahezu äquimolares Verhältnis an Zielprodukt und DDSMe, was die Prozessökonomie limitiert (Schrewe *et al.*, 2013). Die Reaktionseffizienz bei der Synthese von HLSMe durch AlkB wird zudem durch den geringen Anteil an produktiv genutzten Reduktionsäquivalenten, die sogenannte Elektronentransferrate, eingeschränkt, welche für LSMe lediglich 26 % beträgt (Schrewe *et al.*, 2011). Aufgrund der suboptimalen Passung des nicht-natürlichen Substrats LSMe kommt es durch die unspezifische Reduktion von molekularem Sauerstoff durch AlkB als Nebenreaktion zu einer teilweisen Entkopplung des NADH-Verbrauchs von den gebildeten Kohlenwasserstoffprodukten (Lee, 1999), was letztlich zu einem erhöhten Glucosebedarf für die Biosynthese von NADH führt.

Die maßgeschneiderte Anpassung von Enzymeigenschaften an reaktions- und prozesstechnische Bedürfnisse mittels *Enzyme-Engineering* stellt mittlerweile ein bewährtes Konzept innerhalb der Biokatalyse dar (Bornscheuer *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2007). So wurde die Affinität für z.T. nicht-natürliche Enzymsubstrate durch Umgestaltung der Substratbindetasche schon vielfach erfolgreich, teilweise sogar drastisch erhöht (Burton *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2013; Whitehouse *et al.*, 2012). Analog könnte auch ein durch die teilweise Anpassung der Tertiärstruktur verbesserter Substratbindemodus in AlkB dazu beitragen, die Tendenz zur Weiteroxidation des entstehenden Alkohol-Intermediates zu reduzieren. Die gezielte Manipulation von AlkB auf molekularer Ebene wird dabei durch die bislang trotz großen Bemühungen nicht aufgeklärte dreidimensionale Struktur des Enzyms erschwert (Ramu *et al.*, 2011).

Gemäß biochemischen Untersuchungen handelt es sich bei AlkB um ein in der cytoplasmatischen Zellmembran lokalisiertes Membranprotein mit sechs Transmembranhelices (TMHs), dessen Handhabung *in vitro* als äußerst sensibel beschrieben wird (Staijen *et*

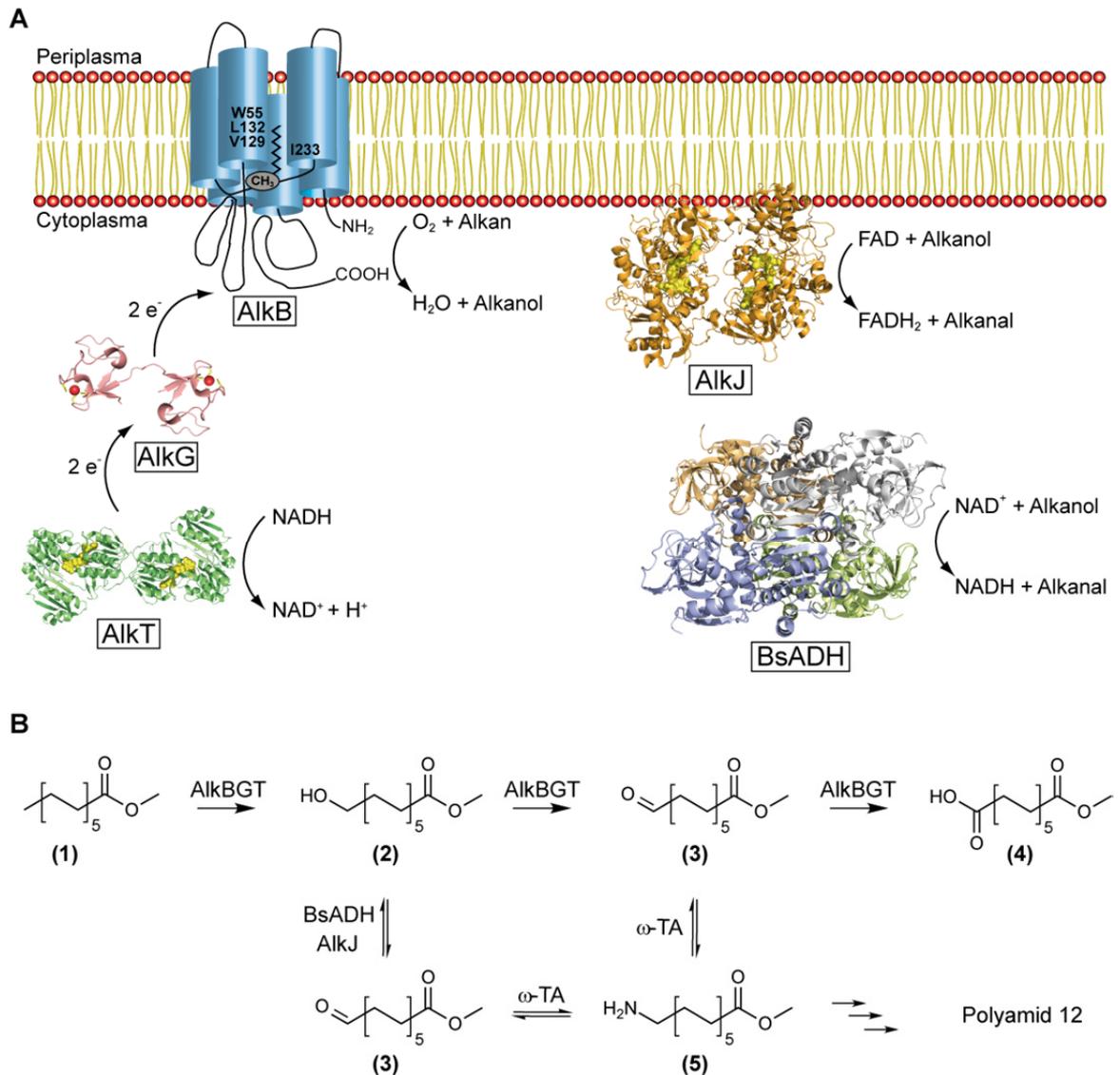
*al.*, 2000; Peters & Witholt, 1994). Bisherige Versuche, AlkB durch *Enzyme-Engineering* anzupassen, beruhten auf vergleichenden Sequenzanalysen sowie Zufallsmutagenese-Ansätzen und erfolgten durch Charakterisierung von die jeweiligen AlkB-Mutanten überproduzierenden *E. coli*-Zellen.

So wurde durch Zufallsmutagenese Trp55 als die Aminosäure bestimmt, welche den Substratbindekanal innerhalb der Lipiddoppelschicht „deckelt“ und damit die Substratkettenlänge limitiert (van Beilen *et al.*, 2005). Durch Evolution *in vivo* wurden außerdem die ebenfalls in den TMHs befindlichen Positionen Val129, Leu132 sowie Ile233 als für die Substratdiskriminierung verantwortlich identifiziert (Koch *et al.*, 2009). Trotz einer fehlenden Kristallstruktur von AlkB oder verwandten Enzymen eröffnen diese Anhaltspunkte in Verbindung mit einer eingehenden bioinformatischen Analyse der Primärstruktur die Möglichkeit, für den katalytischen Mechanismus essentielle und damit auch für die Produktselektivität relevante Aminosäureabschnitte zu identifizieren und durch Mutagenese potentiell vorteilhaft zu verändern.

Eine weitere Alternative um die Überoxidation des Substrats bei der biotechnologischen Produktion des PA 12-Monomers ALSMe zu verringern, stellt der simultane Einsatz einer spezifischen, mit AlkB um das HLSMe-Intermediat konkurrierenden Alkohol-Dehydrogenase (ADH) dar. Diese könnte bei einer höheren Substrataffinität das durch AlkB generierte und freigesetzte HLSMe mit hoher Geschwindigkeit spezifisch zu OLSMe oxidieren und damit der weiteren Überoxidation durch AlkB entziehen (Abbildung 2). Durch die so erhöhte OLSMe-Konzentration würde die Transaminase-Reaktion beschleunigt, was in einer verbesserten Prozessökonomie resultieren sollte.

## **1.5 Eine nichtkanonische Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Pseudomonas putida***

Neben AlkB ist die ebenfalls auf dem *alk*-Operon von *P. putida* GPo1 codierte Alkohol-Dehydrogenase AlkJ grundsätzlich in der Lage, den bei der initialen Hydroxylierung von Alkanen entstehenden primären Alkohol zum Aldehyd weiterzuoxidieren (Benson & Shapiro, 1976), möglicherweise sogar mit einer für die industrielle Herstellung von PA 12-Bausteinen besser geeigneten Produktspezifität. Bis zur vorliegenden Arbeit wurde AlkJ nicht isoliert, weshalb die bislang verfügbaren Erkenntnisse zu diesem Enzym auf bioinformatischen Analysen sowie biochemischen Untersuchungen von Zellextrakten beruhen. So wurde AlkJ auf Basis seiner Aminosäuresequenz in die heterogene Familie der Glucose-Methanol-Cholin-(GMC)-Oxidoreduktasen eingruppiert (Cavener, 1992). Das Hauptmerkmal dieser Enzymfamilie, die mehrere NAD-unabhängige Oxidasen, Lyasen und Dehydrogenasen umfasst ist deren konservierte Flavin/Adenin-Dinukleotid (FAD)-Bindedomäne.



**Abbildung 2.** In dieser Arbeit verwendete Proteine und Substrate. (A) Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme. Die aus *Pseudomonas putida* GPO1 stammende in der inneren bakteriellen Zellmembran lokalisierte Monooxygenase AlkB (Modell abgeändert aus Rojo, 2005) wird über ihre beiden löslichen Redoxpartner, das Rubredoxin AlkG (abgeändert aus PDB ID: 1S24) in Kombination mit der Rubredoxin-Reduktase AlkT (Homolog aus *P. aeruginosa*, PDB ID: 2V3B) mit Reduktionsäquivalenten versorgt. Die vermutete, durch  $\alpha$ -helikale Abschnitte innerhalb der Membran dominierte AlkB-Tertiärstruktur mit der angenommenen Positionierung des Alkansubstrats ist durch blaue Zylinder dargestellt; bisher identifizierte, die Substratbindung beeinflussende Positionen sind gemäß ihrer relativen Positionierung innerhalb der Transmembranhelices gekennzeichnet. Das bei der Hydroxylierung entstehende Alkoholintermediat kann durch die ebenfalls im *alk*-Operon von *P. putida* GPO1 codierte Alkohol-Dehydrogenase (ADH) AlkJ (Homologiemodell, Dr. Alexander Jarasch) spezifisch zum Aldehyd oxidiert werden. Außerdem wurde die Eignung einer ADH aus *Geobacillus stearothermophilus* (BsADH, PDB ID: 1RJW) für die selektive Weiteroxidation des durch AlkBGT zunächst gebildeten Alkohols untersucht. (B) Erweitertes Reaktionsschema der biotechnologischen Herstellung von  $\omega$ -Aminolaurinsäure-Methylester (5). Das pflanzenölbasierte Substrat Laurinsäure-Methylester (1) wird zunächst durch das regioselective Monooxygenasesystem AlkBGT terminal hydroxyliert. Der entstehende  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (2) kann entweder durch Überoxidation mittels AlkB oder aber, mit höherer Spezifität, über eine ADH (AlkJ oder BsADH) zum  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester (3) weiteroxidiert werden. Dieses Oxo-Intermediat kann durch Transaminierung in Gegenwart eines geeigneten Aminodonors durch eine  $\omega$ -Transaminase ( $\omega$ -TA) in das gewünschte Produkt (5) umgewandelt werden, welches einen Synthesebaustein für die Herstellung von Polyamid-12 darstellt. Im Lauf der weiteren Überoxidation konkurriert AlkBGT mit der  $\omega$ -TA um (3), was zur Bildung von  $\alpha,\omega$ -Dodekandisäure-Monomethylester (4) als unerwünschtem Nebenprodukt führt. Diese Nebenreaktion kann möglicherweise verringert werden, indem a) durch *Protein-Engineering* die Produktselektivität des AlkBGT-Systems erhöht wird oder b) das Intermediat (2) dem Fließgleichgewicht durch kombinierte Aktivität einer ADH und der  $\omega$ -TA entzogen wird.

Einige dieser GMC-Enzyme gelten als vielversprechende Kandidaten für die industrielle Anwendung (Goswami *et al.*, 2013) oder werden bereits praktisch eingesetzt, wie etwa die Glucose-Oxidase (Bankar *et al.*, 2009) oder die Cholesterin-Oxidase (Pollegioni *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu anderen Genprodukten des *alk*-Operons ist vergleichsweise wenig über die biochemischen sowie enzymkinetischen Eigenschaften von AlkJ bekannt. Benson und Shapiro (1976) konnten als erste die über den *alk*-Gencluster vermittelte ADH-Aktivität eindeutig AlkJ zuordnen. Anhand von Aktivitätsmessungen mit der Membranfraktion von transformierten *P. putida* oder *E. coli*-Bakterien wurde in darauf folgenden Untersuchungen von van Beilen *et al.* (1992a) die prinzipielle Reaktions- und Substratspezifität von AlkJ für mittel- bis langkettige aliphatische Alkohole nachgewiesen. Auf der Grundlage von Sequenzvergleichen mit der homologen Polyethylenglycol-Dehydrogenase wurde für das Genprodukt des 558 Aminosäuren kodierenden Leserahmens von *alkJ* eine homodimere Quartärstruktur angenommen (Ohta *et al.*, 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass AlkJ im Gegensatz zu anderen GMC-Enzymen eine ausgeprägte Membranaffinität aufweist, was die gentechnische Produktion und funktionelle Reinigung eines Proteins generell erschwert (Tan *et al.*, 2008). In der Tat wurde die Halbwertszeit von heterolog produziertem, in Membranpräparation angereichertem AlkJ unter optimierten Bedingungen zu lediglich 30 min bestimmt (van Beilen *et al.*, 1992a), was eine Neukonzeption der Anreicherungsstrategie nötig erscheinen lässt.

Aufgrund von Sequenzvergleichen mit bereits charakterisierten homologen Enzymen sowie enzymatischen Tests mit Zellextrakten wurde für AlkJ eine Kopplung an die bakterielle Atmungskette über Ubichinon und Cytochrom c postuliert (Chen *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde daher – vor allem mit Hinblick auf einen potentiellen Einsatz von AlkJ bei der biotechnologischen Produktion von ALSMe – die erstmalige Reinigung und Charakterisierung des membranassoziierten Enzyms nach dessen heterologer Produktion in *E. coli* angestrebt.

## **1.6 BsADH – eine thermostabile Oxidoreduktase aus *Geobacillus stearothermophilus***

Für die selektive Oxidation von HLSMe zum Aldehyd wurde in der vorliegenden Arbeit neben AlkJ eine weitere Alkohol-Dehydrogenase aus dem moderat thermophilen, Gram-positiven Bakterium *Geobacillus stearothermophilus* (BsADH) untersucht (Cannio *et al.*, 1994). Dieses Enzym ist in die Klasse der zinkhaltigen *Medium Chain Dehydrogenases/Reductases* (MDR) eingruppiert (Auld & Bergman, 2008) und weist, analog zu typischen ADHs aus Bakterien und Pilzen (Littlechild *et al.*, 2004), eine homotetramere Quartärstruktur aus 339 Aminosäuren großen Untereinheiten auf. Dabei besitzen die zwei Dimer-Paare hohe strukturelle Ähnlichkeit mit homodimeren eukaryotischen ADHs (Jörnvall, 2008). Pro

BsADH-Monomer sind zwei Zinkionen gebunden: ein strukturell relevantes, von vier Cysteinresten koordiniertes Zinkion, welches unter anderem an der Ausbildung der korrekten Quartärstruktur beteiligt ist (Ceccarelli *et al.*, 2004) sowie ein durch zwei Cysteinreste und einen Histidinrest gebundenes katalytisch essentielles Zinkion, das zur Polarisierung des Substrats beiträgt. Jede Untereinheit ist in zwei funktionelle Domänen aufgeteilt: Während der Sequenzabschnitt von Position 150 bis 285 die Cofaktor-Bindedomäne umfasst, sind die Reste 1 bis 149 sowie 286 bis 339 für die katalytische Aktivität verantwortlich (Ceccarelli *et al.*, 2004).

Die NADH-abhängige BsADH weist hohe Stabilität gegenüber ionischen Detergenzien, organischen Lösungsmitteln wie auch chaotropen Reagenzien auf und kann außerdem bei Temperaturen bis zu 65 °C eingesetzt werden (Shim *et al.*, 2003). Diese Eigenschaften machen die BsADH zu einem vielversprechenden Kandidaten für die industrielle Biokatalyse, insbesondere da erhöhte Prozesstemperaturen – wie bei der enzymatischen Herstellung von Fruktosesirup oder der Hydrolyse von Cellulose – zur Verbesserung der Prozessökonomie beitragen können (Illanes, 1999). Außerdem gehen hohe Temperaturen mit einem verringerten Kontaminationsrisiko bei mikrobiell belastetem Ausgangsmaterial einher; zum anderen wird die Löslichkeit von hydrophoben Substraten und Produkten oftmals verbessert. Zusätzlich sinkt mit steigenden Temperaturen die Viskosität der Reaktionslösung, was die Aktivität des Biokatalysators aufgrund der durch die erhöhte Diffusion verbesserte Substratverfügbarkeit steigert. Als weiterer Vorteil muss außerdem für die Kühlung des Bioreaktors weniger Energie aufgewendet werden (Iyer & Ananthanarayan, 2008).

Obwohl die heterologe Überproduktion der BsADH in *E. coli* bereits in den 90er-Jahren beschrieben wurde, erschienen die ersten Studien, welche das Anwendungspotential der BsADH für die industrielle Biokatalyse abhandelten, erst in jüngerer Zeit. So wurde die BsADH aufgrund ihres breiten Substratspektrums sowohl für primäre als auch für sekundäre Alkohole bei der enzymatischen Mehrstufensynthese der Plattformchemikalien Ethanol sowie Isobutanol aus Glucose eingesetzt (Guterl *et al.*, 2012). Außerdem wurde das Enzym für die Herstellung von Zimtalkohol (Pennacchio *et al.*, 2013a) sowie die Enzym-gekoppelte NADH-Regenerierung bei der biokatalytischen Umsetzung von Mandelsäure und 2-Chlormandelsäure bei hohen Temperaturen benutzt (Pennacchio *et al.*, 2011). In einer weiteren aktuellen Arbeit wurden BsADH-enthaltende zellfreie Extrakte für die Synthese von Alkanonen sowie Alkandionen verwendet (Sattler *et al.*, 2012).

Trotz der generell hohen Stabilität gegenüber Chemikalien sowie hohen Temperaturen werden die Einsatzmöglichkeiten der BsADH – insbesondere als isoliertes Enzym – von der Instabilität unter oxidierenden Bedingungen eingeschränkt. Die BsADH scheint anfällig hinsichtlich oxidativen Modifizierungen und benötigt ein reduzierendes Puffermilieu (z.B.

durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol), um ihre enzymatische Aktivität während der Lagerung aufrecht zu erhalten (Guagliardi *et al.*, 1996; Pennacchio *et al.*, 2013b).

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten das Monooxygenasesystem AlkBGT einschließlich der Alkohol-Dehydrogenase AlkJ aus *P. putida* GP01 sowie die BsADH aus *Geobacillus stearothermophilus* hinsichtlich ihres Potentials für die enzymatische Synthese von  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester sowie  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester untersucht werden. Hierzu mussten zunächst für alle Proteine die heterologe Produktion in *E. coli* und jeweils eine geeignete Reinigungsstrategie etabliert werden, um die Enzyme biochemisch charakterisieren und gegebenenfalls durch *Protein-Engineering* optimieren zu können. Erwartet wurden Erkenntnisse zum grundlegenden Verständnis der Funktionalisierung von Alkanen in *P. putida* sowie hinsichtlich der Einsatzmöglichkeiten und Potentiale der untersuchten Enzyme für die biotechnologische Herstellung von Polyamid-12 bzw. seiner Monomerbausteine.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

##### Escherichia coli-Stämme

BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) (Studier & Moffatt, 1986)
MACH1	F <sup>-</sup> , $\Delta$ <i>recA1398</i> , <i>endA1</i> , <i>tonA</i> Φ81, <i>lacZ</i> ΔM15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>hsdR</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) Life Technologies, Darmstadt
W3110	F <sup>-</sup> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rph-1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> Evonik Industries, Marl
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 [F': <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10 (tet <sup>r</sup> )] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

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

##### Vektoren

pACYCDuet-1-AlkJ	Evonik Industries, Marl
pASK-IBA5(+)	IBA, Göttingen
pASK-IBA5(+)-AlkT	Prof. Dr. Arne Skerra, TU München
pASK-IBA35(+)	IBA, Göttingen
pASK75-AlkB	Prof. Dr. Arne Skerra, TU München
pBT10	(Schrewe <i>et al.</i> , 2011)
pET21a-BsADH	Evonik Industries, Marl
pET21b-AlkG	Prof. Dr. Arne Skerra, TU München

## 2.1.2 Oligodesoxynukleotide

### Als Sequenzierprimer und zur Amplifizierung von Genen

BsADH-fw	5' -GCCAAAGCAGCAGTTGTGGAACAG-3'
BsADH-rv	5' -GGTGCTAAGCTTATTTATCTTCCAGGGTCAGAAC-3'
AlkJ-fw	5' -GCCTACGACTATATAATCGTTGGTGCTG-3'
AlkJ-rv	5' -CCCCCTAAGCTTACATGCACACGGCGATCATGGCCAACTCTAGCTCTG-3'
AlkJ-short-rv	5' - ATGCTTAAGCTTAAAGATTCCGCATAATTATTTC-3'
AlkB-rv	5' -GCTTTACGATGCTACCGCAGAG-3'
D20	5' -CCACTCCCTATCAGTGAT-3'
PR1	5' -CGCAGTAGCGGTAAACG-3'

### Zur QuikChange-Mutagenese

AlkB V129M-fw	5' -GTCACTGGGTATCATGAACGGACTAGCG-3'
AlkB V129M-rv	5' -CGCTAGTCCGTTTCATGATACCCAGTGAC-3'
AlkB L132V-fw	5' -ATCGTGAACGGAGTGGCGCTCAATACAG-3'
AlkB L132V-rv	5' -CTGTATTGAGCGCCACTCCGTTACGAT-3'
AlkB T136A-fw	5' -CTAGCGCTCAATGCGGGACACGAACTC-3'
AlkB T136A-rv	5' -GAGTTCGTGTCCCGCATTGAGCGCTAG-3'
AlkB K144A-fw	5' -CTCGGTCACAAGGCGGAGACTTTTGATC-3'
AlkB K144A-rv	5' -GATCAAAAGTCTCCGCCTTGTGACCGAG-3'
AlkB I166A-fw	5' -GGTCACTTCTTTGCGGAGCATAATAAG-3'
AlkB I166A-rv	5' -CTTATTATGCTCCGCAAAGAAGTGACC-3'
AlkB D175A-fw	5' -GGTCATCACCGTGCGGTCGCTACACC-3'
AlkB D175A-rv	5' -GGTGTAGCGACCGCACGGTGATGACC-3'
AlkB Q310A-fw	5' -CTGTTCCACCTTGCGCGGCACTCGGAT-3'
AlkB Q310A-rv	5' -ATCCGAGTGCCGCGCAAGGTGGAACAG-3'
AlkB P319A-fw	5' -CACCACGCGCATGCGACACGTTCTTATC-3'
AlkB P319A-rv	5' -GATAAGAACGTGTCGCATGCGCGTGGTG-3'
BsADH C35S-fw	5' -CGTATTAAAGCCAGCGGTGTTTGTACATACC-3'

BsADH C35S-rv 5' -GGTATGACAAACACCGCTGGCTTTAATACG-3'  
 BsADH C124T-fw 5' -GTTATGCAGAATATACCCGTGCAGCAGC-3'  
 BsADH C124T-rv 5' -GCTGCTGCACGGGTATATTCTGCATAAC-3'  
 BsADH M187L-fw 5' -GTATGCAAAAGCACTGGGTCTGAATGTTG-3'  
 BsADH M187L-rv 5' -CAACATTCAGACCCAGTGCTTTTGCATAC-3'  
 BsADH C257L-fw 5' -CGTGGTGGTGCCTGGTTCTGGTTGG-3'  
 BsADH C257L-rv 5' -CCAACCAGAACCAGTGCACCACCACG-3'  
 BsADH M267L-fw 5' -CCTCCGGAAGAAGTCCGATTCCGATTTTTG-3'  
 BsADH M267L-rv 5' -CAAAAATCGGAATCGGCAGTTCTTCCGGAGG-3'

#### Zur Randomisierung mittels *Error-Prone* PCR

AlkB-epPCR-fw 5' -GGAAGCTCAGCCAATGTCTTGGCTTGAAA-3'  
 AlkB-epPCR-rv 5' -CCTACGACAGCCAACACAATTTTTGGCC-3'

#### Zur Randomisierung mittels ortsgerichteter Sättigungsmutagenese

AlkB V129N-fw 5' -ACGGACTAGCGCTCAATAC-3'  
 AlkB V129N-rv 5' -GAGCGCTAGTCCGTTSNNGATACCCAGTGACA-3'  
 AlkB L132N-fw 5' -CGCTCAATACAGGACACGAAC-3'  
 AlkB L132N-rv 5' -CCTGTATTGAGCGCSNNTCCGTTTACGATAC-3'  
 AlkB T136N-fw 5' -GACACGAACTCGGTCACAAG-3'  
 AlkB T126N-rv 5' -CCGAGTTCGTGTCCSNNATTGAGCGCTAGTCCG-3'

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific, Ulm in RP-HPLC-gereinigter Form bezogen.

### **2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine**

#### Enzyme zur Genklonierung

Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot New England Biolabs, Schwalbach
Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

T4 DNA-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
Herculase II Fusion DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
<i>Pfu</i> Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach

#### Größenmarker zur Kalibrierung von Größenausschlusschromatographiesäulen

Alkohol-Dehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\beta$ -Amylase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Carboanhydrase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Cytochrom c	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

#### **2.1.4 Chemikalien**

Aceton, (Pestilyse)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Stammlösung, 30 %ig, mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese-Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose für die Gelelektrophorese	Bio&SELL, Feucht bei Nürnberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Amp)	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetrazyklin (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	AppliChem, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Coenzym Q <sub>0</sub> (2,3-dimethoxy-5-methyl- 1,4-benzoquinon)	TCI, Eschborn

---

Coenzym Q <sub>1</sub> (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-bezoquinon)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Coomassie Brilliantblau R250	Carl Roth, Karlsruhe
2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP)	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol p.a.	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethylacetat, (Pestilyse)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 % [w/v] in Wasser)	AppliChem, Darmstadt
Flavin/Adenin-Dinukleotid (FAD)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin, 99 %	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
HABA (2'-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Imidazol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kaliumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin A	Carl Roth, Karlsruhe

---

Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
MSTFA (N-Methyl-N-[trimethylsilyl]- Trifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Nickelsulfat	AppliChem, Darmstadt
NAD <sup>+</sup> (Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form)	Carl Roth, Karlsruhe
NADH (Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form)	Carl Roth, Karlsruhe
Oktaethylglycol Monododecylether (C12E8)	Anatrace, Maumee, OH, USA
<i>n</i> -Oktyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (OG)	Carl Roth, Karlsruhe
Phenazinmethosulfat (PMS)	AppliChem, Darmstadt
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylen- diamin)	AppliChem, Darmstadt
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
TRIS (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe
Zinksulfat	Carl Roth, Karlsruhe

### 2.1.5 Enzymsubstrate, Standards und Kits

#### Enzymsubstrate & Standards für die Gaschromatographie

1-Propanal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1-Butanal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

1-Butanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1-Hexanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<i>n</i> -Octan	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1-Octanal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1-Octanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1-Octansäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<i>n</i> -Dekan	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<i>n</i> -Dodekan	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\omega$ -Laurinsäure-Methylester (LSMe)	Evonik Industries, Marl
$\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe)	Evonik Industries, Marl
$\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester (OLSMe)	Evonik Industries, Marl
$\omega$ -Dodekandisäure-Monomethylester (DDSMe)	Evonik Industries, Marl

### Größenstandards

1 kb GeneRuler	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
100 bp GeneRuler	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
6× DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

### Kits

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	PerkinElmer, Rodgau
GeneMorph II Random Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kit	Promega Corp., Madison, WI, USA
ZR DNA Sequencing Clean-up Kit	Zymo Research Europe, Freiburg

### 2.1.6 Geräte

#### Elektrophorese

Beleuchtungstisch T13	Biometra, Göttingen
HE33 Submarine (DNA-Auftrennung)	Hoefer, Holliston, MA, USA
Minigel-Twin (Protein-Auftrennung)	Biometra, Göttingen
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Scanner Perfection V700	Epson, Meerbusch
UV-Transilluminator TI 3 (254 nm)	Biometra, Göttingen

#### Inkubatoren

Friocell Typ 55	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Incucell Typ LSIS-B2V/IC 111	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg

#### Proteinreinigung

Äkta Purifier	GE Healthcare Europe, Freiburg
Detektor 2138 Uvicord SII	GE Healthcare Europe, Freiburg
Fraktionssammler Redifrac	GE Healthcare Europe, Freiburg
Peristaltische Pumpe P1	GE Healthcare Europe, Freiburg
Signalschreiber Rec 112	GE Healthcare Europe, Freiburg

#### Pipetten und Pipettierhilfen

Gilson P10, P200, P1000	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
8-fach Mehrkanalpipette Research, 30 – 300 µl	Eppendorf, Hamburg
8-fach Mehrkanalpipette Research Pro, 50 – 1200 µl	Eppendorf, Hamburg
8-fach Mehrkanalpipette Research Plus, 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
12-fach Mehrkanalpipette Research Plus, 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg

Accu-jet	Brand, Wertheim
Repetierpipette Multipette	Eppendorf, Hamburg

#### Schüttelinkubatoren und -apparate

Minitron	Infors, Bottmingen, Schweiz
Multitron	Infors, Bottmingen, Schweiz
ThermoMixer R	Eppendorf, Hamburg

#### Spektroskopie

CD-Spektropolarimeter Jasco J-810	Jasco Deutschland, Gross-Umstadt
Microplatereader Synergy 2	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Photodiodenarray-Photometer S-3100	Scinco, Seoul, Südkorea
Spektrophotometer Ultrospec 2100	GE Healthcare Europe, Freiburg
Spektrophotometer Ultrospec 3000	GE Healthcare Europe, Freiburg

#### Zentrifugen

Eppendorf 5418R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf MiniSpinR	Eppendorf, Hamburg
Sigma 4K10 mit Rotoren 11122 und 11133	Sigma, Osterode
Sigma 4-16K mit Rotoren 11122 und 11133	Sigma, Osterode
Sorvall Discovery 100 mit Rotor T890	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sorvall RC6 plus mit Rotoren SS-34, SLA-3000 und 4X1L LEX	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

#### Sonstige Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	PerkinElmer, Rodgau
Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, Oberschleißheim
Gaschromatograph Clarus500	PerkinElmer, Rodgau

Homogenisator Potter S (5 ml, 30 ml)	B. Braun, Melsungen
Pipettierroboterstation LabStar plus	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Inkubatorschrank Fame	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Wasserbad WKL 2000	Lauda Dr. R. Worbser, Lauda-Königshofen
Reinstwasseranlage Synergy 185	Merck, Darmstadt
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie II mit Turbomix Aufsatz	Scientific Industries, New York, USA
Zellhomogenisator <i>French Press</i>	SLM Aminco, Urbana, IL, USA

### 2.1.7 Verbrauchsmaterial

#### Chromatographie-Säulen und Material

Ni-Sepharose High Performance	GE Healthcare Europe, Freiburg
OPTIMA FFAPplus GC-Kapillarsäule	Macherey-Nagel, Düren
OPTIMA 5 HT GC-Kapillarsäule	Macherey-Nagel, Düren
PD-10 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare Europe, Freiburg
Resource Q, (6 ml Bettvolumen)	GE Healthcare Europe, Freiburg
<i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	IBA, Göttingen
Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade	GE Healthcare Europe, Freiburg

#### Kunststoffgefäße

Deep Well Block, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte 96-Well, Flachboden	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte 96-Well, Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen, ø 94 mm, PS	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen, ø 150 mm, PS	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen eckig	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Reaktionsgefäß dünnwandig, 0,2 ml	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Vorlegegefäße für Hamilton Workstation	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
Zentrifugengefäße für Rotoren SS34, SLA 3000, 4X1L LEX, T-890	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

### Sonstige Verbrauchsartikel

Atmungsaktive Verschlussfolie für Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dispenser-Tips	Brand, Wertheim
Dialyseschlauch Typ 27, MWCO 12-16 kDa	Biomol, Hamburg
Einwegspritzen „Inkjet“, versch. Größen	B. Braun, Melsungen
Konzentratoren Amicon Ultra, MWCO 10 und 30 kDa	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pipetenspitzen:	
Blau (200 – 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Gelb (5 – 200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Transparent (0,1 – 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Hamilton Workstation (10, 50, 300 & 1000 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Probenfläschchen für die GC, Typ N9 mit Insets, 0,25 ml	Macherey-Nagel, Düren
Quarzküvetten für die Spektroskopie	Hellma, Müllheim
Sterilfilter Filtropur (0,45 und 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Verschlussmatte für Deep Well Blocks	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Sämtliche Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Proteinen und DNA wurden zur Sterilisierung entweder autoklaviert oder filtriert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, für deren Herstellung Leitungswasser verwendet wurde, wurden alle Lösungen mit entionisiertem Wasser angesetzt. Kulturplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt, Lösungen bei Raumtemperatur. Der Zusatz von Antibiotika zu Flüssigmedien erfolgte erst unmittelbar vor deren Gebrauch.

#### Stammlösungen (Aufbewahrung bei -20 °C)

Ampicillin	100 mg/ml in 50 % Ethanol (1:1000 zum Medium)
Anhydrotetrazyklin	2 mg/ml in Isopropanol, (1:10000 zum Medium)
Kanamycin	50 mg/ml in dest. Wasser (1:1000 zum Medium)
IPTG	1 M in dest. Wasser (1:1000 zum Medium)

#### LB Medium (Sambrook & Russell, 2001)

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

Mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.

#### TB-Medium (Sambrook & Russell, 2001)

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

Alle Komponenten wurden in Leitungswasser gelöst, bis zu einem Endvolumen von 900 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Vor Verwendung wurden 100 ml 0,72 M  $K_2HPO_4$ , 0,17 M  $KH_2PO_4$  in entionisiertem Wasser als sterilfiltrierte Lösung zugegeben.

#### TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

1× SDS-Laufpuffer (Fling & Gregerson, 1986)

Tris/HCl (pH 8,3)	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l

4× Lower-Tris

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

4× Upper-Tris

Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 M
SDS	4 g/l

5× SDS-Auftragspuffer

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

Färbelösung

Coomassie Brilliantblau R-250	0,25 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)

Entfärbelösung

Wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Chromatographiepuffer für die SAC von AlkB

NaP <sub>i</sub> (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM

Für die Elution wurde der Puffer mit 2,5 mM D-Desthiobiotin versetzt; alle nach der Solubilierung verwendeten Puffer enthielten 0.025 % (w/v) DDM.

Chromatographiepuffer für die AEX von AlkG

MES/NaOH (pH 6,0)	20 mM
-------------------	-------

Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0 auf 1 M NaCl.

Chromatographiepuffer für die SAC von AlkT

Tris/HCl (pH 8,0)	100 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 mM

Für die Elution wurde der Puffer mit 2,5 mM D-Desthiobiotin versetzt.

Chromatographiepuffer für die IMAC sowie SEC von AlkJ

NaP <sub>i</sub> (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 8,0)	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Die Elution bei der IMAC erfolgte durch einen linearen Imidazolgradienten bis 300 mM, alle nach der Solubilierung verwendeten Puffer (IMAC, SEC) enthielten 0,025 % (w/v) DDM.

Chromatographiepuffer für die SAC sowie SEC von BsADH

NaP <sub>i</sub> (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,0)	50 mM
Glycerin	10 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 mM

Für die Elution wurde der Puffer mit 2,5 mM D-Desthiobiotin versetzt; bei der Größenausschlusschromatographie wurde der Puffer zusätzlich mit 150 mM NaCl versetzt.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Teile der am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München etablierten Standardarbeitsvorschriften sind in aktualisierter und ergänzter Form an frühere Dissertationen der Arbeitsgruppe angelehnt (Schlapschy, 2002; Breustedt, 2008; Gebauer, 2013).

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

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C gelagert und für bis zu vier Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium oder TB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Es wurden Volumina von 3 ml in 13 ml Kulturröhrchen, 50 ml in 100 ml Kulturkolben mit belüfteter Metallkappe, sowie 2 l in 5 l-Erlenmeyerkolben mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 l wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtkultur inokuliert.

Vorkulturen für die Proteinproduktion wurden bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Bei 2 l-Kulturen fand die Inkubation bei Temperaturen von 22 bis 37 °C ebenfalls unter Schütteln bei 180 rpm statt. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm ( $OD_{550}$ ) mit Hilfe eines Ultrospec 2100 Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten  $\geq 1$  wurden die Zellsuspensionen nach entsprechender Verdünnung in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen. Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurden 0,5 ml einer stationären Übernachtkultur in Selektivmedium mit 1 ml hitze-sterilisiertem 87 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt.

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

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA müssen *E. coli*-Zellen in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde die klassische  $CaCl_2$ -Methode (Sambrook & Russell, 2001) eingesetzt, wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca.  $10^5$  bis zu  $10^7$  Transformanden pro  $\mu g$  des Standardvektors pUC19 erhalten werden. 50 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtkultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von  $OD_{550} = 0,5$  wurde die Kultur in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen durch

Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, 15 min) vom Medium getrennt. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskalter 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (s. oben) wurde das erhaltene Sediment in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 µl entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C eingefroren. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt. Zur eigentlichen Transformation wurden 200 µl der auf Eis gehaltenen bzw. aufgetauten Zellsuspension mit 1 bis 2 µl Plasmid-DNA-Lösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin für 42 s bei 42 °C im Heizblock erwärmt und mit 800 µl LB-Medium versetzt. Die Bakterien wurden anschließend für 45 min bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 5 bis 200 µl auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert. Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

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

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firma Qiagen verwendet. Diese beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Bimboim & Doly, 1979), gefolgt von der reversiblen Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (Anionenaustauscher oder Silicagel). Für die Analyse von Transformatanten nach Gen-Klonierungen erfolgte die Plasmidisolierung mittels des QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kits. Dazu wurde eine stationäre 3 ml-Übernachtskultur verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA betrug bei diesem Präparationsverfahren 5 bis 15 µg DNA. Für die präparative Plasmid-Isolierung wurde eine stationäre 50 ml Übernachtskultur verwendet und die Plasmid-DNA mittels eines Plasmid Midi Kits nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Hierbei betrug die Ausbeute an Plasmid gewöhnlich ca. 100 µg in 100 µl TE-Puffer. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert und ohne weitere Aufarbeitung zur Spaltung mit Restriktionsenzymen eingesetzt.

### 2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden im allgemeinen Gele mit 1 % (w/v) Agarose verwendet. Dazu wurde 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Die entstandene klare Lösung wurde anschließend zum Abkühlen stehengelassen. Zu der noch gut handwarmen Lösung wurde 1/10000 Volumen (1 % [w/v]) Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Die Flüssigkeit wurde zum Durchmischen kurz geschwenkt und sofort in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformern gegossen.

Die Abmessungen des Gels betragen 10,5 cm in der Länge, 7,5 cm in der Breite und ca. 0,5 cm in der Dicke. Nach dem Erstarren wurde das Agarose-Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Geltaschenformer entfernt. Die Beladung der Taschen erfolgte mit geeigneten Volumina der jeweiligen DNA-Lösung, welche vorher mit 6× DNA-Auftragspuffer versetzt wurde. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 bis 90 V betrieben. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

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

### **2.2.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA**

Durch PCR amplifizierte oder durch Mutagenese veränderte DNA-Abschnitte wurden der Sequenzanalyse unterzogen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.*, (1977) unter Verwendung eines ABI Prism 310 Genetic Analyzer sequenziert. Eine lineare PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt, wobei ca. 0,2 µg Plasmid-DNA und 2 pmol eines als Primer dienenden Oligodesoxynukleotids mit 4 µl des BigDye Terminator Reaktionsmixes vereinigt wurden. Diese Mischung enthält Puffersubstanzen, thermostabile DNA-Polymerase, Desoxynukleotide sowie fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in geeigneten Konzentrationen. Zur Amplifizierung wurden 25 Zyklen von 30 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C durchgeführt. Anschließend wurden nicht umgesetzte Nukleotide, Primer, Puffersubstanzen sowie DNA Polymerasen mit Hilfe des ZR DNA Sequencing Clean-up Kits abgetrennt. Die erhaltene DNA-Lösung wurde in ein 0,5 ml-Gefäß überführt, dieses mit einem Septum verschlossen und zur Analyse in das Sequenziergerät eingesetzt. Alternativ wurde doppelsträngige DNA durch den Anbieter Eurofins Genomics, Ebersberg, sequenziert.

## **2.3 In-vitro-Modifizierung von DNA**

### **2.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie die Präparation von DNA-Fragmenten wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Wahl des Puffersystems sowie der Temperatur für die enzymatische Hydrolyse erfolgte nach den jeweiligen Empfehlungen des Herstellers. Im Fall divergierender Pufferpräferenzen wurde bei simultan durchgeführten Spaltungen durch zwei Enzyme die eingesetzte Enzymmenge des weniger aktiven Enzyms nach oben angeglichen. Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab wurde üblicherweise mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und 1 bis 2 U einer oder von je zwei Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug typischerweise 1 bis 2 h bei der für die jeweiligen Endonukleasen empfohlenen Temperatur. Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in ähnlicher Weise durchgeführt, jedoch in Reaktionsvolumina von bis zu 75 µl mit bis zu 15 µg Plasmid-DNA und geeigneten Mengen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

### **2.3.2 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA**

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden wurde zur Unterbindung intramolekularer Rezirkularisierung und Bildung von Konkameren das Vektorfragment dephosphoryliert und das zu inserierende PCR-Fragment phosphoryliert. Die Dephosphorylierung des Vektorfragments wurde mit Alkalischer Phosphatase (AP) aus arktischen Garnelen durchgeführt, welche sich durch Hitze leicht inaktivieren lässt. Hierzu wurden zum Verdau des Vektors bei 37 °C 5 U AP zugegeben. Das Enzym wurde anschließend durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und das dephosphorylierte Vektorfragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4) isoliert.

Das zu klonierende PCR-Fragment wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) an den 5'-Enden phosphoryliert. Dazu wurde das isolierte Genfragment in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 3 µl 10× T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer (Fertiglösung des Herstellers), 3 µl 10 mM ATP sowie 5 U PNK versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die PNK durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese von dem DNA-Fragment abgetrennt.

### **2.3.3 Ligierung von DNA-Fragmenten**

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten oder durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Ligierungsreaktionen wurden üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 25 °C oder 4 °C für 2 bis 20 h durchgeführt. Für einen

Standardansatz wurden dazu 2 µl 10× Ligasepuffer (Fertiglösung des Herstellers), 1 µl T4 DNA-Ligase (1 bis 4 Weiss U/µl) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. 5 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

#### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen

Die Amplifizierung von DNA wurde mit Hilfe der PCR (Saiki *et al.*, 1988) durchgeführt. Die dafür als Primer eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Von der Matrizen-DNA abweichende Sequenzen konnten gezielt erzeugt werden, indem Oligodesoxynukleotide verwendet wurden, die stromaufwärts dieser Hybridisierungsregion an definierten Positionen andere Basen aufwiesen. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten bei Klonierungen wurden die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase sowie die Herculase II Fusion DNA-Polymerase oder der jeweils vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden für eine PCR jeweils 0,2 µM der jeweiligen Primer sowie jeweils 0,2 µM der vier dNTPs eingesetzt. Üblicherweise erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 1 min, gefolgt von der Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrix bei 50 bis 60 °C für 1 min. Die Synthese der DNA erfolgte je nach Länge des zu amplifizierenden Abschnitts sowie der verwendeten DNA-Polymerase bei 72 °C für 1 bis 2 min. Üblicherweise wurden dabei 30 Zyklen durchlaufen und der Ansatz anschließend zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 72 °C inkubiert.

#### 2.3.5 Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese durch Crossover PCR

Für die Randomisierung von Aminosäureposition, bei welchen keine Restriktionsschnittstelle in unmittelbarer Nachbarschaft zu der zu mutierenden Position mit dem Mutageneseprimer abgedeckt werden konnte, wurde das Prinzip der *Crossover* PCR (Ho *et al.*, 1989) angewandt. Hierbei werden in parallelen PCR-Ansätzen zwei DNA-Abschnitte amplifiziert, welche in der Nähe der Mutageneseposition überlappen, wobei die zu randomisierende Aminosäureposition nicht im Überlappungsbereich liegt. In einer dritten PCR wird aus beiden DNA-Fragmenten mit Hilfe genflankierender Primer das zu klonierende Insert assembliert. Die Amplifizierung erfolgte angepasst an die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer wie auch an die zur Elongation des relevanten DNA-Abschnitts durch die DNA-Polymerase benötigten Zeit gemäß der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Vorgehensweise. Die zunächst erhaltenen Genfragmente wie auch das final assemblierte Gen wurden jeweils durch präparative Gelelektrophorese gereinigt, enzymatisch prozessiert und für die Ligierung mit einem geeigneten Plasmid-Rückgrat verwendet.

### 2.3.6 Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange PCR

Der zielgerichtete Austausch von Basentriplets erfolgte durch PCR unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.2 angegebenen Primer in Anlehnung an das Protokoll des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Zheng *et al.*, 2004). Das als Matrize dienende Plasmid wurde durch die *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase gemäß den Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Üblicherweise wurden dabei 10 ng Plasmid-DNA, welche aus einem dam<sup>+</sup> *E. coli*-Stamm (z.B. XL1-Blue) isoliert wurde, als Ausgangsmatrize eingesetzt und wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben in 20 Zyklen amplifiziert. Der Erfolg der PCR wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Im Anschluss wurde die methylierte DNA im Anschluss durch Zugabe von 30 U *DpnI* zum PCR-Ansatz bei 37 °C für eine Stunde gespalten. Von dem so erhaltenen einzelsträngigen mutierten Plasmid wurde 5 µl DNA-Lösung für die Transformation chemokompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen (vgl. Abschnitt 2.2.2) eingesetzt.

### 2.3.7 Randomisierung von Genabschnitten in AlkB durch Error-Prone PCR

Zur Einführung zufälliger Punktmutationen in Genabschnitten wurde die Methode der *Error-Prone* PCR (epPCR, Leung *et al.*, 1989) unter Verwendung des GeneMorph II Random Mutagenesis Kits (vgl. Abschnitt 2.1.5) eingesetzt. Das *alkB*-Genfragment wurde unter Verwendung von pASK75-AlkB als Matrize mit Hilfe der flankierenden Primer D20 und PR1 vervielfältigt, durch präparative Gelelektrophorese isoliert und als Templat für die Randomisierung verwendet. Die eigentliche epPCR erfolgte nach den Angaben des Kitherstellers über 30 bis 35 Zyklen, wobei die *Annealing*-Temperatur 50 °C betrug und 10 pg bis 1 ng Templat-DNA eingesetzt wurde. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, einem Restriktionsverdau unterzogen und zur Ligierung mit dem zuvor geschnittenen Plasmidrückgrat verwendet.

### 2.3.8 Herstellung von AlkB-Genbibliotheken

Die wie in den Abschnitten 2.3.5, 2.3.6 und 2.3.7 beschrieben mutierten Gene bzw. Genabschnitte wurden anschließend in die Vektoren pASK75-AlkB oder pASK-IBA5(+)-BsADH kloniert. Dazu wurden sowohl der mutierte Genabschnitt als auch der Empfängervektor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und durch präparative Gelelektrophorese isoliert. Die Ligierung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben in einem Gesamtvolumen von 60 µl bei 16 °C über Nacht. Je Ansatz wurden drei Aliquots chemokompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen mit 20 µl des Ligierungsansatzes (~ 300 ng DNA) transformiert. Je 500 µl der Zellsuspension wurde anschließend auf einer großen LB/Amp Agarplatte ausgestrichen (je 500 µl, ø 14,5cm) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Genbibliothekgröße wurde je 100 µl einer Verdünnungsreihe auf normalen

LB/Amp Agarplatten ausgestrichen. Der auf den großen Agarplatten gewachsene Kolonierasen wurde mit einem sterilen Zellschaber in 10 ml LB-Medium abgeschabt und in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Zur Gewinnung der Bibliothek wurden die Zellen danach abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid-Midi-Kits (s. Abschnitt 2.2.3) isoliert.

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

### 2.4.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im 2 l-Maßstab

Zur Produktion rekombinanter Proteine wurde 50 ml LB/Amp-Medium mit einer Kolonie des mit dem jeweiligen Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die heterologe Biosynthese des Zielproteins erfolgte am nächsten Tag im 5 l-Erlenmeyerkolben, welcher 2 l TB/Amp-Medium enthielt. Die Hauptkultur wurde auf eine initiale OD<sub>550</sub> von 0,1 angeimpft (typischerweise mit ~35 ml der Vorkultur) und je nach Protein bei der jeweiligen Temperatur (s. Tabelle 1) bis zu OD<sub>550</sub> von 0,5 bis 0,6 bei 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde bei Bedarf die Temperatur im Schüttelinkubator gesenkt und nach einer Stunde die Genexpression durch Zugabe von aTc oder IPTG induziert (s. Tabelle 1). Bei der Produktion von AlkB sowie AlkT wurde die Expression mit einer verringerten Menge an Induktor gestartet, um die Gendosis bei der als anspruchsvoll geltenden Biosynthese der beiden Proteine jeweils gering zu halten. Zum Kompensieren des Verbrauchs und der Verdünnung des Induktors durch das Zellwachstum wurde hier die Induktion nach drei Stunden Expressionszeit wiederholt. Zur Ernte wurden die Zellen abzentrifugiert (4X1L LEX, 6000 rpm, 4 °C, 10 min) und das Kulturmedium abgegossen. Das Sediment wurde mit Hilfe eines Spatels in 50-ml-Röhrchen gesammelt und entweder bei -20 °C eingefroren oder frisch weiterverwendet.

**Tabelle 1.** Expressionsparameter der in der vorliegenden Arbeit in *Escherichia coli* produzierten Proteine

Protein	Affinitätstag	<i>E. coli</i> -Stamm	Anzucht [°C]	Produktion [°C]	Dauer [h]	Induktor [µg/l]
AlkB	C-term. <i>Strep</i>	W3110	30	22	5	2 × 50 (aTc)
AlkG	–	BL21(DE3)	37	30	5	1 mM (IPTG)
AlkJ	N-term. His <sub>6</sub>	BL21	22	22	15	200 (aTc)
AlkT	N-term. <i>Strep</i>	BL21	30	22	5	2 × 50 (aTc)
BsADH	N-term. <i>Strep</i>	BL21	37	37	15	200 (aTc)

Um die geernteten Zellen aus 2 l-Kulturen aufzuschließen, wurden diese entweder frisch nach der Zellernte oder angetaut in 15 bis 25 ml des jeweiligen Chromatographiepuffers resuspendiert und mit Hilfe eines *French Press*-Zellhomogenisators aufgeschlossen (1000 lb/in<sup>2</sup>, drei Passagen). Nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zelltrümmer und Aggregate wurden im Anschluss durch Zentrifugation vom Lysat abgetrennt (SS34, 17500 rpm, 4 °C, 30 min). Der erhaltene zellfreie Proteinrohextrakt wurde filtriert (0,45 µm) und für die folgenden Reinigungsschritte verwendet.

#### **2.4.2 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im 1 ml-Maßstab**

Für die parallelisierte Produktion von Proteinen im 1 ml-Maßstab wurde in die Vertiefungen einer 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatte mit Hilfe der automatisierten Arbeitsstation (s. Abschnitt 2.1.6) 100 µl TB/Amp-Medium vorgelegt. Anschließend wurde je eine Kolonie der am Vortag auf einer rechteckigen Agarplatte ausplattierten rekombinanten Klone durch den Pipettierroboter in die Wells überführt. Die so vorbereitete Vorkulturplatte wurde mit einer atmungsaktiven Folie versehen, über Nacht inkubiert (Multitron Inkubator, 37 °C, 250 rpm, 70 % rF) und nach Animpfen der Hauptkultur bei -20 °C aufbewahrt. Die Hauptkultur (1 ml TB/Amp in 2 ml-Deep Well Blocks) wurde am folgenden Tag mit 10 µl der Vorkultur inokuliert und unter den gleichen Kultivierungsbedingungen inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde den Kulturen mit dem Roboter 100 µl Zellsuspension in eine Flachboden-Mikrotiterplatte entnommen und die OD<sub>550</sub> in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Bei einer OD<sub>550</sub> von 1,0 wurde die Temperatur im Inkubationsschüttler auf 30 °C herabgesetzt und eine Stunde später weiter auf die Expressionstemperatur von 22 °C gesenkt. Sobald diese erreicht war, wurde zur Induktion der Genexpression je Vertiefung 100 µl aTc-Lösung (0,15 mg/l final im Ansatz) zugegeben, was nach drei Stunden Expressionszeit wiederholt wurde, da in Vorversuchen ein im Vergleich zur Expression im 2 l-Maßstab erhöhter Bedarf an Induktor beobachtet wurde (s. Abschnitt 3.1.2). Nach insgesamt fünf Stunden Genexpression wurden die Bakterien abzentrifugiert (Sigma 4-16K, Rotor 11122, 5500 rpm, 4 °C, 20 min), das Kulturmedium abgegossen und der Deep Well Block mitsamt der Zellsedimente bei -20 °C eingefroren.

Zum Aufschluss wurde das Zellsediment mit Hilfe des Pipettierroboters mit je 750 µl auf 4 °C gekühltem Lysepuffer überschichtet (1 mg/ml Lysozym, 0,1 U/ml Benzonase in 50 mM Tris/HCl [pH 7,4]) und anschließend mit der 96er-Pipettiereinheit des Roboters auf einer Kühlplatte im Pipettierroboter (15 °C) resuspendiert (500 µl/s). Nach zwei Minuten wurde die Pipettiergeschwindigkeit auf 33 µl/s gedrosselt und die Zellsuspension für weitere 30 Minuten durch stetiges Pipettieren bei Raumtemperatur durchmischt. Zellwandbestandteile, unlösliche Aggregate sowie die Zellmembran wurden durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma 4-16K, Rotor 11122, 5500 rpm, 4 °C, 30 min). Der lösliche Rohextrakt wurde abgegossen und

verworfen und das Sediment mit dem darin enthaltenen membrangebundenen AlkB daraufhin für enzymatische Aktivitätstests wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben verwendet.

### 2.4.3 Anreicherung und Solubilisierung von Membranproteinen

Die Anreicherung rekombinanter Membranproteine erfolgte durch Isolierung der Zellmembran von *E. coli* mit Hilfe von Ultrazentrifugation. Hierzu wurde das aus dem auf die Zellyse folgenden Zentrifugationsschritt (vgl. Abschnitt 2.4.1) erhaltene filtrierte Lysat bei hoher Beschleunigung erneut zentrifugiert (Sorvall Discovery, Rotor T890, 125000 g, 4 °C, 2 h). Der die löslichen cytoplasmatischen Proteine enthaltende Überstand wurde verworfen und das feste, gallertartige Sediment mit dem jeweiligen Chromatographiepuffer resuspendiert. Hierzu wurde das Membransediment mit 5 ml Chromatographiepuffer überschichtet und mit einem Spatel vom Zentrifugengefäß gelöst. Die so entstandenen Membranstückchen wurden in einen vorgekühlten Potter-Homogenisator überführt und auf Eis für 3 min durch manuellen Kolbenhub homogenisiert. Die so entstandene Membransuspension wurde für die Solubilisierung eingesetzt oder direkt für enzymatische Analysen verwendet.

Zur Solubilisierung membranständiger Proteine wurde die zuvor präparierte Membranfraktion in ein Becherglas gegeben, mit dem jeweiligen Detergenz versetzt (s. unten) und bei 250 rpm auf einem Magnetrührer für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden nicht dispergierte Zellmembranstücke sowie bei der Solubilisierung entstandene Proteinaggregate durch Ultrazentrifugation sedimentiert (T890, 125000 g, 4 °C, 1 h) und der klare Überstand für die Chromatographie verwendet. Die Solubilisierung von AlkJ erfolgte mit 0,5 % (w/v) DDM im verwendeten Chromatographiepuffer in einem Gesamtvolumen von 25 bis 30 ml für eine Stunde. Für die Solubilisierung von AlkB wurden 0,87 % (w/v) DDM oder 0,1 % (w/v) C12E8 in einem Gesamtvolumen von 20 ml eingesetzt.

## 2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.5.1 Affinitätschromatographie an *Strep*-Tactin Sepharose

Die Alkanmonooxygenase AlkB, die Rubredoxin-Reduktase AlkT und die BsADH wurden in dieser Arbeit als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II produziert (Schmidt & Skerra, 2007). Diese Enzyme wurden daher mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC) aus dem Cytoplasmaextrakt bzw. der inneren Zellmembran von *E. coli* isoliert. Hierzu wurden die rekombinanten Zellen aufgeschlossen (vgl. Abschnitt 2.4.1), und das filtrierte Lysat bzw. die solubilisierten Membranproteine wurden mit 2 nmol/l/OD<sub>550</sub> Wildtyp-Streptavidin versetzt, um wirtszelleigenes Biotin und biotinhaltige Proteine in dem Rohextrakt zu komplexieren.

Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der kovalent immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (*Strep*-Tactin High Capacity; [Voss & Skerra, 1997; Schmidt & Skerra, 2007]), wurde

bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie ( $A_{280}$ ) mit Chromatographiepuffer (vgl. Abschnitt 2.1.8) gespült. Dabei kamen, abhängig von der erwarteten Menge an rekombinantem Protein, Säulen mit Bettvolumina von 5 ml oder 8 ml zur Anwendung, welche mit Flussraten von 50 ml/h bzw. 100 ml/h betrieben wurden. Nach Auftragen des Rohextraktes auf die Säule wurde diese mit Puffer gespült, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5 mM Lösung von D-Desthiobiotin in Chromatographiepuffer kompetitiv eluiert. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, welche das Zielprotein in ausreichender Reinheit enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und bei 4 °C gelagert.

### 2.5.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Produktion der Alkohol-Dehydrogenase AlkJ erfolgte in Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidinhängsel in *E. coli* BL21, weshalb die Reinigung des rekombinanten Proteins durch  $\text{Ni}^{2+}$ -vermittelte Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) erfolgte (Skerra *et al.*, 1991). Die Bakterien wurden hierzu in der *French Press* homogenisiert und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernt. Die bakterielle Zellmembran wurde durch Ultrazentrifugation isoliert und membranständige Proteine unter Zugabe von DDM solubilisiert (vgl. Abschnitt 2.4.3). Anschließend wurde das Solubilisat auf eine zuvor mit Chromatographiepuffer äquilibrierte Ni-Sepharose High Performance Säule (8 ml Bettvolumen) gegeben und schwach gebundene Proteine mit Waschpuffer (Chromatographiepuffer versetzt mit 20 mM Imidazol/HCl [pH 8,0], 0,025 % [w/v] DDM) ausgewaschen. Nach Erreichen der Basislinie wurde AlkJ durch Anlegen eines linearen Imidazolgradienten (20 bis 300 mM Imidazol/HCl [pH 8,0] über 200 ml) eluiert. Die im Verlauf der Elution gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE hinsichtlich ihres AlkJ-Anteils untersucht und augenscheinlich reines AlkJ enthaltende Fraktionen vereinigt. Diese wurden zur Entfernung von Imidazol zweimal gegen 1,5 l Chromatographiepuffer, versetzt mit 0,025 % (w/v) DDM, dialysiert. Zur Konzentrierung von AlkJ für spektroskopische Analysen sowie für die Größenausschlusschromatographie wurden die dialysierten Fraktionen auf eine zuvor äquilibrierte Ni-Sepharose High Performance Säule mit 1 ml Bettvolumen aufgetragen. Anschließend wurde AlkJ mit 2 ml 300 mM Imidazol/HCl (pH 8,0) in Chromatographiepuffer eluiert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.5.3 Anionenaustauschchromatographie

Das in dieser Arbeit produzierte Rubredoxin AlkG wurde durch Anionenaustauschchromatographie (AEX) gereinigt. Hierzu wurde eine Resource Q-Säule mit 6 ml Bettvolumen eingesetzt. Die Chromatographie wurde mit 20 mM MES/HCl (pH 6,0) als Laufpuffer durchgeführt. Um das rekombinante Protein möglichst separat zu eluieren, wurde ein linearer Konzentrationsgradient mit 20 Säulenvolumina des Elutionspuffers (20 mM MES/HCl [pH 6,0], 1 M NaCl) angelegt.

### 2.5.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde in der vorliegenden Arbeit analytisch zur Bestimmung der Quartärstruktur von Proteinen sowie präparativ zum Pufferwechsel verwendet. Sämtliche Chromatographiepuffer wurden vor ihrer Verwendung filtriert ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) und durch Anlegen von Vakuum für 30 min unter Rühren entgast. Es wurde eine präparative Superdex 200 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule (Bettvolumen 124 ml) mit einem Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa eingesetzt. Vor Auftragung der Proteinprobe wurde die Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min mit zwei Säulenvolumen Chromatographiepuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mittels einer 2 ml-Proben-schleife auf die Säule appliziert, und in einem Fraktionskollektor wurden Fraktionen von 1,5 ml gesammelt. Die Reinheit der gesammelten Fraktionen wurde mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurde die Säule durch Spülen mit einem Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge regeneriert, mit Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert.

### 2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche reduzierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) wurde unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson, (1986) durchgeführt. Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird dabei durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels gebremst und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine fixiert und mit Coomassie Brilliantblau R250 angefärbt.

Die 15 %igen Polyacrylamid-Gele waren 0,8 mm dick, wobei das Trenngel ein Format von 5,5 cm  $\times$  8,5 cm aufwies. Zur Herstellung der Gele wurden zwei sorgfältig gesäuberte Glasplatten (10 cm  $\times$  8 cm) mit Abstandshaltern unter Verwendung einer Silikondichtung zusammengesetzt und mit Hilfe von Klammern fixiert. Die Polymerisation der Trenngelmischung, bestehend aus 5 ml einer 30 %igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 2,5 ml 4 $\times$  Lower Tris und 2,5 ml Wasser, wurde durch Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$

TEMED und 50  $\mu$ l 10 % (w/v) APS-Lösung gestartet. 4,5 ml dieser Mischung wurden zügig in die vertikale Gelkammer pipettiert und zwecks Luftabschluss mit 0,5 ml Wasser sorgsam überschichtet, um eine gleichmäßige Grenzfläche zum Trenngel zu erhalten. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Wasser vollständig entfernt und die Sammelgelmischung, zusammengesetzt aus 1 ml einer 30 %igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stamm-lösung, 1,5 ml 4 $\times$  Upper Tris und 3,5 ml Wasser, hergestellt. Durch Zugabe von 3  $\mu$ l TEMED und 36  $\mu$ l 10 % (w/v) APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet, die Sammelgelmischung wurde in die Gelkammer pipettiert, und ein Taschenformer eingesetzt. Nach Erstarren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Gelkammer gespannt, die mit Laufpuffer befüllt wurde. Die Auftrennung der Proteine erfolgte üblicherweise bei 140 V für 90 min.

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

### 2.5.6 Konzentrierung von Proteinen

Zur Herstellung konzentrierter Proteinlösungen wurde die verdünnte Ausgangslösung mittels einer Konzentratoreinheit (Amicon) mit geeigneter Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4000 rpm, 4 °C) auf ein der gewünschten Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Das Konzentrat wurde dann in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf 5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 20 min) und der Überstand weiterverwendet. Die Konzentration der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen, wurde auch der Proteingehalt des Durchlaufs der Konzentratoreinheit UV-spektrophotometrisch untersucht.

### 2.5.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration  $c$  von Proteinlösungen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke  $d = 1$  cm oder im NanoDrop Photometer unter Korrektur der Absorption des Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $A_{280} = \epsilon \times c \times d$ ) ermittelt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  wurde dabei nach einem Algorithmus, der die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und gegebenenfalls Cystin für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette summiert (Gill & Von Hippel, 1989), für jedes Protein individuell (Tabelle 2) mit Hilfe des Programms ProtParam auf dem ExPASy-Server (Gasteiger *et al.*, 2003) berechnet. Zur Bestimmung der in AlkG gebundenen Fe<sup>3+</sup>-Ionen wurden ein  $\epsilon_{498}$  von 11,1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Peterson & Coon, 1968) sowie

ein  $A_{280}/A_{498}$  Verhältnis von 6,3 für die Beladung mit exakt einem Eisenion zugrundegelegt (Lode & Coon, 1971).

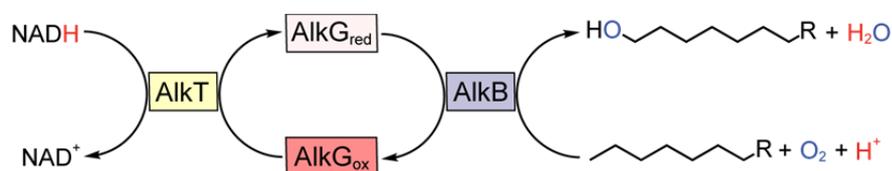
**Tabelle 2.** Anhand der Primärstruktur kalkulierte Molmasse und berechnete Extinktionskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit in *Escherichia coli* produzierten Proteine.

Protein	Anzahl Reste	Molmasse [Da]	Extinktionskoeffizient $\epsilon$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
AlkB (mit <i>Strep</i> -tag II)	411	47.004	118.830
AlkG	173	18.899	33.920
AlkJ (mit His <sub>6</sub> -tag)	571	62.605	56.840
AlkT (mit <i>Strep</i> -tag II)	397	42.465	36.900
BsADH (mit <i>Strep</i> -tag II)	351	37.665	38.390

## 2.6 Enzymatische Aktivitätsanalysen

### 2.6.1 NADH-gekoppelte Aktivitätsbestimmung von AlkB und AlkT

Die Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen durch das AlkBGT-Monooxygenasesystem erfolgt unter Verbrauch von NADH sowie molekularem Sauerstoff. Dabei wird ein Sauerstoffatom für die Funktionalisierung des Kohlenwasserstoffs verwendet, während das zweite Sauerstoffatom durch die Elektronen aus NADH zu Wasser reduziert wird, was die Verfolgung der Reaktion neben den gebildeten Produkten (funktionalisierte Kohlenwasserstoffe, H<sub>2</sub>O) anhand des Verbrauchs an NADH gestattet (Abbildung 3). In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Aktivität von AlkB daher durch den Verbrauch an NADH photometrisch *in situ* verfolgt und zudem die während der Reaktion gebildeten organischen Produkte anschließend durch Gaschromatographie (GC) quantifiziert.



**Abbildung 3.** NADH-abhängige Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffsubstraten durch AlkBGT. Die Rubredoxin-Reduktase AlkT überträgt Elektronen von NADH auf das Eisenzentrum von AlkG, welches diese an AlkB weiterreicht und dabei reoxidiert wird. Das organische Substrat wird durch den Einbau eines aus O<sub>2</sub> stammenden Sauerstoffatoms hydroxyliert, während das verbleibende Sauerstoffatom durch die von NADH stammenden Elektronen zu Wasser reduziert wird.

Der Reaktionsnachweis von AlkB zur Untersuchung der Kopplungseffizienz erfolgte in Quarzküvetten (0,5 cm Schichtdicke) in einem Gesamtvolumen von 1 ml 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) bei Raumtemperatur in einem Ultrospec 2100 Photometer mit Achtfach-Probenwechsler für jeweils bis zu vier Ansätze parallel durch Bestimmung der NADH-Konzentration bei 340 nm (Bergmeyer, 1975). Ein Reaktionsansatz enthielt 0,5 mM NADH, 10  $\mu$ M AEX-gereinigtes AlkG, 1  $\mu$ M SAC-gereinigtes AlkT, 0,4 mM *n*-Octan oder LSME (jeweils gelöst in Aceton, Endkonzentration 2 % [v/v] im Ansatz) sowie 20  $\mu$ l bis 60  $\mu$ l einer (wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben) präparierten *E. coli*-Membranfraktion, welche rekombinantes AlkB enthielt. Zu Beginn wurden Puffer, NADH und Substrat zusammenpipettiert und ein Nullabgleich durchgeführt. Anschließend wurde die Membranfraktion hinzugegeben und die Hintergrundoxidationsrate von NADH für eine Minute aufgezeichnet. Daraufhin wurden AlkG sowie AlkT zeitgleich zugegeben und der Gesamtverbrauch an NADH, welcher sich aus Hintergrundoxidation (z.B. durch Komponenten der bakteriellen Atmungskette) sowie AlkB-induziertem NADH-Verbrauch zusammensetzt, verfolgt. Nach einer Reaktionszeit von drei bis fünf Minuten wurde die Aufzeichnung der Absorption gestoppt und die im Ansatz enthaltenen Edukte und Produkte wie in Abschnitt 2.6.8 beschrieben extrahiert und durch Gaschromatographie (GC) quantifiziert. Für die Auswertung wurde durch Subtraktion der zuvor bestimmten Hintergrundoxidationsrate von NADH der AlkB-spezifische NADH-Verbrauch ermittelt und zu der durch GC-Analytik bestimmten Menge an funktionalisiertem Alkansubstrat in Bezug gesetzt.

Um die Tendenz von AlkB sowie seiner Mutanten zur Überoxidation von LSMe abzuschätzen wurde die terminale Oxidation der Substrate über einen Zeitraum von bis zu 60 min mittels Gaschromatographie verfolgt. Hierzu wurde 0,5 mM Alkansubstrat (gelöst in Aceton, 2 % [v/v] im Ansatz) mit 5 mM NADH in einem Gesamtvolumen von 7 ml 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) in einem 10 ml-Becherglas vorgelegt. Der Ansatz wurde bei RT durch einen magnetischen Kreuzrührer durchmischt (350 rpm). 1  $\mu$ M SAC-gereinigtes AlkT sowie 10  $\mu$ M AEX-gereinigtes AlkG wurden dann zugegeben und die Reaktion mit 140  $\mu$ l AlkB-Membransuspension gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 0,5 ml-Proben entnommen, die Substrate und Produkte wie in Abschnitt 2.6.8 beschrieben extrahiert und durch Gaschromatographie (s. Abschnitt 2.6.9) quantifiziert.

Auch wurde in dieser Arbeit die Funktionalität der Elektronenübergabe von AlkT an AlkG untersucht, welche der eigentlichen Oxidationsreaktion durch AlkB vorgeschaltet ist. Der  $K_M$ -Wert der Rubredoxin Reduktase-AlkT für das Elektronüberträgerprotein AlkG wurde bei Raumtemperatur im Dreifachansatz in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l Hepes/NaOH (pH 8,0) in Mikrotiterplatten bestimmt. Hierzu wurden 5 bis 150  $\mu$ M elektrophoretisch homogenes, mit einem  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion beladenes AlkG, 0,5 mM NADH sowie das zu ergänzende Puffervolumen vorlegt und die Reaktion durch Zugabe von 5 nM SAC-gereinigtem AlkT gestartet. Über eine Zeitspanne von 15 min wurde die Absorption bei der für oxidiertes AlkG

charakteristischen Wellenlänge von 498 nm in Intervallen von 13 s gemessen und der Anteil des verbleibenden oxidierten AlkGs über eine zuvor mit oxidiertem AlkG ermittelte Kalibriergerade bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des SigmaPlot Moduls Enzyme Kinetics 1.3 anhand der Michaelis/Menten Gleichung (Johnson & Goody, 2011).

### 2.6.2 Parallelisierter Screening-Assay für AlkB-Mutanten

Um die biokatalytische Aktivität lokal randomisierter AlkB-Varianten hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber dem industriell relevanten Zielsubstrat LSMe zu untersuchen, wurden diese parallel in 96-Well Deep Well Blocks in *E. coli* W3110 wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben produziert. Da die für die Parallelisierung verwendeten Deep Well Blocks nicht für die bei einer Membranpräparation durch Ultrazentrifugation auftretenden hohen Beschleunigungen ausgelegt waren, wurde für die Aktivitätsanalysen das nach der Zellyse in Gegenwart von Lysozym erhaltene Sediment, welches neben Zellwandbestandteilen auch die bakterielle Zellmembran mit AlkB beinhaltet, verwendet. Als Kontrollen wurden je Platte je drei mit TB/Amp gefüllte und mit *E. coli* W3110 beimpfte Vertiefungen mit pASK75-AlkB-*Strep* (Positivkontrolle) und mit pASK75-AlkJ-*Strep* (Negativkontrolle) sowie zwei unbeimpfte Vertiefungen mit Kulturmedium mitgeführt.

Das nach der chemischen Zellyse (vgl. Abschnitt 2.4.2) erhaltene und gekühlte Zellsediment wurde mit Hilfe des Pipettierroboters in insgesamt 575  $\mu\text{l}$  50 mM Tris/HCl (pH 7,4) resuspendiert (5 min, 500  $\mu\text{l/s}$ , 15 °C). Unvollständig gelöste Sedimente wurden manuell resuspendiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer elektronischen 8-fach Mehrkanalpipette 400  $\mu\text{l}$  der 2,5-fach konzentrierten Reaktionslösung zugegeben (12,5 mM NADH, 25  $\mu\text{M}$  AlkG, 2,5  $\mu\text{M}$  AlkT in 50 mM Tris/HCl [pH 7,4]). Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von LSMe. Hierzu wurden je Well 25  $\mu\text{l}$  der Substratlösung (25 mM, gelöst in Aceton) mit Hilfe einer 12-fach Mehrkanalpipette hinzupipettiert. Der Deep Well Block wurde mit einer atmungsaktiven Verschlussfolie versiegelt und bei RT und 1050 rpm geschüttelt (Eppendorf ThermoMixer R). Die Extraktion der gebildeten Produkte erfolgte in einer für den Mikrotiter-Maßstab angepassten Variante der in Abschnitt 2.6.8 angegebenen Vorschrift: Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  18,5 %igem HCl gequencht (12-fach Mehrkanalpipette) und mit 550  $\mu\text{l}$  Ethylacetat, welches 0,5 mM *n*-Dodekan als internen Standard enthielt, überschichtet (elektronische 8-fach Mehrkanalpipette). Der Deep Well Block wurde mit einer Gummiverschlussmatte abgedichtet und die Kohlenwasserstoffsubstrate bzw. -produkte durch fünf Minuten energisches manuelles Vortexen in die Ethylacetatphase überführt. Anschließend wurden die Ansätze zur Entmischung beider Phasen für 30 min bei RT inkubiert und restliche in der oberen Ethylacetatphase suspendierte Zellbestandteile durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma 4K10, Rotor 11122, 5000 rpm, RT, 30 min). Im Anschluss wurden je 50  $\mu\text{l}$  der Ethylacetatphase durch den Pipettierroboter in ein

mit 50  $\mu\text{l}$  MSTFA-Derivatisierungsreagenz versehenes GC-Probengefäß (mit Inset) überführt und gemischt. Zur Analyse hinsichtlich der gebildeten Produkte wurde nach der unter Abschnitt 2.6.9 beschriebenen Vorgehensweise verfahren.

### 2.6.3 NADH-gekoppelte Aktivitätsbestimmung von BsADH

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der BsADH erfolgte photometrisch durch Messung des in der Redoxreaktion gebildeten NADH bei 340 nm mit Hilfe eines auf 60 °C temperierten Photodiodenarray-Photometers. Ein Reaktionsansatz enthielt BsADH, den jeweiligen oxidierten oder reduzierten Cofaktor sowie das organische Substrat (vgl. Tabelle 3) in insgesamt 2 ml 50 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 8,0) in einer Quarzküvette mit 1 cm Pfandlänge. Die langkettigen Substrate HLSMe sowie OLSMe wurden in THF zu einer Konzentration von 200 mM gelöst und für die Aufnahme von Kinetiken in dem gleichen Lösungsmittel verdünnt, um eine konstante Konzentration von 0,5 % (v/v) Cosolvens im Reaktionsansatz zu gewährleisten. Um etwaige Hintergrundaktivitäten zu erfassen, wurde in Kontroll-experimenten je eine der Reaktionskomponenten weggelassen.

**Tabelle 3.** Übersicht über die verwendeten Reaktionskomponenten zur Bestimmung der kinetischen Parameter der BsADH gegenüber Alkoholen, Aldehyden sowie  $\text{NAD}^+$  und NADH.

Substrat	BsADH [nM]	Substrat [mM]	$\text{NAD}^+$ [mM]	NADH [mM]
Ethanol	5	0–100	2	
Ethanal	5	0–50		0,2
1-Butanol	5	0–50	2	
1-Butanal	5	0–50		0,2
HLSMe	25	0–1	2	
OLSMe	5	0–2,5		0,2
$\text{NAD}^+$	25	1 (HLSMe)	0–10	
NADH	5	1 (OLSMe)		0–2

Alle Reaktionskomponenten bis auf BsADH wurden in der Küvette vereinigt und für drei Minuten bei 60 °C (oder alternativ bei 37 °C) im Photometer vortemperiert. Anschließend wurde ein Nullabgleich durchgeführt, die Reaktion durch Zugabe von BsADH und Mischen gestartet und die Absorptionsänderung bei 340 nm über einen Zeitraum von einer Minute alle drei Sekunden aufgezeichnet. Die Absorptionswerte wurden mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , Bergmeyer, 1975) in Stoffmengenkonzentrationen umgerechnet. Für alle Substratkonzentrationen wurden Dreifachbestimmungen der korrespondierenden Enzymaktivität durchgeführt. Die Berechnung der

kinetischen Parameter  $K_M$  und  $v_{\max}$  erfolgte mit Hilfe des SigmaPlot Moduls Enzyme Kinetics 1.3 anhand der Michaelis/Menten Gleichung (Johnson & Goody, 2011).

Die Oxidation von Ethanol, 1-Butanol und HLSMe wurde mit 2 mM ( $\approx 10 \times K_M$ )  $\text{NAD}^+$  und verschiedenen Alkoholkonzentrationen gemessen. Analog wurde die Reduktion von Ethanal, 1-Butanal und OLSMe mit 0,2 mM  $\text{NADH}$  ( $\approx 3 \times K_M$ ) bei gleichzeitiger Variation der Aldehydkonzentration bestimmt. Die im Vergleich zur Oxidationsreaktion verringerte Menge an Cofaktor ist der hohen Absorption von  $\text{NADH}$  geschuldet, wobei das Reaktionsgleichgewicht die Bildung des Alkohols in diesem Fall ohnehin begünstigt. Die Umsatzrate  $k_{\text{cat}}$  wurde aus der maximalen Initialgeschwindigkeit ermittelt ( $v_{\max}/[E]$ ). Ein Unit wurde als Menge an BsADH definiert, welche pro Minute 1  $\mu\text{mol}$  Substrat umsetzt (Bisswanger, 2014). Die spezifische Aktivität gegenüber einem bestimmten Substrat wurde pro mg eingesetztem Enzym berechnet. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstante für die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Umsetzung von HLSMe zu OLSMe erfolgte gemäß der für Multisubstratreaktionen erweiterten Haldane-Gleichung (Alberty, 1953), wie kürzlich analog für die enzymatische Oxidation von Isosorbid beschrieben (Lerchner *et al.*, 2013).

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{HLSMe}} \times k_{\text{cat}}^{\text{NAD}^+} \times K_M^{\text{OLSMe}} \times K_M^{\text{NADH}}}{k_{\text{cat}}^{\text{OLSMe}} \times k_{\text{cat}}^{\text{NADH}} \times K_M^{\text{HLSMe}} \times K_M^{\text{NAD}^+}}$$

#### 2.6.4 Optischer Aktivitätsnachweis von AlkJ

Aufgrund von Primärstrukturvergleichen wurde bei der Alkohol-Dehydrogenase AlkJ als redoxaktive Gruppe Flavin/Adenin-Dinukleotid (FAD) vermutet (Ohta *et al.*, 2006). Da freies reduziertes  $\text{FADH}_2$  in sauerstoffhaltiger Umgebung zu spontaner Oxidation neigt, ist die Bindung von  $\text{FAD}(\text{H}_2)$  an das jeweiligen Protein üblicherweise hochaffin ( $K_D = 0,1$  bis 100 nM, Walsh & Wenciewicz, 2013). Ein Aktivitätsnachweis mit frei diffundierendem Cofaktor analog zu  $\text{NADH}$ -abhängigen ADHs ist deswegen unüblich. Anstatt dessen wird bei der Aktivitätsbestimmung  $\text{FAD}$ -abhängiger ADHs die enzymgebundene prosthetische Gruppe mit Hilfe artifizieller Elektronenakzeptoren *in situ* regeneriert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der katalytischen Aktivität von AlkJ deshalb mit Hilfe der organischen Redoxindikatoren Dichlorphenolindophenol (DCPIP) sowie Phenazinmethosulfat (PMS), angelehnt an eine publizierte Vorgehensweise (Benson & Shapiro, 1976).

Die vom Alkoholsubstrat abgegebenen Elektronen werden dabei auf das an AlkJ gebundene  $\text{FAD}$  übertragen, welches so reduziert wird (vgl. Reaktionsschema, Abbildung 17). Darauf folgend werden die Elektronen an PMS weitergegeben, welches als Redoxmediator fungiert. PMS transferiert die aufgenommenen Elektronen wiederum auf oxidiertes DCPIP, welches im Assay den terminalen Elektronenakzeptor darstellt. Durch Reduktion verändert

sich die Ringelektronenkonfiguration von DCPIP, was eine Verringerung des Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{ox } 600} = 21,00 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Izai *et al.*, 1992) sowie eine Entfärbung der blauen Reaktionslösung bewirkt. Die enzymatische Oxidation von Alkoholen durch AlkJ kann somit photometrisch anhand des Oxidationsstatus von DCPIP bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt werden.

Die Aktivitätsbestimmung von AlkJ erfolgte im Dreifachansatz in Flachboden-Mikrotiterplatten in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu\text{l}$  NaP<sub>i</sub> (pH 7,5). Die Ansätze enthielten 0,1 mM DCPIP, 0,2 mM PMS, 0,2  $\mu\text{M}$  AlkJ sowie variierende Konzentrationen an in THF gelöstem Substrat (0,5 % [v/v] THF im Ansatz). Die kinetischen Parameter von AlkJ wurden für die Substrate 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol sowie HLSMe bestimmt. Alle Reaktionskomponenten bis auf AlkJ wurden in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorgelegt und bei 30 °C für fünf Minuten äquilibriert, ehe die Reaktion durch Zugabe des Enzyms und Mischen mit Hilfe der 8-fach Mehrkanalpipette gestartet wurde. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch Absorptionsmessung bei 600 nm in einem auf 30 °C temperierten Mikrotiterplatten-Photometer verfolgt. Die Menge an oxidiertem DCPIP zu verschiedenen Zeitpunkten wurde anhand einer zuvor erstellten Kalibrierreihe mit bekannten DCPIP-Konzentrationen ermittelt. Da für den PMS-DCPIP Assay sowohl eine endogene Hintergrundreaktion (Engel, 1981) als auch ein Ausbleichen von DCPIP durch Lichtexposition (McIntire, 1990) beschrieben ist, wurde dieser Reaktionsnachweis in abgedunkelter Umgebung ausgeführt und entsprechende Kontrollen ohne Substrat bei jeder Messreihe mitgeführt. Die ermittelte Hintergrund-Reaktionsgeschwindigkeit betrug typischerweise 10 bis 15 % der maximal gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit. Die um die Hintergrundaktivität korrigierten initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden mit Hilfe des SigmaPlot Moduls Enzyme Kinetics 1.3 anhand der Michaelis/Menten Gleichung, gegebenenfalls unter Berücksichtigung der Formel für unkompetitive Substratinhibierung ausgewertet:  $v = v_{\text{max}}/(1 + K_M/S + S/K_i)$ .

Um die Rolle von Ubichinon als potentiell physiologischem Elektronenakzeptor von AlkJ zu untersuchen, wurden die kinetischen Parameter von AlkJ für das wasserlösliche Ubichinon 1 (Q<sub>1</sub>, 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-benzoquinon) bestimmt. Im Gegensatz zum obig beschriebenen AlkJ-Aktivitätstest ersetzt hier Q<sub>1</sub> das ansonsten verwendete PMS als intermediären Elektronenüberträger auf DCPIP (vgl. Abbildung 17). Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit von AlkJ wurde gegenüber Q<sub>1</sub> in Konzentrationen von 0 bis 0,2 mM mit 0,1 mM 1-Octanol und 0,1 mM DCPIP unter Verwendung von 0,2  $\mu\text{M}$  SEC-gereinigtem AlkJ im Dreifachansatz bestimmt. Der Nachweis der Reaktion erfolgte photometrisch über die mit der Oxidation von 1-Octanol einhergehende Entfärbung von DCPIP. Analog wurde die Eignung von Cytochrom c (Cyt c) als physiologisch relevanter terminaler Elektronenakzeptor anstelle von DCPIP untersucht. Hier wurden unter ansonsten analogen Reaktionsbedingungen PMS und DCPIP durch 5  $\mu\text{M}$  Q<sub>1</sub> sowie 10  $\mu\text{M}$  Cyt c aus

*Equus caballus* ersetzt und die Reaktionsgeschwindigkeit anhand des photometrisch bestimmbaren Redoxzustandes von Cyt c ( $\epsilon_{\text{red } 550} = 27,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt (Margoliash & Frohwirt, 1959).

### 2.6.5 Irreversible thermische Denaturierung

Zur Bestimmung der Halbwertstemperatur von AlkJ und BsADH wurden Aliquots der SEC-gereinigten Enzymlösungen in PCR-Reaktionsgefäßen im Gradienten-Thermocycler parallel bei konstanten Temperaturen inkubiert. Dabei wurde ein positionsspezifischer Temperaturgradient verwendet, so dass eine aus zwölf Ansätzen bestehende Messreihe gleichzeitig einen annähernd linear gestaffelten Temperaturbereich von 20 °C abdeckte. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze gekühlt und die jeweils verbleibende Enzymaktivität durch photometrische Aktivitätsbestimmung im Mikrotiterplattenmaßstab ermittelt.

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur von AlkJ wurden insgesamt 24 Ansätze (75 µl einer 1 µM-Enzymlösung in SEC-Puffer) bei Temperaturen zwischen 20 bis 60 °C für je eine Stunde im Thermocycler inkubiert. Nach Abkühlung wurden die inkubierten Enzymlösungen zu der auf 30 °C vortemperierten Reaktionsmischung in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert (finale Konzentrationen im Ansatz: 0,1 mM 1-Octanol, 0,2 mM PMS, 0,1 mM DCPIP, 0,2 µM AlkJ) und die Reaktion durch Mischen mit der Mehrkanalpipette gestartet.

Analog wurde das Temperaturprofil der BsADH sowie deren Punktmutanten im Temperaturbereich von 42 bis 82 °C analysiert. Um die im Lagerpuffer enthaltenen stabilisierend wirkenden Pufferagenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol und Glycerin zu entfernen, wurden die Enzymlösungen unmittelbar vor der Inkubation im Thermocycler mittels einer PD-10-Säule in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0) umgepuffert. Anschließend wurden 75 µl-Aliquots des Enzyms (50 nM) für 30 min parallel bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Für die Messung der Restaktivität wurde das in Abschnitt 2.6.3 beschriebene Nachweisprinzip in den Mikrotiterplattenmaßstab übertragen: Da BsADH in vorhergehenden Studien mit verschiedenen Substraten gegenüber Ethanol die höchste Aktivität gezeigt hatte, erfolgte die Bestimmung der nach der Thermoinkubation verbleibenden BsADH-Aktivität gegenüber 10 mM Ethanol sowie 2 mM NAD<sup>+</sup> bei der im Mikrotiterplatten-Photometer praktikablen Temperatur von 40 °C, bei welcher ein Kompromiss zwischen hoher Enzymaktivität und reproduzierbarer Probenhandhabung erzielt wurde. Ethanol sowie NAD<sup>+</sup> wurden in 200 µl 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0) in einer Flachboden-Mikrotiterplatte vorgelegt und diese für 10 min bei 40 °C im Mikrotiterplatten-Photometer vortemperiert. Anschließend wurde mit einer 8-fach Mehrkanalpipette je Vertiefung 50 µl der zuvor im Thermocycler inkubierten und abgekühlten Enzymlösungen hinzugegeben (10 nM BsADH im Ansatz) und die durch BsADH katalysierte Reduktion von NAD<sup>+</sup> anschließend bei 340 nm über einen Zeitraum von 20 min aufgezeichnet.

Für die Ermittlung der Halbwertstempertur wurden bei Untersuchung der BsADH wie auch AlkJ die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten auf das Intervall aus der jeweils geringsten sowie höchsten initialen Reaktionsgeschwindigkeit normiert und gegen die entsprechende Inkubationstemperatur aufgetragen. Die Bestimmung der Temperatur, welche eine halbmaximale Enzymaktivität bewirkt ( $T_{stab}$ ) wurde mit Hilfe des SigmaPlot Moduls Enzyme Kinetics 1.3 anhand der auf einem Zweizustandsmodell basierenden Formel für temperaturinduzierte Proteinfaltung (6-Parametermodell) wie beschrieben ermittelt (Schlehuber & Skerra, 2002; Lumry *et al.*, 1966). Dabei wird angenommen, dass nur natives (N) und vollständig denaturiertes (U) Protein in signifikanten Mengen vorliegen und Intermediate vernachlässigt werden können.

### 2.6.6 Lagerstabilität von BsADH

Um die zeitabhängige Inaktivierung von BsADH und der Punktmutante C257L bei konstanter Temperatur zu untersuchen, wurden frisch entsalzte Lösungen des Enzyms (50 nM in 50 mM  $\text{NaP}_i$  [pH 8,0], vgl. Abschnitt 2.6.5) für 56 h bei 15 °C in 2 ml-Reaktionsgefäßen in einem thermostatisierten Metallblock inkubiert. Alle 4 h wurden automatisiert durch den Pipettierroboter 50  $\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen, dem jeweils 10 min zuvor in Flachboden-Mikrotiterplatten bei 40 °C vortemperierten Reaktionsgemisch (200  $\mu\text{l}$ , s. Abschnitt 2.6.5) zugegeben und die Reaktion durch Mischen (mehrmaliges Auf- und Abpipettieren) gestartet. Die Messung erfolgte im Dreifachansatz in der Roboterplattform mit Hilfe des integrierten Mikrotiterplattenphotometers anhand des für BsADH etablierten photometrischen Assays. Die bei 40 °C gegenüber dem Substrat Ethanol erhaltenen jeweiligen initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden für die Auswertung gegen die entsprechenden Messzeitpunkte aufgetragen.

### 2.6.7 ADH-katalysierte Biokatalyse im ml-Maßstab

Die spezifische Aktivität sowie Produktselektivität der ADHs AlkJ und BsADH hinsichtlich einer Überoxidation von HLSMe über OLSMe zu DDSMe wurden durch den Reaktionsnachweis mit gereinigten Enzymen in einem Maßstab von 5 oder 10 ml ermittelt. Substrate und Produkte wurden wie in Abschnitt 2.6.8 angegeben extrahiert gemäß der unter Abschnitt 2.6.9 beschriebenen Vorgehensweise durch instrumentelle Analyse quantifiziert.

Für die biokatalytische Oxidation von HLSMe durch AlkJ wurde ein Überschuss an Ubichinon 0 ( $Q_0$ , 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon) als terminaler Elektronenakzeptor eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,6 mM  $Q_0$ , 0,5 mM HLSMe sowie 1 % (v/v) THF als Cosolvens in einem Gesamtvolumen von 5 ml 50 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 7,5). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,8  $\mu\text{M}$  IMAC-gereinigtem AlkJ gestartet und bei RT über einen Zeitraum von 60 min über GC verfolgt. Unter analogen Reaktionsbedingungen wurde die Analyse von spezifischen Enzymaktivitäten gegenüber 1-Octanol, HLSMe sowie OLSMe in

1 ml-Ansätzen durchgeführt. Um die Aktivität von AlkJ im Bereich der linearen Anfangsgeschwindigkeit zu erfassen, wurden die Reaktionen in diesem Fall bereits nach zehn Minuten durch Zugabe von 30  $\mu$ l HCl gestoppt und der Ansatz wie unter Abschnitt 2.6.8 beschrieben prozessiert. Die pH-Präferenz sowie die THF-Toleranz von AlkJ wurden analog anhand der gebildeten Produkte mittels GC-Nachweis in 1 ml-Ansätzen bestimmt. Dazu wurden je Ansatz 0,2 mM Q<sub>0</sub>, 0,5 mM HLSMe sowie 0,8  $\mu$ M IMAC-gereinigtes AlkJ für 20 min bei RT inkubiert. Dabei wurden zur Bestimmung der Cosolventtoleranz 0,5 bis 30 % (v/v) THF in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,5) eingesetzt. Bei der Ermittlung der pH-Abhängigkeit wurde bei einer Konzentration von 1 % (v/v) THF im Bereich von pH 5,5 bis 6,5 50 mM MES/NaOH als Puffer benutzt. Von pH 7,0 bis 8,0 wurde 50 mM Hepes/NaOH als Puffer verwendet während die Messungen bei pH 8,5 sowie 9,0 in 50 mM Tris/HCl erfolgten.

Die Umsetzung von HLSMe zu OLSMe durch BsADH im semipräparativen Maßstab wurde mit SEC-gereinigtem Enzym in einem Gesamtvolumen von 10 ml durchgeführt. Hierzu wurden 2 mM HLSMe (in DMSO, 1 % [v/v] im Ansatz) sowie 0,1 mM NAD<sup>+</sup> und gegebenenfalls 20 mM 1-Butanal in 0,1 M Hepes/NaOH (pH 8,0) gelöst und in einem 50 ml-Messzylinder als Reaktionsgefäß in einem auf 60 °C temperierten Wasserbad für fünf Minuten erwärmt. Der Ansatz wurde durch einen Magnet-Kreuzrührer bei 750 rpm durchmischt und die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l BsADH (Stammlösung 3  $\mu$ M, 30 nM im Ansatz) gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots von 0,5 ml entnommen, die Kohlenwasserstoffe durch Ethylacetat wie folgend beschrieben extrahiert und durch GC hinsichtlich der gebildeten Produkte untersucht.

### 2.6.8 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie (GC)

Den bei Untersuchungen von AlkB, AlkJ und BsADH zu definierten Zeitpunkten in ein 2 ml-Reaktionsgefäß entnommenen Proben von 0,5 ml wurde 15  $\mu$ l 18,5 %-iger HCL-Lösung hinzugegeben und die enzymatische Reaktion damit gestoppt. Anschließend wurden die Proben mit 275  $\mu$ l Ethylacetat überschichtet, welches als internen Standard 0,5 mM *n*-Dekan oder *n*-Dodekan enthielt. Die Substrate/Produkte wurden durch zweiminütiges Vortexen mit Hilfe des Turbomix-Aufsatzes in die Ethylacetatphase extrahiert. Nach 30-minütiger Entmischung bei RT wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (Minispin R, 13200 rpm, RT, 7 min), 80  $\mu$ l der Ethylacetatphase in ein GC-Probengefäß (mit Inset) überführt und für die GC-Analyse eingesetzt. Bei Experimenten mit einer einmaligen (Endpunkt-) Bestimmung, welche im 1 ml-Maßstab durchgeführt wurden, wurden die oben angegebenen Volumina an HCL und Ethylacetat verdoppelt und die Kohlenwasserstoffe des gesamten Ansatzes auf einmal extrahiert. Bei Bedarf wurden die in Ethylacetat extrahierten Produkte HLSMe und DDSMe zur Verbesserung deren Nachweisgrenzen direkt im GC-Probengefäß durch Zugabe von 80  $\mu$ l MSTFA-Reagenz ( $\cong$  1:1 Verdünnung) derivatisiert.

### 2.6.9 Produktnachweis mittels GC

Die instrumentelle Analyse der im jeweiligen Assay von LSMe oder HLSMe ausgehend gebildeten Produkte erfolgte durch Gaschromatographie unter Verwendung einer OPTIMA5 HT Kapillarsäule (Länge 30 m + 5 m desaktivierte Vorsäule, innerer Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25  $\mu\text{m}$ ) mit einem PerkinElmer Clarus500 Gaschromatograph mit Flammeionisationsdetektor (FID). Als Trägergas wurde Helium bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Für die Untersuchung der mit AlkJ oder BsADH aufgenommenen Zeitreihen wurde die Säule nach Injektion von 1  $\mu\text{l}$  Probe in Ethylacetat bei einem Splitverhältnis von 1:60 von 90 °C Anfangstemperatur mit einer Heizrate von 15 °C/min auf 280 °C erwärmt. Anschließend wurde die Heizrate auf 45 °C/min erhöht, bis eine Temperatur von 300 °C erreicht war, welche für drei Minuten gehalten wurde. Unter Einbeziehung der Säulenabkühlphase von ca. 7 min auf 90 °C und der Äquilibrationszeit von 2 min ergab sich so eine Laufzeit von 24 min je Probe. Bei der Analyse von Proben aus Screening-Experimenten mit AlkB-Mutanten, bei welchen HLSMe bzw. DDSMe durch Zugabe vom MSTFA-Derivatisierungsreagenz (1:1 zur Probe in Ethylacetat) markiert wurden, wurde die Säule bei den oben beschriebenen Injektionsbedingungen von 130 °C auf 170 °C bei einer Heizrate von 15 °C/min erhitzt. Anschließend wurde die Säule mit einer Geschwindigkeit von 30 °C/min auf 300 °C aufgeheizt und diese Temperatur für drei Minuten gehalten. Der Abstand zweier Proben betrug bei dieser Methode 17 min.

Analog wurden die Oxidationsprodukte von *n*-Octan mit Hilfe einer OPTIMA FFAPplus Kapillarsäule (Länge 30 m + 5 m desaktivierte Vorsäule, innerer Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25  $\mu\text{m}$ ) aufgetrennt. Nach Injektion von 1  $\mu\text{l}$  Probenvolumen (Split 1:20) wurde die Säule für 5 min bei 40 °C temperiert, woraufhin die Temperatur bei einer Heizrate von 30 °C/min auf 250 °C erhöht und für 3 min gehalten wurde, was unter Berücksichtigung der Säulenabkühlung in einer Gesamtlaufzeit von 28 min je Probe resultierte. Die Peaks für die Substrate und Produkte der enzymatischen Reaktion wurden mit Hilfe der Steuersoftware anhand von Referenzstandards identifiziert und quantifiziert. Hierzu wurde für jede GC-Methode eine Kalibriergerade für alle zu quantifizierenden Substanzen anhand von 0,5 mM *n*-Dekan oder *n*-Dodekan als internem Standard aufgenommen.

## 2.7 Biophysikalische Methoden

### 2.7.1 Photometrischer Nachweis von FAD

Absorptionsspektren von IMAC-gereinigtem rekombinanten AlkJ wurden in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) an einem Photodiodenarray-Photometer bei RT aufgenommen. Um an AlkJ gebundenes FAD/FADH<sub>2</sub> in einen einheitlichen Oxidationszustand zu überführen, wurde die am Enzym gebundene prosthetische Gruppe durch

Denaturierung mit SDS aus dessen Bindungstasche freigesetzt, woraufhin FADH<sub>2</sub> in sauerstoffhaltiger Lösung bekanntermaßen zu FAD oxidiert wird (Aliverti *et al.*, 1999). Für den Nachweis von enzymgebundenem FADH<sub>2</sub> wurden 10 µM AlkJ-Lösung (2 ml in IMAC-Puffer) durch Zugabe von 0,2 % (w/v) SDS in der Messküvette denaturiert und die Oxidation des freigesetzten FADH<sub>2</sub> durch Aufnahme von Spektren von 600 bis 190 nm verfolgt.

Um die Art der Interaktion des FAD-Cofaktors mit AlkJ zu untersuchen, wurde versucht, die prosthetische Gruppe durch Behandlung des Enzyms mit chaotropen Reagenzien zu entfernen und die resultierende Enzympräparation spektroskopisch auf FAD/FADH<sub>2</sub> zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde 5 mg IMAC-gereinigtes AlkJ nach Dialyse gegen IMAC-Puffer über den His<sub>6</sub>-tag erneut an 1 ml Ni-Sepharose High Performance immobilisiert und mit 20 ml einer Mischung aus 2 M Harnstoff und 2 M KBr in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit IMAC-Puffer gespült und AlkJ mit 2 ml 300 mM Imidazol/HCl (pH 8,0) in IMAC-Puffer eluiert. AlkJ wurde wie oben beschrieben denaturiert und die Enzymlösung hinsichtlich ihres verbliebenen FAD-Gehalts untersucht.

Die Bestimmung des exakten Beladungsgrads von rekombinantem AlkJ mit FAD erfolgte durch photometrische Quantifizierung von AlkJ sowie des aus derselben Enzympräparation freigesetzten FAD. Zu diesem Zweck wurde IMAC-gereinigtes AlkJ durch Zugabe von 70 % (w/v) (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> präzipitiert und das nach der Zentrifugation erhaltene Proteinpräzipitat in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0), 8 M Harnstoff, 2 M KBr resuspendiert. Nach Denaturierung für zwei Stunden bei RT wurde AlkJ durch Zugabe von 10 % (w/v) TCA gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt (5418R, 13.200 rpm, 4 °C, 30 min). Der gelblich gefärbte Überstand wurde abgenommen, wohingegen das Proteinpräzipitat mit Aceton gewaschen und anschließend in IMAC-Puffer gelöst wurde. Die Konzentration von Apo-AlkJ in der Lösung wurde bei 280 nm anhand seines spezifischen Extinktionskoeffizienten (vgl. Abschnitt 2.5.7) bestimmt, wohingegen das oxidierte FAD im Überstand bei 450 nm mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten 9,30 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Aliverti *et al.*, 1999) quantifiziert wurde.

### 2.7.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte in einer speziellen Filmküvette aus Quarzglas (Schichtdicke 0,1 mm) bei 25 °C in einem Jasco J-810 CD-Spectropolarimeter. Hierzu wurde eine 10 µM AlkJ-Lösung verwendet, welche nach der IMAC-Reinigung gegen CD-Puffer (20 mM KP<sub>i</sub> [pH 7,5], 50 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dialysiert worden war (MWCO 12 bis 16 kDa). CD-Spektren zwischen 250 und 190 nm wurden durch Akkumulation von sechs Einzelspektren (*Response* = 1 s, *Bandwidth* = 1 nm, *Data Pitch* = 0,1 nm, *Scan Speed* = 50 nm/min) erhalten. Die in Grad gemessenen Werte für die Elliptizität  $\Theta_{obs}$  wurden auf die molare Elliptizität pro Aminosäure  $\Theta_{MRW}$  (*Mean Residue Weight*) umgerechnet. Dabei bezeichnet  $M_R$  die Molmasse

des untersuchten Proteins,  $c$  dessen Konzentration in mg/ml,  $d$  die Schichtdicke in cm sowie  $N_A$  die Anzahl der Aminosäuren.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta_{obs} \times M_R}{c \times d \times N_A}$$

Der thermische Entfaltungsübergang von AlkJ wurde in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 mm) bei einer Wellenlänge von 215 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge das stärkste Differenzsignal zwischen nativem und bei 95 °C thermisch vollständig denaturiertem Zustand von AlkJ zu beobachten war. Für die Messung des Entfaltungsübergangs wurde eine frisch IMAC-gereinigte 5 µM AlkJ-Lösung verwendet, welche ausgiebig gegen CD-Puffer dialysiert worden war. Die Änderung des CD-Signals wurde in Schritten von 0,1 °C aufgezeichnet und die gemessenen Elliptizität  $\Theta$  gegen die Temperatur aufgetragen. Dabei wurde ein Temperaturbereich von 25 °C bis 55 °C bei einem Temperaturgradienten von 60 K/h überstrichen. Die übrigen Geräteeinstellungen entsprachen denen bei der Aufnahme von CD-Spektren (siehe oben). Zur Auswertung der Rohdaten wurde ein Zweizustandsmodell der Proteinfaltung zugrundegelegt (Lumry *et al.*, 1966). Dabei wird angenommen, dass nur natives (N) und vollständig denaturiertes (U) Protein in signifikanten Mengen vorliegen und Intermediate vernachlässigt werden können. Die Normierung und Kurvenanpassung der erhaltenen Entfaltungsübergänge erfolgte gemäß Schlehuber & Skerra, (2002).

## 2.8 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

ApE 1.17	M. Wayne Davis, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA
BLAST	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
BRENDA	(Schomburg <i>et al.</i> , 2002)
ChemDraw Ultra 12.0	PerkinElmer, Rodgau
Creative Suite 5 Design Standard	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Dichroweb	(Whitmore & Wallace, 2004)
ExpASy	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
EndNote X4	Thomson Reuters, New York City, USA
Gen5	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Jalview	(Waterhouse <i>et al.</i> , 2009)

---

Office Professional 2010	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
Origin	OriginLab, Northampton, MA, USA
Protein Data Bank ( <a href="http://www.rcsb.org/pdb">www.rcsb.org/pdb</a> )	(Berman <i>et al.</i> , 2000)
Protter	(Omasits <i>et al.</i> , 2014)
PyMOL 1.3	(DeLano, 2002)
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc., San Jose, CA, USA
SigmaPlot Enzyme Kinetics Module 1.3	Systat Software Inc., San Jose, CA, USA
TotalLab Quant	TotalLab, Newcastle upon Tyne, UK
UniProt ( <a href="http://www.uniprot.org">www.uniprot.org</a> )	(Apweiler <i>et al.</i> , 2004)

## 3 Ergebnisse

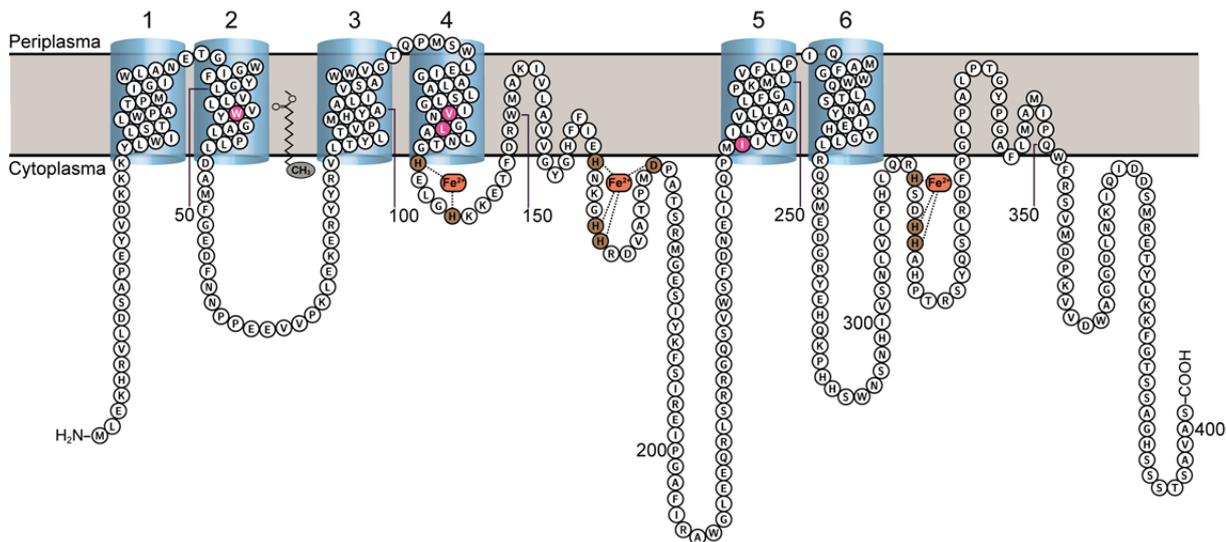
### 3.1 Enzyme-Engineering von AlkB

Aufgrund der im Vergleich zu den meisten bisher charakterisierten Monooxygenasen deutlich strikteren Regioselektivität stellt AlkB einen für die industrielle Biotechnologie hochattraktiven Biokatalysator dar (Ramu *et al.*, 2011). Allerdings wurde bei Biotransformationsexperimenten von Alkanen bzw. deren Derivaten mit *alkBGT*-exprimierenden *E. coli*-Zellen eine Überoxidation zur Alkansäure beobachtet, was auf die für Monooxygenasen nicht untypische (van Beilen *et al.*, 2003) beschränkte Chemoselektivität von AlkB zurückgeführt wurde (Grant *et al.*, 2011). Zudem wurde für das Enzym eine partielle Entkopplung der NADH-Reduktion von der Alkanoxidation festgestellt (Schrewe *et al.*, 2011), so dass eine AlkB-Variante mit höherer Produktselektivität und besserer Elektronentransfereffizienz für die Hydroxylierung von LSMe im industriellen Maßstab wünschenswert wäre. Ausgehend von diesem Anforderungsprofil sollten in der vorliegenden Arbeit die enzymatischen Eigenschaften von AlkB mittels molekularer Evolution für eine selektivere Hydroxylierung des unnatürlichen Substrats LSMe optimiert werden.

#### 3.1.1 Konstruktion eines Topologiemodells

Obwohl AlkB aus *P. putida* GPo1 seit seiner Erstbeschreibung im Jahr 1966 (Peterson *et al.*, 1966) Gegenstand umfassender Untersuchungen sowohl zur genetischen Organisation (Bosetti *et al.*, 1992; Kok *et al.*, 1989; van Beilen *et al.*, 2001) als auch zur molekularen Wirkungsweise gewesen ist (Shanklin *et al.*, 1997; Naing *et al.*, 2013), ist es bis heute nicht gelungen, die dreidimensionale Struktur des Enzyms aufzuklären. Um anhand bekannter Struktur-Funktionsbeziehungen ein tieferes biochemisches Verständnis zu erlangen und um eine Grundlage für die zielgerichtete Modifizierung des Enzyms zu haben, wären die 3D-Struktur oder wenigstens ein realistisches Modell von AlkB jedoch von großem Interesse (Cooper *et al.*, 2012).

Bei der Suche nach sequenzverwandten Enzymen von AlkB mit bekannter 3D-Struktur mit Hilfe des HHPred-Servers (Söding *et al.*, 2005) wurden keine homologen Enzymkandidaten in der PDB (Berman *et al.*, 2000) gefunden. Um aktivitätsrelevante Abschnitte in der Aminosäuresequenz dennoch eingrenzen zu können und dadurch die Erfolgsaussichten für gezielt oder zufällig eingeführte Mutationen zu erhöhen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein auf der Primärstruktur (UniProt ID: P12691) und Literaturdaten für Mutanten von AlkB basierendes Topologiemodell von AlkB erstellt (Abbildung 4). Zur Lokalisierung der in die Lipiddoppelschicht eingelagerten Sequenzabschnitte wurde die Aminosäuresequenz mit Hilfe des TMHMM-Algorithmus (Krogh *et al.*, 2001) auf Transmembranhelices (TMH) untersucht.



**Abbildung 4.** Topologiemodell von AlkB. Dargestellt ist die vorhergesagte schematische Anordnung der Polypeptidkette von *Pseudomonas putida* AlkB innerhalb der Lipiddoppelschicht der inneren Zellmembran basierend auf einer Berechnung mit Hilfe des TMHMM-Algorithmus sowie Mutationsstudien. Die Primärsequenz des Enzyms ist im Einbuchstabencode dargestellt; die Nummerierung gemäß UniProt (ID: P12691) bei jedem 50. Rest angegeben.  $\alpha$ -helicale Sequenzabschnitte innerhalb der Zellmembran sind durch Hinterlegung mit blauen Zylindern gekennzeichnet und entsprechend ihrer Abfolge nummeriert. Die acht an der Koordinierung der essentiellen Eisenionen beteiligten Histidinreste sowie die ebenfalls katalytisch relevante Position Asp181 sind braun schattiert. Zur Veranschaulichung der Metallkoordinierung ist pro Histidin-Cluster ein Eisenion dargestellt. Bisher bekannte an der Substratbindung bzw. -diskriminierung beteiligte Reste sind violett hervorgehoben. Die vermutete Positionierung des industriell relevanten Substrates Laurinsäure-Methylester ist zwischen den Transmembranhelices Nr. 2 und 3 angedeutet.

Dabei wurden insgesamt sieben hydrophobe Sequenzabschnitte mit Längen von 20 bis 43 Aminosäuren ermittelt, die sich deutlich von den restlichen Sequenzbereichen abgrenzen. Davon hatten fünf eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 1,0, wohingegen zwei der kürzeren hydrophoben Bereiche (Nr. 5 & 7) bloß eine Wahrscheinlichkeit von 0,7 aufwiesen. In Anlehnung an eine vorhergegangene Studie zur Membranorientierung von AlkB (van Beilen *et al.*, 1992b) wurden die beiden kürzeren hydrophoben Abschnitte (AS 148 bis 166 sowie AS 332 bis 352) als membranassoziierte Loops interpretiert, wohingegen der mit 43 Aminosäuren längste hydrophobe Sequenzabschnitt von Position 233 bis 275 als doppelte Transmembranhelix gewertet wurde. Beide Polypeptid-Termini sowie die nicht mit der Membran interagierenden Bereiche von AlkB sind in dem resultierenden Modell damit nahezu komplett im bakteriellen Cytoplasma lokalisiert. Der Verlauf der Polypeptidkette im Cytoplasma und der inneren Zellmembran wurde mit Hilfe des Programmes Protter (Omasits *et al.*, 2014) unter Angabe der durch die TMHMM-Analyse erfassten Sequenzabschnitte visualisiert (Abbildung 4).

Die durch AlkB katalysierte Hydroxylierung von Alkanen erfolgt mittels Aktivierung des Substratsauerstoffs durch Eisenionen als katalytisch essentielle Cofaktoren. Im Gegensatz zu den ebenfalls eisenabhängigen CYP-P450-Monooxygenasen (Groves, 2003) oder Sauerstoff-Transportproteinen wie Hämoglobin (Park *et al.*, 2006), sind die Eisenionen bei AlkB aber

nicht in Gestalt eines Häm-Cofaktors, sondern direkt durch Histidin-Seitenketten gebunden, wie in Mössbauer-Studien gezeigt wurde (Shanklin *et al.*, 1997). Als für die enzymatische Aktivität essentiell wurden acht der insgesamt 19 im *alkB*-Gen codierten Histidinreste (His138, His142, His168, His172, His173, His312, His315, His316) sowie Asp181 mittels Alanin-*Scanning* identifiziert (Shanklin & Whittle, 2003). Die den Metall-Cofaktor bindenden Aminosäuren sind dabei in drei Clustern konzentriert, welche im Topologiemodell jeweils cytoplasmatisch nahe der Membran lokalisiert erscheinen und somit trotz ihrer separierten Anordnung in der Aminosäuresequenz in der Tertiärstruktur zusammenkommen und so bei der Koordinierung der Metallionen synergistisch wechselwirken können. Pro AlkB-Monomer wurde eine stöchiometrische Beladung mit 2 Eisenionen ermittelt, für welche eine dinukleare Anordnung vermutet wird (Shanklin *et al.*, 1997).

Weitere Anhaltspunkte hinsichtlich der Eingrenzung der substratbindenden Region in AlkB ergaben sich aus Mutationsstudien. Für die Bindung des Alkansubstrats wurde eine durch die sechs TMHs gebildete Kavität innerhalb der Zellmembran postuliert, in welcher auch die bislang bekannten Mutationen zur Substratspezifität von AlkB lokalisiert sind (Rojo, 2005). Basierend auf der Tatsache, dass *P. putida* AlkB lineare Alkane nur bis zu einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen umsetzt (McKenna & Coon, 1970), wurde ein in die Substratbindetasche reichender Tryptophanrest (Trp55) als die Substratkettenlänge limitierendes Strukturelement der Bindetasche vermutet. Der Austausch von Trp55 gegen Serin resultierte in einer Aktivitätssteigerung gegenüber *n*-Alkanen mit mehr als 14 Kohlenstoffatomen, woraus auf eine direkte Rolle von Trp55 bei der Substratdiskriminierung gefolgert wurde (van Beilen *et al.*, 2005). Weitere die Substratspezifität bestimmende Reste wurden durch Experimente zur gerichteten Evolution von AlkB über Komplementationstests mit gasförmigen Kohlenwasserstoffen als einzig verfügbare Kohlenstoffquelle identifiziert (Koch *et al.*, 2009). Die Aktivität von AlkB für die Hydroxylierung der kurzkettigen Alkane *n*-Propan sowie *n*-Butan wurde dabei durch die Substitutionen V129M, L132V sowie I233V gesteigert.

Sämtliche für die Substraterkennung und -bindung relevanten Aminosäurepositionen, welche bislang anhand von Mutationen identifiziert wurden, liegen in dem Topologiemodell von AlkB (Abbildung 4) in den cytoplasmatisch zugewandten Abschnitten der TMHs Nr. 2, 4 & 5. Die für die Koordinierung der katalytisch essentiellen Eisenionen verantwortlichen Aminosäuren sind dabei unmittelbar im Grenzbereich zu den TMHs im Cytoplasma lokalisiert. In Verbindung mit einem vorgeschlagenem Substratbindetunnel (Rojo, 2005) lässt sich folgern, dass bei der Bindung eines Alkans die zu funktionalisierende  $\omega$ -Position aus der Membran in Richtung Cytoplasma ragt, dem aktiven Zentrum zugewandt ist, wohingegen im Fall von LSMe als Substrat die veresterte Carbonsäuregruppe in die Zone der Lipiddoppelschicht zeigt. Die Wechselwirkung zwischen dem Elektronenüberträgerprotein AlkG mit den Eisenionen im aktiven Zentrum wird im Einklang mit diesem Modell durch die cytoplasmatischen Sequenzbereiche am Amino- und Carboxyterminus von AlkB, sowie die

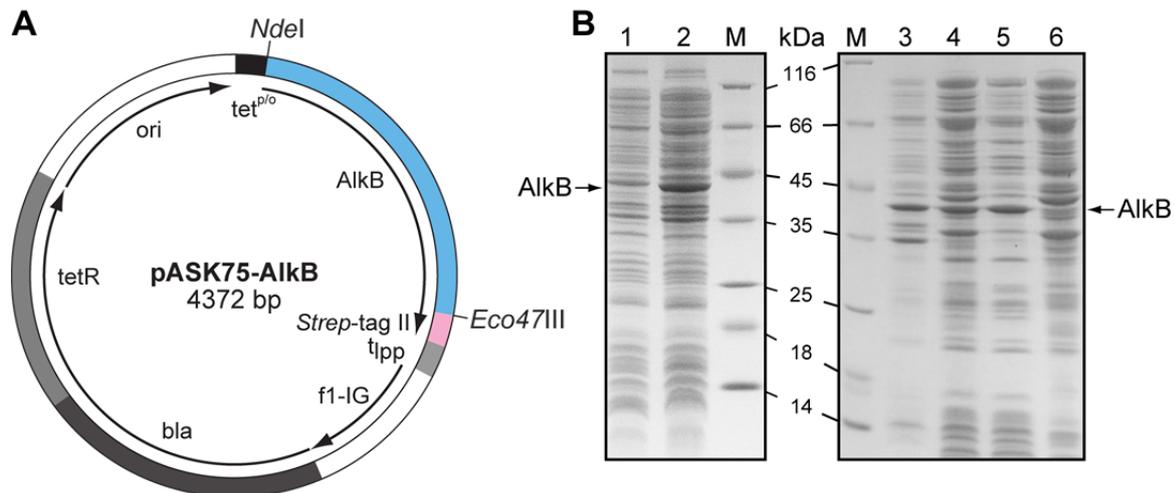
Sequenzabschnitte zwischen den TMHs Nr. 2 & 3 sowie Nr. 4 & 5 vermittelt. Basierend auf diesen experimentellen Befunden und dem anhand dessen konstruierten Topologiemodell wurden in der vorliegenden Arbeit Aminosäurepositionen, welche sich in der dem Cytoplasma zugewandten Region von AlkB befinden, für die Mutagenese ausgewählt.

### 3.1.2 Produktion in *E. coli* und Anreicherung von AlkB

Für die heterologe Produktion von AlkB wurde *E. coli* W3110 als Wirtsorganismus benutzt, bei dessen Verwendung in vorangegangenen Arbeiten im Vergleich zu anderen *E. coli*-Stämmen ein erhöhter Anteil an katalytisch funktionalem AlkB erreicht wurde (Dr. Steffen Schaffer, persönliche Mitteilung). Unter Berücksichtigung der für die Wirtszelle potentiell toxischen Überexpression von Membranproteinen (Padan *et al.*, 2003), wurde zur rekombinanten Biosynthese von AlkB das präzise kontrollierte *tet*-Promotorsystem (Skerra, 1994) mit dem Expressionsplasmid pASK75-AlkB verwendet, auf welchem *alkB* fusioniert mit einem C-terminalen *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) kloniert war (Plasmid zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Gilch; Abbildung 5A).

Die Genexpression wurde moderat induziert (mit nur 50 µg anstelle der sonst üblichen 200 µg aTc/Liter Kulturmedium), sobald eine OD<sub>550</sub> von 0,5 erreicht war. Um dem Verbrauch an Induktor Rechnung zu tragen wurde die Induktion nach drei Stunden Expressionsdauer wiederholt. Die Zelldichte nach insgesamt fünf Stunden Proteinproduktion bei 22 °C betrug zwischen OD<sub>550</sub> = 1,4 – 1,7, wobei der mit Hilfe von SDS-PAGE (gefärbt mit Coomassie-Brilliantblau) und Densitometrie bestimmte Anteil von AlkB am Gesamtzellprotein zum Erntezeitpunkt ca. 10 % ausmachte (Abbildung 5B, Spur 2).

Etwa die Hälfte des produzierten AlkB wurde nach Aufschluss der Zellen durch *French Press* im löslichen Zellrohextrakt nachgewiesen, welcher anschließend zur Isolierung der bakteriellen Zellmembran einer Ultrazentrifugation unterzogen wurde. Die Zentrifugation bei 125.000 g für 2 h führte zur Abtrennung der AlkB-enthaltenden Zellmembran von den löslichen cytoplasmatischen und periplasmatischen Proteinen. Der Anteil von AlkB an den Proteinen der Membranproteinfraktion betrug 16 %. Bei den neben AlkB in der Membranpräparation vorherrschenden *E. coli*-Proteinen handelt es sich vor allem um die Komponenten der bakteriellen Atmungskette, Enzyme der Lipid- und Zellmembranbiosynthese sowie Transporter- und Sensorproteine (Weiner & Li, 2008). Die so präparierte Zellmembran wurde in 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) resuspendiert und im Folgenden für die enzymatische Charakterisierung sowie die vergleichenden Untersuchungen von AlkB-Punktmutanten eingesetzt. Die Membranfraktion konnte im verwendeten Puffer für mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden ohne an Hydroxylierungsaktivität gegenüber *n*-Octan einzubüßen.



**Abbildung 5.** Bakterielle Produktion und Anreicherung von AlkB. (A) Schematische Darstellung des für die Herstellung von AlkB verwendeten Expressionsplasmids für *E. coli*. Das Gen für AlkB, welches am 3'-Ende mit einer für das *Strep-tag II* codierenden Sequenz fusioniert ist, steht unter der Kontrolle des mit Anhydrotetrazyklin induzierbaren tet-Promotor/Operators ( $tet^{P/O}$ ) und endet mit dem Lipoprotein-Transkriptionsterminator ( $t_{lpp}$ ). Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des tet-Repressors (*tetR*) sichergestellt. Weitere Elemente sind der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (*ori*), die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (*f1-IG*) und das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Gen der  $\beta$ -Lactamase (*bla*). (B) Übersicht über die bakterielle Herstellung und Anreicherung von rekombinantem AlkB durch reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spur 1: Gesamtzellextrakt von mit pASK75-AlkB transformierten *E. coli* W3110-Zellen vor Induktion der Fremdgenexpression. Spur 2: Gesamtzellextrakt nach 5 h rekombinanter Genexpression bei 22 °C zum Erntezeitpunkt. Spur 3: Nach dem Zellaufschluss mittels *French Press* sedimentierte Aggregate. Spur 4: Rohextrakt mit löslichen Proteinen. Spur 5: Mittels Ultrazentrifugation sedimentierte Membranfraktion. Spur 6: Löslicher Proteinüberstand nach Ultrazentrifugation.

Um für enzymkinetische Messungen elektrophoretisch homogenes AlkB zu gewinnen, wurden die durch Ultrazentrifugation präparierten Membranproteine solubilisiert. Hierfür wurden zwei publizierten Vorgehensweisen getestet (Alonso & Roujeinikova, 2012), welche auf der Verwendung der Detergenzien *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM) oder Oktaethylenglycol-Monododecylether (C12E8) beruhen.

Wurde DDM als Detergenz verwendet, gingen die Solubilisierung und nachfolgende Reinigung durch SAC mit einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust im Vergleich zur ursprünglich präparierten Membranfraktion von AlkB einher. Im NADH-Verbrauchsassay (vgl. Abschnitt 2.6.1) wurde mit der angereicherten Zellmembran eine enzymatische Aktivität von 488  $\mu\text{M}/\text{min}$  gegenüber *n*-Octan bestimmt. Unmittelbar nach der Solubilisierung der Membranproteine mit DDM wurde nur noch eine Aktivität von 65  $\mu\text{M}/\text{min}$  ermittelt, wohingegen das SAC-gereinigte AlkB lediglich eine minimale Restaktivität von 5  $\mu\text{M}/\text{min}$  aufwies. Aufgrund des deutlichen Aktivitätsverlustes wurde diese Solubilisierungsstrategie nicht weiter verfolgt.

Bei der Solubilisierung mit C12E8 wurden mit Hilfe der veröffentlichten Vorgehensweise (Alonso & Roujeinikova, 2012) aus 2 l Kultur lediglich 75  $\mu\text{g}$  AlkB erhalten, weshalb dieser Ansatz ebenfalls nicht weiter verfolgt wurde. Da für die Solubilisierung von AlkB in nativem

Zustand in früheren Arbeiten bereits eine Vielzahl an Detergenzien ohne Erfolg getestet wurde (Peters & Witholt, 1994) und vielversprechende Ergebnisse publizierter Reinigungsstrategien weder in eigenen Vorexperimenten noch von anderen Arbeitskreisen nachvollzogen werden konnten (Naing *et al.*, 2013), erfolgte die Untersuchung der Enzymaktivität von AlkB und dessen Mutanten in dieser Arbeit mit der angereicherten Zellmembranfraktion.

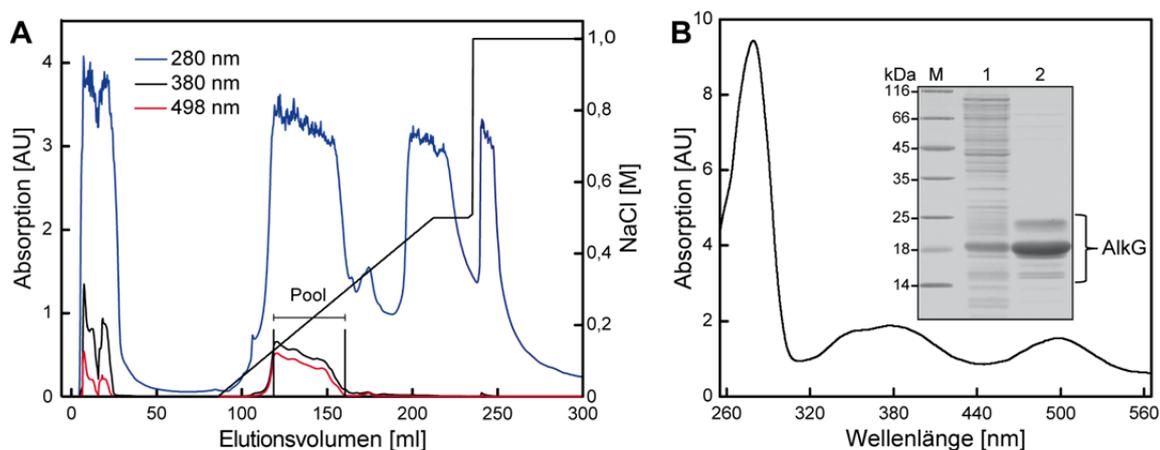
### 3.1.3 Produktion und Reinigung der Helferproteine AlkG und AlkT

In der vorliegenden Arbeit sollten vergleichende Messungen der enzymatischen Aktivität von AlkB – im Gegensatz zu bisher geläufigen Untersuchungen im Ganzzellsystem (Koch *et al.*, 2009; Julsing *et al.*, 2012; Schrewe *et al.*, 2014) – *in vitro* unabhängig vom zelleigenen Metabolismus des Produktionsorganismus angestellt werden. Dies setzt eine vorherige Isolierung der beiden für die katalytische Funktion von AlkB erforderlichen Helferproteine AlkG sowie AlkT voraus, welche separat in *E. coli* produziert und durch Chromatographie gereinigt wurden. Für die gentechnische Herstellung wurden die in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra von Dr. Lukas Eisoldt sowie Dr. Stefan Glich zuvor konstruierten bakteriellen Expressionsvektoren pET21a-AlkG sowie pASK-IBA5(+)-AlkT verwendet.

Für die heterologe Produktion des Elektronenüberträgerproteins AlkG aus *P. putida* GPo1 (UniProt ID: P00272) ohne fusioniertes Affinitätsanhängsel wurde *E. coli* BL21(DE3) als Wirtsorganismus benutzt. AlkG wurde im bakteriellen Cytoplasma für fünf Stunden bei 30 °C synthetisiert und nach Lyse der Zellen durch Anionenaustauschchromatographie (AEX) mit Hilfe einer Resource Q-Säule gereinigt (Abbildung 6A). Aufgrund seines niedrigen isoelektrischen Punktes ( $pI = 4,3$ ) adsorbierte AlkG beim verwendeten Laufpuffer von 20 mM MES/NaOH mit pH 6,0 quantitativ an den Anionentauscher und wurde bei linearer Erhöhung der NaCl-Konzentration scharf getrennt von den Wirtsproteinen eluiert. Über die für aromatische Aminosäuren charakteristische Wellenlänge von 280 nm wurde der Verlauf der Proteinchromatographie insgesamt verfolgt, während der Elutionszeitpunkt von AlkG spezifisch anhand der Absorption der gebundenen  $Fe^{3+}$ -Ionen bei 380 und 498 nm nachgewiesen wurde. Nach der AEX noch vorhandene kontaminierende Proteine wurden unter Erhitzen auf 60 °C denaturiert und durch Zentrifugation abgetrennt.

AlkG besteht aus zwei jeweils ca. 50 AS großen Rubredoxin-Domänen, die über eine aus 66 AS bestehende Linkersequenz miteinander verknüpft sind. Jede Domäne kann dabei, jeweils vermittelt durch 4 Cysteinreste, ein Eisenion binden. Davon ist ein gebildeter Eisenkomplex so stabil, dass dieser während der Reinigung bestehen bleibt, während die zweite Eisenbindungsstelle bei Untersuchungen des gereinigten Proteins stets als unbesetzt charakterisiert wurde (Lode & Coon, 1971; Lee *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der oben beschriebenen Vorgehensweise pro Liter Schüttelkultur 25 bis 35 mg

homogenes AlkG erhalten. Die Überprüfung der für die Funktionalität von AlkG relevanten stöchiometrischen Beladung mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen geschah photometrisch anhand des charakteristischen Absorptionsspektrums des gereinigten Proteins (Abbildung 6B). Dabei wurde übereinstimmend mit früheren Studien ein  $A_{280}/A_{498}$ -Verhältnis von 6,3 ermittelt, was einer Beladung mit einem  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion pro AlkG-Molekül entspricht (Lode & Coon, 1971). Das so gewonnene AlkG wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 20 mM MES/NaOH (pH 6,0) für mehrere Monate gelagert und je nach Bedarf für enzymatische Tests verwendet. Das Einfrieren des Proteins führte dabei nicht zum Verlust des essentiellen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions, was durch spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen wurde.



**Abbildung 6.** Reinigung und UV/Vis-Spektrum von AlkG. (A) Bei der Anionenaustauschchromatographie (AEX) von AlkG an Resource Q wurden zusätzlich zur Absorption bei 280 nm die für AlkG charakteristischen Wellenlängen von 380 sowie 498 nm aufgezeichnet. In den oberhalb von 0,4 M NaCl beobachteten Peaks wurden mittels reduzierender SDS-PAGE keine Proteine mehr nachgewiesen. Die mit Pool bezeichneten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und einer Hitzefällung unterzogen. (B) Absorptionsspektrum von gereinigtem AlkG nach der AEX. Neben dem für Proteine charakteristischen Peak bei 280 nm sind zwei weitere Peaks in den Bereichen von 330 bis 430 nm sowie 480 bis 520 nm zu erkennen, welche durch die im AlkG gebundenen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen hervorgerufen werden. In der eingefügten Graphik ist die Reinigung von AlkG anhand reduzierender SDS-PAGE gezeigt. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spur 1: Rohextrakt von mit pET21a-AlkG transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen nach Aufschluss mittels *French Press* und Abtrennung von Aggregaten. Spur 2: AlkG nach Reinigung durch AEX sowie Hitzefällung. AlkG zeigte das auch in vorhergehenden Studien bereits eingehend beschriebene Mehrfachbandenmuster (Lee *et al.*, 1997), welches durch AlkG-Disulfid-Isoformen hervorgerufen wird.

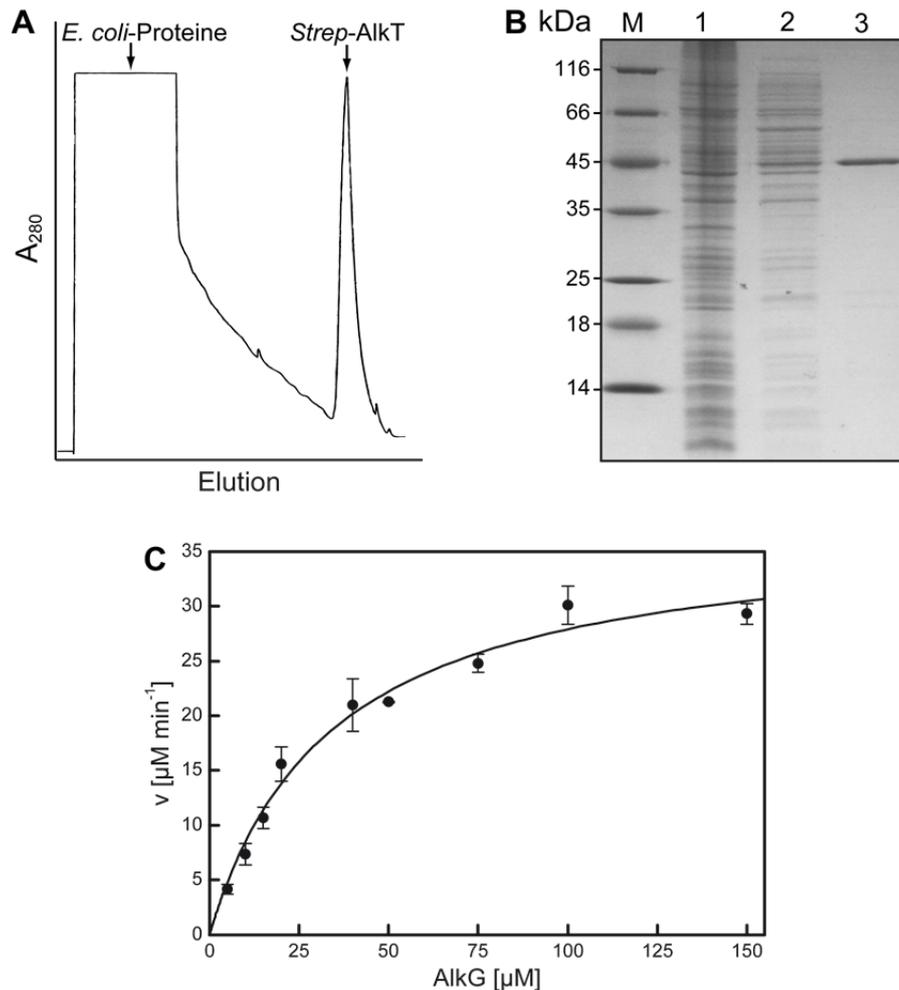
Die Herstellung von AlkT aus *P. putida* GPo1 (UniProt ID: 17052) erfolgte fusioniert mit einem N-terminalen *Strep*-tag II im Cytoplasma von mit dem Expressionsplasmid pASK-IBA5(+)-AlkT transformierten *E. coli* BL21-Zellen im 2 l-Schüttelkolbenmaßstab. Da es bei der heterologen Produktion von AlkT in *E. coli* in vorherigen Arbeiten zu der Produktion von Einschlusskörpern kam (Ueda & Coon, 1972) und die Tendenz von AlkT zur Aggregation während der Biosynthese auch in Vorexperimenten beobachtet wurde, erfolgte die Einleitung der Genexpression mit einer moderaten Induktorkonzentration von 40  $\mu\text{g/l}$  aTc bei  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Im Anschluss an die Lyse der Zellen mit der *French Press* erfolgte die Reinigung des Enzyms durch SAC, nachdem wirtszelleigene biotinhaltige Proteine sowie freies Biotin durch Zugabe von rekombinantem Streptavidin komplexiert worden waren. Zur Vermeidung einer unspezifischen Oxidation der sechs in AlkT vorkommenden Cysteinreste und um die Stabilität von AlkT während der Reinigung zu gewährleisten, wurde allen verwendeten Puffern 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie 10 % (v/v) Glycerin zugesetzt. Nach Auftragen des filtrierten bakteriellen Zellrohextrakts auf die Straptavidin-Matrix und Wegwaschen unspezifisch gebundener Proteine durch Chromatographiepuffer wurde AlkT mit 2,5 mM D-Des-thiobiotin als scharfer Peak eluiert, deutlich getrennt von den wirtszelleigenen Proteinen (Abbildung 7A). Pro Liter Schüttelkultur wurden so bis zu 5 mg elektrophoretisch homogenes AlkT erhalten, welches innerhalb von sechs Stunden für enzymatische Assays eingesetzt wurde. Eine Lagerung von AlkT über sechs Stunden hinaus bei 4 °C oder -20 °C führte zur irreversiblen Aggregation und der damit einhergehenden Freisetzung des gebundenen FAD-Cofaktors, wie schon in früheren Arbeiten beobachtet (Ueda & Coon, 1972).

Die Affinität von durch SAC gereinigtem AlkT für sein physiologisches Proteinsubstrat AlkG wurde anhand eines enzymatischen Aktivitätstests in Mikrotiterplatten mit NADH als Elektronendonator untersucht (Abbildung 7C). Die Reaktion wurde anhand der Reduktion des Eisenzentrums von mit einem Eisenion beladenem AlkG verfolgt ( $\epsilon_{498} = 11,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), anstatt – wie bei enzymkatalysierten Redoxreaktionen gebräuchlich – die Änderung des Oxidationszustands von NADH bei dessen Absorptionsmaximum ( $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Bergmeyer, 1975) zu messen, welches mit dem Absorptionsmaximum von AlkG bei 380 nm überlappte (vgl. Abbildung 6B). AlkT zeigte gegenüber AlkG ein klassisches Michaelis/Menten-Verhalten (Johnson & Goody, 2011), mit einem  $K_M$ -Wert von 34,4  $\mu\text{M}$  und einer Wechselzahl von 125  $\text{s}^{-1}$ . Die katalytische Effizienz wurde zu  $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt.

### 3.1.4 Aktivitätsnachweis von AlkBGT

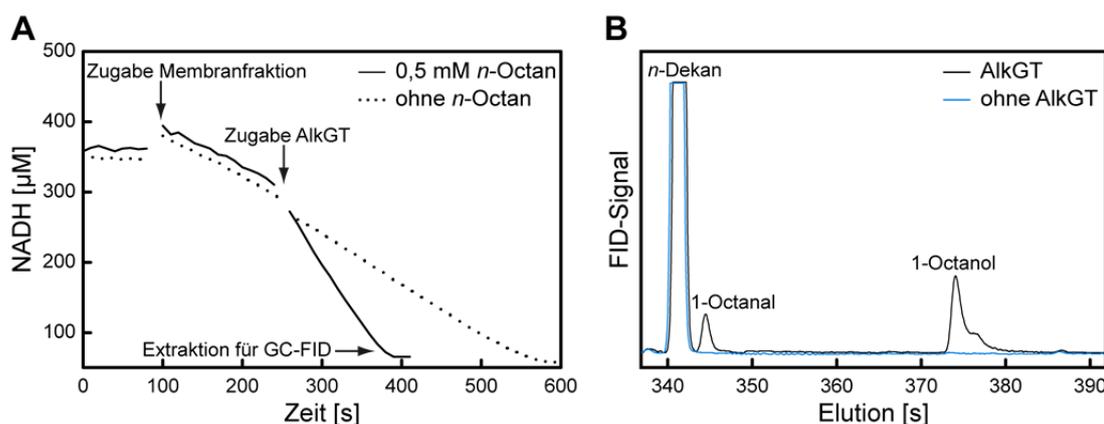
In dieser Arbeit wurde die Oxidation der Alkansubstrate *n*-Octan und LSMe durch AlkB anhand des für die Reduktion von molekularem Sauerstoff verbrauchten Cosubstrats NADH wie auch der gebildeten Kohlenwasserstoffderivate mit Hilfe photometrischer und gaschromatographischer Messungen verfolgt. Übereinstimmend mit vorhergehenden Arbeiten (Xie *et al.*, 2011; Schrewe *et al.*, 2011) wurde bei der photometrischen Aktivitätsbestimmung von in der Membranfraktion angereichertem AlkB nach Start der Reaktion auch ohne zugegebenes Alkansubstrat eine Oxidation des NADH-Cofaktors beobachtet (Abbildung 8A). Dies wird vermutlich durch neben AlkB in der Membranfraktion befindliche Enzyme, wie etwa die in der inneren Zellmembran lokalisierten Komponenten der bakteriellen Atmungskette (Dancey *et al.*, 1976), hervorgerufen.



**Abbildung 7.** Reinigung und kinetische Charakterisierung von AlkT. (A) Elutionsprofil von AlkT an Streptavidin-Sepharose. Der Verlauf der Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC) wurde anhand der Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm verfolgt. Wirtszelleigene Proteine wurden durch Spülen mit Chromatographiepuffer von der Säule gewegewaschen und AlkT schließlich mit 2,5 mM D-Desthiobiotin eluiert. (B) Übersicht über die SAC des rekombinanten AlkT durch reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spur 1: Bakterieller Zellrohextrakt nach Aufschluss durch *French Press* und Abtrennung von Aggregaten. Spur 2: Während des Waschens eluierte Proteine. Spur 3: Gereinigtes AlkT nach der SAC. (C) Die Anfangsgeschwindigkeit von 5 nM SAC-gereinigtem AlkT gegenüber 5 bis 150  $\mu\text{M}$  gereinigtem AlkG wurde im Dreifachansatz in 0,25 ml HEPES/NaOH (pH 8,0) bei 25 °C in Mikrotiterplatten bestimmt. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe des SigmaPlot Moduls Enzyme Kinetics 1.3 anhand der Michaelis/Menten Gleichung und ergab einen  $K_M$ -Wert von 34,4  $\mu\text{M}$  sowie einen  $k_{\text{cat}}$  von 125  $\text{s}^{-1}$ .

Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden bei den spektroskopischen Messungen alle für die Reaktion erforderlichen Reagenzien bis auf AlkG und AlkT in der Küvette vorgelegt (vgl. Abschnitt 2.6.1), die resuspendierte *E. coli*-Membranfraktion hinzupipettiert und zunächst die Hintergrundoxidationsrate für etwa eine Minute aufgezeichnet, welche üblicherweise 20 bis 40  $\mu\text{M}/\text{min}$  betrug. Anschließend wurden die für die katalytische Aktivität von AlkB notwendigen Helferproteine AlkG und AlkT hinzupipettiert und der durch AlkB bedingte NADH-Verbrauch nach Abzug der zuvor bestimmten Hintergrundoxidation ermittelt.

In Abwesenheit des Alkansubstrats wurde bei der Zugabe von AlkGT dabei keine Änderung der NADH-Oxidationsrate festgestellt. Nach Verbrauch des eingesetzten NADHs wurden die Endprodukte mit Ethylacetat extrahiert und durch Gaschromatographie (GC) quantifiziert. Wurde im Assay kein AlkG und AlkT zugegeben, konnten keine  $\omega$ -Oxidationsprodukte von *n*-Octan nachgewiesen werden (Abbildung 8B), was die Selektivität der enzymatischen Aktivität des heterolog exprimierten AlkB sowie die Abwesenheit von Nebenaktivitäten im Membranextrakt von *E. coli* belegt.

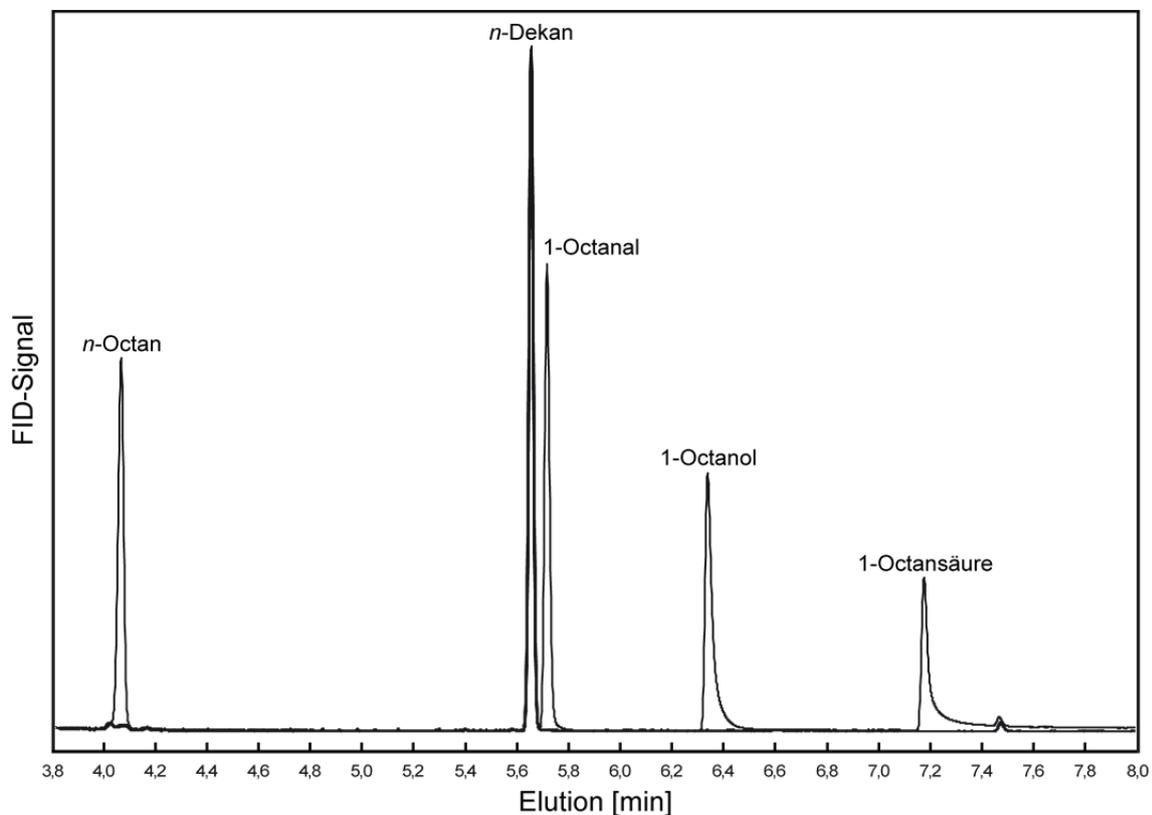


**Abbildung 8.** Photometrischer und gaschromatographischer Nachweis der enzymatischen Aktivität von AlkB. (A) Die Oxidation von  $0,4 \text{ mM}$  NADH wurde in  $1 \text{ ml}$  Tris/HCl ( $\text{pH } 7,4$ ) in  $0,5 \text{ cm}$  Quarzküvetten mit  $0,4 \text{ mM } n\text{-Octan}$  als Substrat bei  $340 \text{ nm}$  verfolgt. Die Membranfraktion enthält optisch aktive Komponenten, weshalb bei Zugabe von  $20 \mu\text{l}$  der AlkB-enthaltenden Zellmembran das Hintergrundsignal steigt. Nach Messung der durch kontaminierende Membranenzyme hervorgerufenen Hintergrundoxidationsrate wurden  $1 \mu\text{M}$  AlkT sowie  $10 \mu\text{M}$  AlkG zugegeben und der durch AlkBGT induzierte NADH-Verbrauch unter Subtraktion der Hintergrundoxidationsrate bestimmt. (B) Die während des photometrischen Assays durch AlkBGT gebildete Oxidationsprodukte von *n*-Octan wurden nach Zugabe eines internen Standards (hier: *n*-Dekan) und Extraktion der Alkane mit Ethylacetat durch Gaschromatographie an einer FFAPplus-Kapillarsäule aufgetrennt und quantifiziert.

Für die Quantifizierung der Produkte mittels GC wurde die Extraktionseffizienz der hydrophoben Produkte beim Übergang in die Ethylacetatphase ermittelt. Für 1-Octanol wurde eine Transfereffizienz von  $95 \%$  bestimmt, wohingegen  $45 \%$  des eingesetzten 1-Octanals und  $90 \%$  der vorgelegten 1-Octansäure nach erfolgter Extraktion in der Ethylacetatphase nachgewiesen wurden. Die Transfereffizienz von HLSMe betrug  $88 \%$ , bei OLSMe und DDSMe wurden nach der Extraktion  $82 \%$  bzw.  $42 \%$  der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden.

Bei der Auftrennung der gebildeten Produkte durch GC wurde für die hochsiedenden Laurinsäurederivate (Sdp. LSMe:  $262 \text{ }^\circ\text{C}$ ) eine temperaturstabile OPTIMA5 HT-Säule verwendet, die für LSMe, HLSMe sowie OLSMe jeweils eine Nachweisgrenze von etwa  $10 \mu\text{M}$  gestattete. Bei DDSMe wurden dagegen ab einer Konzentration von ca.  $150 \mu\text{M}$  quantifizierbare Peaks im Chromatogramm erhalten. Durch Derivatisierung der zuvor

extrahierten Produkte mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-Trifluoracetamid (Donike, 1969) konnte die Nachweisgrenze für HLSMe und DDSMe jeweils auf 5  $\mu\text{M}$  gesenkt werden, wohingegen die Bestimmungsgrenzen für LSMe sowie OLSMe aufgrund der für eine quantitative Silylierung notwendigen 1:1 Verdünnung auf 20  $\mu\text{M}$  stiegen. Der vergleichsweise niedrige Siedepunkt von *n*-Octan und seiner  $\omega$ -Oxidationsprodukte (125 bis 237  $^{\circ}\text{C}$ ) gestattete die Bestimmung von 1-Octanol, 1-Octanal sowie 1-Octansäure auf einer für nicht veresterte Carbonsäuren ausgelegten und thermisch bis zu 280  $^{\circ}\text{C}$  belastbaren Polyethylenglycol-Säulenphase (*Free Fatty Acid Phase*, FFAPplus; Abbildung 9). Unter deren Verwendung wurden alle von *n*-Octan ausgehend gebildeten Oxidationsprodukte underivatisiert mit einer Nachweisgrenze von unter 10  $\mu\text{M}$  quantifiziert.



**Abbildung 9.** Auftrennung von C8-Verbindungen durch Gaschromatographie an einer FFAPplus-Kapillarsäule. Gezeigt ist die Überlagerung von vier Einzelläufen mit je 500  $\mu\text{M}$  *n*-Octan, 1-Octanol, 1-Octanal sowie 1-Octansäure, welche jeweils in Ethylacetat vorlagen. Als interner Standard wurden 500  $\mu\text{M}$  *n*-Dekan verwendet. Die Geräteeinstellungen entsprachen dabei der in Abschnitt 2.6.9 beschriebenen Vorgehensweise.

Der gaschromatographische Nachweis der von AlkB gebildeten Reaktionsprodukte ergab übereinstimmend mit früheren Arbeiten (van Beilen *et al.*, 2003), dass AlkB nicht nur den initialen Einbau eines Sauerstoffatoms an der  $\omega$ -Position der Alkansubstrate katalysiert, sondern zudem in der Lage ist, den dabei entstehenden Alkohol zum Aldehyd und zur Carbonsäure weiterzuoxidieren. Allgemein wurde für Hydroxylasen (Lee, 1999), darunter insbesondere für AlkB (Schrewe *et al.*, 2011), eine Entkopplung des NADH-Verbrauchs von der Oxofunktionalisierung des Alkansubstrats beschrieben, was im Einklang mit der Überoxidationsaktivität steht.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit durch Kombination des Photometrischen Assays und anschließender Produktanalytik mittels GC die Kopplungseffizienz der Reaktion für *n*-Octan sowie LSMe ermittelt. Dabei wurden neben 1-Octanol/HLSMe auch die Folgeprodukte 1-Octanal/OLSMe sowie 1-Octansäure/DDSMe unter Berücksichtigung der für die vorherigen Oxidationsstufen verbrauchten Reduktionsäquivalente miteinbezogen. Nach Aufzeichnung der Hintergrundoxidationsrate im Photometer wurde der durch AlkB induzierte NADH-Verbrauch über einen Zeitraum von drei bis fünf Minuten bestimmt und die damit einhergehend gebildeten  $\omega$ -Oxidationsprodukte des Alkansubstrats durch GC quantifiziert.

Basierend auf einer densitometrischen Abschätzung des AlkB-Gehalts in der angereicherten Membranfraktion wurde in Verbindung mit der Produktquantifizierung eine spezifische Aktivität von 1,32 U/mg gegenüber *n*-Octan bei einer Kopplungseffizienz von 61 % bestimmt. Wurde LSMe als Substrat verwendet, betrug die spezifische Aktivität 0,3 U/mg bei einer geringeren Kopplungseffizienz von 33 %. Diese Werte stehen im Einklang mit in früheren Arbeiten ermittelten Enzymaktivitäten, bei welchen für LSMe eine spezifische Aktivität von 0,072 U/mg bei einer Elektronentransfereffizienz von 26 % ermittelt wurde (Schrewe *et al.*, 2011). Dagegen wurde mittels photometrischer Messungen gegenüber *n*-Octan bei der Verwendung der AlkB-haltigen Membranfraktion früher eine spezifische Aktivität von ca. 2 U/mg gemessen (Shanklin & Whittle, 2003).

### 3.1.5 Modellbasierte rationale Punktmutationen

Um für die Aktivität und Selektivität von AlkB kritische Regionen in der Umgebung des aktiven Zentrums zu identifizieren, wurde im Bereich der Eisenionen-koordinierenden Histidinreste (Abbildung 10) ein Alanin-Scan durchgeführt. Hierzu wurden Positionen in der Nähe der Histidin-Clustern durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht und der Einfluss der Substitution auf die Enzymaktivität und NADH-Kopplungseffizienz untersucht. Zudem wurden die bereits in vorangegangenen Arbeiten beschriebenen Mutationen V129M und L132V (Koch *et al.*, 2009), welche eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym erhöhte Aktivität gegenüber *n*-Propan sowie *n*-Butan bewirken, hinsichtlich der katalytischen Aktivität gegenüber LSMe untersucht.

Histidin-Cluster 1	129-Val	129	Asn	Gly	132	Leu	Ala	Leu	Asn	136	Thr	Gly	138	Glu	Leu	Gly	142	His	Lys	144	Lys	Glu	Thr	Phe	Asp	148
Histidin-Cluster 2	160-Gly	Tyr	Gly	His	Phe	Phe	166	Tle	Glu	168	His	Asn	Lys	Gly	172	His	173	His	Arg	175	Asp	Val	Ala	Thr	Pro	179
Histidin-Cluster 3	307-Phe	His	Leu	310	Gln	Arg	312	His	Ser	Asp	315	His	316	His	Ala	His	319	Pro	Thr	Arg	Ser	Tyr	Gln	Ser	Leu	326

**Abbildung 10.** Auswahl der Aminosäurepositionen für die gerichtete Mutagenese von AlkB. Für die Aktivität von AlkB essentielle Histidine sind in den gemäß UniProt (ID: P12691) nummerierten Sequenzausschnitten grau hinterlegt; für die Alanin-Mutagenese ausgewählte Aminosäurepositionen sind umrahmt.

Die AlkB-Varianten wurden in *E. coli* W3110 produziert, mit der bakteriellen Zellmembran isoliert und die enzymatische Aktivität sowie Elektronentransfereffizienz gegenüber *n*-Octan und LSMe mit Hilfe des photometrischen Assays und der GC-Analytik bestimmt. Im Gegensatz zur gesteigerten Aktivität gegenüber dem kurzkettigen Alkan *n*-Butan (Koch *et al.*, 2009) wurde in der vorliegenden Arbeit mit LSMe als Substrat für den Austausch L132V eine verbleibende Enzymaktivität von lediglich 16 % gegenüber wtAlkB ermittelt (**Tabelle 4**). Die ebenfalls für kurzkettige Alkane aktivitätssteigernd wirkende Mutation V129M führte zu einer Restaktivität von 62 % bei einer nahezu gleichbleibenden Kopplungseffizienz von 34 %.

Bei allen sechs Alaninmutanten wurde bei der Untersuchung der katalytischen Aktivität eine verminderte Oxidationsleistung gegenüber *n*-Octan festgestellt. Austausche der Aminosäuren T136, K144, I166, D175 sowie Q310 gegen Alanin resultierten in Aktivitäten von 25 bis 56 % (**Tabelle 4**). Die Mutation P319A führte sogar zum nahezu vollständigen Funktionsverlust. Bei der Mutante I166A wurde eine leichte Erhöhung der Kopplungseffizienz auf 77 % ermittelt; zudem zeigte dieser Austausch nahe des zweiten Histidin-Clusters die geringste Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität gegenüber *n*-Octan.

**Tabelle 4.** Aktivität und Kopplungseffizienz von AlkB-Punktmutanten gegenüber *n*-Octan und LSMe.

	LSMe				<i>n</i> -Octan						
	Wt <sup>[a]</sup>	V129M <sup>[a]</sup>	L132V <sup>[a]</sup>	T136A <sup>[a]</sup>	Wt <sup>[b]</sup>	T136A <sup>[b]</sup>	K144A <sup>[b]</sup>	I166A <sup>[b]</sup>	D175A <sup>[b]</sup>	Q310A <sup>[b]</sup>	P319A <sup>[b]</sup>
NADH-Verbrauch	138	91	4	87	206	105	47	64	92	167	31
Produkt [μM]	45	31	6	25	125	55	31	49	24	86	5
Kopplungseffizienz [%]	33	34	-	28	61	53	66	77	26	51	16
Aktivität [%] <sup>[c]</sup>	100	62	16	51	100	48	41	56	25	51	3

[a] Substrat: 0,4 mM LSMe.

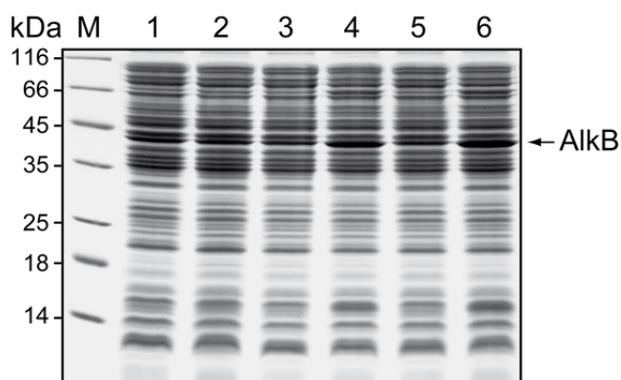
[b] Substrat: 0,4 mM *n*-Octan.

[c] Die für das jeweilige Enzym bestimmte Produktbildung wurde auf die durch Densitometrie quantifizierte eingesetzte AlkB-Menge normiert und mit der Aktivität von wtAlkB in Bezug gesetzt.

Durch gezielte Substitutionen nahe des aktiven Zentrums wurden weder gegenüber LSMe noch hinsichtlich *n*-Octan aktivere oder selektivere AlkB-Varianten generiert. Auch führte keine der eingeführten Ala-Mutationen zu einer verbesserten Elektronentransfereffizienz. In Ermangelung eines ausreichend präzisen 3D-Modells, wurde für die weitere Vorgehensweise die Strategie des kombinatorischen *Protein-Engineerings* verfolgt, indem AlkB-Varianten mit zufällig ausgetauschten Aminosäuren mit einem parallelisierten Nachweissystem durchmustert wurden. Hierzu wurde in dieser Arbeit mit der am Lehrstuhl für Biologische Chemie vorhandenen Laborrobotik (s. Abschnitt 2.6.2) eine Methodik etabliert, welche die miniaturisierte, parallele Produktion von AlkB-Mutanten in Verbindung mit einem Enzymassay in Mikrotiterplatten sowie anschließender produktspezifischer Analytik durch GC gestattet.

### 3.1.6 Produktion und Screening von AlkB-Mutanten im Mikrotiterplattenmaßstab

Die miniaturisierte Produktion von AlkB-Varianten für den parallelisierten Nachweis einer erhöhten bzw. selektiveren Hydroxylierung von LSMe erfolgte in 1 ml TB/Amp Medium in Deep Well Blocks unter Verwendung des Expressionsvektors pASK75-AlkB (vgl. Abbildung 5). Im Gegensatz zur gentechnischen Herstellung von AlkB im Schüttelkolbenmaßstab (s. Abschnitt 3.1.2) führte die Induktion der Genexpression mit 50 µg/l aTc zu keiner durch SDS-PAGE nachweisbaren Produktion von AlkB. Eine Verdopplung der Induktorkonzentration führte schließlich zu einer verstärkten Biosynthese von AlkB, welche durch weitere Erhöhung der Induktormenge auf 150 µg/l aTc nochmals gesteigert werden konnte (Abbildung 11).



**Abbildung 11.** Übersicht über die Herstellung von AlkB in Deep Well Blocks durch reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spuren 1,3,5: Gesamtzellextrakt von mit pASK75-AlkB transformierten *E. coli* W3110-Zellen vor Induktion der Fremdgenexpression. Spuren 2,4,6: Gesamtzellextrakt der mit (2) 50, (4) 100 und (6) 150 µg/l aTc induzierten Genexpression bei 22 °C nach 5 h.

Nach Ernte der Zellen wurde deren Zellmembran durch die Bildung von Eiskristallen während der Verwahrung bei -20 °C sowie mit Hilfe von Lysozym (1 mg/ml bei der Resuspendierung des Zellpellets bei RT) labilisiert und der austretende Zellextrakt von den unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation für 25 min bei 5000 rpm getrennt. Die Untersuchung der löslichen Fraktion wie auch der sedimentierten Aggregate hinsichtlich der enzymatischen Aktivität gegenüber LSMe unter Zugabe von gereinigtem AlkG und AlkT ergab, dass – im Gegensatz zu aus dem Schüttelkolben stammenden Zellpräparationen – ausschließlich in der sedimentierten Zellfraktion eine Hydroxylierungsaktivität vorliegt (nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf die im Vergleich zur Zellyse mittels *French Press* geringeren Scherkräfte zurückzuführen, so dass die bakterielle Zellmembran bei der im Mikrotiterplattenmaßstab verwendeten chemischen Lyse nur eingeschränkt dispergiert und bei der Zentrifugation in Form partikulärer Aggregate sedimentiert wird.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der AlkB-Mutanten erfolgte hier deshalb mit dem resuspendierten Sediment nach Zusatz von gereinigtem AlkGT. Durch den Verwurf der löslichen Zellbestandteile nach der Zentrifugation fand so auch hier, ähnlich wie bei der Behandlung der 2 l-Kulturen, eine Abreicherung der cytoplasmatischen Proteine vor dem Aktivitätsnachweis statt. Bei den Mikrotiterplattentests mit wtAlkB wurden nach 60 min Reaktionszeit durch GC ca. 20 µM HLSMe sowie 10 µM DDSMe als Reaktionsprodukte nachgewiesen. Das Intermediat OLSMe wurde bei diesen miniaturisierten Experimenten, vermutlich auch wegen der Verdünnung der Lösung mit dem Derivatisierungsreagenz MSTFA, nicht detektiert. Die statistische Variation der Enzymaktivität, welche anhand von 14 unabhängig voneinander produzierten und analysierten wtAlkB-Klonen ermittelt wurde, betrug bei dieser Vorgehensweise 10 %.

Durch die Parallelisierung des Aktivitätsnachweises konnte weder die spezifische Aktivität noch die Kopplungseffizienz einer Enzymvariante bestimmt werden, sondern es war lediglich eine vergleichende Aussage hinsichtlich der Enzymaktivität sowie des Produktmusters möglich. Potentiell unterschiedliche Expressionsniveaus der verschiedenen AlkB-Varianten wurden dabei nicht berücksichtigt. Anhand dieser Vorgehensweise können bis zu 96 Enzymvarianten innerhalb von 27 Stunden untersucht werden.

### **3.1.7 Randomisierung von AlkB mittels *Error-Prone* PCR und ortsgerichteter Sättigungsmutagenese**

Basierend auf den Erkenntnissen modellgestützter Aminosäureaustausche (s. Abschnitt 3.1.5) sowie vorangegangenen Mutationsstudien zur enzymatischen Aktivität sowie Substratdiskriminierung (Koch *et al.*, 2009; Shanklin & Whittle, 2003) wurde die vierte TMH von AlkB einschließlich des benachbarten ersten Histidin-Clusters (AS 119 bis 151) als aussichtsreicher Bereich für eine Zufallsmutagenese ausgewählt und der dafür codierende

Genabschnitt durch *Error-Prone* PCR (epPCR) selektiv randomisiert (s. Abschnitt 2.3.7). Die dahin generierte Genbibliothek umfasste  $2,4 \times 10^6$  Varianten, welche in dem randomisierten Genabschnitt von 97 bp ein bis zwei Aminosäuresubstitutionen enthielten. Insgesamt wurden davon 176 Klone durch den Roboter gepickt, in *E. coli* W3110 produziert und hinsichtlich der Oxidation von LSMe innerhalb von 60 min im Miniaturmaßstab untersucht. Um Rückschlüsse auf die den jeweiligen Aktivitäten zugrundeliegenden Aminosäuresubstitutionen zu ziehen, wurde für interessante Klone aus der zurückgestellten Masterplatte jeweils eine 3 ml-Kultur angeimpft, daraus das Expressionsplasmid isoliert und die entsprechende Mutation durch Sequenzanalyse des relevanten Vektorabschnitts mit dem Primer D20 identifiziert.

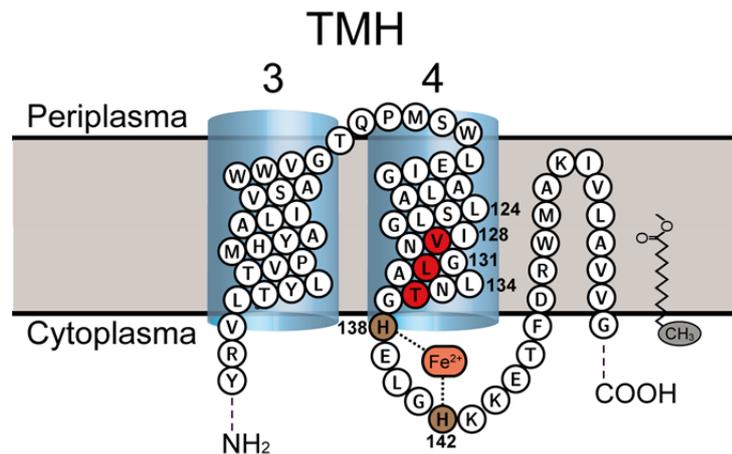
Von den durch lokale Randomisierung generierten Mutanten wies bei der Untersuchung der Reaktionsprodukte durch GC keine ein im Vergleich mit wtAlkB für HLSMe deutlich selektiveres Produktmuster bei mindestens gleich hoher Aktivität auf. Die Sequenzanalyse von zehn der Mutanten bestätigte, dass His138 – wie in vorhergehenden Arbeiten beschrieben (Shanklin & Whittle, 2003) – für die enzymatische Aktivität von AlkB von essentieller Bedeutung ist, da zwei katalytisch inaktive Klone Austausch von His138 gegen Cystein bzw. Tyrosin aufwiesen (**Tabelle 5**). Ebenso führte die Mutation von Ala133 zu Threonin zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust von AlkB gegenüber LSMe. Dagegen wurde bei den Austauschen W150R sowie T136S eine nahezu wildtyp-analoge Aktivität bestimmt, während die Mutationen E139D sowie G127S eine im Vergleich zu wtAlkB um nahezu die Hälfte verringerte Aktivität bewirkten. Bei zwei Mutanten mit wildtyp-ähnlicher Aktivität wurde kein Aminosäureaustausch im randomisierten Abschnitt festgestellt. Insgesamt führten die eingeführten Mutationen bei 64 der 176 untersuchten AlkB-Varianten zum kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität.

**Tabelle 5.** Aminosäureaustausche bei der partiellen Randomisierung von AlkB im Sequenzbereich von AS 119 bis 151 durch *Error-Prone* PCR

Position	Austausch	Aktivität [%]	HLSMe/DDSM
wt	-	100	2,0
127	G→S	44	4,7
133	A→T	5	-
136	T→I	64	0,9
136	T→S	106	0,9
138	H→C	4	-
138	H→Y	0	-
139	E→D	64	2,9
150	W→R	111	3,1

Da die bei einer epPCR möglichen Nukleotidaustausche die theoretische Komplexität an möglichen Aminosäuresubstitutionen aufgrund der Redundanz des genetischen Codes nur zu

einem kleinen Teil abdecken (Wong *et al.*, 2007), wurden für die Generierung weiterer AlkB-Mutanten drei an der Substratdiskriminierung beteiligte Aminosäurepositionen durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenese randomisiert. Die in früheren Mutationsstudien identifizierten Positionen V129, L132 sowie T136, welche an der Substraterkennung und -positionierung beteiligt zu sein scheinen, wurden hierzu mit partiell degenerierten Oligodesoxynukleotiden (NNS-Codons) durch ein zweistufiges PCR-Verfahren (*Crossover* PCR, s. Abschnitt 2.3.5) mutiert und so drei Bibliotheken mit je einer randomisierten Position erzeugt (Abbildung 12). Von jeder Genbank wurden 88 zufällig ausgewählte Klone neben drei Positiv- (*wtAlkB-Strep*) und drei Negativkontrollen (*wtAlkJ-Strep*) in Mikrotiterplatten kultiviert und die Aktivität der produzierten AlkB-Varianten gegenüber LSMe wie zuvor bestimmt. Die gewählte Anzahl an Klonen gewährleistete dabei die statistische Erfassung des Großteils der 19 theoretisch möglichen Austausche (Nov, 2012).

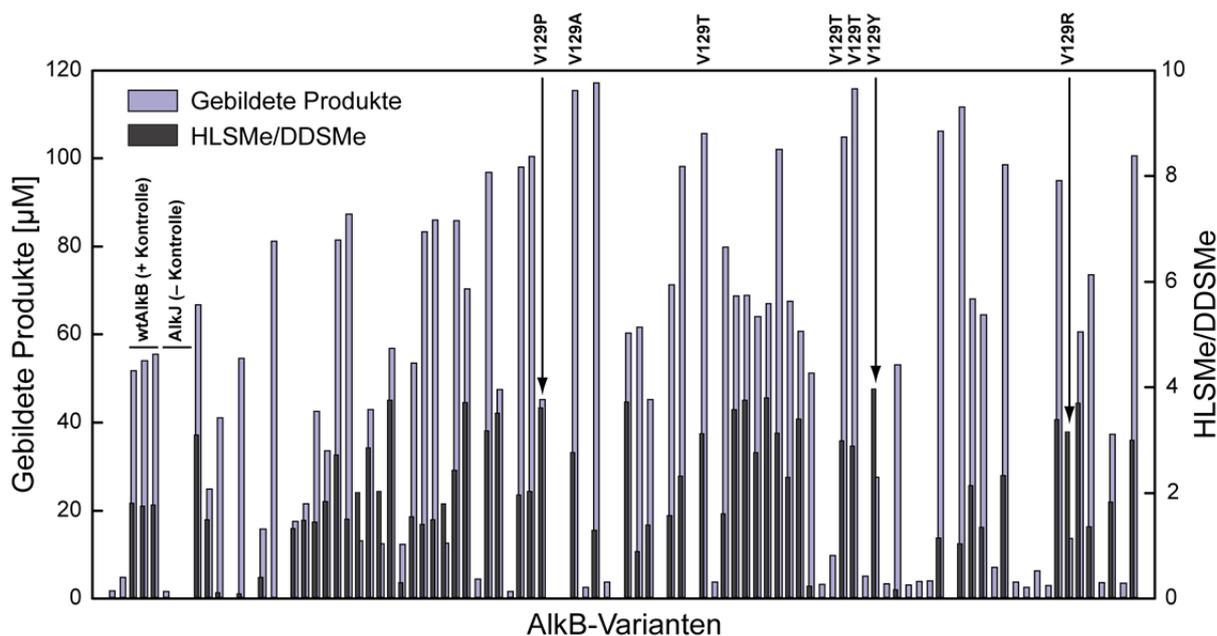


**Abbildung 12.** Lage der zur Sättigungsmutagenese ausgewählten Positionen im AlkB-Topologiemodell. Der Verlauf des relevanten Polypeptidkettenschnitts innerhalb der inneren bakteriellen Zellmembran ist im Einbuchstabencode skizziert, wobei die Transmembranhelices drei und vier mit blauen Zylindern gekennzeichnet sind. Die randomisierten Positionen V129, L132 sowie T136 sind rot hervorgehoben, die für die katalytische Aktivität essentiellen Histidinreste (His138 und His142) sind braun hinterlegt. Das industriell relevante Alkanderivat Laurinsäure-Methylester ist in seiner vermuteten Positionierung innerhalb der Lipiddoppelschicht dargestellt und dessen Methylgruppe markiert.

Von den 88 untersuchten Klonen der Bibliothek V129X zeigten 26 Varianten keine messbare Hydroxylierungsaktivität gegenüber LSMe. Die Substitutionen V129R sowie V129Y führten zu 32 % bzw. 61 % Aktivität, wohingegen der Austausch von Val129 gegen Prolin eine annähernd unveränderte Aktivität und Selektivität bewirkte. Bei Analyse eines Klons, welcher nach 60 min Reaktionszeit erhöhte Aktivität und verbesserte Selektivität aufwies, wurde die Mutation V129A festgestellt, welche zu insgesamt 116  $\mu\text{M}$  Produkt führte (Abbildung 13). Am häufigsten wurde bei den im Vergleich zu *wtAlkB* (ca. 50  $\mu\text{M}$  Produkt) aktiveren Varianten der Austausch von Val129 gegen Thr ermittelt. Dieser Austausch wurde in drei im Vergleich zu *wtAlkB* aktiveren Klonen gefunden, mit einer Gesamtproduktbildung von

jeweils ca. 105  $\mu\text{M}$ . Die Varianten V129A sowie V129T wurden aufgrund ihrer erhöhten Produktivität sowie des im Vergleich zu wtAlkB verbesserten HLSMe/DDSMe-Verhältnisses für eine eingehendere Untersuchung im präparativen Maßstab ausgewählt.

Bei der Aktivitätsanalyse der Bibliothek L132X wurde bei mehr als der Hälfte der untersuchten AlkB-Varianten keine Umsetzung des Alkansubstrats LSMe beobachtet (nicht gezeigt). Beim aktivsten Klon der Bibliothek, bei welchem 53  $\mu\text{M}$  Produkt gebildet wurde und der damit eine wtAlkB-ähnliche Aktivität aufwies, wurde ein Austausch von Leucin gegen Phenylalanin festgestellt. Da innerhalb dieser Bibliothek keine Variante mit verbesserten Eigenschaften erhalten wurde, wurde keine weitere Charakterisierung durchgeführt.



**Abbildung 13.** Ergebnis des Screenings von 88 Klonen der Bibliothek V129X. Die von den AlkB-Mutanten gebildeten Oxidationsprodukte von LSMe wurden nach einer Reaktionszeit von 60 min extrahiert und durch Gaschromatographie quantifiziert.

Die Randomisierung der nahe am essentiellen His138 gelegenen Position T136 führte zu lediglich 22 aktiven von insgesamt 88 untersuchten Klonen, wobei die Austausche L136M sowie L136R in einem kompletten Funktionsverlust des Enzyms resultierten, wohingegen die bereits bei der rationalen Mutagenese generierte Variante T136A im Screening Assay nach 60 min zu einer im Vergleich zu wtAlkB leicht erhöhten Aktivität führte (83  $\mu\text{M}$ ). Als weitere interessante Substitution wurde an Position 136 der Austausch gegen Leucin festgestellt, welcher bei drei Klonen mit wt-analoger Aktivität gefunden wurde. Da bei der Bibliothek T136X außer T136A keine im Vergleich zum Ausgangskonstrukt aktivitätssteigernden Mutationen festgestellt wurden, wurde kein Vertreter dieser Bibliothek weiter untersucht.

Für die genauere Charakterisierung der ausgewählten Varianten wurden wtAlkB sowie dessen Mutanten V129A und V129T im 2 l-Schüttelkolbenmaßstab in *E. coli* W3110 produziert und nach Lyse der Zellen wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben angereichert. Nach Präparation der AlkB-haltigen Zellmembran durch Ultrazentrifugation wurden die Mutanten mit Hilfe des photometrischen Assays sowie von GC hinsichtlich ihres NADH-Verbrauchs und der damit einhergehenden Produktbildung charakterisiert (s. Abschnitt 3.1.4).

Das Reduktionsmittel NADH (0,2 mM) war bei allen AlkB-Varianten nach ca. 5 min Reaktionszeit verbraucht. Beim anschließenden GC-Nachweis der gebildeten Produkte wurden das primäre Oxidationsprodukt HLSMe sowie die nachfolgende Oxidationsstufe OLSMe detektiert. Die Mutation V129A zeigte wildtyp-analoge Aktivität, (**Tabelle 6**) wohingegen bei der Substitution von V129 gegen Thr insgesamt 71,5  $\mu$ M HLSMe-Äquivalent gebildet wurden (OLSMe  $\cong 2 \times$  HLSMe), bei einer im Vergleich zu wtAlkB um etwa ein Drittel erhöhten Kopplungseffizienz. Während bei wtAlkB sowie der Variante V129A nach 5 min Reaktionszeit weniger HLSMe als OLSMe in der Reaktionsmischung vorlag, überwog dieses bei der Threoninmutante um über 50 % den OLSMe-Anteil.

**Tabelle 6.** Vergleich von AlkB-Varianten hinsichtlich der Oxidation von LSMe

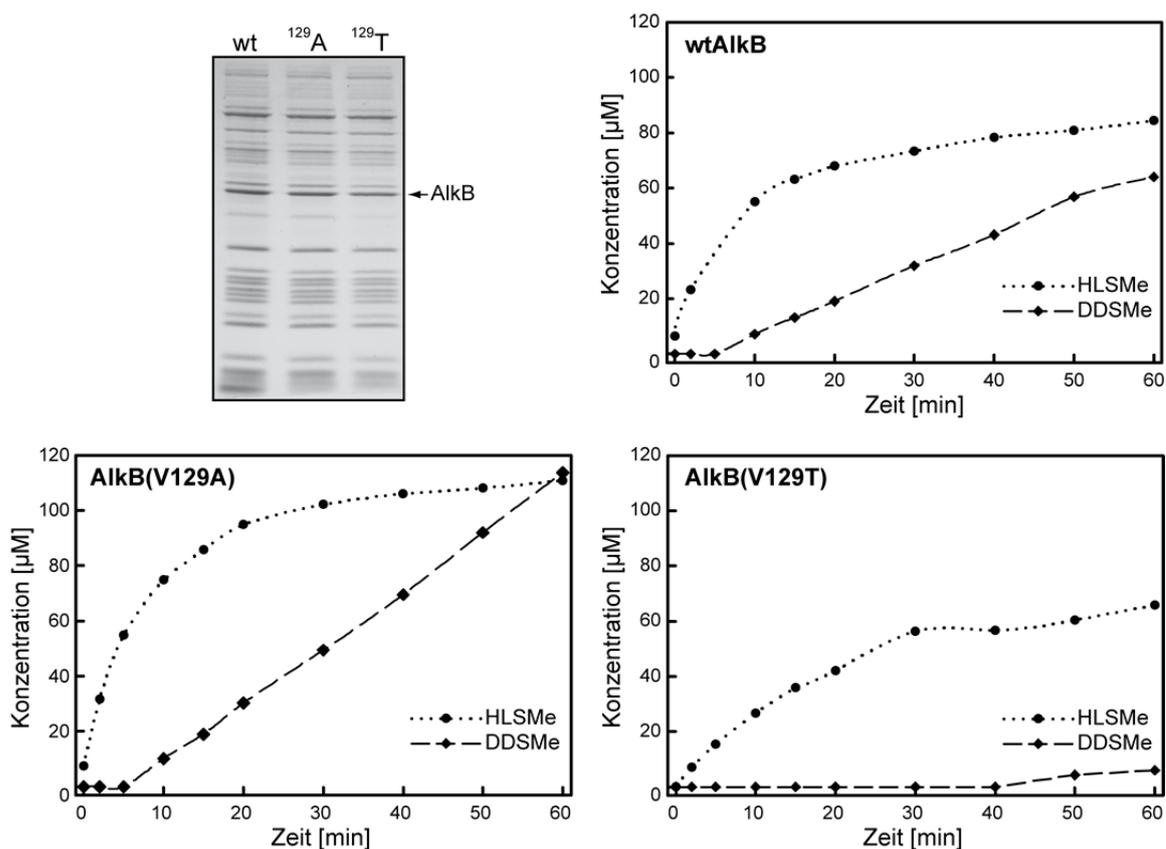
	wtAlkB	AlkB(V129A)	AlkB(V129T)
HLSMe [ $\mu$ M]	18,2	17,2	31,5
OLSMe [ $\mu$ M]	21,3	22,1	20,0
HLSMe/OLSMe	0,85	0,78	1,57
Elektronentransfereffizienz [%]	36	34	45

Um die Tendenz von wtAlkB und seiner Varianten V129A und V129T hinsichtlich der Überoxidation von HLSMe weiter zu vergleichen, wurde die Oxidation von 0,5 mM LSMe mit einem zehnfachen Überschuss an NADH über einen Zeitraum von 60 min mittels GC untersucht (Abbildung 14). Um bei allen Ansätzen die gleich Menge an AlkB-Enzym zu gewährleisten, wurde dessen Anteil in der Membranproteinfraktion durch Densitometrie eines mit Coomassie-Brilliantblau gefärbten Polyacrylamidgels bestimmt. Dabei wurde eine vergleichbare Expressionseffizienz der Mutanten festgestellt, weshalb die Membranfraktion nach Abgleich der Proteinkonzentration in gleicher Menge eingesetzt wurde (Abbildung 14).

Abweichend vom Ergebnis des Screeningexperiments sowie der Untersuchung der Elektronentransfereffizienz zeigte die Mutante V129A bei der Langzeitmessung über 60 min eine erhöhte Aktivität für sowohl den primären Oxidationsschritt von LSMe zu HLSMe als auch die nachfolgende Überoxidation zu DDSMe. Sowohl bei wtAlkB als auch bei V129A wurde nach etwa zehn Minuten ab einer HLSMe-Konzentration von etwa 60  $\mu$ M eine deutliche

Verringerung der Hydroxylierungsgeschwindigkeit von LSMe beobachtet. Jedoch wurde im Laufe des Assays keine durch Weiteroxidation bedingte Abnahme von HLSMe erfasst. Die Geschwindigkeit der Überoxidation zu DDSMe innerhalb des beobachteten Zeitrahmens blieb jeweils konstant, was auf eine Limitierung der initialen Hydroxylierungsreaktion durch z.B. die schlechte Löslichkeit des Substrats LSMe hindeutet. In den Langzeitmessungen der Oxidation von LSMe über 60 min wurde in keinem Fall OLSMe nachgewiesen, was wahrscheinlich der Verdünnung der Proben aufgrund der Derivatisierung mit MSTFA geschuldet ist.

Bei der Mutante V129T wurde dagegen eine geringere Hydroxylierungsrate beobachtet, welche nach 60 min Reaktionszeit zu einem HLSMe-Titer von ca. 60  $\mu\text{M}$  führte. Im Gegensatz zu wtAlkB sowie AlkB(V129A) setzte die Bildung der Disäure trotz der bis dahin akkumulierten Menge an HLSMe erst nach 40 min und mit deutlich verringerter Geschwindigkeit ein. Mit zunehmender Reaktionszeit nahm allerdings auch bei AlkB(V129T) die Oxidationsgeschwindigkeit des primären Hydroxylierungsschritts ab.



**Abbildung 14.** Zeitverlauf der Oxidation von Laurinsäure-Methylester durch AlkB. AlkB und dessen Varianten wurden in *E. coli* W3110 produziert und durch Isolierung der Zellmembranfraktion mit Hilfe von Ultrazentrifugation angereichert. Um vergleichbare Mengen an AlkB im Ansatz zu gewährleisten, wurde der Anteil von AlkB innerhalb der bakteriellen Membranfraktion mittels Densitometrie eines mit Coomassie-Brilliantblau gefärbten Polyacrylamidgels abgeglichen. Die Oxidation von 0,5 mM LSMe zu  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) sowie zu Dodekandisäure-Monomethylester (DDSMe) wurde für wtAlkB sowie dessen Punktmutanten V129A und V129T in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  gereinigtem AlkT sowie 10  $\mu\text{M}$  gereinigtem AlkG mit 5 mM NADH in 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) für 60 min bei 25 °C verfolgt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Substrate und Produkte mit Ethylacetat extrahiert und durch GC quantifiziert.

Aufgrund der ohne erheblichen apparativen Aufwand nur schwierig standardisierbaren Messung der AlkBGT-vermittelten Oxidation über längere Zeitspannen (s. Abschnitt 4.2) konnten die erhaltenen Produktbildungsraten nicht in einer für eine exakte Quantifizierung ausreichenden Genauigkeit reproduziert werden. Jedoch wurde der Trend einer durch den Austausch von Valin 129 gegen Threonin bedingten erhöhten HLSMe-Bildung durch Langzeitmessungen in weiterführenden Arbeiten bestätigt (Martin, 2015). Dort führte der Austausch V129T in einem artifiziellen Fusionskonstrukt bestehend aus *P. putida* AlkB und AlkG, bei welchem – wie auch bei verwandten AlkB-Monooxygenasen natürlich vorkommend (Nie *et al.*, 2011) – die eisenbindende carboxyterminale Domäne des Rubredoxins genetisch mit dem C-Terminus der Monooxygenase fusioniert worden war, zu einer im Vergleich zu wtAlkB sechsfach gesteigerten HLSMe-Bildung. Zudem wurde bei der Mutante V129T auch in Langzeitmessungen die Bildung von nachweisbaren Mengen des Aldehyd-Intermediats OLSMe beobachtet.

Aufgrund der verbesserten Bildung von HLSMe in Verbindung mit der erhöhten Kopplungseffizienz scheint die AlkB-Variante V129T für einen Einsatz zur biokatalytischen Herstellung von ALSMe prädestiniert, auch wenn die Abschätzung zur Eignung bei der Ganzzellbiokatalyse im industriellen Maßstab noch aussteht.

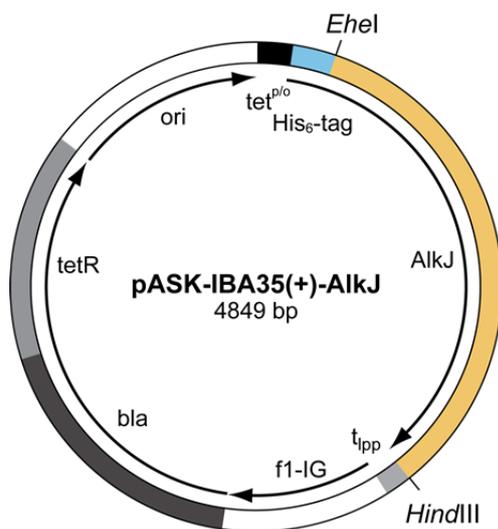
## 3.2 Reinigung und Charakterisierung von AlkJ

Die auf dem *alk*-Operon von *P. putida* GPo1 stromabwärts von *alkB* codierte Alkohol-Dehydrogenase AlkJ wurde zuvor lediglich in angereicherten bakteriellen Zellextrakten untersucht, so dass über dieses Enzym im Vergleich zu den anderen Alk-Proteinen bislang nur wenig bekannt war. Dass keine Reinigung von AlkJ publiziert war, ist vermutlich unter anderem der Labilität des membranassoziierten Enzyms geschuldet, welches in früheren Studien eine *in vitro*-Stabilität von bloß 30 min aufwies (van Beilen *et al.*, 1992a). Im Zuge der Nutzbarmachung des Alk-Systems für die biotechnologische Synthese von ALSMe sollte in der vorliegenden Arbeit das Potential von AlkJ für die Generierung von OLSMe untersucht werden. Um eine im Hinblick auf das technische Anwendungspotential aussagekräftige Einschätzung vornehmen zu können, sollte AlkJ in *E. coli* produziert und als gereinigtes Enzym hinsichtlich seiner proteinchemischen Eigenschaften sowie katalytischen Aktivität untersucht werden.

### 3.2.1 Klonierung, Produktion und Reinigungsstrategie

Das Gen für die codonoptimierte Sequenz von AlkJ (UniProt ID: Q00593) wurde vom Kooperationspartner Evonik Industries auf dem Plasmid pACYCDuet-1 kloniert zur Verfügung gestellt. Für die Expression in *E. coli* mit anschließender Affinitätsreinigung

wurden durch PCR mit Hilfe flankierender Primer Schnittstellen für *EheI* (5') sowie *HindIII* (3') angefügt. Über diese Schnittstellen wurde das *alkJ*-Strukturgen auf den bakteriellen Expressionsvektoren pASK-IBA5(+) sowie pASK-IBA35(+) kloniert, welche dessen Expression fusioniert mit einem N-terminalen *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) oder His<sub>6</sub>-tag (Skerra *et al.*, 1991) gestattete (Abbildung 15). Die Induktion der Genexpression erfolgt dabei mit Hilfe des Tetracyclin-Promotor/Operators (Skerra, 1994). Für die Proteinproduktion wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (Studier & Moffatt, 1986) verwendet, welcher nach Induktion der Genexpression für 15 h bei 22 °C inkubiert wurde. Nach dem Zellaufschluss in der *French Press* waren etwa 50 % des rekombinanten Enzyms in der löslichen Fraktion durch SDS-PAGE nachweisbar (nicht gezeigt).



**Abbildung 15.** Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsplasmids pASK-IBA35(+)-AlkJ. Das Gen für AlkJ, welches am 5'-Ende mit einer für das *Strep*-tag II (IBA5[+]) oder His<sub>6</sub>-Tag (IBA35[+]) codierenden Sequenz fusioniert ist, steht unter der Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotor/Operators (*tet*<sup>P/O</sup>) und wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*t*<sub>ipp</sub>) abgeschlossen. Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressors (*tetR*) sichergestellt. Weitere Elemente sind der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (*ori*), der funktionelle Replikationsursprung der intergenen Region des filamentösen Phagen f1 (*f1-IG*) und das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Gen der  $\beta$ -Lactamase (*bla*).

Die chemische Funktionalisierung von Kohlenwasserstoffen durch das Alk-System findet in *P. putida* GPo1 an der inneren bakteriellen Zellmembran statt (van Beilen *et al.*, 1994), was durch die bessere Löslichkeit der hydrophoben Alkansubstrate in der Lipiddoppelschicht erklärbar ist. Dementsprechend erfolgt die initiale Hydroxylierung des Substrats durch ein Membranenzym, AlkB. Analog wurde auch für die Dehydrogenase AlkJ eine Assoziation an die cytoplasmatische Zellmembran beschrieben (Benson & Shapiro, 1976); jedoch wurden in einer bioinformatischen Analyse der Primärstruktur mit Hilfe des TMHMM-Algorithmus (Krogh *et al.*, 2001) keine für eine Verankerung in der Membran typischen Sequenzmotive identifiziert. Folglich wurde eine lediglich schwache Affinität zur Zellmembran angenommen.

Verschiedene Versuche AlkJ aus dem nach der Zellyse erhaltenen löslichen Gesamtzellextrakt von *E. coli* durch SAC oder IMAC zu isolieren, führten nicht zum Erfolg, da AlkJ stets zusammen mit den nicht an die Affinitätsmatrix bindenden Wirtsproteinen im Durchfluss nachgewiesen wurde. Anhand einer Präparation der bakteriellen Zellmembran durch Ultrazentrifugation wurde gezeigt, dass AlkJ trotz der bei der Zellyse angewandten

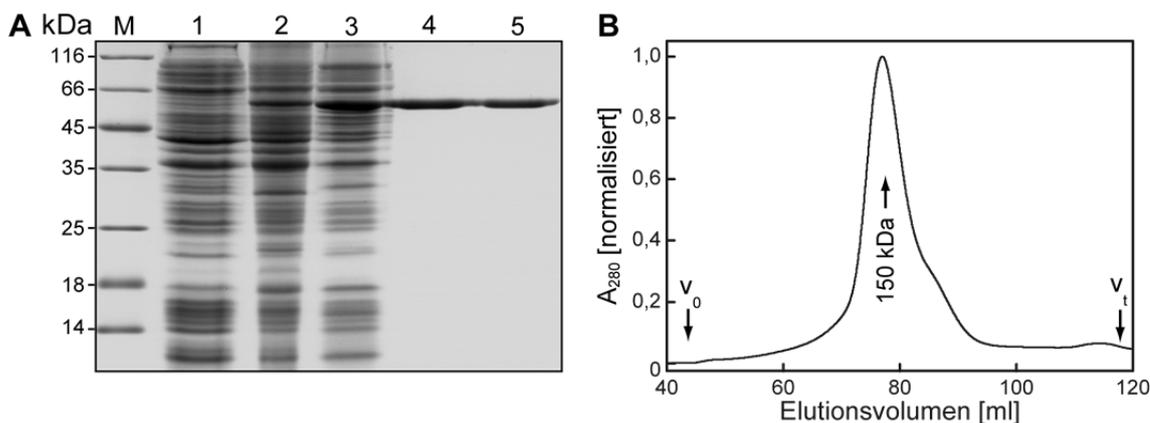
hohen mechanischen Kräften weiterhin an der Zellmembran lokalisiert war. Deshalb wurde versucht, AlkJ durch Solubilisierung mit Detergenzien aus der zuvor isolierten Zellmembran zu lösen. Hierzu wurden die milden nicht-ionischen Detergenzien *n*-Oktyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (OG) sowie *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM) eingesetzt. Die Solubilisierung des rekombinanten AlkJ mit OG wie auch DDM führte bei der darauffolgenden Affinitätschromatographie an *Strep*-Tactin Sepharose (*Strep*-AlkJ) bzw. Ni-Sepharose (His<sub>6</sub>-AlkJ) jeweils zu einer spezifischen Bindung. Eine Untersuchung mit Hilfe von SDS-PAGE sowie enzymatischen Aktivitätsassays mit 1-Octanol als Substrat und PMS und DCPIP als Elektronenakzeptoren (s. Abschnitt 3.2.2) ergab, dass eine Solubilisierung für eine Stunde mit 0,5 % (w/v) DDM bei 4 °C den besten Kompromiss zwischen effektiver Solubilisierung einerseits und enzymatischer Aktivität andererseits darstellt. Mit dieser Vorgehensweise konnten bis zu ca. 75 % natives AlkJ aus der bakteriellen Membranfraktion gewonnen werden. Da die Expression von AlkJ mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag in höheren Enzymausbeuten resultierte (ca. 6 mg je l Kultur), wurde dieses Konstrukt für weitere Experimente verwendet.

Durch Voranreicherung von AlkJ mittels Ultrazentrifugation sowie vorsichtiges Wegwaschen unspezifisch bindender Wirtsproteine mit Hilfe eines flachen Imidazol-Konzentrationsgradienten wurde schon nach der IMAC eine elektrophoretisch homogene AlkJ-Präparation erhalten (Abbildung 16A, Spur 4). Die Konzentrierung des Eluats für die SEC durch Ultrafiltration (MWCO 30 kDa) führte jedoch zur Aggregation von AlkJ ab einer DDM-Konzentration von ca. 0,1 % (w/v). Dieses Phänomen ist vermutlich der im Laufe der Filtration steigenden Konzentration des verwendeten Detergenz DDM geschuldet, welches Mizellen von 50 bis 70 kDa bildet (le Maire *et al.*, 2000). Bei der für AlkJ (62,7 kDa) verwendeten Konzentratoreinheit wird DDM daher ebenfalls angereichert, was dessen Denaturierungspotential bekanntermaßen steigert (Urbani & Warne, 2005).

Die Konzentrierung von AlkJ für die SEC erfolgte deshalb durch miniaturisierte IMAC. Ni-High Performance Sepharose besitzt eine Bindekapazität von bis zu 40 mg Protein je ml Säulenmaterial (Angabe des Herstellers), so dass theoretisch bereits 1 ml ausreicht, um das zuvor aus 2 l Kultur gewonnene AlkJ (ca. 12 mg) erneut zu immobilisieren. Hierzu wurden die bei der ersten IMAC erhaltenen Eluatfraktionen vereinigt, gegen Laufpuffer dialysiert und anschließend auf 1 ml des mit SEC-Puffer äquilibrierten IMAC-Säulenmaterials aufgetragen. Bei dieser Vorgehensweise wurden nach Stufenelution in 2 ml Elutionspuffer ca. 80 % der zuvor applizierten Enzymmenge wiedererhalten (vgl. Abschnitt 2.5.2), welche direkt für die SEC an einer präparativen Superdex S200 Säule verwendet werden konnten.

Die Molmasse von solubiliertem AlkJ wurde durch SEC anhand einer zuvor erstellten Kalibriergerade (vgl. Abschnitt 2.1.3) zu 150 kDa bestimmt (vgl. Abbildung 16B), was einem AlkJ-Homodimer im Verbund mit etwa 43 DDM und zwei FADH<sub>2</sub>-Molekülen entspricht. Nach der Solubilisierung mit Detergenz und Tandem-IMAC wurden so pro Liter

*E. coli*-Kultur ca. 5 mg elektrophoretisch homogenes, monodisperses AlkJ gewonnen, von welchem nach präparativer SEC 3,5 mg wiedergewonnen werden konnten. Das Enzym wurde in Elutionspuffer oder SEC-Puffer bei 4 °C bis zu fünf Tage gelagert ohne an Aktivität einzubüßen.

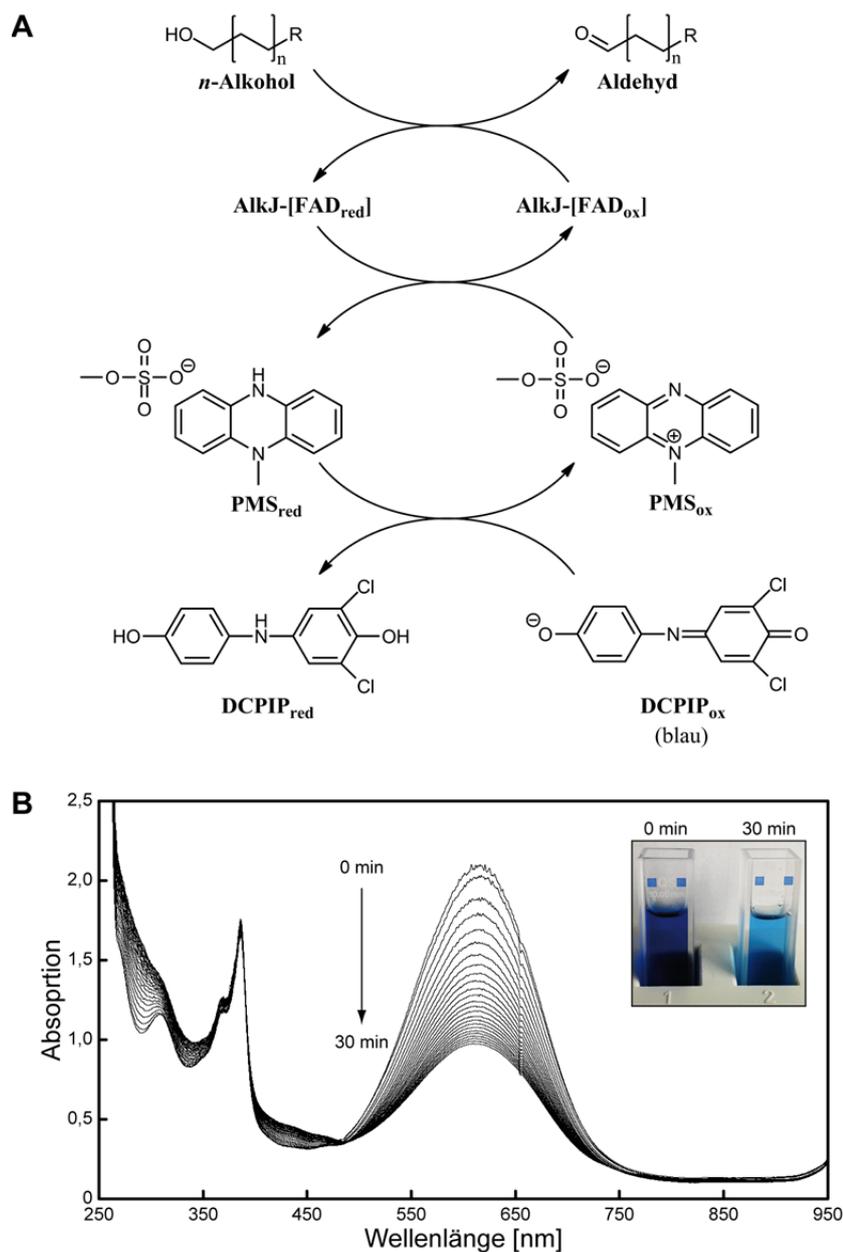


**Abbildung 16.** Expression und Reinigung von AlkJ. (A) Übersicht über Produktion und Reinigung von rekombinantem AlkJ durch reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spur 1: Gesamtzellextrakt von mit pASK-IBA35(+)-AlkJ transformiertem *E. coli* BL21 vor Induktion der Fremdgenexpression. Spur 2: Gesamtzellextrakt nach 15 h rekombinanter Genexpression bei 22 °C zum Erntezeitpunkt. Spur 3: Mit DDM solubilisierete membranständige Proteine nach der Abtrennung von Aggregaten. Spur 4: Vereinigte Elutionsfraktionen nach IMAC. Spur 5: Gereinigtes AlkJ nach präparativer SEC. (B) SEC-Profil von AlkJ nach der IMAC-Reinigung. AlkJ eluiert bei 78 ml, was einer Molekülmasse von 150 kDa entspricht. Dies steht im Einklang mit einem AlkJ-Homodimer mit ca. 43 assoziierten DDM sowie zwei gebundenen FADH<sub>2</sub> Molekülen. Das leichte Tailing des Peaks wird durch einen kleinen Anteil von monomerem AlkJ hervorgerufen. Die das Dimer enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und für enzymatische Analysen verwendet.

### 3.2.2 Etablierung eines Redoxfarbstoff-gekoppelten Aktivitätstests

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des gereinigten AlkJs wurde ein für FAD-abhängige Enzyme gängiger Aktivitätsnachweis (Adachi *et al.*, 2007) adaptiert. Dieser basiert auf der Verwendung der artifiziellen Elektronenakzeptoren Phenazinmethosulfat (PMS) sowie Dichlorphenolindophenol (DCPIP). Der üblicherweise hochaffin gebundene Cofaktor FAD wird dabei nach Aufnahme der Elektronen vom Alkoholsubstrat durch PMS regeneriert und steht somit für einen weiteren oxidierenden Reaktionszyklus zur Verfügung (Abbildung 17A). PMS gibt die Elektronen wiederum an DCPIP weiter, bei welchem es zu einer Änderung im Ringelektronensystem kommt, was wiederum dessen Absorptionseigenschaften verändert.

Um die Tauglichkeit dieses Aktivitätsnachweises für AlkJ zu überprüfen, wurde eine Mischung aus 1,25 mM HLSMe und 0,1 mM PMS, 0,1 mM DCPIP mit 10 µg IMAC-gereinigtem AlkJ versetzt und die Reaktion durch Absorptionsmessung an einem Photodiodenarray-Spektrophotometer für 30 Minuten im Wellenlängenbereich von 950 bis 250 nm alle 90 Sekunden verfolgt (Abbildung 17B).



**Abbildung 17.** Photometrischer Aktivitätsnachweis von AlkJ. (A) Reaktionsprinzip des photometrischen Aktivitätstests. Die am Enzym gebundene prosthetische Gruppe Flavin/Adenin-Dinukleotid (FAD) übernimmt bei der Oxidation des Alkoholsubstrats zum Aldehyd zwei Elektronen und wird dabei reduziert. Durch den intermediären Elektronenüberträger Phenazinmethosulfat (PMS) wird das weiterhin enzymgebundene FAD reoxidiert. PMS wiederum überträgt die Elektronen an den Redoxfarbstoff Dichlorphenolindophenol (DCPIP), welcher in der Reaktionsmischung den terminalen Elektronenakzeptor darstellt und PMS wieder in seine oxidierte Form überführt. Der Reaktionsnachweis erfolgt durch die photometrische Bestimmung des Redoxzustandes von DCPIP bei 600 nm. (B) Die UV/Vis-Spektrenschar ( $d = 1 \text{ cm}$ ) zeigt die zeitliche Änderung des aus den Beiträgen von 0,1 mM PMS sowie 0,1 mM DCPIP zusammengesetzten Absorptionsspektrums der Reaktionslösung aufgrund der Oxidation von 1,25 mM  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) durch 10  $\mu\text{g}$  AlkJ innerhalb von 30 min. Mit der enzymatischen Oxidation von HLSMe geht die Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors DCPIP einher. Die damit verbundene Änderung der Ringelektronenkonfiguration von DCPIP bewirkt eine Verringerung des spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 600 nm. Im Einsatz ist die mit bloßem Auge deutlich erkennbare Entfärbung der in der Küvette befindlichen Reaktionslösung innerhalb von 30 min zu sehen, welche durch die enzymatische Reaktion hervorgerufen wird.

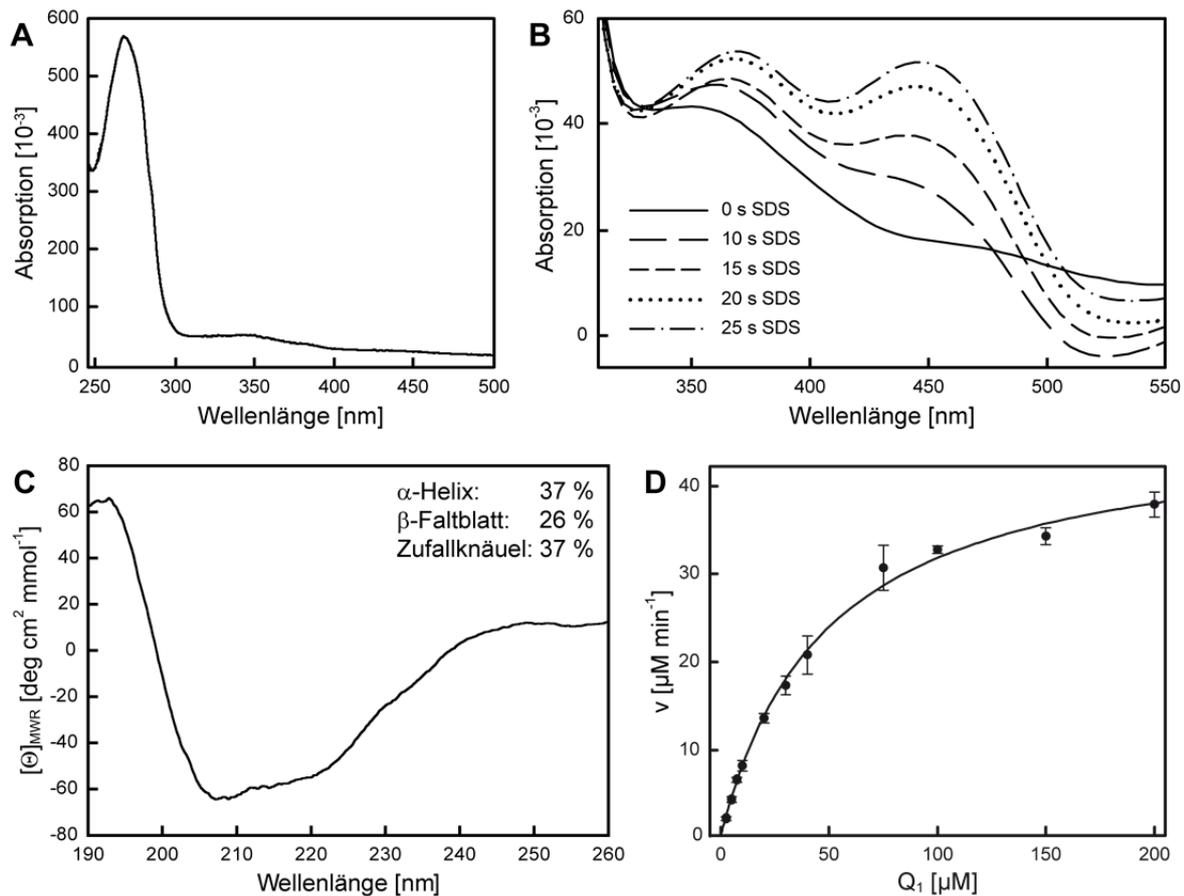
Dabei wurde eine deutliche Abnahme der Absorption bei 600 nm von 2,1 auf 0,9 beobachtet ( $\epsilon_{\text{ox } 600} = 21,00 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), was auf die Oxidation von HLSMe durch AlkJ zurückgeführt werden kann. In einem Kontrollexperiment ohne HLSMe ergab sich keine messbare Veränderung des Absorptionsspektrums innerhalb von 30 min.

Eine Verringerung bzw. Erhöhung der hinzugegebenen AlkJ-Menge führte hingegen zu einer verzögerten bzw. beschleunigten Ausprägung der in Abbildung 17 dargestellten spektralen Änderungen. Der Assay erschien folglich für die Bestimmung der AlkJ-Enzymaktivität geeignet und wurde in der vorliegenden Arbeit für die photometrische *in vitro*-Bestimmung der enzymatischen Aktivität gegenüber *n*-Alkanolen durch Messung der Absorptionsabnahme bei 600 nm verwendet.

### 3.2.3 Identifizierung von FAD und Ubichinon als Cofaktoren von AlkJ

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die von AlkJ katalysierte Oxidationsreaktion unabhängig von  $\text{NAD}^+$  erfolgt (Benson & Shapiro, 1976). Auf Basis dieses Befunds sowie vergleichender Primärstrukturanalysen wurde für AlkJ FAD als redoxaktive prosthetische Gruppe antizipiert (van Beilen *et al.*, 1992a). Ein experimenteller Nachweis für die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AlkJ an FAD wurde bisher jedoch nicht veröffentlicht. Bei der Untersuchung des durch SEC gereinigten rekombinanten AlkJs durch UV/Vis-Spektroskopie konnten im Gegensatz zu anderen Flavoenzymen (Aliverti *et al.*, 1999) allerdings keine prominenten Peaks bei 372 und 450 nm ausgemacht werden. Bloß eine kleine Schulter des durch die aromatischen Aminosäuren hervorgerufenen Maximums bei 280 nm, welche sich bis zu einer Wellenlänge von 355 nm erstreckte, deutete auf vollständig reduziert vorliegendes  $\text{FADH}_2$  in der AlkJ-Präparation hin (Ghisla *et al.*, 1974, Abbildung 18A). Um potentiell an AlkJ gebundenes  $\text{FADH}_2$  in seine spektroskopisch besser quantifizierbare oxidierte Form FAD zu überführen, wurde die Enzympräparation zur Denaturierung von AlkJ mit SDS versetzt und Luftsauerstoff ausgesetzt. Diese Vorgehensweise führte zur schnellen Ausprägung zweier Absorptionsmaxima bei 377 sowie 449 nm im UV/Vis-Spektrum innerhalb von 25 s. Dies zeigt, dass AlkJ FAD als redoxaktive prosthetische Gruppe bindet, welches somit den primären Elektronenakzeptor bei der durch AlkJ katalysierten Oxidation von Alkoholen darstellt (Abbildung 18B).

Weiterführende Untersuchungen zur Interaktion zwischen AlkJ und FAD ergaben, dass die Bindungswechselwirkung im Gegensatz zu anderen Flavoenzymen nicht durch kovalente Verknüpfung erfolgt. Hierzu wurde über den His<sub>6</sub>-tag an Ni-Sepharose gebundenes AlkJ ausgiebig mit einer Mischung aus Harnstoff und KBr gewaschen (Hefti *et al.*, 2003). Bei der daraufhin durch Elution mit 300 mM Imidazol gewonnenen AlkJ-Präparation konnten auch nach Denaturierung mit SDS keine Peaks bei 370 und 450 nm ausgemacht werden.



**Abbildung 18.** Spektroskopische Eigenschaften von AlkJ und Funktion des Ubichinon-Analogons  $Q_1$  als Cosubstrat für AlkJ. (A) UV/Vis-Absorptionsspektrum von  $10 \mu\text{M}$  durch IMAC gereinigtem AlkJ, welches keine für oxidiertes FAD charakteristischen Maxima zeigt, jedoch den durch die aromatischen Aminosäuren hervorgerufenen Peak bei  $280 \text{ nm}$ . An diesen Peak grenzt eine sich zu längeren Wellenlängen hin erstreckende Schulter, welche auf die Anwesenheit von  $\text{FADH}_2$  hindeutet. (B)  $10 \mu\text{M}$  durch IMAC gereinigtes AlkJ wurden mit  $0,2 \%$  (w/v) SDS denaturiert und die durch Luftsauerstoff hervorgerufene Reoxidation des freigesetzten Cofaktors  $\text{FADH}_2$  zu verschiedenen Zeitpunkten an einem Photodiodenarray-Spektrophotometer verfolgt, was zu zwei neuen Absorptionsmaxima um  $370$  und  $450 \text{ nm}$  führte. (C) Fern-UV-Circular-dichroismus-Spektrum von durch IMAC gereinigtem AlkJ-Holoenzym. Das CD-Spektrum wurde bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von  $0,1 \text{ mm}$  aufgenommen und auf die molare Elliptizität  $\Theta_{\text{MRW}}$  normiert. Die Proteinlösung lag in Messpuffer ( $50 \text{ mM K}_2\text{SO}_4$ ,  $20 \text{ mM KP}_i$  pH  $7,5$ ) vor. Die Anteile von  $\alpha$ -Helix sowie  $\beta$ -Faltblatt können aus der breiten Bande von  $220$  bis  $210 \text{ nm}$  abgeschätzt werden. Die Sekundärstrukturanteile wurden mit Hilfe des auf dem Dichroweb Server verfügbaren K2D Algorithmus berechnet (s. Abschnitt 2.8). (D) Die Ermittlung der katalytischen Aktivität von AlkJ mit  $Q_1$  als Cofaktor erfolgte als Dreifachbestimmung bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ mM NaP}_i$  (pH  $7,5$ ) mit  $0,2 \mu\text{M}$  rekombinantem AlkJ in Gegenwart von  $0,1 \text{ mM 1-Octanol}$ . Der Verlauf der Reaktion wurde über die Entfärbung des artifiziellen terminalen Elektronenakzeptors DCPIP bei  $600 \text{ nm}$  verfolgt. Die lineare Anfangsgeschwindigkeit bei verschiedenen  $Q_1$ -Konzentrationen wurde aufgetragen und die kinetischen Parameter mit Hilfe der Michaelis/Menten Gleichung ermittelt (s. Abschnitt 2.6.4), was einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $3,5 \text{ s}^{-1}$  sowie einen  $K_M$ -Wert von  $41 \mu\text{M}$  ergab.

Dies lässt auf eine vollständige Dissoziation von Enzym und prosthetischer Gruppe durch die verwendeten chaotropen Agenzien schließen. Um den während der Produktion in *E. coli* erreichten Beladungsgrad von AlkJ mit FAD zu untersuchen, wurde eine durch IMAC gereinigte Enzympräparation durch Zugabe von Harnstoff und KBr denaturiert, um enzymgebundenes  $\text{FADH}_2$  freizusetzen. Anschließend wurde AlkJ durch TCA präzipitiert und durch Zentrifugation vom gelbgefärbten Überstand (Cofaktorklösung) abgetrennt. Das

AlkJ-Pellet wurde in IMAC-Puffer gelöst und sowohl die Enzym- als auch die Cofaktorlösung separat für die photometrische Quantifizierung verwendet. Unter Zuhilfenahme der entsprechenden Absorptionskoeffizienten (vgl. Abschnitt 2.5.7) wurde das Verhältnis von FADH<sub>2</sub>/AlkJ zu 1,04 bestimmt.

Außerdem wurde der Anteil der unterschiedlichen Sekundärstrukturen innerhalb von AlkJ anhand durch IMAC gereinigtem Holoenzym mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht (Abbildung 18C). Die Analyse des Fern-UV Spektrums ergab als Faltungsbestandteile 37 %  $\alpha$ -Helix, 26 %  $\beta$ -Faltblatt und 37 % Zufallsknäuel. Diese Sekundärstrukturanteile decken sich mit dem am nächsten verwandten Enzym (31 % Aminosäureidentität) mit bekannter dreidimensionaler Struktur, der Cholin-Oxidase von *Arthrobacter globiformis* (PDB 2JBV, Quaye *et al.*, 2008), welche gemäß der mit Hilfe des Programms Stride (Frishman & Argos, 1995) interpretierten Kristallstruktur 25 %  $\alpha$ -Helix sowie 23 %  $\beta$ -Faltblatt aufweist.

Die Zugabe von bis zu 2 mM NAD<sup>+</sup> oder NAD(P)<sup>+</sup> führte bei Aktivitätsmessungen mit 0,1 mM 1-Octanol in Verbindung mit PMS und DCPIP zu keiner Veränderung der enzymatischen Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass AlkJ die aus der Oxidation des Alkoholsubstrats stammenden Elektronen nicht auf Nikotinamid-Cosubstrate übertragen kann. Allerdings wurde die durch AlkJ katalysierte Reaktion auch dann nicht beschleunigt, wenn FAD (bis zu 25  $\mu$ M) zum Reaktionsansatz hinzugegeben wurde, was die Annahme einer vollständiger Beladung des aus der Zellmembran von *E. coli* gereinigtem AlkJ mit dieser prosthetischen Gruppe bestätigt.

Vor dem Hintergrund der Membranassoziation von AlkJ wurde von van Beilen *et al.* (van Beilen *et al.*, 1992a) eine Kopplung von AlkJ mit der pseudomonalen Atmungskette über Ubichinon postuliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Q<sub>1</sub>, ein wasserlösliches Ubichinon-Analogon mit verkürzter Isoprenseitenkette, als Elektronenakzeptor in enzymatischen Aktivitätsanalysen eingesetzt. Durch Messung des Redoxzustandes des terminalen Elektronenakzeptors DCPIP bei 600 nm konnte gezeigt werden, dass der durch AlkJ katalysierte Transfer von Elektronen von 1-Octanol zu Q<sub>1</sub> in konzentrationsabhängiger Weise erfolgt (Abbildung 18D). Eine Analyse der für die verschiedenen Q<sub>1</sub>-Konzentrationen gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten ergab (s. Abschnitt 2.6.4), dass die Katalyse der Oxidationsreaktion mit Q<sub>1</sub> als Elektronenakzeptor einer typischen Michaelis/Menten-Kinetik folgt, mit einem  $k_{cat}$ -Wert von 3,5 s<sup>-1</sup> und einem bemerkenswert niedrigem K<sub>M</sub>-Wert von 41  $\mu$ M.

In Anbetracht dieses Experiments erscheint es plausibel, dass unter physiologischen Bedingungen in *P. putida* Ubichinon als Elektronenakzeptor von AlkJ fungiert und so die Oxidation des Alkoholsubstrats direkt an die bakterielle Atmungskette koppelt, wo die abgegebenen Elektronen für die Reduktion von O<sub>2</sub> genutzt werden. In einem weiteren Experiment konnte anhand des Redoxzustandes von equinem Cytochrom c (10  $\mu$ M) bei

550 nm gezeigt werden, dass die Zugabe von 5  $\mu\text{M}$   $\text{Q}_1$  als Elektronenshuttle den Elektronentransport von AlkJ auch auf Cytochrom c ermöglicht, wohingegen Cytochrom c alleine nicht durch AlkJ reduziert wurde (nicht gezeigt).

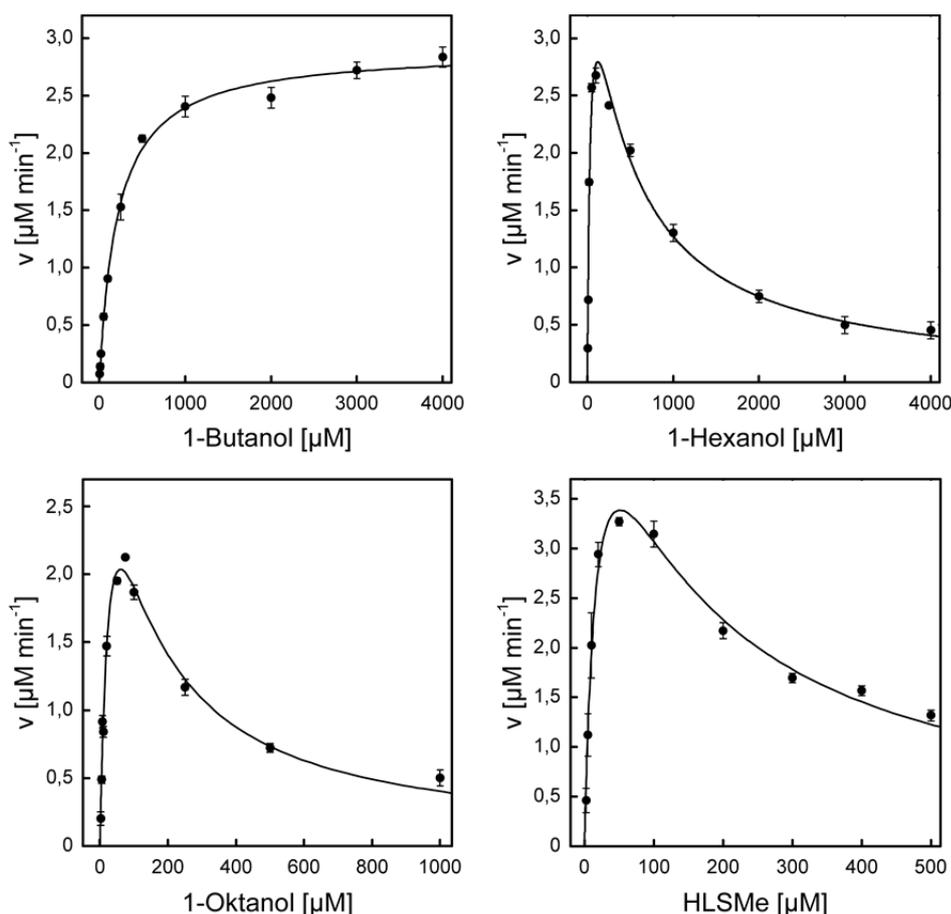
### 3.2.4 Untersuchung des Substratspektrums von AlkJ

Die Substratspezifität von AlkJ gegenüber linearen aliphatischen Alkoholen wurde gemäß einer für FAD-abhängige Enzyme gängigen Praxis (Adachi *et al.*, 2007) unter Verwendung von PMS und DCPIP als artifizielle Elektronenakzeptoren untersucht (s. Abschnitt 2.6.4). Als Substrate wurden 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol sowie das industriell relevante langkettige Fettsäuremethylesterderivat HLSMe in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. AlkJ zeigte eine klassische Michaelis/Menten-Kinetik für 1-Butanol (Johnson & Goody, 2011, Abbildung 19), wohingegen bei 1-Hexanol, 1-Octanol sowie HLSMe bei höheren Substratkonzentrationen eine verringerte Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wurde, was auf Substratinhibition hindeutete. Eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter ist in **Tabelle 7** gegeben.

**Tabelle 7.** Kinetische Parameter von AlkJ für vier verschiedene Alkoholsubstrate. Die katalytische Aktivität mit Phenazinmethosulfat sowie Dichlorphenolindophenol als Elektronenakzeptoren wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt.

	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Spez. Aktivität [ $\text{U mg}^{-1}$ ]
<b>1-Butanol</b>	194	0,24	–	1,2	0,23
<b>1-Hexanol</b>	37,5	0,38	399	10,0	0,36
<b>1-Octanol</b>	39,0	0,39	95	9,9	0,37
<b>HLSMe</b>	20,9	0,51	125	24,5	0,49

Mit ca. 200  $\mu\text{M}$  wies AlkJ die geringste Substrataffinität für 1-Butanol auf, wohingegen für 1-Hexanol, 1-Octanol sowie HLSMe  $K_M$ -Werte im Bereich von 20 bis 40  $\mu\text{M}$  gemessen wurden, was die breite Substratspezifität von AlkJ für lineare aliphatische Substrate mit mehr als sechs Kohlenstoffatomen zeigt. Entsprechend wurden für 1-Hexanol, 1-Octanol sowie HLSMe auch höhere spezifische Aktivitäten als für 1-Butanol bestimmt. Das Phänomen der Substratinhibition war für 1-Octanol ( $K_i = 95 \mu\text{M}$ ) sowie HLSMe ( $K_i = 125 \mu\text{M}$ ) stärker ausgeprägt als für 1-Hexanol ( $K_i = 399 \mu\text{M}$ ).

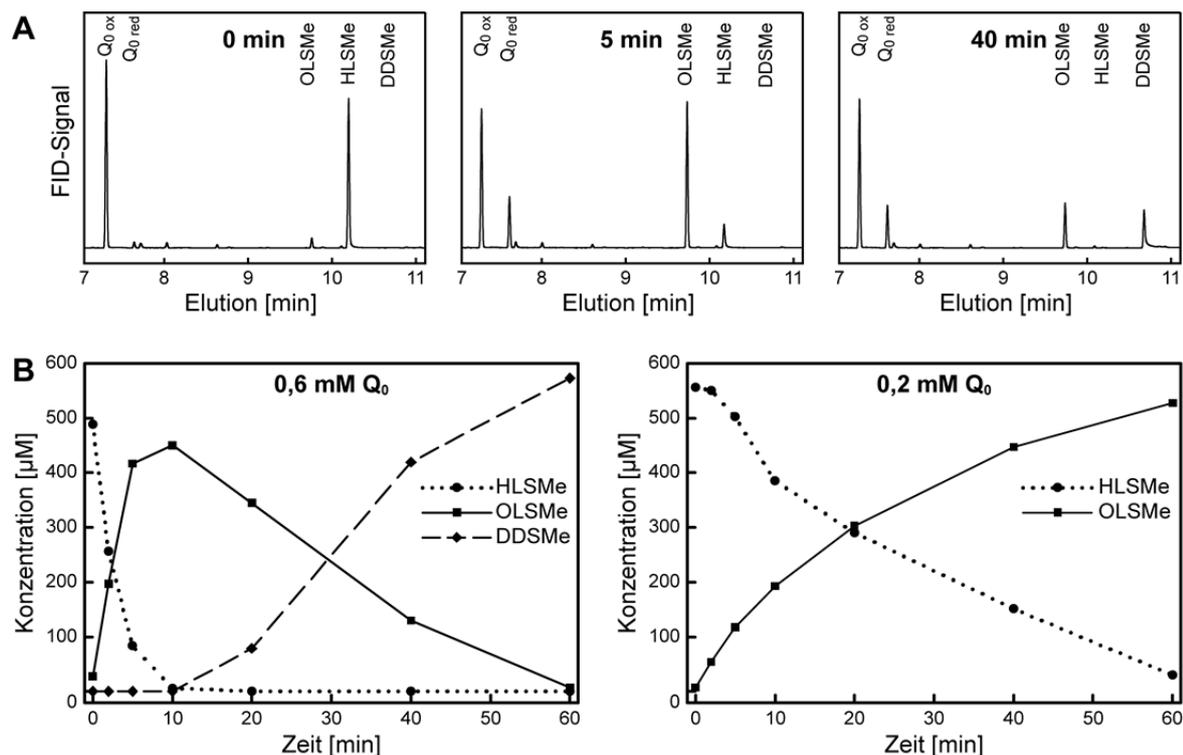


**Abbildung 19.** Katalytische Aktivität von AlkJ gegenüber verschiedenen Alkoholsubstraten. Die kinetischen Parameter des gereinigten rekombinanten Enzyms gegenüber den aliphatischen Alkoholen 1-Butanol, 1-Hexanol und 1-Octanol sowie dem industriell relevanten Substrat  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) wurden unter Verwendung von  $0,2 \mu\text{M}$  AlkJ in  $50 \text{ mM NaP}_i$  ( $\text{pH } 7,5$ ) mit Phenazinmethosulfat (PMS) und Dichlorphenolindophenol (DCPIP) als Redoxpartner in Mikrotiterplatten ermittelt. Die Bestimmung erfolgte im Dreifachansatz (angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung), wobei der Oxidationszustand des terminalen Elektronenakzeptors DCPIP *in situ* photometrisch bei  $600 \text{ nm}$  verfolgt wurde. Die bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen gemessenen katalytischen Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit Hilfe der Michaelis/Menten Gleichung angepasst und daraus die kinetischen Konstanten ermittelt. Für die drei Substrate mit längerer Kohlenstoffkette wurde bei der Berechnung der enzymkinetischen Parameter eine unkompetitive Substratinhibierung angenommen.

### 3.2.5 Bestimmung der Chemoselektivität der Biokatalyse durch AlkJ

Die von AlkJ katalysierte Oxidation von HLSMe zu OLSMe wurde über den beschriebenen photometrischen Assay hinaus durch den direkten instrumentellen Nachweis des Alkoholsubstrats und der daraus gebildeten Produkte mittels GC weiter untersucht. Hierzu wurde die enzymatische Umsetzung von  $0,5 \text{ mM HLSMe}$  durch AlkJ unter Verwendung von  $0,6 \text{ mM Q}_0$  als einem gegenüber PMS/DCPIP physiologisch relevanteren Oxidationsmittel über einen Zeitraum von  $60 \text{ min}$  verfolgt. Die Umsetzung von HLSMe zu OLSMe war bei einer spezifischen Aktivität von  $1,46 \text{ U/mg}$  (bestimmt nach  $5 \text{ min}$  Reaktionszeit) nach zehn Minuten abgeschlossen. Unter den gleichen Bedingungen wurde 1-Octanol mit einer spezifischen Aktivität von  $1,42 \text{ U/mg}$  zum entsprechenden Aldehyd oxidiert.

Überraschenderweise hielt die enzymatisch katalysierte Reaktion nicht beim primären Oxidationsprodukt OLSMe an, sondern dieses wurde mit einer Aktivität von 0,16 U/mg zum Dicarbonsäure-Monomethylester DDSMe weiteroxidiert (Abbildung 20B). Eine Verringerung der  $Q_0$ -Konzentration auf 0,2 mM führte zu einer verlangsamt Oxidationsrate von HLSMe (0,47 U/mg). Im Zeitraum von 60 min wurde bei dieser verringerten Cofaktorkonzentration kein DDSMe als Reaktionsprodukt erhalten.



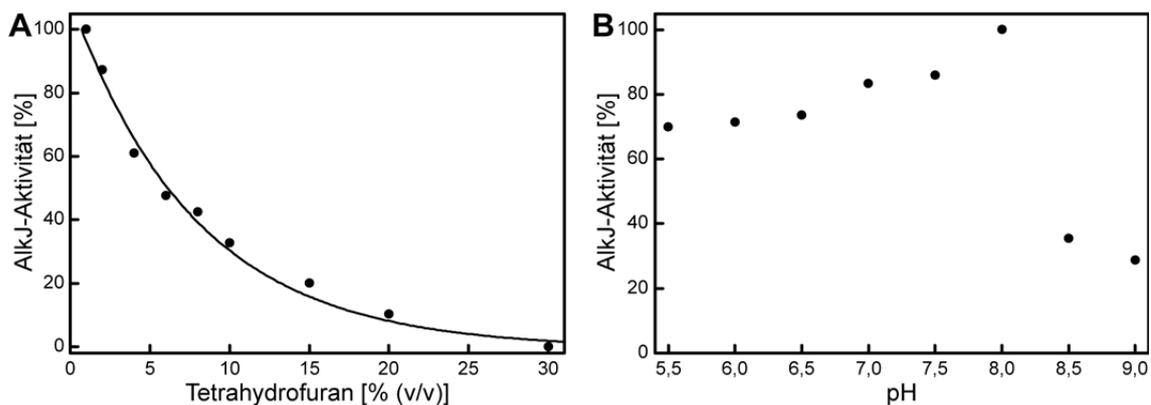
**Abbildung 20.** Chemoselektivität von AlkJ. Die Oxidation von 0,5 mM  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) zum Aldehyd  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester (OLSMe), gefolgt von der Überoxidation zum Dodekandisäure-Monomethylester (DDSMe) durch 0,8  $\mu\text{M}$  AlkJ wurde mit unterschiedlichen  $Q_0$ -Konzentrationen als Elektronenakzeptor bei 25 °C in 50 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 7,5) über einen Zeitraum von 60 min verfolgt. HLSMe sowie dessen durch AlkJ generierte Oxidationsprodukte wurden durch Analyse der Substrate und Produkte mittels Gaschromatographie (GC) quantifiziert. (A) zeigt exemplarisch drei bei Einsatz von 0,6 mM  $Q_0$  erhaltene GC-Chromatogramme zu verschiedenen Zeitpunkten der enzymatischen Umsetzung. Der zeitliche Verlauf der Oxidation bei zwei verschiedenen Elektronenakzeptorkonzentrationen ist in (B) graphisch aufgetragen.

### 3.2.6 Solvenstoleranz und pH-Optimum

Ergänzend zur Substratpräferenz und Produktselektivität wurde am Beispiel von Tetrahydrofuran (THF) die Toleranz von AlkJ gegenüber organischen Lösungsmitteln, welche oftmals zur Erhöhung der Substratverfügbarkeit in Bioprozessen eingesetzt werden, untersucht. Zudem wurde das pH-Optimum der enzymatischen Oxidation mit 0,8  $\mu\text{M}$  IMAC-gereinigtem AlkJ, 0,2 mM  $Q_0$  als Elektronenakzeptor sowie 0,5 mM HLSMe bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden hierzu bei verschiedenen THF-Konzentrationen bzw. pH-Werten für 20 min bei RT inkubiert und die gebildeten Produkte anschließend extrahiert und durch GC quantifi-

ziert. Das Holo-Enzym zeigte bereits bei einem Lösungsmittelanteil von 2 % THF (v/v) einen Abfall auf 87 % der maximalen Aktivität. Bei einem Solvensanteil von 30 % (v/v) THF wurde keine enzymatische Aktivität mehr nachgewiesen. Die Inaktivierung von AlkJ durch THF folgte einem exponentiellen Verlauf, wobei das Enzym bei einer Inkubationsdauer von 20 min bei ca. 5 % THF halbmaximale Aktivität aufwies (Abbildung 21A).

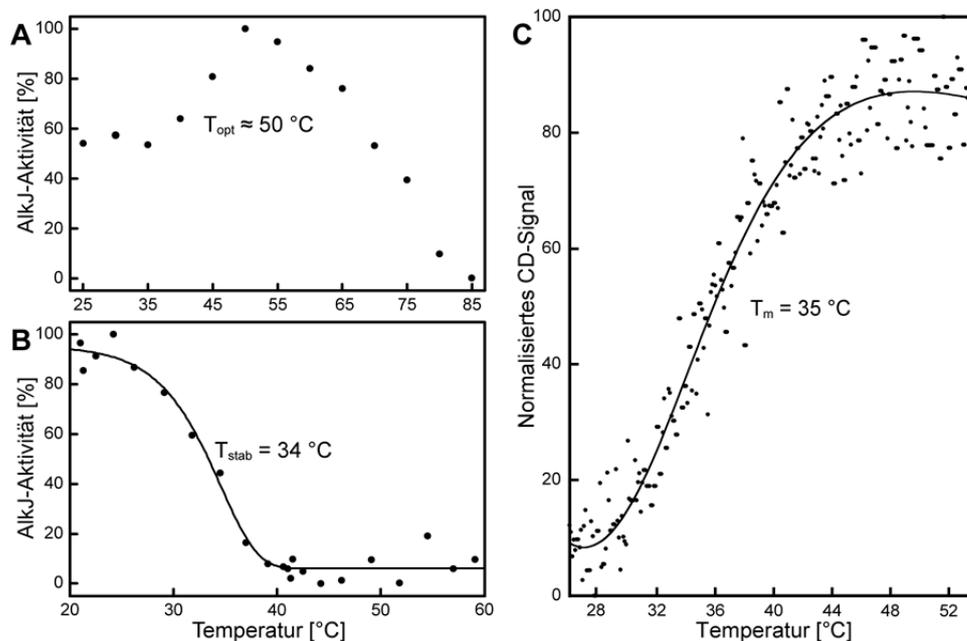
Bei der Untersuchung des pH-Optimums zeigte AlkJ die höchste Aktivität bei pH 8,0. Diese flachte zum Säuren hin leicht ab, wobei bei pH 5,5 noch eine Restaktivität von 65 % ermittelt wurde (Abbildung 21B). Die alkalischeren pH-Werte von 8,5 sowie 9,0 führten zu einem steilen Abfall der enzymatischen Aktivität auf ca. 30 % des maximal gemessenen Umsatzes. Die reduzierte Aktivität bei alkalischen pH-Werten hängt womöglich mit dem Protonierungsgrad der acht in AlkJ vorkommenden Cysteinseitenketten zusammen, welche bei einem pK-Wert von etwa 8,1 mit steigendem pH jenseits 8,0 zunehmend deprotoniert werden. So wurde im zu AlkJ nächstverwandten Enzym mit bekannter Aminosäuresequenz, der PEGDH aus *Sphingopyxis terrae*, eine Beteiligung von Cysteinresten bei sowohl der Substratbindung wie auch bei der Elektronenweitergabe beobachtet (Ohta *et al.*, 2006).



**Abbildung 21.** Analyse der Solvenstoleranz sowie des pH-Optimums von AlkJ. 0,5 mM  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester wurden mit 0,8  $\mu$ M AlkJ und 0,2 mM  $Q_0$  als Elektronenakzeptor für 20 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Produkte extrahiert und durch Gaschromatographie quantifiziert. (A) Einfluss des organischen Lösungsmittels Tetrahydrofuran (THF) auf die Aktivität von gereinigtem AlkJ. Die Reaktionsansätze wurden mit verschiedenen Konzentrationen an THF versetzt und die Aktivität von AlkJ anhand der gebildeten Produkte bestimmt. (B) Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität von gereinigtem AlkJ. Die Reaktion erfolgte in jeweils 50 mM Lösungen der Puffersubstanzen MES/NaOH (pH 5,5; 6,0; 6,5), Hepes/NaOH (pH 7,0; 7,5; 8,0) sowie Tris/HCl (pH 8,5; 9,0).

### 3.2.7 Untersuchungen zur Thermostabilität

Im Hinblick auf die Prozessstabilität von AlkJ wurden sowohl dessen Temperaturoptimum als auch die thermische Stabilität untersucht.  $T_{\text{opt}}$ , die Temperatur bei welcher AlkJ die höchste katalytische Aktivität aufweist, wurde durch Messung der enzymatischen Aktivität gegenüber 0,1 mM 1-Octanol mit 0,2 mM PMS und 0,1 mM DCPIP in 50 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 7,5) im Photodiodenarray-Photometer bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Hierbei zeigte AlkJ bei Temperaturen von 25 bis 35 °C eine nahezu unveränderte Aktivität von etwa 60 % der maximalen Katalyseleistung. Die höchste initiale Umsatzrate (= 100 % Aktivität) wurde bei ca. 50 °C erhalten. Höhere Temperaturen führten zu einer verringerten Enzymaktivität (Abbildung 22A).



**Abbildung 22.** Thermische Stabilität von Holo-AlkJ. (A) Temperaturabhängigkeit der von AlkJ katalysierten Oxidationsreaktion. Die für AlkJ optimale Reaktionstemperatur wurde anhand der Enzymaktivität gegenüber 0,1 mM 1-Octanol bei verschiedenen Temperaturen mit dem Elektronenakzeptor Dichlorphenolindophenol (DCPIP) bei 600 nm in Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS) im Photodiodenarray-Spektrophotometer ermittelt. (B) Die thermisch induzierte Denaturierung von AlkJ bei pH 8,0 wurde nach einstündiger Inkubation durch Messung der enzymatischen Restaktivität gegenüber 0,1 mM 1-Octanol mit 0,2 mM PMS und 0,1 mM DCPIP bei 30 °C untersucht. (C) Quasireversible thermische Denaturierung bei pH 7,5. Die Entfaltung von AlkJ wurde im CD-Spektropolarimeter bei 215 nm bei einer Heizrate von 60 K/h bestimmt.

Die thermische Stabilität von gereinigtem AlkJ wurde mit zwei verschiedenen experimentellen Vorgehensweisen ermittelt. Für die Bestimmung der nach einer Thermoinkubation verbleibenden enzymatischen Restaktivität wurden AlkJ-Aliquots für eine Stunde bei konstanten Temperaturen im Thermocycler in 50 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 8,0), 150 mM NaCl, 15 % (v/v) Glycerin, 0,025 % (w/v) DDM inkubiert und die Enzymaktivität anschließend mit dem Substrat 1-Octanol und den Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP

ermittelt. Die höchste Aktivität wurde bei einer Inkubation nahe RT (26 °C) gemessen. Für  $T_{\text{stab}}$ , die Inkubationstemperatur, bei welcher AlkJ eine Restaktivität von 50 % aufweist, wurde durch Kurvenanpassung ein Wert von 34 °C ermittelt. Temperaturen von über 40 °C führten zu einer enzymatischen Aktivität von unter 5 % (Abbildung 22B).

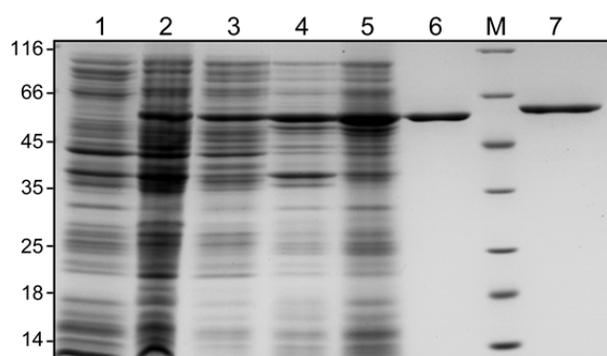
Dieser Wert wurde durch die thermische Denaturierung von AlkJ im CD-Spektropolarimeter bestätigt. Die Messung des durch thermische Entfaltung bedingten Verlusts an Sekundärstruktur ergab einen  $T_m$  von 35 °C. Da AlkJ im verwendeten CD-Puffer (20 mM  $\text{KP}_i$  [pH 7,5], 50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) während der Erhitzung Aggregate bildete, konnte keine Renaturierungskurve aufgezeichnet werden (irreversible Denaturierung).

### 3.2.8 Einfluss der C-terminalen Aminosäuren auf die Membranassoziation

Obwohl AlkJ bereits in früheren Veröffentlichungen als membranständiges Enzym beschrieben (Benson & Shapiro, 1976; van Beilen *et al.*, 1992a) und dies in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis des in *E. coli* produzierten AlkJ in der bakteriellen Zellmembran bestätigt wurde (vgl. Abschnitt 3.2.1), konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein Sequenzmotiv in AlkJ (oder einem homologen Enzym) für die Membranassoziation verantwortlich gemacht werden. Die Untersuchung der Aminosäuresequenz auf Transmembransegmente mit dem TMHMM-Algorithmus (Krogh *et al.*, 2001) ergab keinen Hinweis auf Transmembranhelices oder in die Lipiddoppelschicht reichende hydrophobe Loops. Allerdings wurden bei AlkJ im Gegensatz zu den beiden nächstverwandten Enzymen mit bekannter Kristallstruktur, der Cholin-Oxidase aus *Arthrobacter globiformis* (CHOX, PDB ID: 2JBC; (Quaye *et al.*, 2008)) sowie der Pyridoxin-4-Oxidase aus *Mesorhizobium loti* (PNOX, PDB ID: 4HA6; (Mugo *et al.*, 2013)), am C-Terminus sieben kumulierte negative Aminosäuren identifiziert (6× Glu, 1× Asp, Abbildung 23).

Über ionische Wechselwirkungen mit den an den Phospholipiden der bakteriellen Zellmembran gebundenen Calciumionen könnten diese sauren Reste eine Verankerung von AlkJ an der Membran bewirken. Sowohl CHOX als auch PNOX sind als lösliche Proteine im bakteriellen Cytoplasma löslich beschrieben, was die Untersuchung des Einflusses der C-terminalen Extension in AlkJ auf die subzelluläre Lokalisierung inspirierte. Hierzu wurde auf Basis eines Aminosäuresequenzalignments eine um 27 Aminosäuren verkürzte AlkJ-Variante, AlkJ $\Delta$ C, generiert, in welcher der die sieben negativ geladenen C-terminalen Aminosäuren enthaltende Sequenzabschnitt fehlt.





**Abbildung 24.** Übersicht über Produktion und Reinigung von AlkJ $\Delta$ C mittels reduzierender SDS-PAGE-Analyse. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spur 1: Gesamtzellextrakt von mit pASK-IBA35(+)-AlkJ $\Delta$ C transformierten *E. coli* BL21 vor Induktion der Fremdgenexpression. Spur 2: Gesamtzellextrakt nach 15 h rekombinanter Genexpression bei 22 °C zum Erntezeitpunkt. Spur 3: Bakterieller Zellrohextrakt nach Lyse der Zellen mittels *French Press* und Abtrennung von Aggregaten. Spur 4: Membranfraktion nach Anreicherung durch Ultrazentrifugation. Spur 5: Mit *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM) solubilisierte membranständige Proteine nach der Abtrennung von Aggregaten. Spur 6: Gereinigtes AlkJ $\Delta$ C nach Tandem-IMAC und Größenausschlusschromatographie (SEC). Spur 7: Durch Tandem-IMAC und SEC gereinigtes wtAlkJ.

AlkJ $\Delta$ C zeigte eine leicht verringerte katalytische Effizienz sowohl für die Umsetzung von HLSMe als auch bezüglich des Cosubstrats Q<sub>1</sub> als Oxidationsmittel (**Tabelle 8**). Eine Analyse der apparenten Molmasse des Enzyms durch präparative SEC ergab eine Größe von 141 kDa für das AlkJ $\Delta$ C-Homodimer, was einer Massendifferenz von 9 kDa gegenüber wtAlkJ entspricht (vgl. Abschnitt 3.2.1) und im Einklang mit den Erwartungen steht. Da die C-terminale Verkürzung von AlkJ nur mit einer geringer Veränderung der kinetischen Parameter einhergeht, allerdings eine verbesserte Ausbeute für das rekombinante Protein bewirkte, bietet die hier klonierte Variante AlkJ $\Delta$ C trotz der bestehenden Membranassoziation Potential für eine technische Nutzung.

**Tabelle 8.** Produktion und kinetische Parameter von AlkJ $\Delta$ C.

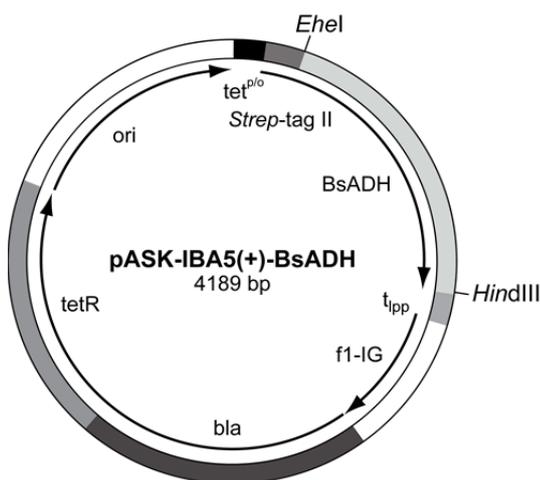
Ort	Ausbeute [mg/l]	Berechnete Molmasse [kDa]	Bestimmte Molmasse [kDa]	HLSMe				Q <sub>1</sub>			
				K <sub>M</sub> [ $\mu$ M]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]	K <sub>M</sub> [ $\mu$ M]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	
wtAlkJ	Membran	6	125	150	21	0,51	25	125	42,2	3,5	83
AlkJ $\Delta$ C	Membran	8	120	141	16	0,34	22	104	49,3	3,9	80

### 3.3 Charakterisierung und Stabilitäts-Engineering der BsADH

Zusätzlich zu der aus *P. putida* stammenden FAD-abhängigen ADH AlkJ wurde in der vorliegenden Arbeit eine ADH aus *Geobacillus stearothermophilus* auf ihre Eignung für die selektive Oxidation von HLSMe untersucht. Aufgrund des bekannten breiten Substratspektrums sowie der Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und organischen Lösungsmitteln ist dieses Enzym hochinteressant für eine Anwendung in der industriellen Biotechnologie (Guterl *et al.*, 2012), weshalb hier die kinetischen und proteinbiochemischen Eigenschaften weitergehend untersucht werden sollten. Um die Eignung des Enzyms für den technischen Einsatz zu steigern, sollte zudem die Stabilität dieser moderat-thermophilen ADH durch strukturbasiertes *Protein-Engineering* weiter erhöht werden.

#### 3.3.1 Klonierung, Produktion und Reinigung

Für die gentechnische Herstellung der BsADH (UniProt ID: P42328) wurde die von Evonik Industries auf dem Plasmid pET21a-BsADH erhaltene codonoptimierte Gensequenz auf den bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA5(+) umkloniert, welcher eine Expression in Fusion mit dem N-terminalen *Strep*-tag II für eine anschließende Affinitätsreinigung gestattet (Schmidt & Skerra, 2007). Die Induktion der rekombinanten Genexpression wurde dabei über den Tetrazyklin-Promotor/Operator reguliert (Abbildung 25, Skerra, 1994). Als Wirtszellorganismus für die heterologe Biosynthese des Enzyms wurde der *E. coli*-Stamm BL21 benutzt.



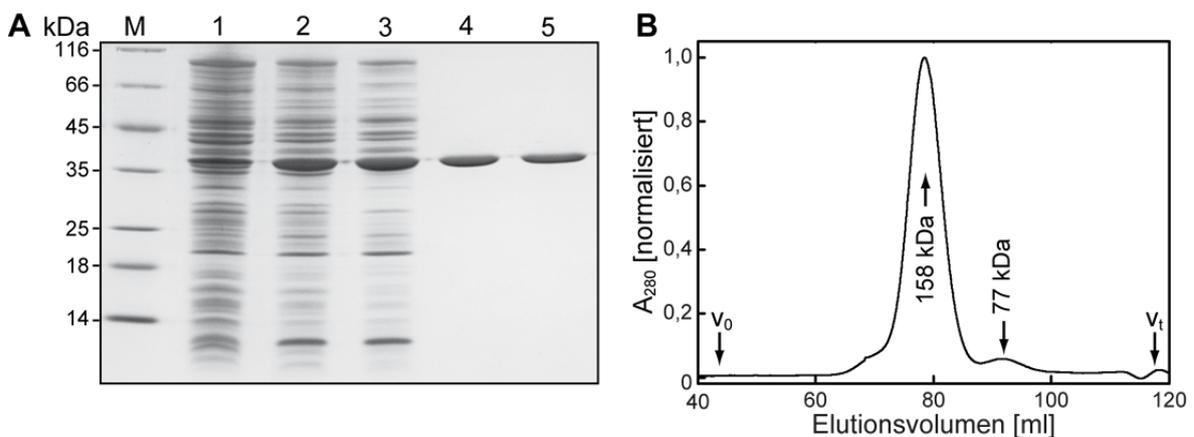
**Abbildung 25.** Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsplasmids pASK-IBA5(+)-BsADH. Das Gen für BsADH, welches am 5'-Ende mit einer für das *Strep*-tag II codierenden Sequenz fusioniert ist, steht unter der Kontrolle des mit Anhydrotetrazyklin induzierbaren *tet*-Promotor/Operators ( $tet^{P/0}$ ) und wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator ( $t_{ipp}$ ) abgeschlossen. Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressors (*tetR*) sichergestellt. Weitere Elemente sind der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (*ori*), der Replikationsursprung aus der intergenen Region des filamentösen Bacteriophagen f1 (*f1-IG*) und das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Gen der  $\beta$ -Lactamase (*bla*).

Nach Genexpression der BsADH über 14 Stunden bei 37 °C machte das im bakteriellen Cytoplasma überproduzierte Enzym etwa 15 % des Gesamtzellproteins aus (Abbildung 26A, Spur 2), wobei bemerkenswerterweise keine Einschlusskörper nachgewiesen wurden. Dies lässt auf ein robustes Faltungsverhalten des homotetrameren Proteins sowie auf den

effizienten Einbau der beiden essentiellen Zinkionen pro Untereinheit schließen, welche sowohl für die Ausbildung der nativen Quartärstruktur als auch für die katalytische Funktion essentiell sind (Fiorentino *et al.*, 1998).

Nach dem Auftragen des nach Lyse der Zellen mittels *French Press* erhaltenen Rohextrakts auf eine *Strep*-Tactin Säule und Wegwaschen von an die Säulenmatrix schwach gebundenen Wirtsproteinen wurde BsADH mit D-Desthiobiotin in einem scharfen Peak eluiert (nicht gezeigt). Die vereinigten Eluatfraktionen enthielten elektrophoretisch homogene BsADH, wie anhand von reduzierender SDS-PAGE nachgewiesen wurde.

Um die korrekte Quartärstruktur des Enzyms zu überprüfen und potentielle Kontaminanten weiter abzureichern, wurde die BsADH zusätzlich durch präparative Größenausschlusschromatographie an einer Superdex 200 Säule gereinigt. Während der SEC wurden zwei separierte Maxima erfasst, ein 158 kDa entsprechender Hauptpeak und ein kleinerer Peak, der einer Molmasse von 77 kDa entsprach (Abbildung 26B). Basierend auf einer berechneten Masse von 37.665 Da pro *Strep*-BsADH Monomer ist der erste Peak dem als Homotetramer vorliegendem Enzym zuzuordnen, wohingegen der zweite Peak offenbar durch einen kleineren Anteil BsADH-Dimer hervorgerufen wird.



**Abbildung 26.** Bakterielle Produktion und Reinigung der BsADH. (A) Analyse der Produktion von BsADH in *E. coli* bei 37 °C sowie deren Reinigung durch reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Protein-Größenstandard (kDa). Spur 1: Gesamtzelllysat von *E. coli* BL21, transformiert mit pASK-IBA5(+)-BsADH, vor Induktion. Spur 2: Gesamtzellextrakt nach 14 h rekombinanter Genexpression zum Erntezeitpunkt. Spur 3: Lösliche Proteine nach mechanischem Zellaufschluss durch *French Press*. Spur 4: Vereinigte Eluatfraktionen nach Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC). Spur 5: Finale BsADH-Präparation nach Größenausschlusschromatographie (SEC). (B) SEC-Profil von BsADH auf einer präparativen Superdex 200 Säule nach vorhergehender SAC-Reinigung. BsADH eluiert bei einem Volumen, welches mit der nativen homotetrameren Quartärstruktur (158 kDa) übereinstimmt. Der kleinere Peak entspricht einer Molmasse von 77 kDa und wurde nach Untersuchung der betreffenden Fraktionen mittels SDS-PAGE der homodimeren BsADH zugeordnet. Die das Tetramer enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (Abbildung A, Spur 5) und in der vorliegenden Arbeit für enzymatische Analysen sowie Stabilitätstests verwendet.

Die Berechnung der Peakflächen ergab, dass 97 % des Enzyms in dem physiologisch relevanten homotetrameren Zustand vorlagen, wovon insgesamt 10 mg pro Liter *E. coli*-Kultur gewonnen wurden. Durch ESI-MS-Messungen des SEC-gereinigten Enzyms wurde eine Masse von 37.534 Da für *Strep*-BsADH bestimmt, was bei einer Massendifferenz von -131 Da zur berechneten Molmasse auf eine Abspaltung des Startmethionins durch die Methionin-Aminopeptidase von *E. coli* hindeutet (Hirel *et al.*, 1989).

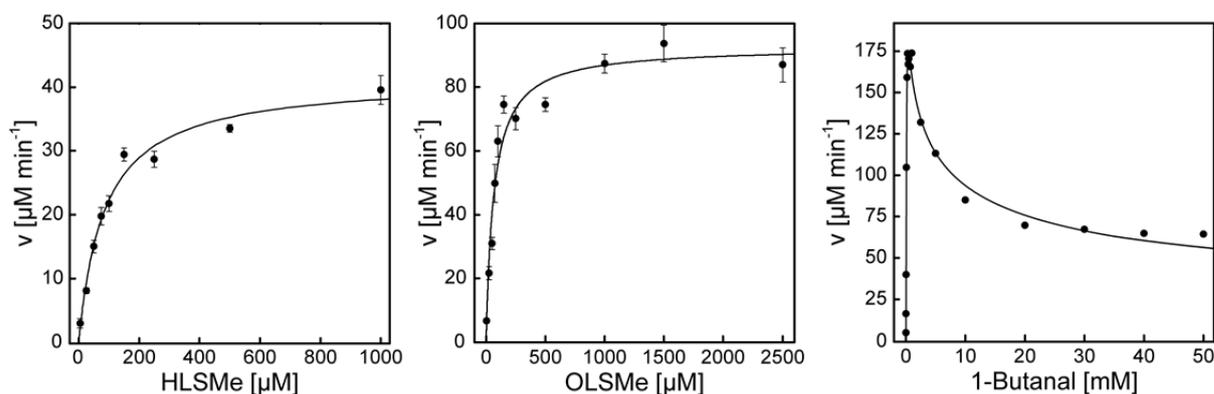
Da pro BsADH-Untereinheit außerhalb der beiden Zinkbindestellen drei ungepaarte Cysteinreste vorliegen, wurde allen während der Reinigung und Lagerung verwendeten Puffern  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt, um eine Oxidation der exponierten freien Thiolgruppen zu verhindern. Um die insbesondere während der Konzentration durch Ultrafiltration auftretende Präzipitation des Enzyms zu unterbinden, wurde außerdem Glycerin zugefügt (Vagenende *et al.*, 2009). Unmittelbar vor den Messungen zur Enzymstabilität wurden die stabilisierenden Pufferzusätze durch Umpuffern der Enzymlösungen mit Hilfe von PD-10 Säulen entfernt.

### 3.3.2 Enzymkinetische Parameter

Für das mittels SEC-gereinigte homotetramere Enzym wurden die enzymkinetischen Konstanten gegenüber den Substratpaaren Ethanol/Ethanal (Fiorentino *et al.*, 1998), 1-Butanol/1-Butanal sowie dem industriell relevanten langkettigen aliphatischen Alkohol HLSMe bzw. dessen korrespondierendem Aldehyd OLSMe bestimmt (Abbildung 27). Die Messungen für die Berechnung von  $K_M$  sowie der Wechselzahl  $k_{cat}$  wurden mit verschiedenen Substratkonzentrationen bei der für BsADH optimalen Reaktionstemperatur von 60 °C durchgeführt. Das rekombinante Enzym zeigte gegenüber Ethanol einen  $K_M$ -Wert von 0,91 mM bei einem  $k_{cat}$  von 305 s<sup>-1</sup>, was einer spezifischen Aktivität von 489 U/mg und einer katalytischen Effizienz von  $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entspricht (Aktivität bei 37 °C: 147 U/mg). Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte spezifische Aktivität steht in Einklang mit dem in einer publizierten Studie ermittelten Wert für das ohne Affinitätsanhängsel gereinigte Enzym von 420 U/mg (Cannio *et al.*, 1994). Bei einer als Fusion mit der Glutathion S-Transferase isolierten BsADH wurde durch Shim *et al.* (2003) eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität von 61 U/mg bei einem  $K_M$ -Wert von 5,1 mM gemessen.

BsADH zeigte zudem hohe Aktivität bei der Rückreaktion (Ethanal: 1086 U/mg) wie auch für 1-Butanol (311 U/mg). Die höchste Aktivität unter den kurzkettigen Substraten wurde für 1-Butanal bestimmt ( $K_M = 108 \mu\text{M}$ ; 1483 U/mg). In diesem Fall wurde allerdings mit steigender Substratkonzentration ein inhibierender Effekt (Hanekom *et al.*, 2006) auf BsADH beobachtet ( $K_i = 2,1 \text{ mM}$ , Abbildung 27 und Tabelle 9). Bemerkenswerterweise zeigte die BsADH in nachfolgenden Experimenten eine ebenfalls hohe Substrataffinität gegenüber dem

langkettigen Alkoholsubstrat HLSMe ( $K_M = 85,9 \mu\text{M}$ , Abbildung 27) bei einer Umsatzrate von  $27,6 \text{ s}^{-1}$ , entsprechend einer spezifischen Aktivität von  $44 \text{ U/mg}$  ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ :  $11 \text{ U/mg}$ ).



**Abbildung 27.** Kinetische Charakterisierung der BsADH. Die linearen Anfangsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen des langkettigen aliphatischen Alkohols  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) und dessen korrespondierendem Aldehyd  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester (OLSMe) sowie von 1-Butanal wurden durch spektroskopische Quantifizierung des Nikotinamid-Cofaktors bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ mM NaP}_i$  (pH 8,0) bestimmt. Die Reaktionslösung enthielt nahezu sättigende Konzentration an  $\text{NAD}^+$  ( $2 \text{ mM} \approx 10 \times K_M$ ) oder  $\text{NADH}$  ( $0,2 \text{ mM} \approx 3 \times K_M$ ) sowie einen konstanten Anteil von  $0,5 \%$  (v/v) Tetrahydrofuran als Cosolvens im Fall der langkettigen Substrate. Für die Umsetzung von HLSMe wurde  $25 \text{ nM}$  Enzym eingesetzt; die Reduktion von OLSMe und 1-Butanal wurde in Gegenwart von  $5 \text{ nM}$  BsADH ermittelt. Die Messergebnisse wurden mit Hilfe des SigmaPlot Moduls Enzyme Kinetics 1.3 oder mit Origin anhand der Michaelis/Menten-Gleichung oder, im Fall von 1-Butanal, der biphasischen Hill-Gleichung ausgewertet.

Um das chemische Gleichgewicht für die durch  $\text{NAD}^+$  getriebene Oxidation von HLSMe zu bestimmen, wurde auch hier die Rückwärtsreaktion, d.h. die Reduktion von OLSMe mit  $\text{NADH}$  als Reduktionsmittel untersucht. Hier ergab sich für BsADH ein  $K_M$ -Wert von  $66 \mu\text{M}$  sowie ein  $k_{\text{cat}}$  von  $308 \text{ s}^{-1}$  (**Tabelle 9**). Darüber hinaus wurden  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  für die beteiligten Cofaktoren  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  erfasst, jeweils unter Substratsättigung mit HLSMe bzw. OLSMe. Basierend auf der katalytischen Effizienz der BsADH für HLSMe, OLSMe sowie die dazugehörigen Nikotinamid-Cofaktoren wurde ein  $K_{\text{eq}}$  von  $2,16 \times 10^{-3}$  berechnet (vgl. Abschnitt 2.6.3). Dies zeigt, dass die an  $\text{NAD}^+$  gekoppelte Oxidation von HLSMe zum aliphatischen Aldehyd – wie erwartet (Alberty, 1953) – thermodynamisch nicht begünstigt ist. Die enzymatische Aktivität der BsADH wurde dabei durch die Zugabe von  $0,5 \%$  (v/v) Tetrahydrofuran, welches als Cosolvens bei Untersuchungen mit langkettigen Substraten eingesetzt wurde, nicht beeinträchtigt (nicht gezeigt), was anhand von Messungen mit dem gängigen, gut wasserlöslichen Substrat Ethanol ermittelt wurde.

**Tabelle 9.** Kinetische Parameter der BsADH für kurzkettige Alkohole und Aldehyde, die industriell relevanten Substrate HLSMe und OLSMe sowie die entsprechenden Nikotinamid-Cofaktoren bei 60 °C in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0).

	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Aktivität [ $\text{U mg}^{-1}$ ]	$K_i$ [ $\text{mM}$ ]
<b>Ethanol</b>	910	305	$3,4 \times 10^5$	489	–
<b>Ethanal</b>	364	681	$19 \times 10^5$	1085	–
<b>1-Butanol</b>	611	195	$3,2 \times 10^5$	311	–
<b>1-Butanal</b>	108	931	$86 \times 10^5$	1486	2,1
<b>HLSMe</b>	85,9	27,6	$3,2 \times 10^5$	44	–
<b>NAD<sup>+</sup>[a]</b>	239	34,2	$1,0 \times 10^5$	55	–
<b>OLSMe</b>	66,0	308	$47 \times 10^5$	495	–
<b>NADH<sup>[b]</sup></b>	71,6	326	$45 \times 10^5$	523	–

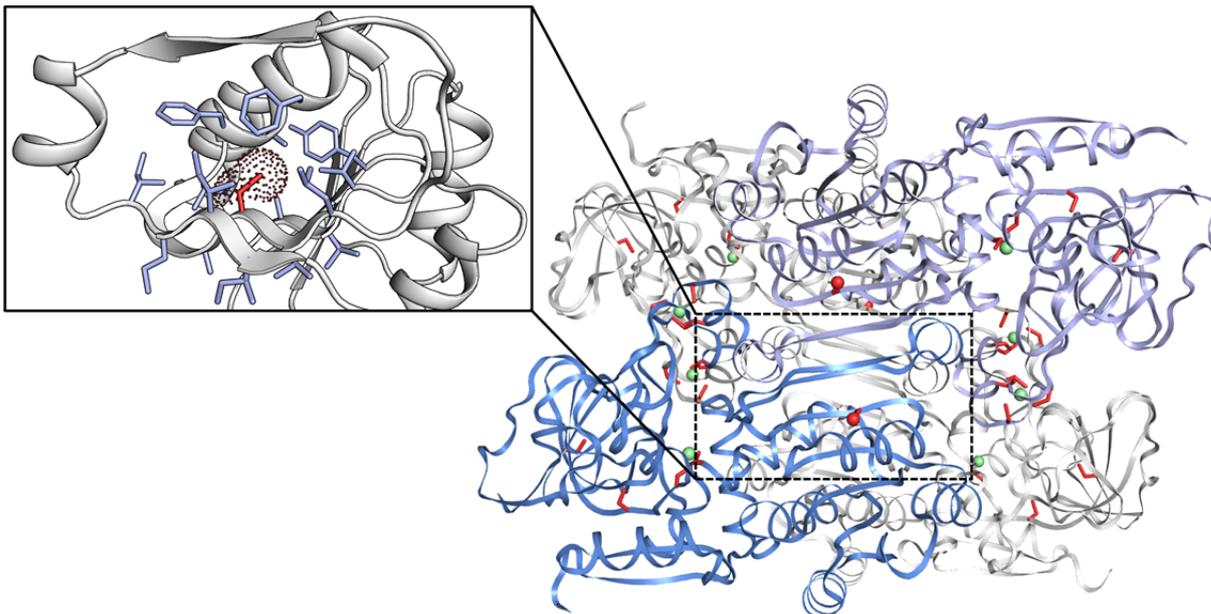
<sup>[a]</sup> gemessen mit HLSMe

<sup>[b]</sup> gemessen mit OLSMe

### 3.3.3 Erhöhung der Enzymstabilität durch strukturbasierte rationale Mutagenese

Auch wenn pro BsADH-Untereinheit sechs Cysteinreste an der Koordinierung der beiden essentiellen Zinkionen beteiligt sind (Ceccarelli *et al.*, 2004), weist die Primärstruktur des Enzyms drei zusätzliche, freie Cysteinreste auf (Abbildung 28). Solche freien Thiolseitenketten tendieren zur Ausbildung unspezifischer intra- wie auch intermolekularer Disulfidverbrückungen und stellen in der Regel die chemisch empfindlichsten Gruppen innerhalb eines Proteins dar. So führen oxidative Modifizierungen schwefelhaltiger Aminosäureseitenketten oftmals zu einer Veränderung der physikochemischen Eigenschaften des Proteins (Li *et al.*, 1995) und schränken dadurch dessen Anwendungspotential ein. Obwohl eine oxidative Modifizierung der Schwefelatome in den Seitenketten unterdrückt ist, solange sich das Protein im reduzierenden Milieu des bakteriellen Cytoplasmas aufhält, stellt die Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren bei der Anwendung von Proteinen unter oxidierenden Bedingungen ein generelles Problem dar und geht bei hohen Temperaturen sogar noch schneller vonstatten (Opperman & Reetz, 2010). Eine geeignete Substitution schwefelhaltiger Aminosäuren gegen inerte Seitenketten kann daher sowohl zu einer verlängerten Lagerfähigkeit eines Enzyms wie auch zu dessen erhöhter Prozessstabilität unter oxidativen Bedingungen beitragen.

Mit der Zielsetzung, die bekannte Oxidationslabilität der BsADH zu beheben, wurden die drei freien Cysteinreste sowie zwei auf der Enzymoberfläche exponierte Methioninreste für eine Mutagenesestudie ausgewählt. Um geeignete Substitutionen zu identifizieren wurden zur BsADH ähnliche Enzymsequenzen mit Hilfe von BLAST (Altschul *et al.*, 1990) identifiziert und die 100 nächstverwandten Enzyme hinsichtlich einer Substitution an der zu mutierenden



**Abbildung 28.** Räumliche Anordnung der Cysteinreste innerhalb der BsADH. Überblick über die homotetramere Quartärstruktur der BsADH (PDB ID: 1RJW). Die erweiterte  $\beta$ -Faltblatt-Interaktionsfläche von Monomer A (hellblau) und D (mittelblau) ist im vorderen Zentrum der Struktur zu sehen und gleicht der homodimeren Organisation der nahe verwandten Pferdeleber-ADH (31 % Sequenzidentität; PDB ID: 1AXG). Die katalytischen sowie strukturellen Zinkionen sind als mintgrüne Kugeln dargestellt. Die metall-koordinierenden wie auch freien Cysteinreste sind als rot eingefärbte Stäbchen hervorgehoben. Bei der in dieser Arbeit näher untersuchten Position Cys257 ist  $S\gamma$  als rote Kugel betont. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt (in abgeänderter Orientierung) die hydrophobe Umgebung der Position 257 nahe der Interaktionsfläche von Monomer A und D innerhalb der NAD-Bindetasche. Cys257 ist als rotes Stäbchen dargestellt, der entsprechende van-der-Waals-Radius ist durch rote Punkte abgegrenzt. Aminosäuren im Umkreis von 8 Å des  $C\alpha$ -Atoms von Cys257 sind als hellblaue Sticks gezeichnet.

Position untersucht. Die an der Mutationsstelle im Sequenzkollektiv am häufigsten vertretene Aminosäure wurde ausgewählt und die entsprechende Substitution mit Hilfe des Mutagenesemoduls von PyMol auf Grundlage der BsADH-Kristallstruktur *in silico* modelliert. Dabei wurden am jeweiligen Ort der Mutation je ein oder mehrere Rotamere identifiziert, welche keine sterischen Überlappungen mit benachbarten Seitenketten aufwiesen, so dass für die Substitutionen C35S, C124T und C257L eine Klonierungsstrategie ausgearbeitet wurde. Zudem wurden ausgehend von der Variante C257L die Mutanten M187L, M267L sowie M187L/M267L generiert.

Aufgrund vielversprechender Vorversuche wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Mutante BsADH(C257L), welche eine im Vergleich zum Wildtypenzym um nahezu das Doppelte erhöhte Ausbeute von 18 mg/l Kultur nach der Reinigung durch SAC sowie SEC zeigte (wtBsADH: 10 mg/l), eingehender untersucht. Bei der Umsetzung von Ethanol wies die Punktmutante mit 614 U/mg (37 °C: 199 U/mg) eine gegenüber der wtBsADH leicht erhöhte Aktivität auf. Darüber hinaus zeigte diese Leucinvariante ähnlich vorteilhafte kinetische Parameter für eine Umsetzung von HLSMe wie das Wildtypenzym ( $K_M = 100 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}} = 34,3 \text{ s}^{-1}$ ; die spezifische Aktivität für HLSMe betrug bei 60 °C 55 U/mg (37 °C: 12 U/mg).

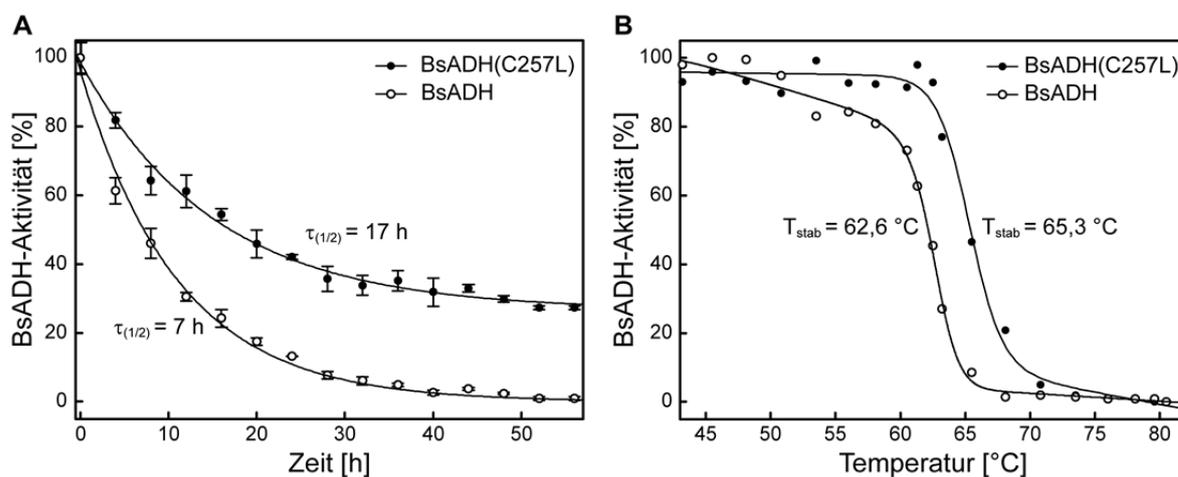
Diese Charakteristika wiesen auf eine gute Eignung der Punktmutante als Biokatalysator hin, weshalb BsADH(C257L) hinsichtlich verbesserter Stabilität sowie potentieller Anwendung bei der biotechnologischen Synthese von OLSMe charakterisiert wurde.

Zur Ermittlung der Lagerstabilität unter oxidierenden Bedingungen wurden wtBsADH und dessen Mutante C257L nach Abtrennung der stabilisierenden Pufferkomponenten durch PD-10-Säulen in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0) bei 15 °C für 56 h inkubiert. Die jeweils verbleibende Enzymaktivität gegenüber Ethanol wurde alle 4 Stunden über einen spektrophotometrischen NADH-Verbrauchsassay im Mikrotiterplattenmaßstab bestimmt. Direkt nach Start der Inkubation verlor das Wildtypenzym deutlich an Aktivität, welche nach sieben Stunden nur noch ca. 50 % der Ausgangsaktivität betrug, wohingegen für die Mutante C257L eine sichtlich verlängerte „Halbwertszeit“ von ca. 17 h ermittelt wurde (Abbildung 29A). Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung entsprach beim Wildtypenzym, welches nach 56 h eine Restaktivität von gerade 1 % aufwies, einem exponentiellen Zerfall. Hingegen zeigte die Mutante C257L nach 56 h Inkubationsdauer eine Restaktivität von 30 %, wobei der Aktivitätsverlust hier ebenfalls exponentiell, jedoch mit geringerer negativen Steigung erfolgte. Allerdings konnten in Anwesenheit von 10 mM β-Mercaptoethanol sowie 10 % Glycerin sowohl wtBsADH als auch BsADH(C257L) in dem Puffer 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0), 150 mM NaCl für mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden, ohne an Aktivität gegenüber dem Substrat Ethanol zu verlieren (nicht gezeigt).

Für die Bestimmung der Halbwertstemperatur  $T_{\text{stab}}$ , also des Temperaturwerts, bei welchem ein Enzym nach Inkubation (unter oxidierenden Bedingungen) noch 50 % der Ausgangsaktivität aufweist, wurden 50 nM Lösungen der zuvor frisch mit Hilfe von PD-10-Säulen entsalzten BsADH sowie BsADH(C257L) parallel für 30 min bei definierter Temperatur in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0) unter Nutzung der Temperaturgradientenfunktion in einem Thermocycler inkubiert. Nach schneller Abkühlung der Enzymlösungen im Thermocycler wurde die Aktivität unter Verwendung von Ethanol als Substrat wie oben beschrieben gemessen. Das Wildtypenzym zeigte im Temperaturbereich von 42 bis 58 °C eine kontinuierliche leichte Abnahme der thermischen Stabilität von 100 auf 81 % (Abbildung 29B). Bei höherer Temperatur nahm die Enzymaktivität sprunghaft ab und wies bei einer Inkubationstemperatur von 68 °C noch lediglich 1 % der Ausgangsaktivität auf. Durch Kurvenanpassung ergab sich für wtBsADH eine Halbwertstemperatur von  $T_{\text{stab}} = 62,6$  °C.

Im Gegensatz zum Wildtypenzym wurde die Aktivität der Mutante C257L durch Inkubationstemperaturen von bis zu 62 °C nur geringfügig beeinträchtigt (93 % Restaktivität). Erst bei höherer Temperatur nahm sie deutlich ab, mit 5 % verbleibender Enzymaktivität bei 71 °C. Für die Mutante C257L wurde  $T_{\text{stab}} = 65,3$  °C ermittelt, was einer nominalen Erhöhung der Thermostabilität um 2,7 °C durch den Tausch von Cystein gegen Leucin entspricht. Allerdings zeigte die Leucinmutante auch bei Inkubationstemperaturen unterhalb der

Halbwertstemperatur eine deutliche Stabilisierung gegenüber dem Wildtypenzym (vgl. Abbildung 29B), was jedoch nicht einfach zu quantifizieren ist. Wenn den Enzymlösungen bei der Thermoinkubation  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben wurde, stieg sowohl für wtBsADH ( $T_{\text{stab}} = 64,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) als auch für BsADH(C257L) ( $T_{\text{stab}} = 67,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) die Halbwertstemperatur geringfügig und nahezu gleichermaßen (nicht gezeigt).



**Abbildung 29.** Lagerstabilität bei 15 °C und irreversible thermische Denaturierung von wtBsADH und deren Punktmutante C257L. (A) Die katalytische Restaktivität beider Enzyme gegenüber 10 mM Ethanol wurde im Verlauf der Inkubation einer 50 nM Enzymlösung (nach Entfernung der stabilisierenden Pufferzusätze  $\beta$ -Mercaptoethanol und Glycerin) in 50 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 8,0) bei 15 °C durch photometrische Messungen mit 2 mM  $\text{NAD}^+$  bei 40 °C im Mikrotiterplattenmaßstab ermittelt. Die Bestimmung erfolgte im Dreifachansatz als Mittelwert unter Angabe der Standardabweichung; der höchste gemessene Wert wurde auf 100 % normiert. (B) Verbleibende enzymatische Aktivität nach einer dreißigminütigen Inkubation von 50 nM Enzymlösung bei definierter Temperatur. Die Messung erfolgte analog der für (A) beschriebenen Vorgehensweise.  $T_{\text{stab}}$  wurde basierend auf einem Zweizustandsmodell der Proteinfaltung mit Hilfe von SigmaPlot berechnet.

Darüber hinaus wurden neun weitere kombinierte Cystein- und Methioninmutanten kloniert, analog zur wtBsADH in *E. coli* BL21 produziert und mittels SAC sowie SEC zur Homogenität gereinigt. Anhand enzymatischer Messungen wurden jeweils die Halbwertstemperatur ( $T_{\text{stab}}$ ) und die kinetischen Parameter für ausgewählte Varianten bestimmt (Tabelle 10). Von den Cysteinsubstitutionen wiesen die an den Positionen 35 oder 124 mutierten Varianten interessanterweise eine im Vergleich zu wtBsADH um 5,2 °C (C35S) bzw. um 1,7 °C (C124T) verringerte Halbwertstemperatur auf (Tabelle 10).

Der (de)stabilisierende Trend der jeweiligen Einzelmutationen bestätigte sich bei der Untersuchung der kombinierten Doppel- bzw. Tripelmutanten, bei welchen additive Effekte der jeweiligen Einzelaustausche beobachtet wurden. Der Austausch der innerhalb einer Turn-Struktur an der Grenzfläche der Untereinheiten A und B bzw. C und D lokalisierten Position M187 gegen Leucin resultierte mit einer um 10,7 °C verminderten Schmelztemperatur gegenüber BsADH(C257L) zu einer drastisch verringerten thermischen Stabilität und zeigte damit

von allen untersuchten Varianten den stärksten destabilisierenden Effekt. Eine nahezu unveränderte Halbwertstempertemperatur wurde hingegen bei der Substitution des räumlich nahe bei C257 befindlichen Rests M267 gegen Leucin ermittelt.

**Tabelle 10.** Halbwertstempertemperatur und enzymkinetische Parameter für die Oxidation von Ethanol sowie  $\omega$ -Hydroxylaurin-säure-Methylester ausgewählter Cys- sowie Met-substituierter BsADH-Varianten

	Produktion in <i>E. coli</i>	T <sub>stab</sub> [°C]	Ethanol				HLSMe			
			Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	K <sub>M</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	K <sub>M</sub> [μM]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
wtBsADH	+++	62,6	489	0,91	305	3,4 × 10 <sup>5</sup>	44	85,9	27,6	3,2 × 10 <sup>5</sup>
C35S	+++	57,4	558	-	-	-	16	-	-	-
C124T	+++	60,9	510	-	-	-	36	-	-	-
C257L	+++	65,3	614	1,5	365	2,4 × 10 <sup>5</sup>	55	100	34,3	3,4 × 10 <sup>5</sup>
C35S/C124T	+	57,1	559	-	-	-	20	-	-	-
C124T/C257L	+++	64,8	599	-	-	-	33	-	-	-
C35S/C257L	++	61,4	540	-	-	-	20	-	-	-
C257L/M187L	+++	54,6	317	-	-	-	88	-	-	-
C257L/M267L	++	65,6	463	0,73	270	3,7 10 <sup>5</sup>	90	106	46,0	4,3 × 10 <sup>5</sup>
C35S/C124T/ C257L	+	63,6	503	3,9	365	0,94 x 10 <sup>5</sup>	20	108	21,1	2,0x 10 <sup>5</sup>
C257L/M187L/ M267L	++	< 50	102	-	-	-	71	-	-	-

### 3.3.4 Semipräparative enzymatische Synthese von OLSMe mit Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung

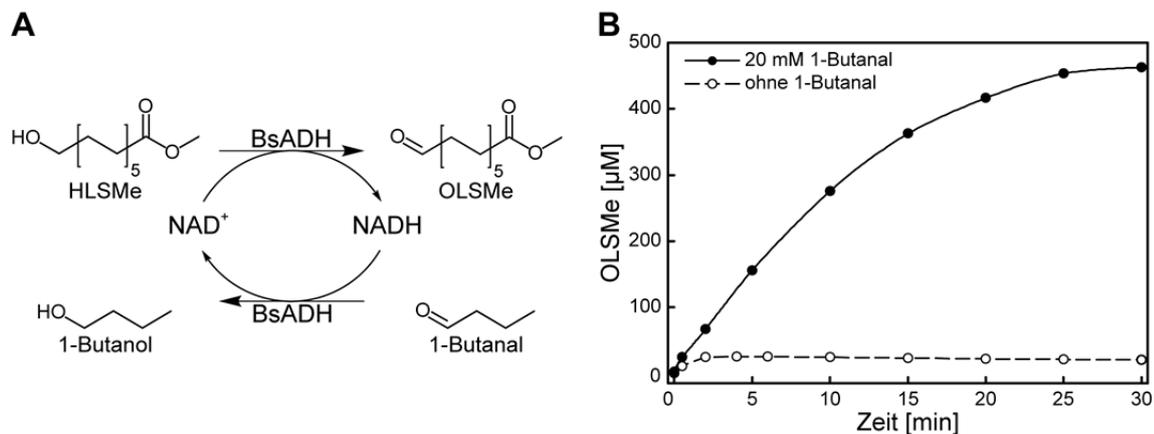
Wie bereits anhand der kinetischen Untersuchungen gezeigt, ist die Oxidation von HLSMe mit NAD<sup>+</sup> als Cofaktor thermodynamisch nicht begünstigt. Um die quantitative OLSMe-Bildung dennoch zu forcieren, wurde in dieser Arbeit eine Strategie zur gleichzeitigen Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts mit einhergehender Regenerierung von NAD<sup>+</sup> über ein zusätzliches Cosubstrat etabliert. Hierzu wurde ein leicht verfügbarer und zugleich gut wasserlöslicher kurzkettiger Aldehyd verwendet, welcher zum einen die Aktivität der BsADH im relevanten Konzentrationsbereich von bis zu 20 mM nur wenig beeinträchtigt und zum anderen ein hocheffizientes Substrat für die enzymkatalytische Regenerierung von NAD<sup>+</sup> darstellt. Der dabei lediglich in katalytischer Konzentration eingesetzte Cofaktor NAD<sup>+</sup> wird somit *in situ* erzeugt und damit das chemische Gleichgewicht auf die Bildung von OLSMe verlagert (Abbildung 30A).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorangegangenen kinetischen Charakterisierung stellen sowohl Ethanal (1085 U/mg) als auch 1-Propanal (1411 U/mg) sowie 1-Butanal prinzipiell vielversprechende Cosubstrate für die BsADH-gekoppelte Cofaktorregenerierung

dar. In Anbetracht ihrer niedrigen Siedepunkte (20 °C bzw. 49 °C) wurden die beiden erstgenannten Substrate für das hier angestrebte Demonstrationsexperiment nicht berücksichtigt, welches bei der für BsADH optimalen Temperatur von 60 °C durchgeführt werden sollte. Anstatt dessen wurde 1-Butanal (Siedepunkt 75 °C) als besser geeignetes Cosubstrat verwendet, gegenüber welchem BsADH trotz des Inhibitionsphänomens (vgl. Abbildung 27) bei der im Experiment verwendeten Konzentration von 20 mM dennoch eine sehr hohe spezifische Aktivität aufweist (370 U/mg).

Für die semipräparative enzymatische Biosynthese wurde 2 mM HLSMe (in DMSO) in 10 ml 0,1 M Hepes/NaOH (pH 8,0) gelöst; als Cosubstrate wurden dem Ansatz 20 mM 1-Butanal sowie 0,1 mM NAD<sup>+</sup> zugesetzt. Die Mischung wurde in einem Wasserbad auf 60 °C erwärmt und die Reaktion durch Zugabe von 30 nM der SEC-gereinigten BsADH-Variante C257L gestartet. Die Konzentrationen von Edukt und Produkt wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch GC bestimmt. Unter den beschriebenen Bedingungen wurden innerhalb von 30 min bis zu 23 % des eingesetzten Substrats HLSMe in OLSMe umgewandelt, was zu einer Produktkonzentration von annähernd 0,5 mM führte (Abbildung 30B). Dies entspricht einem katalytischen Gesamtumsatz (*Total Turnover Number*, TTN) von  $3,9 \times 10^3$  pro eingesetztem Enzymmonomer sowie einer vierfachen Regenerierung des NAD<sup>+</sup>-Cofaktors.

Aus der nahezu linearen Anfangsgeschwindigkeit wurde in diesem Biokatalyseansatz eine spezifische Aktivität von 27,5 U/mg ermittelt. Nach 30 min Reaktionszeit wurde keine weitere Produktzunahme beobachtet. In einem analog durchgeführten Experiment ohne Zusatz des Cosubstrats 1-Butanal stieg der Produkttiter dagegen schon nach zwei Minuten nicht weiter an. Die dabei erzielte vergleichsweise niedrige OLSMe-Konzentration von 25 µM entspricht einem Umsatz von bloß einem Prozent, was mit dem geringen Oxidationspotential von NAD<sup>+</sup> im Einklang steht. Interessanterweise wurde bei der Verwendung von HLSMe als Substrat in der GC-Analyse keine Überoxidation zu DDSMe beobachtet (vgl. Abschnitt 3.2.5). Wurden im Experiment jedoch 0,6 mM OLSMe mit äquimolaren Mengen an NAD<sup>+</sup> mit 20 mM 1-Butanal zur Cofaktorregenerierung eingesetzt, erfolgte innerhalb einer Stunde eine Überoxidation des Aldehyds zum Disäure-Monomethylester bei einem Umsatz von 2,5 %.



**Abbildung 30.** Biokatalytische Herstellung von  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester (OLSMe). (A) Reaktionsschema der substratgekoppelten Cofaktorregenerierung durch 1-Butanal. (B) Die Umsetzung von  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) durch BsADH(C257L) wurde sowohl mit als auch ohne durch 1-Butanal vermittelte Regenerierung des  $\text{NAD}^+$ -Cofaktors jeweils für 30 min verfolgt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,1 mM  $\text{NAD}^+$ , 30 nM SEC-gereinigtes Enzym sowie, in einem Fall, 20 mM 1-Butanal in 10 ml 0,1 M Hepes/NaOH (pH 8,0) mit 1 % (v/v) Dimethylsulfoxid als Cosolvens. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Edukt sowie Produkt extrahiert und mittels Gaschromatographie quantifiziert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Anwendungspotential der Enzyme aus dieser Arbeit für die biotechnologische Herstellung von ALS

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Oxidoreduktasen und deren Mutanten in Bezug auf die selektive Erzeugung der Polymervorläufer HLSMe und OLSMe ausgehend von (H)LSMe untersucht. Von den hier generierten Mutanten des Enzyms AlkB wies insbesondere die Punktmutante V129T verbesserte Eigenschaften gegenüber dem Wiltyp auf. So wurde in Messungen mit LSMe eine von 34 auf 45 % erhöhte Elektronentransfereffizienz sowie eine geringere Tendenz zur Überoxidation des primären Alkoholproduktes beobachtet. Zwar ist anhand dieser Ergebnisse im semiquantitativen Labormaßstab noch keine skalierbare Prognose hinsichtlich der Produktbildung unter Prozessbedingungen möglich, jedoch kann die hier beobachtete verbesserte HLSMe-Syntheseleistung dazu beitragen, die OLSMe-Konzentration im Bioprozess zu erhöhen und damit die von der Bildung des Aldehyds abhängige Transaminierung zu fördern. Durch die verbesserte Elektronentransferausbeute wird zusätzlich der Glucosebedarf in dem Ganzzellkatalysator für die Synthese von NADH reduziert, was die Prozessökonomie steigern sollte.

Um das gebildete HLSMe selektiv zu OLSMe weiterzuoxidieren, könnten die beiden in dieser Arbeit charakterisierten ADHs verwendet werden. Zwar katalysiert die nicht-kanonische Alkohol-Dehydrogenase AlkJ ebenso wie AlkB auch die unerwünschte Überoxidation zu DDSMe, jedoch findet bei AlkJ der zweite Oxidationsschritt in einer abgrenzbaren Reaktionsphase statt (s. Abbildung 20) und erfolgt zudem neunfach langsamer als die Oxidation von HLSMe zum Aldehyd. Die selektivere Oxidation des Alkoholsubstrats durch AlkJ eröffnet die Möglichkeit, die bei der biokatalytischen  $\omega$ -Funktionalisierung von LSMe generell auftretende Überoxidation durch das AlkBGT-System von *P. putida*, bei welcher in etwa gleiche Anteile an Aldehyd und Disäure entstehen (Schrewe *et al.*, 2013), einzudämmen. Allerdings weist AlkJ *in vitro* eine begrenzte Lagerstabilität auf, so dass der Einsatz dieses Enzyms nach derzeitigem Kenntnisstand auf einen rekombinanten Ganzzellbiokatalysator beschränkt ist – wie auch der des integralen Membranproteins AlkB.

Im Gegensatz zur enzymatischen Oxidation von HLSMe durch AlkB oder AlkJ wurde bei der Verwendung der BsADH aus *G. stearothermophilus* nur eine äußerst geringe Überoxidation des entstehenden Aldehyds zur Dicarbonsäure beobachtet. Die für BsADH bestimmte Affinität für das nicht-natürliche Substrat HLSMe ist mindestens doppelt so hoch, wie die für AlkB beschriebene Substrataffinität gegenüber seinem natürlichen Substratanalogon 1-Okten (Xie *et al.*, 2011), wodurch beim simultanen Einsatz von BsADH und AlkB die spezifische Alkoholoxidation durch BsADH begünstigt werden sollte. Als zusätzlicher Vorteil würde die Integration der BsADH in das Biokatalysator-Ensemble bei der Oxidation von HLSMe zu OLSMe die Regenerierung von NADH ermöglichen, welches bei der Hydroxylierung von

LSMe durch AlkB wiederverwendet werden kann, und somit in der Gesamtbilanz die Belastung des Zellmetabolismus verringert. Zudem eröffnet die in dieser Arbeit weiter verbesserte Stabilität gegenüber hohen Temperaturen sowie Lösungsmitteln die Möglichkeit, BsADH auch bei extremen Reaktionsbedingungen im Ganzzellsystem sowie *in vitro* einzusetzen.

## 4.2 Molekulare Optimierung der Alkanmonooxygenase AlkB

Der technische Einsatz von Oxygenasen ist sowohl aus ökonomischer Sicht als auch aus Gründen der Nachhaltigkeit eine vielversprechende Alternative zu klassischen Metallkatalysatoren für die Funktionalisierung von wenig reaktiven C-H Verbindungen in der synthetischen Chemie (Staudt *et al.*, 2013). Bisher sind jedoch die meisten charakterisierten Enzymsysteme nur bedingt für eine industrielle Verwendung geeignet, wobei hier oftmals deren geringe Stabilität unter Prozessbedingungen (Julsing *et al.*, 2008) oder die zum Teil unvorteilhaften Produktspezifität (Dror & Fishman, 2012) von Bedeutung sind. Bei der biotechnologischen Herstellung von ALSMe wurde insbesondere die Überoxidation des Substrats durch die verwendete Monooxygenase AlkB als Hindernis für eine industrielle Umsetzung des Reaktionsprinzips postuliert (Schrewe *et al.*, 2013). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Erhöhung der Produktspezifität von AlkB durch *Protein-Engineering* angestrebt.

Bei der rekombinanten Herstellung von AlkB in *E. coli* wurde katalytisch aktives Enzym nach fünf Stunden Produktionszeit ausschließlich in der Zellmembran nachgewiesen. In den nach der Zellyse abgetrennten Zelltrümmern befindliches AlkB zeigte keine enzymatische Aktivität gegenüber *n*-Octan (nicht gezeigt), weshalb es sich bei dem sedimentierten Anteil von AlkB wahrscheinlich um missgefaltetes Protein handelt. Die Aggregation eines Teils des synthetisierten AlkB könnte durch die im Laufe der Genexpression zunehmend mit AlkB-Molekülen gesättigte bakterielle Cytoplasmamembran begünstigt werden, was die Insertion weiterer Membranproteine erschwert und damit die Entstehung von Einschlusskörpern fördert, wie auch in anderen Arbeiten zu Membranproteinen beobachtet (Miroux & Walker, 1996; Padan *et al.*, 2003; Butzin *et al.*, 2010).

Darüber hinaus beeinträchtigt die Überladung der Zellmembran bei der Überexpression von Membranproteinen zusätzlich die Funktionalität der bakteriellen Atmungskette (Wagner *et al.*, 2007), was zu einem verlangsamtem Wachstum und damit einhergehend geringeren Proteinausbeuten führen kann. In der Tat wurde bei der bakteriellen Herstellung von AlkB im Vergleich zur Produktion der lediglich peripher membranassoziierten Alkohol-Dehydrogenase AlkJ sowie der cytoplasmatisch lokalisierten BsADH deutlich weniger Zellmasse nach fünf Stunden Genexpression erhalten (nicht gezeigt).

Für die Solubilisierung von AlkB aus der präparierten Zellmembran wurden in der vorliegenden Arbeit die in vorausgegangenen Studien beschriebenen nichtionischen Detergenzien DDM sowie C12E8 verwendet (Alonso & Roujeinikova, 2012). In beiden Fällen wurde AlkB im Prinzip erfolgreich aus der Lipiddoppelschicht gelöst und anschließend durch SAC zur Homogenität gereinigt. Beim Einsatz von C12E8 waren jedoch die Ausbeuten geringer, da trotz optimierter Bedingungen der Großteil von AlkB zusammen mit unsolubiliertem oder während der Solubilisierung denaturiertem Protein sedimentiert wurde. Bei der Verwendung von DDM wurden nach der SAC bis zu 2 mg AlkB aus zwei Litern Kultur erhalten, welches allerdings im Vergleich zu frischen AlkB-haltigen Zellextrakten lediglich zwei Prozent Restaktivität aufwies. Da AlkB sowohl aliphatische als auch zyklische Kohlenwasserstoffe umsetzt (McKenna & Coon, 1970), könnte die Inaktivierung von AlkB während der Solubilisierung auf eine irreversible Bindung von DDM im aktiven Zentrum zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung könnte die für eine erfolgreiche Solubilisierung notwendige hohe Detergenzkonzentration sein, was gleichzeitig zu einer Denaturierung des Enzyms führt.

Auch Versuche, AlkB durch andere publizierte Reinigungsstrategien unter Verwendung des Detergenz Lauryldimethylaminoxid (Xie *et al.*, 2011) oder nativ in Form Ultraschall-induzierter Membranvesikel anzureichern (Shanklin *et al.*, 1997) führten nicht zur erfolgreichen Reinigung (Dr. Stefan Gilch und Dr. Lukas Eisoldt, persönliche Mitteilung). Interessanterweise wurden diese publizierten Reinigungsvorschriften auch innerhalb derselben Arbeitsgruppe im Rahmen nachfolgender Studien umfänglich abgeändert (Xie *et al.*, 2011; Alonso & Roujeinikova, 2012) oder konnten von anderen Arbeitskreisen nicht reproduziert werden (Naing *et al.*, 2013). Aufgrund der geringen Erfolgswahrscheinlichkeit, AlkB durch Solubilisierung in funktionellem Zustand zur Homogenität zu reinigen, wurde in dieser Arbeit die angereicherte Membranfraktion für die Aktivitätsmessung von AlkB und dessen Mutanten eingesetzt.

Bei der Messung der AlkB-Aktivität anhand des NADH-Verbrauchs zeigte sich eine endogene Hintergrundoxidation von NADH durch Enzyme der *E. coli*-Membran. Diese wurde für die Bestimmung der durch AlkBGT genutzten Menge an Elektronen berücksichtigt. Jedoch wurden die durch GC identifizierbaren terminalen Oxidationsprodukte der für *E. coli* BL21 xenogenen Substrate *n*-Octan und LSMe nur in Gegenwart von AlkG und AlkT nachgewiesen (s. Abbildung 8B). Der instrumentelle GC-Nachweis gestattet also in Kombination mit dem photometrischen NADH-Assay trotz Verunreinigung der AlkB-Präparation die Ermittlung der enzymatischen Aktivität und letztlich der Elektronentransfereffizienz von AlkB.

Sowohl bei der Oxidation von *n*-Octan als auch bei der des Alkanderivats LSMe wurde in dieser Arbeit eine Entkopplung des NADH-Verbrauchs von der Produktbildung analog zu der

von Gorsky *et al.*, (1984) postulierten Oxidase-Nebenaktivität von Monooxygenasen beobachtet, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. So wurde für *n*-Octan als einem für *P. putida* GPo1 physiologischen Substrat (McKenna & Coon, 1970) eine Kopplungseffizienz von 61 % bestimmt, wohingegen bei dem industriell relevanten Zielsubstrats LSMe nur 33 % der verbrauchten Elektronen effektiv für die Funktionalisierung des Alkanderivats genutzt wurden. Es ist bekannt, dass nicht zur Hydroxylierung verwendete Reduktionsäquivalente auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, welcher zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert wird (Lee, 1999), was wiederum den Biokatalysator selbst beeinträchtigen kann. Die stöchiometrische Kopplung zwischen NADH-Verbrauch und Oxidation des Substrats, welche von der Wechselwirkung des Substrats mit der Bindetasche des Enzyms abhängt, ist für die Effizienz der enzymatischen Reaktion entscheidend und liegt oftmals unter 10 % (Hollmann *et al.*, 2010).

Tatsächlich wurde bei der Hydroxylierung von anderen nicht-natürlichen Substraten durch die eingehend charakterisierte Monooxygenase CYP102 (P450 BM3) aus *Bacillus megaterium* eine im Vergleich zu AlkB noch stärkere Entkopplung beobachtet (Whitehouse *et al.*, 2012). Für die Oxidation von Phenanthren wurde eine Kopplung von lediglich 1 % bestimmt (Carmichael & Wong, 2001), wohingegen die Kopplungseffizienz gegenüber Naphthalin immerhin 5 % betrug (Li *et al.*, 2001). Eine deutlich höhere Elektronentransfereffizienz wurde mit demselben Enzym für Propan erzielt, wo der Prozentsatz an produktiv genutzten Elektronen durch strukturbasierte Evolution sogar von 17 auf 98 % gesteigert werden konnte (Fasan *et al.*, 2007).

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit war keine experimentelle 3D-Struktur von AlkB oder eines eng verwandten Enzyms mit demselben Reaktionstyp verfügbar. Kenntnisse hinsichtlich des enzymatischen Reaktionsmechanismus (Cooper *et al.*, 2012; Bertrand *et al.*, 2005) wie auch des Substratspektrums von AlkB (McKenna & Coon, 1970; van Beilen *et al.*, 1994) gründeten auf biochemischen Untersuchungen. Das in dieser Arbeit für die Planung von Mutationen angefertigte Topologiemodell basiert auf der Klassifizierung lipophiler Primärstrukturbereiche von AlkB, die vermutlich mit der Lipiddoppelschicht der inneren Zellmembran von *E. coli* interagieren, sowie auf durch Zufallsmutagenese identifizierten Aminosäurepositionen, welche die enzymatische Aktivität des Enzyms beeinflussen. Die zunächst mit Hilfe des TMHMM-Servers erhaltene Topologievorhersage wurde unter Berücksichtigung der bislang verfügbaren Anhaltspunkte zur Orientierung der TMHs von AlkB modifiziert (van Beilen *et al.*, 1992b). Da der für die Vorhersage verwendete Algorithmus lediglich zwischen innerhalb und außerhalb der Membran gelegenen Aminosäurepositionen unterscheidet, nicht aber membranassoziierte Abschnitte unabhängig von TMHs erkennt, wurden ausschließlich TMHs mit einem Bestimmtheitsmaß von 1,0 als solche gewertet; der Verlauf der Polypeptidkette bei den beiden weiteren hydrophoben nicht-TMH-Segmenten wurde als entsprechend jeweils nicht membrandurchspannend weiterinterpretiert (Melén *et al.*, 2003). Die gemäß TMHMM-Vorhersage in den sechs THMs

befindlichen Aminosäuren entsprechen dem anhand von Kristallstrukturen bestimmten Verteilungsmuster von Aminosäuren in TMHs (Ulmschneider *et al.*, 2005). Beide Termini von AlkB liegen laut diesem Topologiemodell im bakteriellen Cytoplasma, was auch für 57 % aller Membranproteine der inneren Zellmembran des Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* zutrifft. (Daley *et al.*, 2005). Die Anzahl von sechs membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices stellt dabei das am zweithäufigsten postulierte Motiv der Membranverankerung – nach den zwölf-THMs-umfassenden Transmembranproteinen – dar (von Heijne, 2006).

Im Gegensatz zu den weit verbreiteten CYP-P450-Monooxygenasen, bei welchen die Bindung des katalytisch aktiven Eisenions über vier äquatorial angeordnete freie Stickstoff-Elektronenpaare des Häm-Cofaktors sowie einen axial positionierten, konservierten Cysteinrest geschieht (Graham & Peterson, 1999), erfolgt die Koordinierung der Eisenionen in AlkB direkt durch die Aminosäureseitenketten der Polypeptidkette. Das hierfür in AlkB mitverantwortliche acht-Histidin-Motiv (s. Abbildung 4), welches in der vorliegenden Arbeit zumindest teilweise bestätigt wurde, wurde neben AlkB auch in weiteren Membranenzymen, unter anderem bei Desaturasen (Hashimoto *et al.*, 2008; Sayanova *et al.*, 1997), Epoxidasen sowie Acetylasen identifiziert (Shanklin & Cahoon, 1998). Dabei sind die einzelnen Histidin-Cluster in den verschiedenen Enzymen durch jeweils ähnlich lange Sequenzabschnitte voneinander getrennt und folgen stets auf einen dem Cytoplasma zugewandten hydrophoben THM-Sequenzabschnitt, so dass alle Eisenionen-koordinierenden Aminosäurecluster auf der cytoplasmatischen Grenze der Lipiddoppelschicht positioniert und dadurch räumlich eng benachbart sind. Zusätzlich zu den acht in AlkB an der Bindung von Eisen beteiligten Histidinresten wurde auch Asp181 als katalytisch essentiell beschrieben und ist daher vermutlich, neben weiteren noch unbekanntem Positionen, ebenfalls an der Koordination der Eisenionen beteiligt (Shanklin & Whittle, 2003).

Gemäß den durch Alanin-Scanning identifizierten Metall-komplexierenden Aminosäuren wird die Eisenbindung bei AlkB vorwiegend durch Histidine bewirkt (Shanklin *et al.*, 1994), analog zu mononuklearen eisenhaltigen nicht-Häm-Enzymen wie der Isopennicillin-N-Synthase (Lange & Que Jr, 1998), der Methylphosphonat-Synthase (Cooke *et al.*, 2012) oder der erst kürzlich entdeckten Oxidase UndA (Rui *et al.*, 2014). Dies steht im Gegensatz zu anderen nicht-Häm-Monooxygenasen, wie etwa der löslichen Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Whittington & Lippard, 2001, PDB 1FZ1), bei welcher die Koordination der katalytisch relevanten Eisenionen durch vier Glutamatseitenketten zusammen mit zwei Histidinresten erfolgt. Bei der bislang weniger eingehend charakterisierten, ebenfalls membrangebundenen Methan-Monooxygenase aus *Methylocystis sp.* hingegen ist das für die katalytische Aktivität verantwortliche binukleare Kupferzentrum bloß durch drei Histidine stabilisiert (Smith *et al.*, 2011).

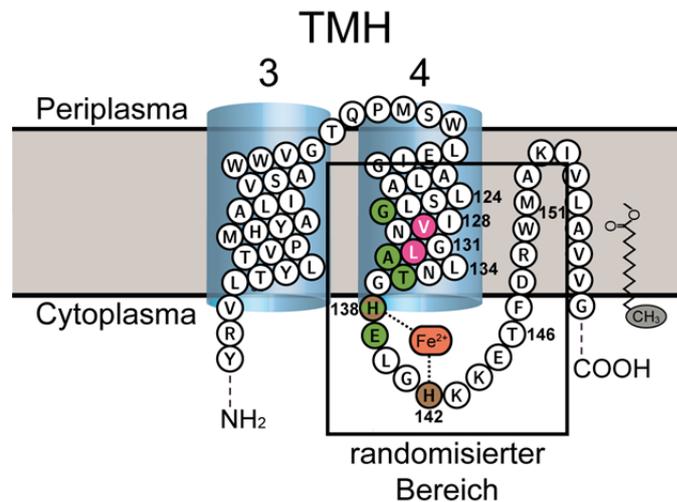
Als für die Bindung des ungesättigten Alkanderivats Palmitoleinsäure verantwortlich wurden bei der Alkanhydroxylase BM3 aus *Bacillus megaterium* vor allem hydrophobe Kontakte zwischen der Kohlenstoffkette des Substrats und unpolaren Aminosäureseitenketten des Substrattunnels ausgemacht (Li *et al.*, 2001), wobei eine zusätzliche Koordinierung der Carboxylatgruppe über polare Wechselwirkungen mit Tyrosin/Arginin erfolgt (Li & Poulos, 1997). Auch die bei AlkB wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligten hydrophoben Aminosäuren Trp55, Val129, Leu132 sowie Ile233 liegen innerhalb von lipophilen TMH-ausbildenden Sequenzabschnitten, so dass die Positionierung des Substrats auch hier mittels hydrophober Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten innerhalb der von den TMHs gebildeten Substratbindetasche stattfinden kann (Rojo, 2005). Zusätzlich könnte die Orientierung von LSMe im Substratkanal durch Wechselwirkung der Carboxylestergruppe mit ebenfalls innerhalb der Lipiddoppelschicht lokalisierten polaren Seitenketten, wie etwa Tyr99, Ser125 oder Thr136 begünstigt werden (s. Abbildung 31)

Die hier beschriebene Anordnung von in der Zellmembran und dem Cytoplasma lokalisierten Sequenzabschnitten sowie den essentiellen mit dem Substrat interagierenden Aminosäuren gibt einen Überblick über den Anteil an für die Membranverankerung verantwortlichen sowie potentiell für die katalytische Aktivität von AlkB relevanten Bereiche. Allein ausgehend von der Primärstruktur kann jedoch keine Vorhersage über das durch lokale Konformationen beeinflussbare tatsächliche Zusammenwirken der TMHs getroffen werden (von Heijne, 2006). Dabei kann auch nicht abgeschätzt werden, ob es sich bei den beiden weiteren hydrophoben und vermutlich membranassoziierten Sequenzabschnitten um in die Membran reichende Loops, wie etwa bei Synaptotagmin (Herrick *et al.*, 2006), oder um innerhalb der Zellmembranebene lateral angeordnete hydrophobe Helices handelt, wie im Fall der NADH-Dehydrogenase (Zickermann *et al.*, 2015). Das hier erstellte Topologiemodell stellt somit eine Zwischenstufe zwischen der Aminosäuresequenz und der gefalteten 3D-Struktur von AlkB dar, auf deren Basis rationale Substitutionen sowie partielle Randomisierungen erfolgten.

Der Austausch der  $\beta$ -verzweigten Aminosäure Valin an Position 129 gegen Methionin führte bei nahezu unveränderter Kopplungseffizienz zu einer verminderten Aktivität gegenüber LSMe von 62 %. Da diese Mutation in einer früheren Studie eine erhöhte Aktivität gegenüber *n*-Butan bewirkte (Koch *et al.*, 2009) liegt es nahe, dass die Einführung des Methionins dazu beiträgt, die Substratbindetasche zu verkleinern. Einen weitaus größeren Effekt auf die enzymatische Aktivität hatte der Austausch L132V. Die Kürzung der Seitenkette um lediglich eine Methylengruppe führte hier zu einem drastischen Verlust der Enzymaktivität gegenüber LSMe. Da diese Substitution ebenfalls in einer Steigerung der Aktivität gegenüber kurzkettigen Alkanen resultiert (Koch *et al.*, 2009) kann vermutet werden, dass die Verkleinerung der Seitenkette eine konformelle Änderung in der Nähe des Substratkanals bewirkt, was die Bindung kürzerer Substrate begünstigt.

Die Mutation T136A resultierte sowohl gegenüber LSMe als auch gegenüber *n*-Octan in verringerter Aktivität sowie niedrigerer Kopplungseffizienz. Dies könnte einerseits auf einen durch die Seitenkettenkürzung bedingten Verlust von Wechselwirkungen bei der Substratbindung zurückzuführen sein, andererseits auf eine Destabilisierung der Sekundärstruktur z.B. durch veränderte H-Brücken. Durch Austausch des Aspartats an Position 175 gegen Alanin sank die Aktivität von AlkB sogar auf 25 %, was durch Konformationsänderung des Peptidrückrats ausgelöst werden könnte. Eine weitere Erklärung liegt in der potentiellen Beteiligung von Asp175 an der Koordinierung eines der katalytisch essentiellen Eisenionen, wie sie für das benachbarte Asp181 bereits nachgewiesen worden ist (Shanklin & Whittle, 2003). Die Mutation des nahe dem dritten Histidin-Clusters befindlichen Pro310 zu Alanin führte zu einem nahezu kompletten Funktionsverlust des Enzyms (3 % Restaktivität), was darauf hindeutet, dass diese Position für die katalytische Funktion oder Faltung von entscheidender Relevanz ist. In Anbetracht der die Aktivität beeinflussenden Aminosäurepositionen 129, 132 sowie 136 (s.o.) in Verbindung mit den vorhandenen Literaturdaten wurde die Region um die vierte TMH von AlkB einschließlich des benachbarten Histidin-Clusters (AS 119 – 151) für eine Randomisierung mittels *Error-Prone* PCR ausgewählt.

Die bei der lokalen Randomisierung ermittelten Aminosäurepositionen (s. **Tabelle 5**), bei denen eine deutliche Änderung der enzymatischen Aktivität beobachtet wurde, befinden sich vorwiegend in dem vorhergesagten Transmembranbereich (AS 119 – 137) sowie im Übergang zum ersten Histidin-Cluster (Abbildung 31). Die Mutationen liegen nahe den bereits bekannten an der Substraterkennung beteiligten Aminosäuren V129 sowie L132 (Koch *et al.*, 2009), weniger in dem ebenfalls randomisierten, dem Histidin-Cluster folgenden Sequenzabschnitt (AS 139 – 151). Dies stützt die Annahme, dass die zur Mutagenese ausgewählte Transmembranhelix maßgeblich an der Bindung und Positionierung des Substrats beteiligt ist, wohingegen der Übergang vom His-Cluster zum folgenden hydrophoben Sequenzabschnitt von geringerer Bedeutung für die katalytische Funktionalität zu sein scheint. Die bereits bei Shanklin & Whittle (2003) als für die enzymatische Aktivität essentiell charakterisierte Position His138 wurde in der vorliegenden Arbeit als für die Hydroxylierung von LSMe durch AlkB notwendig bestätigt. Eine Substitution gegen die Aminosäuren Cystein oder Tryptophan führte zu einem kompletten Ausfall der Enzymaktivität (s. **Tabelle 5**), was sehr wahrscheinlich dem Verlust der für die Eisenkoordinierung wichtigen Imidazolfunktionalität geschuldet ist.



**Abbildung 31.** Lage der durch Randomisierung erhaltenen aktivitätsrelevanten Positionen im AlkB-Topologiemodell. Der Verlauf des relevanten Abschnitts der Polypeptidkette innerhalb der Lipiddoppelschicht der inneren bakteriellen Zellmembran ist im Einbuchstabencode skizziert, wobei die Transmembranhelices drei und vier mit blauen Zylindern gekennzeichnet sind. Positionen, die eine deutliche Veränderung der Enzymaktivität bewirken sind grün eingefärbt. Die bereits für die Substratbindung als verantwortlich beschriebenen Positionen V129 sowie L132 sind pink hervorgehoben, die für die katalytische Aktivität essentiellen Reste His138 und His142 sind braun hinterlegt. Das industriell relevante Alkanderivat Laurinsäure-Methylester ist in seiner vermuteten Positionierung innerhalb der Lipiddoppelschicht dargestellt und dessen terminale Methylgruppe markiert.

Da die lokale Randomisierung von AlkB zu keiner verbesserten Mutante führte, wurden im Folgenden die bereits für die Substratbindung relevant beschriebenen Positionen V129, L132 wie auch die in dieser Studie schon durch Alaninmutagenese adressierte Position T136 unter Verwendung von NNS-Codons mutiert. Mit zunehmender Nähe der mutagenisierten Position zum benachbarten Histidin-Cluster stieg die Tendenz, durch einen Aminosäuretausch die Enzymfunktion negativ zu beeinträchtigen. So wurde bei der Analyse der an Position 129 randomisierten Klone bei 30 % keine enzymatische Aktivität gegenüber LSMe festgestellt. Die Randomisierung der dem aktiven Zentrum näher gelegenen Position 132 führte bei 56 % der analysierten Klone zu keiner detektierbaren Produktbildung, wohingegen bei der unmittelbar vor dem Histidin-Cluster gelegenen Position T136 bei 75 % der Mutanten keine Oxidationsprodukte von LSMe nachgewiesen wurden. Mit verringerter Distanz zu dem für die enzymatische Aktivität essentiellen Rest His138 nimmt die Toleranz der Aminosäurepositionen gegenüber Substitution somit deutlich ab, was darauf hindeutet, dass His138 durch die über die N-terminal benachbarten Reste vorgegebene Konformation des Peptidrückrats für die Eisenbindung im aktiven Zentrum entscheidend positioniert wird.

Von allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten AlkB-Varianten zeigte die durch ortsspezifische Sättigungsmutagenese generierte Mutante V129T die im Vergleich zu wtAlkB deutlichste Verbesserung. Durch Einbringung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in der ansonsten vorwiegend durch hydrophobe Reste dominierten Transmembranregion konnten sowohl die Elektronentransfereffizienz als auch die Bildung des Alkoholintermediats HLSMe

derart optimiert werden, dass diese Mutante hohes Potential für eine industrielle Nutzung birgt. Während eine Vergrößerung der Aminosäureseitenkette an dieser Position durch Methionin zu einer höheren Aktivität gegenüber *n*-Butan führt (Koch *et al.*, 2009), führt die durch den Austausch gegen Threonin vermittelte Erhöhung der Hydrophilie in unmittelbarer Nähe zu der vermuteten Bindestelle für die polare LSMe-Carbonsäureesterfunktion offenbar zu einer verbesserten HLSMe-Ausbeute, womöglich bedingt durch eine verbesserte Positionierung des Substrats über H-Brücken.

Eine umfassende kinetische Charakterisierung der Überoxidation des entstehenden Alkoholintermediats *in vitro* wurde durch die nur schwierig standardisierbaren exogenen Reaktionsparameter kompliziert. So sind in wässrigem Puffer bei 25 °C lediglich max. 250 µM O<sub>2</sub> gelöst, was – wie bereits in einer früheren Arbeit beschrieben (Gudimichi *et al.*, 2012) – zur Limitierung der enzymatischen Reaktion durch den als Cosubstrat benötigten gelösten Sauerstoff führen kann. Tatsächlich wurde bei Messungen der LSMe-Oxidation über einen Zeitraum von 60 min mit in Membransuspensionen angereichertem rekombinanten AlkB nicht mehr als 500 µM Gesamtumsatz erreicht. Zusätzlich wird der Sauerstoffgehalt während des Assays durch die Hintergrundaktivität der in der Membransuspension ebenfalls enthaltenen bakteriellen Atmungskette weiter verringert (vgl. Abbildung 8A). Hier wird für die Monooxygenasereaktion notwendiges NADH mit molekularem Sauerstoff zu Wasser reduziert und damit den (Co)Substratpool für die AlkB-Reaktion entscheidend geschmälert. Der Sauerstoffgehalt wird nur allmählich durch das Nachlösen von atmosphärischem O<sub>2</sub> aufgefüllt, was eine exakt reproduzierbare Quantifizierung der Reaktion erschwert. Die aufgrund der individuell optimalen Lagertemperatur oftmals einen unterschiedlichen O<sub>2</sub>-Sättigungsgrad aufweisenden Stammlösungen verstärken diese Problematik. Da die Sauerstoffkonzentration entscheidenden Einfluss auf sowohl die Aktivität als auch die Selektivität von Monooxygenasereaktionen hat (Schneider *et al.*, 1999), kann damit in dieser Arbeit keine endgültige Aussage über den Einfluss der Mutation V129T getroffen werden.

Die Langzeitcharakterisierung der LSMe-Oxidation durch AlkB wurde zudem durch die geringe Stabilität der Rubredoxin-Reduktase AlkT eingeschränkt (Ueda & Coon, 1972). Zwar zeigte das rekombinante und mittels SAC gereinigte Enzym hohe Aktivität gegenüber *P. putida* AlkG (vgl. Abbildung 7), jedoch präzipitierte ein Teil der Enzympräparation bereits in der ersten Stunde nach der Elution von der Affinitätsäule. Diese allmähliche Inaktivierung findet vermutlich bei der Verwendung von AlkT im AlkBGT-Assay unter suboptimalen Pufferbedingungen (d.h. ohne β-Mercaptoethanol und Glycerin, vgl. Abschnitt 3.1.3) weiter statt und beeinflusst damit die Reaktion.

Das Ausmaß der AlkB-vermittelten Überoxidation von Alkanen wird zudem von der Verfügbarkeit des jeweiligen Substrats sowie der daraus entstehenden Intermediate signifikant mitbeeinflusst. So wurde bei der Oxidation von *n*-Octan durch AlkB *in vivo* ein wesentlich

geringerer Anteil an Carbonsäure erhalten als bei der Umsetzung von *n*-Dodekan (Grant *et al.*, 2011). Die verringerte Tendenz zur Überoxidation von *n*-Octan wurde dabei dem effizienteren Substratnachschieb aufgrund der höheren Löslichkeit von *n*-Octan im Reaktionsmedium wie auch im Cytoplasma des Wirtsbakteriums zugeschrieben. Die geringere Permeabilität der *E. coli*-Zellmembran für länger-kettige Kohlenwasserstoffe, wie z.B. LSMe, trägt zu dem Unterschied noch bei (Julsing *et al.*, 2012). Ein solcher Effekt wurde auch bei der enzymatischen  $\omega$ -Oxidation von *n*-Dodekan durch AlkB beobachtet, wo die Konzentration des bei der zur Ganzzellbiotransformation verwendeten, die Substratverfügbarkeit entscheidend verbessernden Cosolvens DMSO die Überoxidationsrate in hohem Maße beeinflusste (Grant *et al.*, 2012).

Da bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt aufgrund fehlender strukturbiologischer Daten keine Evidenz zur genauen Lokalisierung des aktiven Zentrums oder zur Substratpositionierung in AlkB vorliegt, sind zukünftige Ansätze, AlkB hinsichtlich Substratspezifität oder Kopplungseffizienz zu optimieren ebenfalls auf biochemische Untersuchungen angewiesen. Eine Optimierung von AlkB scheint deshalb am ehesten durch kombinatorisches *Protein-Engineering* in Verbindung mit einer effizienten Durchmusterungsstrategie der generierten Mutanten möglich (Chen *et al.*, 2012). Dabei wird im Fall von AlkB die Durchmusterungskapazität vor allem durch die zur Analyse der Überoxidation notwendige instrumentelle Analytik durch GC eingeschränkt, da anhand des photometrisch bestimmbareren NADH-Verbrauchs allein keine Aussagen zur Elektronentransferausbeute sowie der Überoxidationstendenz getroffen werden kann.

Durch Optimierung des Temperaturprogrammes wurde in der vorliegenden Arbeit die ursprüngliche Zeit pro GC-Lauf zwar von 24 min auf 17 min verkürzt, was für die Analyse von 96 Klonen allerdings dennoch eine im Vergleich zu einfachen photometrischen Aktivitätstests erheblich verlängerte Analysezeit von insgesamt 27 h mit sich bringt. Da der Probendurchsatz neben der bloßen GC-Laufzeit auch durch die zeitintensive Probenextraktion und -derivatisierung limitiert wird, könnte ein geeigneter photometrischer Assay dazu beitragen, die Durchmusterungsrate – und damit auch die Wahrscheinlichkeit, einen vorteilhaften Austausch nachzuweisen – erheblich zu steigern. Um dabei selektivere Enzymvarianten von lediglich weniger aktiven oder schlechter exprimierten Varianten abgrenzen zu können, ist eine parallele Erfassung der NADH-Oxidationsrate durch AlkBGT notwendig. Das während des NADH-Assays gebildete Überoxidationsprodukt DDSMe könnte beispielweise anschließend über einen spezifischen photometrischen Nachweis, wie z.B. über einen pH-Indikator (Yu *et al.*, 2011), quantifiziert werden. Alternativ könnte die Bestimmung der freien Säure DDSMe – wie in der klinischen Chemie gebräuchlich – durch Kopplung mit einer Acyl-CoA-Synthase in Verbindung mit einer Acyl-CoA-Oxidase erfolgen, wobei das bei der Fettsäureoxidation stöchiometrisch gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch einen chromogenen Peroxidase-Assay gemessen wird (Okabe *et al.*, 1980).

Eine weitere Möglichkeit, mehrere AlkB-Mutanten parallel zu charakterisieren, stellt die miniaturisierte Biotransformation mit ganzen Zellen unter Verwendung des pBT10-Plasmids (Schrewe *et al.*, 2011) dar, auf welchem sowohl das Drei-Komponenten-Hydroxylasesystem *alkBGT*, als auch das die zelluläre Resorption von LSMe fördernde Porin *alkL* codiert sind. Die parallele Untersuchung von Ganzzellbiotransformationen ist für die industrielle Biotechnologie generell von hohem Interesse und wird aufgrund der beim Einsatz von Mikrotiterplatten auftretenden zellphysiologischen Limitierungen in der Regel in Parallelf fermentern (Bareither & Pollard, 2011) oder miniaturisierten Rührkesselreaktoren durchgeführt (Weuster-Botz, 2005). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde eine optimierte Vorgehensweise zur Untersuchung der Oxidation von *n*-Dodekan durch AlkBGT in 24-Well Mikrotiterplatten beschrieben, wo bei der Miniaturisierung vorkommende Einschränkungen, wie ein veringertes Sauerstoffeintrag oder limitierender Substrattransfer, den Prozessbedingungen angepasst werden konnten (Grant *et al.*, 2012). Aufgrund der Ähnlichkeit der Substrate birgt diese Strategie folglich auch für die Charakterisierung von AlkB-Mutanten hinsichtlich LSMe erhebliches Potential.

Die Prozessökonomie bei der biokatalytischen Oxidation von LSMe durch AlkB wird – wie in dieser Arbeit gezeigt – durch die Entkopplung der NADH-Oxidation von der Substratoxidation negativ beeinflusst. Des Weiteren führt die Überoxidation zu DDSMe zum unproduktiven Verbrauch von LSMe wie auch NADH. Trotz dieser Einschränkungen stellt dieses Enzym einen gut geeigneten Ausgangspunkt für die Entwicklung eines biokatalytischen Hydroxylierungssystems für Alkane dar. Denn im Gegensatz zu P450-Monooxygenasen, denen vorwiegend die Hydroxylierung von hydrophoben Xenobiotika in der zellulären Phase-I Detoxifizierung zugeschrieben wird (Iyanagi, 2007), scheint die physiologische Funktion von AlkB *per se* vorwiegend in der terminalen Aktivierung von Kohlenwasserstoffen zur Energiegewinnung über  $\beta$ -Oxidation zu liegen (Coon, 2005). Aufgrund der damit verbundenen, bisher von anderen Monooxygenasen unerreichten Regioselektivität für die  $\omega$ -Hydroxylierung von Alkanen (Koch *et al.*, 2009) besitzt AlkB hohes Potential für den industriellen Einsatz, wohingegen das Anwendungspotential anderer Oxygenasen unter anderem wegen der gebildeten Vielzahl an oxidierten Nebenprodukten eingeschränkt ist (Feenstra *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit generierte AlkB-Mutante V129T stellt einen Ansatzpunkt für eine Verbesserung der Prozessökonomie dar, jedoch sind weitere Optimierungen wünschenswert, um die Kopplungseffizienz sowie die Substratselektivität von AlkB durch *Protein-Engineering* weiter zu steigern.

### 4.3 Biotechnologische Synthese von Aldehyden mit AlkJ

Im Gegensatz zu früheren Studien, bei welchen die angereicherte Zellmembranfraktion von *P. putida* oder transformierten *E. coli* zur Untersuchung von AlkJ verwendet wurden (Benson

& Shapiro, 1976; van Beilen *et al.*, 1992a), beschreibt die vorliegende Arbeit erstmalig die Reinigung des Enzyms zu elektrophoretischer Homogenität sowie dessen biochemische Charakterisierung. Anhand des isolierten rekombinanten Enzyms wurde durch spektroskopische Messungen gezeigt, dass AlkJ tatsächlich ein Flavoenzym ist, welches während der heterologen Synthese in *E. coli* effizient FAD inkorporiert und dieses auch während der Reinigung durch IMAC und SEC als prosthetische Gruppe fest bindet. Darüber hinaus gibt die vorliegende Arbeit den ersten experimentellen Hinweis, dass die durch AlkJ katalysierte Redoxreaktion über den Elektronenüberträger Ubichinon direkt an die bakterielle Atmungskette gekoppelt ist. Die enzymkinetische Untersuchung des Enzyms mit vier verschiedenen Alkoholsubstraten ergab eine breite Substrataffinität von AlkJ für langkettige *n*-Alkanole. Überraschenderweise ist AlkJ auch in der Lage, den bei der Oxidation des Alkohols entstehenden Aldehyd weiter zur Carbonsäure zu oxidieren, wenn auch mit deutlich verringerter Geschwindigkeit, was in der Ausprägung zweier deutlich getrennter Reaktionsphasen resultiert.

Trotz des Fehlens ausgeprägter hydrophober Sequenzbereiche in seiner Primärstruktur zeigte AlkJ hohe Affinität zur bakteriellen Zellmembran, weshalb das rekombinant produzierte Enzym mit dem milden nichtionischen Detergenz DDM aus der angereicherten Membranfraktion solubilisiert wurde. Versuche, AlkJ durch Absättigung der vermuteten elektrostatischen Interaktion zwischen Membran und Protein mittels hoher NaCl-Konzentrationen von der Membran loszulösen, blieben erfolglos. Die Affinität zur bakteriellen Zellmembran unterscheidet AlkJ von seinem nächstverwandten Enzym mit bekannter Kristallstruktur, der Cholin-Oxidase (CHOX) aus *Arthrobacter globiformis* (Quaye *et al.*, 2008). Obwohl beide Enzyme aufgrund ihrer ähnlichen Strukturelemente in die Enzymfamilie der Glucose-Methanol-Cholin-(GMC)-Oxidoreduktasen eingruppiert sind, differieren sie deutlich bezüglich ihrer subzellulären Lokalisierung, da CHOX als im bakteriellen Cytoplasma sehr gut lösliches Protein beschrieben wurde (Fan *et al.*, 2004). Bemerkenswerterweise enthält die Gruppe der GMC-Enzyme sowohl membranassoziierte Vertreter, wie die Polyethylenglycol-Dehydrogenase aus *Sphingopyxis terrae* (Kawai *et al.*, 1980) und die Glucose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* (Matsushita *et al.*, 1980), als auch cytoplasmatische Enzyme, wie die Format-Oxidase aus *Aspergillus oryzae* (Maeda *et al.*, 2009), was darauf hindeutet, dass das bei AlkJ für die Membraninteraktion ausschlaggebende Strukturelement nicht Teil der katalytischen oder für die Bindung des Cofaktors verantwortlichen Domänen ist.

Die Deletion der im Vergleich zu verwandten cytoplasmatischen GMC-Enzymen bei AlkJ C-terminal verlängerten Aminosäuresequenz führte nicht zur Aufhebung der Membranassoziation. Auch die katalytische Wirkung bezüglich HLSMe oder des Elektronenüberträgers Q<sub>1</sub> wurde durch die Verkürzung von AlkJ um 27 Aminosäuren nicht beeinträchtigt. Damit kann geschlossen werden, dass der C-terminale Abschnitt der Polypeptidkette weder an der Interaktion mit der prosthetischen Gruppe, noch dem Substrat, oder der Zellmembran beteiligt

ist. Für einen industriellen Einsatz von AlkJ sowie die weitere Charakterisierung des Enzyms könnte somit die in der vorliegenden Arbeit hergestellte verkürzte AlkJ-Variante verwendet werden, da diese eine verbesserte Ausbeute als wtAlkJ aufwies (vgl. Abschnitt 3.2.8) und somit eine ökonomischere Produktion dieses Enzyms ermöglicht.

Die nach der IMAC mittels SEC bestimmte Größe von AlkJ entspricht einer homodimeren Quartärstruktur, wahrscheinlich unter Assoziation mehrerer Detergenzmoleküle, was zeigt, dass die Solubilisierung aus der bakteriellen Zellmembran mit Hilfe von DDM die Wechselwirkung der beiden Monomere nicht negativ beeinflusst. Die pro AlkJ-Dimer bestimmte Anzahl von gebundenen DDM Molekülen (43) scheint gering verglichen mit der für integrale Membranproteine typischerweise ermittelten Menge (Møller & le Maire, 1993), was sich mit der Abwesenheit von erkennbaren Transmembransegmenten in der Aminosäuresequenz von AlkJ deckt und auf eine periphere Membranassoziation hindeutet. Dennoch erscheint die Lokalisierung an der bakteriellen Zellmembran von essentieller Bedeutung für die Stabilität des Enzyms, da nach 15 h Produktion in *E. coli* mindestens 90 % des katalytisch aktiven Proteins in der angereicherten Membranfraktion durch SDS-PAGE nachgewiesen wurden.

Bei der Bestimmung der thermischen Stabilität sowohl mittels CD-Messungen als auch über die enzymatische Restaktivität nach Thermoinkubation wurde für solubilisiertes AlkJ eine Schmelztemperatur von ca. 35 °C ermittelt. Die mit zwei unterschiedlichen Methoden festgestellte nahezu identische Halbwertstemperatur scheint die Thermostabilität des gereinigten Enzyms sehr gut widerzuspiegeln, unterschätzt aber wahrscheinlich die Robustheit von AlkJ *in vivo*. Da mit der Solubilisierung eine Abtrennung von der Zellmembran erfolgt, gilt es einen Verlust von potentiell stabilisierenden Interaktionen des Enzyms mit der ursprünglichen Lipidumgebung in Betracht zu ziehen. Die Loslösung von Enzymen von der Zellmembran kann zu einer deutlich verminderten Proteinstabilität *in vitro* führen (Prive, 2007). In der Tat aggregierte das in SEC-Puffer gelagerte solubilierte AlkJ während längerer Aufbewahrung bei 4 °C. Diese begrenzte Lagerstabilität steht im Einklang mit einem nachteiligen Effekt der Solubilisierung, ist aber dennoch merklich besser als die nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation bestimmte Halbwertszeit von ca. 30 min (van Beilen *et al.*, 1992a).

Ein konserviertes Merkmal der GMC-Oxidoreduktasen ist deren Rossmann-Faltung (Rossmann *et al.*, 1974), was die Identifizierung der nukleotidbindenden Domäne anhand der Aminosäuresequenz gestattet (Kiess *et al.*, 1998). Auch in der Primärstruktur von AlkJ wurde das Rossmann-Motiv nachgewiesen und das Enzym aufgrund dessen der Enzymfamilie der GMC-Oxidoreduktasen zugeordnet (Ohta *et al.*, 2006). Ein experimenteller Beleg für die Assoziation der prosthetischen Gruppe FAD(H<sub>2</sub>) mit AlkJ wurde bislang jedoch nicht erbracht. In einem direkt nach der Reinigung durch IMAC und SEC aufgenommenen Absorptionsspektrum des rekombinanten Enzyms (vgl. Abbildung 18) wurde kein FAD anhand der charakteristischen Peaks bei 372 und 450 nm festgestellt. Jedoch wies das

UV/Vis-Spektrum von AlkJ ein Plateau im Bereich von 355 bis 325 nm auf, welches bis zu einer Wellenlänge von 500 nm stetig auf die Basislinie fiel und damit dem Absorptionsspektrum von vollständig reduziertem FADH<sub>2</sub> in dem GMC-Enzym Glucose-Oxidase ähnelte (Massey & Palmer, 1966).

Da der für die aromatischen Aminosäureseitenketten des Proteins typische ausgeprägte Peak bei 280 nm mit der geringen und breiten Absorption von FADH<sub>2</sub> überlappte, wurde die Charakterisierung des reduzierten, am Enzym gebundenen Cofaktors nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde enzymgebundenes FADH<sub>2</sub> durch Denaturierung von AlkJ mit SDS freigesetzt und der unter Einwirkung von gelöstem Sauerstoff oxidierte Cofaktor gemäß gängiger enzymologischer Praxis anschließend anhand seiner spezifischen Absorption bei 450 nm quantifiziert (Aliverti *et al.*, 1999). Dieser Befund legt nahe, dass an AlkJ gebundenes FADH<sub>2</sub> vor einer unspezifischen Oxidation durch Luftsauerstoff geschützt ist. Im nächstverwandten Enzym CHOX wurde dagegen eine Mischung aus vollständig oxidiertem FAD sowie FAD-Semichinon bestimmt (Fan *et al.*, 2004).

Eine Quantifizierung von AlkJ und FAD nach der Trennung ergab ein ungefähr äquimolares Verhältnis, was zeigt, dass das Enzym während der Produktion in *E. coli* effizient FAD(H<sub>2</sub>) inkorporiert und dieses auch während der Solubilisierung mit mildem Detergenz sowie der darauffolgenden chromatographischen Reinigung unter den gewählten Pufferbedingungen fest bindet. Die prosthetische Gruppe ist also stabil, jedoch nicht kovalent mit dem Enzym assoziiert, was auch durch Waschen von an Ni-Sepharose gebundenem AlkJ mit Harnstoff und KBr nachgewiesen wurde (s. Abschnitt 3.2.3). AlkJ teilt diese Eigenschaft mit weiteren Vertretern der GMC-Enzymfamilie (Kiess *et al.*, 1998; Vrielink & Ghisla, 2009; Ruiz-Duenas *et al.*, 2006), wohingegen beim ebenfalls nahe verwandten Enzym CHOX die prosthetische Gruppe kovalent gebunden ist (Fan *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu Nikotinamid-Cosubstraten, welche nach erfolgtem Hydrid-Transfer üblicherweise vom Enzym wegdiffundieren, bleibt FAD(H<sub>2</sub>) meist an das Enzym gebunden, was evolutionär aufgrund der hohen Tendenz von FADH<sub>2</sub> zur Autooxidation in freier Lösung zu erklären ist (Walsh & Wencewicz, 2013). Die quasi irreversible Bindung bedingt, dass die vom Alkoholsubstrat abstrahierten Elektronen in einer weiteren oxidativen Halbreaktion auf einen Elektronenakzeptor übertragen werden müssen, um die prosthetische Gruppe für den nächsten Reaktionszyklus zu regenerieren. In einigen Mitgliedern der GMC-Enzymfamilie geschieht diese Regenerierung der prosthetischen Gruppe durch molekularen Sauerstoff, wie etwa bei der Arylalkohol-Oxidase (Hernandez-Ortega *et al.*, 2012), der Cholesterol-Oxidase (Vrielink & Ghisla, 2009) oder der CHOX (Gadda, 2003), wohingegen für das GMC-Enzym Cellobiose-Dehydrogenase der physiologische Elektronenakzeptor bislang nicht identifiziert wurde (Henriksson *et al.*, 2000). Für die zu AlkJ nahe verwandte PEGDH, welche eine

Aminosäureidentität von 42 % aufweist, wurde Ubichinon als physiologisches Oxidationsmittel postuliert (Ohta *et al.*, 2006).

Auch für AlkJ wurde eine Kopplung an die Atmungskette über Ubichinon als Elektronenakzeptor vorgeschlagen (van Beilen *et al.*, 1992a), was in der vorliegenden Arbeit experimentell durch enzymkinetische Messungen mit dem wasserlöslichen Ubichinon-Analogon Q<sub>1</sub> anstelle der physiologisch relevanten, aber nahezu wasserunlöslichen Ubichinone Q<sub>9</sub> oder Q<sub>10</sub> gezeigt wurde. Die Oxidation von 1-Octanol verlief konzentrationsabhängig von Q<sub>1</sub> als intermediärem Oxidationsmittel, wohingegen die Reaktion nur sehr langsam oder überhaupt nicht erfolgte, wenn bloß die terminalen Elektronenakzeptoren DCPIP oder Cytochrom c eingesetzt wurden. Der für AlkJ bestimmte K<sub>M</sub>-Wert für Q<sub>1</sub> ist mit 41 µM nur leicht höher als die für PEGDH beschriebene Affinität für Q<sub>10</sub> (11 µM, Ohta *et al.*, 2006) und liegt in derselben Region wie der für Q<sub>1</sub> gemessene K<sub>M</sub>-Wert der Fumarat-Reduktase (Maklashina & Cecchini, 1999). Da Ubichinon 9 in der Atmungskette von *Pseudomonaden* nachgewiesen wurde (Zannoni, 1989; Matsushita *et al.*, 1980), erscheint es wahrscheinlich, dass die durch AlkJ katalysierte Redoxreaktion über dieses Cosubstrat direkt an den bakteriellen Energiestoffwechsel gekoppelt ist, wo die aus dem Alkoholsubstrat stammenden Elektronen unter Energiegewinn weiter auf Cytochrom c und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen werden.

Bereits kurz nach der Erstbeschreibung des OCT-Plasmids aus *P. putida* GPo1 wurde die durch diesen endogenen Vektor vermittelte Oxidation von Alkanolen zu Aldehyden untersucht (Grund *et al.*, 1975). Als Ergebnis wurde die in der isolierten Zellmembran von *P. putida* nachgewiesene Dehydrogenaseaktivität gegenüber aliphatischen Alkoholen dem *alkJ*-Cistron als Teil des *alk*-Operons zugeschrieben (Benson & Shapiro, 1976). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Oxidation von Alkanolen durch AlkJ anhand des gereinigten Enzyms weiter eingehender kinetisch analysiert werden. AlkJ wies eine von der Substratkonzentration abhängige Aktivität auf, welche im Fall von 1-Butanol einer Michaelis/Menten-Kinetik folgte, wohingegen bei Substraten mit sechs oder mehr Kohlenstoffatomen eine Substratinhibierung beobachtet wurde. Dies ist womöglich durch die nahezu zehnfach höhere Substrataffinität von AlkJ gegenüber 1-Hexanol, 1-Octanol sowie HLSMe im Vergleich zu 1-Butanol begründet.

Darüber hinaus wurde bei gleichen Reaktionsbedingungen eine deutlich verringerte Aktivität von AlkJ gegenüber 1-Octanol erhalten als in früheren Studien (0,37 vs. 3,84 U/mg), bei denen die angereicherte Membranfraktion von *P. putida* eingesetzt wurden (Benson & Shapiro, 1976). Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass AlkJ in der physiologischen Membranumgebung höhere strukturelle Integrität aufweist als in der nach Solubilisierung vorliegenden DDM-Mizelle. Die bei der Verwendung der Membranfraktion intakte Lipiddoppelschicht um AlkJ erhöht darüber hinaus die Löslichkeit der hydrophoben Substrate in

der unmittelbaren Umgebung des Enzyms, was vermutlich zu einer gesteigerten effektiven Substratkonzentration führt. Ferner werden bei der Präparation der bakteriellen Zellmembran auch darin befindliche lipophile Elektronenakzeptoren wie z.B. Ubichinone angereichert, welche im enzymatischen Assay eine effiziente Reoxidierung des an AlkJ gebundenen FAD bewirken.

In der Tat resultierte die Verwendung von  $Q_0$  als Elektronenakzeptor im Vergleich zum Einsatz der auch in früheren Studien verwendeten artifiziellen Elektronenakzeptoren PMS/DCPIP (Benson & Shapiro, 1976) in einer ungefähren Verdreifachung der Aktivität von AlkJ gegenüber 1-Octanol sowie HLSMe. Die Aktivität gegenüber HLSMe stieg von 0,49 U/mg auf 1,46 U/mg, bei 1-Octanol wurde statt 0,37 U/mg eine spezifische Aktivität von 1,42 U/mg ermittelt. AlkJ verhält sich hinsichtlich der Cosubstratpräferenz analog zu anderen FAD/Ubichinon-abhängigen Enzymen wie etwa der Koffein-Dehydrogenase (Yu *et al.*, 2008), bei welcher die Verwendung  $Q_0$  als Elektronenakzeptor anstelle von PMS/DCPIP zu in einer 1,6-fach gesteigerten Aktivität führte.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass AlkJ lineare Alkoholsubstrate effizient zu den entsprechenden Aldehyden oxidieren kann, welche als wertvolle Ausgangsstoffe für eine Vielzahl von Anwendungen in der pharmazeutischen, chemischen sowie der Kosmetikindustrie Verwendung finden. Aufgrund seiner einschlägigen Substratspezifität scheint AlkJ für eine Nutzung für die biokatalytische Synthese von OLSMe ausgehend von HLSMe prädestiniert.

#### 4.4 BsADH als thermostabiler Biokatalysator

Gentechnische Produktion und Eigenschaften der temperaturstabilen BsADH aus *Bacillus stearothermophilus* in dem Wirtsorganismus *E. coli* BL21 wurden durch die N-terminale Fusion des Enzyms mit dem *Strep*-tag II offensichtlich nicht beeinträchtigt. Beim Vergleich mit vorhergehenden Studien mit dem Enzym ohne Affinitätsanhängsel wurde in der vorliegenden Arbeit eine vergleichbare Menge an BsADH in der löslichen Gesamtproteinfraktion nach mechanischem Aufschluss der Zellen festgestellt (Fiorentino *et al.*, 1998). Das *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) ermöglichte die Präparation elektrophoretisch homogener BsADH in einem einzigen Chromatographieschritt unter reduzierenden Bedingungen (d.h. in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol), wohingegen in früheren Studien bis zu drei Chromatographieschritte nötig waren (Guagliardi *et al.*, 1996). Die Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie erwies sich in diesem Fall gegenüber der Verwendung des ansonsten gebräuchlicheren Polyhistidin-Affinitätsanhängsels als vorteilhaft, da dieses nur eingeschränkt mit Reduktionsmitteln kompatibel ist (Schmitt *et al.*, 1993) und außerdem aufgrund seiner hohen Affinität für Zink eine Abstraktion der essentiellen Zinkionen aus den metallbindenden Zentren der BsADH hätte bewirken können. Wie durch

Größenausschlusschromatographie gezeigt wurde, lag BsADH nahezu ausschließlich in seiner funktionellen homotetrameren Form vor, solange die Zusätze Glycerin und  $\beta$ -Mercaptoethanol in den zur Reinigung verwendeten Puffern enthalten waren. Der Verzicht auf diese stabilisierenden Pufferagenzien während der Reinigung führte dagegen zu einer partiellen Dissoziation der BsADH in Dimere, welche bis zu zwei Drittel der finalen Enzympräparation ausmachten (nicht gezeigt).

Der stabilisierende Effekt von Glycerin auf die strukturelle Integrität von Enzymen ist seit langem bekannt (Bradbury & Jakoby, 1972; Bommarius & Paye, 2013). Freie Cysteinreste neigen hingegen zur Ausbildung nicht-nativer Disulfidverbrückungen und können darüber hinaus unter anderem durch gelösten Sauerstoff zu Sulfensäure und weiter zu Cysteinsäure oxidiert werden (Luo *et al.*, 2005), was die Enzymaktivität unvorteilhaft beeinflusst (Perry & Wetzel, 1987; Slavica *et al.*, 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich – übereinstimmend mit früheren Studien (Guagliardi *et al.*, 1996) – der nachteilige Effekt von oxidierenden Pufferbedingungen auf die Enzymstabilität: Wurde SEC-gereinigte BsADH ohne den Zusatz von Reduktionsmittel sowie Glycerin in  $\text{NaP}_i$ -Puffer bei 15 °C gelagert, sank die Enzymaktivität innerhalb von 2,5 Tagen auf 1 % des Ausgangswerts. Eine Analyse der katalytisch inaktiven Enzympräparation durch SEC ergab, dass das ursprüngliche vorliegende BsADH-Homotetramer in Dimere zerfallen war (s.o.), was darauf hinweist, dass für die katalytische Funktion des Enzyms eine intakte Quartärstruktur unerlässlich ist. Dass bei der SEC-Analyse keine Aggregate oder höhere Oligomere nachgewiesen wurden legt den Schluss nahe, dass die BsADH vorrangig über die chemische Oxidation von Cystein- oder Methionin-Seitenketten inaktiviert wird, wohingegen die Bildung unspezifischer Disulfidbrücken keine wesentliche Rolle für den Verlust der enzymatischen Aktivität zu spielen scheint.

Da die Stabilität des verwendeten Biokatalysators wesentlichen Einfluss auf die Rentabilität eines biotechnologischen Produktionsprozesses hat (Tufvesson *et al.*, 2010) wurde in dieser Arbeit versucht, die Robustheit der BsADH durch den gezielten Austausch oxidationslabiler Aminosäuren zu erhöhen. Exponierte ungepaarte Thiolseitenketten stellen die chemisch bei weitem empfindlichsten Gruppen innerhalb eines Proteins dar, welche leicht durch gelösten Sauerstoff oxidiert werden können (Marshall *et al.*, 2003). Beispielsweise wurde festgestellt, dass die technische Anwendung der industriell relevanten thermostabilen Mono-Zink-ADH aus *Thermoanaerobacter brockii* durch ihre exponierten Cysteinreste limitiert wird (Keinan *et al.*, 1986; Peretz *et al.*, 1997). Dies liefert vermutlich auch bei der BsADH die Ursache für ihre eingeschränkte Stabilität im oxidierenden Milieu. Basierend auf bioinformatischen Sequenzanalysen wurden daher die drei freien Cysteinreste sowie zwei oberflächenexponierte Methioninreste gegen jeweils geeignete chemisch stabile Aminosäuren ausgetauscht.

Von den insgesamt fünf adressierten Positionen erwies sich der Austausch von Cys257, welches innerhalb der freien Cysteinreste bei verwandten ADHs am wenigsten konserviert ist

(60 %), geeignet für eine Substitution mit dem chemisch inerten Leucin. Die entsprechende Punktmutante BsADH(C257L) wies eine nahezu verdoppelte Ausbeute bei der Produktion in *E. coli* auf (18 mg/l Kultur vs. 10 mg/l Kultur) und zeigte deutlich erhöhte Lager- sowie Thermostabilität bei vergleichbaren katalytischen Eigenschaften hinsichtlich der Umsetzung von HLSMe. Die Halbwertstemperatur in einem Standardpuffer ohne stabilisierende Additive wurde um 2,7 °C gesteigert, wobei auch bei Temperaturen unterhalb  $T_{stab}$  die Inaktivierung wesentlich geringer ausgeprägt war als bei der wtBsADH. Die Punktmutante C257L wies nach einer Inkubation für 56 h bei 15 °C noch 30 % der Anfangsaktivität auf, wohingegen wtBsADH lediglich 1 % Restaktivität zeigte.

Wurde bei der Inkubation von wtBsADH  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Verhinderung unspezifischer Oxidationsreaktionen zugesetzt, führte dies erwartungsgemäß zu einer erhöhten Halbwertstemperatur um 2,4 °C im Vergleich zur Inkubation in bloßem  $\text{NaP}_i$ -Puffer. Überraschenderweise zeigte auch die Variante C257L unter solchen reduzierenden Bedingungen einen um 2,4 °C erhöhten  $T_{stab}$ . Da die Oxidation von Cys257 unter reduzierenden Bedingungen nicht stattfindet, ist der stabilisierende Effekt der Substitution womöglich einer verbesserten Packung der Aminosäuren an der Grenzfläche der einzelnen Monomere oder auch einer veränderten Interaktion mit dem Nicotinamid-Cofaktor geschuldet. Weiterhin sind in der DNA-Sequenz der BsADH zwei Methioninreste sowie drei Tryptophanreste codiert, welche aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften ebenfalls leicht oxidativ modifiziert werden können (Chao *et al.*, 1997; Vogt, 1995). Dementsprechend könnte die Stabilität der BsADH durch rationale Mutagenese oder gerichtete Evolution noch weiter gesteigert werden.

Interessanterweise tragen auch manche bereits industriell genutzte Enzyme, wie z.B. die ADH aus *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt ID: P00330; PDB ID: 4W6Z), den gleichen konservierten freien Cysteinrest in ihrer Cofaktorbindetasche. Die in dieser Arbeit erreichte Erhöhung der Thermostabilität der BsADH zeigt somit einen Weg auf, bereits etablierte Biokatalysatoren weiter zu verbessern. Im Gegensatz zu zahlreichen *Enzyme-Engineering*-Kampagnen, bei welchen der Versuch die Substrataffinität oder katalytische Aktivität zu erhöhen zu Lasten der Enzymstabilität ging (Tokuriki *et al.*, 2008), steigerte die Mutation C257L bei der BsADH nicht nur die generelle Stabilität des Enzyms, sondern erhielt die vorteilhaften katalytischen Eigenschaften gegenüber dem Zielsubstrat HLSMe.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die BsADH ein  $K_M$ -Wert von 85,9  $\mu\text{M}$  für das industriell relevante Substrat HLSMe bestimmt, was im Vergleich zu dem für Aktivitätsmessungen typischerweise eingesetzten Substrat Ethanol (0,91 mM) eine zehnfach höhere Affinität bedeutet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der geräumigen Substratbindetasche der BsADH, welche an den Grenzen der Untereinheiten A und D bzw. B und C ausgebildet wird, damit eine strukturelle Flexibilität aufweist und von dem Modellsubstrat Trifluorethanol in der Kristallstruktur bei weitem nicht vollständig ausgefüllt wird (Ceccarelli *et al.*, 2004).

Die Bindestelle ist ferner mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleidet, was die Bindung der Kohlenwasserstoffkette von HLSMe begünstigt. Die Selektivität der BsADH für räumlich anspruchsvolle sowie unpolare Alkoholsubstrate war bereits mit früheren Studien anhand der erfolgreichen Umsetzung von Dekandiol (Sattler *et al.*, 2012) wie auch Zimtaldehyd (Pennacchio *et al.*, 2013a) nahegelegt.

Trotz der hohen Affinität für HLSMe ist die Verwendung der BsADH in einem isolierten Prozess aufgrund der für die Oxidation des Alkohols ungünstigen thermodynamischen Verhältnisse beschränkt. Bei der enzymologischen Untersuchung der NAD<sup>+</sup>-gekoppelten Vorwärts- sowie Rückreaktion wurde ein chemisches Gleichgewicht von  $2,16 \times 10^{-3}$  ermittelt, was zeigt, dass die Oxidation von HLSMe zum entsprechenden Aldehyd mit NAD<sup>+</sup> als Oxidationsmittel thermodynamisch benachteiligt ist. Dies wurde auch durch den geringen Umsatz von lediglich einem Prozent des eingesetzten Substrats bei der biokatalytischen Oxidation von HLSMe – ohne Zusatz eines weiteren Redox-Cosubstrats – bestätigt. Dass dieser Wert dennoch fünfmal so hoch ist wie eigentlich erwartet, ist wahrscheinlich dem abgeänderten Versuchsaufbau geschuldet, welcher eine höhere Konzentration an Cosolvens wie auch eine höhere Pufferionenstärke beinhaltete, wobei letztere dafür bekannt ist, die Aldehydausbeute zu steigern (Keinan *et al.*, 1986).

Um thermodynamisch ungünstige biokatalytische Reaktionen dennoch voranzutreiben, können diese mit einer exergonen Folgereaktion gekoppelt werden. Im Fall der enzymatischen Alkoholoxidation kann dies durch eine reduktive Aminierung des entstehenden Aldehyds/Ketons durch eine Transaminase in Gegenwart eines geeigneten Aminodonors geschehen (Lerchner *et al.*, 2013), wodurch das Oxo-Intermediat dem chemischen Gleichgewicht entzogen wird. Alternativ kann das Gleichgewicht einer ADH-Reaktion durch Substrat- oder Enzym-gekoppelte Coenzymregenerierung auf die Seite des Aldehyds verschoben werden (Orbegozo *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013; Kara *et al.*, 2014).

Speziell bei enzymatisch katalysierten Reduktionsreaktionen, wie z.B. der asymmetrischen Synthese chiraler Alkohol-Intermediate aus Ketonen, kann die Regenerierung des verbrauchten NADHs über bereits industriell etablierte Enzymsysteme wie etwa die Formiat-Dehydrogenase (Cassimjee *et al.*, 2010) erfolgen (**Tabelle 11**). Zur Regenerierung des bei ADH-katalysierten Oxidationsreaktionen benötigten Cofaktors NAD<sup>+</sup> stehen im Gegensatz dazu jedoch wenige gut charakterisierte verwendete Enzyme zur Verfügung. Zwar wurden in der jüngeren Vergangenheit z.B. die NADH-Oxidase (Geueke *et al.*, 2003) oder die Glutamat-Dehydrogenase (van der Donk & Zhao, 2003) für derlei Anwendungen beschrieben; allerdings müssen bei diesen unter *in vitro* Bedingungen entweder zwei zusätzliche Substrate zugegeben werden, oder aber die gereinigten, rekombinanten Proteine zeigen nur begrenzte Stabilität (Brondani *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf die Produktseite sowie die Regenerierung von  $\text{NAD}^+$  durch Zugabe eines leicht verfügbaren kurzkettigen Aldehyds als stöchiometrischer Redoxpartner für die Oxidation von HLSMe, so dass der kostenintensive Nicotinamid-Cofaktor lediglich in katalytischen Mengen eingesetzt werden musste. In Anbetracht der Substratspezifität der BsADH erschien der gebräuchliche Aldehyd 1-Butanal trotz der in dieser Arbeit beschriebenen partiellen Inhibierung aufgrund der dennoch hohen Enzymaktivität für diesen Zweck geeignet. Bei der Inkubation von BsADH(C257L) mit dem Substrat HLSMe sowie dem Cofaktor  $\text{NAD}^+$  steigerte der Zusatz von 1-Butanal tatsächlich den HLSMe-Umsatz um den Faktor 23. Bei der semipräparativen Synthese von OLSMe zeigte BsADH jedoch nur halb so hohe spezifische Aktivität wie in den kinetischen Untersuchungen, was wahrscheinlich auf den inhibierenden Effekt des Cosubstrats 1-Butanal zurückzuführen ist.

**Tabelle 11.** Gebräuchliche enzymatische Regenerierungssysteme für  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ .

Cofaktor	Ansatz	Verwendetes Enzym/Substrat	Besonderheit
NADH	Enzym-gekoppelt	Alkohol-Dehydrogenase	Solvens-tolerante Enzyme verfügbar
		Formiat-Dehydrogenase	Gold-Standard, quasi irreversible Reaktion
		Phosphit-Dehydrogenase	Preiswertes Cosubstrat
		Transhydrogenase	Begrenzte Enzymstabilität
	Substrat-gekoppelt	Isopropanol, Ethanol	Potentielle Inaktivierung d. Enzyms
$\text{NAD}^+$	Enzym-gekoppelt	Aminosäure-Dehydrogenasen	Erfordert $\alpha$ -Ketosäure + $\text{NH}_3$
		Laktat-Dehydrogenase	Substratinhibierung
		NADH-Oxidase	Begrenzte Enzymstabilität
	Substrat-gekoppelt	Aceton, Ethanal	Potentielle Inaktivierung d. Enzyms

Der Befund, dass die finale Produktkonzentration bei dem verwendeten Versuchsaufbau 0,5 mM nicht überschritt, liegt vermutlich in der begrenzten Löslichkeit des langkettigen aliphatischen Substrats wie auch Produkts in wässriger Lösung begründet (Grant *et al.*, 2012). Dies kann zu einer Bildung von Substrat/Produkt-Mikroemulsionen führen, welche nur eingeschränkt an der in der wässrigen Phase stattfindenden enzymatischen Reaktion teilnehmen. Tatsächlich führte eine Verringerung der eingesetzten Substratkonzentration von 2 mM auf 0,5 mM HLSMe zu einem Umsatz von 67 % innerhalb von 30 min (nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass diese erhöhte Produktbildung nicht lediglich dem günstigeren Verhältnis an Cosubstrat/Substrat zu verdanken ist, wurde bei Verwendung des Standardansatzes mit 2 mM HLSMe die Konzentration an 1-Butanal schrittweise von 20 mM auf bis

zu 100 mM erhöht. Dies führte zu einer leicht verringerten Umsatzgeschwindigkeit, im Einklang mit dem inhibierenden Effekt des Cosubstrats. Der erreichbare Maximalumsatz wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt, was darauf schließen lässt, dass die eingeschränkte Löslichkeit des langkettigen Alkohols im wässrigen System größeren Einfluss auf die Effektivität der biokatalytischen Umsetzung hat.

Ein weiterer Grund für die nicht vollständige Umsetzung des eingesetzten Alkanolsubstrats könnte die begrenzte Stabilität des verwendeten Biokatalysators sein. Zwar gilt die BsADH als robust gegenüber der Verwendung von chaotropen Agenzien wie auch gegenüber hohen Temperaturen (Shim *et al.*, 2003), jedoch wurde für deren Lagerung unter oxidierenden Bedingungen ein Verlust an enzymatischer Aktivität festgestellt (s.o.). Da die Verwendung von wtBsADH anstelle der stabilisierten Variante C257L ebenfalls in einem Produkttiter von etwa 0,5 mM resultierte (nicht gezeigt), scheint die Stabilität des Biokatalysators jedoch nicht die Umsetzung des Substrats zu begrenzen.

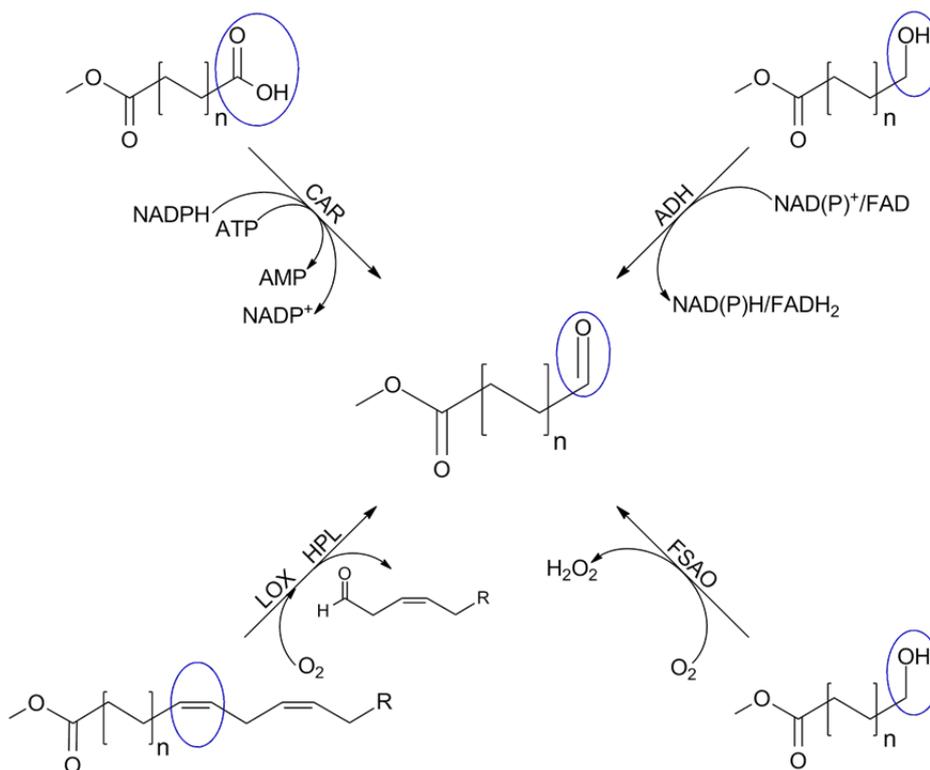
Mit OLSMe als alleinigem Substrat bei gleichzeitiger Anwesenheit von äquimolaren Mengen an Oxidationsmittel ( $\text{NAD}^+$ ) wurde innerhalb einer Stunde eine sehr geringe Menge an DDSMe nachgewiesen. Nachdem bei gleichzeitigem Vorhandensein von HLSMe, was angesichts des chemischen Gleichgewichts auch bei dessen Oxidation stets gegeben ist, keine Überoxidation zu DDSMe beobachtet wurde, scheint die Säurebildung durch die BsADH unter anwendungsnahen Bedingungen vernachlässigbar. Obwohl hinsichtlich der Bioprozessbedingungen zweifelsohne noch Optimierungspotential besteht, zeigt die hier durchgeführte Studie die prinzipielle Eignung der BsADH für die nachhaltige biotechnologische Synthese des biobasierten Polymerbausteins  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester.

In Anbetracht ihrer äußerst vorteilhaften Produktionseigenschaften in einem gut charakterisiertem bakteriellen Wirtsorganismus sowie der hohen Aktivität bei 37 °C, wie auch des breiten Substratspektrums in Kombination mit hoher Chemoselektivität, stellt die BsADH auch allgemein einen vielversprechenden Biokatalysator für den industriellen Einsatz bei der selektiven Oxidation von Alkoholen dar. Mit der Erhöhung der Enzymstabilität durch Eliminierung einer oxidationslabilen Aminosäure wurde in der vorliegenden Arbeit ein Biokatalysator mit verlängerter Halbwertszeit für den Einsatz in biotechnologischen Anwendungen bereitgestellt.

## 4.5 Alternative biotechnologische Syntheserouten zu $\omega$ -Oxocarbonsäuren

$\alpha/\omega$ -Oxo-Alkanderivate wie OLSMe stellen als reaktive Intermediate aufgrund der chemischen Vielseitigkeit der Aldehydfunktion äußerst attraktive Plattformchemikalien dar (Otte *et al.*, 2013; Schaffer & Haas, 2014). Bei deren biokatalytischen Herstellung durch

Alkanooxygenasen kann jedoch ein beträchtlicher Teil des eingesetzten Substrats durch Überoxidation verloren gehen (van Beilen *et al.*, 2003). Über die Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Enzyme hinaus erscheinen auch weitere Enzymklassen für eine im Vergleich zu Monooxygenasen selektivere biokatalytische Generierung von  $\omega$ -Oxocarbonsäuren und deren Methylestern, wie sie typischerweise bei der Gewinnung von Fettsäuren durch Umesterung der in der Biomasse dominierenden Triacylglyceride entstehen (Helwani *et al.*, 2009), geeignet (Abbildung 32).



**Abbildung 32.** Syntheserouten für die selektive enzymatische Generierung von  $\omega$ -Oxocarbonsäure-Methylestern. Die Generierung der Aldehydfunktion kann, ausgehend von einem primären Alkohol durch Oxidation mittels einer NAD(P)- oder FAD-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (ADH) erfolgen oder durch eine Fettsäurealkohol-Oxidase (FSAO) unter Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Eine alternative Möglichkeit stellt die Verwendung einer Carbonsäure-Reduktase (CAR) dar, welche unter Verbrauch von NADPH sowie ATP die freie Carboxylfunktion zum Aldehyd reduzieren kann. Ferner können durch kombinierte Anwendung von Lipoxygenase (LOX) sowie Hydroperoxid-Lyase (HPL) mehrfach ungesättigte Fettsäuren als Ausgangssubstanzen für die Erzeugung der gewünschten  $\omega$ -Oxocarbonsäure-Methylester dienen.

Neben der in dieser Arbeit realisierten Option, über  $\text{NAD}^+$ - oder FAD-gekoppelte Oxidation eines Fettalkohols durch eine spezifische ADH das gewünschte Oxo-Intermediat zu erzeugen, kann die Transformation von langkettigen Alkoholen zu Aldehyden auch durch Fettsäurealkohol-Oxidasen aus *Candida tropicalis* (ATCC 20336) katalysiert werden, wobei hier anstatt  $\text{NAD}^+$ /FAD molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient und  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Nebenprodukt entsteht (Kakoti *et al.*, 2012; Eirich *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde erst kürzlich eine vielbeachtete Strategie zur Erzeugung von Plattformchemikalien aus Biomasse

veröffentlicht, in welcher der gewünschte langkettige Aldehyd durch Reduktion der entsprechenden freien Carboxylfunktion über eine Carbonsäure-Reduktase aus *Mycobacterium marinum* erhalten wurde (Akhtar *et al.*, 2013). Diese wegweisende Arbeit zeigt einen metabolischen Ausweg aus der bislang als Sackgasse geltenden Überoxidation zu Carbonsäuren auf. Jedoch erfordert diese Reaktion aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität der Carboxylfunktion neben NADPH als Reduktionsäquivalent zusätzlich zwei ATP-Äquivalente. Zudem erfolgt die Reduktion zum Aldehyd mit eingeschränkter Chemoselektivität, so dass auch Alkohole als Nebenprodukte entstehen können (Napura-Wijata *et al.*, 2014).

Abgesehen von der Redoxtransformation von linearen gesättigten Alkanderivaten können auch C-C-Doppelbindungen bei zumeist aus Pflanzen stammenden ungesättigten Fettsäuren regioselektiv durch Sauerstoff aktiviert werden. So erkennt die aus *Citrullus lanatus* isolierte 9-Lipoxygenase das *cis*-Pentadien-Motiv in mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie z.B. Linolsäure und oxidiert dieses durch Einbau von zwei Sauerstoffatomen zur Hydroperoxosäure (Vick & Zimmerman, 1976). Eine synergistische 9-Hydroperoxid-Lyase spaltet das entstehende Peroxo-Zwischenprodukt in einen kürzeren Aldehyd, welcher als typischer Pflanzenaromastoff vielfach als „Green Note“ in der Aromaindustrie Verwendung findet (Gigot *et al.*, 2010), sowie die gewünschte  $\omega$ -Oxocarbonsäure, welche unter anderem als Vorläufer für biobasierte Polymerbausteine dienen kann (Otte *et al.*, 2013).

Trotz der Vielzahl an enzymbasierten Alternativen erfolgt die  $\omega$ -Oxo-Funktionalisierung von Alkanderivaten zu Alkoholen und Aldehyden im industriellen Maßstab derzeit vorwiegend durch heterogene Katalyse (Falbe *et al.*, 2013; Labinger, 2004). Neben den erforderlichen hohen Drücken und Temperaturen ist vor allem die Umwelttoxizität und eingeschränkte Wiederverwendbarkeit der eingesetzten Katalysatoren für die mangelnde Nachhaltigkeit dieser Ansätze verantwortlich. Darüber hinaus weisen die bisher gebräuchlichen (Edel-)Metallkatalysatoren nur begrenzte Produktselektivität auf (Periana *et al.*, 2004). So ist es bislang nicht gelungen, bei der Reduktion von Carbonsäuren mit anorganischen Reduktionsmitteln das Produktmuster entscheidend in Richtung des Alkohols oder Aldehyds zu verlagern (Mérel *et al.*, 2015). Auch bei der chemischen Oxidation von Alkanen ist die Ausbeute durch die eingeschränkte Produktselektivität, d.h. der starken Tendenz zur Überoxidation, begrenzt (Conley *et al.*, 2006). Große Hoffnung wird in ein erst kürzlich vorgestelltes Verfahren zur Generierung von kurzkettigen Alkoholen aus Erdgas über Esterkopplung an Trifluoressigsäure gesetzt, in welchem erstmals Umsätze von > 20 % bei einer Selektivität von > 85 % erreicht werden konnten (Fortman *et al.*, 2014).

Auch wenn Stabilität, Selektivität und Aktivität bei den bislang charakterisierten enzymatischen Oxidationsreaktionen von Alkanen noch nicht den Kriterien einer idealen Reaktion entsprechen (Staudt *et al.*, 2013; Gröger, 2014), bieten sich durch die enorme

Diversität mikrobieller Enzyme, die bislang nur zu einem Bruchteil erschlossen ist, sowie durch *Protein-Engineering* nahezu unbegrenzte Möglichkeiten, maßgeschneiderte Biokatalysatoren zu generieren. In naher Zukunft könnten Enzyme daher entscheidend dazu beitragen, das verfügbare Arsenal an heterogenen wie homogenen Katalysatoren bei der industriellen Herstellung von  $\omega$ -oxofunktionalisierten Alkanen zu erweitern.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung dreier Enzyme für die biokatalytische Erzeugung der industriell relevanten Fettsäurederivate  $\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester (HLSMe) und  $\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester (OLSMe) aus dem pflanzenölbasierten Substrat Laurinsäure-Methylester (LSMe) untersucht. HLSMe und OLSMe spielen als Intermediate eine zentrale Rolle bei der biotechnologischen Herstellung von Polyamid-12-Bausteinen unter Einsatz der Monooxygenase AlkB. Dabei wird jedoch ein beträchtlicher Teil des Substrats zum unerwünschten Nebenprodukt Dodekandisäure-Monomethylester (DDSMe) überoxidiert. Mit Hinblick auf verbesserte Ausbeute sollten zur spezifischen Oxidation des HLSMe-Intermediats zwei Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) charakterisiert und das zentrale Enzym der Reaktionskaskade, AlkB, hinsichtlich seiner Produktselektivität optimiert werden.

Die aus *P. putida* GPo1 stammende Oxygenase AlkB wurde in *E. coli* produziert, wobei das sechs Transmembranhelices umfassende Enzym in katalytisch aktiver Form in der Zellmembran lokalisiert war. Versuche, AlkB in aktiver Form zu solubilisieren, führten nicht zum Erfolg, weshalb für die enzymatische Charakterisierung die AlkB-enthaltende Membranfraktion verwendet wurden. Die photometrische Messung des von AlkB verbrauchten NADH bei gleichzeitiger Erfassung der aus LSMe gebildeten Oxidationsprodukte durch Gaschromatographie (GC) zeigte, dass dieses Alkansubstrat mit einer Aktivität von 0,3 U/mg bei einer Elektronentransfereffizienz von 33 % umgesetzt wird.

Insgesamt acht Aminosäuren in der Nähe der katalytisch essentiellen Histidinreste von AlkB wurden anhand eines Strukturmodells substituiert, was jedoch zu keiner höheren Aktivität oder Kopplungseffizienz führte. Um den Probendurchsatz zu erhöhen, wurde die parallelisierte Produktion und Untersuchung von AlkB-Varianten im Mikrotiterplattenmaßstab etabliert, was eine Analyse der Reaktionsprodukte von 96 Varianten in 27 Stunden gestattete. So wurde bei der lokalen Randomisierung des *alkB*-Strukturgens eine Beteiligung der vierten Transmembranhelix an der Substratbindung festgestellt. Aus drei daraufhin generierten, an je einer Position in dieser Region permutierten Protein-Bibliotheken wurde die Variante V129T erhalten, welche im Vergleich zu wtAlkB eine um ein Drittel verbesserte Kopplungseffizienz sowie eine erhöhte Syntheseeffizienz des primären Oxidationsprodukts, HLSMe, aufwies.

Die ebenfalls aus *P. putida* GPo1 vom gleichen Operon stammende ADH AlkJ wies nach heterologer Produktion in *E. coli* deutliche Affinität zur bakteriellen Zellmembran auf, konnte allerdings mit *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid in aktiver Form solubilisiert werden. Bei der Charakterisierung einer verkürzten AlkJ-Variante zeigte sich, dass der im Vergleich zu homologen Enzymen elongierte C-Terminus an der Membranbindung nicht essentiell beteiligt ist. Im Absorptionsspektrum des anhand des His<sub>6</sub>-tag und durch Größenausschlusschromatographie (SEC) erstmals zur Homogenität gereinigten Enzyms wurde kein auf den Cofaktor Flavin/Adenin-Dinukleotid (FAD) hindeutender Peak erhalten. Die Denaturierung

mit SDS führte jedoch zur Ausprägung der für oxidiertes FAD charakteristischen Banden bei 370 und 450 nm, anhand welcher eine stöchiometrische Beladung mit FAD ermittelt wurde. Die katalytische Aktivität von AlkJ wurde für 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol sowie HLSMe untersucht. Es zeigte sich, dass AlkJ bevorzugt langkettige Substrate umsetzt, welche das Enzym allerdings bei hohen Konzentrationen inhibieren. Die höchste Aktivität wurde für HLSMe bestimmt ( $K_M = 21 \mu\text{M}$ ;  $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ ).

AlkJ war in der Lage, die aus dem Substrat stammenden Elektronen über das Ubichinon-Derivat  $Q_1$  auf Cytochrom c zu übertragen, was nahelegt, dass diese ADH im physiologischen Kontext an die bakterielle Atmungskette gekoppelt ist. Während anhand von Circular dichroismus-Spektroskopie sowie enzymatischen Tests für das solubilisierte Enzym eine Halbwerts-temperatur von  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  ermittelt wurde, betrug das erhaltene Temperaturoptimum  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Am Beispiel der Umsetzung von HLSMe mit  $Q_0$  wurde gezeigt, dass AlkJ nicht nur imstande ist, Alkohole zu Aldehyden zu oxidieren, sondern – allerdings mit klar verringerter Geschwindigkeit – auch die Weiteroxidation zur Carbonsäure zu katalysieren.

Schließlich wurde die thermostabile  $\text{NAD}^+$ -abhängige BsADH aus *Geobacillus stearothermophilus* für die biokatalytische Synthese von OLSMe aus HLSMe untersucht. Das heterolog in *E. coli* produzierte und über das *Strep*-tag II sowie durch SEC gereinigte homotetramere Enzym zeigte hohe Aktivität gegenüber HLSMe ( $K_M = 86 \mu\text{M}$ ;  $44 \text{ U mg}^{-1}$ ). Anhand der kinetischen Parameter für die BsADH-katalysierte Vor- und Rückreaktion wurde die Gleichgewichtskonstante der  $\text{NAD}^+$ -gekoppelten Oxidation von HLSMe zu  $2,16 \times 10^{-3}$  bestimmt. Da die BsADH unter nicht-reduzierenden Pufferbedingungen nur begrenzt stabil war, wurden basierend auf homologen Enzymsequenzen sowie Computermodellen fünf oxidationslabile Aminosäurepositionen gegen chemisch inerte Seitenketten ausgetauscht. Die Substitution Cys257Leu führte dabei zu einer stabilisierten BsADH-Variante, welche dreifach verlängerte Halbwertszeit sowie um  $2,4 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöhte Halbwertstemperatur aufwies.

Übereinstimmend mit dem oben ermittelten Redox-Gleichgewicht wurde bei der enzymatischen Umsetzung bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  lediglich 1 % des eingesetzten HLSMe durch  $\text{NAD}^+$  unter Katalyse mit BsADH(C257L) oxidiert. Die Verwendung von 1-Butanal zur Cofaktor-Regenerierung *in situ* mit lediglich katalytischer Konzentration an  $\text{NAD}^+$  führte zu einer Steigerung des Umsatzes auf 23 %. Im Gegensatz zu anderen Oxidoreduktasen wurde interessanterweise nur eine geringe Überoxidation zu DDSMe beobachtet.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass AlkJ und BsADH wie auch die AlkB-Variante V129T Potential besitzen, die bei der biotechnologischen Herstellung von Polyamid-12-Bausteinen bislang störende Überoxidation zu verringern. Um die Eignung dieser Biokatalysatoren für eine technische Umsetzung in Kombination mit dem bestehenden Fermentationsprozess abschätzen zu können, empfiehlt sich die schrittweise Integration der einzelnen Enzyme in den derzeit industriell verwendeten Ganzzellbiokatalysator.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AEX	<i>Anion exchange chromatography</i> , Anionenaustauschchromatographie
AlkB	Alkan-Monooxygenase aus <i>Pseudomonas putida</i> GPo1
AlkG	Rubredoxin aus <i>Pseudomonas putida</i> GPo1
AlkJ	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Pseudomonas putida</i> GPo1
AlkT	Rubredoxin-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i> GPo1
ALSMe	$\omega$ -Aminolaurinsäure-Methylester
AS	Aminosäure
bp	<i>Base pair</i> , Basenpaar
BsADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
DDSMe	Dodekandisäure-Monomethylester
ESI-MS	Elektrospray Ionisierung-Massenspektrometrie
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HLSMe	$\omega$ -Hydroxylaurinsäure-Methylester
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kt	Kilotonne
LSMe	Laurinsäure-Methylester
Mt	Megatonne
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i> (Ausschlussgrenze)
OLSMe	$\omega$ -Oxolaurinsäure-Methylester
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
rF	Relative Feuchte
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SAC	Streptavidin-Affinitätschromatographie
Sdp	Siedepunkt
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TMH	Transmembranhelix
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

## 7 Literaturverzeichnis

- Adachi, O., Ano, Y., Toyama, H. & Matsushita, K. (2007) Biooxidation with PQQ- and FAD-dependent dehydrogenases. IN SCHMID, R. D. & URLACHER, V. B. (Eds.) *Modern Biooxidation: Enzymes, Reactions and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Akhtar, M.K., Turner, N.J. & Jones, P.R. (2013) Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 87-92.
- Alberty, R.A. (1953) The relationship between Michaelis constants, maximum velocities and the equilibrium constant for an enzyme-catalyzed reaction. *J Am Chem Soc* **75**, 1928-1932.
- Aliverti, A., Curti, B. & Vanoni, M. (1999) Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins. IN CHAPMAN, S. K. & REID, G. A. (Eds.) *Flavoprotein Protocols*. Humana Press, New York, USA.
- Alonso, H. & Roujeinikova, A. (2012) Characterization and two-dimensional crystallization of membrane component AlkB of the medium-chain alkane hydroxylase system from *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl Environ Microbiol* **78**, 7946-7953.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Antoni, D., Zverlov, V.V. & Schwarz, W.H. (2007) Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 23-35.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N. & Yeh, L.L. (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **32**, D115-D119.
- Auld, D.S. & Bergman, T. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3961-3970.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. & Ananthanarayan, L. (2009) Glucose oxidase – an overview. *Biotechnol Adv* **27**, 489-501.
- Bareither, R. & Pollard, D. (2011) A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnol Prog* **27**, 2-14.
- Bart, J.C.J. & Cavallaro, S. (2015) Transiting from adipic acid to bioadipic acid. Part II. Biosynthetic Pathways. *Ind Eng Chem Res* **54**, 567-576.

- Beardslee, T. & Picataggio, S. (2012) Bio-based adipic acid from renewable oils. *Lipid Technol* 24, 223-225.
- Benson, S. & Shapiro, J. (1976) Plasmid-determined alcohol dehydrogenase activity in alkane-utilizing strains of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 126, 794-798.
- Bergmeyer, H.U. (1975) Neue Werte für die molaren Extinktions-Koeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 13, 507-508.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- Bertrand, E., Sakai, R., Rozhkova-Novosad, E., Moe, L., Fox, B.G., Groves, J.T. & Austin, R.N. (2005) Reaction mechanisms of non-heme diiron hydroxylases characterized in whole cells. *J Inorg Biochem* 99, 1998-2006.
- Bimboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bisswanger, H. (2014) Enzyme assays. *Perspect Sci* 1, 41-55.
- Bommarius, A.S. & Paye, M.F. (2013) Stabilizing biocatalysts. *Chem Soc Rev* 42, 6534-6565.
- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C. & Robins, K. (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185-194.
- Bosetti, A., van Beilen, J.B., Preusting, H., Lageveen, R.G. & Witholt, B. (1992) Production of primary aliphatic alcohols with a recombinant *Pseudomonas* strain, encoding the alkane hydroxylase enzyme system. *Enzyme Microb Technol* 14, 702-708.
- Bozell, J.J. & Petersen, G.R. (2010) Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – the US Department of Energy's "top 10" revisited. *Green Chem* 12, 539-554.
- Bradbury, S.L. & Jakoby, W.B. (1972) Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2373-2376.
- Brehmer, B. (2013) Polyamides from biomass derived monomers. IN KABASCI, S. (Ed.) *Bio-based plastics: materials and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Breustedt, D.A. (2008) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung humaner Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie. Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.

- Brondani, P.B., Dudek, H.M., Martinoli, C., Mattevi, A. & Fraaije, M.W. (2014) Finding the switch: turning a baeyer-villiger monooxygenase into a NADPH oxidase. *J Am Chem Soc* 136, 16966-16969.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue – A high efficiency plasmid transforming RecA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Burton, S.G., Cowan, D.A. & Woodley, J.M. (2002) The search for the ideal biocatalyst. *Nat Biotech* 20, 37-45.
- Butzin, N.C., Owen, H.A. & Collins, M.L. (2010) A new system for heterologous expression of membrane proteins: *Rhodospirillum rubrum*. *Protein Expr Purif* 70, 88-94.
- Cannio, R., Rossi, M. & Bartolucci, S. (1994) A few amino acid substitutions are responsible for the higher thermostability of a novel NAD<sup>+</sup>-dependent bacillar alcohol dehydrogenase. *Eur J Biochem* 222, 345-352.
- Carmichael, A.B. & Wong, L.-L. (2001) Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur J Biochem* 268, 3117-3125.
- Cassimjee, K.E., Branneby, C., Abedi, V., Wells, A. & Berglund, P. (2010) Transaminations with isopropyl amine: equilibrium displacement with yeast alcohol dehydrogenase coupled to *in situ* cofactor regeneration. *Chem Commun* 46, 5569-5571.
- Cavener, D.R. (1992) GMC oxidoreductases: a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol* 223, 811-814.
- Ceccarelli, C., Liang, Z.-X., Strickler, M., Prehna, G., Goldstein, B.M., Klinman, J.P. & Bahnson, B.J. (2004) Crystal structure and amide H/D exchange of binary complexes of alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*: Insight into thermostability and cofactor binding. *Biochemistry* 43, 5266-5277.
- Chao, C.-C., Ma, Y.-S. & Stadtman, E.R. (1997) Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2969-2974.
- Chen, M.M.Y., Snow, C.D., Vizcarra, C.L., Mayo, S.L. & Arnold, F.H. (2012) Comparison of random mutagenesis and semi-rational designed libraries for improved cytochrome P450 BM3-catalyzed hydroxylation of small alkanes. *Protein Eng Des Sel* 25, 171-178.
- Chen, Q., Janssen, D.B. & Witholt, B. (1995) Growth on octane alters the membrane lipid fatty acids of *Pseudomonas oleovorans* due to the induction of *alkB* and synthesis of octanol. *J Bacteriol* 177, 6894-6901.

- Chen, Y. & Nielsen, J. (2013) Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks. *Curr Opin Biotechnol* 24, 965-972.
- Cheng, K.-K., Zhao, X.-B., Zeng, J., Wu, R.-C., Xu, Y.-Z., Liu, D.-H. & Zhang, J.-A. (2012) Downstream processing of biotechnological produced succinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 95, 841-850.
- Coffman, D.D., Cox, N.L., Martin, E.L., Mochel, W.E. & Van Natta, F.J. (1948) Polymeric amides from omega-amino acids. *J Polym Sci B Polym Phys* 3, 85-95.
- Cok, B., Tsiropoulos, I., Roes, A.L. & Patel, M.K. (2014) Succinic acid production derived from carbohydrates: an energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels Bioprod Biorefin* 8, 16-29.
- Conley, B.L., Tenn III, W.J., Young, K.h.J.H., Ganesh, S.K., Meier, S.K., Ziatdinov, V.R., Mironov, O., Oxgaard, J., Gonzales, J., Goddard III, W.A. & Periana, R.A. (2006) Design and study of homogeneous catalysts for the selective, low temperature oxidation of hydrocarbons. *J Mol Catal A Chem* 251, 8-23.
- Cooke, H.A., Peck, S.C., Evans, B.S. & van der Donk, W.A. (2012) Mechanistic investigation of methylphosphonate synthase, a non-heme iron-dependent oxygenase. *J Am Chem Soc* 134, 15660-15663.
- Coon, M.J. (2005) Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 378-385.
- Cooper, H.L., Mishra, G., Huang, X., Pender-Cudlip, M., Austin, R.N., Shanklin, J. & Groves, J.T. (2012) Parallel and competitive pathways for substrate desaturation, hydroxylation, and radical rearrangement by the non-heme diiron hydroxylase AlkB. *J Am Chem Soc* 134, 20365-20375.
- Cyranoski, D. (2012) China's patent boom brings legal wrangles. *Nature* 492, 323.
- Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D. & von Heijne, G. (2005) Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* 308, 1321-1323.
- Dancey, G.F., Levine, A.E. & Shapiro, B.M. (1976) The NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Escherichia coli*. I. Properties of the membrane-bound enzyme, its solubilization, and purification to near homogeneity. *J Biol Chem* 251, 5911-5920.
- de Jong, E., Higson, A., Walsh, P. & Wellisch, M. (2012) Product developments in the bio-based chemicals arena. *Biofuels Bioprod Biorefin* 6, 606-624.

- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Palo Alto, CA, Delano Scientific.
- Donike, M. (1969) N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. *J Chromatogr A* 42, 103-104.
- Dror, A. & Fishman, A. (2012) Engineering non-heme mono- and dioxygenases for biocatalysis. *Comput Struct Biotechnol J* 2, 1-12.
- Eirich, L.D., Craft, D.L., Steinberg, L., Asif, A., Eschenfeldt, W.H., Stols, L., Donnelly, M.I. & Wilson, C.R. (2004) Cloning and characterization of three fatty alcohol oxidase genes from *Candida tropicalis* strain ATCC 20336. *Appl Environ Microbiol* 70, 4872-4879.
- Engel, P.C. (1981) Butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Methods Enzymol* 71, 359-366.
- Erickson, B., Nelson, J.E. & Winters, P. (2012) Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnol J* 7, 176-185.
- Falbe, J., Bahrmann, H., Lipps, W., Mayer, D. & Frey, G.D. (2013) Alcohols, Aliphatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Fan, F., Ghanem, M. & Gadda, G. (2004) Cloning, sequence analysis, and purification of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*: a bacterial enzyme involved in osmotic stress tolerance. *Arch Biochem Biophys* 421, 149-158.
- Fasan, R., Chen, M.M., Crook, N.C. & Arnold, F.H. (2007) Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450<sub>BM3</sub> exhibiting natively like catalytic properties. *Angew Chem Int Ed Engl* 46, 8414-8418.
- Feenstra, K.A., Starikov, E.B., Urlacher, V.B., Commandeur, J.N.M. & Vermeulen, N.P.E. (2007) Combining substrate dynamics, binding statistics, and energy barriers to rationalize regioselective hydroxylation of octane and lauric acid by CYP102A1 and mutants. *Protein Sci* 16, 420-431.
- Fiorentino, G., Cannio, R., Rossi, M. & Bartolucci, S. (1998) Decreasing the stability and changing the substrate specificity of the *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase by single amino acid replacements. *Protein Eng* 11, 925-930.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.

- Fortman, G.C., Boaz, N.C., Munz, D., Konnick, M.M., Periana, R.A., Groves, J.T. & Gunnoe, T.B. (2014) Selective monooxidation of light alkanes using chloride and iodate. *J Am Chem Soc* 136, 8393-8401.
- Frishman, D. & Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* 23, 566-579.
- Gadda, G. (2003) Kinetic mechanism of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochim Biophys Acta* 1646, 112-118.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- Gebauer, M. (2013) Kombinatorisches Design und funktionelle Charakterisierung von Anticalinen gegen die Extra-Domäne B in onkofetalem Fibronectin. Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Geueke, B., Riebel, B. & Hummel, W. (2003) NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme Microb Technol* 32, 205-211.
- Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.M. & Mayhew, S.G. (1974) Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. *Biochemistry* 13, 589-597.
- Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Wathelet, J.-P., Du Jardin, P. & Thonart, P. (2010) The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnol Agron Soc Environ* 14, 451-460.
- Gill, S.C. & Von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gorsky, L.D., Koop, D.R. & Coon, M.J. (1984) On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *J Biol Chem* 259, 6812-6817.
- Goswami, P., Chinnadayala, S.S., Chakraborty, M., Kumar, A.K. & Kakoti, A. (2013) An overview on alcohol oxidases and their potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4259-4275.
- Graham, S.E. & Peterson, J.A. (1999) How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys* 369, 24-29.
- Grant, C., da Silva Damas Pinto, A.C., Lui, H.-P., Woodley, J.M. & Baganz, F. (2012) Tools for characterizing the whole-cell bio-oxidation of alkanes at microscale. *Biotechnol Bioeng* 109, 2179-2189.

- Grant, C., Woodley, J.M. & Baganz, F. (2011) Whole-cell bio-oxidation of *n*-dodecane using the alkane hydroxylase system of *P. putida* GPO1 expressed in *E. coli*. *Enzyme Microb Technol* 48, 480-486.
- Green, E.M. (2011) Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Curr Opin Biotechnol* 22, 337-343.
- Gröger, H. (2014) Hydroxy functionalization of non-activated C–H and C=C bonds: new perspectives for the synthesis of alcohols through biocatalytic processes. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 3067-3069.
- Groves, J.T. (2003) The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3569-3574.
- Grund, A., Shapiro, J., Fennewald, M., Bacha, P., Leahy, J., Markbreiter, K., Nieder, M. & Toepfer, M. (1975) Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 123, 546-556.
- Guagliardi, A., Matilde, M., Ingram, I., De Rosa, M., Rossi, M. & Bartolucci, S. (1996) Purification and characterization of the alcohol dehydrogenase from a novel strain of *Bacillus stearothermophilus* growing at 70°C. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 239-246.
- Gudimichi, R.K., Randall, C., Opperman, D.J., Olaofe, O.A., Harrison, S.T., Albertyn, J. & Smit, M.S. (2012) Whole-cell hydroxylation of *n*-octane by *Escherichia coli* strains expressing the *CYP153A6* operon. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 1507-1516.
- Guterl, J.K., Garbe, D., Carsten, J., Steffler, F., Sommer, B., Reisse, S., Philipp, A., Haack, M., Ruhmann, B., Koltermann, A., Ketting, U., Bruck, T. & Sieber, V. (2012) Cell-free metabolic engineering: production of chemicals by minimized reaction cascades. *ChemSusChem* 5, 2165-2172.
- Hanekom, A.J., Hofmeyr, J.H.S., Snoep, J.L. & Rohwer, J.M. (2006) Experimental evidence for allosteric modifier saturation as predicted by the bi-substrate Hill equation. *Syst Biol (Stevenage)* 153, 342-345.
- Hashimoto, K., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S. & Kanehisa, M. (2008) The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *J Lipid Res* 49, 183-191.
- Hefti, M.H., Milder, F.J., Boeren, S., Vervoort, J. & van Berkel, W.J. (2003) A His-tag based immobilization method for the preparation and reconstitution of apoflavoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1619, 139-143.
- Helwani, Z., Othman, M.R., Aziz, N., Kim, J. & Fernando, W.J.N. (2009) Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: a review. *Appl Catal A Gen* 363, 1-10.

- Henriksson, G., Johansson, G. & Pettersson, G. (2000) A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J Biotechnol* 78, 93-113.
- Hernandez-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V. & Martinez, A.T. (2012) Role of active site histidines in the two half-reactions of the aryl-alcohol oxidase catalytic cycle. *Biochemistry* 51, 6595-6608.
- Herrick, D.Z., Sterbling, S., Rasch, K.A., Hinderliter, A. & Cafiso, D.S. (2006) Position of synaptotagmin I at the membrane interface: cooperative interactions of tandem C2 domains. *Biochemistry* 45, 9668-9674.
- Hilditch, T.P. (1949) The chemical constitution of natural fats. *Br J Nutr* 3, 347-354.
- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8247-8251.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Hollmann, F., Arends, I.W.C.E. & Buehler, K. (2010) Biocatalytic redox reactions for organic synthesis: nonconventional regeneration methods. *ChemCatChem* 2, 762-782.
- Hong, J., Radojcic, D., Ionescu, M., Petrovic, Z.S. & Eastwood, E. (2014) Advanced materials from corn: isosorbide-based epoxy resins. *Polym Chem* 5, 5360-5368.
- Illanes, A. (1999) Stability of biocatalysts. *Electron J Biotechnol* 2, 1-10.
- Iyanagi, T. (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol* 260, 35-112.
- Iyer, P.V. & Ananthanarayan, L. (2008) Enzyme stability and stabilization – aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem* 43, 1019-1032.
- Izai, K., Uchida, Y., Orii, T., Yamamoto, S. & Hashimoto, T. (1992) Novel fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 267, 1027-1033.
- Johnson, K.A. & Goody, R.S. (2011) The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry* 50, 8264-8269.
- Jörnvall, H. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* 65, 3873-3878.
- Julsing, M.K., Cornelissen, S., Bühler, B. & Schmid, A. (2008) Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr Opin Chem Biol* 12, 177-186.

- Julsing, M.K., Schrewe, M., Cornelissen, S., Hermann, I., Schmid, A. & Bühler, B. (2012) Outer membrane protein AlkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* 78, 5724-5733.
- Kakoti, A., Kumar, A.K. & Goswami, P. (2012) Microsome-bound alcohol oxidase catalyzed production of carbonyl compounds from alcohol substrates. *J Mol Catal B Enzym* 78, 98-104.
- Kara, S., Schrittwieser, J.H., Hollmann, F. & Ansorge-Schumacher, M.B. (2014) Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 1517-1529.
- Kawai, F., Kimura, T., Tani, Y., Yamada, H. & Kurachi, M. (1980) Purification and characterization of polyethylene glycol dehydrogenase involved in the bacterial metabolism of polyethylene glycol. *Appl Environ Microbiol* 40, 701-705.
- Keinan, E., Hafeli, E.K., Seth, K.K. & Lamed, R. (1986) Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *J Am Chem Soc* 108, 162-169.
- Kiess, M., Hecht, H.-J. & Kalisz, H.M. (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Eur J Biochem* 252, 90-99.
- Koch, D.J., Chen, M.M., van Beilen, J.B. & Arnold, F.H. (2009) In vivo evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6. *Appl Environ Microbiol* 75, 337-344.
- Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M.P., Raatjes, P., Kingma, J., van Lelyveld, P.H. & Witholt, B. (1989) The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression. *J Biol Chem* 264, 5435-5441.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E.L.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567-580.
- Kroha, K. (2004) Industrial biotechnology provides opportunities for commercial production of long-chain dibasic acids. *Inform* 15, 568-571.
- Kurian, V.J. (2005) A new polymer platform for the future – Sorona® from corn derived 1,3-propanediol. *J Polym Environ* 13, 159-167.
- Labinger, J.A. (2004) Selective alkane oxidation: hot and cold approaches to a hot problem. *J Mol Catal A Chem* 220, 27-35.

- Ladkau, N., Hermann, I., Bühler, B. & Schmid, A. (2011) Enzyme-catalyzed lauro lactam synthesis via intramolecular amide bond formation in aqueous solution. *Adv Synth Catal* 353, 2501-2510.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lange, S.J. & Que Jr, L. (1998) Oxygen activating nonheme iron enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 2, 159-172.
- le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 1508, 86-111.
- Lee, H.J., Lian, L.Y. & Scrutton, N.S. (1997) Recombinant two-iron rubredoxin of *Pseudomonas oleovorans*: overexpression, purification and characterization by optical, CD and  $^{113}\text{Cd}$  NMR spectroscopies. *Biochem J* 328, 131-136.
- Lee, K. (1999) Benzene-induced uncoupling of naphthalene dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 181, 2719-2725.
- Lerchner, A., Achatz, S., Rausch, C., Haas, T. & Skerra, A. (2013) Coupled enzymatic alcohol-to-amine conversion of isosorbide using engineered transaminases and dehydrogenases. *ChemCatChem* 5, 3374-3383.
- Lerchner, A., Jarasch, A. & Skerra, A. (2015) Engineering of alanine dehydrogenase from *Bacillus subtilis* for novel cofactor specificity. *Biotechnol Appl Biochem* 23, 616-624.
- Leung, D.W., Chen, E. & Goeddel, D.V. (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15.
- Li, H. & Poulos, T.L. (1997) The structure of the cytochrome P450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Mol Biol* 4, 140-146.
- Li, Q.-S., Ogawa, J., Schmid, R.D. & Shimizu, S. (2001) Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 67, 5735-5739.
- Li, S., Schöneich, C. & Borchardt, R.T. (1995) Chemical instability of protein pharmaceuticals: mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol Bioeng* 48, 490-500.
- Littlechild, J.A., Guy, M.N. & Isupov, M.N. (2004) Hyperthermophilic dehydrogenase enzymes. *Biochem Soc Trans* 32, 255-258.

- Lode, E.T. & Coon, M.J. (1971) Enzymatic  $\omega$ -oxidation: V. Forms of *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin containing one or two iron atoms: structure and function in  $\omega$ -hydroxylation. *J Biol Chem* 246, 791-802.
- Lopez-Gallego, F. & Schmidt-Dannert, C. (2010) Multi-enzymatic synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 14, 174-183.
- Lumry, R., Biltonen, R. & Brandts, J.F. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.
- Luo, D., Smith, S.W. & Anderson, B.D. (2005) Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J Pharm Sci* 94, 304-316.
- Maeda, Y., Doubayashi, D., Oki, M., Nose, H., Sakurai, A., Isa, K., Fujii, Y. & Uchida, H. (2009) Expression in *Escherichia coli* of an unnamed protein gene from *Aspergillus oryzae* RIB40 and cofactor analyses of the gene product as formate oxidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 2645-2649.
- Mahmoudian, M. (2014) Special feature biocatalysis: the green factor. *Org Process Res Dev* 18, 751-751.
- Maklashina, E. & Cecchini, G. (1999) Comparison of catalytic activity and inhibitors of quinone reactions of succinate dehydrogenase (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and fumarate reductase (menaquinol-fumarate oxidoreductase) from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 369, 223-232.
- Margoliash, E. & Frohwirt, N. (1959) Spectrum of horse-heart cytochrome c. *Biochem J* 71, 570-572.
- Marshall, S.A., Lazar, G.A., Chirino, A.J. & Desjarlais, J.R. (2003) Rational design and engineering of therapeutic proteins. *Drug Discov Today* 8, 212-221.
- Martin, J. (2015) Optimierung des Alk-Oxidationssystems zur  $\omega$ -Hydroxy-Funktionalisierung von Alkanen mittels *Protein Engineering*. Master Thesis. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Massey, V. & Palmer, G. (1966) On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones. *Biochemistry* 5, 3181-3189.
- Matsushita, K., Yamada, M., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1980) Function of ubiquinone in the electron transport system of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. *J Biochem* 88, 757-764.
- McIntire, W.S. (1990) Trimethylamine dehydrogenase from bacterium W3A1. *Methods Enzymol* 188, 250-260.

- McKenna, E.J. & Coon, M.J. (1970) Enzymatic  $\omega$ -oxidation. IV. Purification and properties of the  $\omega$ -hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J Biol Chem* 245, 3882-3889.
- Meier, M.M., Rajendran, C., Malisi, C., Fox, N.G., Xu, C., Schlee, S., Barondeau, D.P., Höcker, B., Sterner, R. & Raushel, F.M. (2013) Molecular engineering of organophosphate hydrolysis activity from a weak promiscuous lactonase template. *J Am Chem Soc* 135, 11670-11677.
- Melén, K., Krogh, A. & von Heijne, G. (2003) Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. *J Mol Biol* 327, 735-744.
- Mérel, D.S., Do, M.L.T., Gaillard, S., Dupau, P. & Renaud, J.-L. (2015) Iron-catalyzed reduction of carboxylic and carbonic acid derivatives. *Coord Chem Rev* 288, 50-68.
- Metzger, J.O. & Bornscheuer, U. (2006) Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 13-22.
- Miroux, B. & Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289-298.
- Møller, J.V. & le Maire, M. (1993) Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J Biol Chem* 268, 18659-18672.
- Mugo, A.N., Kobayashi, J., Yamasaki, T., Mikami, B., Ohnishi, K., Yoshikane, Y. & Yagi, T. (2013) Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*. *Biochim Biophys Acta* 1834, 953-963.
- Naing, S.H., Parvez, S., Pender-Cudlip, M., Groves, J.T. & Austin, R.N. (2013) Substrate specificity and reaction mechanism of purified alkane hydroxylase from the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* (AbAlkB). *J Inorg Biochem* 121, 46-52.
- Nakamura, C.E. & Whited, G.M. (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14, 454-459.
- Napora-Wijata, K., Strohmeier, G.A. & Winkler, M. (2014) Biocatalytic reduction of carboxylic acids. *Biotechnol J* 9, 822-843.
- Nie, Y., Liang, J., Fang, H., Tang, Y.Q. & Wu, X.L. (2011) Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain *n*-alkane degradation. *Appl Environ Microbiol* 77, 7279-7288.

- Nov, Y. (2012) When second best is good enough: another probabilistic look at saturation mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 78, 258-262.
- Ohta, T., Kawabata, T., Nishikawa, K., Tani, A., Kimbara, K. & Kawai, F. (2006) Analysis of amino acid residues involved in catalysis of polyethylene glycol dehydrogenase from *Sphingopyxis terrae*, using three-dimensional molecular modeling-based kinetic characterization of mutants. *Appl Environ Microbiol* 72, 4388-4396.
- Okabe, H., Uji, Y., Nagashima, K. & Noma, A. (1980) Enzymic determination of free fatty acids in serum. *Clin Chem* 26, 1540-1543.
- Omasits, U., Ahrens, C.H., Müller, S. & Wollscheid, B. (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30, 884-886.
- Opperman, D.J. & Reetz, M.T. (2010) Towards practical Baeyer-Villiger-monooxygenases: design of cyclohexanone monooxygenase mutants with enhanced oxidative stability. *ChemBioChem* 11, 2589-2596.
- Orbegozo, T., Lavandera, I., Fabian, W.M.F., Mautner, B., de Vries, J.G. & Kroutil, W. (2009) Biocatalytic oxidation of benzyl alcohol to benzaldehyde via hydrogen transfer. *Tetrahedron* 65, 6805-6809.
- Otte, K.B. & Hauer, B. (2015) Enzyme engineering in the context of novel pathways and products. *Curr Opin Biotechnol* 35, 16-22.
- Otte, K.B., Kirtz, M., Nestl, B.M. & Hauer, B. (2013) Synthesis of 9-oxononanoic acid, a precursor for biopolymers. *ChemSusChem* 6, 2149-2156.
- Padan, E., Hunte, C. & Reiländer, H. (2003) Production and purification of recombinant membrane proteins. IN HUNTE, C., VON JAGOW, G. & SCHÄGGER, H. (Eds.) *Membrane protein purification and crystallization: a practical guide*. Elsevier, San Diego.
- Park, S.-Y., Yokoyama, T., Shibayama, N., Shiro, Y. & Tame, J.R.H. (2006) 1.25 Å resolution crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbonmonoxy forms. *J Mol Biol* 360, 690-701.
- Pennacchio, A., Giordano, A., Rossi, M. & Raia, C.A. (2011) Asymmetric reduction of  $\alpha$ -keto esters with *Thermus thermophilus* NADH-dependent carbonyl reductase using glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase for cofactor regeneration. *European J Org Chem* 2011, 4361-4366.
- Pennacchio, A., Rossi, M. & Raia, C.A. (2013a) Synthesis of cinnamyl alcohol from cinnamaldehyde with *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase as the

- isolated enzyme and in recombinant *E. coli* cells. *Appl Biochem Biotechnol* 170, 1482-1490.
- Pennacchio, A., Sannino, V., Sorrentino, G., Rossi, M., Raia, C.A. & Esposito, L. (2013b) Biochemical and structural characterization of recombinant short-chain NAD(H)-dependent dehydrogenase/reductase from *Sulfolobus acidocaldarius* highly enantioselective on diaryl diketone benzil. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3949-3964.
- Peretz, M., Weiner, L.M. & Burstein, Y. (1997) Cysteine reactivity in *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase. *Protein Sci* 6, 1074-1083.
- Periana, R.A., Bhalla, G., Tenn III, W.J., Young, K.J.H., Liu, X.Y., Mironov, O., Jones, C.J. & Ziatdinov, V.R. (2004) Perspectives on some challenges and approaches for developing the next generation of selective, low temperature, oxidation catalysts for alkane hydroxylation based on the CH activation reaction. *J Mol Catal A Chem* 220, 7-25.
- Perry, L.J. & Wetzel, R. (1987) The role of cysteine oxidation in the thermal inactivation of T4 lysozyme. *Protein Eng* 1, 101-105.
- Peters, D. (2007) Raw Materials. IN ULBER, R. & SELL, D. (Eds.) *White Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin.
- Peters, J. & Witholt, B. (1994) Solubilization of the overexpressed integral membrane protein alkane monooxygenase of the recombinant *Escherichia coli* W3110[pGEc47]. *Biochim Biophys Acta* 1196, 145-153.
- Peterson, J.A., Basu, D. & Coon, M.J. (1966) Enzymatic  $\omega$ -oxidation: I. Electron carriers in fatty acid and hydrocarbon hydroxylation. *J Biol Chem* 241, 5162-5164.
- Peterson, J.A. & Coon, M.J. (1968) Enzymatic  $\omega$ -oxidation: III. Purification and properties of rubredoxin, a component of the  $\omega$ -hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem* 243, 329-334.
- Pollegioni, L., Piubelli, L. & Molla, G. (2009) Cholesterol oxidase: biotechnological applications. *FEBS J* 276, 6857-6870.
- Prather, K.L.J. & Martin, C.H. (2008) De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol* 19, 468-474.
- Prive, G.G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41, 388-397.
- Quaye, O., Lountos, G.T., Fan, F., Orville, A.M. & Gadda, G. (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47, 243-256.

- Raab, A.n.M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D. & Lang, C. (2010) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metab Eng* 12, 518-525.
- Ramu, R., Chang, C.-W., Chou, H.-H., Wu, L.-L., Chiang, C.-H. & Yu, S.S.F. (2011) Regio-selective hydroxylation of gem-difluorinated octanes by alkane hydroxylase (AlkB). *Tetrahedron Lett* 52, 2950-2953.
- Raum, A.L.J. & Thukral, P.S. (1971) Polyamides from isophorone diamine, hexamethylene diamine, isophthalic acid and terephthalic acid. US3627736 A.
- Rojo, F. (2005) Specificity at the end of the tunnel: understanding substrate length discrimination by the AlkB alkane hydroxylase. *J Bacteriol* 187, 19-22.
- Rossmann, M.G., Moras, D. & Olsen, K.W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194-199.
- Rui, Z., Li, X., Zhu, X., Liu, J., Domigan, B., Barr, I., Cate, J.H. & Zhang, W. (2014) Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 18237-18242.
- Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Martinez, M.J. & Martinez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Protein Expr Purif* 45, 191-199.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. & Erlich, H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Sattler, J.H., Fuchs, M., Tauber, K., Mutti, F.G., Faber, K., Pfeffer, J., Haas, T. & Kroutil, W. (2012) Redox self-sufficient biocatalyst network for the amination of primary alcohols. *Angew Chem Int Ed Engl* 51, 9156-9159.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. & Branduardi, P. (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol* 26, 100-108.
- Saxena, R.K., Anand, P., Saran, S. & Isar, J. (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv* 27, 895-913.
- Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson, G., Christie, W.W., Shewry, P.R. & Napier, J.A. (1997) Expression of a borage desaturase cDNA

- containing an N-terminal cytochrome *b*<sub>5</sub> domain results in the accumulation of high levels of  $\Delta^6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4211-4216.
- Schaffer, S. & Haas, T. (2014) Biocatalytic and fermentative production of  $\alpha,\omega$ -bifunctional polymer precursors. *Org Process Res Dev* **18**, 752-766.
- Scheps, D., Malca, S.H., Richter, S.M., Marisch, K., Nestl, B.M. & Hauer, B. (2013) Synthesis of  $\omega$ -hydroxy dodecanoic acid based on an engineered CYP153A fusion construct. *Microb Biotechnol* **6**, 694-707.
- Schlapschy, M. (2002) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)<sub>2</sub>-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – a so-called ‘anticalin’ – using a molecular random approach. *Biophys Chem* **96**, 213-228.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535.
- Schmitt, J., Hess, H. & Stunnenberg, H.G. (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* **18**, 223-230.
- Schneider, S., Wubbolts, M.G., Oesterhelt, G., Sanglard, D. & Witholt, B. (1999) Controlled regioselectivity of fatty acid oxidation by whole cells producing cytochrome P450<sub>BM-3</sub> monooxygenase under varied dissolved oxygen concentrations. *Biotechnol Bioeng* **64**, 333-341.
- Scholten, E. & Dägele, D. (2008) Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnol Lett* **30**, 2143-2146.
- Schomburg, I., Chang, A. & Schomburg, D. (2002) BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res* **30**, 47-49.
- Schrewe, M., Julsing, M.K., Lange, K., Czarnotta, E., Schmid, A. & Bühler, B. (2014) Reaction and catalyst engineering to exploit kinetically controlled whole-cell multistep biocatalysis for terminal FAME oxyfunctionalization. *Biotechnol Bioeng* **111**, 1820-1830.
- Schrewe, M., Ladkau, N., Bühler, B. & Schmid, A. (2013) Direct terminal alkylamino-functionalization via multistep biocatalysis in one recombinant whole-cell catalyst. *Adv Synth Catal* **355**, 1693-1697.

- Schrewe, M., Magnusson, A.O., Willrodt, C., Bühler, B. & Schmid, A. (2011) Kinetic analysis of terminal and unactivated C-H bond oxyfunctionalization in fatty acid methyl esters by monooxygenase-based whole-cell biocatalysis. *Adv Synth Catal* **353**, 3485-3495.
- Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B.G. & Münck, E. (1997) Mössbauer studies of alkane  $\omega$ -hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2981-2986.
- Shanklin, J. & Cahoon, E.B. (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 611-641.
- Shanklin, J. & Whittle, E. (2003) Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane  $\omega$ -hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. *FEBS Lett* **545**, 188-192.
- Shanklin, J., Whittle, E. & Fox, B.G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**, 12787-12794.
- Shim, E.-J., Sang-Hoon, J. & Kwang-Hoon, K. (2003) Overexpression, purification and biochemical characterization of the thermostable NAD-dependent alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Microbiol Biotechnol* **13**, 738-744.
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Bio/Technology* **9**, 273-278.
- Slavica, A., Dib, I. & Nidetzky, B. (2005) Single-site oxidation, cysteine 108 to cysteine sulfinic acid, in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its structural and functional consequences. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8061-8068.
- Smith, S.M., Rawat, S., Telsler, J., Hoffman, B.M., Stemmler, T.L. & Rosenzweig, A.C. (2011) Crystal structure and characterization of particulate methane monooxygenase from *Methylocystis* species Strain M. *Biochemistry* **50**, 10231-10240.
- Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, W244-248.
- Staijen, I.E., Van Beilen, J.B. & Witholt, B. (2000) Expression, stability and performance of the three-component alkane mono-oxygenase of *Pseudomonas oleovorans* in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **267**, 1957-1965.

- Staudt, S., Burda, E., Giese, C., Müller, C.A., Marienhagen, J., Schwaneberg, U., Hummel, W., Drauz, K. & Gröger, H. (2013) Direct oxidation of cycloalkanes to cycloalkanones with oxygen in water. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 2359-2363.
- Steverding, D. (2010) Fermentative Biotechnologie. Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. *Chem. unserer Zeit* 44, 384-389.
- Straathof, A.J.J. (2014) Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chem Rev* 114, 1871-1908.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Sushkevich, V.L., Ivanova, I.I. & Taarning, E. (2015) Ethanol conversion into butadiene over Zr-containing molecular sieves doped with silver. *Green Chem* 17, 2552-2559.
- Taber, D.F. & Straney, P.J. (2010) The Synthesis of lauro lactam from cyclododecanone via a Beckmann rearrangement. *J Chem Educ* 87, 1392-1392.
- Tan, S., Tan, H.T. & Chung, M.C.M. (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 8, 3924-3932.
- Tokuriki, N., Stricher, F., Serrano, L. & Tawfik, D.S. (2008) How protein stability and new functions trade off. *PLoS Comput Biol* 4, e1000002.
- Torres Pazmiño, D.E., Winkler, M., Glieder, A. & Fraaije, M.W. (2010) Monooxygenases as biocatalysts: classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *J Biotechnol* 146, 9-24.
- Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M. & Woodley, J.M. (2010) Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org Process Res Dev* 15, 266-274.
- Ueda, T. & Coon, M.J. (1972) Enzymatic  $\omega$ -oxidation: VII. Reduced dephosphoryridine nucleotide-rubredoxin reductase: properties and functions as electron carrier in  $\omega$ -hydroxylation. *J Biol Chem* 247, 5010-5016.
- Ulmschneider, M.B., Sansom, M.S.P. & Di Nola, A. (2005) Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* 59, 252-265.
- Urbani, A. & Warne, T. (2005) A colorimetric determination for glycosidic and bile salt-based detergents: applications in membrane protein research. *Anal Biochem* 336, 117-124.
- Vagenende, V., Yap, M.G.S. & Trout, B.L. (2009) Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* 48, 11084-11096.

- van Beilen, J.B., Duetz, W.A., Schmid, A. & Witholt, B. (2003) Practical issues in the application of oxygenases. *Trends Biotechnol* 21, 170-177.
- van Beilen, J.B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. & Witholt, B. (1992a) DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* 6, 3121-3136.
- van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Rothlisberger, M. & Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* 147, 1621-1630.
- van Beilen, J.B., Penninga, D. & Witholt, B. (1992b) Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J Biol Chem* 267, 9194-9201.
- van Beilen, J.B., Smits, T.H.M., Roos, F.F., Brunner, T., Balada, S.B., Röthlisberger, M. & Witholt, B. (2005) Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *J Bacteriol* 187, 85-91.
- van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G. & Witholt, B. (1994) Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegrad* 5, 161-174.
- van der Donk, W.A. & Zhao, H. (2003) Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 14, 421-426.
- Van Dien, S. (2013) From the first drop to the first truckload: commercialization of microbial processes for renewable chemicals. *Curr Opin Biotechnol* 24, 1061-1068.
- Vick, B.A. & Zimmerman, D.C. (1976) Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol* 57, 780-788.
- Vogt, W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 18, 93-105.
- von Heijne, G. (2006) Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 909-918.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 10, 975-982.
- Vrielink, A. & Ghisla, S. (2009) Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. *FEBS J* 276, 6826-6843.
- Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A.J., Klussmeier, A., Wagner, C.S., Nord, O., Nygren, P.-Å., van Wijk, K.J. & de Gier, J.-W. (2007) Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* 6, 1527-1550.

- Walsh, C.T. & Wencewicz, T.A. (2013) Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep* 30, 175-200.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. & Barton, G.J. (2009) Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- Weiner, J.H. & Li, L. (2008) Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1698-1713.
- Weuster-Botz, D. (2005) Parallel reactor systems for bioprocess development. IN KRAGL, U. (Ed.) *Technology Transfer in Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin.
- Whitehouse, C.J., Bell, S.G. & Wong, L.L. (2012) P450<sub>BM3</sub> (CYP102A1): connecting the dots. *Chem Soc Rev* 41, 1218-1260.
- Whitmore, L. & Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32, 668-673.
- Whittington, D.A. & Lippard, S.J. (2001) Crystal structures of the soluble methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) demonstrating geometrical variability at the dinuclear iron active site. *J Am Chem Soc* 123, 827-838.
- Wong, T.S., Roccatano, D. & Schwaneberg, U. (2007) Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environ Microbiol* 9, 2645-2659.
- Wu, H., Tian, C., Song, X., Liu, C., Yang, D. & Jiang, Z. (2013) Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chem*, 1773-1789.
- Xie, M., Alonso, H. & Roujeinikova, A. (2011) An improved procedure for the purification of catalytically active alkane hydroxylase from *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl Biochem Biotechnol* 165, 823-831.
- Yu, C.L., Kale, Y., Gopishetty, S., Louie, T.M. & Subramanian, M. (2008) A novel caffeine dehydrogenase in *Pseudomonas* sp. strain CBB1 oxidizes caffeine to trimethyluric acid. *J Bacteriol* 190, 772-776.
- Yu, D. (2013) Bericht zum Segment Specialty Materials. *Capital Markets Day, 03.09.2013*. Essen, Evonik Industries AG.
- Yu, K., Hu, S., Huang, J. & Mei, L.H. (2011) A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase. *Enzyme Microb Technol* 49, 272-276.

- Zannoni, D.D. (1989) The respiratory chains of pathogenic pseudomonads. *Biochim Biophys Acta* 975, 299-316.
- Zeikus, J.G., Jain, M.K. & Elankovan, P. (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 545-552.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.-L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* 32, e115.
- Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C. & Brandt, U. (2015) Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* 347, 44-49.

## **Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Arne Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Erding, den 12. Mai 2017

Ludwig Kirmair