

INHALTSVERZEICHNIS

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

INHALTSVERZEICHNIS

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

4.2	Konzepte für den Zugang zu (S)-2-Hydroxypropioiphenon-Derivaten	87
4.2.1	Optimierung der Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> mittels zielgerichteter Mutagenese	87
4.2.2	Biochemische Charakterisierung der <i>PpBFDL461G</i> -Variante	90
4.2.2.1	Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der <i>PpBDFL461G</i> -Variante	90
4.2.2.2	Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>PpBDFL461G</i> -Variante	95
4.2.2.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>PpBFDL461G</i> -Variante	96
4.2.2.4	Carboligaseaktivität der <i>PpBFDL461G</i> -Variante	98
4.2.3	Fazit: Erweiterung der Enzym- <i>Toolbox</i> mit (S)-2-Hydroxypropioiphenon-Derivaten	103
4.3	Kombination struktureller und funktionaler Informationen der <i>PpBFD</i>	104
4.3.1	Herstellung von <i>PpBFD</i> -Doppelvarianten	106
4.3.1.1	Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>PpBFD</i> -Doppelvarianten	106
4.3.1.2	Carboligaseaktivität der <i>PpBFD</i> -Doppelvarianten	107
4.3.2	Fazit: Hinweise auf einen alternativen Weg für die Synthese von (S)-2-Hydroxyketonen in der <i>PpBFD</i>	112
4.4	Konzepte für den Zugang zu (S)-Phenylacetylcarbinol-Derivaten.....	113
4.4.1	Optimierung der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Acetobacter pasteurianus</i> mittels zielgerichteter Mutagenese	113
4.4.2	Varianten im Bereich der <i>ApPDC</i> -Donor-Bindestelle	113
4.4.3	Biochemische Charakterisierung der <i>ApPDC</i> -Varianten im Bereich der Donor-Bindestelle <i>ApPDCW388A/I</i>	114
4.4.3.1	Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten	114
4.4.3.2	Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten	118
4.4.3.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten	121
4.4.3.4	Carboligaseaktivität der <i>ApPDCW388A/I</i> -Varianten	122
4.4.4	Fazit: Hinweise auf einen alternativen Weg für die Synthese von (S)-2-Hydroxyketonen in der <i>ApPDC</i>	126
4.4.5	Varianten im Bereich der <i>ApPDC</i> -Akzeptor-Bindestelle	127
4.4.6	Biochemische Charakterisierung der <i>ApPDC</i> -Varianten im Bereich der Akzeptor-Bindestelle (<i>ApPDCE469D/Q/G</i> ; <i>ApPDCI468A</i>)	127
4.4.6.1	Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>ApPDCE469D/Q/G</i> -Varianten	127
4.4.6.2	Untersuchung des Decarboxylase-Substratspektrums der <i>ApPDCI468A</i> -Variante	129
4.4.6.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der <i>ApPDCE469D/Q/G</i> - und <i>ApPDCI468A</i> -Varianten	131
4.4.6.4	Einfluss äußerer Faktoren auf die Decarboxylaseaktivität der <i>ApPDCE469G</i> -Variante	133
4.4.6.5	Carboligaseaktivität der <i>ApPDCE469D/Q/G</i> - und <i>ApPDCI468A</i> -Varianten	137
4.4.7	Fazit: Erstmalige enzymatische Synthese von (S)-Phenylacetylcarbinol möglich	143
4.5	Kombination struktureller und funktionaler Informationen der <i>ApPDC</i>	144
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	147
6	CONCLUSION AND OUTLOOK	151
7	LITERATURVERZEICHNIS	155