
**Hochselektive Bioaktivierung von Plattform-Intermediaten: Molekulares
Screening, funktionale Überexpression und umweltfreundliche
elektrochemische Verfahren
AZ 13123**

Projektkoordinator:

*Prof. Dr. Andreas Schmid
Lehrstuhl für Biotechnik, Universität Dortmund*

Bewilligungsempfänger:

*Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg
Biochemical Engineering, International University Bremen*
seit 2007 Jacobs University Bremen

Projektpartner:

*Dr. Katja Otto, Dipl. Natw. ETH Reto Ruinatscha, Dipl. Ing. Volker Höllrigl
Lehrstuhl für Biotechnik, Universität Dortmund
Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg, Dr. Radovije Prodanovic (seit Anfang 2007; Ersatz Dr.
H. Weingart), Dipl. Biol. Kang Lan Tee
Biochemical Engineering, Jacobs University Bremen
PD Dr. Jürgen Pleiss, Dipl. Biol. (t. o.) Michael Knoll
Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller, Dr. Renate Spohn
EMC microcollections GmbH, Tübingen
Dr. Jürgen Eck, Dr. Patrick Lorenz
B R A I N AG, Zwingenberg
Prof. Dr. Bernhard Hauer, Dr. Michael Breuer
BASF AG, Ludwigshafen*

Projektbeginn: 1.08.2004

Laufzeit: 24 Monate (kostenneutrale Verlängerung gewährt bis 31.01.2007)

Dortmund, 2007

Band 1

April 07		1 <u>Projektkennblatt</u> der Deutschen Bundesstiftung Umwelt			
Az	13123	Referat	32	Fördersumme	432 970.- €
Antragstitel		Hochselektive Bioaktivierung von Plattform-Intermediaten: Molekulares Screening, funktionale Überexpression und umweltfreundliche elektrochemische Verfahren			
Stichworte		Biotechnologie, Verfahren, Abluft, Abwasser			
Laufzeit		Projektbeginn		Projektende	
2 Jahre		1.8.2004		31.08.2006 (31.01.2007)	
Endbericht				Projektphase(n) 2	
Bewilligungsempfänger		International University Bremen* School of Engineering and Science Campus Ring 8 28759 Bremen			Tel 0231 755 7380
Projektkoordination		Universität Dortmund, Fachbereich für Bio- und Chemieingenieurwesen Lehrstuhl für Biotechnik Emil-Figge-Str. 66 44227 Dortmund			Fax 0231 755 7382
					Projektleitung Herr Prof. A. Schmid Herr Prof. U. Schwaneberg
					Bearbeiter
Kooperationspartner		<ul style="list-style-type: none"> -Universität Dortmund, Lehrstuhl für Biotechnik -International University Bremen*, School of Engineering and Science -Universität Stuttgart, Inst. für Technische Biochemie -BRAIN AG, Zwingenberg -EMC microcollections GmbH, Tübingen -BASF AG, Ludwigshafen (keine Fördermittel) 			
<i>Zielsetzung und Anlass des Vorhabens</i>					
<p>Das Projektziel umfasste die Entwicklung eines umweltfreundlichen elektroenzymatischen Verfahrens zur Herstellung verschiedener chiraler Epoxide und Ketone mit hoher Enantiomerenreinheit mittels kofaktorabhängigen Biokatalysatoren. Um dieses Ziel zu realisieren, sollten bekannte Katalysatoren möglichst einfach hergestellt werden, um als „Shelf-Enzyme“ zur Verfügung zu stehen. Außerdem sollten mit Hilfe neuer Screeningsysteme weitere Oxgenaseaktivitäten aus Umweltproben isoliert werden. Durch die Kombination von <i>in silico</i> und <i>in vitro</i> Methoden sollten die Katalysatoren in Ihrer Aktivität und Spezifität verbessert werden, um für die Anwendung interessant zu sein.</p>					
<i>Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden</i>					
<p>Methodisch erstreckten sich die Arbeitsschritte vom Durchsuchen natürlicher Diversität bis zur optimierten Prozessentwicklung. Konzeptionell war wichtig, dass entlang der industriellen Verwertungskette neue Katalysatoren aus der Biodiversität für die Entwicklung von Epoxygenierungs-/Hydroxylierungsprozessen gesucht, und insbesondere die industriell bedeutsame Enzymklasse der Epoxygenasen für Methoden der gelenkten Evolution zugänglich gemacht wurden. Gleichzeitig wurde die elektrochemische Prozesstechnologie weiterentwickelt, um eine rasche Nutzung/Verwertung der aufgefundenen Aktivitäten in neuen nachhaltigen Prozessen zu gewährleisten. Im Einzelnen wurden folgende verzahnte Arbeitspakete definiert:</p>					

- A) Entwicklung von Screeningsystemen zum Auffinden neuer Monoxygenasen für Hydroxylierung und Epoxydierungsreaktionen an Substraten, die von der BASF AG benannt wurden und industriell bedeutsam sind.
- B) Screening und Bereitstellung neuer Monoxygenasen aus kultivierbarer Biodiversität
- C) Identifikation und Isolierung der Vollängen-Gene neuer Monoxygenasen und heterologe Darstellung der Enzyme, sowie Herstellung genomischer Genbanken und Bereitstellung von Metagenom-Genbanken aus nicht-kultivierter Biodiversität für ein hochdurchsatzfähiges Monoxygenase-Screening.
- D) Entwicklung eines FACS-Nachweissystems zum Durchmustern von Metagenomen.
- E) Prozessentwicklung mit der Styrolepoxygenase StyAB und der thermostabilen Alkoholdehydrogenase TADH: Evaluierung des elektrochemischen Prozesses, Optimierung des Expressionssystem und gerichtete Evolution der Styrolepoxygenase.
- F) Erstellung eines Strukturmodells der TADH basierend auf einer Strukturdatenbank aller bekannter Alkoholdehydrogenasen. Darauf basierend *in silico* Vorhersagen über Mutationsansätze, um Substratspezifitäten des Katalysators zu verändern.
- G) Umsetzung der *in silico* Vorschläge und Anwendung des mutierten Katalysators auf, aus pharmazeutischer Sicht interessante, Substanzbibliotheken im elektroenzymatischen Reaktor.
- F) Umweltevaluation des verbesserten Prozesses am Beispiel der Styrolmonoxygenase.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden komplementäre Ansätze in zwei getrennten Modulen bearbeitet. In dem Modul Biooxidation lag der Schwerpunkt auf der Suche nach neuen Oxygenasen. Ferner wurden Katalysatoren technisch gereinigt, als Pulver für Prozessanwendungen bereitgestellt und mittels eines neuen Mutageneseverfahrens (SeSaM) evolviert.

Das Modul Bioreduktionen versuchte eine *in silico* Anpassung von enzymatischen Hydrierungskatalysatoren zur Umsetzung verschiedener Wirkstoffklassen. Aufbauend auf einer Datenbank homologer Proteine wurde ein Modell der Bindungstasche und des Katalysators entwickelt, welches basierend auf Vorhersagen von Substratspezifitäten rationale Mutationen ermöglichen sollte. Die Vorhersagen wurden im Labor verifiziert und die Ergebnisse dem Modell wieder zugeführt.

Biokatalysatoren aus beiden Modulen wurden in einem neu zu entwickelnden umweltfreundlichen elektroenzymatischen Reaktor, zur Herstellung verschiedener chiraler Epoxide und Alkohole/Ketone eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Modul 1 Biooxidationen— Screeningsysteme zum Auffinden neuer Monoxygenasen für Hydroxylierungs- und Epoxydierungsreaktionen wurden erfolgreich entwickelt, validiert und zur BRAIN AG transferiert. Für die benannten Substrate und Substratklassen wurden Durchmusterungssysteme zunächst im 96-Well-Mikrotiterplatten entwickelt und publiziert (siehe Zwischenbericht).

Aus der Stammsammlung der BRAIN AG und unterschiedlichster Umweltproben konnten so etwa 100 Stämme isoliert werden, die auf interessanten Kohlenwasserstoff-Verbindungen wachsen. Zur Identifikation und Isolierung der Vollängen-Gene neuer Monoxygenasen und der heterologen Darstellung der Enzyme wurde eine Genbank vom Isolat HD1106 erstellt. Für das Durchmustern der Metagenombank ist ein Assay in der Entwicklung, welcher auf Doppemulsionen basiert, die in einem FACS sortiert werden. Diese Arbeiten werden Mitte Mai abgeschlossen sein.

Außerdem wurde ein Nachweissystem für Aromatenhydroxylierungen auf der Basis von 4-Aminoantipyrin auf unsere Anwendung adaptiert^[9]. Beim Durchmustern von Sättigungsmutantenbibliotheken der Monoxygenase P450 BM3 wurden Varianten mit 8-fach erhöhter Aktivität für Phenoxytoluol aufgefunden^[7]. Das Epoxidnachweissystem wurde für die Styrolmonoxygenase StyAB optimiert und in einer ersten Runde der Gelenkten Evolution wurden drei Klone isoliert, die nach wiederholtem Durchmustern im Rohextrakt eine ca. zweifach erhöhte Aktivität zeigten.

Der elektroenzymatische Prozess mit der Styrolmonoxygenase als Modellenzym wurde detailliert evaluiert und die grundlegenden Limitationen des Systems identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Regeneration des Kofaktors FAD zum FADH₂ hochspezifisch abläuft. Die Hauptproblematik in diesem System besteht im sogenannten „Sauerstoffdilemma“. Da bedingt durch die Reaktion es nicht in Frage kam, unter anaeroben Bedingungen zu arbeiten, wurde als Alternative ein artifizielles sauerstofftolerantes Deazaflavin synthetisiert und

unter unseren Prozessbedingungen getestet. Leider konnte keine nennenswerte Aktivität mit diesen Kofaktor erzielt werden, weshalb nun hauptsächlich an prozesstechnischen Lösungen gearbeitet wird.

Modul 2 Bioreduktionen— Um ein Strukturmodell der Alkoholdehydrogenase TADH zu erstellen wurde zunächst eine umfangreiche Datenbank aufgebaut, welche alle zur TADH homologen Proteine enthält. Die Datenbank enthält zum ggw Zeitpunkt 7500 Sequenzeinträge von über 3000 Proteinen. Basierend auf dieser Datenbank konnte ein Modell der Bindetasche von TADH konstruiert werden und in silico Vorschläge für gezielte Mutationen zur Veränderung der Substratspezifität gemacht werden. Parallel wurde eine einfache „Einschritt-Reinigung“ mit anschließender Lyophilisierung für technisch reine TADH entwickelt. Somit kann nun 8200 U TADH (85% rein) innerhalb von zwei Tagen zur Verfügung gestellt werden. Die vorgeschlagenen Mutationen wurden technisch umgesetzt und *in vitro* charakterisiert. Dazu wurde eine erste Auswahl an speziellen Substraten, welche pharmazeutisch von Interesse sind, von der EMC-GmbH synthetisiert und auf Umsätze getestet. Die in silico Vorhersagen konnten für einige Mutationen bestätigt werden. Um den elektroenzymatischen Prozess voranzubringen wurde eine kontinuierliche Durchflusszelle entwickelt. Ein neues Elektrodenmaterial ermöglichte eine Erhöhung der Kofaktorregenerationsrate um Faktor 20. Außerdem wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um eine Inaktivierung des Biokatalysators im elektroenzymatischen Prozess zu vermeiden. Es wurde sowohl versucht, die Oberfläche des Enzyms chemisch zu modifizieren, als auch prozesstechnische Lösungen zu finden. Während die chemischen Modifikationen nicht besonders erfolgreich waren, konnte durch eine Optimierung der Prozessbedingungen die Stabilität des Biokatalysators auf > 7 Tage unter Prozessbedingungen verbessert werden.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung & Umweltevaluation— Eine abschließende Wirtschaftlichkeits- und Umweltbetrachtung des elektroenzymatischen Prozess ergab, dass im Falle der Oxidation die wirtschaftlichen Bedingungen noch nicht erfüllt sind. Die Aktivität der Monooxygenasereaktion ist viel zu gering, um wirtschaftlich interessant zu sein. Dies spiegelt sich auch in der Umweltevaluation wieder, die für den Bioprozess aufgrund der hohen Spezifität und der milden Reaktionsbedingungen zwar sehr positiv ausfällt, allerdings von der Produktivität die Anforderungen nicht erreicht. Eine Evaluation anderer Prozesse, welche ebenfalls auf elektroenzymatischer Kofaktorregeneration basieren ergab, dass es derzeit keine Monooxygenase-Reaktion gibt, die die wirtschaftlichen Anforderungen soweit erfüllt, dass sie für eine Anwendung interessant sein könnte. Anders sieht es mit der Dehydrogenase-Reaktion aus. Hier ist es im Rahmen dieses Projekts gelungen, den Prozess entscheidend zu verbessern. Enzymstabilität und Produktivität konnten soweit erhöht werden, dass dieser Prozess nun im Rahmen industriell interessanter Reaktionen liegt.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Sensitive assay for laboratory evolution of hydroxylases toward aromatic and heterocyclic compounds. Wong, T. S., Wu, N., Roccatano, D., Zacharias, M., Schwaneberg, U. (2005) Journal of Biomolecular Screening **10**:246-252. (Titelseite)

A screening system for directed evolution of epoxygenases: validation reveals importance of position 184 in P450 BM3 for stereoselective styrene epoxydation. K.-L. Tee, U. Schwaneberg (2006) Angewandte Chemie, **45**: 5380-5383.

A host/guest complex enables directed evolution of a two-component epoxygenase (StyAB) for styrene epoxidation, Tee, K. L., Dmytrenkoa, O., Otto, K., Schmid, A., Schwaneberg, U., (zur Publikation eingereicht)

Productivity of electroenzymatic reduction and oxidation reactions: theoretical and practical considerations. R. Ruinatscha, V. Höllrigl, K. Otto and A. Schmid (2006) Advanced Synthesis & Catalysis **348**:2015-2026

Electroenzymatic asymmetric reduction of rac-3-methylcyclohexanone to (1S,3S)-3-methylcyclohexanol in organic/aqueous media catalyzed by a thermophilic alcohol dehydrogenase. V. Höllrigl, K. Otto, A. Schmid (2007) Advanced Synthesis & Catalysis (Accepted)

Fazit

Dieses sehr ehrgeizige und vielschichtige Projekt ist ein Beispiel für erfolgreiche interdisziplinäre Zusammenarbeit. An den Hochschulen entwickelte Methoden wie z.B. der Epoxidscreen konnten direkt beim KMU Partner implementiert werden. Als sehr interessant und vielversprechend hat sich die Kombination von *in situ* und *in vitro* Charakterisierung in Verbindung mit der Produktion von pharmazeutisch interessanten Ausgangsstoffen erwiesen. Etwas ernüchternd ist die Bilanz bei der Entwicklung eines elektrochemischen Prozesses für eine Anwendung mit einer Monooxygenase. Das Sauerstoffdilemma konnte nur bedingt gelöst werden und auch die Evolvierung des Enzyms brachte keine wesentliche Verbesserung des Prozesses. Die Anwendung der Elektroenzymologie auf sauerstoffunabhängige Reaktionen hingegen, wurde entscheidend vorangebracht und sollte unbedingt weiterverfolgt werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Anlass und Zielsetzung	3
Verwendete Methoden	4
Ergebnisse	7
Modul1 Biooxidationen	
<i>Entwicklung von Screeningsystemen</i>	7
<i>Evaluierung des elektroenzymatischen Prozesses</i>	10
<i>Screening neuer Monooxygenasen aus kultivierbarer Biodiversität</i>	21
<i>Entwicklung eines FACS-Nachweissystems</i>	24
Modul 2: Bioreduktionen	
<i>Expressionssystem und Katalysatorentwicklung</i>	29
<i>Erstellung des TADH-Strukturmodells</i>	30
<i>Vorhersagen von Mutanten zur Verifizierung des Modells</i>	32
<i>Substratspektrum der TADH</i>	35
<i>Modifikation von Lysin an der Oberfläche der TADH</i>	40
Elektroenzymologischer Prozess	45
Wirtschaftlichkeitsbetrachtung	54
Diskussion	60
Soll-/Ist Vergleich	65
Kooperationen innerhalb des Projekts	68
Publikationen	69
Fazit	70
Referenzen	71
Anhang	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	4-Aminoantipyrin-Nachweissystem	07
Abbildung 2	Nachweissystem für Epoxyde	08
Abbildung 3	Analyse der Styrolepoxidproduktion	09
Abbildung 4	Cyclovoltamogramme von FAD und $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	11
Abbildung 5	Cyclovoltamogramme von FAD mit je 200 μM $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	11
Abbildung 6	Cyclovoltamogramme von 5-Deaza FAD	15
Abbildung 7	Relative Symproportionierungsrate von reduziertem FAD	16
Abbildung 8	Schematischer Aufbau der oxidativen elektroenzymatischen Zelle	17
Abbildung 9	Immobilisierungseffizienz von StyA aus Zellextrakt an SEPABEAD Q1A und EA	19
Abbildung 10	StyA Reinheit auf den verwendeten Trägern bei verschiedenen pH Werten	19
Abbildung 11	Adsorption von StyA aus Zellextrakt auf SEPABEAD Q1A und EA	20
Abbildung 12	Kristalle von StyA mit und ohne FAD	21
Abbildung 13	Durchmusterung der kultivierbaren Biodiversität auf Hydroxylierungsreaktionen von aromatischen Verbindungen	22
Abbildung 14	Wachstum bzw. Inhibition mikrobieller Isolate durch die BASF Substrate	23
Abbildung 15	Partialverdaute DNA und Genbankanalyse des Isolates HD1106 aus der Isolationskampagne bei BRAIN	24
Abbildung 16	Positivkontrollen zur Oxidation von Indol zu Indigo durch rekombinante <i>E. coli</i> Klone aus Metagenom Banken	25
Abbildung 17	Doppelemulsionen	26
Abbildung 18	Sortierung einer Mischung von Doppelemulsionen, die mit BSA und FITC-markiertem BSA beladen sind	27
Abbildung 19	Synthetisierte Coumarin-Derivate und deren Umsetzung	28
Abbildung 20	Kinetik der Umsetzung von Benzoylcoumarin	28
Abbildung 21	TADH Reinigung	29

Abbildung 22	TADH Reinigung	30
Abbildung 23	Modelle der unterschiedlich gestalteten Bindetaschen	32
Abbildung 24	Einteilung in die beiden ADH-Klassen abhängig vom Loop	34
Abbildung 25	Homologiemodell der TADH	40
Abbildung 26	Elektrospray Massenspektrum der TADH	41
Abbildung 27	Ablaufschema Modifikation der TADH	43
Abbildung 28	Bestimmung des Schutzeffektes der TADH Modifizierungen	44
Abbildung 29	Cyclovoltametrische Untersuchung von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ bei unterschiedlichen Temperaturen	45
Abbildung 30	Schematischer Aufbau eines elektrochemischen Reaktors	47
Abbildung 31	Einfluss des Sauerstoffs auf die Reduktion von NADH	48
Abbildung 32	Vergleich von Kohlefilz und RVC-Elektroden	49
Abbildung 33	kontinuierliche Zelle zur Kofaktorregenerierung	50
Abbildung 34	Umsetzung von 3-Methylcyclohexanon	51
Abbildung 35	Bildung von (1S, 3S)-3-Methylcyclohexanonl im 2-Phasen System	52
Abbildung 36	Reduktion des EMC Substrates A133 im elektroenzymatischen Durchflussreaktor	53
Abbildung 37	Produkt aus der elektroenzymatischen Reduktion des EMC Substrates A133 nach dem Destillieren	53
Abbildung 38	Evaluation aktueller elektroenzymatischer Prozesse mit Oxidoreduktasen	54
Abbildung 39	Umweltevaluation des elektroenzymatischen Prozesse verglichen mit drei chemischen Prozessen	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	P450 BM-3 Mutanten mit Stereoinversion der Styrolepoxydierung	8
Tabelle 2	Prozessleistungen für die direkte und indirekte Regeneration von FADH ₂	10
Tabelle 3	Reinigungsschritte bis zur technisch reinen TADH	29
Tabelle 4	Optimierte TADH Produktion	30
Tabelle 5	Umsätze des Testsubstrats durch die unterschiedlichen Mutanten im Vergleich	33
Tabelle 6	Auswahl von Verbindungen zur Oxidation mittels TADH	35
Tabelle 7	Fokussierte Verbindungskollektion zur Oxidation mittels TADH	36
Tabelle 8	Oxidation der fokussierten Verbindungskollektion durch TADH	37
Tabelle 9	Substratauswahl zur Reduktion mittels TADH	38
Tabelle 10	Modifikation der TADH	42
Tabelle 11	Proteinkonzentration und Aktivität der modifizierten TADH Proben	43
Tabelle 12	Halbwertszeit von NADH in verschiedenen Puffern	47
Tabelle 13	Zusammenstellung aktueller elektroenzymologischer Prozesse	55
Tabelle 14	Arbeitsprogramm und Meilensteine - Soll-/Ist Vergleich	63

Zusammenfassung

Modul 1 Biooxidationen— Screeningsysteme zum Auffinden neuer Monooxygenasen für Hydroxylierungs- und Epoxydierungsreaktionen wurden erfolgreich entwickelt, validiert und zur BRAIN AG transferiert. Für die benannten Substrate und Substratklassen wurden Durchmusterungssysteme zunächst im 96-Well-Mikrotiterplatten entwickelt und publiziert (siehe Zwischenbericht).

Aus der Stammsammlung der BRAIN AG und unterschiedlichster Umweltproben konnten so etwa 100 Stämme isoliert werden, die auf interessanten Kohlenwasserstoff-Verbindungen wachsen. Zur Identifikation und Isolierung der Vollängen-Gene neuer Monooxygenasen und der heterologen Darstellung der Enzyme wurde eine Genbank vom Isolat HD1106 erstellt. Für das Durchmustern der Metagenombank ist ein Assay in der Entwicklung, welcher auf Doppelemulsionen basiert, die in einem FACS sortiert werden. Diese Arbeiten werden Mitte Mai abgeschlossen sein.

Außerdem wurde ein Nachweissystem für Aromatenhydroxylierungen auf der Basis von 4-Aminoantipyrin auf unsere Anwendung adaptiert^[9]. Beim Durchmustern von Sättigungsmutantenbibliotheken der Monooxygenase P450 BM3 wurden Varianten mit 8-fach erhöhter Aktivität für Phenoxytoluol aufgefunden^[7]. Das Epoxidnachweissystem wurde für die Styrolmonooxygenase StyAB optimiert und in einer ersten Runde der Gelenkten Evolution wurden drei Klone isoliert, die nach wiederholtem Durchmustern im Rohextrakt eine ca. zweifach erhöhte Aktivität zeigten.

Der elektroenzymatische Prozess mit der Styrolmonooxygenase als Modellenzym wurde detailliert evaluiert und die grundlegenden Limitationen des Systems identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Regeneration des Kofaktors FAD zum FADH₂ hochspezifisch abläuft. Die Hauptproblematik in diesem System besteht im sogenannten „Sauerstoffdilemma“. Da bedingt durch die Reaktion es nicht in Frage kam, unter anaeroben Bedingungen zu arbeiten, wurde als Alternative ein artifizielles sauerstofftolerantes Deazaflavin synthetisiert und unter unseren Prozessbedingungen getestet. Leider konnte keine nennenswerte Aktivität mit diesen Kofaktor erzielt werden, weshalb nun hauptsächlich an prozesstechnischen Lösungen gearbeitet wird.

Modul 2 Bioreduktionen— Um ein Strukturmodell der Alkoholdehydrogenase TADH zu erstellen wurde zunächst eine umfangreiche Datenbank aufgebaut, welche alle zur TADH homologen Proteine enthält. Die Datenbank enthält zum ggw Zeitpunkt 7500 Sequenzeinträge von über 3000 Proteinen. Basierend auf dieser Datenbank konnte ein Modell der Bindetasche von TADH konstruiert werden und in silico Vorschläge für gezielte Mutationen zur Veränderung der Substratspezifität gemacht werden. Parallel wurde eine einfache „Ein-Schritt-Reinigung“ mit anschließender Lyophilisierung für technisch reine TADH entwickelt. Somit kann nun 8200 U TADH (85% rein) innerhalb von zwei Tagen zur Verfügung gestellt werden. Die vorgeschlagenen Mutationen wurden technisch umgesetzt und in vitro charakterisiert. Dazu wurde eine erste Auswahl an speziellen Substraten, welche pharmazeutisch von Interesse sind, von der EMC-GmbH synthetisiert und auf Umsätze getestet. Die in silico Vorhersagen konnten für einige Mutationen bestätigt werden. Um den elektroenzymatischen Prozess voranzubringen wurde eine kontinuierliche Durchflusszelle entwickelt. Ein neues Elektrodenmaterial ermöglichte eine Erhöhung der Kofaktorregenerationsrate um Faktor 20. Außerdem wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um eine Inaktivierung des Biokatalysators im elektroenzymatischen Prozess zu vermeiden. Es wurde sowohl versucht, die Oberfläche des Enzyms chemisch zu modifizieren, als auch prozesstechnische Lösungen zu finden. Während die chemischen Modifikationen nicht besonders erfolgreich waren, konnte durch eine Optimierung der Prozessbedingungen die Stabilität des Biokatalysators auf > 7 Tage unter Prozessbedingungen verbessert werden.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung & Umweltevaluation— Eine abschließende Wirtschaftlichkeits- und Umweltbetrachtung des elektroenzymatischen Prozess ergab, dass im Falle der Oxidation die wirtschaftlichen Bedingungen noch nicht erfüllt sind. Die Aktivität der Monooxygenasereaktion ist viel zu gering, um wirtschaftlich interessant zu sein. Dies spiegelt sich auch in der Umweltevaluation wieder, die für den Bioprozess aufgrund der hohen Spezifität und der milden Reaktionsbedingungen zwar sehr positiv ausfällt, allerdings von der Produktivität die Anforderungen nicht erreicht. Eine Evaluation anderer Prozesse, welche ebenfalls auf elektroenzymatischer Kofaktorregeneration basieren ergab, dass es derzeit keine Monooxygenase-Reaktion gibt, die die wirtschaftlichen Anforderungen soweit erfüllt, dass sie für eine Anwendung interessant sein könnte. Anders sieht es mit der

Dehydrogenase-Reaktion aus. Hier ist es im Rahmen dieses Projekts gelungen, den Prozess entscheidend zu verbessern. Enzymstabilität und Produktivität konnten soweit erhöht werden, dass dieser Prozess nun im Rahmen industriell interessanter Reaktionen liegt

Dieses sehr ehrgeizige und vielschichtige Projekt ist ein Beispiel für gute interdisziplinäre Zusammenarbeit. An den Hochschulen entwickelte Methoden wie z.B. der Epoxidscreen konnten direkt beim KMU Partner implementiert werden. Als sehr interessant und vielversprechend hat sich die Kombination von *in situ* und *in vitro* Charakterisierung in Verbindung mit der Produktion von pharmazeutisch interessanten Ausgangsstoffen erwiesen. Etwas ernüchternd ist die Bilanz bei der Entwicklung eines elektrochemischen Prozesses für eine Anwendung mit einer Monooxygenase. Das Sauerstoffdilemma konnte nur bedingt gelöst werden und auch die Evolvierung des Enzyms brachte keine wesentliche Verbesserung des Prozesses, was sich auch in der Umweltbilanz niederschlägt. Die Anwendung der Elektroenzymologie auf sauerstoffunabhängige Reaktionen hingegen, wurde entscheidend vorangebracht und sollte unbedingt weiterverfolgt werden.

Anlass und Zielsetzung

Das Projektziel umfasste die Entwicklung eines umweltfreundlichen elektroenzymatischen Verfahrens zur Herstellung verschiedener chiraler Epoxide und Ketone mit hoher Enantiomerenreinheit mittels kofaktorabhängigen Biokatalysatoren. Um dieses Ziel zu realisieren, sollten sowohl bekannte Katalysatoren möglichst einfach hergestellt werden, sowie neue Oxigenaseaktivitäten aus Umweltproben isoliert werden. Durch eine Kombination von *in silico* und *in vitro* Methoden sollten die Katalysatoren in Ihrer Aktivität und Spezifität verbessert werden, um für die Anwendung interessant zu sein.

Verwendete Methoden

Molekularbiologische Methoden

Für Restriktionsanalysen, Klonierung, Agarosegelelektrophorese und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Standardprotokolle nach Sambrook *et al.*^[1] verwendet.

TADH Mutation

Die ausgewählten Punktmutationen wurden mit Hilfe eines PCR-basierten Protokolls durchgeführt. Dafür wurden die Primer 5'-GAG GCG TCT ACG GTG CTG GCC CCA TGT TTG G-3' (Y111A), 5'-GGA GGC GTC TAC GGT GIT GGC CCC ATG TTT GG-3' (Y111V), 5'-GAG GCG TCT ACG GTA GTG GCC CCA TGT TTG -3' (Y111S) und 5'-GGA GGC GTC TAC GGT CTT GGC CCC ATG TTT GG-3' (Y111L) mit den jeweiligen komplementären Reverse-Primern generiert. Die gewünschten Basenpaare wurden somit durch Amplifikation des gesamten Plasmid pASZ2 ausgetauscht. Der PCR Ansatz wird nun mit *DpnI* verdaut, wobei nur methylierte DNA geschnitten wird, also nur das Ursprungsplasmid und nicht die neu generierten Plasmide. Der verdaute PCR Ansatz wird nun zur Transformation verwendet. Aus den Kolonien wird im nächsten Schritt das Plasmid isoliert und das Gen sequenziert, um das Vorhandensein der Mutation zu verifizieren.

Kultivierung der Organismen

Zur Kultivierung in Schüttelflaschen sowie im 2 L Kleinlaborfermenter (Bioengineering) wurde mit Ampicillin versetztes Komplexmedium LB, TB oder das Minimalmedium M9* verwendet^[1].

Proteinreinigung TADH

- Kombiniertes Zellaufschluss und Hitzeschritt: 75 °C für 20 min
- UZ: 91500 x g für 45 min (Sorvall Discovery 90 SE mit A841 Rotor)
- Ionenaustauscher: EMD-TMAE (Merck) Laufpuffer 20 mM Tris/HCl, pH 7,5. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl Gradienten von 0 – 1 M
- Gelfiltration: HiLoad 16/60 Sephadex 200: Laufpuffer 20 mM Tris/HCl

Aktivitätsassay

Die Enzymaktivitäten wurden entweder spektrophotometrisch über Zu-/Abnahme des Kofaktors NADH oder über die Produktbildungsrate (HPLC / GC) bestimmt.

Analytische Methoden:

Alle Produkte und Substrate wurden mittels GC oder HPLC analysiert.

Herstellung der EMC - Substrate

Die Verbindungen wurden in mehrstufigen Synthesen in Lösung und an fester Phase hergestellt, gereinigt und mittels HPLC-MS analysiert. Die Reinheiten der Verbindungen lagen zwischen 85 und >95 %, die Mengen zwischen 3,1 mg und 50 mg.

Modifikation der TADH

Die TADH wurde mittels ESI-MS charakterisiert. Zur Modifikation der Lysinseitenketten der TADH wurden N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimid) (Fmoc-OSu), Acetessigsäure-(N-hydroxysuccinimidylester), Essigsäureanhydrid, N,N-Dimethylaminosulfonylchlorid, Dimethylcarbonylchlorid und Essigsäure (gekoppelt mit wasserlöslichem Carbodiimid, EDC) eingesetzt. Nach der Umsetzung wurde das Enzym dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Cyclovoltametrie:

Alle cyclovoltametrischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institute of Analytical Sciences – ISAS durchgeführt. Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um ein Autolab PGSTAT20 mit Metrohm VA-Stand 663.

Datenbanksystem und Klassifizierung:

Es wurde ein am Institut für Technische Biochemie (Universität Stuttgart) entwickeltes automatisiertes Datenbanksystem zum Aufbau der Proteinfamiliendatenbank verwendet^[2]. Proteine werden durch eine im Rahmen dieses Projekts etablierte Methode klassifiziert. Diese verwendet den in Tribe-MCL^[3] implementierten Algorithmus und zusätzlich eine Verfeinerung der Klassifizierung nach dem „*single linkage*-Algorithmus“. Die Proteine wurden in Superfamilien und homologe Familien eingeteilt. Funktionell wichtige Aminosäuren wurden dabei

automatisch annotiert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Informationen von Projektpartnern über experimentelle Befunde in die Datenbank zu integrieren und auszuwerten.

Homologiemodellierung und Qualitätsbewertung:

Da für die TADH keine Struktur aufgelöst ist, musste ein Strukturmodell durch Homologiemodellierung für Untersuchungen erstellt werden. Dieses wurde basierend auf einem Multisequenzalignment mit dem Programm MODELLER^[2] erstellt. Die Qualität wurde einerseits über Energieterme, welche die Interaktionen zwischen Aminosäuren beschreiben (Programm PROSA2003)^[4] bewertet, andererseits wurden geometrische Faktoren analysiert (Programm PROCHECK)^[5].

Konservierungsanalyse :

Eine hohe Konservierung einer Position im Multisequenzalignment bedeutet, dass die biochemischen Eigenschaften der Aminosäurereste unterschiedlicher Proteine an dieser Position erhalten sind und somit von einer funktionell wichtigen Aminosäure ausgegangen werden kann. Um die Konservierung der Aminosäureeigenschaft innerhalb der TADH-Superfamilie zu berechnen, wurde der in AL2CO^[6] implementierte Algorithmus verwendet. Diese Methode verwendet Informationen über den Austausch von Aminosäuren aus Substitutionsmatrizen, um biochemische Variationen einer Position im Multisequenzalignment zu bewerten. Die Ergebnisse einer solchen Konservierungsanalyse können als Hilfe zur Vorhersage von Mutanten herangezogen werden.

Weitere angewandte Methoden werden soweit relevant im Ergebnisteil erwähnt.

Ergebnisse

Modul 1: Biooxidation

Entwicklung von Screeningsystemen zum Auffinden neuer Monooxygenasen für Hydroxylierung und Epoxydierungsreaktionen an Substraten, die von der BASF AG benannt wurden und industriell bedeutsam sind

Für die benannten Substrate und Substratklassen wurden zunächst zwei Durchmusterungssysteme für das 96-Well-Mikrotiterplatten-Format entwickelt.

Für Aromatenhydroxylierungen wurden zwölf Nachweissysteme im Detail untersucht und ein auf 4-Aminoantipyrin, ein sensitives Phenolnachweisreagenz, basierendes System ausgewählt (Abbildung 1)^[7]. Dieses Nachweissystem ist sehr sensitiv und hat einen linearen Nachweisbereich von 50-800 μM , der im Mikrotiterplattenformat ausreicht, um selbst langsame Hydroxylierungskatalysatoren zu identifizieren. Es zeichnet sich ferner durch eine einfache Handhabung und hohe „Biokompatibilität“ aus und wurde bereits im Durchmustern von Sättigungsmutantenbibliotheken von P450 BM-3 erfolgreich angewandt.

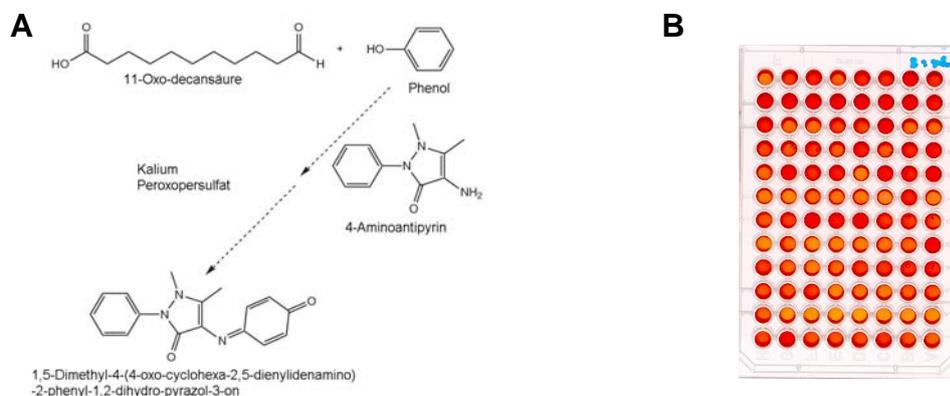


Abbildung 1: Das 4-Aminoantipyrin-Nachweissystem. **A)** Reaktion **B)** Bild einer durchgemusterten Mikrotiterplatte. Das Endprodukt der Reaktion mit 4-AAP ist rot.

Dieses Nachweissystem wurde der BRAIN AG mit einer Kontrollreaktion (P450 BM-3, 3-Phenoxytoluol)^[8] für die Durchmusterung ihrer Stammsammlung zur Verfügung gestellt.

Die Styrolepoxydierung stellt die Modelverbindung für den integrativen Charakter des oxidativen Verbundprojektes dar. Es wurde erstmals ein Durchmusterungssystem für Gelenkte Evolution einer Epoxygenase entwickelt und durch Erhöhung der Styrolepoxydierungsaktivität und Inversion der Stereopräferenz validiert (Tee, K. L. und Schwaneberg, U.; *Angewandte Chemie* 2006). Für diese Assayentwicklung/-validierung wurde zunächst die Monooxygenase P450 BM3 eingesetzt, da P450 BM3 als Einkomponentensystem eine einfachere Handhabung gegenüber dem Zweikomponentensystem StyAB aufweist und Expression- und Mutagenesebedingungen bereits ausgearbeitet waren. Das Epoxydase-Nachweissystem wurde zur BRAIN AG transferiert und ein BRAIN-Technikers in Bremen eingearbeitet (drei Arbeitstage).

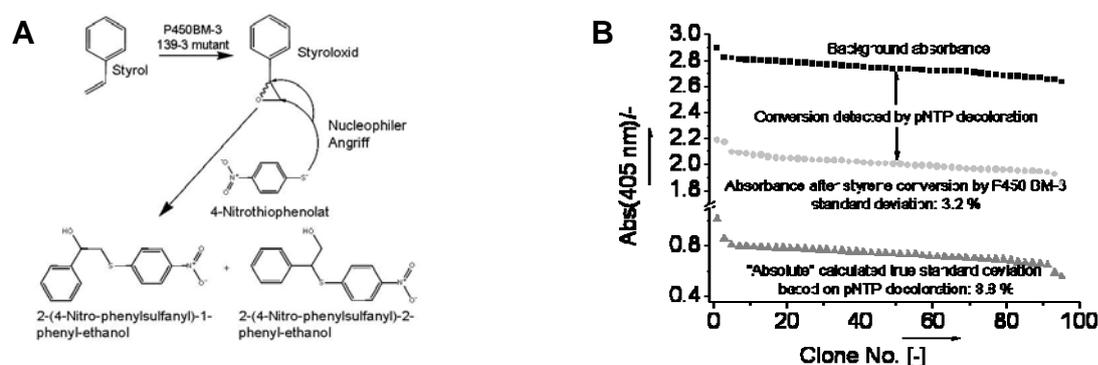


Abbildung 2: Nachweissystem für Epoxyde basierend auf der Entfärbung von *p*-Nitrothiophenolat bei der Reaktion mit einem Epoxyd. **A:** Reaktion **B:** Standardabweichung

Tabelle 1: P450 BM-3 Mutanten mit Stereo inversion der Styrolepoxydierung

Klone	Styrolepoxyd [%ee] (chirale GC)	Umsatz ^[a] [%]	Styrol & Styroloxid Wiederfindungsrate nach Extraktion [%]
WT	19,7 (<i>R</i>) ± 0,1	11,7 ± 0,6	79 ± 3
WT ^[b]	19,7 (<i>R</i>) ± 0,1	14,1 ± 0,2	78 ± 3
WT ^[c]	20,0 (<i>R</i>) ± 1,1	11,0 ± 0,8	79 ± 4
139-3	6,4 (<i>R</i>) ± 0,3	40,2 ± 0,9	69 ± 2
5F5	26,6 (<i>R</i>) ± 1,5	36,1 ± 0,4	78 ± 3
5F5A184R	26,5 (<i>S</i>) ± 0,3	41,6 ± 1,4	75 ± 1
5F5A184K	27,3 (<i>S</i>) ± 0,5	41,4 ± 0,5	83 ± 2
5F5A184H	26,0 (<i>S</i>) ± 1,3	32,9 ± 2,0	78 ± 4

[a] Umsatz = $c(\text{Styroloxid}) / (c(\text{Styrol}) + c(\text{Styroloxid})) \times 100$; [b] Reaktionszeit 4fach erhöht auf 2 Std

[c] Enzymkonzentration 4fach erhöht auf 3,2 μM

In der eingereichten Publikation (Tee, K. L., Dmytrenkoa, O., Otto, K., Schmid, A., und Schwaneberg, U.) wird die Optimierung und Adaptation dieses Assays auf das StyAB System beschrieben. Die Evaporation von Styrol wurde durch den Einsatz von Cyclodextrinen reduziert und ein Durchmusterungsprotokoll für das StyAB-Styrolepoxygenasesystem entwickelt. StyAB wird aufgrund der gegenüber P450 BM3 höheren Selektivität in der Prozessentwicklung eingesetzt. Eine aktivitätsverbesserte StyAB-Variante wird momentan mittels GC-charakterisiert (Abbildung 3) und zum Projektpartner (Dortmund; AG Schmid) transferiert werden.

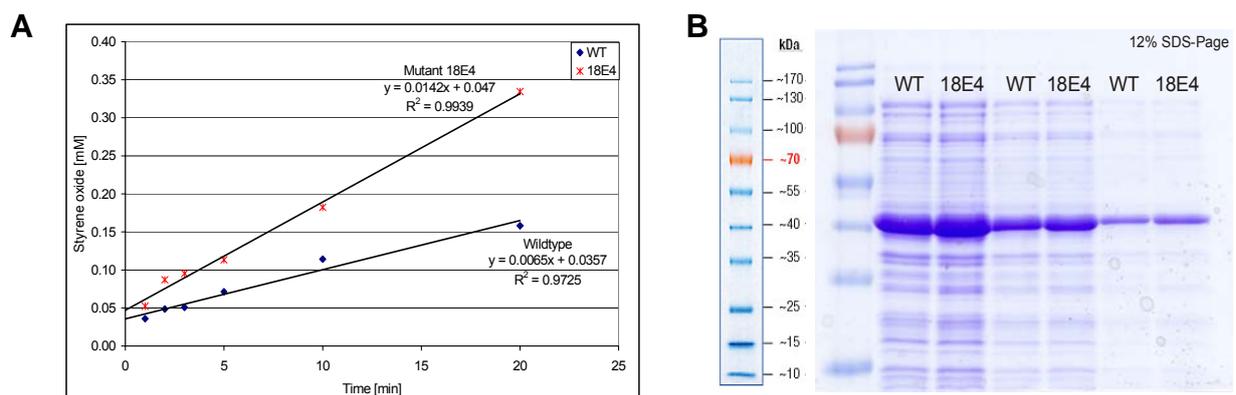


Abbildung 3: A) GC-Analyse der Styrolepoxydproduktion aus Styrol in einem 4-ml Reaktionsansatz (geschlossenes 4.5-mL Glasgefäß) mit StyAB WT und Mutante 18E4. B) Kontroll PAGE Monoxygenasemengen normalisiert nach Bestimmung mit Agilent 2100 Bioanalyser und Protein 200 Plus Assay Kit.

Über die beschriebenen Nachweissysteme hinaus wurde ein bereits entwickeltes Durchmusterungssystem für terminale Hydroxylierungen^[8] zur BRAIN AG transferiert und als Kontrollreaktion mit P450 BM3 verwendet.

Der Styrolepoxydnachweis wurde für die Monoxygenase StyAB optimiert (Wachstum (7 h, 37°C; 900 rpm; 70 % Luftfeuchtigkeit), gefolgt von Induktion mit 0,05 % DCPK + 5 Std Expression). Die Zugabe von Glycerin verringerte die Standardabweichung auf 12,8 %. In Gelenkten Evolutionsexperimenten wurden Nachweissysteme mit Standardabweichungen von 10-12 % erfolgreich für die Evolution von Monoxygenasen eingesetzt^[9]. Eine erste durchgemusterte Mutantenbibliothek von StyAB (600 Klone) lieferte drei Kandidaten, die im Rohextrakt nach wiederholtem Durchmustern eine ca. zweifach erhöhte Aktivität zeigten.

Die vom Institut für Biotechnologie der ETH Zürich entwickelte chirale GC-Analytik wurde an der JUB etabliert und zur Charakterisierung der Styrolexpoxydierungsprodukte eingesetzt. Im weiteren Verlauf des Projektes werden interessante Mutanten für den Einsatz in einem elektroenzymologischen Prozess evaluiert. Dies ist allerdings noch nicht abgeschlossen.

Evaluierung des elektroenzymatischen Prozesses am Beispiel der Styrolmonooxygenase StyAB

Die zellfreie Anwendung der Styrol Monooxygenase (StyA) benötigt effiziente Strategien, um die verbrauchten Kofaktoren (FADH_2) zu regenerieren. Frühere Experimente haben gezeigt, dass FADH_2 entweder direkt an der Elektrode oder durch den Einsatz des organometallischen Komplexes pentamethylcyclopentadienyl rhodium bipyridin ($[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$) selektiv regeneriert werden kann. Es hat sich allerdings herausgestellt, dass die Prozessleistungen für die direkte und indirekte Regeneration von FADH_2 noch stark verbesserungsfähig sind (Tabelle 2).

Tabelle 2: Prozessleistungen für die direkte und indirekte Regeneration von FADH_2

Kofaktor Regeneration	Mediator	Enzymaktivität [U/ g _{enzym}]	Prozessdauer [h]	Elektronenaus- beute [%]
Direkt	-	70	0.2	1
indirekt	$[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H})]^{2+}$	35	6	0.02

Darum war das primäre Ziel, die beiden Systeme auf molekularer Ebene zu verstehen und limitierende Faktoren der beiden Regenerations-Systeme ausfindig zu machen. Mit dem besser geeigneten und optimierten Regenerations-System ist dann die Basis zur anschließenden Prozessentwicklung gelegt.

Indirektes Regenerations-System: Effekt von $[\text{Cp}^\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H})]^{2+}$ auf die Reduktion von FAD*— Der Effekt von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ auf die Reduktion von FAD wurde auf Reaktionsebene cyclovoltametrisch untersucht. Es wurden im Wesentlichen zwei verschiedene Messreihen durchgeführt. In der einen Messreihe wurde FAD vorgegeben und mit $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ titriert. In der anderen Messreihe wurde $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ vorgegeben und mit FAD titriert. Durch Erstellung von Differenzspektren ergaben sich die folgenden Eigenschaften des aus

$[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ und FAD bestehenden Redox-Systemen: i) Die beiden Redox-Systeme liegen nicht unabhängig voneinander vor und bilden an der Elektrode zu einem gewissen Teil einen Komplex, bei dem das Redoxpotential von FAD (-550 mV vs AgCl) zu negativeren Werten verschoben ist. Dies ergibt sich aus der zusätzlichen „Schulter“ unterhalb -550 mV auf Kosten des $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ Signals bei -750 mV vs AgCl (Abbildung 4).

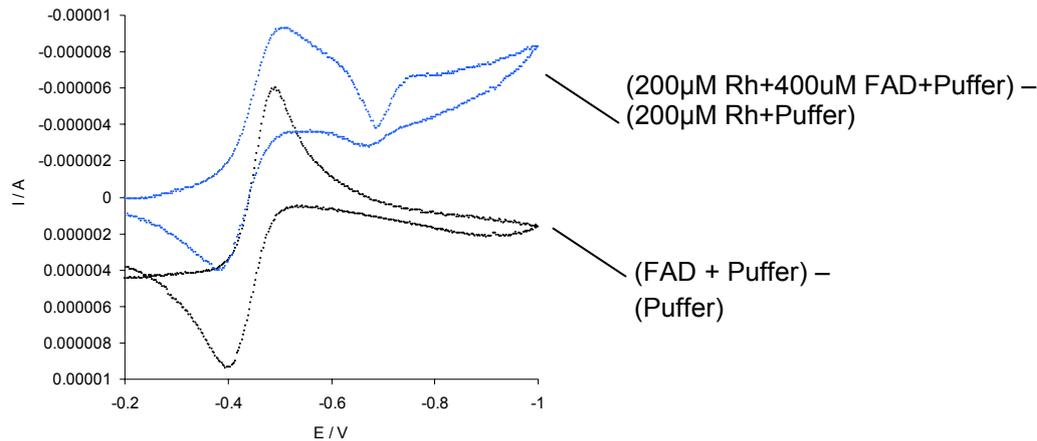


Abbildung 4: Cyclovoltamogramme von FAD und $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ in Kalium Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7.5, 37 °C) unter anaeroben Bedingungen. Scanrate: 100 mV s⁻¹, Potentialschritte: 0.0024, Glassy-Carbon Elektrode (3 mm Durchmesser), Rotation: 0 rpm. Es ist jeweils der dritte Scan aufgezeigt.

ii) $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H})]^{2+}$ zeigt keine nachweisbaren katalytischen Effekte bezüglich der Reduktion von FAD (Abbildung 5).

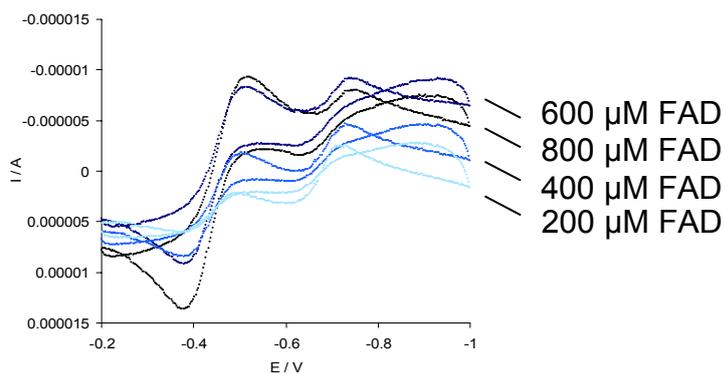


Abbildung 5: Cyclovoltamogramme von FAD und mit je 200 μM $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ in Kalium Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7.5, 37 °C) unter anaeroben Bedingungen. Scanrate: 100 mV s⁻¹, Potentialschritte: 0.0024, Glassy-Carbon Elektrode (3 mm Durchmesser), Rotation: 0 rpm. Es ist jeweils der dritte Scan aufgezeigt.

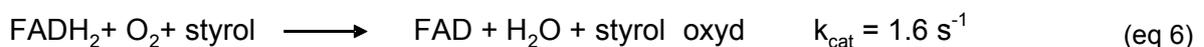
Dies lässt sich am besten durch die in Abbildung 5 gezeigte FAD Titrationsreihe mit vorgegebenem Mediator zeigen. Die zunehmende Konzentration von FAD erhöht nicht die Reduktionsrate von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ wie eigentlich zu erwarten wäre (siehe Effekt von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ auf NAD; Modul Bioreduktion). Dies wird durch die gleich bleibende Intensität der Faraday'schen Ströme für den Mediator bei -750 mV ersichtlich.

Direktes Regenerations-System: Selektivität der direkten Reduktion von FAD— Wie aus der indirekten Regeneration ersichtlich ist, hat FAD ein höheres Reduktionspotential als der Mediator. FAD wird deshalb auch unabhängig von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ direkt reduziert. Bei der $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H})]^+$ vermittelten Reduktion des Kofaktors wird angenommen dass ein regioselektiver Übergangszustand des Kofaktor-Mediator-Komplexes zur ausschließliche Bildung von enzymatisch aktivem FADH_2 führt. Bei der direkten Regeneration von FAD wurde deshalb die Selektivität der FAD-Reduktion an der Elektrodenoberfläche ebenfalls untersucht. Energetische Berechnungen zeigen, dass nur die Reduktion des Isoalloxazinringes in Flavinen elektrochemisch zur enzymatisch aktiven Form führt. Die möglichen Elektroaktivitäten des in FAD enthaltenen Adenin-Ringes wurden hingegen experimentell untersucht. Cyclovoltametrische Experimente zeigten jedoch, dass Adenin selbst bei tiefen Reduktionspotentialen keine Elektroaktivitäten aufzeigt. Die direkte Regeneration von FAD ist folglich auch regioselektiv und führt immer zum enzymatisch aktiven Kofaktor.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass weder die direkte noch die indirekte Regeneration zu enzymatisch inaktiven Formen des Kofaktors führt und darum beide Systeme einsetzbar sind.

Um die Effektivität des Rhodium-Mediators abzuklären, wurden zuerst kinetische Fragestellungen näher untersucht. Die Cyclovoltamogramme der indirekten Regeneration zeigten keine katalytischen Effekte von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H})]^+$ bezüglich der Bildung von FADH_2 , wie dies bei der NADH Regenerierung beobachtet wurde. Man könnte jedoch annehmen, dass die eingesetzte Scanrate über der katalytischen FADH_2 –Bildungsrate liegt, bzw. der beobachtete Übergangskomplex (siehe indirekte Regeneration) eine relativ hohe Halbwertszeit aufweist. Aus diesem Grunde wurde das indirekte Regenerationsprinzip in einem kontinuierlichen System untersucht, in dem die oben genannten Zeitlimitationen der cyclovoltametrischen Messungen nicht

relevant sind. Als Modellsystem wurde ein 100 mL-Batchreaktor an eine Durchflusszelle gekoppelt, um *in situ* Konzentrationsbestimmungen von FAD durchführen zu können. So konnte unter prozessähnlichen Bedingungen die Reaktion quantifiziert werden, da anaerob gearbeitet werden konnte. Dies ist wichtig, weil der reduzierte Kofaktor FADH₂ sehr schnell über Reaktionen mit Sauerstoff rückoxydiert wird. Mit unterschiedlich kombinierten FAD und [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺ Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass erhöhte [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺ Konzentrationen mit erhöhten initialen FAD Reduktionsraten korrelieren. Dies steht in starkem Gegensatz zu den Prozessleistungen für die direkte und indirekte Regeneration von FADH₂ unter aeroben Bedingungen (Tabelle 2). Wir führen dies hauptsächlich auf das Vorhandensein von molekularem Sauerstoff zurück, welcher durch seine beiden ungepaarten Elektronen die FADH₂ Regenerierung durch Symproportionierungsreaktionen entkoppelt. Offenbar führt eine erhöhte FADH₂ Regenerationsrate durch [Cp*Rh(bpy)H]⁺ zu einer höheren Entkopplung, und dementsprechend zu tieferen Produktivitäten und Elektronenausbeuten im enzymatischen Ansatz. Eine genauere Betrachtung der chemischen Reaktivitäten von FADH₂ lässt dieses Verhalten sehr plausibel erscheinen (siehe Reaktionsgleichgewichte 1 - 6).



Entkopplungsreaktionen von (regeneriertem) FADH₂ mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor, gemäss Massey *et al.*, *Chem.*, 1994. 269: 22459-22462.

Wie aus Reaktion (eq 1) ersichtlich ist, liegt reduziertes Flavin in physiologischem pH unprotoniert vor. Dies macht das freie Elektronenpaar zugänglich für die Symproportionierung mit oxidiertem FAD, siehe Reaktion (eq 2). Diese Reaktion ist zweiter Ordnung für FAD und FADH⁻, wodurch die Entkopplung umso ausgeprägter ist, je höher die FADH₂ Regenerierungsrate ist, zum Beispiel durch den oben

beschriebenen Rhodium-Mediator. Dies gilt allerdings nur, wenn ein entsprechender 1-Elektronen Akzeptor wie molekularer Sauerstoff gleichzeitig vorhanden ist und mit dem gebildeten Flavin Radikalanion weiter reagiert, siehe Reaktion (eq 3). Damit wird das Gleichgewicht in Reaktion (eq 2) kontinuierlich zugunsten der Symproportionierung verschoben.

Die Hauptlimitation für Elektroenzymologie mit Flavin vermittelten Oxidationsreaktionen besteht deshalb aus der Schwierigkeit, hohe FADH_2 Regenerationsraten zu erzielen und gleichzeitig entkoppelnde 1-Elektronen Reaktionen zu unterbinden. Wie aus den oben aufgeführten Reaktionsgleichgewichten ersichtlich, sind diese Reaktionen nicht reversibel und führen zum unmittelbaren Verlust an Reduktionsäquivalenten mit entsprechend tiefen Elektronenausbeuten. Des Weiteren sind sie um Größenordnungen schneller (nahe der Diffusionsgeschwindigkeit) als die gewünschte enzymatische Umsetzung, Reaktion (eq 6), was den Einsatz von mehr Enzym nur beschränkt sinnvoll macht. Hinzu kommt auch, dass radikalische Kettenreaktionen durch molekularen Sauerstoff schädlich für den Katalysator sein können und damit die Prozesszeit stark beeinträchtigen (Tabelle 2). Enzymimmobilisierungen würden deshalb eine gute Möglichkeit bieten, den Biokatalysator zu stabilisieren und damit die Prozesszeiten zu verlängern (siehe unten).

Vergleichbare Limitationen existieren für Elektroenzymologie gekoppelt an Reduktionsreaktionen nicht annähernd in diesem Ausmaß. Reduktionsäquivalente werden hierbei über strikte 2-Elektronen Chemie zum Enzym vermittelt, zum Beispiel über Hydrid-Donoren wie NAD(P)H . Reaktionen mit 1-Elektronen Akzeptoren wie molekularem Sauerstoff sind äußerst langsam aufgrund des benötigten (verbotenen) Elektronenspinumkehres in der Donorverbindung. Dies wird zum Beispiel ersichtlich bei der direkten Peroxidation von reduziertem FAD, Reaktion (eq 4), welche um Größenordnungen langsamer abläuft als die 1-Elektronen vermittelten Entkopplungen.

Zur Lösung der oben geschilderten Limitationen wurden vier verschiedene, aber komplementäre Strategien verfolgt:

- (i) Biochemische Evaluierung eines artifiziellen, sauerstofftoleranten 5-Deaza FAD Kofaktors welcher ausschließlich strikte 2-Elektronen Chemie eingeht

- (ii) Prozesstechnische Optimierung des elektroenzymatischen Systems mit dem nativen Flavin Kofaktor unter minimierten Symproportionierungsbedingungen
- (iii) Stabilisierung von StyA durch ein neuartiges Immobilisierungsverfahren, welches unter anderem auch einen schnellen und simplen Zugang zum immobilisierten Biokatalysator liefert
- (iv) Strukturaufklärung von StyA als wertvolle Informationsquelle für zukünftige Biokatalysator-Entwicklungen.

(i) *Biochemische Evaluierung eines artifiziellen, Sauerstofftoleranten 5-Deaza FAD Kofaktors welcher strikte 2-Elektronen Chemie eingeht* — Der artifizielle 5-Deaza FAD Kofaktor wurde ausgehend von 5-DeazaFMN (von Prof. Ghisla / Uni-Konstanz zur Verfügung gestellt) und einer bifunktionellen Flavokinase (Prof. Mack/ Uni Mannheim) synthetisiert. Das erhaltene Produktgemisch wurde anschließend über HPLC aufgereinigt. FTICR-MS Analyse bestätigte die 5-Deaza FAD Zielverbindung, sowie deren hohe Reinheit.

Da auch der artifizielle Kofaktor nur in der reduzierten Form als enzymatisch aktiv angenommen werden kann, wurden als erstes die möglichen Reduktionsverfahren untersucht. Sowohl die natürliche Reduktase Komponente StyB wie auch der Mediator $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}]^+$ haben sich hierbei als gute Hydrid-Donoren erwiesen. Im Gegensatz zum nativen Kofaktor FAD ist allerdings die direkte Reduktion an der Kathode nicht möglich, wie über Cyclovoltammografie aufgezeigt werden konnte. Die Reduktion von 5-Deaza Fad erfolgt analog zu NAD erst ab -1 V (Abbildung 6) und führt ebenfalls zu inaktiven Intermediaten.

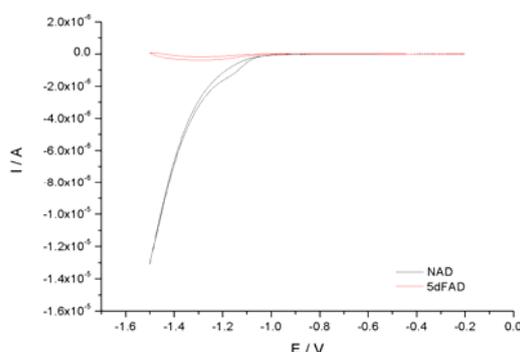


Abbildung 6: Cyclovoltammogramme von 5-Deaza FAD und als Vergleich NAD an einer BDD Elektrode. Reduktive Peaks können erst unter -1 V gesehen werden.

Dies konnte aus repetitiv cyclovoltammetrischen Untersuchungen geschlossen werden. Diese chemisch ähnlichen Verhaltensweisen erstaunen nicht wenn man bedenkt, dass der artifizielle Kofaktor um den aktiven Bereich strukturell mit NAD identisch ist und ein „Nicotinamid in FAD-Hülle“ darstellt. Analog zu den reduzierten Nicotinamid Kofaktoren zeigte auch 5-Deaza FADH₂ sehr tiefe Rückoxidationsraten in oxygenierten Medien, im Gegensatz zum nativen Flavin Kofaktor.

Obgleich der artifizielle Kofaktor elektrochemisch reduziert werden konnte, konnte bislang kein enzymatischer Umsatz nachgewiesen werden. Vielmehr sieht es so aus, dass das DeazaFlavin als kompetitiver Inhibitor an die Monooxygenase bindet. Somit stellt er keine Alternative zum natürlichen System dar, ist aber durchaus interessant für die Strukturaufklärung.

(ii) *Prozesstechnische Optimierung des elektroenzymatischen Systems mit dem nativen Flavin Kofaktor unter minimierten Symproportionierungsbedingungen*— Wie aus den Kinetikgleichungen ersichtlich ist, findet der Initiale Schritt der FADH⁻ Entkopplung über Symproportionierung mit FAD statt (eq 2). Dieser Vorgang ist zudem unabhängig von Sauerstoff und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb der gesamten Entkopplungskaskade dar. Diese Reaktion ist zweiter Ordnung, bzw. erster Ordnung bezüglich FAD und FADH⁻, und kann für die Entkopplungsgeschwindigkeit wie folgt formuliert werden:

$$v = -\frac{d \text{FAD}}{d t} = -\frac{d \text{FADH}^-}{d t} = \frac{1}{2} \frac{d \text{FADH}^-}{d t} = \frac{k_1}{k_{-1}} [\text{FAD}] [\text{FADH}^-]$$

Dadurch ergibt sich für die Entkopplungswahrscheinlichkeit eine konzentrationsabhängige Funktion bezüglich FAD und FADH⁻, welche bei äquimolaren Verhältnissen am ausgeprägtesten ist, und entweder bei sehr tiefen oder sehr hohen Konzentrationen FADH⁻ am geringsten ist (Abbildung 7).

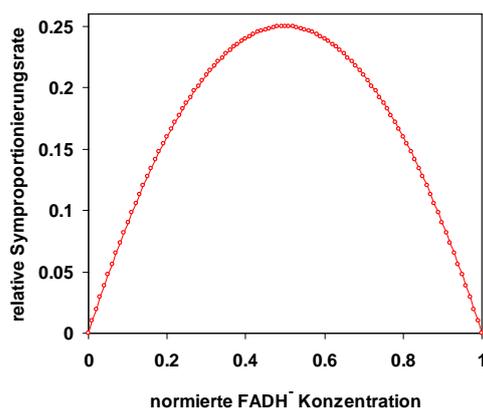


Abbildung 7:
Entkopplungswahrscheinlichkeit,
bzw. relative
Symproportionierungsrate von
reduziertem FAD in Abhängigkeit der
normierten Konzentration.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde eine Durchflusszelle konstruiert, bei der das reduktive Kompartiment den vollständigen Umsatz zum reduzierten FAD erzwingt. Dadurch können dem enzymatischen Kompartiment hohe FADH_2 Konzentrationen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff zugeführt werden mit tiefen Entkopplungsraten. Vergleichbar hohe Elektronenausbeuten sind bei einer herkömmlichen Batch-Zelle nicht zu erwarten, weil sich im gemeinsamen kathodischen Zell-Kompartiment stets hohe FAD Konzentrationen mit tiefen FADH^- Konzentrationen innerhalb der Diffusionsschicht an der Elektrodenoberfläche entkoppeln.

Die schematische Darstellung der entwickelten Zelle ist in Abbildung 8 wiedergegeben.

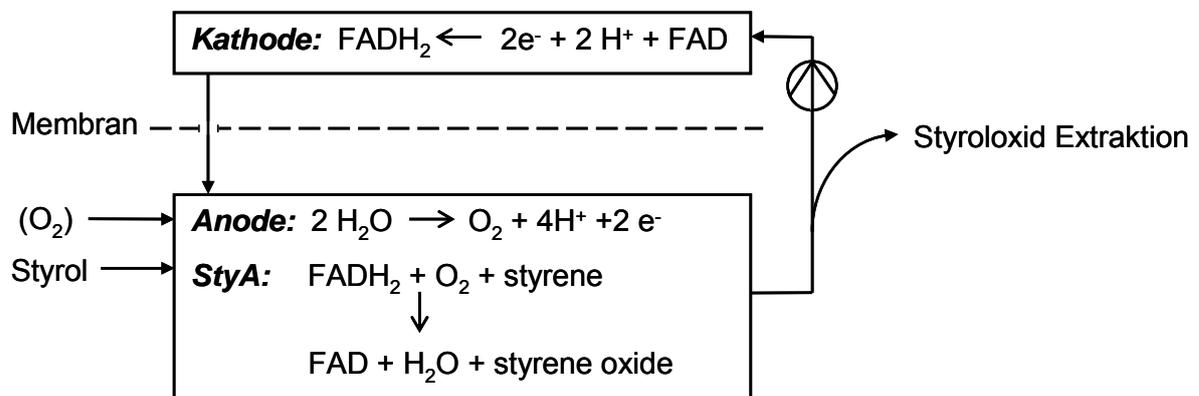


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der oxidativen elektroenzymatischen Zelle. Die Haupt-Reaktionen sind bezüglich des kathodischen und anodischen Kompartimentes aufgeführt.

Im kathodischen Reaktionsraum wird FAD vollständig in einem Zyklus elektrochemisch zum enzymatisch aktiven Kofaktor reduziert. Die reduzierten Kofaktoren werden dann direkt in den Anodenraum weitergeleitet, in welchem immobilisiertes StyA in der grossporigen Anode eingelagert ist. Die beiden Reaktionsräume sind durch eine Nafion Membran getrennt, um Nebenreaktionen zu unterbinden. Aufgrund der angelegten Spannung der Elektrolysezelle läuft im anodischen Kompartiment die oxidative Gegenreaktion zur reduktiven Kathodenreaktion ab. Dabei wird Wasser zu molekularem Sauerstoff oxidiert, welcher dann unmittelbar in der enzymatischen Reaktion benötigt wird. Der Vorteil dieses Aufbaus besteht darin, dass reaktionsgeschwindigkeitslimitierende

Diffusionseffekte der Reaktionspartner durch die unmittelbare Nähe zur Anode und zum Enzym minimiert werden können. Allfällige Sauerstofflimitationen können über einen optionalen Eingang zum Anodenraum überdies kompensiert werden. Styrol wird ebenfalls über einen separaten Eingang in den Anodenraum geführt, was eine kontrollierte Reaktionsführung erlaubt. Da anfallendes Styroloxid mit steigender Konzentration die enzymatische Reaktion inhibiert und verlangsamt, wurde überdies eine Extraktionseinheit an die Zelle gebaut. Zwei Systeme werden momentan evaluiert. Das eine System besteht aus einer Zweiphasenmischung mit Oktan als organische Phase. Das zweite System basiert auf *in situ* Produkt-Extraktion durch entsprechende Trägermaterialien. Das Ziel dabei ist, Styroloxid mit höherer Selektivität als Styrol zu binden, und dadurch schon während des Prozesses eine Aufreinigung zu bewirken. Die Evaluation geeigneter Träger ist hierbei in Zusammenarbeit mit Resindion Gegenstand aktueller Untersuchungen.

(iii) Stabilisierung von StyA durch ein neuartiges Immobilisierungsverfahren— Traditionellerweise werden Enzyme zunächst über mehrere Schritte aufgereinigt und anschließend immobilisiert. Dazu werden in der Regel spezielle Aufreinigungsapparaturen und eine Vielzahl an Materialien benötigt, welche sich kostengünstig auswirken. Zudem können die Zielenzyme während der zeitlich langen Prozedur an Stabilität einbüßen und zur Kosten-Ineffektivität des Prozesses beitragen. Aus diesen Gründen sind kombinierte Strategien, welche die Aufreinigungsmatrix direkt als Katalysmatrix verwenden, von großem Interesse. In Zusammenarbeit mit Resindion wurde die direkte Immobilisierung von StyA direkt aus dem Zellextrakt von *E. coli* auf Ebene von Ladungseffekten (pH) und Proteinkonzentrationen im Zellextrakt untersucht.

Als Trägermaterialien wurde zwei unterschiedliche Ionenaustauscher, SEPABEAD[®] Q1A und EA, verwendet. Bei tiefen Zellextraktkonzentrationen wurden sowohl eine höhere StyA Absorptionseffizienz aus dem Zellextrakt (Abbildung 9) wie auch eine höhere Protein-Reinheit auf den Trägern erreicht (Abbildung 10). In beiden Fällen war der Einfluss des pH-Werts gering. Andererseits wurden die Trägerkapazitäten besser ausgenutzt, wenn anfänglich mit höheren Zellextraktprotein-Konzentrationen gearbeitet wurde (Abbildung 11).

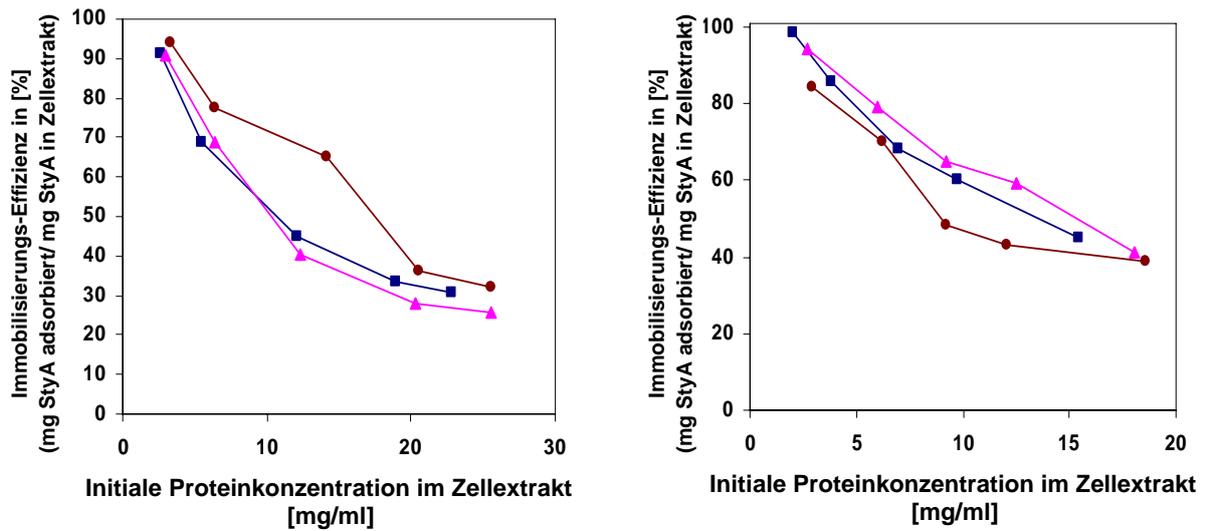


Abbildung 9: Immobilisierungseffizienz von StyA aus Zellextrakt an SEPABEAD® Q1A (A) und EA (B). Total immobilisiertes Protein bei pH 7 (—●—), pH 6.5 (—▲—) und pH 6 (—■—); immobilisiertes StyA bei pH 7 (—○—), pH 6.5 (—△—) und bei pH 6 (—□—)

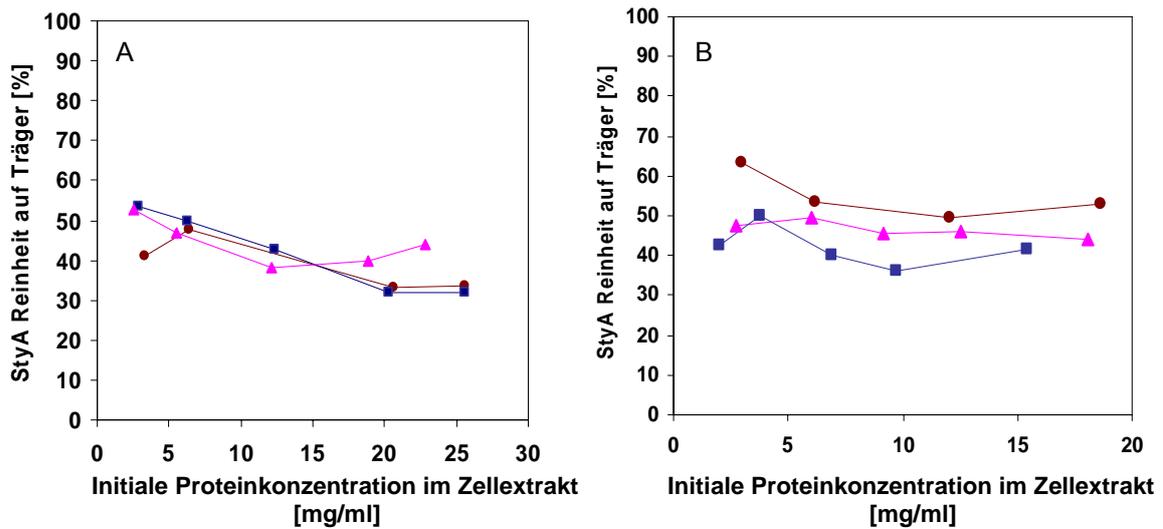


Abbildung 10: StyA Reinheit auf den verwendeten Trägern bei verschiedenen pH Werten. SEPABEAD® Q1A ist in Figur A dargestellt, SEPABEAD® EA in Figur B. Die Reinheit für pH 7 (—●—), pH 6.5 (—▲—) und pH 6 (—■—) bestimmt worden.

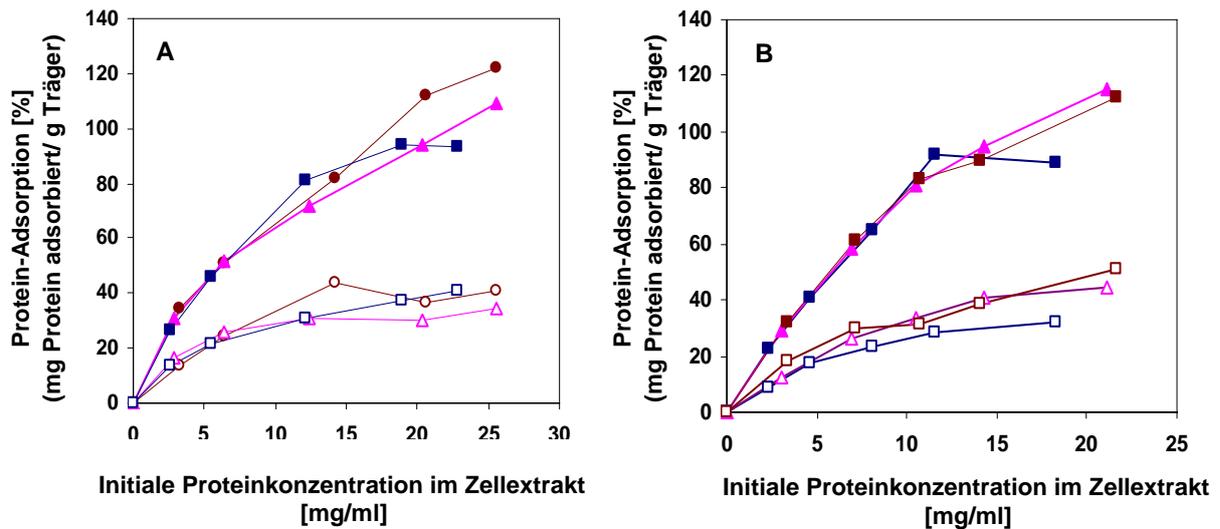


Abbildung 11: Adsorption von StyA aus Zellextrakt auf SEPABEAD® Q1A (A) und EA (B) bei variierenden initialen Proteinkonzentrationen. Total immobilisiertes Protein bei pH 7 (—●—), pH 6.5 (—▲—) und pH 6 (—■—); immobilisiertes StyA bei pH 7 (—○—), pH 6.5 (—△—) und bei pH 6 (—□—)

StyA kann bis zu 60% auf den Trägern angereichert werden, und die Absorptionseffizienz aus dem Zellextrakt erreicht bis zu 90%. Selbst unter prozessähnlichen Bedingungen war die Affinität von StyA an die Träger sehr hoch. Es konnten zum Beispiel keine Verluste an immobilisiertem Enzym gemessen werden. Für erste Evaluationszwecke wurde die immobilisierte Aktivität über Ko-Immobilisation der Reduktasekomponente StyB bestimmt. SEPABEAD® Q1A zeigte mit bis zu 0.7 U/mg immobilisiertem StyA die höchste Aktivität, welche 20% der maximalen Aktivität des freien Enzyms darstellt.

Mit den erhaltenen Daten konnte gezeigt werden, dass das Aufreinigung und Immobilisierung sehr effektiv kombinierbar ist. Mit dieser Grundlage werden nun Optimierungen und Weiterentwicklungen vorgenommen, welche die Technologie auch zugänglich für Prozesse in größerem Maßstab und mit höheren Katalysatordichten erlaubt. Die Erhöhung der Katalysatordichte auf den Trägern wird momentan bezüglich Konduktivität untersucht, da die ladungsabhängige Absorption von StyA nicht nur vom pH abhängig ist, sondern auch von der Salzkonzentration.

(v) *Strukturaufklärung von StyA als wertvolle Informationsquelle für Biokatalysator-Entwicklungen*— In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. James H. Naismith vom „Centre for Biomolecular Sciences“, University of St

Andrews/Scotland, ist die Strukturaufklärung von StyA mittels Röntgenkristallografie in Angriff genommen worden. Für diesen Zweck wurden bis zum heutigen Zeitpunkt 350 mg reinstes Enzym, sowie 45 mg reinstes selenomethionin-markiertes Enzym bereitgestellt. Die ersten Kristalle liegen in einer Auflösung von 3.0 Å vor. In Abbildung 12 sind die Kristalle mit dem FAD Kofaktor (A) und ohne (B) gezeigt. An der Qualität der Kristalle wird momentan intensiv gearbeitet, um die exakte Strukturberechnung zu ermöglichen.

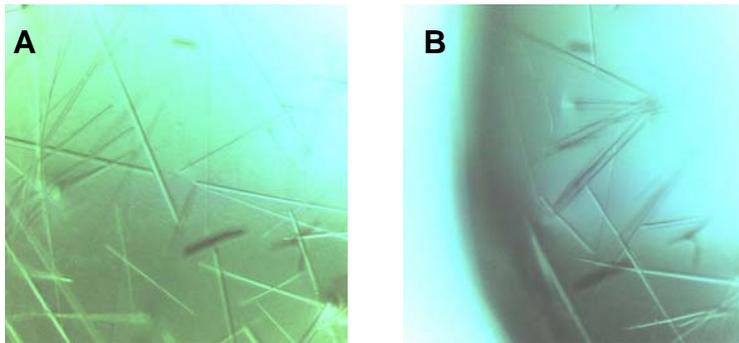


Abbildung 12: Kristalle von StyA mit FAD (A) und ohne FAD (B) in einer Auflösung von 3.0 Å.

Eine dieser Entwicklungen stützt sich auf den Katalysemechanismus. Hierbei werden in Zusammenarbeit mit dem Swedish NMR Centre/Göteborg Struktur-dynamik/Katalyse Korrelationen identifiziert und für Enzym-Entwicklungen ausgenutzt.

Screening neuer Monooxygenasen aus kultivierbarer Biodiversität

Zum Auffinden neuer Monooxygenasen aus kultivierbarer Biodiversität wurden zwei Strategien verfolgt (Abbildung 13). Zum einen wurden Mikroorganismen aus zahlreichen unterschiedlichen Standorten neu isoliert (z.B. natürlich und anthropogen ölkontaminierte Standorte, Eisenbahnschwellen, Rhizosphäre von ätherische Öle produzierenden Pflanzen). Zum anderen wurden Isolate der Stammsammlung der BRAIN AG untersucht, welche für oxidative Umsetzungen von Kohlenwasserstoffen bekannt sind. Die Neuisolate wurden auf einem Minimalmedium-Agar (1 % (v/v) Petroleum, Merck #1.09718 (Alkane, Aromaten 0.2 %) + Terpene (Borneol, Carvon, Lavandulol); 5 Wochen Inkubation bei 30°C) angezogen, wobei die P450 Expression mit Salicylsäure induziert wurde. Insgesamt wurden so 58 Neuisolate aus der natürlichen Biodiversität isoliert. Von diesen 58 Neuisolaten zeigten 11 außerdem

Wachstum auf einer über die Gasphase eingebrachten Substratmischung bestehend aus den Aromaten Naphthalin, 3-Phenoxytoluol, Inden und Toluol. Für fünf dieser Isolate konnte nach Permeabilisierung der Zellen ein Umsatz mit allen getesteten Substraten, wie z. B. für das Isolat HD1106, nachgewiesen werden (Abbildung 13).

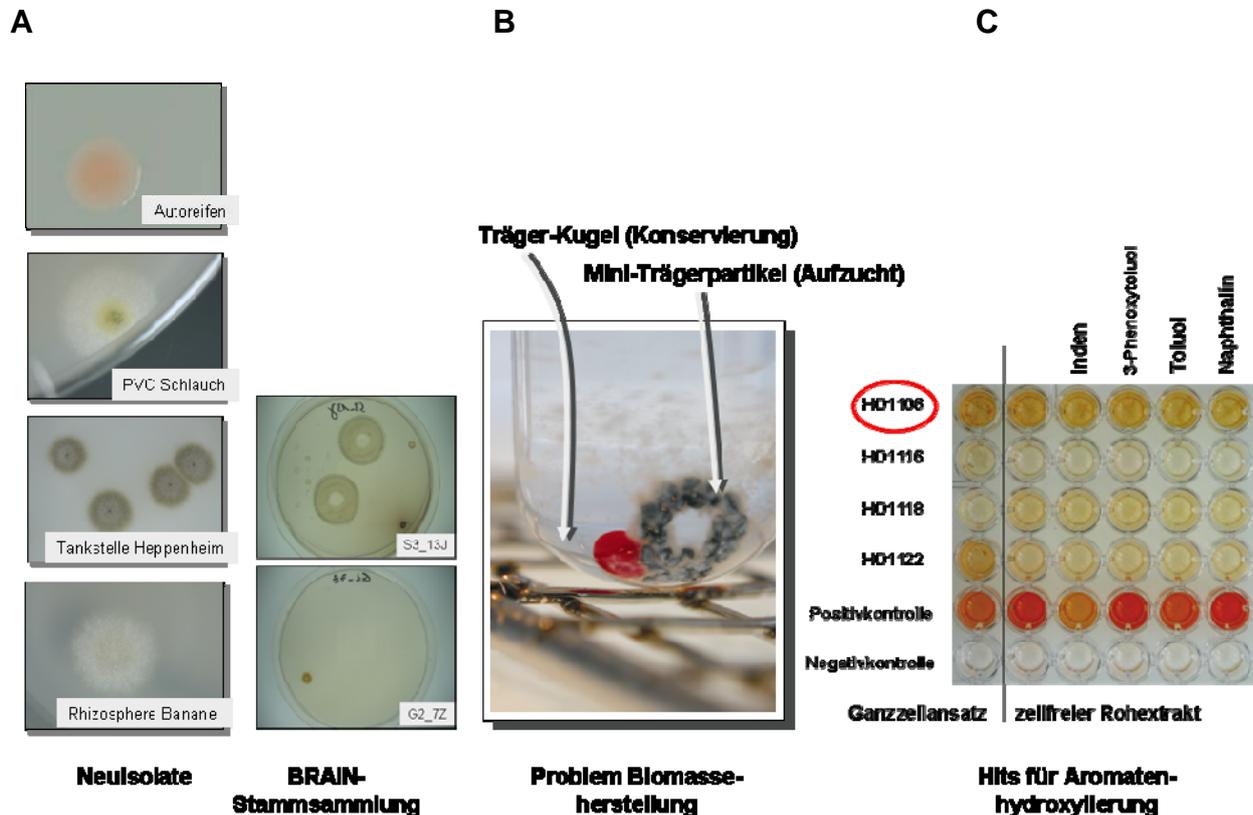


Abbildung 13: Durchmusterung der kultivierbaren Biodiversität, um Organismen zu finden, die aromatische Verbindungen hydroxylieren. **A)** Beispiele dieser Organismen **B)** Kultivierung **C)** Umsetzung der vier Testsubstrate im zellfreien Rohextrakt im 96er-Format mit dem 4-AAP Assay.

Zusätzlich zu den Neuisolaten wurden 768 Stämme aus der BRAIN-Stammsammlung auf Agar-Minimalmedium gestempelt und mit den o.g. aromatischen Substraten begast. 26 Stämme zeigten Wachstum und wurden weiter untersucht. Aus der kultivierbaren Biodiversität wurden somit insgesamt 37 Isolate für Hydroxylierung von Aromaten isoliert. Fünf Neuisolate zeigen Aktivität im zellfreien Extrakt, was auf lösliche, nicht membrangebundene Enzyme hinweist. Weitere Untersuchungen zur Enzymklassifizierung sind im Gange.

Neun Stämme wurden ferner auf ihre Fähigkeit zur Styrolepoxydierung geprüft. Diese Stämme waren im 4-Aminoantipyrin (4-AAP) Assay positiv für die Hydroxylierung von

Inden, 3-Phenoxytoluol, Toluol und Naphthalin. Sowohl der kolorimetrische Epoxydnachweis in der Mikrotiterplatte als auch HPLC-Messungen zeigten keine Bildung von Styrolepoxyd in diesen Isolaten. Weitere Isolate werden momentan untersucht.

Für 3 wasserunlösliche Substrate, die von der BASF AG benannt wurden, sind bisher 1196 Organismen aus der BRAIN Stammsammlung (M9 Mineralsalzmedium-Agar (Festphase); 33 Tage bei 28°C) und 58 Neuisolate auf Wachstum mit diesen Verbindungen als einziger C-Quelle untersucht worden. Dazu wurden die C-Quellen in einer offenen Glasschale in einem abgeschlossenen Inkubator gemeinsam mit den Stämmen auf der Festphase inkubiert. Über die Gasphase wird die C-Quelle zum Wachstum bereitgestellt. Dieses Vorgehen hat sich in diesem Projekt bereits beim Auffinden der Neuisolate für die Aromatenhydroxylierung bewährt (s.o.). Es zeigte sich (Abb. 14), dass in der durchsuchten Biodiversität keine Organismen in der Lage waren, mit diesen 3 Verbindungen als einziger C-Quelle zu wachsen.

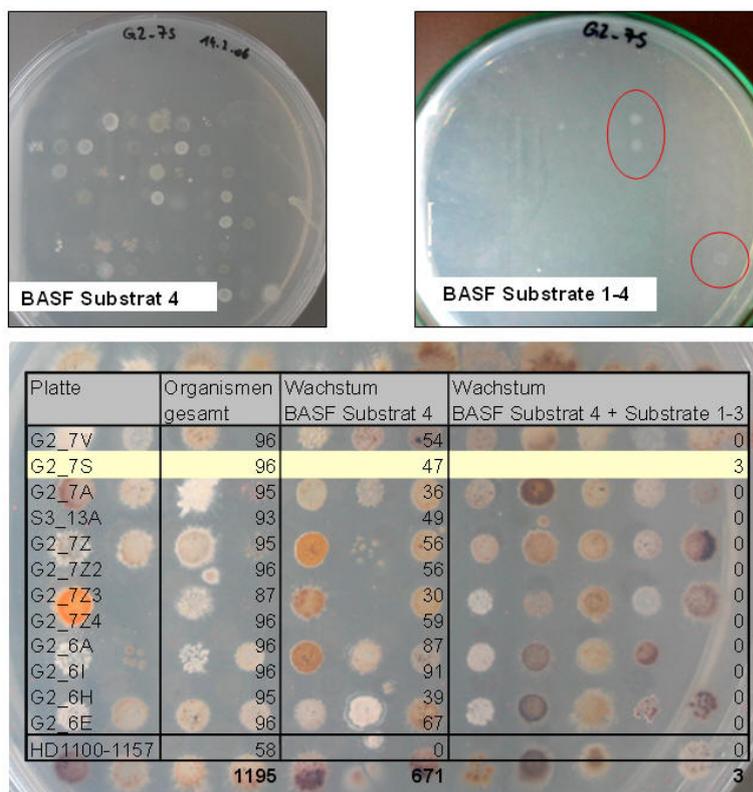


Abbildung 14: Wachstum bzw. Inhibition mikrobieller Isolate durch BASF-Substrate

Erst nach Zugabe eines vierten, wasserlöslichen BASF-Substrates in die Agarplatten waren 3 Isolate in der Lage, Kolonien auszubilden. Plattierte man die Gesamtheit der

rund 1200 Stämme nur auf diesem Substrat ohne die Anwesenheit der 3 anderen Verbindungen in der Gasphase, so wuchsen über 50 % aller Isolate (671 von 1196). Dies belegt, dass die 3 anderen Substrate in den anliegenden Konzentrationen (über die Gasphase) nicht nur keine ausreichenden C-Quellen darstellen, sondern darüber hinaus toxisch sind.

Entwicklung eines FACS-Nachweissystems zum Durchmustern von Metagenomen

Als Basis für die Etablierung des HTS-Screeningsystems wurden mehrere Plasmid-Bibliotheken des bezüglich der getesteten Aromaten 4-AAP Nachweis-positiven Stammes HD1106 (nach 16S-rDNA Taxonomie-Typisierung bei BRAIN ein Verwandter der *Burkholderia sp.*/β-Proteobacteria, für die Monooxygenasen beschrieben sind) erstellt und der AG Schwaneberg für Durchmusterung mittels FACS übergeben. Als beste Methode für die Erstellung der Genbank aus der genomischen DNA von HD1106 erwies sich ein *AluI*-Partialverdau (Abb. 15).

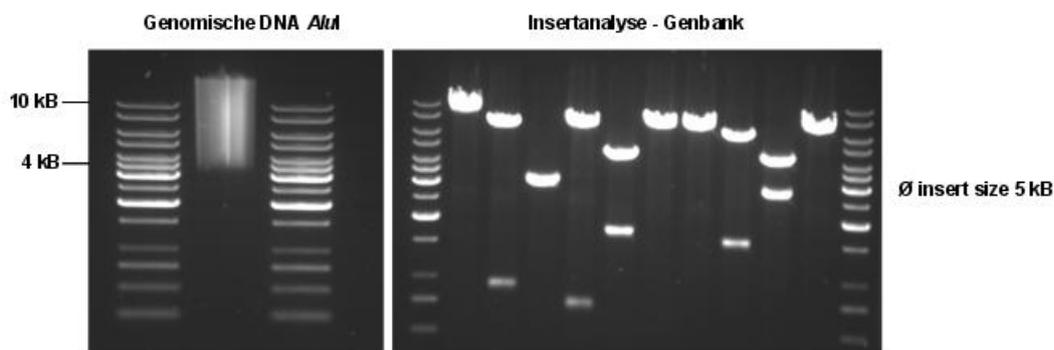


Abbildung 15: Partialverdaute DNA und Genbankanalyse des 4-AAP positiven Isolates HD1106 aus der mikrobiellen Isolationskampagne bei BRAIN

Eine Genbank mit 216.000 cfu und 5 kB Insertgröße wurde in pUK21 erzeugt (14.000 cfu reichen zur Abdeckung des Genoms aus). Davon wurden rund 100.000 cfu einer Sekundärbank zum Aktivitätsscreening auf Agarplatten ausgebracht. Da die Etablierung des FACS-Screenings beim Projektpartner IUB noch nicht ausreichend weit fortgeschritten war, sollte das Screening alternativ als klassisches Agarplattenscreening ausgelegt werden. Ein 4-AAP Flüssigassay von rund 20.000 Proben (rekombinante „shotgun“-Klone der Genbank) war im Projektumfang nicht abgebildet und die Erfolgsaussichten einer Detektion aufgrund der natürlicherweise nicht-optimierten Genexpression in einer „shotgun“-Bank (die hochaktive P450 BM-3

Referenz Oxygenase wurde im pET T7-System stark überexprimiert, um vermeßbar zu sein) eher gering. Als Alternative wurde daher versucht, die Oxidation von Indol zu Indigo durch den Stamm HD1106 nachzuweisen. Die Plattierung von 100.000 cfu der HD1106 Genbank auf Indol-haltige Agarplatten unter Bedingungen, bei denen in *E. coli* exprimierte Metagenom- und Isolat „shotgun“-Klone als Positivkontrollen aktiv sind (Abb. 16), führte zu keiner Identifizierung rekombinanter Klone. Dies kann bedeuteten, dass die zu einer Bildung von Indigo notwendige spezifische Oxidation des Indols am stickstoffhaltigen 5-Ring durch die Oxidase aus HD1106 nicht stattfindet.



Abbildung 16: Positivkontrollen zur Oxidation von Indol zu Indigo durch rekombinante *E. coli* Klone aus Metagenom-Banken.

Um Metagenombibliotheken von Oxygenasen zu durchsuchen sind Durchmusterungssysteme nötig, welche 10^6 - 10^7 Varianten in kurzer Zeit untersuchen können. Konventionelle Nachweissysteme im Mikrotiterplattenformat erlauben diese Durchsätze nicht. Basierend auf Vorarbeiten von Hai et al.^[10] wurden Emulsionen (Wasser in Öl) und Doppelemulsionen (Wasser in Öl in Wasser) hergestellt. In einem Milliliter Emulsion sind ca. 10^{10} Kompartimente als Reaktionsräume mit einem Durchmesser von durchschnittlich 2.6 μm herstellbar (Abbildung 17). Die durchschnittliche Emulsionsgröße kann durch Variation der Rührergeschwindigkeit bis zu einem Durchmesser von ca. 60 μm variiert werden. Das Durchmusterungsprinzip beruht auf der Vereinzelnung der Metagenombibliothek in den Emulsionströpfchen. Das Ziel ist in diesen kompartimentierte Metagenomgene zu exprimieren und aktive Proteine durch einen Fluoreszenzaktivitätsnachweis zu detektieren. Im Jahre 2005 publizierten Bernarth^[11] und Mastrobattista^[11, 12] erstmals die erfolgreiche Sortierung von Doppelemulsionen für ganze Zellen und *in vitro* translatierte Proteine mittels FACS. Wir wählten als Modellsystem für die Assay-

Entwicklung fluoreszierende FITC-markierte BSA-Proteinmoleküle, die anschließend über FACS durchgemustert wurden. Um eine Sortierung der Reaktionsräume mit einem FACS zu ermöglichen, ist eine Doppelemulsion nötig. Die Größenverteilung der Doppelemulsionen wurde gegenüber bisherigen Methoden verbessert (Abbildung 17).

Entwicklung eines FACS-Nachweissystems zum Durchmustern von Metagenomen

Doppelemulsionen wurden im Vergleich zu Literaturdaten verbessert durch Reduktion der Zahl von Wassertropfen pro Ölphase (von 5-6 auf 1 bis 2 Tropfen) ohne dass sich die Zahl der aufgefundenen Doppelemulsionen (25 %) verringerte (Abbildung 17).

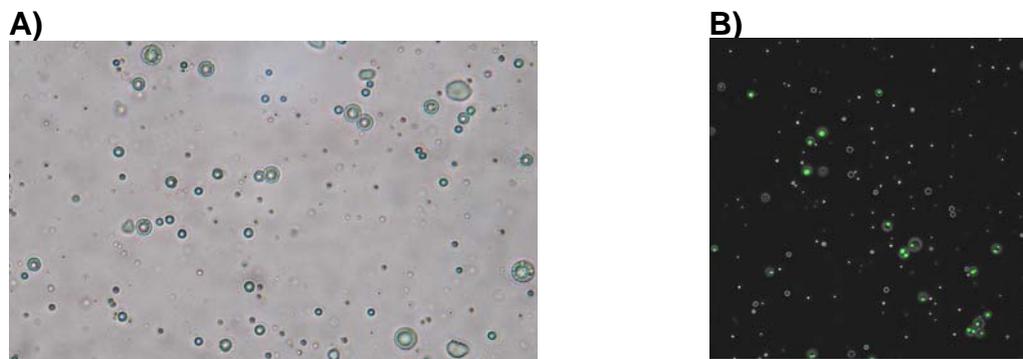


Abbildung 17: Doppelemulsionen aufgenommen im Lichtmikroskop (A) und konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (B). Doppelemulsionen wurden mit Span 80/Tween 80 in Mineralöl (light) mit eingeschlossenem FITC-markierten BSA erzeugt.

Die erhaltenen Doppelemulsionen zeigen eine hohe Stabilität und konnten zweimal hintereinander sortiert werden ohne erkennbare Scherungen im Sortierprozess. In der ersten Sortierrunde gelang eine Anreicherung der Fluoreszenz von 4.2% auf 42% in der sortierten Population. In einer zweiten Sortierung dieser Population gelang ein Anstieg auf über 70%. Zur Sortierung wurde auf ein FACSVantage (Becton Dickinson) der BASF AG zurückgegriffen (Abbildung 18).

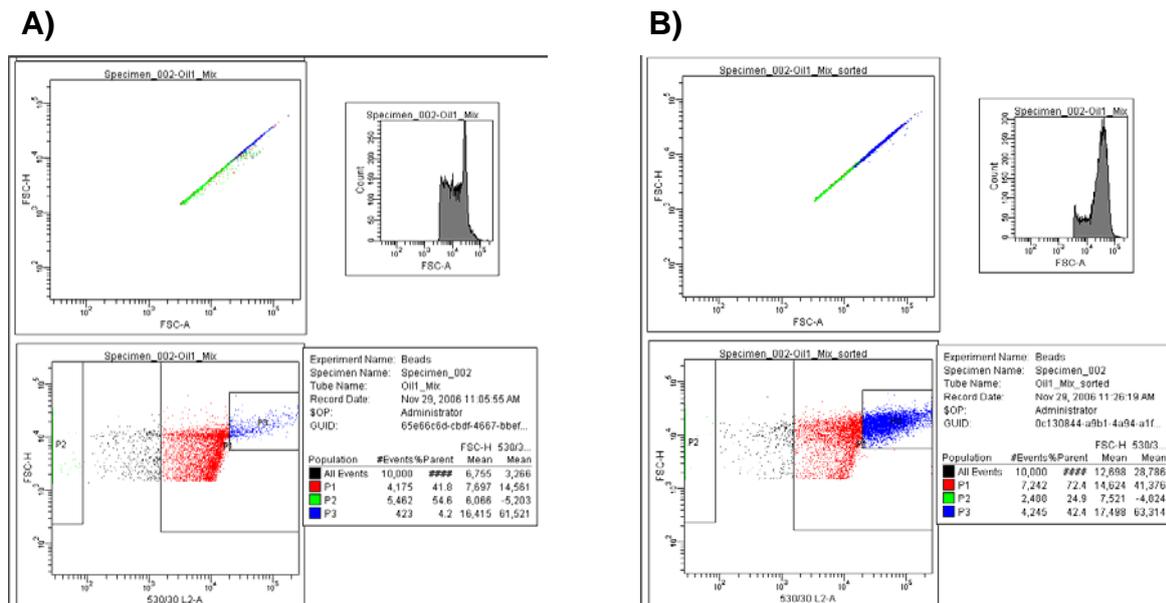


Abbildung 18: Sortierung einer Mischung von Doppelemulsionen, die mit BSA und FITC-markierten BSA beladen sind (A), und Sortierung der in (A) aussortierten Doppelemulsionen (B; Region P3).

Zusammenfassend wurden Doppelemulsionsprotokolle entwickelt, die in Durchflußzytometern sortierbar sind und ein gegenüber den Literaturdaten verbessertes Verhältnis der Wasser in Öltröpfen besitzt.

Neue Durchmusterungssysteme für die Gelenkte Evolution/Metagenom-Screening von Monooxygenasen in FACS-Systemen

Für die Sortierung müssen Fluoreszenznachweissysteme entwickelt werden, die den Anregungswellen der FACS-Laser genügen. Für Monooxygenasen wurden mehrere Coumarin-Derivate (Coumarinbutylether, Coumarinoyldodekansäure, Coumarinoylnonansäure und Coumarinbenzoyl ether; Abbildung 19 links) synthetisiert und auf Umsatz mit der Monooxygenase P450 BM3 untersucht (Abbildung 19; rechts).

Monooxygenase P450 BM3 wt hydroxyliert Benzoylcoumarin (Abbildung 19; rechts TLC). Nach Hydroxylierung der Benzoylposition wird fluoreszierendes Coumarin freigesetzt, welches im Durchflußzytometer anregbar und detektierbar ist. Abbildung 20 zeigt den Umsatz von Benzoylcoumarin im einem Fluorometer (Tecan, Safire).

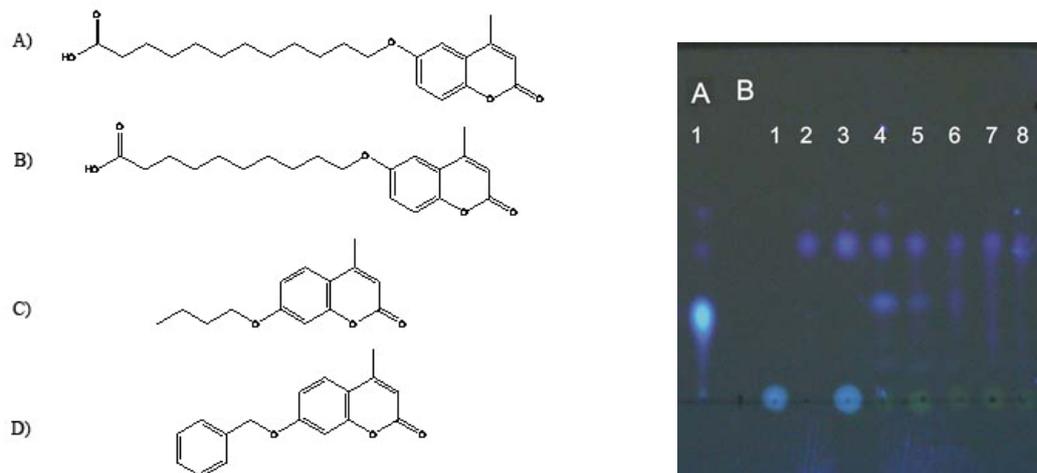


Abbildung 19: Synthetisierte Coumarin-Derivate (links) für FACS-basierende Monooxygenase-sortierung: **A:** Coumarinoyldodekansäure, **B:** Coumarinoylnonansäure, **C:** Coumarin-butylether und **D:** Coumarinbenzoyl ether. Nachweis des Umsatzes von Coumarinbenzoyl ether (rechts). **A1:** Coumarin; **B1:** NADPH, **B2:** Benzoylcoumarin; **B3:** NADPH + Benzoylcoumarin; **B4:** Reaktionsmischung (B3) + P450 BM3 wt, statt P450 BM3-Wildtype, **B5:** Mutante F87A, **B6:** Mutante F87A/R47F, **B7:** Mutante F87A/R47F/M355S und **B8:** Mutante Y51F.

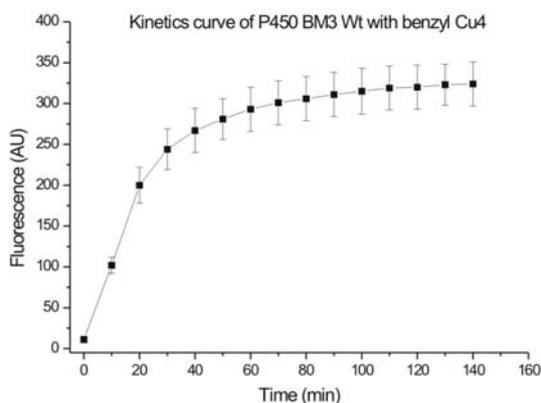


Abbildung 20: Kinetik der Umsetzung von Benzoylcoumarin (Endkonzentration 180 μM) mit P450 BM3 wt. K_m wurde bestimmt zu $80 \pm 5 \mu\text{M}$ und k_{cat} $0.1 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$

Momentan wird an dem Einsatz der Benzoylcoumarin-Verbindung in Doppel-emulsionen und FACS gearbeitet, um die BRAIN-Metagenomdatenbanken zu durchsuchen (letzter Meilensteinpunkt des IUB-Partners).

Modul 2: Bioreduktion

Expressionssystem und Katalysatorentwicklung

Als Modellkatalysator dient die thermophile Alkoholdehydrogenase aus *Thermus* sp.. Der Katalysator wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pASZ2 unter Kontrolle des *lac*-Promotors exprimiert. Studien zur Optimierung der Expression wurden zunächst im Schüttelkolben durchgeführt. Diese Erkenntnisse wurden dann auf den 2 L Maßstab übertragen und der Biokatalysator im Fed-batch Verfahren produziert. Aus einer Fermentation konnten durch eine einfache Hitzefällung durchschnittlich 800 mg technisch reine TADH (75 %) gewonnen werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reinigungsschritte bis zur technisch reinen TADH

Parameter		Zellfreier Extrakt	Hitzebehandelt
Volumen	ml	600,0	485,0
Protein Konzentration	mg/ml	17,2	1,6
Spezifische Aktivität	U/mg	0,5	5,5
Totale Aktivität	U	4797,9	4379,7
Ausbeute	%	100,0	91,3
Reinigungsfaktor		1,0	11,9

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde eine höhere Reinheit benötigt, die durch zwei weitere Chromatographieläufe erreicht werden konnte (Abbildung 21). Zur Lagerung wurde das Enzym ohne signifikante Aktivitätsverluste lyophilisiert.

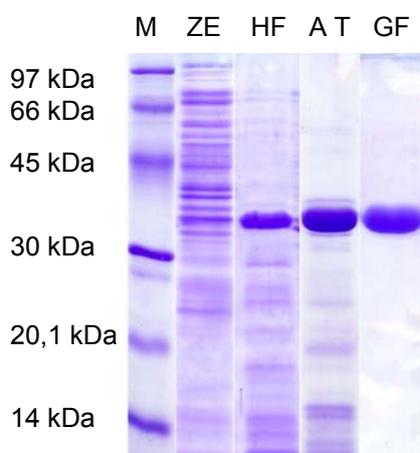


Abbildung 21: TADH Reinigung (15 % SDS/PAGE)

M: Größenstandard; **ZE:** Zellfreier Extrakt; **HF:** Hitzefällung (80 °C, 15 min); **AC:** Anionenaustauschchromatographie; **GF:** Gelfiltration

Um eine höhere Expressionsrate zu erzielen, wurde Terrific Broth (TB) als Medium verwendet und der Reaktor im Batch Modus eingesetzt. Die Reinigung der TADH konnte weiter optimiert werden. Durch einen kombinierten Zellaufschluss- und Hitzfällungsschritt konnte ein zeitintensiver Ultrazentrifugationsschritt eingespart werden.

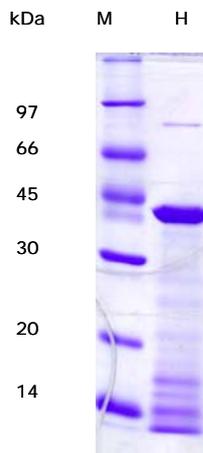


Tabelle 4: Optimierte TADH Produktion

Parameter		Hitzebehandelt
Volumen	ml	87,02
Protein Konzentration	mg/ml	4,97
Spezifische Aktivität	U/mg	19
Totale Aktivität	U	8217

Abbildung 22: TADH Reinigung (15 % SDS/PAGE)

M: Größenstandard; **H:** Kombinierte Zellyse und Hitzefällung (75 °C, 20 min);

Mit diesem Produktionsprotokoll können nun größere Mengen (8200 U) technisch reiner TADH (85 %) innerhalb von 2 Tagen hergestellt werden.

Erstellung des Strukturmodells auf Basis der Datenbank

Mit Hilfe des am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart bereits erfolgreich eingesetzten Datenbanksystems^[13] wurde eine umfassende Datenbank der MDR Superfamilie (medium chain dehydrogenases) aufgebaut, welche alle zu TADH homologen Proteine enthält. Die Datenbank enthält zurzeit über 7500 Sequenzeinträge, die für nahezu 3000 Proteine codieren. Die Datenbank umfasst 86 in der *Protein Data Bank* (PDB) zugängliche Struktureinträge für 27 unterschiedliche Proteine, die mit insgesamt 207 Strukturdatensätzen in der Datenbank abgelegt sind. Um eine detaillierte systematische Analyse der Proteine und die Erstellung eines verlässlichen Homologiemodells der TADH zu ermöglichen, wurden die Proteine nach Sequenzähnlichkeit in definierte Proteinfamilien eingeteilt. Die Proteinsequenzen wurden in Superfamilien und homologe Familien klassifiziert (Knoll, 2007, Publikation in Vorbereitung).

Die Superfamilie, welche die TADH enthält (TADH-Superfamilie), umfasst Strukturinformation für die Formaldehyddehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (PPFDH, PDB-Eintrag 1KOL), welche somit das global sequenzähnlichste Protein mit bekannter Struktur darstellt. Die Erstellung eines Strukturmodells für die TADH basierend auf dem PDB Eintrag 1KOL erwies sich allerdings als nicht sinnvoll, da sich die beiden Proteine in ihren biochemischen Eigenschaften stark unterscheiden: Die PPFDH setzt ausschließlich sehr kleine Substrate um, die TADH hat dagegen ein relativ breites Substratspektrum. Die gut charakterisierte Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber (HLADH) zeigt ein ähnliches Substratspektrum wie die TADH. Bei dem der TADH am ähnlichsten Isoenzym der HLADH handelt es sich um das steroidspezifische Isoenzym (PDB-Eintrag 1EE2, SS-Isoenzym). Obwohl die HLADH global eine etwas geringere Sequenzidentität zu TADH hat als die PPFDH (26% bzw. 33%), konnten Bereiche mit lokal höherer Sequenzidentität zu TADH identifiziert werden. Diese Bereiche befinden sich zum einen im Eingangsbereich des Substratkanals, vor allem aber im inneren Bereich. Im inneren Bereich der Bindetasche befindet sich bei der PPFDH an der Position 125 ein Tyrosinrest, der die Größe der Bindetasche stark einschränkt. Dieses Tyrosin findet sich auch in der Sequenz der TADH wieder, was auf eine ähnliche Form der Bindetasche in diesem Bereich schließen lässt. In der HLADH fehlt diese Aminosäure, da der sich an dieser Stelle befindliche Loop in einer anderen Konformation vorliegt, was eine deutlich erweiterte Bindetasche an dieser Stelle zur Folge hat. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei der TADH um ein Hybrid aus HLADH (SS-Isoenzym) und der PPFDH handelt. Durch diese Sequenz- und Strukturvergleiche konnten Modelle für die Form der Bindetaschen der genannten Proteine erstellt werden, an Hand welcher ein Modell für die Bindetasche der TADH abgeleitet werden konnte (Abbildung 23).

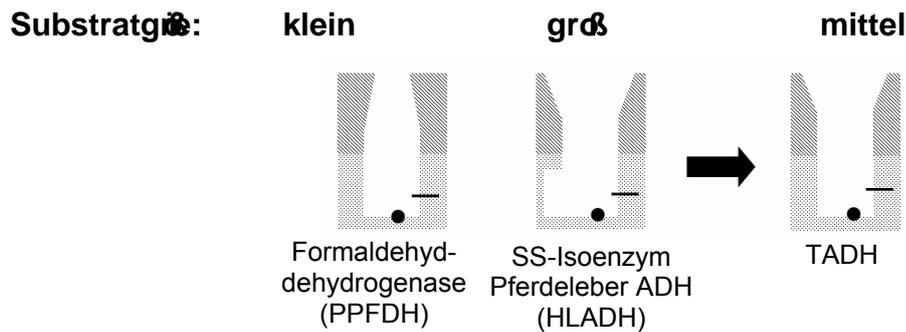


Abbildung 23: Modelle der unterschiedlich gestalteten Bindetaschen. Hell schraffierte Region: innerer Bereich der Bindetasche, dunkel schraffierte Region: Eingangsbereich. Die Verengung der Bindetasche durch das vorhandene Tyrosin125 ist in der Darstellung der PPFDH deutlich im unteren linken Bereich des Schemas zu sehen. Durch Punkt und Strich sind die Lokalisation des katalytischen Zink bzw. des NAD angedeutet.

Die Erkenntnisse über die Form der Bindetasche dienten als Basis für die Erstellung des Strukturmodells der TADH mittels Homologiemodellierung. Daher wurden jeweils die lokal ähnlicheren Bereiche aus PPFDH (PDB Eintrag 1KOL) und HLADH (PDB Eintrag 1EE2) als Template-Strukturen herangezogen. Die Qualitätsuntersuchungen mit den Programmen PROSA2003 und PROCHECK bestätigten eine gute Qualität für das erstellte Modell der TADH.

Vorhersage von Mutanten zur Verifizierung der Modelle der Bindetaschen

Um die Gültigkeit der Modelle der Bindetaschen zu überprüfen, wurden für die TADH Mutanten für den inneren Bereich der Bindetasche vorgeschlagen und experimentell überprüft. Um den inneren Bereich der Bindetasche aufzuweiten und somit sperrigeren Substraten zugänglicher zu machen, wurden zunächst Mutanten vorgeschlagen, um den sperrigen Tyrosinrest zu verkleinern. Dazu wurde ein Austausch des Tyrosins an der Stelle 111 gegen Serin, Alanin, Valin und Leucin vorgeschlagen. Serin wurde aufgrund der ebenfalls vorhandenen OH-Gruppe, Alanin und Valin wegen ihrer geringen Größe, und Leucin wegen der ähnlichen Größe ausgewählt. Als Testsubstrat für die Mutanten wurde 3-Methylcyclohexanol ((*R*)- und (*S*)-Enantiomer im Vergleich) ausgewählt. Die Wahl dieser Substrate bietet sich an, da das sperrigere *R*-3-Methylcyclohexanon vom Wildtyp 100 mal schlechter umgesetzt wird als das Racemat, also die *S*-Form. Eine vergrößerte Substrattasche würde eine verbesserte Umsetzung dieses Substrates ermöglichen, welches durch das Verhältnis der Aktivitäten von racemischer zur *R*-Form angegeben werden kann.

TADH Mutationen

Die ausgewählten Mutationen wurden technisch am Lehrstuhl für Biotechnik umgesetzt. Die erste Auswahl von Mutanten bezog sich vorrangig auf das Tyrosin an der Stelle 111. Es wurden die vier kleineren Aminosäuren Valin, Leucin, Alanin und Serin ausgewählt, um die Substratbindungstasche zu vergrößern. Bis auf die Alaninmutation konnten alle Aminosäuren ausgetauscht und die mutierten Enzyme in löslicher Form produziert und wie oben beschrieben gereinigt werden.

Tabelle 5: Umsätze des Testsubstrats durch die unterschiedlichen Mutanten im Vergleich

	wtTADH	Y111S	Y111V	Y111L
3-Methylcyclohexanon (<i>rac.</i>) [U mg ⁻¹]	7.9	0.5	5.7	13.3
(<i>R</i>)-3-Methylcyclohexanon [U mg ⁻¹]	0.09	0.03	0.2	0.4
Verhältnis (<i>rac.</i>) / (<i>R</i>)	90	17	37	32

Für Y111V und Y111L konnte ein verbesserter Umsatz des (*R*)-Enantiomers gemessen werden. Dies zeigt, dass die Substratbindungstasche tatsächlich durch die ausgewählten Mutationen vergrößert werden konnte. Durch die experimentellen Befunde konnte die Region um das Tyrosin bei der TADH aus den Modellen der Bindetaschen als für die Substratspezifität und Selektivität wichtige Region der Bindetasche identifiziert und bestätigt werden.

Klassifizierung aller ADHs nach Form der Bindetasche

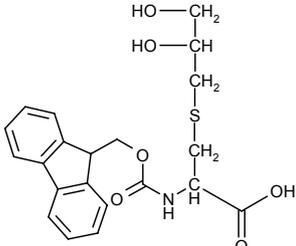
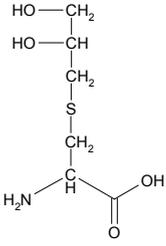
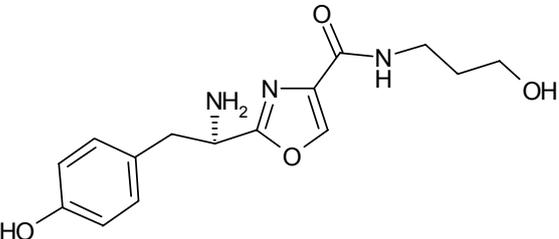
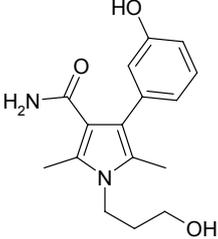
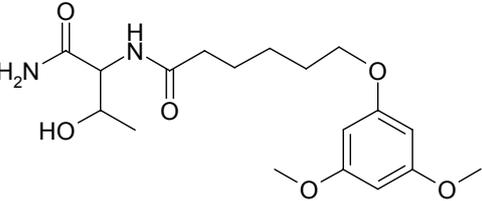
Um die identifizierte Region, welche für die unterschiedliche Größe der Bindetasche und die daraus resultierenden unterschiedlichen Substratspezifitäten verantwortlich ist, als Merkmal für eine Klassifizierung aller ADHs aufgrund der Form der Bindetaschen heranziehen zu können, wurden die lokalen strukturellen Gegebenheiten dieser Region anhand aller Proteine mit verfügbarer PDB-Struktur verglichen. Dieser Vergleich der Strukturen konzentrierte sich auf den Bereich, welcher die innere Region der Bindetasche bildet. Es stellte sich heraus, dass sich alle bekannten ADH-Strukturen in zwei Klassen einteilen lassen. Der Bereich wird durch einen charakteristisch verlaufenden Loop gebildet. In Klasse 1 ist dieser Loop

Substratspektrum TADH

Oxidation

Die ausgewählten Substrate sind pharmazeutisch interessante Derivate, welche von der EMC GmbH (Partner 6) synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden. Diese erste Auswahl bestand aus Vertretern dreier pharmakologisch relevanter Grundstrukturen, Oxazole, Arylether und Pyrrole, Fmoc-Dihydroxypropylcystein (Fmoc-Dhc) und Dihydroxypropylcystein (Dhc). Die Verbindungen zeigen charakteristische primäre, sekundäre und phenolische OH-Gruppen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Auswahl von Verbindungen zur Oxidation mittels TADH

<p>Fmoc-Dihydroxypropylcystein (Fmoc-Dhc)</p> 	<p>Dihydroxypropylcystein (Dhc)</p> 
<p>Oxazol 009B4861</p> 	<p>Pyrrol 011B2895</p> 
<p>Arylether 001A0155</p> 	

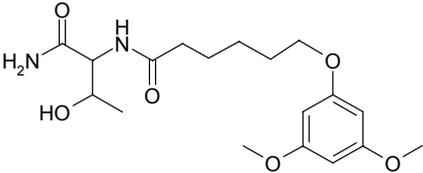
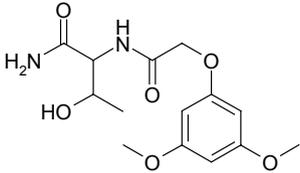
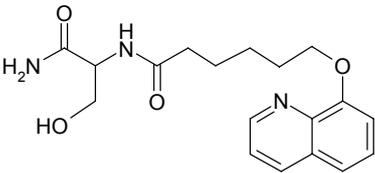
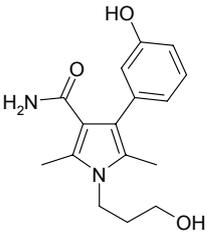
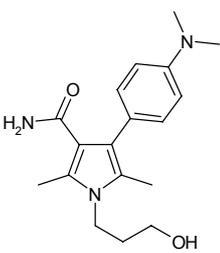
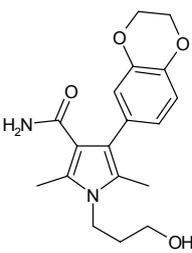
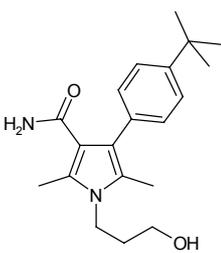
Fmoc-Dihydroxypropylcystein und Dihydroxypropylcystein sind ausgesprochen interessante Intermediate bei der Synthese von Lipopeptid-Agonisten von Toll-like Rezeptoren. Agonisten und Antagonisten von Toll-like Rezeptoren sind sowohl in der Forschung als auch bei der Entwicklung von Therapeutika von großer Bedeutung. Die EMC microcollections GmbH besitzt zwei Patente zur Anwendung von

Lipopeptid-Agonisten und hat großes Interesse an der Modifikation der Vorstufen dieser Verbindungen durch TADH. Nach selektiver Oxidation einer oder beider Hydroxygruppen durch die TADH stehen wertvollen Bausteine zur Synthese neuartiger Derivate zur Verfügung, die bisher nicht zugänglich sind. Auch für die weiteren drei Verbindungen dieser ersten Auswahl und deren Analoga wurden biologische Aktivitäten nachgewiesen und es ist geplant ein Upscale Verfahren für die jeweiligen Endprodukte zu etablieren.

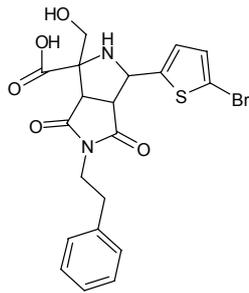
Sowohl das Dhc (0,47 U/mg) als auch das Pyrrol (0,29 U/mg) gefolgt von dem Arylether (0,15 U/mg) können durch TADH oxidiert werden. Das Oxazol und das Fmoc-Dhc wurden dagegen nicht bzw. in geringem Maße umgesetzt.

Basierend auf diesen ermutigenden Ergebnissen wurde zur weiteren Erfassung des oxidativen Leistungsspektrums der TADH und zur Beschreibung von „Scope and limitations“ eine fokussierte Verbindungskollektion von 8 Verbindungen synthetisiert, gereinigt und mittels HPLC-MS charakterisiert. Die Kollektion bestand aus drei Arylethern, vier Pyrrolen und einem Pyrrolidin (Tabelle 7). Die Mengen lagen bei 7,7 – 12 mg pro Verbindung, die Reinheiten > 80 % (HPLC-MS).

Tabelle 7: Fokussierte Verbindungskollektion zur Oxidation mittels TADH

<p>Arylether 001A0155</p> 	<p>Arylether 001A0149</p> 		
<p>Arylether 001A0060</p> 			
<p>Pyrrol 011B2895</p> 	<p>Pyrrol 011B2884</p> 	<p>Pyrrol 011B2886</p> 	<p>Pyrrol 011B2893</p> 

Pyrrolidin 010B0095



Die Aktivitäten der TADH bei der oxidativen Umsetzung der Alkoholgruppen der Arylether und Pyrrole konnten leider nicht reproduziert werden. Sie lagen durchweg deutlich niedriger als bei den ersten Versuchen (Tabelle 8). Aus den Ergebnissen lassen sich keine Rückschlüsse auf aktivitätsbeeinflussende Strukturmerkmale ziehen.

Tabelle 8: Oxidation der fokussierten Verbindungskollektion durch TADH

Verbindungscode	Aktivität [U/mg]
001A0155	0,0160
001A0149	0,0471
001A0060	0,0594
011B2895	0,0168
011B2884	0,0208
011B2886	-
011B2893	-
010B0095	?

Anhand des Homologiemodells der TADH wurden die Substrate in Bezug auf ihre Bindungseigenschaften in der Bindetasche der TADH evaluiert. Da die Aktivitäten relativ gering sind, kann an den sperrigen Verzweigungen der Substrate liegen. Diese Verzweigungen befinden sich bei der Umsetzung durch TADH direkt im Eingangsbereich der Bindetasche (siehe auch Ergebnisse: *Vorhersage von Mutanten zur Verifizierung der Modelle der Bindetaschen*, oben).

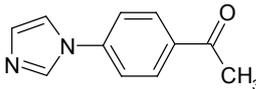
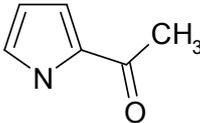
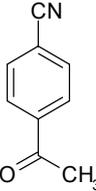
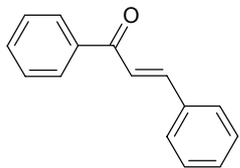
Deshalb wurde vorgeschlagen, die sperrigen Aminosäuren Leu286 und Phe288 auszutauschen. Um den Eingangsbereich der Bindetasche zugänglicher zu gestalten, wurden folgende Mutanten vorgeschlagen: Leu286Val, Leu286Ala und Phe288Ala. Außerdem wurden Doppelmutanten im Eingangsbereich und in Kombination mit der Bindetasche vorgeschlagen.

Reduktion

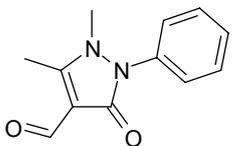
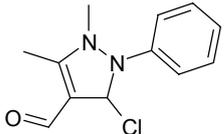
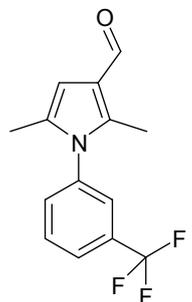
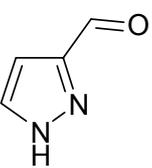
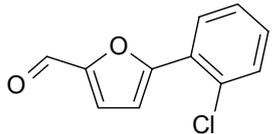
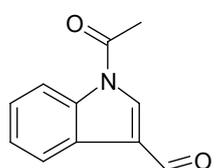
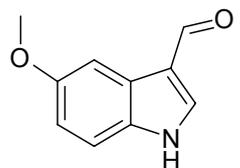
Für die Reduktion durch TADH wurden vier Arylketone in Mengen von 12 mg – 17,8 mg und sieben Aldehyde ausgewählt und in Mengen von 10,3 mg – 16,2 mg zur Reduktion mittels TADH zur Verfügung gestellt. Die Reinheiten der Arylketone und Aldehyde lagen bei > 95 %. Von den Aldehyden A088 und A133 wurden für die Umsetzungen im präparativen Maßstab jeweils 100 mg zur Verfügung gestellt. Die Verbindungen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Substratauswahl zur Reduktion mittels TADH

Die ausgewählten Substrate der EMC wurden von Partner 1 getestet. Dabei wurden die Aktivitäten einerseits für das Wildtypenzym als auch für den Valin und Leucin Mutanten getestet.

Name	Struktur	Menge mg	MW g mol ⁻¹	Reinheit %	Aktivität [U mg ⁻¹]		
					wtTADH	Y111V	Y111L
Arylketone							
AK016		12	186,21	>95	nein	nein	nein
AK028		17,8	109,13	>95	nein	nein	nein
AK034		16	145,16	>95	nein	nein	nein
AK037		17,5	208,26	>95	nein	nein	nein

Aldehyde

A001		14	216,24	>95	nein	nein	nein
A028		11,3	220,66	>95	nein	nein	nein
A025		10,3	267,25	>95	nein	nein	nein
A088		11,5	96,1	>95	2,5	0,15	0,15
A133		16,2	206,63	>95	0,2	0,7	0,2
A140		13,6	187,2	>95	nein	nein	nein
A179		13,7	175,2	>95	nein	nein	nein

Modifikation von Lysinen an der Oberfläche von TADH

Ein großes Problem bei der elektroenzymatischen Reaktion mit TADH und dem verwendeten Rh-Komplex ist die Koordinierung des Mediators an die Lysinreste an der Katalysatoroberfläche. Um dieses Problem zu, werden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden basierend auf dem erstellten Homologiemodell der TADH acht potentielle Lysine identifiziert, welche an den Rh-Komplex koordinieren könnten. Davon sind drei Lysinreste (Lys9, Lys48, Lys336) besonders nahe am Eingang des NAD/NADH-Tunnels lokalisiert (Abbildung 25).

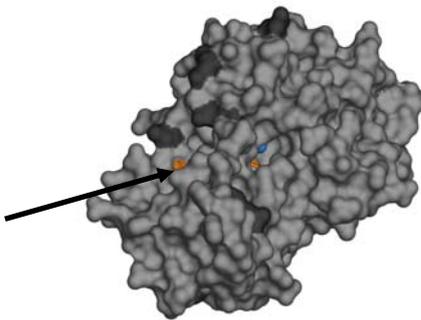


Abbildung 25: Homologiemodell der TADH (Monomer). Der Pfeil zeigt die Position des NAD/NADH-Tunnels an. Die Lysinreste an der Oberfläche sind dunkel eingefärbt.

Die Lysinreste, die nahe dem NAD/NADH-Tunnel angeordnet sind, wurden als erste Mutationskandidaten gewählt, da die Koordination dieser Aminosäuren mit dem Rh Komplex ein Austreten des NADH zur Regeneration verhindern würde. Um gezielt Mutationsvorschläge zur Eliminierung der Lysinreste an der Oberfläche machen zu können, wurde eine Konservierungsanalyse der Proteinsequenzen der TADH-Superfamilie durchgeführt. Die Konservierungsanalyse ergab keine hohe Konservierung für die Lysine an Position 9 und 48. Bei dem Lysin an Position 336 handelt es sich um eine Position mit höherer Konservierung der biochemischen Eigenschaft, da sich im Alignment hauptsächlich Lysin- und Argininreste an dieser Position befinden. Basierend auf der Analyse der häufigsten Aminosäuren an den Positionen Lys9, Lys48 und Lys336, wurden folgende Mutationen zur Verhinderung der Inaktivierung durch den Rh Komplex vorgeschlagen: (Lys9Pro), Lys9Ser, Lys48Gly, Lys48Asp und Lys336Arg.

Die zweite Strategie verfolgte einen chemischen Ansatz. Zur Modifikation der Substratspezifität und Aktivität der TADH sollte das Enzym mittels bioorganischer Methoden verändert werden. Im ersten Versuch wurde N-(9-

Fluorenylmethyloxycarbonyloxy)succinimid (Fmoc-OSu) zur chemischen Modifikation eingesetzt. Dieses Reagenz wurde gewählt, da die Modifikation reversibel ist (Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch organische Basen wie Piperidin) und eine deutliche Molekulargewichtszunahme durch die Modifikation erfolgen sollte, die dann über ESI-MS detektiert werden kann.

Durch den Nachweis mehrfach geladener Ionen konnte die TADH durch Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS) charakterisiert werden (Abbildung 26).

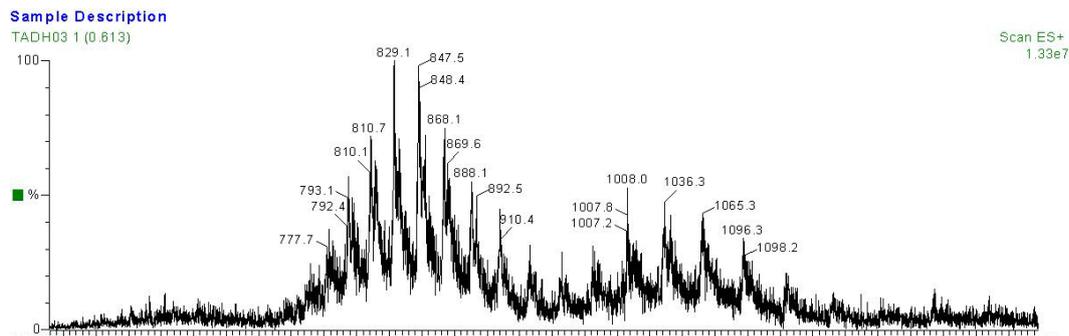


Abbildung 26: Elektrospray Massenspektrum der TADH: Masse/Ladung mehrfach geladener Ionen

Aus dem Spektrum ergibt sich ein durchschnittliches Molekulargewicht der TADH von 37.255 Da. Dies entspricht dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht von 37.253 Da (einschließlich ein koordinativ gebundenes Zink-Ion). Die Abweichung von 2 Da liegt im Fehlerbereich der Meßmethode.

Die TADH wurde mit Fmoc-OSu modifiziert. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurde die Aktivität bestimmt. Leider führte die Umsetzung mit Fmoc-OSu zum Aktivitätsverlust. Die Toleranz des Enzyms gegenüber organischen Lösungsmitteln wurde daraufhin untersucht und es zeigte sich, dass sowohl das für die Umsetzung mit Fmoc-OSu eingesetzte DMSO als auch alle weiteren gängigen organische Lösungsmittel die Aktivität des Enzyms schon in niedrigen Konzentrationen beeinträchtigen. Für die Modifikation der TADH mussten daher Methoden und Reagenzien gewählt werden, welche ausschließlich in wässrigen Lösungen durchgeführt werden konnten. Zum Einsatz kamen die Umsetzungen mit Anhydriden, Sulfochloriden, Succinimidylestern, Säurechloriden und Carbonsäuren. Die nicht voraktivierte Carbonsäure wurde mit EDC, einem wasserlöslichen Carbodiimid als Kupplungsreagenz, zur Reaktion gebracht.

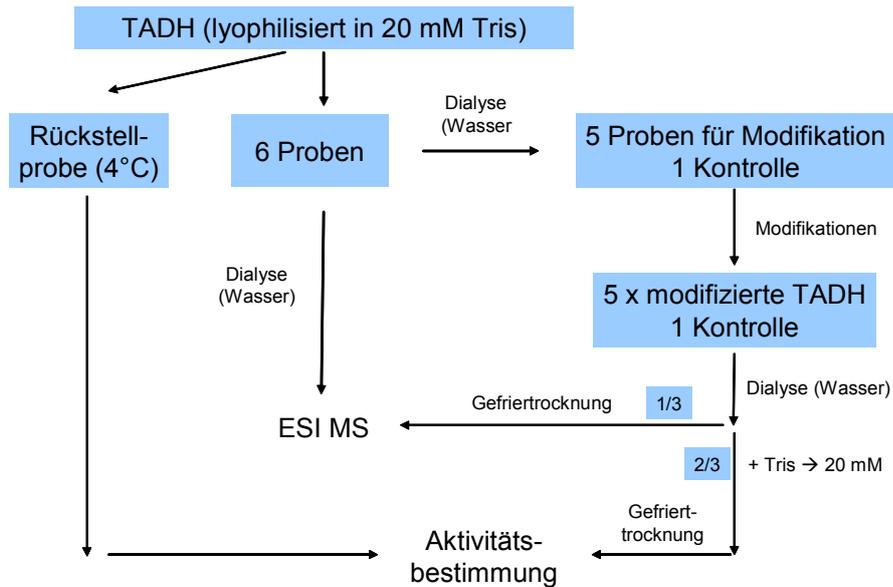


Abbildung 27: Ablaufschema Modifikation der TADH

Die lyophilisierte TADH wurde in sieben Äquivalente geteilt, ein Äquivalent wurde bei 4 °C gelagert, fünf Äquivalente wurden mit den in Tabelle 10 geschilderten Methoden modifiziert, ein Äquivalent als Kontrolle parallel dazu dialysiert, inkubiert und lyophilisiert (ohne Modifikationsreagenz). 1/3 der jeweiligen Probe wurde für ESI-MS Messungen gegen Wasser dialysiert, 2/3 wurde Tris zugesetzt (Endkonzentration 20 mM). Nach der Gefriertrocknung wurde die Aktivität aller sieben Proben gemessen.

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford, die Aktivität der fünf modifizierten TADH's sowie der beiden Kontrollen wurden mittels des Standardassays für TADH mit n-Butanol bestimmt und sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Proteinkonzentration und Aktivität der modifizierten TADH Proben.

Modifizierung	Konzentration / $\mu\text{g ml}^{-1}$	Aktivität / U mg^{-1}
Dimethylcarbamoyl chloride	18.2	1.98
N,N-dimethylamino sulfonylchloride	143.4	0.97
N-Hydroxy-succinimidylacetoacetate	132.7	5.7
Acetic acid anhydride	184	3.1
acetic acid water soluble carbodiimide	399.5	2.95
EDC		
Kontrolle (keine Modifizierung)	213.4	4
Lagerprobe TADH	196.3	8.3

Die Proteinkonzentration und die Aktivität der modifizierten TADH sowie der beiden Kontrollen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Rückstellprobe hat über den betrachteten Zeitraum von knapp sechs Monaten kaum Aktivität eingebüßt. Die Acetylierung durch Essigsäureanhydrid, und Essigsäure/EDC führen zu vergleichbaren Aktivitäten von 3,1 bzw. 2,95 U/mg. Dies entspricht ca. 75 % der Aktivität der nicht modifizierten Kontrolle (4,0 U/mg), welche der gleichen Behandlung (Dialyse, Gefriertrocknung) unterzogen wurde. Nach Acylierung mittels N,N-Dimethylcabamoylchlorid und Sulfonierung mit N,N-Dimethylamino-sulfonylchlorid reduzierte sich die Aktivität auf ca. 50 % bzw. 25 % der Aktivität der Kontrolle. Der Aktivitätsverlust korreliert mit der Größe des eingeführten Restes. Außerdem ist zu beachten, dass das Bradfordreagenz unter anderem auch an Lysine bindet. Somit kann es durch die Modifikation zu verfälschten Proteinkonzentrationsmessungen kommen. Um diesen Fehler zu berücksichtigen wurde die Aktivität bei den Inaktivierungsversuchen immer auf die Ausgangsaktivität zurückgerechnet.

In Abbildung 28 sind die Resultate der Inaktivierung durch den Rhodiumkomplex dargestellt. Keine der durchgeführten Modifikation konnte mit einem verbesserten Schutzeffekt gegen Inaktivierung durch den Mediator aufweisen. Während die meisten modifizierten Enzyme nach dieser Zeit nur noch weniger als 10 % der Ausgangsaktivität aufweisen konnten hatte das mit Essigsäure + wasserlöslichem carbodiimide EDC modifizierte Enzym nach 2, 5 Stunden noch 20 % seiner Aktivität. Nach 4 h waren immer noch 8 % der Ausgangsaktivität vorhanden.

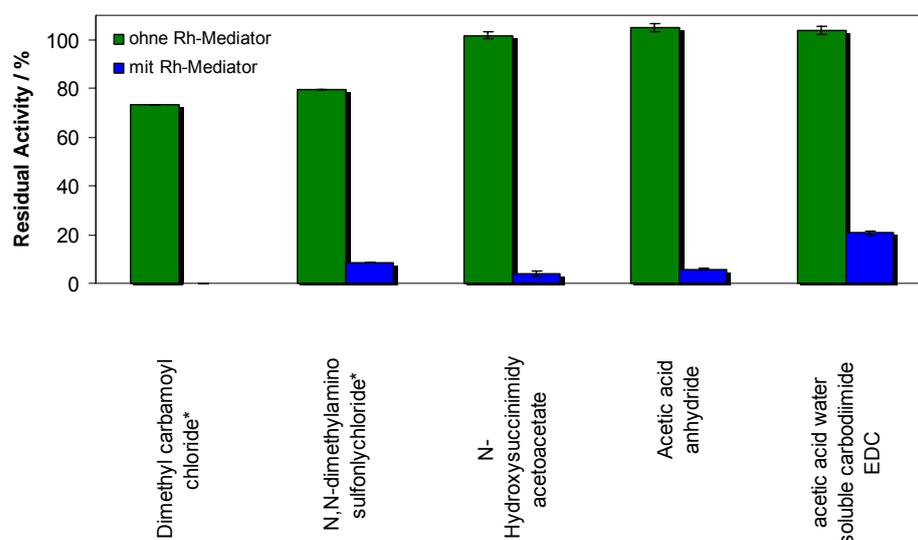


Abbildung 28: Bestimmung des Schutzeffektes der TADH Modifizierungen

Es muss nun überprüft werden, wie viele Lysine tatsächlich durch die Modifikation verändert wurden. Dafür werden die Proben an die EMC zurückgeschickt und mit Hilfe von LC-MS nach einem tryptischen Verdau analysiert (in Arbeit).

Elektroenzymologischer Prozess: Gemeinsame Basis für Modul 1 und 2

Mediator-technologie— TADH ist ein thermostabiles Enzym und hat sein Temperaturoptimum zwischen 60 und 70°C. Deshalb wurde untersucht, wie sich der Mediator $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ bei diesen Temperaturen verhält. Die Verwendbarkeit des organometallischen Rhodium Komplex $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ zur elektrochemischen Kofaktorregenerierung bei höheren Temperaturen wurde durch cyclovoltametrische Messungen bei 30 °C und bei 60 °C untersucht (Abbildung 29). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der katalytische Effekt der Bildung von NADH durch $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ bei 60 °C nicht verändert, erkennbar an der Zunahme der reduktiven Peaks bei zunehmender NAD^+ -Konzentration. Der bei 60 °C auftretende Oxidationspeak beeinflusst die Bildung von NADH nicht und kann auf die höhere Diffusionsgeschwindigkeiten bei 60 °C zurückgeführt werden.

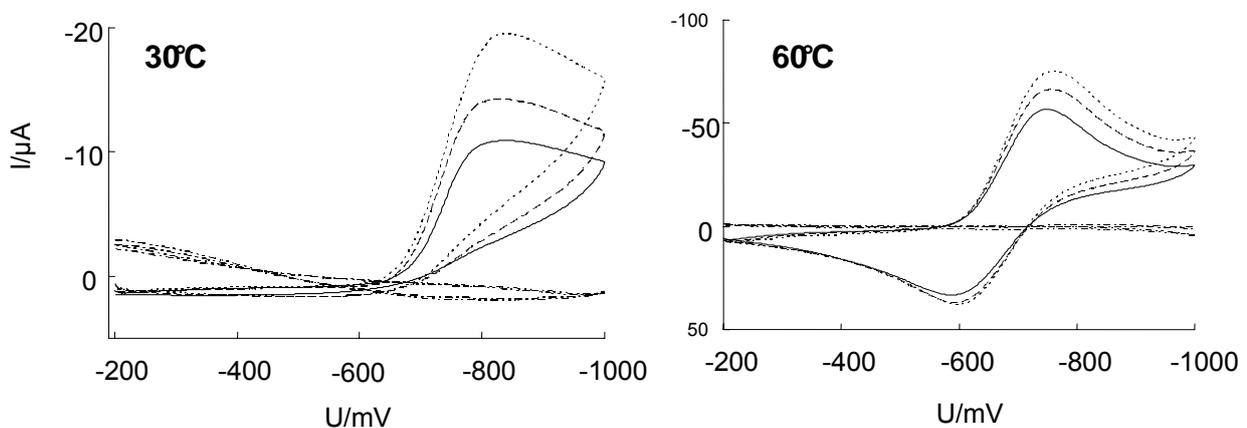


Abbildung 29: Cyclovoltametrische Untersuchung von $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ bei unterschiedlichen Temperaturen. *Reaktionsparameter:* 100 mM Tris, pH 7; anaerob; *Volumen:* 10 ml; *Scanrate:* 100 mV/min; *Arbeitselektrode:* 3 mm Glaskohlenstoff Rotierende Scheibenelektrode, *Referenzelektrode:* Ag/AgCl/KCl (3M); *Anode:* Platin

--- : 5 mM $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$; -- : 0,5 mM $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ + 0.5 mM NAD^+
 ••••• : 0,5 mM $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ + 1 mM NAD^+ ; -•-•- : 0.5 mM NAD^+ ; -••-• : 1 mM NAD^+

Als Alternative zum $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ wurde ein neuer elektrochemischer Mediator auf Iridiumbasis getestet. Dieser $[\text{IrCp}^*(\text{FcNCHNFC})]$ -Komplex besitzt zwei Ferrocene, um die elektronenziehende Wirkung am Iridium zu erhöhen und so die Bildung des Hydrids zu beschleunigen. Dadurch soll insgesamt die NADH Bildungsrate erhöht werden, die momentan noch durch die Bildung des Hydridokomplexes limitiert ist. Allerdings zeigten erste Versuche mit $[\text{IrCp}^*(\text{FcNCHNFC})]$ in wässrigen Medien, dass der Komplex schlecht löslich ist. Deswegen wurde er für cyclovoltametrische Messungen an die Glaskohlenstoffelektrode adsorbiert. Dadurch konnte ein Reduktionspeak bei -400 mV nachgewiesen werden. Allerdings verschwand der Reduktionspeak langsam bei wiederholten Messungen, was mit einem Ablösen des Mediators von der Elektrode zusammenhängen könnte. Außerdem konnte kein katalytischer Effekt bezüglich der Reduktion von NAD^+ nachgewiesen werden, welches aber auch mit der schwachen Adsorption des Komplexes an der Elektrode zusammenhängen kann und den damit einhergehenden Messproblemen. Weitere Versuche mit löslicheren Derivaten des Komplexes sind geplant.

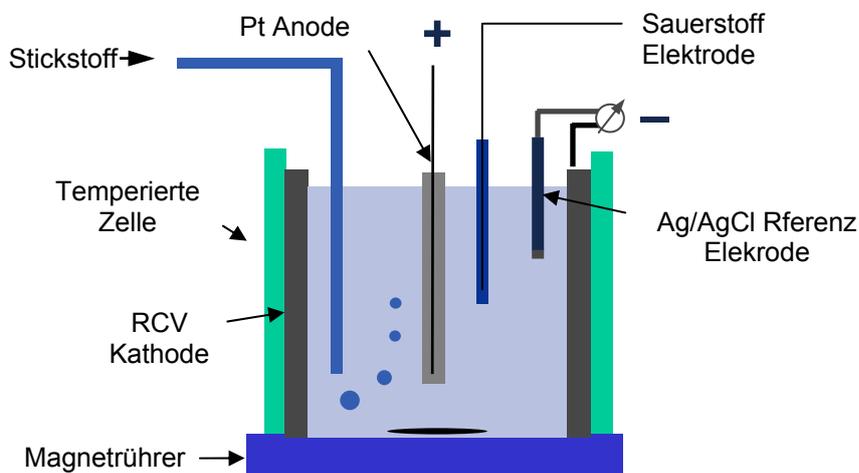
Elektroaktivität des Reaktions-Puffers— Um die optimale enzymatische Aktivität der einzusetzenden Katalysatoren StyA und TADH zu erreichen, wurden verschiedene Puffersysteme evaluiert. Zum einen müssen die Enzyme in diesen Puffern eine optimale Aktivität zeigen, zum anderen muss im Hinblick auf den elektroenzymatischen Prozess gewährleistet sein, dass der Puffer selbst nicht elektrochemisch aktiv ist, also unter den elektrochemischen Bedingungen inert bleibt. Die elektrochemische Pufferaktivität verschiedener Puffersysteme (Phosphat, MES, MOPS, HEPES, Tris) wurde deshalb cyclovoltametrisch unter Prozessbedingungen überprüft und es konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb der Prozesspotentialbereiche (-550 mV und -750 mV vs. AgCl) keine Faraday'schen Ströme auftreten. Die überprüften Puffer sind folglich nicht elektrochemisch aktiv und können im Prozess verwendet werden. Für Anwendungen der TADH ergibt sich im gleichen Zusammenhang die Frage nach der Stabilität des Kofaktors NADH bei erhöhten Temperaturen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Halbwertszeit von NADH in verschiedenen Puffern^a.

Puffer	Leitfähigkeit [ms / cm]	Halbwertszeit [min] von NADH @60°C
100 mM Natrium Phosphate	9.9	122
100 mM Tris/HCl	4.5	408
100 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl	22.0	578
100 mM Tris/HCl, 50 mM NH₄Cl	10.7	694

^aReaktionsbedingungen: pH = 7.0, 10 µM [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺, 0.1 mM NADH;

Das vorläufige Reaktor Set-up ist schematisch in Abbildung 31 wiedergegeben.

**Abbildung 30:** Schematischer Aufbau des elektrochemischen Reaktors.

Im elektrochemischen Reaktor wurden Untersuchungen zum Einfluss des Sauerstoffs auf die Reduktion von NAD durchgeführt. Dabei wurden drei Elektrolysen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass sich die Rate der NADH Produktion bei höheren Sauerstoffkonzentrationen drastisch reduziert (Abbildung 31).

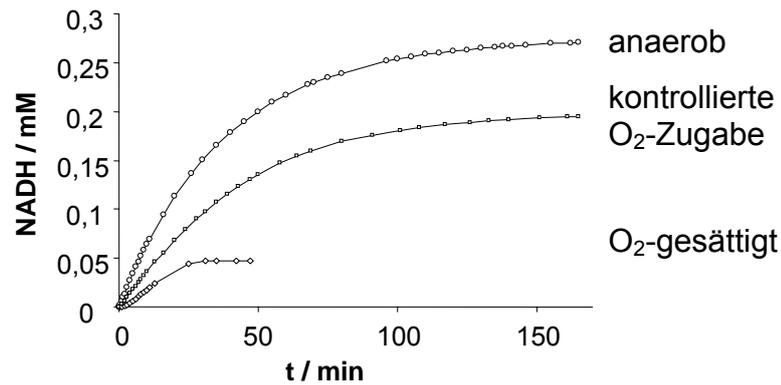


Abbildung 31: Einfluss des Sauerstoffs auf die Reduktion von NADH. *Reaktionsparameter:* 100 mM Tris, pH 7 @ 60°C; *Volumen:* 150 ml; *Potentiostat:* NTN 700M-200 (FUG); *Arbeitselektrode:* RVC; *Potential:* -750 mV vs Ag/AgCl/NaCl (3M); *Anode:* Platindraht; $c([\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}) = 4 \mu\text{M}$; $c(\text{NAD}^+) = 400 \mu\text{M}$; $c(\text{NADH})$ wurde bei 340 nm in einem a VIS-Spectrophotometer bestimmt.

Deswegen sollten Elektrolysen unter rein anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Maximal konnte eine NADH Bildungsrate von $7,5 \mu\text{mol min}^{-1}$ erreicht werden. Dies entspricht einer Turnover Frequenz für $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ von 112 h^{-1} . Die Studien ergaben, dass die Reaktion durch die Oberfläche der Elektrode limitiert ist, da die gleiche NADH Bildungsrate auch mit einer 10-fach höheren $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ Konzentration erreicht wurde (Daten nicht gezeigt). Es ist deshalb geplant Elektroden mit größeren Oberfläche:Volumen Verhältnissen zu verwenden, um die Reaktionsperformance der Elektroden weiter zu optimieren.

Evaluation der Arbeitselektrode— Da der anfänglich verwendete Kohlefilz diverse Nachteile hatte, z.B. in Bezug auf die Reproduzierbarkeit wurde nach Alternativen zu diesem Material gesucht. Die jetzt neu verwendete Reticulated-Vitrous-Carbon-Elektrode® (RVC) (Bioanalytics SI, UK) besteht aus Glaskohlenstoff, dasselbe Material aus dem die Arbeitselektroden des Cyclovoltameter beschaffen sind. Dies hat den Vorteil, dass sich Ergebnisse aus den grundlegenden cyclovoltametrischen Messungen besser übertragen lassen. Außerdem zeichnet sich dieses Material durch eine hohe Ladungsdichte bei geringem Widerstand aus. Um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurde ein effizientes Reinigungs- und Konditionierungsprotokoll entwickelt. Dabei wurden Waschschrte in verschiedenen Lösungsmitteln mit elektrochemischen Reinigungsschritten kombiniert. Bei der elektrochemischen Reinigung werden durch das Anlegen hoher Potentiale (von -0,9 bis 0,9 V) an der Elektrodenoberfläche adsorbierte Substanzen

reduziert bzw. oxidiert und dadurch zerstört. Dabei muss allerdings gewährleistet sein, dass der Puffer bei diesen hohen Potentialen noch nicht selbst elektrochemisch aktiv ist. Deshalb wurden mehrere Puffer cyclovoltammetrisch untersucht und es stellte sich heraus, dass nur Phosphat- und Trispuffer über den gesamten getesteten Potentialbereich elektrochemisch inert sind. Die anderen getesteten Puffer werden bei Potentialen um 650 mV oxidiert und sind demnach für Reinigungsschritte und Elektrodenkonditionierung ungeeignet.

Zur Evaluation des Materials wurde das NAD/ $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ Test-System gewählt und es konnte folgendes gezeigt werden: i) die maximalen Umsatzraten an der RVC-Elektrode sind unter den gewählten Bedingungen 4 x höher als an der Kohlefilzelektrode, obwohl die RVC Oberfläche 5 x kleiner ist. Daraus ergibt sich eine relative Steigerung der Umsatzrate um einen Faktor von 20 (Abbildung 33).

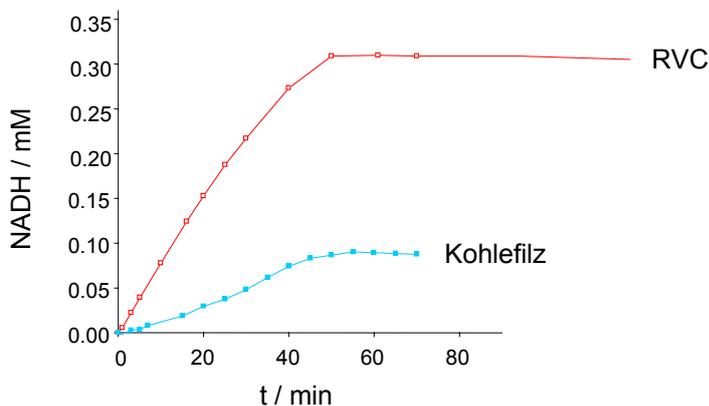


Abbildung 32: Vergleich von Kohlefilz- (Carbon-Felt) und RVC-Elektroden. Test-System für die Elektrolysen: 40 μM $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, 400 μM NAD^+ , 30 $^\circ\text{C}$, TRIS-Puffer, pH 7. Aktive Elektrodenoberflächen: Kohlefilz 2000 cm^2 , RVC 400 cm^2 .

ii) An der RVC-Elektrode treten keine so starken Diffusionslimitationen auf wie an der Kohlefilzelektrode. iii) An der RVC-Elektrode wurde ein Nah-Umsatz von 75% erreicht, an der Kohlefilzelektrode nur ein Umsatz von 25%. Die 5 x größere Oberfläche der Kohlefilzelektrode korreliert zudem relativ gut mit der angenommenen Absorptionsrate.

Kontinuierliche Zelle

Die RVC Elektrode eignet sich hervorragend als Durchflusselektrode, da das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sehr groß ist ($66 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-3}$). Außerdem ist das Totvolumen sehr gering, so dass bei einem Reaktor mit 50 ml Volumen 47,5 ml für

die Reaktion genutzt werden und das bei einer effektiven Oberfläche von 3300 cm². Um diesen Effekt auszunutzen wurde eine kontinuierliche Zelle entwickelt (Abbildung 33). Die Kathode sowie die Anode bestehen aus RVC (100 ppi). Beide Räume sind durch eine Nafion 1110 Membran voneinander abgetrennt, um die Vermischung des Anoden- und Kathodenpuffers sowie den Übergang von Sauerstoff, der an der Anode entsteht, zu vermeiden. Die Vorratsgefäße werden vor Reaktionsbeginn entgast und können dann verschlossen werden, um den Eintritt von Luftsauerstoffe zu vermeiden. Durch zwei Pumpen werden Kathoden- und Anodenpuffer im Kreis gepumpt. Als Kathodenpuffer wurde, wie oben beschrieben, 100 mM Bis-Tris, pH_{60°C} 6,0 Puffer gewählt, um eine möglichst hohe Stabilität von TADH und NADH in Gegenwart vom Rh-Mediator zu gewährleisten. Auf der Anodenseite wurde 200 mM Phosphatpuffer pH_{60°C} 7,0 verwendet. Hier konnte ein günstiger Puffer verwendet werden, da an der Anode nur die notwendige Gegenreaktion abläuft, die aber keinen Einfluss auf die Kofaktorregenerierung und somit auf die Enzymreaktion hat.

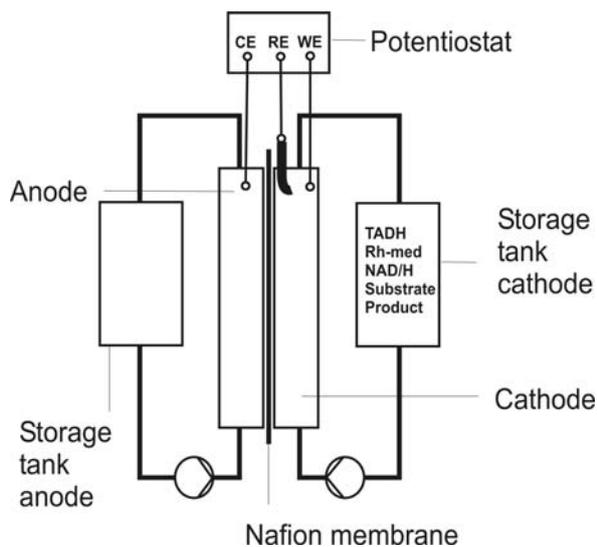


Abbildung 33: Kontinuierliche Zelle zur Kofaktorregenerierung. Details siehe Text.

Eine Evaluierung des neuen System wurde abiotisch, also ohne Enzym durchgeführt. Dabei konnte mit der reinen Kofaktorregenerierung eine NADH Produktionsrate von 9,6 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht werden. Hierbei muss beachtet werden, dass diese Reaktion unter optimalen Reaktionsbedingungen für die TADH (T = 60 °C, pH 6) durchgeführt wurden. Im nächsten Schritt sollen diese Reduktionsequivalente für die Produktion von Feinchemikalien durch TADH verwendet werden. Als Beispiel einer

enantioselektiven Reaktion wurde die Reduktion von racemischen 3-Methylcyclohexanon zu (1*S*,3*S*)-3-Methylcyclohexanol verwendet. Bei dieser Reaktion wird nur das (*S*)-Enantiomer vom Enzym akzeptiert und selektiv zum (1*S*,3*S*)-3-Methylcyclohexanol umgewandelt. Das (*R*)-Enantiomer verbleibt unverbraucht im Reaktionsgemisch. Eine erste Evaluierung der elektroenzymatischen Reaktion zeigte, dass das Produkt inhibierend wirkt, da bei gleichen Ansätzen mit unterschiedlicher Substratkonzentration selbst bei geringeren Anfangskonzentrationen die gleiche Produktkonzentration erreicht wurde (Abbildung 34)

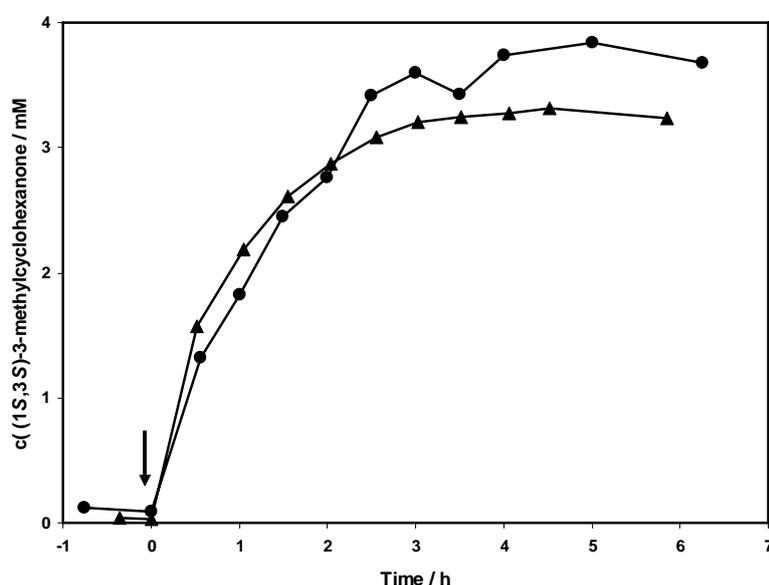


Abbildung 34: Umsetzung von 3-Methylcyclohexanon. Reaktionsbedingungen: 100 mM Bis-Tris, pH 6.0 (60 °C), V= 150 ml, T = 60 °C, Flussrate = 6.75 ml min⁻¹, c([Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺) = 100 μM, c(NAD⁺) = 0.5 mM, c(TADH) = 0.216 μM, ●: c(*rac*-3-Methylcyclohexanon) = 40 mM; ▲: c(*rac*-3-Methylcyclohexanon) = 10 mM. Der Pfeil weist auf den Start der Elektrolyse durch das Einstellen des Potentials auf of -800 mV hin.

Um diese Produktinhibierung zu umgehen, wurde eine organische Phase zur *in situ* Produktextraktion eingesetzt. Als organische Phase wurde Oktan gewählt, da es relativ gute Verteilungskoeffizienten für Substrat und Produkt aufweist ($K_{p_{3\text{-Methylcyclohexanon}}} = 13$ und $K_{p_{3\text{-Methylcyclohexanol}}} = 10$)^[14]. Die organische Phase wurde im Verhältnis 1:1,5 (organisch:wässrig) eingesetzt. Das Ergebnis dieser Reaktion ist in Abbildung 35 dargestellt.

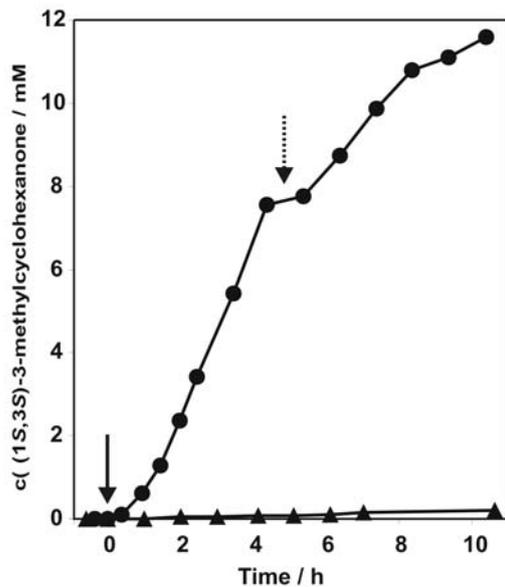


Abbildung 35: Bildung von (1S,3S)-3-Methylcyclohexanol während der elektroenzymatischen Reduktion von rac-3-Methylcyclohexanon im 2-phasen System. Reaktionsbedingungen: 100 mM Bis-Tris, $\text{pH}_{60} \text{ } ^\circ\text{C}$ 6.0, $V_{\text{aq}} = 150 \text{ ml}$, $V_{\text{Oktan}} = 100 \text{ ml}$, $T = 60 \text{ } ^\circ\text{C}$, Flussrate = 6.75 ml min^{-1} , $c([\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}) = 100 \text{ } \mu\text{M}$, $c(\text{NAD}^+) = 0.5 \text{ mM}$, $c(\text{rac-1})_{\text{Oktan}} = 150 \text{ mM}$. (●) $c(\text{TADH}) = 0.216 \text{ } \mu\text{M}$; (▲) Kontrolle ohne TADH. Der Pfeil weist auf den Start der Elektrolyse durch das Einstellen des Potentials auf $-800 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ hin. Der gepunktete Pfeil zeigt die Zugabe von $50 \text{ } \mu\text{M}$ $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ an.

Durch die Anwendung von Oktan als *in situ* Produktextraktion konnte die Endkonzentration (bezogen auf die organische Phase) vervierfacht werden. Eine Endkonzentration von $1,32 \text{ g L}^{-1}$ ($11,3 \text{ mM}$) mit einer Produktivität von $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde erreicht. Das Produkt war enantiomerrein mit einem diastereomerischen Überschuss von 96 %.

Außerdem wurde das Aldehyd A133 von EMC im elektroenzymatischen Reaktor zum Alkohol umgesetzt. Da die TADH Mutante (Y111V), die höchste Aktivität bezogen auf dieses Substrat hat, wurde es für die Umsetzung eingesetzt. Als Ausgangsmenge wurden 95 mg A133 in Oktan gelöst. In diesem Beispiel wurde wieder Oktan als organische Phase eingesetzt, da die Löslichkeit von A133 sehr gering ist. Ansonsten wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie im oben beschriebenen Beispiel verwendet. Der Verlauf der Reaktion ist in Abbildung 36 dargestellt.

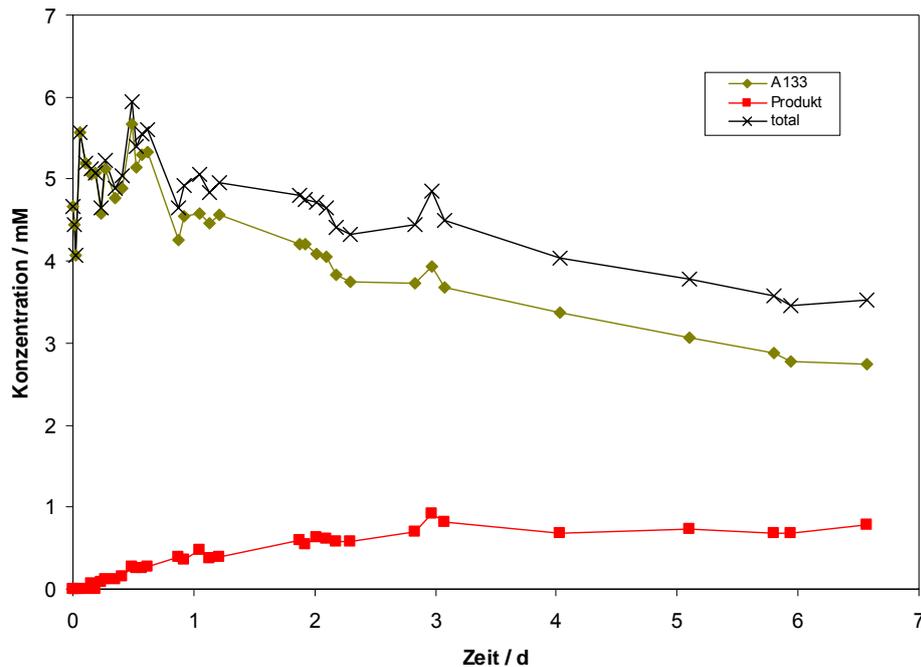


Abbildung 36: Reduktion des EMC Substrates A133 im elektroenzymatischen Durchflussreaktor. Details siehe Text.

Die Reaktion musste sehr lange fortgeführt werden, da die Aktivität für dieses Substrat sehr gering ist. Die Reaktion wurde nach knapp 7 Tagen abgebrochen, die Oktanphase abgezogen und abdestilliert.



Abbildung 37: Produkt der Reduktion des EMC Substrates A133 nach der Destillation

Das Produkt konnte so als Feststoff gewonnen werden. Insgesamt wurden 57,6 mg nach dem Destillieren erhalten (Abbildung 37). Eine Analyse des Produktes hat gezeigt, dass das Substrat zu 30 % umgesetzt wurde. Damit ergibt sich eine Ausbeute für das Produkt von 17,3 mg. Außerdem konnte die erwartete Masse (208 g mol^{-1}) des Alkohols im GC/MS nachgewiesen werden.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung* und Umweltevaluation

Um die Leistung eines Prozesses zu bewerten wird die Produktivität als Funktion der Produktendkonzentration und Prozesslaufzeit betrachtet. Innerhalb eines solchen Diagramms kann nach Woodley^[15] ein Fenster definiert werden welches die minimalen Anforderungen und die maximal mögliche Prozessleistung festlegt. Prozesse, welche innerhalb dieses Fensters lokalisiert sind, können hinsichtlich der Prozessleistung als industriell interessant eingestuft werden.

Die minimalen Voraussetzungen für einen industriell interessanten elektroenzymatischen Prozess legen die unteren Grenzen des Fensters fest und werden durch wirtschaftliche Betrachtungen definiert. Basierend auf einer Evaluation von Straathof et al.^[16] müssen Enzym-basierte Bioprozesse für die Produktion von Feinchemikalien Produktivitäten von mindestens $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit einer Produktendkonzentration von 1 g L^{-1} erreichen. Als minimale Prozesslaufzeit wird 1 Stunde angenommen. Die obere Grenze des Fensters wird durch die Quantifizierung von Produktivität und Prozesslaufzeit der elektronischen und der enzymatischen Subreaktionen festgelegt. Aus der Schnittmenge ergibt sich das Prozessfenster (Abbildung 38).

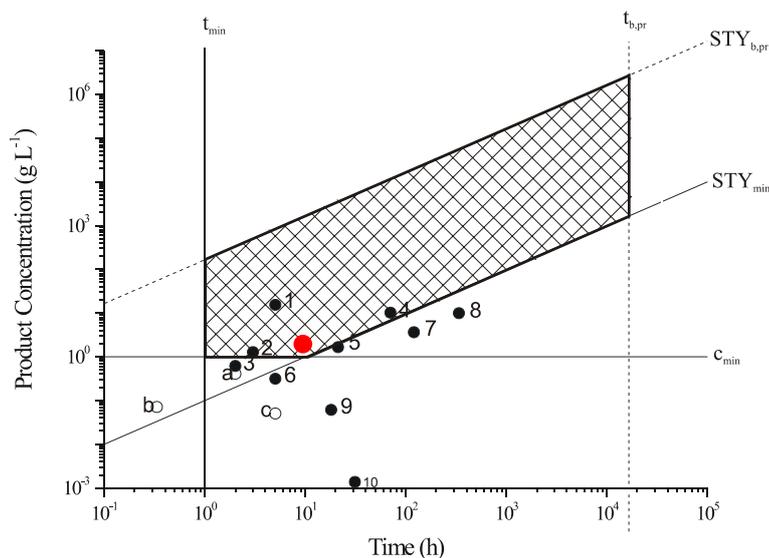


Abbildung 38: Evaluation aktueller elektroenzymatischer Prozesse mit Oxidoreduktasen. Die schraffierte Fläche zeigt das Prozessfenster. •: Dehydrogenase Prozesse; ○: Oxygenase Prozesse; roter Punkt: TADH. T = Prozessdauer; c = Produktendkonzentration; STY = Produktivität; _{min} = minimale Bedingungen; b = enzymatisch; Die Prozesse sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 13: Zusammenstellung aktueller elektroenzymologischer Prozesse

#	Enzym	Kofaktor	Kofaktor - Regeneration	gL ⁻¹ h ⁻¹	Zeit (h)	Quelle
Elektroenzymatische Prozesse mit Dehydrogenasen						
1	L-GDH 1.4.1.3	NADH	Hydrogenase	3,04	5	[17]
2	D-LDH 1.1.1.28	NADH	[Cp*Rh(bpy)(H ₂ O)] ²⁺	0,42	3	[18]
3	GR 1.6.4.1	NADPH	Alg-V, FRD	0,31	2	[19]
4	HLADH 1.1.1.1	NADH	[Cp*Rh(bpy)(H ₂ O)] ²⁺	0,14	70	[20]
5	D-LDH 1.1.1.28	NADH	--	0,08	21	[21]
6	GR 1.6.4.1	NADPH	FRD / MV ⁺	0,06	5	[22]
7	D-LDH 1.1.1.28	NADH	Diphosphatase /MV ⁺	0,03	120	[23]
8	D-LDH 1.1.1.28	NADH	FDR / MV ⁺	0,03	336	[24]
9	L-LDH 1.1.1.27	NADH	--	0,0033	18	[25]
10	HLADH 1.1.1.1	NADH	--	0,00004	31	[26]
Elektroenzymatische Prozesse mit Oxygenasen						
a	HbpA 1.14.13.44	NADH	[Cp*Rh(bpy)(H ₂ O)] ²⁺	0,20	2	[27]
b	StyA	FADH₂	--	0,03	0,33	[28]
c	CYP101 1.14.15.1	--	Putidaredoxin	0,01	5	[29]

Nur drei elektroenzymatische Prozesse fallen in dieses Fenster. Der Prozess mit der höchsten Produktivität wurde von Cantet und Mitarbeitern entwickelt^[17]. Dabei handelt es sich um den Umsatz von α -Ketoglutarat zu L-Glutamat durch die Glutamat – Dehydrogenase. Dieser Prozess hat eine volumetrische Produktivität von 3,04 g L⁻¹ h⁻¹ mit einer Elektronenausbeute von fast 100 %. Nach fünf Stunden beträgt die Produktkonzentration 15,2 g L⁻¹. Die Hauptlimitation dieses Prozesses liegt in der Instabilität der Glutamat Dehydrogenase, welche nach fünf Stunden bereits 70 %

ihrer Regenerationsaktivität verloren hat. Ein viel stabilerer Prozess wurde in einem Membran Reaktor mit der Umsetzung von Cyclohexanon zu Cyclohexanol katalysiert durch die Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) erreicht^[20]. Dieser Prozess erreichte zwar lediglich eine volumetrische Produktivität von $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ lief allerdings für 70 Stunden stabil, bis alles Substrat umgesetzt war.

Ein Weiterer industriell interessanter Prozess wurde von Rupert und Mitarbeitern entwickelt^[18]. Hierbei wird Pyruvat zu D-Lactat mittels D-Lactat Dehydrogenase umgesetzt. Die erreichte volumetrische Produktivität betrug $0.42 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Allerdings mussten 1300 U Enzym zugegeben werden, um eine Produktendkonzentration von 1.26 g L^{-1} nach 3 h zu erreichen.

Alle anderen elektroenzymatischen Prozesse fallen nicht in dieses Fenster, in dem sie für industrielle Anwendungen interessant werden. Hauptlimitationen sind entweder unzureichenden Produktivitäten^[21,23] und / oder eine zu niedrige Produktendkonzentration^[19,22,25,26].

Aus dieser Evaluation geht einerseits hervor, dass bislang nur sehr wenige elektroenzymatische Prozesse industriell interessant sind. Diese basieren alle auf Dehydrogenase Reaktionen. Andererseits wird deutlich, dass viele Prozesse nicht sehr weit von dem Punkt entfernt sind, ab dem sie industriell relevant werden. Hauptlimitationen ist in den meisten Fällen die elektrochemische Kofaktorregeneration, was in sehr geringen Produktivitäten resultiert die weit unter dem eigentlichen Potential des Katalysators liegen. Im Rahmen dieses Projektes konnte unser TADH Prozess soweit optimiert werden, dass er jetzt innerhalb des Fensters liegt. Für die Monooxygenasereaktion konnte leider kein Erfolg diesbezüglich verbucht werden. Die Hauptlimitation hier ist nach wie vor eine zu geringe Elektronenausbeute, begünstigt durch die im Ergebnissteil dargelegten Reaktionskinetiken des Kofaktors FADH_2 unter Reaktionsbedingungen. Dies spiegelt sich auch in der Umweltbilanz wieder, welche mit Hilfe des Programms EATOS[®] für diese Reaktion erstellt wurde (Abbildung 39). Es wurden drei chemische Prozesse mit dem elektroenzymatischen Bioprozess verglichen, wobei es sich bei den chemischen Beispielen jeweils um die Herstellung des Racemats handelt, da die chemische Herstellung enantiomerenreinem Styrolepoxid nach unserem Wissen bislang nicht möglich ist und keinerlei Publikationen darüber gefunden werden konnten. Außerdem wurde nur die eigentliche Reaktion berücksichtigt, also weder das Upstreaming, noch das Downstreaming betrachtet. Es wird deutlich, dass der

Bioprozess bezogen auf Selektivität und Umweltrelevanz sehr gut abschneidet. Dies kommt vor allem durch die Tatsache, dass keine organischen Lösungsmittel verwendet werden. Allerdings muss hier etwas relativiert werden, da auch bei dem Bioprozess spätestens bei der Produktaufarbeitung der Einsatz von organischem Lösungsmittel nötig werden wird.

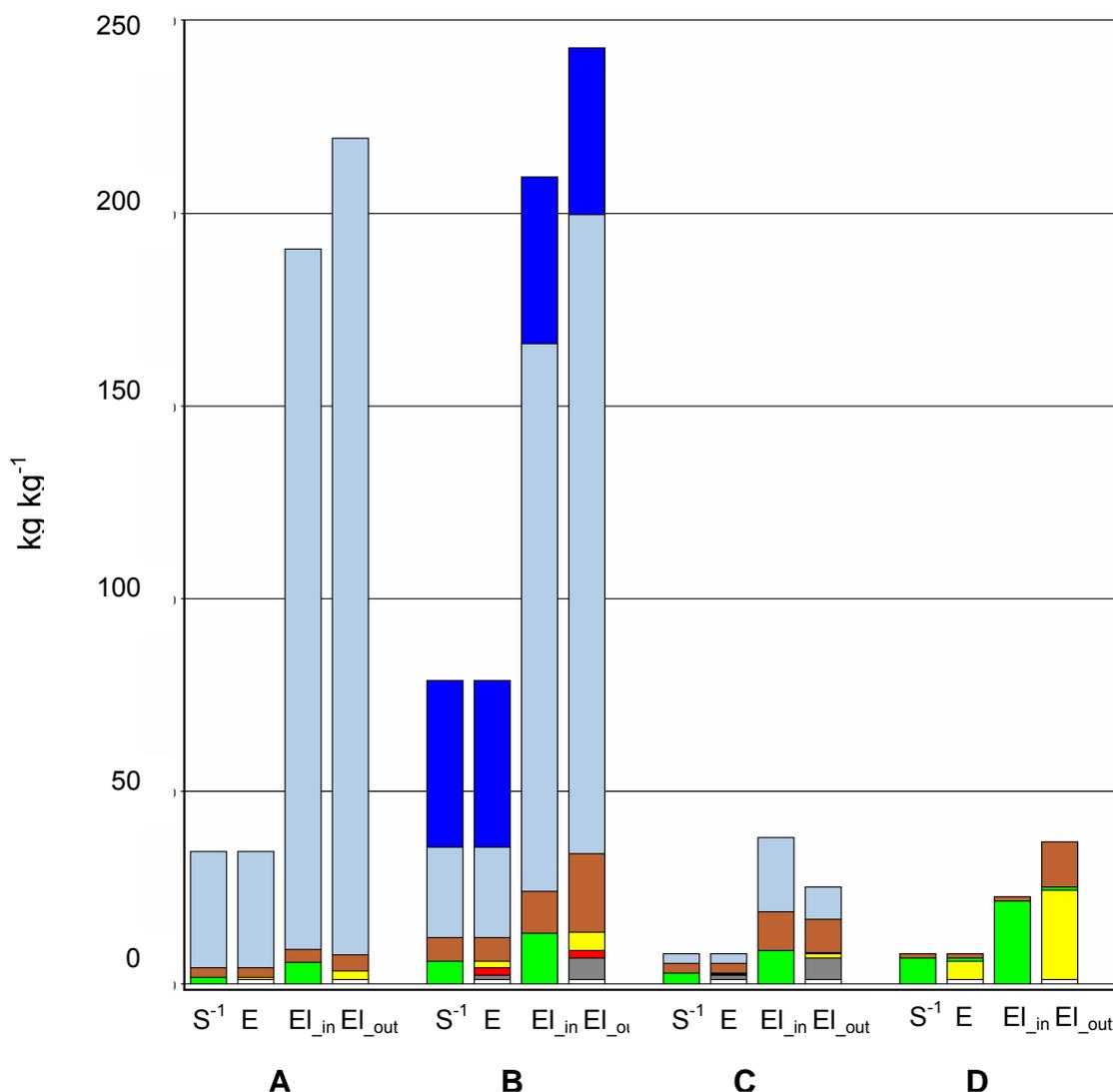


Abbildung 39: Umweltevaluation von drei chemischen Herstellungsprozessen von (R,S) Styroloxid mit dem Bioprozess zur Herstellung von enantiomerenreinem (S)-Styroloxid. □Lösungsmittel; ■Abwasser; ■Hilfsstoffe; ■Edukte; ■Nebenprodukte; ■ Isomere; □ Produkt; **A:** Perbenzoesäure Prozess^[35]; **B:** Perbenzoesäure Prozess^[36]; **C:** Wasserstoffperoxid Prozess^[37]; **D:** Bioprozess. S⁻¹ = Massenindex; E = Umweltindex; EI_{in} = Umweltindex input; EI_{out} = umweltindex output. Evaluation erstellt mit EATOS®

Die Materialbilanz wird in Form eines Säulendiagramms wiedergegeben. Die Säulen werden mit „S⁻¹“ und „E“ bezeichnet und lehnen damit an zwei von R.A. Sheldon definierten Kennzahlen an – der Selektivität S und dem Umweltfaktor E^[38]. Die Selektivität S ist der gewichtsbezogene Quotient von Produkten und Edukten, d.h. ein Mass für die Effektivität der Umsetzung der Edukte zum gewünschten Produkt. In Anlehnung an diese Kennzahlen wird eine inverse Selektivität (S⁻¹), auch als mass intensity bzw Massenindex bezeichnet, definiert, die allerdings neben den Substraten auch alle weiteren Eingangsstoffe mit einbezieht. Der Exponent zeigt an, dass im Gegensatz zur Selektivität S nicht das Verhältnis von Produkt zu den Eingangsstoffen, sondern die umgekehrte Beziehung bestimmt wird. Der Massenindex S⁻¹ stellt also den Massenindex pro Produkteinheit dar, den sogenannten Input der Reaktion.

$$\text{Massenindex } S^{-1} = \frac{\Sigma \text{Substrate [g]} + \text{Lösungsmittel [g]} + \text{Hilfsstoffe [g]} + \text{Katalysator [g]} + \dots}{\text{Produkt [g]}}$$

Das analoge Verhältnis von Abfall zum Produkt nennt Sheldon den Umweltfaktor E.

$$\text{Umweltfaktor } E = \frac{\Sigma \text{Abfall [g]}}{\text{Produkt [g]}}$$

„Kleine Werte“ für den Massenindex S⁻¹ und den Umweltindex E weisen also auf eine "bessere" Synthese hin. Die EI_input und EI_output Werte gewichten die Input- und Output-Ströme (also vor und nach der Synthese) auch nach ihrer Belastung für Mensch, Tier und Umwelt, also R-Sätzen und Toxizitäten.

Die Produktmengen sind erstaunlicherweise fast vergleichbar, allerdings entstehen bei den chemischen Prozessen große Anteile des Racemats. Die anscheinend großen Mengen Nebenprodukt entstehen durch die Gewichtung und programminterne Behandlung der einzelnen Substanzen. Ursache dafür ist, dass das Programm die nicht umgesetzten Mengen von Edukt (Styrol) und Hilfsstoffen (Cofaktoren, Katalase) aufgrund der relativ geringen Ausbeute von Styroloxid, als Nebenprodukt mit einbezieht. Hinzu kommt in den Umweltindizes die Gewichtung der R-Sätze und Toxizitäten (LC50 etc.,) welche z.B. bei Styrol relativ umfangreich bzw. hoch ausfallen und so die Säulenanteile dieser Substanz(en) vergrößern.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sauerstoffabhängige Reaktionen wie Monooxygenierungen zwar vom Umweltaspekt her interessant und vor allem aufgrund ihrer Enantioselektivität auch für eine Anwendung hoch spannend sind, dass aber die Wirtschaftlichkeit einer solchen Reaktion, welche auf elektrochemischer Kofaktorregeneration aufbaut noch sehr weit von dem entfernt ist, was für eine Implementierung nötig ist. In einem, solchen Fall sind, zumindest nach dem heutigen Stand der Technik, klassische Regenerierungsmethoden bzw Ganzzell Anwendungen sicherlich vielversprechender.

*Auszug aus dem Review „ *Productivity of electroenzymatic reduction and oxidation reactions: theoretical and practical considerations*. R. Ruinatscha, V. Höllrigl, K. Otto and A. Schmid (2006) *Advanced Synthesis & Catalysis* **348**:2015-2026

Diskussion

Modul 1 Biooxidation— Screeningsysteme zum Auffinden neuer Monooxygenasen für Hydroxylierung und Epoxydierungsreaktionen an Substraten, die von BASF AG benannt wurden und industriell bedeutsam sind, wurden erfolgreich entwickelt, validiert und zur BRAIN AG transferiert. Dort wurden aus kultivierbarer Biodiversität (Neuisolate und BRAIN-Stammsammlung) 58 Isolate mit Wachstum auf Terpen/Aliphaten-Agar isoliert. 37 (aus 826) Isolate zeigten ein Wachstum auf Naphthalin, 3-Phenoxytoluol, Inden und Toluol und 5 Isolate zeigten im zellfreien Extrakt einen Umsatz mit allen vier Substraten (Naphthalin, 3-Phenoxytoluol, Inden und Toluol). Ferner setzten 13 der bisher getesteten Isolate Styrol um, ohne dass es zu einer mittels HPLC detektierbaren Styrolepoxydbildung kam, was darauf schließen lässt, dass es sich um Organismen handelt welche das Substrat über eine mehrstufige Reaktion bis zum Phenylacetat abbauen und dann im Zellmetabolismus komplett umsetzen^[30]. Zusätzlich wurden bisher 1196 Stämme auf Wachstum mit drei wasserunlöslichen Substraten der BASF AG als einziger C-Quelle untersucht. Keiner dieser 1196 Stämme konnte zunächst auf diesen Substraten angezogen werden. Um zumindest einen co-metabolischen Umsatz zu ermöglichen, wurden die Stämme zusammen mit einem weiteren wasserlöslichen BASF Substrat inkubiert. Es konnten 671 Isolate innerhalb der BRAIN Stammsammlung identifiziert werden, welche auf dem wasserlöslichen BASF-Substrat als einziger C-Quelle wachsen konnten. Von diesen konnten nur 3 Isolate in Anwesenheit der restlichen 3 Substrate wachsen. Offensichtlich sind diese Substrate in hohem Maße wachstumshemmend. Zur Identifikation und Isolierung der Vollängen-Gene neuer Monooxygenasen und heterologen Darstellung der Enzyme wurden beispielhaft mehrere Genbanken vom Isolat HD1106 erstellt, welches sich als am weitesten charakterisierter prokaryontischer Organismus (β -Proteobacterium) mit relativ unproblematischem Wachstumsverhalten gegenüber den anderen Isolaten auszeichnet. Da das eingeplante FACS-Screeningsystem noch nicht für die Vermessung der rekombinanten Genbankklone zur Verfügung stand wurde ein alternatives aktivitätsbasiertes Plattenscreeing zum Nachweis einer Indoloxidation durchgeführt. Dies führte jedoch nicht zur Identifizierung aktiver Klone, obgleich die Oxygenase aus HD1106 beim hergestellten Genbankumfang sicherlich in der Bank abgebildet war. Die Entwicklung des für das Durchmustern der Metagenombank vorgesehenen

FACS-Screen ist weitgehend abgeschlossen. Die Technologie wird nun auf die verfügbaren Genbanken der BRAIN übertragen und diese werden dann erneut auf die Oxygenasen durchgemustert.

Die berichtete Aktivitätssteigerung der Variante 18E4, welche im Zwischenbericht erwähnt wurde konnte leider nicht reproduziert werden. Weitere Optimierungen des Assays resultierten in der Identifizierung von zwei potenziellen Mutanten, welche erhöhte Epoxydierungsaktivität zeigen. Diese werden derzeit auf die ihnen zugrundeliegenden Mutationen untersucht, um anschließend biochemisch weiter charakterisiert zu werden.

In der von StyA katalysierten Epoxydierungsreaktion ist FADH₂ der essentielle Kofaktor^[31]. Die damit einhergehende Problematik der spontanen Reaktion des Kofaktors und damit der schlechte Elektronenausbeute, wie sie im Ergebnissteil ausgiebig dargelegt wurde, konnte im Rahmen des Projektes nicht gelöst werden. Anfänglich vielversprechende Resultate mit einem artifiziellen Kofaktor mussten relativiert werden. Momentan wird an einer prozesstechnischen Lösung dieses Problems gearbeitet.

Modul 2 Bioreduktion— Durch Optimierung der Katalysator-Expression und der Reinigung konnten aus einem 2 L Fed-Batch Reaktor innerhalb von 3 Tagen 800 mg technisch reiner Katalysator gewonnen werden, wobei lediglich ein einfacher Reinigungsschritt nötig ist. Der Katalysator konnte ohne Aktivitätsverlust lyophilisiert werden und steht somit als „shelf-enzyme“ zur Verfügung.

Für die weitere Enzymcharakterisierung und Modifikationsarbeiten wurde die Enzymreinigung um zwei Reinigungsschritte erweitert und somit ein Reinheitsgrad von etwa 99 % erreicht.

Mit diesem hochreinen Protein wurden Umsetzungen mit Substraten der EMC gemacht. Diese Auswahl bestand aus Vertretern dreier pharmakologisch relevanter Grundstrukturen, Oxazole, Arylether und Pyrrole. Die Verbindungen zeigen charakteristische primäre, sekundäre und phenolische OH-Gruppen. Fmoc-Dihydroxypropylcystein und Dihydroxypropylcystein sind ausgesprochen interessante Intermediate bei der Synthese von Lipopeptid-Agonisten von Toll-like Rezeptoren. Auf diesem Gebiet verfügt die EMC microcollections GmbH über ein breites Methodenspektrum zur Herstellung von Verbindungen die das komplizierte Netzwerk zur Steuerung der angeborenen und erworbenen Immunität steuern. Agonisten und Antagonisten von Toll-like Rezeptoren sind sowohl in der Forschung als auch bei der

Entwicklung von Therapeutika von großer Bedeutung. Nach selektiver Oxidation einer oder beider Hydroxygruppen durch die TADH stehen wertvollen Bausteine zur Synthese neuartiger Derivate zur Verfügung, die bisher nicht zugänglich sind. Obwohl die oxidativen Umsetzungen der unterschiedlichen Substrate eher ernüchternd ausfiel, konnten bereits vielversprechende Umsetzungen in der reduktiven Richtung gemacht werden. Vor allem nachdem nach *in silico* Vorhersagen geeignete Mutationen in das Enzym eingebracht wurden.

Basierend auf dem Konzept des *Data Warehousing* wurde ausgehend von der Sequenz der TADH eine umfangreiche Alkoholdehydrogenase - Proteindatenbank aufgebaut. Durch die Möglichkeit, Informationen von Projektpartnern in die Datenbank einfließen zu lassen, wurde zusätzlich eine Kooperationsplattform etabliert. Dieses automatisierte Datenbanksystem wurde bereits erfolgreich bei verschiedenen Proteinfamilien angewendet^[32,33]. Nach endgültiger Fertigstellung der Datenbank wird diese online zur Verfügung gestellt, um anderen Gruppen eine systematischen Analyse der Alkoholdehydrogenase-Familie zu ermöglichen. Mit Hilfe der Datenbank konnte die Formaldehyddehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (PPFDH) als sequenzähnlichstes Protein zu TADH mit bekannter Struktur (PDB Eintrag 1KOL) identifiziert werden. Die Alkoholdehydrogenase der Pferdeleber (HLADH) zeigte allerdings trotz geringerer globaler Sequenzidentität lokal sequenzähnlichere Bereiche. Aus Kombination beider Enzyme konnte die Form der Bindetasche der TADH abgeleitet werden. Für die TADH wurde ein Homologiemodell basierend auf der Struktur der HLADH (PDB Eintrag 1EE2) und der PPFDH (PDB Eintrag 1KOL) erstellt. Das Modell zeigte gute Qualität und konnte bereits für die Analyse der Lysinreste an der Proteinoberfläche sowie für verschiedene Mutationsvorschläge herangezogen werden. Dies ist hinsichtlich des Prozesses sehr wichtig, da vermutet wird, dass die Lysine auf der Oberfläche des Enzyms an das zentrale Rhodiumatom des $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ -Komplexes koordinieren, und dadurch die Reaktion stark inhibiert wird. Eine Lösung dieses Problems könnte, basierend auf dem Modell, gerichtete Mutationen am Enzym selbst sein. In einem anderen Ansatz wurden die oberflächennahen Lysine chemisch modifiziert, was allerdings zu einem signifikanten Aktivitätsverlusts des Enzyms führte. Allerdings konnte die Methode mittlerweile soweit optimiert werden, dass mittlerweile bis zu 20 % der ursprünglichen Aktivität erhalten bleiben, wohingegen erste Versuch zu einem kompletten Aktivitätsverlust führten. Ein weiterer viel versprechender Ansatz setzt bei

Veränderungen der Reaktionsbedingungen an. Dass dies möglich ist, konnte am Beispiel der Rückoxidation von NADH gezeigt werden. Die Oxidation von NADH zum NAD⁺ ist abhängig von der Koordinierung des Kofaktors an den Mediator^[34]. Durch Zugabe hoher Ammoniumkonzentrationen zum Reaktionsgemisch konnte die Rückoxidation stark reduziert werden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass dies auch Interaktionen zwischen $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ und dem Enzym verhindern oder zumindest reduzieren könnte.

Die auf der Grundlage von HLADH und PPFDH erstellten Homologiemodelle führten in Dockingexperimenten nicht zu eindeutigen Aussagen über die Umsetzung bestimmter Substrate. Daher wurden zur Vorhersage der Substratspezifität der TADH die Modelle der Form der Bindetaschen herangezogen. Erfolgreiche Beispiele aus anderen Proteinfamilien haben diese Methode bereits bestätigt^[35]. Ausgehend von diesen Modellen können einerseits experimentelle Beobachtungen der Substratumsetzung für weitere Alkoholdehydrogenasen in der Datenbank erklärt werden und Mutanten vorhergesagt werden, andererseits können die Alkoholdehydrogenasen basierend auf der Form ihrer Bindetasche nach ihren biochemischen Eigenschaften klassifiziert werden. Das erstellte Homologiemodell der TADH konnte allerdings erfolgreich zum Design von Mutanten zur Vergrößerung der Bindetasche im inneren Bereich herangezogen werden. Dadurch erwies sich die untersuchte Region der Bindetasche als relevant für Substratspezifität und Selektivität. Diese relevante Region im inneren Bereich der Bindetasche lässt sich zur Klassifizierung in zunächst zwei Klassen der Alkoholdehydrogenasen nach Form der Bindetasche heranziehen. Diese Region wird in der Proteinstruktur durch einen charakteristischen Verlauf des Proteinrückgrates abhängig von der Länge eines Loops gebildet. Durch ein *in silico* screening aller Alkoholdehydrogenasen der Datenbank können dadurch neue Enzyme mit geeignetem Substratspektrum identifiziert werden, sofern Substratspezifitäten mit der Einteilung nach Form der Bindetasche korreliert werden können.

Mit Hilfe des angewendeten Datenbanksystems konnte gezeigt werden, dass eine Einteilung zahlreicher Proteine in wenige Klassen möglich ist, sofern man z.B. aus Proteinstrukturen einfache Regeln bzw. Unterschiede ableiten kann, die sich in der Proteinsequenz und im Familiensequenzalignment konserviert wieder finden. Diese einfache Methode zur Klassifizierung einer umfassenden und diversen Proteinfamilie

anhand struktureller Eigenschaften lässt sich leicht auf andere Proteinfamilien (wie z.B. die Familie der short-chain Alkoholdehydrogenasen) übertragen.

Strukturbasierte Untersuchungen hinsichtlich Stabilität und Exprimierbarkeit der TADH wurden nicht weiter durchgeführt, da weder die Stabilität des exprimierten Enzyms, noch die Exprimierbarkeit selbst sich als problematisch herausstellte.

Elektroenzymatischer Prozess— Um die Entwicklung eines elektroenzymatischen Prozesses besser angehen zu können wurden zunächst die grundlegenden Limitationen des Systems untersucht. Die Hauptlimitation ist die geringe Elektronen Ausbeute des elektroenzymatischen Prozesses, vor allem für die Oxidationsreaktion von StyA. Es konnte gezeigt werden, dass der fürs Enzym optimale Puffer sowie das Produkt der katalysierten Reaktion nicht elektrochemisch aktiv sind, und somit die Elektronenausbeute nicht verringern. Dies trifft sowohl für die von StyA, als auch für die von TADH katalysierten Reaktionen zu. Für den reduktiven Prozess mit TADH wurde durch die Zugabe von 50 mM Ammoniumchlorid in 100 mM Tris/HCl die Stabilität des Kofaktors NADH bei 60 °C auf etwa 12 h Halbwertszeit erhöht. Dieser Puffer ist ebenfalls optimal geeignet, um das Elektrodenmaterial zu konditionieren, was einen späteren Prozessablauf signifikant vereinfacht. Durch die Umstellung auf ein neues Elektrodenmaterial (RVC) konnte bereits unter nicht optimierten Bedingungen eine relative Steigerung der elektrochemischen Regenerationsrate von NADH um das Zwanzigfache erzielt werden. Das neue Elektrodenmaterial weist zudem viel Spielraum für das Design spezifischer Reaktortypen aus und ist kostengünstig. Basierend darauf wurde eine kontinuierliche Durchflusszelle konstruiert. In dieser Zelle konnten durch die zusätzliche Integration einer zweiten Phase so hohe Umsätze erzielt werden, dass diese Reaktion nun innerhalb des Prozessfensters liegt, in dem elektroenzymatische Reaktionen für die Anwendung interessant werden.

Soll-/Ist-Vergleich – Begründung für Abweichungen

Da die Anpassung des Epoxyd-Durchmusterungssystems auf das Enzym Styrolmonooxygenase StyAB mit mehr Schwierigkeiten verbunden war als erwartet, konnte erst relativ spät im Projekt nach Mutanten des StyAB Systems mit erhöhter Aktivität gesucht werden. Da Partner 1 noch keine StyAB Mutanten erhalten hat, konnten im elektroenzymatischen Prozess bislang nur der Wildtyp des Enzyms getestet werden. Bei Partner 2 kam es aus oben genannten Grund zur zeitlichen Verzögerung mit den ersten drei Projektziele, welche aber letztendlich alle erreicht wurden. Letzteres ist durch publizierte oder zur Publikation eingereichte Arbeiten belegt. Ein FACS-Durchmusterungsverfahren zur Sortierung von Doppelemulsionen wurde etabliert und neue Fluorophoreverbindungen für FACS-Durchmusterungen wurden synthetisiert. In noch ausstehenden Arbeiten müssen die BRAIN-Metagenombibliotheken mittels der synthetisierten Fluorophore auf Monooxygenaseaktivität untersucht werden.

Alle anderen Meilensteine sind der nachfolgenden Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Arbeitsprogramm und Meilensteine – Soll-/Ist-Vergleich

Partner	Aufgaben	1. HJ	2. HJ	3. HJ	4. HJ
Partner 1 UniDo	Expressionsystem und Katalysatorentwicklung	XX			
		✓			
	Mediator-technologie		XX	XX	
			✓	○	
	Prozessentwicklung		xx	XX	XX
			✓	○	○
Umweltevaluation und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Prozesses		xx	XX	XX	
		--	○	✓	
Partner 2 IUB Bremen	Mutagenese des StyA-Monooxygenasegens mit SeSaM	XX			
		✓			
	Durchmusterung von Organismen-bibliotheken und Genbanken von BRAIN zum Auffinden neuer Monooxygenasen und Epoxydasen	XX	XX		
		✓	✓		
	Entwicklung eines FACS – Lipokalin Durchmusterungssystem*		XX	XX	
			✓	✓	

	Durchmustern von Metagenombanken, die von BRAIN bereitgestellt werden.				XX
		vorgesehen bis Mai 2007			
Partner 3 BRAIN	Screening und Bereitstellung neuer Monoxygenasen aus kultivierbarer Biodiversität	XX	XX		
		✓	✓		
	Identifikation und Isolierung der Vollängen-Gene neuer Monoxygenasen und heterologe Darstellung der Enzyme		XX	XX	
			○	○	
Bereitstellung von Metagenome-Genbanken nicht-kultivierter Biodiversität für hochdurchsatzfähigem Monoxygenase-Screening				XX	
				○	
Partner 4 BASF	FACS-Screening		XX	XX	XX
			--	✓	✓
	Unterstützung bei elektrochemischer Reaktorentwicklung	XX	XX	XX	XX
		--	--	○	○
Partner 5 ITB Stuttgart	Erstellung eines Strukturmodells	XX			
		✓			
	Modellierung der experimentell beobachteten Substratspezifität (20 Substrate)		XX		
			✓		
	Vorhersage von Mutanten in der Bindungstasche mit veränderter Spezifität Modellierung von durch gerichtete Evolution erzeugten Mutanten			XX	XX
				✓	✓
	Modellierung des Austauschs und der chemischen Modifikation von Lysinen an der Oberfläche		XX		
			✓		
	Design von Mutanten mit verringerter Inaktivierung durch den Mediator			XX	
				✓	
	Vergleichende Analyse der Struktur und Design von Mutanten mit erhöhter Stabilität				XX
					✓
					XX
Vergleichende Analyse der Exprimierbarkeit ein <i>E.coli</i> und Design von Mutanten mit erhöhtem Expressionslevel				✓	
				○	
Partner 6 EMC Tübingen	Vorbereitung der Testverbindungen, Chemische Mod. von TADH, Analytik	XX			
		✓	✓	✓	✓
	Synthesen neuer Mediatoren,		XX	XX	

	Proteinanalytik, fokussierte Kollektionen von Testverbindungen, Analytik		✓	✓	
	Erstellung eines strukturellen Patterns der umgesetzten Substrate, Analytik		XX	XX	XX
			✓	✓	✓

* Die Lipokaline wurden durch Doppemulsionen ersetzt (überlegene Technologie, die während der Projektlaufzeit von Tawfik und Griffith für die Gelenkte Evolution validiert wurde. Die Doppemulsionstechnologie wurde inzwischen auf Projekt-Fragestellungen System adaptiert; siehe obige Ergebnisse).

X **Vorgabe aus Zeitplan Projektantrag** **○** **Aktuell bearbeitete Aufgabe**
✓ **Erledigte Aufgabe** **--** **Nicht in Angriff genommen**

Kooperation innerhalb des Projekts

Die Kooperationen innerhalb des Projekts verliefen sehr harmonisch. Es kam zu regelmäßigen Projekttreffen mit allen Partnern, bzw. wenn nötig auch auf bilateraler Ebene. Probleme wurden in einer offenen Atmosphäre diskutiert. Es kam vermehrt zu Gastaufenthalten einzelner Mitarbeiter in den Laboren der anderen Projektpartner, um z.B. bestimmte Methoden besser im eigenen Bereich implementieren zu können. Zwischen Partner 2 und 3 kam es zu einem weiterführenden BMBF BioChancePlus-Projekt.

Wer partizipiert an den Ergebnissen?

Drei Durchmusterungssysteme für Oxygenasen wurden zur BRAIN AG transferiert und haben sich dort im Durchmustern von Biodiversität bewährt. Damit verfügt die BRAIN AG über neue Durchmusterungssysteme, um in der natürlichen Biodiversität nach Biokatalysatoren für Oxygenasefunktionalisierungen zu suchen. Diese Systeme werden der BRAIN AG helfen ihr Produktangebot für Oxyfunktionalisierung zu erweitern und stärken somit die Wettbewerbsposition der BRAIN AG. Für die an der IUB in der Vorbereitung befindliche Gründung der Firma SeSaM-Biotech, die SeSaM-Mutagenesekits entwickelt und gelenkte Evolutionsdienstleistungen anbietet, stellen die Durchmusterungssysteme einen weiteren Anreiz für Kunden dar, um SeSaM-Dienstleistungen in Anspruch zu nehmen.

Wird das Vorhaben über die Projektlaufzeit weitergeführt?

Aufgrund des methodischen Austausches erhielt das SeSaM-Profit Center der IUB bereits einen ersten Auftrag durch die BRAIN AG für die Gelenkte Evolution eines Biokatalysators, der zur vollsten Zufriedenheit der BRAIN AG bearbeitet wurde. Ferner wird in einem gemeinsamen BMBF-Projekt der BRAIN AG und der Arbeitsgruppe Schwaneberg die Doppelemulsions-Durchmusterungstechnologie weiterentwickelt und zur Gelenkten Evolution von Proteasen und Monooxygenasen verwendet.

Partner 1 hat ebenfalls ein Nachfolgeprojekt gefördert durch das Land NRW und der EU bewilligt bekommen, in dem besonders die vielversprechende elektroenzymatische Anwendung mit der TADH, sowie die prozesstechnischen Lösungen der StyA Anwendung in diesem Reaktorsystem weiterentwickelt werden.

Publikationen

Sensitive assay for laboratory evolution of hydroxylases toward aromatic and heterocyclic compounds. Wong, T. S., Wu, N., Roccatano, D., Zacharias, M., Schwaneberg, U. (2005) *Journal of Biomolecular Screening* **10**:246-252.

A screening system for directed evolution of epoxygenases: validation reveals importance of position 184 in P450 BM3 for stereoselective styrene epoxydation. K.-L. Tee, U. Schwaneberg (2006) *Angewandte Chemie*, 45: 5380-5383.

A host/guest complex enables directed evolution of a two-component epoxygenase (StyAB) for styrene epoxidation, Tee, K. L., Dmytrenkoa, O., Otto, K., Schmid, A., Schwaneberg, U., (zur Publikation eingereicht).

Productivity of electroenzymatic reduction and oxidation reactions: theoretical and practical considerations. R. Ruinatscha, V. Höllrigl, K. Otto and A. Schmid (2006) *Advanced Synthesis & Catalysis* **348**:2015-2026

Electroenzymatic asymmetric reduction of rac-3-methylcyclohexanone to (1S,3S)-3-methylcyclohexanol in organic/aqueous media catalyzed by a thermophilic alcohol dehydrogenase. V. Höllrigl, K. Otto, A. Schmid (2007) *Advanced Synthesis & Catalysis* (accepted).

The Medium-Chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database. M. Knoll, J. Pleiss (Publikation in Vorbereitung)

Fazit

Dieses sehr ehrgeizige und vielschichtige Projekt ist ein Beispiel für gute interdisziplinäre Zusammenarbeit. An den Hochschulen entwickelte Methoden wie z.B. der Epoxidscreen konnten direkt beim KMU Partner implementiert werden. Als sehr interessant und vielversprechend hat sich die Kombination von *in situ* und *in vitro* Charakterisierung in Verbindung mit der Produktion von pharmazeutisch interessanten Ausgangsstoffen erwiesen. Etwas ernüchternd ist die Bilanz bei der Entwicklung eines elektrochemischen Prozesses für eine Anwendung mit einer Monooxygenase. Das Sauerstoffdilemma konnte nur bedingt gelöst werden und auch die Evolvierung des Enzyms brachte keine wesentliche Verbesserung des Prozesses, was sich auch in der Umweltbilanz niederschlägt. Die Anwendung der Elektroenzymologie auf sauerstoffunabhängige Reaktionen hingegen, wurde entscheidend vorangebracht und sollte unbedingt weiterverfolgt werden.

Referenzen

1. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning*. A laboratory manual, ed. C. Nolan. Vol. 3. 1989, New York: Cold Spring Harbor laboratory press.
2. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J. Mol. Biol., 1993. **234**: p. 779-815.
3. van Dongen, S., *A cluster algorithm for graphs*. Technical Report INS-R0010, National Research Institute for Mathematics and Computer Science in the Netherlands, Amsterdam,, 2000.
4. Sippl, M.J., *Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins*. Proteins, 1993. **17**: p. 355-362.
5. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Cryst, 1993. **26**: p. 283-291.
6. Pei, J. and N.V. Grishin, *AL2CO: calculation of positional conservation in a protein sequence alignment*. Bioinformatics, 2001. **17**: p. 700-712.
7. Wong, T.S., et al., *Sensitive assay for laboratory evolution of hydroxylases toward aromatic and heterocyclic compounds*. J Biomol Screen, 2005. **10**: p. 246-252.
8. Schwaneberg, U., et al., *A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A*. Anal Biochem, 1999. **269**: p. 359-366.
9. Wong, T.S., F.H. Arnold, and U. Schwaneberg, *Laboratory evolution of cytochrome P450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents*. Biotechnol Bioeng, 2004. **85**: p. 351-358.
10. Hai, M., et al., *Flow cytometry: a new method to investigate the properties of water-in-oil-in-water emulsions*. Langmuir, 2004. **20**: p. 2081-2085.
11. Bernath, K., S. Magdassi, and D.S. Tawfik, *Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery*. J Mol Biol, 2005. **345**: p. 1015-1026.
12. Mastrobattista, E., et al., *High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions*. Chem Bio, 2005. **12**: p. 1291-1300.
13. Fischer, M. Q.K.Thai, M.Grieb, J.Pleiss 2006. *DWARF - a data warehouse system for analyzing protein families*. BMC Bioinformatics **7**: 495-495
14. Hollmann, F.
15. Woodley, J.M. and N.J. TitchenerHooker, *The use of windows of operation as a bioprocess design tool*. Bioprocess Engineering, 1996. **14**(5): p. 263-268.
16. Straathof, A.J., S. Panke, and A. Schmid, *The production of fine chemicals by biotransformations*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(6): p. 548-556.
17. Cantet, J., A. Bergel, and M. Comtat, *Coupling of the electroenzymatic reduction of NAD⁺ with a synthesis reaction*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. **18**(1): p. 72-79.
18. Ruppert, R., S. Herrmann, and E. Steckhan, *Efficient indirect electrochemical in-situ regeneration of NADH: electrochemically driven enzymatic reduction of pyruvate catalyzed by D-LDH*. Tetrahedron Letters, 1987. **28**(52): p. 6583-6586.

19. Suye, S., et al., *Electrochemical reduction of immobilized NADP(+) on a polymer modified electrode with a co-polymerized*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**(2): p. 139-144.
20. Delecouls-Servat, K., A. Bergel, and R. Basseguy, *Membrane electrochemical reactors (MER) for NADH regeneration in HLADH-catalysed synthesis: comparison of effectiveness*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2004. **26**(4): p. 205-15.
21. Baik, S.H., et al., *Direct electrochemical regeneration of NADH from NAD(+) using cholesterol-modified gold amalgam electrode*. Biotechnology Techniques, 1999. **13**(1): p. 1-5.
22. Nakamura, Y., S. Itoh, and S. Suye, *Redox Reaction System Conjugating Electrochemical Reduction of Nadp(+) and Enzymatic-Reaction across the Electron-Transfer Membrane*. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**(12): p. 1026-1030.
23. Kang, Y.W., et al., *Optimization of the mediated electrocatalytic reduction of NAD(+) by cyclic voltammetry and construction of electrochemically driven enzyme bioreactor*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(8): p. 599-604.
24. Dicosimo, R., et al., *Enzyme-Catalyzed Organic-Synthesis - Electrochemical Regeneration of Nad(P)H from Nad(P) Using Methyl Viologen and Flavoenzymes*. Journal of Organic Chemistry, 1981. **46**(22): p. 4622-4623.
25. Cosnier, S. and H. Gunther, *A Polypyrrole [Rh(III)(C5me5)(Bpy)Cl]⁺ Modified Electrode for the Reduction of Nad⁺ Cofactor - Application to the Enzymatic Reduction of Pyruvate*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1991. **315**(1-2): p. 307-312.
26. Beley, M. and J.P. Collin, *Electrochemical Regeneration of Nicotinamide Cofactor Using a Polypyrrole Rhodium Bis-Terpyridine Modified Electrode*. Journal of Molecular Catalysis, 1993. **79**: p. 133-140.
27. Hollmann, F., A. Schmid, and E. Steckhan, *The first synthetic application of a monooxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration*. Angewandte Chemie International Edition, 2001. **40**(1): p. 169-171.
28. Hoormann, D., J. Jörissen, and H. Putter, *Electrochemical procedure - New developments and tendencies*. Chemie Ingenieur Technik, 2005. **77**(9): p. 1363-1376.
29. Reipa, V., M.P. Mayhew, and V.L. Vilker, *A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1997. **94**(25): p. 13554-13558.
30. Panke, S., et al., *Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of Pseudomonas sp. strain VLB120*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(6): p. 2032-2043.
31. Otto, K., et al., *Biochemical characterization of StyAB from Pseudomonas sp strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(16): p. 5292-5302.
32. Barth, S., et al., *The database of epoxide hydrolases and haloalkane dehalogenases: one structure, many functions*. Bioinformatics, 2004. **20**: p. 2845-2847.
33. Fischer, M. and J. Pleiss, *The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families*. Nucl. Acid. Res., 2003. **31**: p. 319-321.
34. Hollmann, F., B. Witholt, and A. Schmid, *[Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺: a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin*

-
- coenzymes*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002. **19**: p. 167-176.
35. Pleiss, J., M. Fischer, and R.D. Schmid, *Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site*. Chem Phys Lipids, 1998. **93**: p. 67-80.
34. Freemann, J.P. *in* Organic Synthesis Collection. Vol. 1, p. 494; Wiley 1941
35. Laha, S.C. and R. Kumar, *Selective epoxidation of styrene to styrene oxide over TS-1 using urea hydrogen peroxide as oxidizing agent*. Journal of Catalysis, 2001. **204**: 64-70
36. Rode, C.V., U. N.Nehete, M.K. Dongar, *Alkali promoted selective epoxidation of styrene to styrene oxide using TS-1 catalyst*. Catalysis Communications, 2003. **4**:365–369
37. Sheldon, R.A. *Consider the environmental quotient*. Chemtech, 1994. **3**:38-47