

Abschlussbericht

AZ 13197-32

Förderschwerpunkt integrierte Biotechnologie:

„Gerichtete Evolution einer Phenylalanin- Ammoniak-Lyase zur effizienten enzymatischen Synthese chiraler Amine“

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer
Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Institut für Biochemie
Abt. Biotechnologie und Enzymkatalyse
Felix-Hausdorffstr. 4
17487 Greifswald
Tel. 03834 86 4367
Fax: 03834 86 80066
Email: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

Projektbeginn: 1. September 2007

Projektende: 31. August 2009

Greifswald, 27.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. ZIELSETZUNG DES PROJEKTES	2
3. VERWENDETE METHODEN	3
COMPUTER MODELLING	3
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	3
MIKROBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN	3
CHEMISCHE METHODEN	3
4. ERGEBNISSE	4
4.1. VORARBEITEN	4
EXPRESSION DER PAL AUS <i>PETROSELINUM CRISPUM</i> (<i>PCPAL</i>)	4
4.2. GENERIERUNG VON AKTIVITÄT GEGENÜBER PHENYLALANINOL	4
ETABLIERUNG EINES HOCHDURCHSATZ-TAUGLICHEN AKTIVITÄTSASSAYS FÜR PHENYLALANINOL	5
4.3. ERSTELLUNG VON MUTANTENBIBLIOTHEKEN DER <i>PCPAL</i>	5
4.4. SELEKTION DER MUTANTENBIBLIOTHEKEN AUF PHENYLALANINOL-AKTIVITÄT	8
ETABLIERUNG EINES SELEKTIONSASSAYS GEGENÜBER PHENYLALANINOL	8
SELEKTION NACH PHENYLALANINOL-AKTIVITÄT	8
4.5. DURCHMUSTERUNG DER MUTANTENBIBLIOTHEKEN IN MTP	9
4.6. KONZEPT DES STABILISIERTEN SUBSTRATES UND RATIONALES PROTEINDESIGN	11
4.7. TYROSIN-AMMONIAK-LYASE AUS <i>RHODOBACTER SPHAEROIDES</i>	12
AKTIVE EXPRESSION DES SYNTHETISCHEN GENES	13
OPTIMIERUNG DER PROTEINEXPRESSION	13
4.8. NEUES KONZEPT DES REAKTIONSMECHANISMUS	15
GRUNDLAGEN	15
KONZEPT	17
EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE	19
ZUSAMMENFASSUNG	21
4.9. MUTANTENBIBLIOTHEKEN <i>PCPAL</i>-ARG354-NNK UND <i>RS</i>TAL-ARG303-NNK	22
VORVERSUCHE / PLANUNG DER MUTANTENBIBLIOTHEKEN	22
MUTANTENBIBLIOTHEK ARG354 (<i>PCPAL</i>) UND ARG303 (<i>RS</i> TAL)	22
KULTIVIERUNG DER POSITIVEN KLONE	24
BEURTEILUNG DER MUTANTENBIBLIOTHEKEN	24
4.10. RATIONALES DESIGN AN DER POSITION 487 UND 488 (<i>PCPAL</i>)	25
ERGEBNISSE DES RATIONALEN DESIGNS AN DER POSITION 487 (<i>PCPAL</i>)	26
BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	27
RATIONALES PROTEINDESIGN DER POSITION 488 (<i>PCPAL</i>)	27
4.11. MUTANTENBIBLIOTHEKEN <i>PCPAL</i>-PHE137HIS-487/488-NNK UND <i>RS</i>TAL-435/436-NNK	28
BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	28
4.12. MUTANTENBIBLIOTHEK <i>PCPAL</i>-PHE137HIS-TYR110-NNK	29

HINTERGRUND	29
GENERIERUNG UND SCREENING DER BIBLIOTHEK	30
OPTIMIERUNG DER SCREENINGMETHODE	31
SCREENING DER NEUEN BIBLIOTHEK	31
4.13. BEWERTUNG DES PROTEINDESIGNS	32
4.14. RATIONALES DESIGN DER POSITION 137 (<i>pcPAL</i>) UND 89 (<i>rsTAL</i>)	32
4.15. AUSBLICK AUF ZUKÜNFTIGES PROTEINDESIGN	33
4.16. ALTERNATIVE SUBSTRATE	34
SYNTHESE VON DOPA-OL	34
SYNTHESE VON 3,4-DIHYDROXYZIMTSÄUREALKOHOL (DOZS-OL)	36
4.17. ETABLIERUNG DER RÜCKREAKTION	38
ASSAY	38
BIOKATALYSEN MIT <i>pcPAL</i> -PHE137HIS	38
VERGLEICH <i>pcPAL</i> -PHE137HIS UND <i>rsTAL</i>	40
QUANTITATIVE ANALYTIK	41
BIOKATALYSE MIT DEM <i>pcPAL</i> -WT	41
ZUSAMMENFASSUNG	42
LITERATUR	43

1. Zusammenfassung

Zunächst sollte durch fokussierte, gerichtete Evolution der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *Petroselinum crispum* (*pcPAL*) Aktivität gegenüber Phenylalaninol generiert werden. Dazu wurde eine Selektionsmethode auf Minimalmedium ohne N-Quellen etabliert und zwei fokussierte Mutantenbibliotheken mit Mutationen der Aminosäurepositionen 348, 350 und 354 in der ersten Bibliothek und 487, 488 in der zweiten Bibliothek durchmustert. Auf diese Weise konnte jedoch kein Klon mit Aktivität gegenüber Phenylalaninol generiert werden. Daher wurde ebenfalls das Hochdurchsatzscreening der Bibliothek mit photometrischen Assays begonnen. Ebenfalls ohne Erfolg. Moleküldynamische Simulationen zeigten, dass Phenylalaninol aufgrund der fehlenden Carboxylgruppe nicht im aktiven Zentrum zu stabilisieren war. Daher wurde das Substrat zum Tyrosin-Analogon Tyrosinol gewechselt. Durch rationales Design wurde die Einzelmutante Phe137His vorgeschlagen, was in Simulationen zu einer Stabilisierung des Substrates führte. Dieser Mutante konnte tatsächlich Aktivität gegenüber Tyrosinol nachgewiesen werden. Da ähnliche oder höhere Aktivitäten in echten Tyrosin-Ammoniak-Lyasen zu erwarten waren, wurde die *rsTAL* aus *Rhodobacter sphaeroides* als synthetisches Gen mit optimierter Codon-usage bestellt. Die *rsTAL* zeigte ähnliche Aktivitäten gegenüber Tyrosinol wie die *pcPAL*. Es wurden verschiedene Mutantenbibliotheken sowie rationale Punktmutationen der *pcPAL*-Phe137His-Mutante und der *rsTAL* generiert und nach erhöhter Aktivität durchmustert. Es konnte keine Mutante mit erhöhter Aktivität gegenüber Tyrosinol identifiziert werden. Daher wurde nach alternativen Substraten gesucht. Sowohl Tyrosinamide als auch Tyrosinhydrazid können von *pcPAL*-Phe137His und *rsTAL* umgesetzt werden. Es wurden Biokatalysen zur Aminierung verschiedener α,β -ungesättigter Substrate durchgeführt und analysiert. *Para*-Nitrozimtsäure stellte sich als ein besonders geeignetes Substrat heraus.

Darüber hinaus wurde durch moleküldynamische Simulationen eine neue Hypothese über den Mechanismus der Katalyse entwickelt, basierend auf einer einzigen, den chemischen Mechanismus der Katalyse bestimmenden Aminosäure Glu484 (*pcPAL*).

2. Zielsetzung des Projektes

Chirale Amine und Aminoalkohole haben eine große Bedeutung in der organisch-chemischen und pharmazeutischen Industrie. Sie finden Verwendung für die Produktion enantiomerenreiner Carbonsäuren durch fraktionierte Kristallisation und als chirale Auxiliare und Liganden in enantioselektiven chemischen Synthesen. Besonders hervorzuheben ist der Bedarf an enantiomerenreinen Aminen als Intermediate für die pharmazeutische und Agrochemie. Neben der selektiven Kristallisation der Enantiomere (max. 50 % Ausbeute) und chemischen Verfahren, stellt bislang die Lipase-katalysierte Racematspaltung das wichtigste enzymatische Verfahren dar. Allerdings werden hier maximal 50 % Ausbeute erreicht und bei Aminoalkohole ist zusätzlich die Einführung bzw. Entfernung von Schutzgruppen notwendig.

Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) katalysieren die reversible Addition von Ammoniak an Zimtsäure unter Bildung von optisch reinem L-Phenylalanin. Besonders gut untersucht und rekombinant in *E. coli* exprimierbar ist das Isoenzym PAL1 aus der Petersilie *Petroselinum crispum*.

Das Ziel des Projektes ist die Veränderung der Substratspezifität und Aktivität der PAL, um diese zur Synthese von chiralen Aminen bzw. Aminoalkoholen ausgehend von ungesättigten Substraten darzustellen. Dieses soll sowohl durch rationales Proteindesign als auch durch gerichtete Evolution der PAL erreicht werden. Ziel ist die Erzeugung von PAL-Varianten mit hoher Enantioselektivität, Aktivität und der Fähigkeit auch Substrate ohne Carboxylfunktion umzusetzen, um einen effizienten und umweltfreundlichen Zugang zu chiralen Aminen und Aminoalkoholen zu ermöglichen.

3. Verwendete Methoden

Computer Modelling

- Autodock4 / Autogrid4
 - o Automatisiertes Docking von Substraten ins aktive Zentrum unter Verwendung des Lamarckischen genetischen Algorithmus
- YASARA
 - o Molekulardynamische Simulationen in einer periodischen Wasserbox unter Verwendung des Amber99-Kraftfeldes
- VMD
 - o Analyse und Visualisierung der von YASARA generierten Trajektorien
- CPMD (Car-Parinello Molecular Dynamics)
 - o Quantenmechanische, molekulardynamische *ab initio* Simulation
- Rationales Proteindesign
- Mechanistische Untersuchungen

Molekularbiologische Methoden

- Positionsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange[®]-Protokoll
- Generierung von fokussierten Mutantenbibliotheken durch positionsgerichtete Sättigungsmutagenese

Mikrobiologische und biochemische Methoden

- Mikrotiterplatten-basierte, photometrische Hochdurchsatzassays
- Mutantenbibliotheken in MTP
 - o Hochdurchsatz-Proteinexpression in MTP
 - o Durchmusterung der Mutantenbibliotheken
- Selektionsassay auf Minimalmedium
- Bestimmung von kinetischen Parametern von Enzymen (Michaelis-Menten-Kinetik)
- Proteinaufreinigung
 - o Affinitätschromatographie
 - o Ionenaustauschchromatographie
 - o Gelfiltration

Chemische Methoden

- Organische Synthesen
- Analytik: Fluoreszenzspektrometrie, HPLC, Dünnschichtchromatographie (DC), DC-FID
- Vakuumdestillation
- Säulenchromatographie
- Evaluierung der synthetisierten Substrate: ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS,

4. Ergebnisse

4.1. Vorarbeiten

Expression der PAL aus *Petroselinum crispum* (*pcPAL*)

In Vorarbeiten wurde bereits die Expression der *pcPAL* in *E. coli* etabliert. Dazu sind verschiedene Expressionsstämme sowie die Coexpression von verschiedenen Chaperonen unter verschiedenen Bedingungen getestet worden. Als am besten eignete hat sich die Expression der *pcPAL* im pET22b(+)-Vektor (Novagen) durch Coexpression des Triggerfaktors aus dem Chaperon-Plasmid-Kits (pTF16) von TaKaRa in *E. coli* BL21(DE3) herausgestellt.

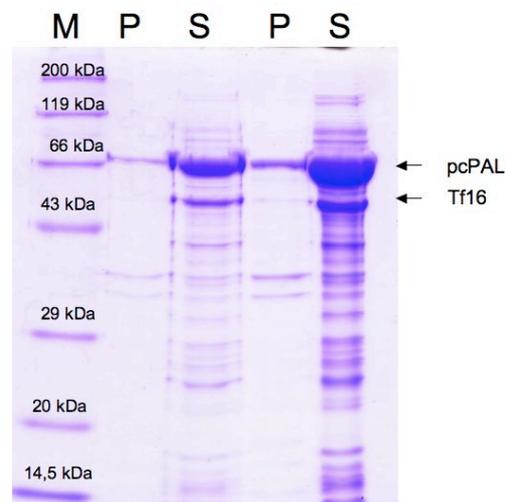


Abbildung 1: SDS-PAGE der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion. Die selben Proben wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen; Links: 15 μ l Probe entsprechend OD=1, rechts 15 μ l entsprechend OD=3.

Wie in Abbildung 1 ersichtlich lässt sich die *pcPAL* im hohen Maße überexprimieren.

4.2. Generierung von Aktivität gegenüber Phenylalanin

Entsprechend der Projektzielsetzung wurde zunächst mit der Generierung einer enzymatischen Aktivität gegenüber dem Alkoholderivat von Phenylalanin, Phenylalaninol (Phe-OI) begonnen (Abbildung 2).

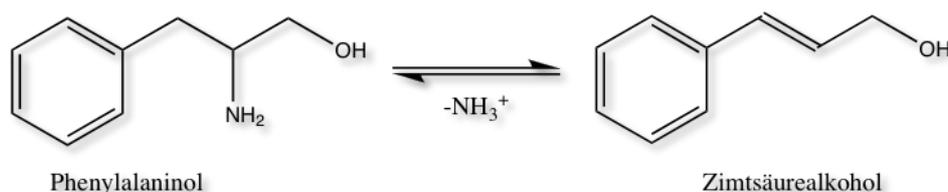


Abbildung 2: Angestrebte, von einer *pcPAL*-Variante katalysierte, nichtoxidative Deaminierung von Phenylalaninol zu Zimtsäurealkohol.

Die Reaktionsrichtung (Aminierung oder Deaminierung) liegt im Fall von Phenylalanin eindeutig auf der Seite der Zimtsäure. Durch hohe Konzentrationen von Ammoniak (4 M) kann das Gleichgewicht in die Richtung der Aminierung verschoben werden. Zur Untersuchung der Substratspezifität bietet sich hingegen die Deaminierung an.

Etablierung eines Hochdurchsatz-tauglichen Aktivitätsassays für Phenylalaninol

Aufgrund der zusätzlichen Doppelbindung des Zimtsäurealkohols im Vergleich mit Phenylalaninol, kann ein verändertes Absorptionsspektrum erwartet werden.

Unterschiedliche Absorptionsspektren konnten tatsächlich experimentell beobachtet werden. Messungen der Fluoreszenzspektren bei Anregung mit den Wellenlängen, die die höchste Absorption zeigten, konnte darüber hinaus eine starke Fluoreszenz (250nm/305nm) des Zimtsäurealkohols feststellen. Weder Zelllysate noch Phenylalaninol zeigten bei Anregung bei 250 nm eine Fluoreszenz bei 305 nm. Aufgrund der starken Fluoreszenz konnten bei Gegenwart von Zelllysate Konzentrationen von 20 μ M eindeutig nachgewiesen werden. Für die Messung von Kinetiken muss jedoch beachtet werden, dass die Fluoreszenz durch die Anregung bei 250 nm schnell nachlässt, was eine zuverlässige Aktivitätsmessung erschwert.

Für den *pcPAL*-Wildtyp (WT) konnte jedoch keine Aktivität gegenüber Phenylalaninol festgestellt werden. Daher reichen Punktmessungen der Fluoreszenz aus, um Mutanten mit Aktivität zu identifizieren. Darüber hinaus sind keine teuren UV-transparenten MTP notwendig, die für eine Absorptionsmessung bei 290 nm nötig wären und die Zelltrümmer nach dem Aufschluss stellen keine Beeinträchtigung dar. Somit kann in den Expressions-MTP direkt nach dem Aufschluss und Zentrifugation der Zelltrümmer, ohne weiteren Pipettierschritt, die Aktivität gemessen werden.

Somit steht ein sehr empfindlicher, für ein Hochdurchsatzscreening geeigneter Assay zur Messung von Aktivität gegenüber Phenylalaninol zur Verfügung.

4.3. Erstellung von Mutantenbibliotheken der *pcPAL*

Da von der *pcPAL* eine Kristallstruktur zur Verfügung stand (pdb-Code 1W27^[1]) konnten gezielte Mutantenbibliotheken mit Sättigungsmutagenese bestimmter Orte im aktiven Zentrum begonnen werden. Die Kristallstruktur zeigt ein wahrscheinlich inaktives Protein, da der Tyrosin 110-enthaltende Loop, der als essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms angesehen wird ^[2], im Gegensatz zu anderen Ammoniak-Lyasen, weit außerhalb des aktiven

Zentrums liegt. Mutationsstudien konnten zeigen, dass das Tyr110 für die katalytische Aktivität essentiell ist [3].

Aus diesem Grund wurde zunächst ein Homologiemodell der „aktiven“ Konformation der *pcPAL* erstellt. Dazu wurde die Orientierung des Tyr110-Loop der Kristallstruktur an die hoch homologe Kristallstruktur der Histidin-Ammoniak-Lyase aus *P. putida* angepasst (Abbildung 3).

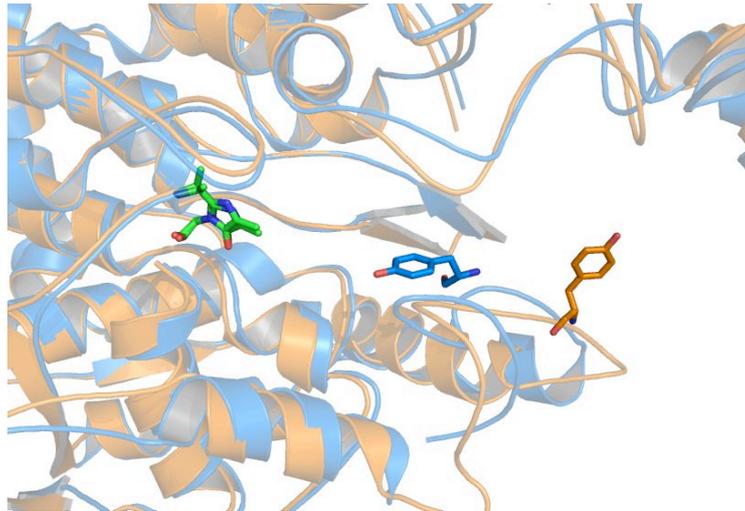


Abbildung 3: Vergleich *pcPAL*-Kristallstruktur (1W27; orange) und Homologiemodell (Blau). Die Tyrosine 110 sowie die prosthetische MIO-Gruppe (grün) sind als Sticks dargestellt.

Anschließend konnten Docking-Experimente durchgeführt werden, um die Lage des Substrates im aktiven Zentrum festzustellen (Abbildung 4).

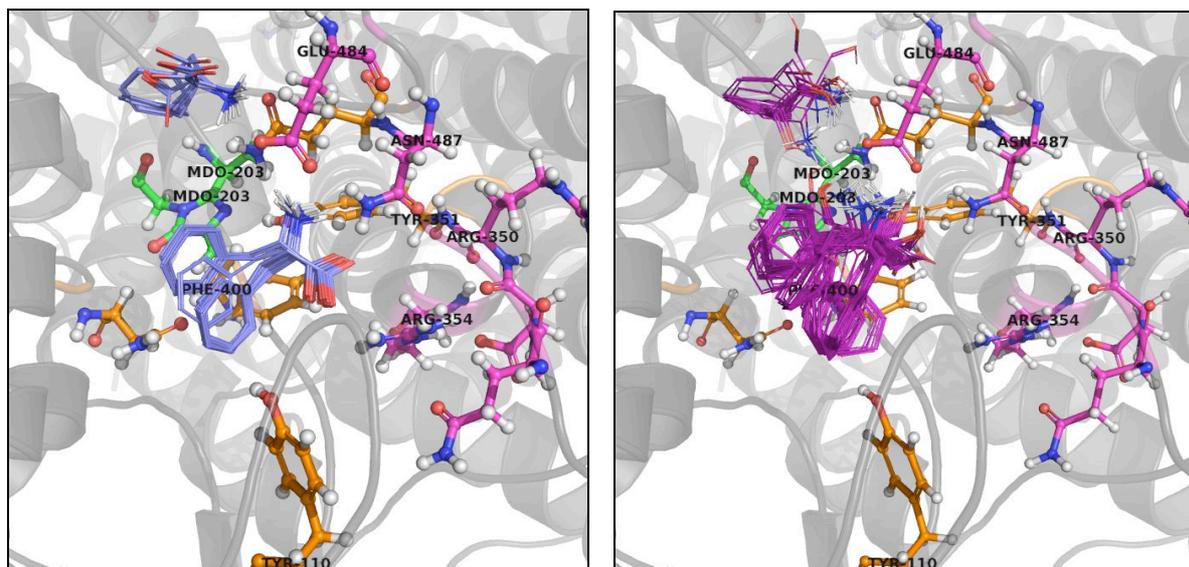


Abbildung 4: Dockingexperimente mit dem *pcPAL*-Homologiemodell und Phe (links; violett) sowie Phe-OI (rechts; magenta). Gezeigt sind die Ergebnisse von je 100 unabhängigen Docking-Experimenten.

Aus dem Docking-Experiment ging die eindeutige Position von Phenylalanin im aktiven Zentrum der *pcPAL* hervor.

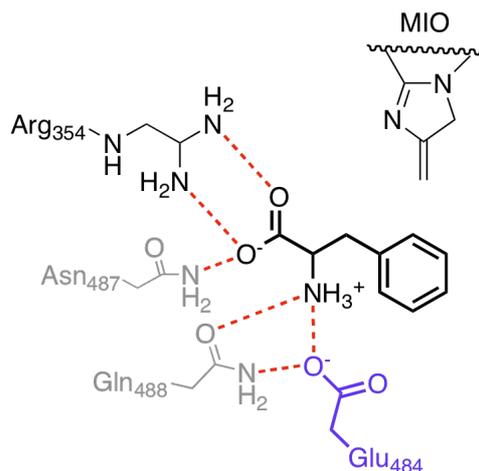


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Orientierung von Phenylalanin im aktiven Zentrum der *pcPAL*. Wasserstoffbrücken sind in Rot dargestellt.

Darüber hinaus hat das Docking-Experiment gezeigt, dass der Alkohol von Phenylalanin weniger eindeutig im aktiven Zentrum positioniert ist. Moleküldynamische Simulationen des gedockten Phenylalanins im aktiven Zentrum der *pcPAL* zeigten eine stabile Orientierung an, Phenylalaninol hingegen, bewegte sich aus dem aktiven Zentrum hinaus (Abbildung 6).

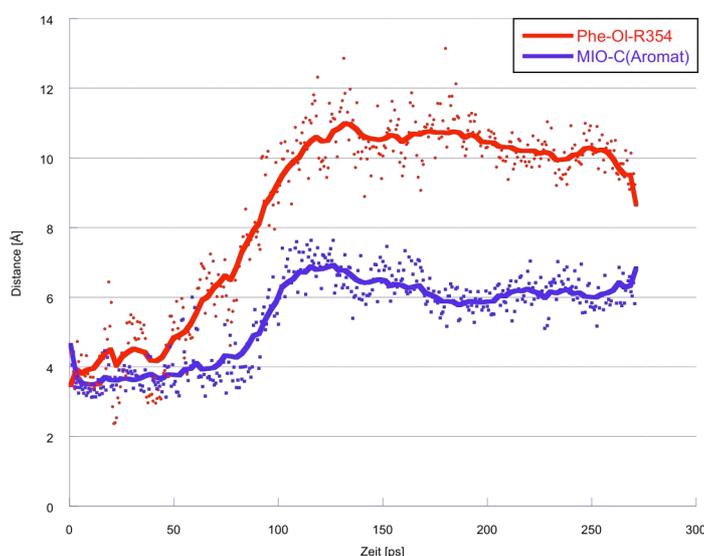


Abbildung 6: Moleküldynamische Simulation von Phenylalaninol im aktiven Zentrum der *pcPAL*. In Rot ist der Abstand der Hydroxylgruppe des Substrates zum Arginin354 über die Simulationszeit dargestellt (Punkte entsprechen dem Abstand, die Linie ist der mittlere Abstand). In Blau ist die Abstand der MIO-Gruppe zum Phenylring dargestellt.

Die stabilisierenden Wasserstoffbrücken der Carboxylgruppe des Phenylalanins können vom Alkohol nicht ausgebildet werden. Darüber hinaus ist die Hydroxylgruppe durch das zusätzliche Proton sterisch anspruchsvoller als die Carboxylgruppe.

Daher ist die Anforderung an die Enzymvarianten eine bessere Stabilisierung des alkoholischen Substrates im aktiven Zentrum der *pcPAL* zu erreichen.

Um die Aminosäuren mit dem größten Einfluss auf die Alkohol-Gruppe für eine fokussierte Mutantenbibliothek zu identifizieren, wurden *in silico* verschiedene Mutanten der *pcPAL* generiert und die Veränderung im Verhalten des Substrates bei Docking-Experimenten ausgewertet. Es wurden 20 verschiedene Einzel- und Doppel-Mutanten hergestellt. Erwartungsgemäß stellten sich die Aminosäuren Arg354 sowie Asn487/Asn488 am interessantesten heraus, jedoch ohne eindeutige Ergebnisse für ein rationales Proteindesign zu liefern.

Daher wurden zwei Mutantenbibliotheken basierend auf Sättigungsmutagenese der Orte 348/350/354 sowie 487/488 generiert. Dazu wurden Primer mit entsprechend degenerierten Codons für positionsgerichtete Mutagenese entsprechend dem QuikChange[®](QC)-Protokoll verwendet. Da es sich um recht GC-reiche Sequenzbereiche handelte, musste das Protokoll in mehreren Mutations-/Sequenzierungszyklen optimiert werden, bis die Mutantenbibliotheken die korrekten Sättigungsmutationen enthielten.

Somit lagen die Bibliotheken Bib1, mit zufälligen Mutationen der Positionen 348/350/354 sowie Bib2, mit Mutationen der Positionen 487/488 vor.

4.4. Selektion der Mutantenbibliotheken auf Phenylalaninol-Aktivität

Etablierung eines Selektionsassays gegenüber Phenylalaninol

Der Selektionsassay basiert auf der Idee, dass bei der Deaminierung von Phenylalaninol Ammoniak freigesetzt wird, welches von *E. coli* als Stickstoffquelle verwendet werden kann (Abbildung 2). Auf Minimalmedium ohne N-Quelle können somit nur Klone mit Aktivität gegenüber Phenylalaninol wachsen.

Dazu wurden ca. 50 verschiedene Kombinationen und Konzentrationen von Phenylalaninol, Antibiotika, Spurenelementen und Induktoren auf Hintergrundwachstum (Negativ-Kontrollen) und Wachstum (Positivkontrollen) getestet. Darüber hinaus wurde sowohl die Toxizität des Substrates und Produktes untersucht.

Selektion nach Phenylalaninol-Aktivität

Die Ergebnisse der Kontrollen waren nach der Optimierung der Methode vielversprechend, daher wurden die Bibliotheken zunächst mit Hilfe des Selektionsassays nach Phenylalaninol-Aktivität durchmustert (Abbildung 7).

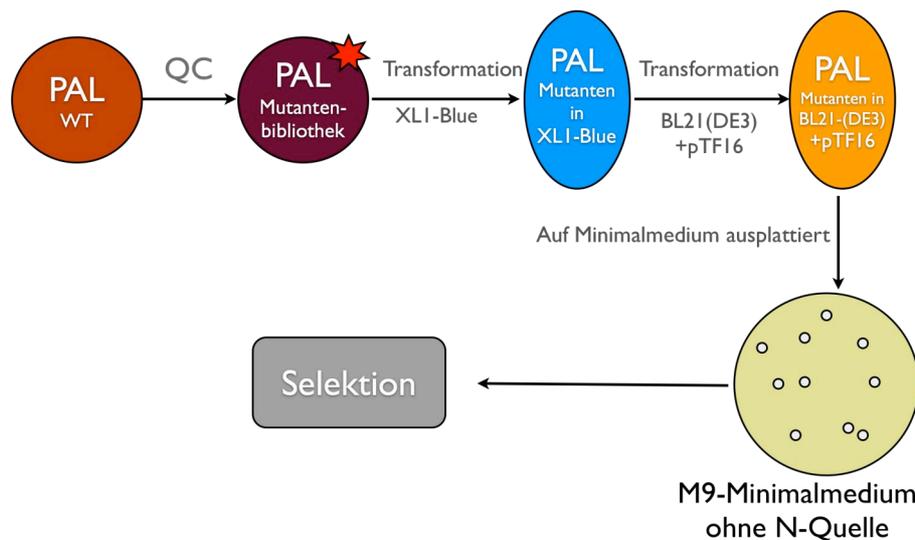


Abbildung 7: Vorgehensweise bei der Selektion nach Phenylalaninolyse-Aktivität. QC bezeichnet die positionsgerichtete Sättigungsmutagenese nach dem QuikChange®-Protokoll.

Von den beiden Mutantenbibliotheken konnten ca. 200 Klone von den Minimalmediums-Platten gepickt werden. Allerdings war die Sequenzanalyse wie auch erneutes Ausstreichen auf Minimalmediumsplatten und Anreicherungskulturen in flüssigem Medium nicht erfolgreich. In Expressionsexperimenten zeigte nur ein Klon, von zehn getesteten, überhaupt eine Überexpression der *pcPAL*, es konnte jedoch keine Aktivität festgestellt werden. Daher wurden die 200 Klone in Mikrotiterplatten (MTP) überführt und zur Proteinexpression kultiviert. Nach der Zellyse wurde die Aktivität der Klone gegenüber Phenylalaninolyse getestet, ohne Erfolg.

Daher ist anzunehmen, dass es sich bei den Klonen hauptsächlich um falsch-positive Klone handelt. Daher wurde die Methode der Selektion verworfen. Aufgrund der relativ kleinen Größe der Mutantenbibliotheken (ca. 5000 verschiedene Mutanten pro Bibliothek) ist ebenfalls die Durchmusterung in MTP möglich.

4.5. Durchmusterung der Mutantenbibliotheken in MTP

Da sich die Selektion nicht als effektive Methode zur Identifizierung aktiver Klone herausgestellt hat, wurde mit der Durchmusterung der Bibliotheken begonnen (Abbildung 8). Dazu wurden die Mutantenbibliotheken auf Agarplatten ausgestrichen und mit einem Pickroboter in MTP übertragen. Um die Anzahl der angewachsenen Klone und die Position leerer Wells zu bestimmen, wurde die optische Dichte der einzelnen Wells gemessen. Darüber hinaus erwies es sich als notwendig, falsch-positive Messwerte des Fluoreszenz-Assays (s.o.) zu verhindern. Da bei der Anregungswellenlänge von 250 nm sowohl Proteine als auch DNA absorbieren,

führen leere Wells bei der Auswertung der Fluoreszenzmessungen zu einem stärkeren Hintergrund, der zu falsch-positiven Messwerten führen kann. Daher wurden die leeren Wells nicht in die Auswertung mit aufgenommen. Von den Masterplatten wurden die Expressionsplatten angeimpft, in denen die Proteinexpression induziert wurde. Die Proteinexpression wurde mehrfach durch SDS-PAGE überprüft. Nach erfolgter Expression wurden die Zellen in den MTP aufgeschlossen. Zum Zellaufschluss wurde Lysozym verwendet um die Zellwand zu zerstören. Der eigentliche Aufschluss wurde durch einen Gefrier-Auftau-Zyklus oder kurze Inkubation im Ultraschallbad erreicht. Es wurden verschiedene Aufschlussmethoden getestet, wobei der Ultraschall-Aufschluss der schnellste und mit dem Gefrier-Auftau-Zyklus auch effizienteste war. Die aufgeschlossenen Expressions-MTP wurden dann 30 min. bei 30°C mit dem Substrat Phenylalaninol inkubiert und die Fluoreszenz gemessen.

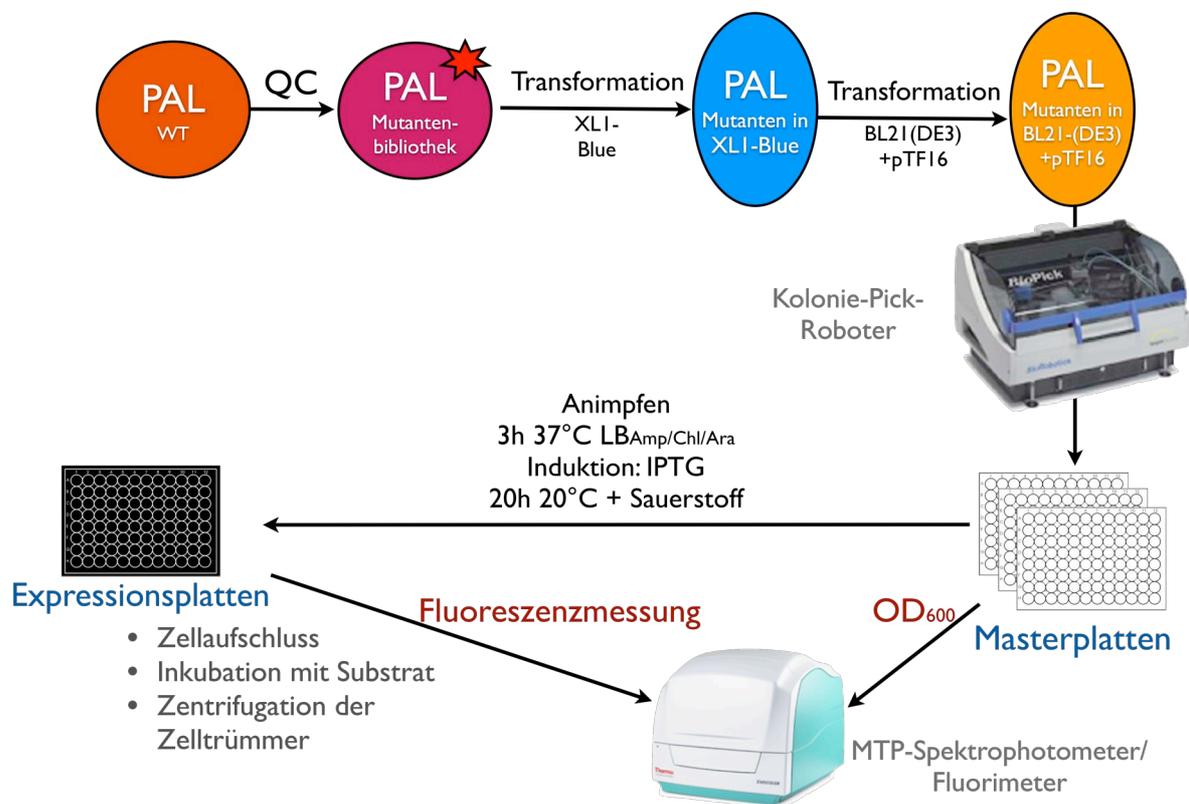


Abbildung 8: Vorgehensweise zur Durchmusterung der Mutantenbibliotheken nach Aktivität gegenüber Phenylalaninol.

Auf diese Weise wurden 1762 Klone der Bibliothek 1 mit Mutationen der Aminosäuren 348, 350 und 354 und 1078 Klone der Bibliothek 2 mit Mutationen der Positionen 487 und 488 durchmustert. Die 94 vielversprechendsten Klone wurden in einer weiteren MTP zusammengefasst und erneut auf Aktivität getestet. Um größere Proteinmengen zu erreichen wurden diesmal MTP einem größeren Volumen (1 ml/Well) verwendet. Jedoch stellte sich keiner der Klone als aktiv heraus.

4.6. Konzept des stabilisierten Substrates und rationales Proteindesign

Die moleküldynamische Simulation von Phenylalaninol im aktiven Zentrum der *pcPAL* (Abbildung 6) demonstrierte die fehlende Stabilisierung des Substrates. Die notwendige Stabilisierung des Substrates konnte durch fokussierte gerichtete Evolution der Aminosäuren 348, 350, 354 sowie 487, 488 nicht hergestellt werden. Somit musste nach alternativen Strategien zur Stabilisierung des Substrates gesucht werden.

Das Problem bei der Verwendung von Phenylalaninol ist, dass das Substrat nur mit der Aminogruppe im aktiven Zentrum gebunden werden kann. Der unpolare Phenylring liegt frei in einer unpolaren Tasche und trägt nicht wesentlich zur Positionierung des Substrates bei.

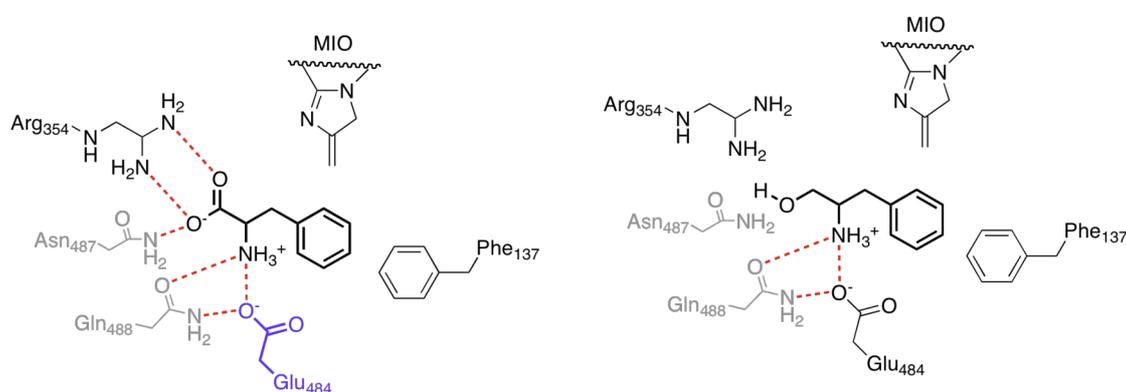


Abbildung 9: Vergleich der Stabilisierung von Phenylalanin und Phenylalaninol im aktiven Zentrum der *pcPAL*.

Eine Möglichkeit zur genaueren Positionierung des Phenylrings wird in Tyrosin-Ammoniak-Lyasen (TAL) beobachtet. Dort wird die *p*-Hydroxylgruppe des Tyrosins über eine Wasserstoffbrücke zu einem Histidin-Seitenrest stabilisiert.

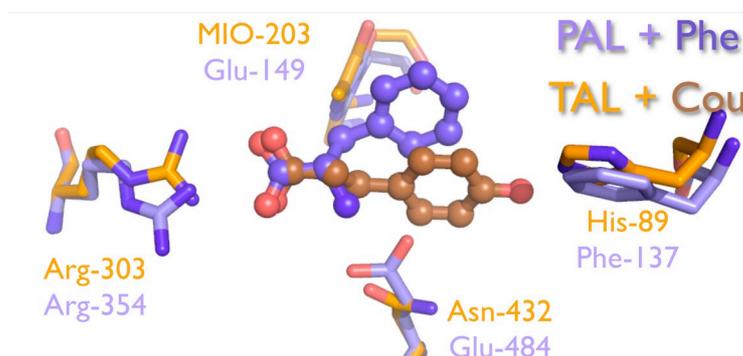


Abbildung 10: Alignment der *pcPAL* mit der Tyrosin-Ammoniak-Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides* (*rsTAL*). In Blau sind die Aminosäuren der *pcPAL* mit gedocktem Phenylalanin und in Orange die der *rsTAL* mit gedocktem Tyrosin dargestellt.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass durch Austausch des Phe137 zu einem Histidin die Aktivität der *pcPAL* gegenüber Tyrosin steigt.^[4]

Moleküldynamische Simulationen bestätigten, dass Tyrosinol in der Phe137His-*pcPAL*-Mutante stabil im aktiven Zentrum liegt. Daher wurde durch positionsgerichtete Mutagenese die Mutation Phe137His eingefügt und Mutante exprimiert.

Die Mutante *pcPAL*-Phe137His zeigte aufgrund eines wesentlich niedrigeren K_M -Wertes gegenüber Tyrosin im Vergleich mit dem WT ein um den Faktor fünf gesteigertes k_{cat}/K_M -Verhältnis (Tabelle 1). Die Aktivität gegenüber Phenylalanin nahm dagegen signifikant ab.

Tabelle 1: Messung der Aktivität des *pcPAL*-WT und der Phe137His Mutante gegenüber verschiedenen Substraten.

Enzym	Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1} M^{-1}$]
<i>pcPAL</i> WT		$0,054 \pm 0,01$	31 ± 3	568 000
<i>pcPAL</i> Phe137His	L-Phe	$5,2 \pm 0,6$	$21 \pm 0,2$	4 000
<i>pcPAL</i> WT		$2,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	754
<i>pcPAL</i> Phe137His	L-Tyr	$0,26 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,02$	3 600
<i>pcPAL</i> WT		n.b.	$< 0,01^{[a]}$	-
<i>pcPAL</i> Phe137His	L-Tyr-Ol	n.b.	$0,1 \pm 0,04^{[a]}$	-

[a] Aktivitätsmessung mit 10 mM Substrat unter der Annahme von Sättigungsbedingungen; n.d.: nicht detektierbar.

Wie in der moleküldynamischen Simulation erwartet zeigte die Phe137His-Mutante Aktivität gegenüber L-Tyrosinol. Diese war gering, aber im Gegensatz zum WT deutlich messbar.

Dieses Ergebnis unterstützt das Konzept, dass Phenylalaninol aufgrund mangelnder Stabilisierung im aktiven Zentrum nicht umgesetzt werden konnte, Tyrosinol hingegen durch die Wasserstoffbrücke zum Histidin der Phe137His-Mutante schon.

4.7. Tyrosin-Ammoniak-Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides*

Das durch die Mutation Phe137His der *pcPAL* eingeführte Histidin ist in echten Tyrosin-Ammoniak-Lyasen (TAL) natürlicher Weise vorhanden. Es war davon auszugehen, dass eine TAL wesentlich höhere Aktivitäten gegenüber Tyrosinol aufweist, da das Substrat dem natürlichen Substrat dieser Enzyme eher ähnelt.

Da kein Zugang zu TAL-kodierenden Enzymen bestand, wurde ein synthetisches Gen der *Rhodobacter sphaeroides* TAL (*rsTAL*) mit optimierter Codon-usage im Expressionsvektor pET22b(+) in Auftrag gegeben.

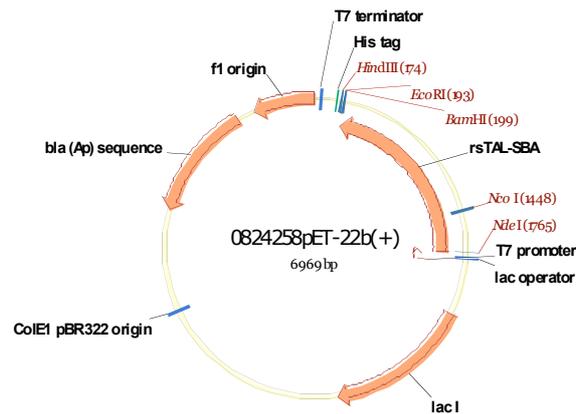


Abbildung 11: Plasmidkarte des pET22b(+) Expressionsvektors mit dem synthetischen Gen der *rsTAL*.

Aktive Expression des synthetischen Genes

Der pET22b(+) Vektor mit dem Gen der *rsTAL* wurde nach dem selben Protokoll exprimiert, das für die *pcPAL* erfolgreich war. Zunächst konnte zwar auf SDS-PAGE eine deutliche Überexpression des Enzyms festgestellt werden, allerdings ohne jede Aktivität. Unterschiedliche Optimierungsversuche mit der Coexpression unterschiedlicher Chaperone und die Verwendung unterschiedlicher Expressionsstämme führten zunächst nicht zum Erfolg.

Eine genauere Sequenzanalyse zeigte, dass in dem für das synthetische Gen verwendeten Aminosäuresequenz zwei der drei Aminosäuren, die die katalytische MIO-Gruppe bilden, fehlten. Diese konnten durch positionsgerichtete Mutagenese eingeführt werden, dass zur aktiven Expression der *rsTAL* führte.

Optimierung der Proteinexpression

Um die aktive Expression der *rsTAL* zu optimieren wurden zunächst die Coexpression unterschiedlicher Chaperone in BL21(DE3) getestet.

Tabelle 2: *rsTAL*-Expression mit Coexpression verschiedener Chaperon-Systeme des TaKaRa-Chaperon-Plasmid-Kits.

Enzym	Chaperon		Spezifische Aktivität [U/mg Gesamtprotein]
	Plasmid	Enzym	
<i>rsTAL</i>	-	ohne	0,0699
	pTF-16	Triggerfaktor	0,2077
	pGro7	GroEL/ES	0,2757
	pG-Tf2	GroEL/ES Trig	0,1603
	pG-KJE8	dnaK dnaJ grpE GroEL/ES	0,0521
	pKJE7	dnaK dnaJ grpE	< 0,01

Aus Tabelle 2 geht hervor, dass die Coexpression des pGro7-Chaperon-Plasmids aus dem TaKaRa-Chaperone-Plasmid Kit zur höchsten proteinbezogenen (spezifischen) Aktivität führte.

In SDS-PAGE Analysen konnte jedoch die Expression der *rsTAL* aufgrund der ähnlichen Größe nicht vom GroEL/ES-System unterschieden werden. Dies ist besonders bei nachfolgenden Proteinaufreinigungen problematisch, da so mögliche Verunreinigungen durch das Chaperon-System nicht festgestellt werden können (Abbildung 12). Daher wurde die Coexpression des Triggerfaktors auf dem pTF16-Plasmid beibehalten.

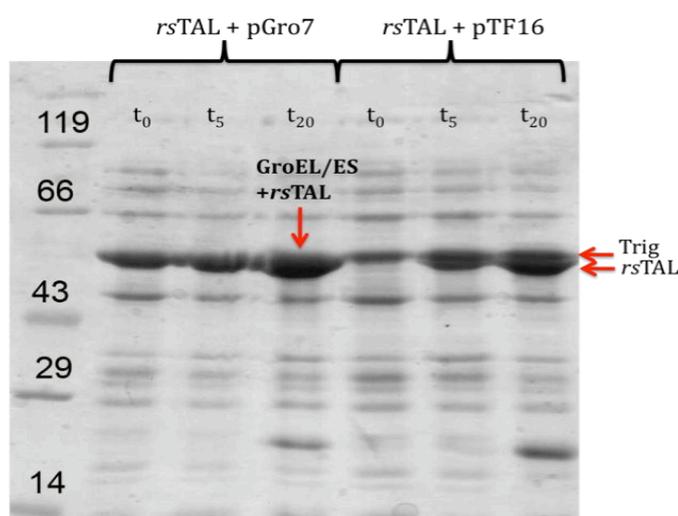


Abbildung 12: SDS-PAGE der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss. Die Banden des GroEL/ES-Systems und der *rsTAL* sind überlagert. Der Triggerfaktor kann jedoch deutlich vom der *rsTAL* unterschieden werden.

Als weiterer Parameter wurde der Einfluss der Expressionstemperatur untersucht (Tabelle 3). Bisher wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 die Chaperon-Vorexpression bei 37°C durchgeführt und anschließend mit IPTG (1 mM) die *rsTAL*-Expression bei 20°C für 20 h induziert. Um die ideale Expressionstemperatur herauszufinden wurde parallel bei 20°C, 30°C und 37°C nach IPTG-Induktion kultiviert und die Aktivität im Zellextrakt nach 20 h gemessen, mit dem Resultat, dass nicht nur der Proteingehalt bei 20°C am höchsten war, sondern auch die proteinbezogene Aktivität (spezifische Aktivität).

Tabelle 3: Vergleich der Proteinexpression bei verschiedenen Expressionstemperaturen.

Kultivierungstemperatur	Proteingehalt [mg/ml]	spezifische Aktivität [U/mg Gesamtprotein]
20°C	5,08	0,22
30°C	2,34	0,13
37°C	1,08	0,016

4.8. Neues Konzept des Reaktionsmechanismus

Grundlagen

Zur Zeit werden in der Literatur zwei unterschiedliche Mechanismen für aromatische Ammoniak-Lyasen und Mutasen diskutiert. [5]

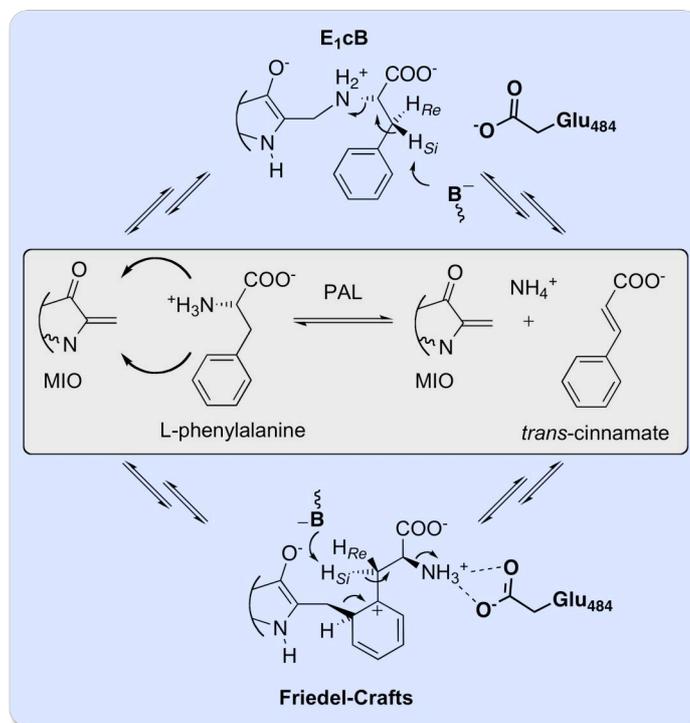


Abbildung 13: Ausschnitte möglicher Mechanismen der nicht oxidativen Deaminierung aromatischer Ammoniak-Lyasen unter Verwendung der aus einem Tripeptid autokatalytisch gebildeten MIO-Gruppe. Oben: Eliminierungsmechanismus (E₁cB), unten Friedel-Crafts ähnlicher Mechanismus.

Beide Mechanismen haben theoretische Nachteile. So ist bei der Eliminierungsreaktion unbekannt, wie das H_{Si}-Proton des Substrates nach dem elektrophilen Angriff der prothetischen MIO-Gruppe mit einem pK_a von < 40 von einer enzymatischen Base abstrahiert werden kann. Bei dem Friedel-Crafts-Mechanismus geht zumindest Übergangsweise die Aromatizität des Phenylrings verloren, was energetisch nachteilig ist. [5] Beide Mechanismen werden durch einige indirekte Experimente unterstützt. Der Friedel-Crafts-Mechanismus konnte mit einem chemischen Modell imitiert werden. [6] Darüber hinaus wurde die höhere Aktivität der *pc*PAL gegenüber *m*-Tyrosin im Vergleich mit Phenylalanin durch die Stabilisierung des Übergangszustandes während der Friedel-Crafts-Reaktion begründet (Abbildung 14). [7]

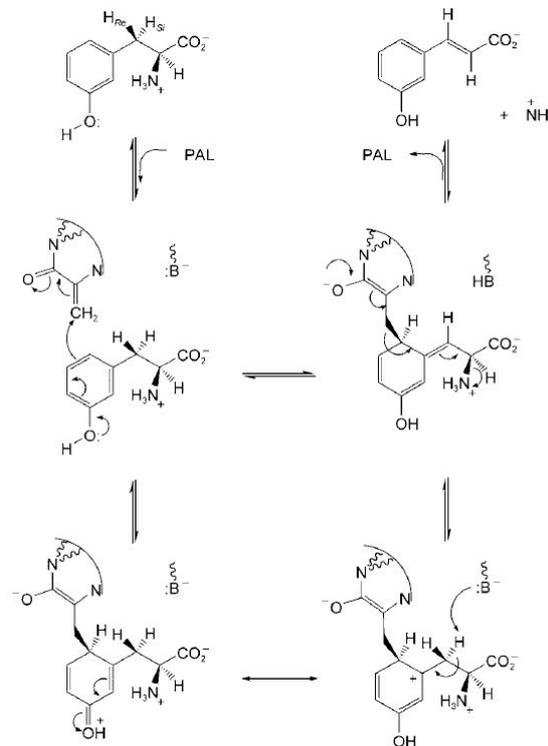


Abbildung 14: Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Friedel-Crafts-Reaktion. Durch das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs kann die positive Ladung des Phenylrings kompensiert werden.^[7]

Der Friedel-Crafts-Mechanismus scheint daher für die PAL der zur Zeit in der Literatur bevorzugte Mechanismus zu sein. Dennoch wurde eine Kristallstruktur einer Tyrosin-Ammoniak-Mutase (TAM) mit gebundenem Inhibitorsubstrat gelöst, bei der die MIO-Gruppe eindeutig kovalent an die Aminogruppe des Substrates gebunden war.^[8]

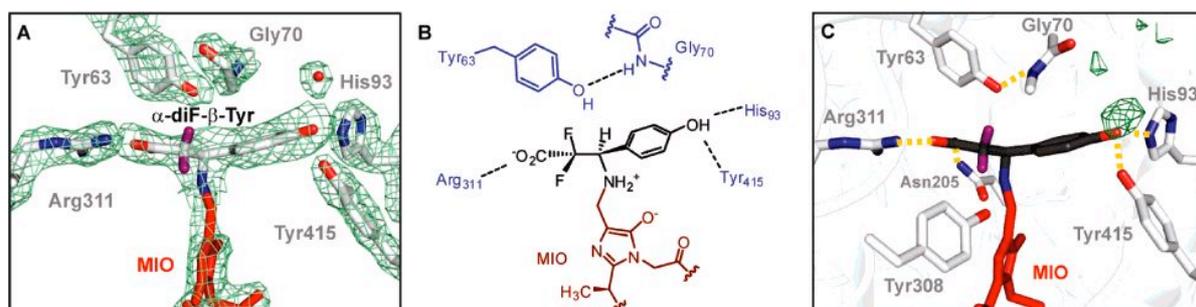


Abbildung 15: Abbildung aus^[8]. Dargestellt ist die Kristallstruktur der TAM mit kovalent gebundenem Inhibitorsubstrat.

Dies sind nur wenige Beispiele einer seit vielen Jahren andauernden Diskussion über den Mechanismus der aromatischen Ammoniak-Lyasen und Mutasen.

Eine genauere Kenntnis des Mechanismus der Ammoniak-Lyasen ist vor allem im Hinblick auf rationales Proteindesign zur Generierung bisher nicht vorhandener Aktivitäten hilfreich. Aus diesem Grund wurde an einem besseren Verständnis des Mechanismus gearbeitet.

Konzept

Bei dem Alignment der *rsTAL* mit der *pcPAL* (Abbildung 10) wird neben dem Unterschied des Restes Phe137 ebenfalls ein Unterschied an der Position Glu484 ersichtlich. In TAL- und TAM-Enzymen ist an der entsprechenden Stelle stets ein Asparagin. Dies war zunächst verwunderlich, wurde das Glutamat doch als der Rest angesehen, der das abstrahierte Ammonium aufnahm.

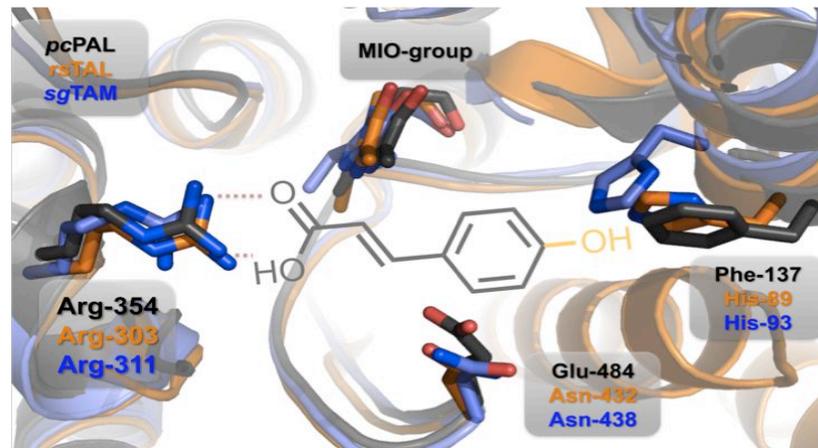


Abbildung 16: Alignment der aktiven Zentren der *pcPAL* (schwarz), *rsTAL* (orange) und *sgTAM* (blue). Die Orientierung des Substrates wurde mit Linien eingezeichnet.

b)

		484 (<i>pcPAL</i>)
PAL <i>Petroselinum crispum</i>	(460)	QFLANPVTNHVQSAE QH NQDVNSLGLISSRKTSEAVEILKL
PAL <i>Arabidopsis thaliana</i>	(451)	QFLANPVTNHVQSAE QH NQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKL
PAL <i>Musa acuminata</i>	(456)	QFLANPVTNHVQSAE QH NQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKL
PAL <i>Pellia epiphylla</i>	(450)	QYLANPVTTHVQSAE QH NQDVNSLGLIAARKTAEAVEILKL
PAL <i>Robinia pseudoacacia</i>	(463)	QYLANPVTTHVQSAE QH NQDVNSLGLISSRKTNEAIEILKL
PAL <i>Pinus pinaster</i>	(463)	LYLANPVTTHVQSAE QH NQDVNSLGLGSARKSAEAIDILKL
PAL <i>Lycopersicon esculentum</i>	(448)	QFLANPVTNHVQSAE QH NQDVNSLGLISARKTAKAVDILKI
PAM <i>Taxus canadensis</i>	(431)	QYLANPVTTHV SAE QH Q NQDVNSLGLISARKTEEALDILKL
TAL <i>Saccharothrix espanaensis</i>	(391)	RO L VFPASLTTLPT NG W N QDVHVPMA NG ANSVFEAL EL GW L
TAL <i>Rhodobacter Sphaeroides</i>	(407)	RATGPASIH S IST N AA N QDVVSLG T AAAR L CREKIDRWAE
TAM <i>Actinomadura madurae</i>	(414)	RTIGPASTQ S IP S NG DN Q IV S MGL I GARNARRV L NNH T
TAM <i>Streptomyces globisporus</i>	(402)	RTIGPASTQ S V S P S NG DN Q DVV S MGL I SARNARRV L SNN K
TAM <i>Chondromyces crocatus</i>	(403)	LD L AA P SS I KS L PS N GS N Q D VV S MG T T S ARK S L R LC E NV G T

Abbildung 17: Sequenzvergleich der bekannten PAL-, PAM-, TAL- und TAM-Enzyme. Schwarz: konservierte Aminosäuren; grau: homologe und ähnliche Aminosäuren; Aminosäure 484 (*pcPAL*) ist gelb hervorgehoben und durch einen Pfeil markiert.

Die Tatsache, dass in PAL- und PAM-Enzymen stets ein Glutamat und in TAL- und TAM-Enzymen stets ein Asparagin (Asn, N) vorhanden ist, kann durch zwei Hypothesen begründet werden:

1. Tyrosin kann aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe am Phenylring im aktiven Zentrum stabilisiert werden, Phenylalanin hingegen muss neben der Carboxylgruppe durch eine weitere Wasserstoffbrücke im aktiven Zentrum positioniert werden, der vom Glutamat zur Aminogruppe.

2. Hypothese 1 führt direkt zu der Folgerung, dass bei der Gegenwart des Glutamats nur der Friedel-Crafts-Mechanismus funktionieren kann. Ist ein Asparagin an der entsprechenden Position, wird die Aminogruppe des Substrates nicht fest über Wasserstoffbrücken gebunden und kann zur MIO-Gruppe zeigen. Somit entscheidet eine Aminosäure im aktiven Zentrum nach welchem Mechanismus die katalysierte Reaktion abläuft.

Beide Hypothesen konnten in molekulardynamischen Simulationen bestätigt werden. Die bessere Stabilisierung des Substrates durch die zusätzliche Hydroxylgruppe wurde bereits beschrieben. Für den Effekt des Glutamats 484 (E484) wurden verschiedene Simulationen mit der *pcPAL* und der *rsTAL* und den entsprechenden E \leftrightarrow N (PAL) oder N \leftrightarrow E (TAL) Mutanten *in silico* durchgeführt (Abbildung 18).

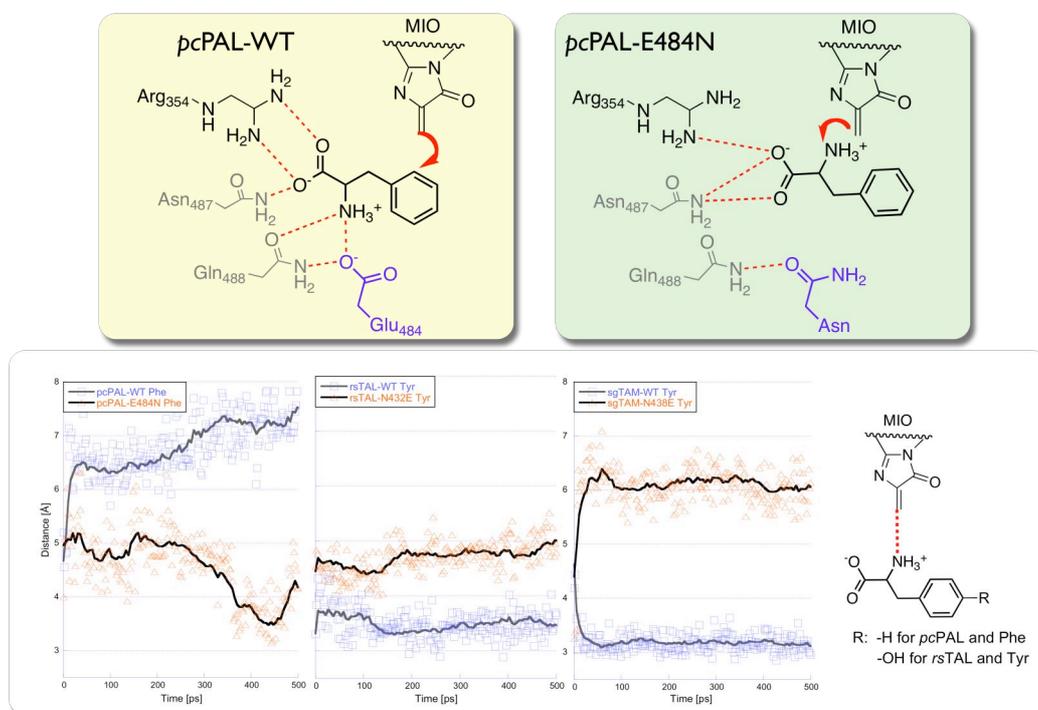


Abbildung 18: oben) Schematische Darstellung der aktiven Zentren des *pcPAL*-WT und der Glu484Asn-Mutante mit gedocktem Substrat. Mit roten Pfeilen ist der vermutete Mechanismus angedeutet. unten) 500 ps Simulationen der *rsTAL* und *pcPAL*. Simuliert wurde jeweils der WT und die Mutante N \rightarrow E oder E \rightarrow N. Dargestellt sind die Abstände der MIO-Gruppe zur Aminogruppe oder zum Phenyrling (s. unten rechts).

Die Simulationen zeigten, dass ein Glutamat an der Position 484 (*pcPAL*) die Aminogruppe des Substrates anzieht, so dass diese von der MIO-Gruppe wegzeigt, was nicht zu einem Angriff der MIO-Gruppe auf die Aminogruppe führen kann. Ist hingegen ein Asparagin an der entsprechenden Stelle, so bildet sich keine Wasserstoffbrücke aus und die Aminogruppe zeigt stets zur MIO-Gruppe, was einen elektrophilen Angriff auf die Aminogruppe des Substrates ermöglicht (Abbildung 19).

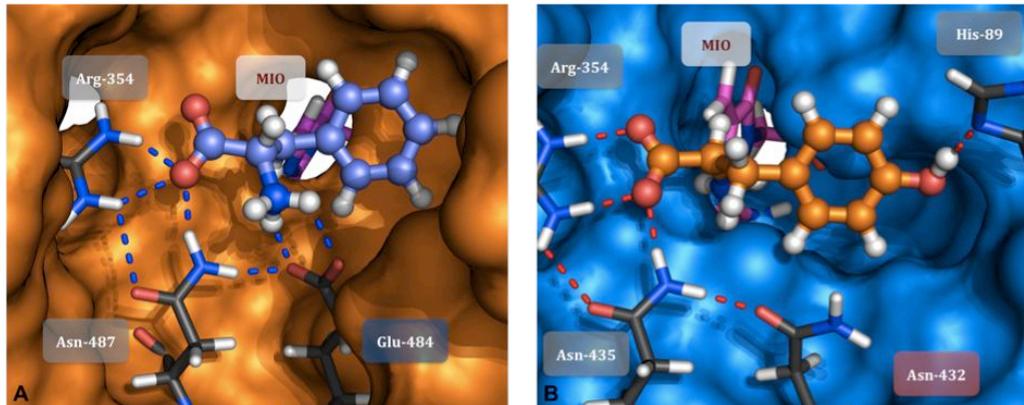


Abbildung 19: Vergleich der aktiven Zentren der *pcPAL* (links) und der *rsTAL* (rechts) mit gedocktem Substrat (Phenylalanin links; Tyrosin rechts) nach 500 ps moleküldynamischer Simulation. Mögliche Wasserstoffbrücken wurden mit gestrichelten Linien dargestellt. Das Glu484 der *pcPAL* bindet die Aminogruppe des Phenylalanins (links) wohingegen das Asn432 der *rsTAL* keinen Einfluss auf die Aminogruppe des Tyrosins nimmt, welches zur MIO-Gruppe zeigt.

Experimentelle Ergebnisse

Experimentell lässt sich die Hypothese durch Verwendung von *m*-Tyrosin im Vergleich mit Phenylalanin nachweisen (Abbildung 14). Sollte die Glu484Asn-Mutante *m*-Tyrosin schlechter umsetzen als Phenylalanin so würde dies zeigen, dass die elektronischen Effekte, die *m*-Tyrosin zu einem besseren Substrat machen, weggefallen sind. Nur der Friedel-Crafts-Mechanismus profitiert von den elektronischen Effekten der *m*-Hydroxylgruppe von *m*-Tyrosin.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde zunächst durch positionsgerichtete Mutagenese ein His₆-Tag am C-Terminus der *pcPAL* angefügt, damit das Protein leichter aufzureinigen ist. Dies war notwendig, nachdem sich Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration als unzureichend und zu aufwändig erwiesen hatten. Die Aufreinigung ist notwendig, um die kinetischen Parameter des Enzyms zuverlässig bestimmen zu können.

Tabelle 4: Vergleich der kinetischen Konstanten des *pcPAL*-WT und der Glu484Asn Mutante gegenüber L-Phenylalanin und *m*-Tyrosin.

Enzym	Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1} M^{-1}$]
<i>pcPAL</i> WT	L-Phe	0,054±0,01	31±3	568 000
<i>pcPAL</i> Glu484Asn		0,75±0,08	13±1	16 700
<i>pcPAL</i> WT	L- <i>m</i> -Tyr	0,10±0,01	24±1	246 000
<i>pcPAL</i> Glu484Asn		0,32±0,03	1,7±0,2	5 410

Die für den *pcPAL*-WT und die Glu484Asn-Mutante gemessenen kinetischen Konstanten zeigten eine signifikant verminderte Aktivität gegenüber *m*-Tyr verglichen mit Phe (7,6-fach niedrigerer k_{cat}), während die WT-Aktivitäten gegenüber den beiden Substraten ähnlich waren (Tabelle 4). Dies zeigt eindeutig, dass die vorteilhaften elektronischen Effekte des *m*-Tyr, die den Friedel-Crafts-Mechanismus unterstützen, nicht für die Glu484Asn-Mutante Anwendung

finden, was die Hypothese eines Mechanismus-Wechsels unterstützt. Darüber hinaus zeigte die Glu484Asn-Mutante gegenüber Phenylalanin einen wesentlich erhöhten K_M -Wert (14x höher). Der K_M -Wert drückt die Stabilität des Substrat-Enzym-Komplexes aus. Das Ergebnis zeigt somit, dass durch die fehlende Wasserstoffbrücke des Glutamates das Substrat wesentlich schlechter im aktiven Zentrum des Enzyms stabilisiert wird.

Dies wirft allerdings die Frage auf, weshalb die Natur zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen nutzen sollte, um das selbe Ziel zu erreichen und weshalb unterschiedliche Aminosäuren an der selben Position konserviert sein sollten, in Abhängigkeit des bevorzugt ungesetzten Substrates. Um die molekularen Gründe dafür herauszufinden, wurden die Faktoren für die Substratstabilisierung im aktiven Zentrum betrachtet: während Tyrosin in TAL/TAM durch Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxylgruppe des Tyr und Arg303 (in *rsTAL*) und zwischen der Substrat *p*-OH-Gruppe und His89 (*rsTAL*) orientiert wird, fehlt die *p*-OH-Gruppe bei PAL/PAM (vgl. Abbildung 9 und Kap. 4.6). Dies bestätigt die Annahme, dass mindestens zwei unabhängige Wasserstoffbrücken für eine korrekte Substratorientierung und -stabilisierung im aktiven Zentrum der PAL/PAM notwendig sind. Durch Verwendung von Phenylalaninol entfällt bekanntlich die Wasserstoffbrücke zwischen Arg354 und der Carboxylgruppe des Substrates (Abbildung 9). Die Unterstützung durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke unter Verwendung der bereits beschriebenen *pcPAL*-Mutante Phe137His und Tyrosinol (Tyr-Ol) als Substrat führte hingegen zu messbarer Aktivität (Tabelle 5 und Kap. 4.6).

Tabelle 5: Vergleich der kinetischen Konstanten des *pcPAL*-WT, der Mutanten und *rsTAL* gegenüber L-Phe und L-Tyr und L-Tyr-Ol.

Enzym	Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1} M^{-1}$]
<i>pcPAL</i> WT		$0,054 \pm 0,01$	31 ± 3	568 000
<i>pcPAL</i> Glu484Asn	L-Phe	$0,75 \pm 0,08$	13 ± 1	16 700
<i>pcPAL</i> Phe137His		$5,2 \pm 0,6$	$21 \pm 0,2$	4 000
<i>rsTAL</i>		$2,7 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,02$	226
<i>pcPAL</i> WT		$2,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	754
<i>pcPAL</i> Glu484Asn	L-Tyr	$0,20 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,02$	3 200
<i>pcPAL</i> Phe137His		$0,26 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,02$	3 600
<i>rsTAL</i>		$0,10 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,1$	10 000
<i>pcPAL</i> WT			$< 0,01^{[a]}$	
<i>pcPAL</i> Phe137His	L-Tyr-Ol	n. d.	$0,11 \pm 0,04^{[a]}$	n. d.
<i>rsTAL</i>			$0,12 \pm 0,04^{[a]}$	

[a] Aktivitätsmessung mit 10 mM Substrat unter der Annahme von Sättigungsbedingungen; n.d.: nicht detektierbar.

Aus Tabelle 5 geht hervor, dass die Glu484Asn-Mutante der *pcPAL* einen gegenüber dem WT gesteigerten k_{cat}/K_M Wert mit Tyr als Substrat aufweist. Daher wurde erwartet, dass die Kombination der Glu484Asn und der Phe137His-Mutante aus der *pcPAL* ein noch TAL-ähnlicheres Enzym generieren würde. Lieder wies die Doppelmutante *pcPAL*-Phe137His-Glu484Asn keinerlei messbare Aktivität auf. Auch die *rsTAL*-Asn432Glu erwies sich als inaktiv, was darauf hindeutet das TAL und PAL sich in mehr als nur den Aminosäuren 137 und 484 (*pcPAL*) unterscheiden.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann der seit vielen Jahren kontrovers diskutierte Mechanismus der PAL/PAM- und TAL/TAM-Enzyme durch die Beobachtung erklärt werden, dass das Glu484 (*pcPAL*) einen Angriff der MIO-Gruppe auf die Aminogruppe des Substrates verhindert, was den Friedel-Crafts-Mechanismus unterstützt, im Gegensatz zu TAL/TAM Enzymen (Abbildung 20). Diese Beobachtung, die einer „mechanistischen Promiskuität“ entspricht – bei der unterschiedliche Reaktionsmechanismen zum selben Produkt führen können – beantwortet die Frage, warum sowohl der E_{1cB} - wie auch der Friedel-Crafts-Mechanismus in der Literatur bisher favorisiert wurden. Hiermit konnten nun die Unterschiede der Substratspezifitäten zwischen PAL/PAM und TAL/TAM durch Untersuchungen der Substratorientierung und -stabilisierung dadurch erklärt werden, dass mindesten zwei Wasserstoffbrücken notwendig sind. Zusätzlich eröffnet die beobachtete Aktivität der Phe137His-Mutante der *pcPAL* und des *rsTAL*-WT gegenüber Tyr-Ol die Möglichkeit, diese optisch reinen Substanzen herzustellen, falls die umgekehrte Reaktion von den entsprechenden α/β -ungesättigten Alkoholen durchgeführt wird.

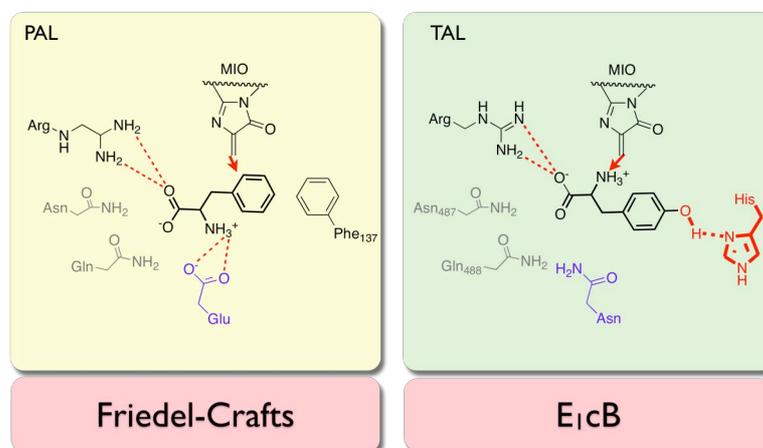


Abbildung 20: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus der TAL und PAL Enzyme. links) Vorhergesagter Friedel-Crafts Mechanismus in Phenylalanin-umsetzenden Enzymen. rechts) Darstellung des Eliminierungsmechanismus (E_{1cB}). Wasserstoffbrücken sind mit gestrichelten, roten Linien dargestellt, der Ort des elektrophilen Angriffes mit einem roten Pfeil.

4.9. Mutantenbibliotheken *pcPAL*-Arg354-NNK und *rsTAL*-Arg303-NNK

Da die *pcPAL* und die *rsTAL* zum Teil unterschiedlich auf Mutationen im aktiven Zentrum reagieren, wurden im Folgenden Mutantenbibliotheken stets mit der *pcPAL* Mutante Phe137His und der *rsTAL* durchgeführt.

Vorversuche / Planung der Mutantenbibliotheken

Aufgrund der geringen Aktivität der *rsTAL* und der *pcPAL*-Phe137His gegenüber Tyr-Ol und aufgrund des geringen Absorptionskoeffizienten des Produktes *trans*-Coumarylalkohol (Cou-Ol) von $1630 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurden zunächst möglichst kleine Bibliotheken generiert.

Dies bot den Vorteil, dass die Expression in 24-well *Deep-well*-Platten (24-dw-MTP) mit 4 ml LB-Medium pro Well durchgeführt werden konnten. Da der Sauerstoffeintrag durch die größere Oberfläche und die bessere Durchmischung wesentlich höher ist als bei Standard-MTP, konnten in Vorversuchen optische Dichten zwischen 5 und 7 erreicht werden. Dies führt nach dem Aufschluss in 1 ml Lysispuffer zu Proteingehalten von 0,8-1,5 mg Protein/ml (nach BCA). Zum Aufschluss mit Lysispuffer wurde nach Optimierung abweichend vom Standardprotokoll Tris-Puffer (pH 8,8 (nicht 7,5), 50 mM mit 0,1 mg/ml Lysozym und 0,5 µg/ml DNaseI) verwendet.

Mutantenbibliothek Arg354 (*pcPAL*) und Arg303 (*rsTAL*)

Da sich Tyrosinol nur durch die substituierte Carboxylgruppe vom Tyrosin unterscheidet, sollte zunächst eine Sättigungsmutagenese des Arg354 (*pcPAL*) bzw. Arg303 (*rsTAL*) mit Hilfe positionsgerichteter Mutagenese durchgeführt werden (Abbildung 21), sodass Bibliotheksgrößen von 100 Klonen für eine vollständige Sättigung der betreffenden Aminosäuren ausreichen.

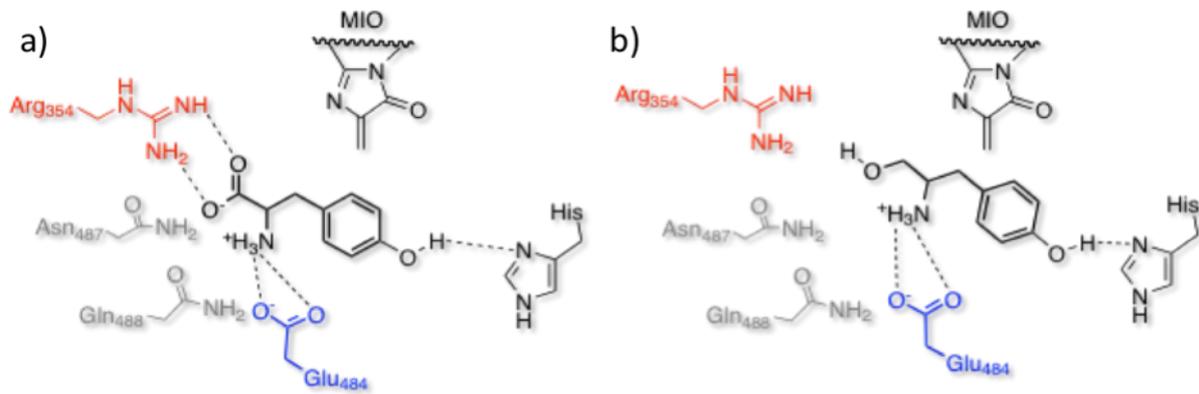


Abbildung 21: Vergleich der Wasserstoffbrücken von a) Tyrosin und b) Tyrosinol im aktiven Zentrum der *pcPAL-Phe137His*.

Nach aufwändiger Optimierung der Reaktionsbedingungen zur positionsgerichteten Mutagenese gelang die Herstellung der beiden Mutantenbibliotheken *pcPAL-Phe137His-Arg354-NNK* und *rsTAL-Arg303-NNK*. Da die direkte Transformation in den Expressionstamm BL21(DE3)-pTF16 aufgrund der DNA-Einzelstrangbrüche nach der positionsgerichteten Mutagenese (QuikChange[®]) nicht möglich ist, wurde die Bibliothek zunächst in kommerzielle, ultrakompetente XL10-Zellen (Stratagene) transformiert, um den Strangbruch reparieren zu lassen und sie dann anschließend in den Expressionstamm zu klonieren. Sequenzanalysen bestätigten die erfolgreiche Sättigungsmutagenese. Mit Hilfe des Pickroboters wurden jeweils 400 Klone in Master-Mikrotiterplatten gepickt und aufgrund des größeren Volumens anschließend in 24-dw-MTP exprimiert.

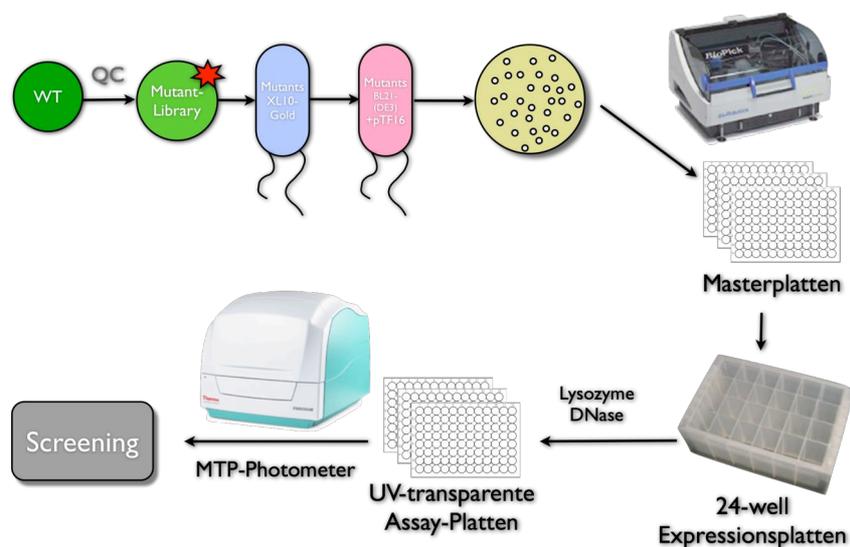


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Screening-Verfahrens.

Als mögliche Hits wurden alle Klone definiert, die eine höhere Aktivität als die WT-Kontrollen zeigten. Sequenzanalysen zeigten neben mehreren WT-Klonen die Mutationen *rsTAL-Arg303Leu*, -Asn und -Val sowie *pcPAL-Arg354Gly* und -Gln (Abbildung 23).

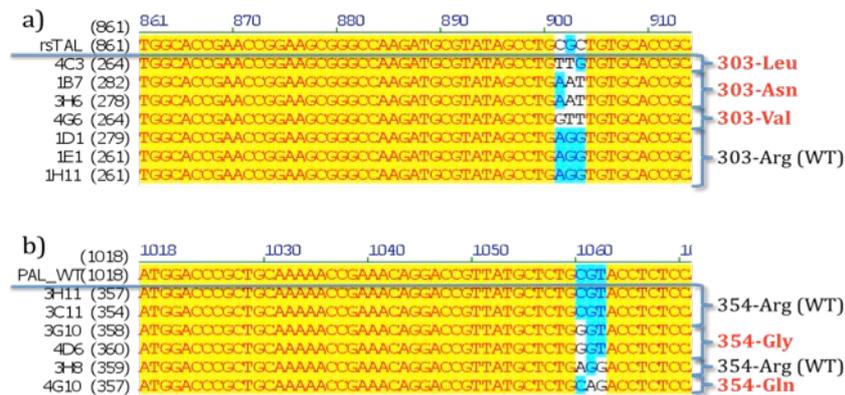


Abbildung 23: Sequenzvergleich der positiv getesteten Klone beider Mutantenbibliotheken *rsTAL-303-NNK* (a) und *pcPAL-354-NNK* (b).

Kultivierung der positiven Klone

Die identifizierten Mutanten wurden in 250 ml-Schüttelkolben exprimiert und nach dem Zellaufschluss aufgereinigt um die Aktivitäten gegenüber Phe und Tyr-Ol zu testen. Leider stellten sich alle Mutanten als falsch-positiv heraus. Die Mutanten der *rsTAL*-Bibliothek waren selbst gegenüber Phe inaktiv, die *pcPAL* Mutanten zeigten hingegen ca. 10% der WT-Aktivität, jedoch ebenfalls keinerlei Aktivität gegenüber Tyrosinol.

Beurteilung der Mutantenbibliotheken

Zusammenfassend führte die Sättigungsmutagenese des Arginins im aktiven Zentrum der *pcPAL* und *rsTAL* zu keiner Mutante mit gesteigerter Aktivität. Jede getestete Mutante war signifikant weniger aktiv als der WT und inaktiv gegenüber Tyrosinol.

Dies deutet auf eine bisher unbekannt aber essentielle Bedeutung des Arginins für den katalytischen Mechanismus hin. Das keinerlei Aktivität gegenüber Tyr-Ol festgestellt werden konnte, könnte ebenfalls auf einen gewissen stabilisierenden Effekt des Arginins auf die Hydroxylgruppe des Tyr-Ol zurückzuführen sein, indem es, wie MD-Simulationen zeigten, schwache Wasserstoffbrücken zum Sauerstoffatom ausbilden können (Abbildung 24).

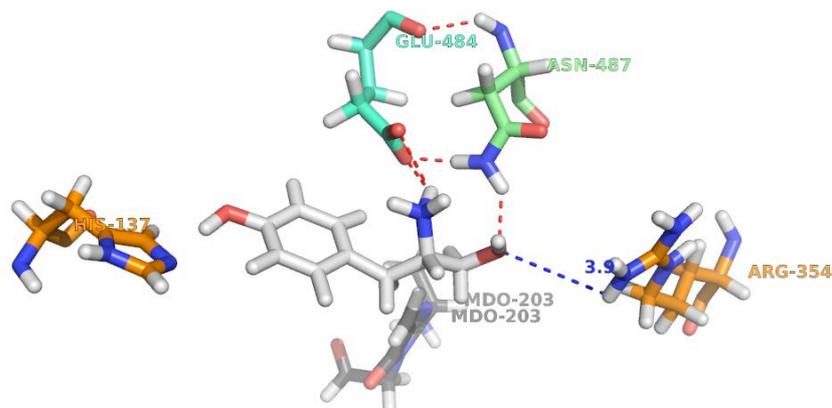


Abbildung 24: Aktives Zentrum der *pcPAL* mit gedocktem Tyrosinol nach kurzer MD-Simulation (12,5 ps). Wasserstoffbrücken sind in Rot dargestellt, der Abstand des Arg354 zum Hydroxyl-Sauerstoff in blau. Die MIO-Gruppe (in der Kristallstruktur als MDO bezeichnet) ist schwarz im Hintergrund.

In der kurzen MD-Simulation zeigte sich allerdings auch das Asn487 als sehr interessanter Kandidat zur Stabilisierung der OH-Gruppen des Substrates.

4.10. Rationales Design an der Position 487 und 488 (*pcPAL*)

Da sich die Position entsprechend dem Asn487 in der *pcPAL* in MD-Simulationen ebenfalls als sehr interessant zur besseren Stabilisierung des Tyr-Ol im aktiven Zentrum herausgestellt hat, wurden zunächst *in silico* unterschiedliche Mutationen untersucht (Abbildung 25).

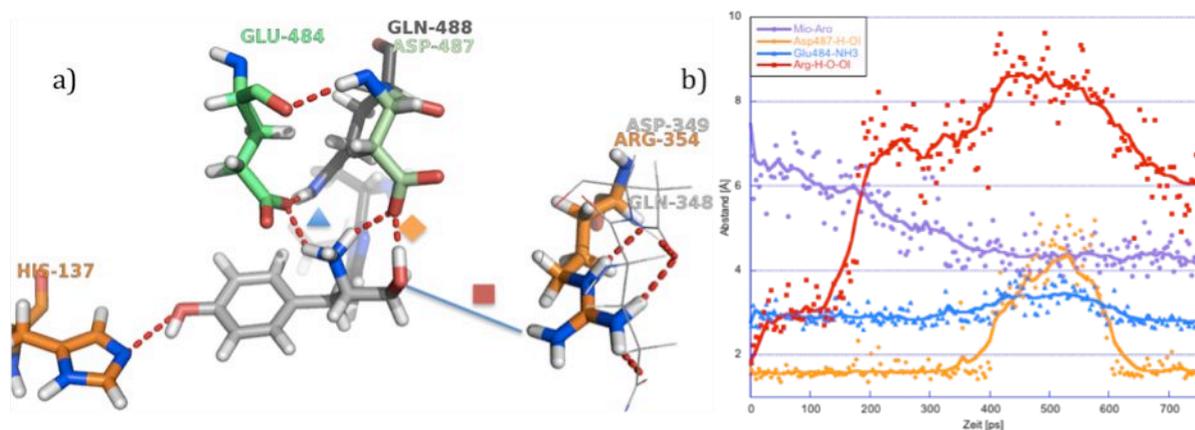


Abbildung 25: Aktives Zentrum der *pcPAL*-Phe137His-Asn487Asp nach 720 ps MD-Simulation (a), Wasserstoffbrücken sind in rot dargestellt, Abstände der wichtigsten Reste im aktiven Zentrum (Quadrat, Raute, Dreieck) wurden über die Zeit geplottet (b). Der Abstand der MIO-Gruppe zum o-C des Aromaten liegt im Hintergrund (Kreise).

Erwartungsgemäß erwies sich die Asn487Asp Mutante der *pcPAL*-Phe137His in den Simulationen am vielversprechendsten. So bildet das Aspartat nicht nur eine Wasserstoffbrücke zum Proton der Hydroxylgruppe des Substrates, (Abbildung 25, orange Raute) sondern zusätzlich wie das Glu484 auch eine Wasserstoffbrücke zur Aminogruppe des Substrates.

Aus Abbildung 25 geht allerdings hervor, dass sich während der Simulation das Arg354 aus ungeklärten Gründen aus dem aktiven Zentrum herausdreht und Wasserstoffbrücken zum Asp349 und Gln348 bildet. Dies konnte bei verschiedenen unabhängigen Simulationen beobachtet werden, jedoch nicht durch eine Abstoßung ausgehend vom Substrat oder der Asp487-Mutation erklärt werden. Dennoch wurde diese Bewegung nicht bei Simulationen der Phe137His-Mutatante oder dem WT beobachtet. Diese Beobachtung könnte einen Hinweis auf die eigentliche Aufgabe des konservierten Asn487 geben, die stabilisierende Wirkung gegenüber dem Arg354. Das Asn kann durch sein partiell negativ geladenes Sauerstoffatom Wasserstoffbrücken zum Arg354 ausbilden und mit der positiven Aminogruppe Wasserstoffbrücken zum Glu484 ausbilden. Da der Fokus allerdings auf der Stabilisierung des Aminoalkohols lag, wurde dieser Umstand zunächst nicht weiter beachtet.

Ergebnisse des rationalen Designs an der Position 487 (*pcPAL*)

In den MD-Simulationen konnte nicht zwischen der Asn487Asp- oder der Glu-Mutante unterschieden werden. Daher wurden zunächst beide Mutanten hergestellt. Da Histidin ebenfalls Hydroxylprotonen stabilisieren kann, wurde zusätzlich die Asn487His Mutante hergestellt. Somit wurden durch positionsgerichtete Mutagenese folgende Mutanten generiert:

pcPAL-Phe137His -Asn487Asp, -Asn487Glu, Asn487His sowie
rsTAL -Asn435Asp und -Asn435Glu.

Nachdem der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzanalysen bestätigt worden ist, wurden die Mutanten in BL21(DE3)+pTF16 exprimiert und über den His-Tag aufgereinigt um die spezifische Aktivität gegenüber Phe und Tyr-OI zu bestimmen. Dabei stellten sich alle Mutanten als weitgehend inaktiv heraus (Abbildung 26).

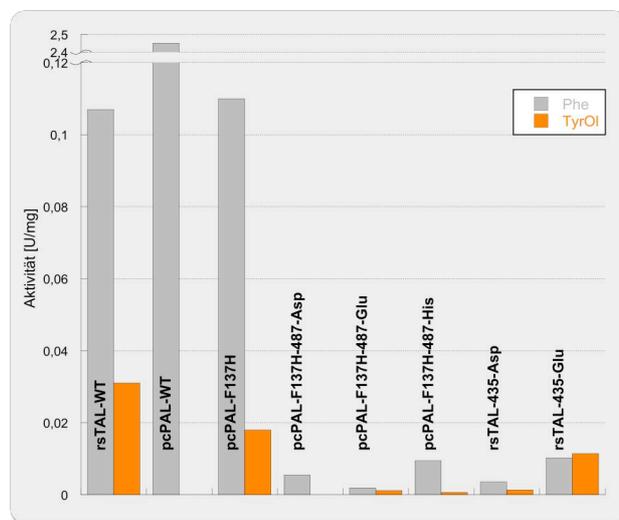


Abbildung 26: Vergleich der Aktivitäten unterschiedlicher Mutanten und WT von *rsTAL* und *pcPAL* gegenüber Phenylalanin (grau) und Tyrosinol (orange).

Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse führen zur Schlussfolgerung, dass die Position 487 (*pcPAL*) weitgehend konserviert ist und das Asn für die katalytische Funktion des Enzyms essentiell zu sein scheint. Offenbar ist das Herausdrehen des Arg aus dem aktiven Zentrum (Abbildung 24) kritischer als zunächst angenommen. Die Aufgabe des Asn487 scheint die Abschirmung und Stabilisierung des Glu484 und des Arg354 zu sein. Von der Arg354-NNK-Bibliothek ist bereits bekannt, dass das Arg für den katalytischen Mechanismus essentiell zu sein scheint. Da das Asn487 das Arg354 in der richtigen Orientierung zu halten scheint, ist dessen Aufgabe ähnlich essentiell für den katalytischen Mechanismus wie das Arg selbst.

In *ab initio* Car-Parrinello-moleküldynamischen Simulationen (quantenmechanischen (QM)-Simulationen) mit der Software CPMD konnte ebenfalls die Funktion des Asn487 als Bindeglied zwischen dem Arg354 und Glu484 bestätigt werden. Darüber hinaus konnte ein komplexes Wasserstoffbrückennetzwerk das vom Glu484 über Arg354 bis zum Tyr110 identifiziert werden (Abbildung 27).

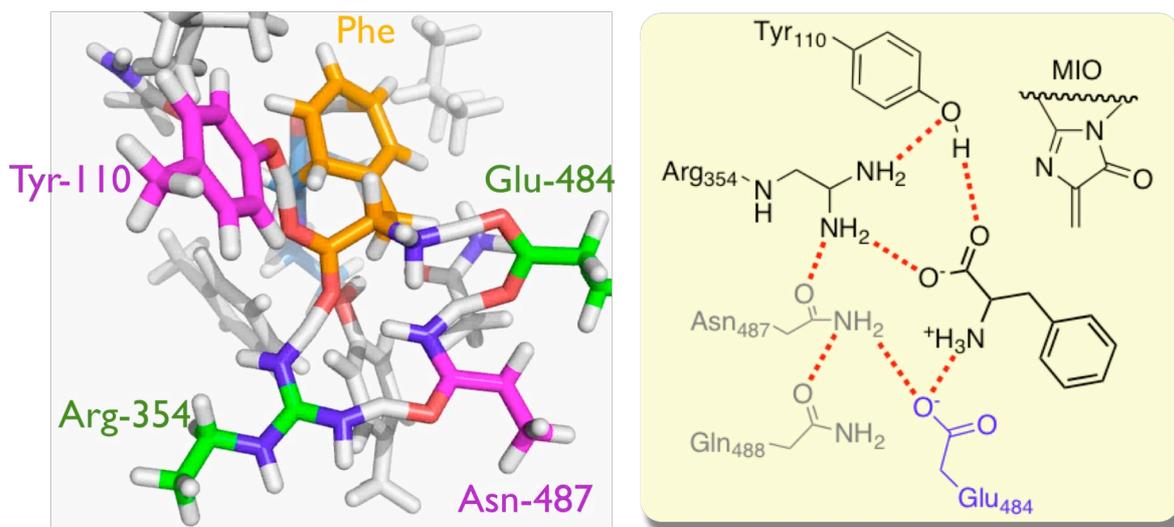


Abbildung 27: Kurze quantenmechanische Car-Parrinello-Simulation des aktiven Zentrums der *pcPAL* mit gedocktem Phenylalanin als Substrat (links) und vereinfachtes Schema der Wasserstoff-Brücken (rechts). Zur QM-Simulation wurden zur Vereinfachung nur die Aminosäureseitenketten ohne das Peptid-Rückgrat simuliert.

Rationales Proteindesign der Position 488 (*pcPAL*)

Aus der Abbildung 27 geht hervor, dass das Gln488 wahrscheinlich nicht direkt an dem Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt ist, dennoch in direkter Nachbarschaft zur Hydroxylgruppe des Substrates steht. Diese Aminosäure stellt ebenfalls ein interessantes Ziel für rationales Proteindesign dar.

Daher wurden durch positionsgerichtete Mutagenese ebenfalls folgende Mutanten hergestellt: *pcPAL*-Phe137His-Gln488Asp und -Gln488Glu.

Nach Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese, Expression und Aufreinigung stellten sich jedoch beide Mutanten als inaktiv gegenüber Tyrosinol heraus und nur die Gln488Glu-Mutante zeigte geringe Aktivität gegenüber Phenylalanin.

4.11. Mutantenbibliotheken *pcPAL*-Phe137His-487/488-NNK und *rsTAL*-435/436-NNK

Parallel zum rationalen Proteindesign wurde an den Mutantenbibliotheken zur Sättigungsmutagenese der Positionen 487 und 488 (*pcPAL*) gearbeitet. Da sich die QC zur Generierung der *pcPAL*-Bibliothek als schwierig herausstellte, wurde zunächst nur die entsprechende *rsTAL*-Mutantenbibliothek 435/436-NNK generiert und getestet.

Das Screening der Mutantenbibliothek wurde weiter optimiert. So wurde die Expression in 96-*Deep-well* Platten unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Die photometrische Messung der Aktivität der Klone wurde durch drei Einzelpunkt-Messungen ersetzt, wobei parallel sowohl bei 320 nm für die Produktion des Coumarylalkohols als auch bei 600 nm gemessen wurde. Auf diese Weise sollten falsch-positive Klone vermieden werden, deren Absorptionzunahme durch eine Trübung verursacht wurde.

Es wurden 1400 Klone in Masterplatten gepickt und getestet. Alle Klone die WT-ähnliche oder höhere Aktivität gegenüber Tyrosinol zeigten (ca. 200 Klone) wurden auf Agarplatten vereinigt und erneut getestet. Die fünf besten Klone wurden im Schüttelkolben exprimiert und aufgereinigt um die spezifischen Aktivitäten zu bestimmen. Parallel wurden Sequenzanalysen durchgeführt um die Mutationen zu identifizieren.

Sowohl die Sequenzierung sowie die Aktivitätsmessung bestätigten, dass es sich bei allen fünf Klonen um WT-Enzyme handelte.

Bewertung der Ergebnisse

Bei dem Screening wurden ausschließlich WT-Klone identifiziert. Sequenzanalysen verschiedener Klone während der Bibliotheksgenerierung zeigten jedoch keinen WT sondern zufällig mutierte Codons. Somit zeigt das Screening, dass Mutationen weder an der Position 435 noch 436 der *rsTAL* erlaubt sind. Dies lässt sich wahrscheinlich ebenfalls auf die entsprechenden Positionen in der *pcPAL* 487 und 488 übertragen, deren Mutantenbibliothek aufgrund von Komplikationen während der positionsgerichteten Sättigungsmutagenese nicht hergestellt wurde. Das rationale Design dieser Positionen zeigte bereits keine verbesserte Aktivität.

4.12. Mutantenbibliothek *pcPAL*-Phe137His-Tyr110-NNK

Hintergrund

Der einzig verbleibende Aminosäurerest, der direkt mit der Carboxylgruppe des ursprünglichen Substrates interagiert ist Tyr110. Diese Aminosäure liegt in einem flexiblen Loop, der offenbar einen Deckel des aktiven Zentrums darstellt. In fast allen bisher bekannten Strukturen von PAL-Enzymen war der Tyr-enthaltende Loop entweder nicht aufgelöst oder, wie bei der Kristallstruktur der *pcPAL*, aus dem aktiven Zentrum herausgeklappt. Die einzige Ausnahme bildet die Kristallstruktur der *Anabaena variabilis* PAL Mutante Cys503Ser/Cys565Ser.^[9] Diese Kristallstruktur zeigt ähnlich der *rsTAL* eine geschlossene Struktur. Es konnte gezeigt werden, dass das aktive Zentrum dieser Struktur vollkommen vom Lösungsmittel abgeschnitten ist.

Bereits 2002, bevor die Kristallstruktur der „inaktiven“ *pcPAL* bekannt war, stellten D. Rother, L. Poppe et. al.^[3] die Hypothese auf, dass das Tyr110 der *pcPAL* als Deckel für das aktive Zentrum dienen könnte und bei dem Eintritt des Substrates in das aktive Zentrum wie auch in der Katalyse selbst eine bedeutende Rolle spielt (Abbildung 28).

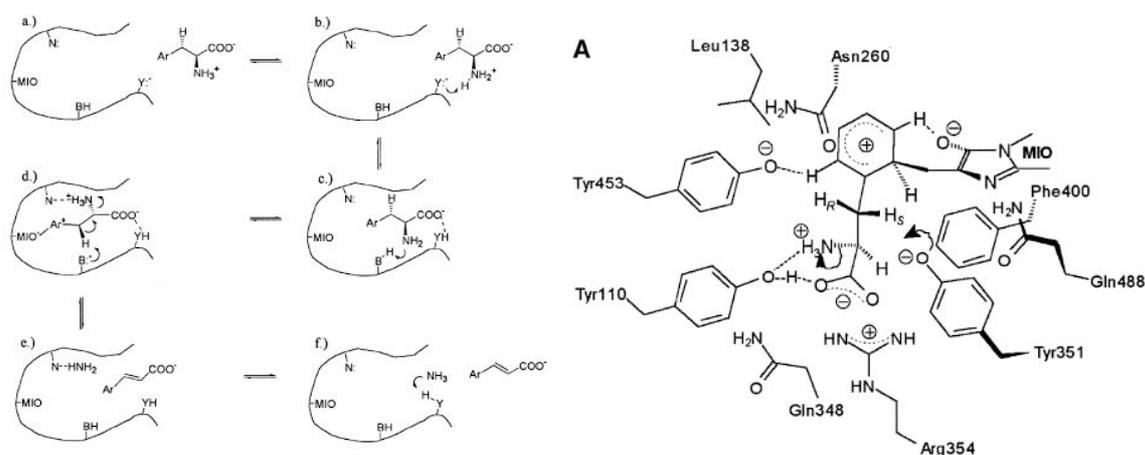


Abbildung 28: Darstellung der Funktionen des Tyr110 für die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum sowie die katalytische Bedeutung. Entnommen von ^[3].

Die in Abbildung 28 vermutete Funktion des Tyr110 wird zwar durch eine Mutation zu Phenylalanin verhindert, was zur Inaktivität des Enzyms führt (Tyr110Phe-Mutante ^[9]), die Funktion könnte aber durch Glutamat ersetzt werden. Das Tyr110 ist bei pH 8 trotz des aziden Charakters der phenolischen Hydroxylgruppe wahrscheinlich protoniert, im Gegensatz zum Substrat Phenylalanin, dessen Carboxylgruppe mit Sicherheit deprotoniert ist.

Durch den Ersatz der Carboxylgruppe des Substrates durch einen Alkohol ändert sich die Kooperation zwischen Tyr110 und dem Substrat, da nun beide funktionellen Gruppen proto-

niert vorliegen (vgl. Abbildung 28, rechts). Somit könnte die Mutation Tyr110Glu oder Tyr110Asp eventuell positive Effekte auf die katalytische Aktivität gegenüber Tyrosinol zeigen, falls der „Deckel“ weiterhin geschlossen werden kann.

Generierung und Screening der Bibliothek

Es wurden bereits Computer Modeling-Studien durchgeführt die zeigen konnten, dass ein Glu an der korrespondierenden Position des Tyr110 das Phenylalaninol im aktiven Zentrum stabilisieren kann (Abbildung 29).

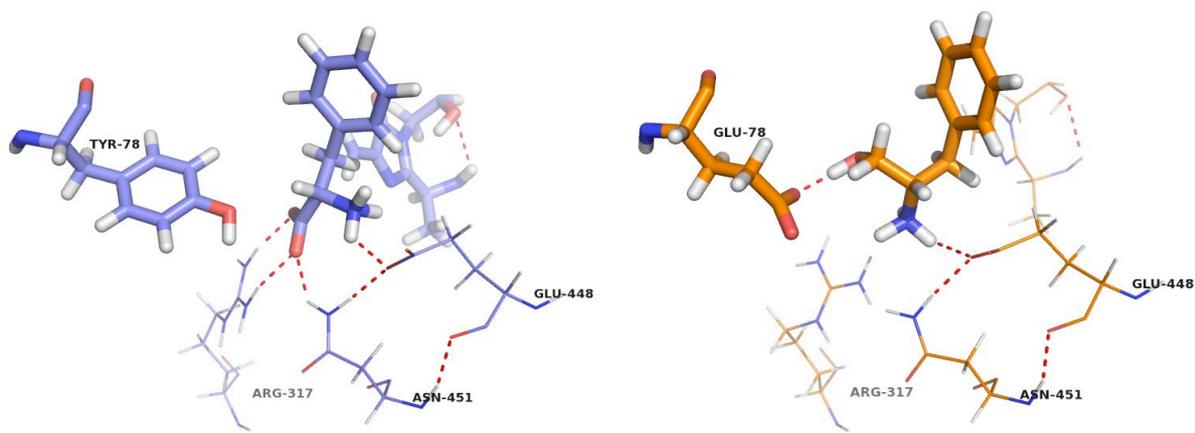


Abbildung 29: Vergleich der minimierten Strukturen der *Anabaena variabilis*-PAL, mit gedocktem Phenylanin (links) und der Tyr-78-Glu Mutante mit gedocktem Phenylalaninol rechts.

Daher wurde die entsprechende QuikChange[®] durchgeführt und in ultrakompetente XL10 Gold-Zellen transformiert. Die Plasmide von 740 Klonen wurden in BL21(DE3) mit pTF16 transformiert, von denen 94 in eine MTP gepickt wurden. Sequenzanalysen von sieben Klonen der XL10 Gold-Transformation bestätigten den Erfolg der QuikChange[®]. Allerdings schien die Sättigungsmutagenese unter Verwendung des NNK-Codons nicht völlig zufällig (Abbildung 30). So war das Codon AAT besonders häufig vertreten.

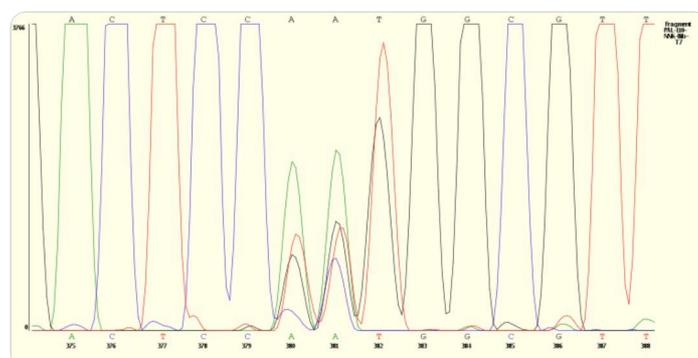


Abbildung 30: Chromatogramm der Sequenzanalyse der erhaltenen Mutantenbibliothek mit Sättigungsmutagenese des Codons 110 mit NNK. Die verschiedenen Nukleotide sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (A: grün, C: blau, G: schwarz, T: rot). Die Positionen 380/381 sollten eine gleichmäßige Verteilung von A, T, C und G aufweisen, zeigen jedoch überproportionale Anteile von A.

Die 94 gepickten Klone wurden dennoch dem Screening gegenüber Tyrosinol-Aktivität unterzogen, die zehn scheinbar aktivsten Klone wurden sequenziert und die unterschiedlichen Mutanten wurden in Schüttelkolben exprimiert und auf Aktivität getestet. Dabei wurde bei keiner der Mutanten signifikante Aktivität gegenüber Tyr-Ol festgestellt.

Optimierung der Screeningmethode

Zur Optimierung des Screenings wurde ein weiterer neuer Assay etabliert, basierend auf einem alternativen Substrat Tyrosinamid (Tyr-Amid).

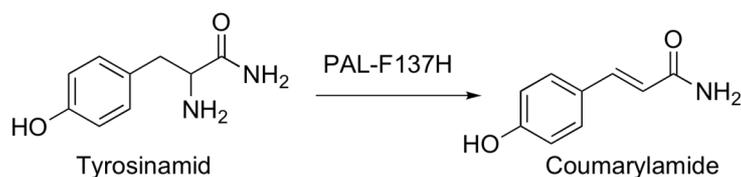


Abbildung 31: Deaminierung von Tyrosinamid (Tyr-Amid) zum Coumarylamide.

Ähnlich zu Coumarylalkohol konnte der Verlauf der Reaktion bei 320 nm mit einem Absorptionskoeffizienten von $\epsilon=4075 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (vierfach höher als der Absorptionskoeffizient von Coumarylalkohol) beobachtet werden. Sowohl die *pcPAL*-Phe137His als auch die *rsTAL* zeigten geringe aber durch den höheren Absorptionskoeffizienten besser messbare Aktivität (Tabelle 6).

Tabelle 6: Kinetische Parameter der *pcPAL*-Phe137His und der *rsTAL* gegenüber verschiedenen Substraten.

Enzym	Substrat	K_M [mM]	K_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1}M^{-1}$]
<i>pcPAL</i> -Phe137His	L-Phe	$0,054 \pm 0,01$	31 ± 3	568 000
	L-Tyr-Ol	-	$0,11 \pm 0,04$	-
	L-Tyr-Amid	$0,84 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,001$	109
<i>rsTAL</i> -WT	L-Phe	$2,7 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,02$	226
	L-Tyr-Ol	-	$0,12 \pm 0,04$	-
	L-Tyr-Amid	$2,7 \pm 0,75$	$0,05 \pm 0,005$	17,7

Screening der neuen Bibliothek

Die Tyr110-NNK Mutantenbibliothek wurde aufgrund des Mangels an Variabilität erneut mit neuen Mutagenese-Primern einer andern Firma generiert. Es wurden 200 Klone in MTP gepickt und auf Aktivität gegenüber Tyrosinol und Tyrosinamid getestet. Nur die fünf Klone mit Aktivität gegenüber beiden Substraten wurden zur näheren Untersuchung ausgewählt. Sequenzanalysen zeigten, dass drei Klone dem Ausgangsenzym entsprachen, *pcPAL*-Phe137His, für einen Klon schlug die Sequenzierung fehl und bei einem Klon handelte es sich um die Mutante *pcPAL*-Phe137His-Tyr110Gly die sich als inaktiv herausstellte.

4.13. Bewertung des Proteindesigns

In der *pcPAL*-Phe137His-Tyr110NNK-Bibliothek wurden ebenfalls keine Mutanten identifiziert, die eine erhöhte Aktivität gegenüber Tyrosinol zeigten, noch nennenswerte Aktivität gegenüber Phenylalanin aufweisen.

Somit wurde jede denkbare Position um die, im Vergleich zum natürlichen Substrat veränderte, Hydroxylgruppe des Tyrosinols mutiert. Dies führte stets nicht nur zum Verlust jeglicher Aktivität gegenüber Tyrosinol, sondern darüber hinaus meist auch zum Verlust jeglicher Aktivität, auch gegenüber den natürlichen Substraten.

Es musste daher festgestellt werden, dass das aktive Zentrum der PAL und TAL gegenüber Mutationen jeglicher Art, die um die an der Katalyse beteiligten Region des Substrates lokalisiert sind, stets zum Verlust der katalytischen Aktivität führt.

Es handelt sich bei den Auswirkungen der Mutationen meist nicht um die elektrostatische oder sterische Fähigkeit das Substrat korrekt zu binden, als viel mehr um die Fähigkeit den nicht trivialen katalytischen Mechanismus selbst auszuführen.

Daher kann festgestellt werden, dass keinerlei Mutation im Bereich der Bindungsstellen der Aminogruppe und der Hydroxylgruppe des Substrates zulässig sind, da diese unmittelbar am katalytischen Prozess beteiligt sind und nicht ausgetauscht werden können. Dies zeigt deutlich, dass zur nicht-oxidativen (De)-Aminierung aromatischer Aminosäuren nicht nur die prosthetische MIO-Gruppe und ein oder zwei aktivierende Aminosäureseitenketten notwendig sind, sondern fast das ganze aktive Zentrum dieser Enzyme.

Die einzige bisher beschriebene Mutation, die tatsächlich zu positiv veränderten Eigenschaften des Enzyms führte, war die *pcPAL*-Phe137His Mutation, die die Aktivität der PAL gegenüber Tyrosin deutlich steigert.

Daher scheint ausschließlich die Bindetasche um den aromatischen Ring weniger gegenüber Mutationen sensitiv zu sein.

4.14. Rationales Design der Position 137 (*pcPAL*) und 89 (*rsTAL*)

Da durch den Austausch des Phe137 der *pcPAL* geringe Aktivität gegenüber Tyrosinol hergestellt werden konnte, sollte versucht werden, an dieser Stelle eine geeignetere Aminosäure zur Stabilisation des Substrates zu finden.

Als basische Aminosäuren stehen, abgesehen von Histidin, nur Arginin und Lysin zur Verfügung. Beide Aminosäuren sind aber wesentlich zu groß und würden das aktive Zentrum zu

sehr verkleinern. Daher wurden Aspartat und Glutamat ausgewählt. Bei neutralen oder basischen pH-Werten liegen die funktionellen Gruppen der Aminosäure überwiegend deprotoniert und negativ geladen vor. Die phenolische *p*-OH-Gruppe des Tyrosins ist hingegen leicht azid, mit einem pK_S von ca. 10. Somit wird auch das Substrat Tyrosinol überwiegend protoniert vorliegen. Daher könnte das Proton der Hydroxylgruppe auch Wasserstoffbrücken zu Asp oder Glu ausbilden.

Daher wurden folgende Mutanten durch positionsgerichtete Mutagenese hergestellt:

pcPAL-Phe137Glu und -Phe137Asp sowie

rsTAL-His89Glu und -His89Asp.

Nachdem die erfolgreiche Mutagenese durch Sequenzanalysen bestätigt wurde, wurden die Mutanten exprimiert und aufgereinigt.

Die Aktivitäten wurden gegenüber Phe und Tyr-Ol gemessen. Dabei zeigten die Mutanten der *pcPAL* geringe Aktivitäten gegenüber Phe, alle Mutanten waren gegenüber Tyr-Ol inaktiv.

4.15. Ausblick auf zukünftiges Proteindesign

Zwar erwiesen sich die über das rationale Design hergestellten Mutanten an der Position 137 (*pcPAL*) als inaktiv gegenüber Tyrosinol, jedoch stehen unterschiedliche Positionen zur Mutagenese im Bereich des Phenylrings zur Verfügung. Zusammen mit der Kombination verschiedener Substituenten des Phenylrings wie Nitro-, Amino-, Chlor- und Fluor-Substituenten, mehrerer Hydroxylgruppen und Kombinationen verschiedener Substituenten wären weiterführende Mutagenesestudien vielversprechend. Besonders die Alkohole von 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) 3,4-Dihydroxyphenylalaninol (DOPA-Ol) und der entsprechende deaminierte Alkohol von Coffeinsäure 3,4-Dihydroxyzimtsäure-Alkohol (DOZS-Ol) sind hochinteressante Substrate, da diese eine *m*-Hydroxylgruppe besitzen. Wie vom *m*-Tyrosin bekannt ist, können die Elektronen des *m*-Sauerstoffatoms die während des Friedel-Crafts-Reaktionsmechanismus auftretende positive Ladung zum Teil stabilisieren und könnten zu höheren Aktivitäten führen.^[7] Durch die zweite Hydroxylgruppe werden Mutagenesen in Nachbarschaft zur Position 137 interessant, um durch weitere Wasserstoffbrücken das Substrat stabilisieren zu können. Leider sind weder DOPA-Ol noch DOZS-Ol kommerziell verfügbar und müssen synthetisiert werden (s.u.).

Aufgrund des Endes der Projektlaufzeit konnten keine weiteren Mutantenbibliotheken an und um die Position 137 (*pcPAL*) generiert werden.

4.16. Alternative Substrate

Wie in Kap. 4.15 beschrieben wurde, sind die Alkohole DOPA-OI und DOZS-OI von großem Interesse, da vor allem durch die elektronischen Effekte der *m*-OH-Gruppe auf eine höhere Aktivität geschlossen werden kann.

Synthese von DOPA-OI

Da Dihydroxyphenylalanin sehr preisgünstig ist, liegt eine Reduktion der Säure zum Alkohol mit LiAlH_4 nahe (Abbildung 32).

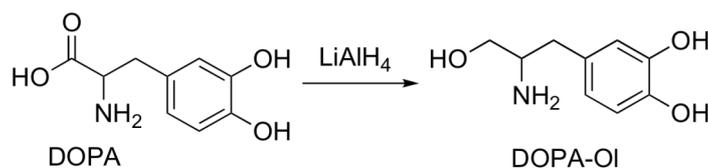


Abbildung 32: Geplante Synthese von DOPA-OI.

Es wurden zu Beginn verschiedene Versuche durchgeführt DOPA direkt zum DOPA-OL zu reduzieren, jedoch stets ohne Erfolg. Vor allem die Aminogruppe erwies sich bei der Aufarbeitung aufgrund der hohen Polarität als sehr störend. Da die phenolischen OH-Gruppen azid reagieren, die Aminogruppe aber leicht basisch, war es nicht möglich das Produkt aus der wässrigen Phase zu extrahieren (Abbildung 33).

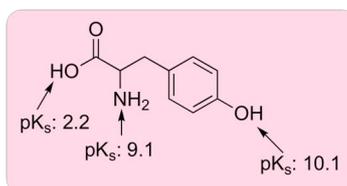


Abbildung 33: pK_s-Werte von Tyrosin. Die *p*-OH-Gruppe reagiert leicht sauer, die Aminogruppe basisch. Zur Extraktion mit organischen Lösungsmitteln sollte das Substrat möglichst ungeladen vorliegen.

Um die schlechte Löslichkeit des DOPA in organischen Lösungsmitteln zu verbessern, wurde die Carboxylgruppe verestert. Dazu wurde zunächst Trimethylsilyl-Diazomethan verwendet, welches jedoch wesentlich zu teuer ist und sich im präparativen Maßstab nicht eignet. Daher wurde eine säurekatalysierte Ester-Synthese in Methanol durchgeführt.

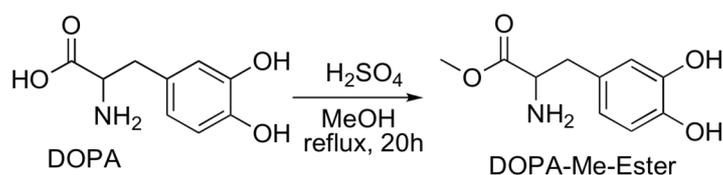


Abbildung 34: Veresterung von DOPA.

H_2SO_4 wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Es wurde ohne weitere Aufreinigung laut NMR reines Produkt erhalten (Ausbeute 54%). Da sich der Methyl ester in THF lösen lässt, wurde die Reduktion des Esters zum Alkohol mit LiAlH_4 getestet. Leider ließ sich der eventuell entstandene Alkohol nicht aus dem Reaktionsgemisch

extrahieren. Da beim *Quenchen* von LiAlH_4 eine Reihe von Lithium und Aluminium-Verbindungen entstehen, erwies sich die Aufarbeitung als sehr schwierig. Daher schien es einfacher, die Aminogruppe mit der BOC-Schutzgruppe zu schützen (Abbildung 35).

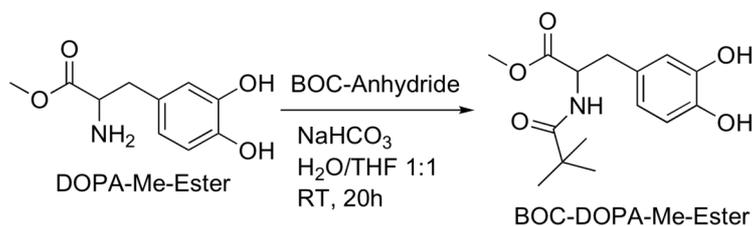


Abbildung 35: Schützung des DOPA-Me-Esters mit BOC

Dazu wurden zunächst 1,4 g DOPA-Me-Ester für die Reaktion eingesetzt und ein Überschuss an BOC-Anhydrid verwendet, welches nach Abbruch der Reaktion ebenfalls extrahiert wurde. Daher wurden die phenolischen Hydroxylgruppen des BOC-DOPA-Me-Esters mit Triethylamine deprotoniert, sodass unreaktiertes BOC-Anhydrid mit Hexan extrahiert werden konnte. Die Struktur wurde durch NMR bestätigt, die Ausbeute betrug 44,1%.

Anschließend wurde die Reduktion des BOC-DOPA-Me-Esters mit LiAlH_4 zum BOC-DOPA-Ol durchgeführt (Abbildung 36).

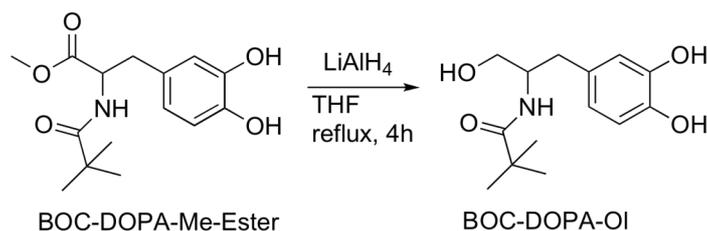


Abbildung 36: Reduktion des BOC-DOPA-Me-Esters zum Alkohol

Zunächst wurde die Reduktion mit einer kleineren Menge geschütztem Ester getestet. Nach der Extraktion mit Ethylacetat wurde ein dunkelbrauner Feststoff erhalten. NMR-Analysen haben den Erfolg bestätigt.

Zur Optimierung der Extraktion des Reaktionsansatzes wurde das Protokoll nach Frieser & Frieser verwendet. Zunächst wird 1 eq. (bez. auf LiAlH_4) H_2O zugegeben, dann 2 eq. NaOH (15%), dann 3 eq. H_2O . Nach Filtration durch Celite war die Extraktion mit Chloroform wesentlich vereinfacht. Auch dieses Protokoll wurde zunächst mit 1,5 g BOC-DOPA-Me-Ester getestet. Die Ausbeute betrug 36%. In einem dritten Ansatz wurden 5 g BOC-DOPA-Me-Ester zu 1,3 g BOC-DOPA-Ol reduziert (Ausbeute 29%, schwarz, ölig, nicht aufgereinigt). Im abschließenden Schritt wurde die BOC-Schutzgruppe durch Säurekatalyse entfernt (Abbildung 37).

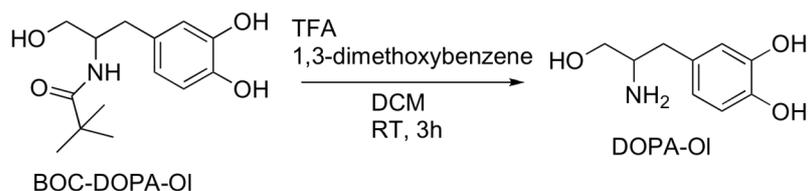


Abbildung 37: Entschützung des BOC-DOPA-OI zu DOPA mit Trifluoressigsäure

1,3 g BOC-DOPA-OI wurden in 20 ml DCM und 20 ml TFA gelöst und 3 h bei RT gerührt. Durch die Protonierung des Carbamat-Sauerstoffs wird das *tert*-butyl-Carbokation freigesetzt, welches eine Carbaminsäure generiert, die zum Amin decarboxyliert. Das *tert*-butyl-Carbokation könnte sensible Gruppen wie z.B. den Phenylring von Tyrosin angreifen.^[10] Es ist sehr wahrscheinlich, dass ebenfalls der Dihydroxyphenylring von DOPA vom Carbokation angegriffen werden kann. Daher wurde als „Scavenger“ 1 eq. 1,3-Dimethoxybenzen zugesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeeengt und zur Neutralisierung auf ein Natriumbicarbonat/Eis-Gemisch gegeben. Es wurde mit Chloroform und Ethylacetat extrahiert. Nach dem Einengen (1,4 g) blieben zwei Phasen übrig, eine flüssige (wahrscheinlich 1,3-Dimethoxybenzen, 1 g) und eine feste, schwarze Phase (430 mg). Schließlich stellte sich ein $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}$ (250:50:1) Gemisch als geeignete mobile Phase für eine Silicagel-Chromatographie heraus. Nach der chromatographischen Aufreinigung wurden 250 mg Produkt erhalten. Die NMR-Analyse bestätigte die erwartete Struktur. Allerdings ist zur Etablierung eines Assays für die Biokatalyse ebenfalls der deaminierte Alkohol DOZS-OI notwendig. Darüber hinaus ist die enzymatische Reaktion zum DOPA-OI die eigentlich interessantere Reaktion.

Synthese von 3,4-Dihydroxizimtsäurealkohol (DOZS-OI)

Zur Verbesserung der Löslichkeit des Substrates wurde zunächst der Methylester hergestellt, der dann mit LiAlH_4 zum Alkohol reduziert werden sollte. Die Reaktion wurde bereits für Dihydroxyphenyl-Essigsäure in der Literatur beschrieben.^[11]

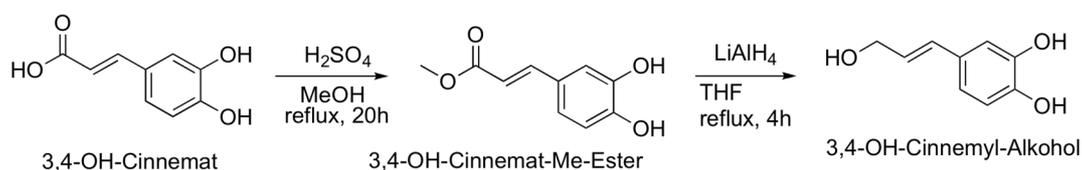


Abbildung 38: Synthese des Methylesters von 3,4-Dihydroxy-Zimtsäure und Reduktion des Methylesters zum Alkohol.

Nach der Aufreinigung wurde jedoch kein Produkt erhalten. Die Reaktion wurde mehrfach wiederholt, aber ohne Erfolg.

Es stellte sich heraus, dass die Reduktion von α,β -ungesättigten Säuren bzw. Estern aufgrund konkurrierender 1,2- und 1,4-Reaktionen nicht so trivial ist, wie ursprünglich angenommen.

Diese Problem wurde ebenfalls in einem kürzlich veröffentlichten Artikel beschrieben, der eine Reduktion mit *in vitro* gebildetem AlH_3 als Alternative beschreibt (Abbildung 39).^[12]

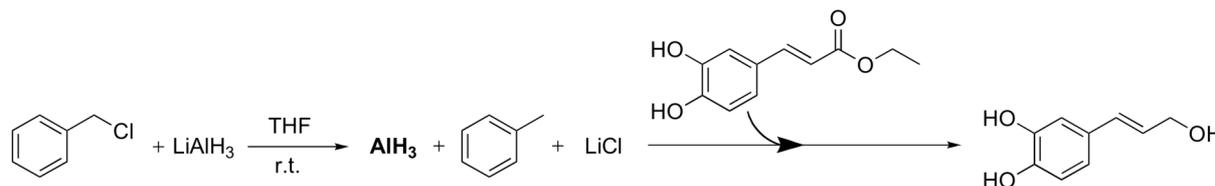


Abbildung 39: Reduktion von DOZS-Me-Ester zum Alkohol durch AlH_3 aus der Reaktion von LiAlH_4 und Benzylchlorid.

Die Publikation beschreibt die Ausbeute für die Reduktion des DOZS-Ethylester mit 81% nach 1,5 h, gibt allerdings kein spezielles Protokoll an.

Diese Reaktion wurde ebenfalls getestet und lieferte kein Produkt. Problematisch sind wahrscheinlich die beiden phenolischen Hydroxylgruppen, die aufgrund der zum Phenylring konjugierten Doppelbindung sehr azide sind und evtl. unterschiedliche Komplexe mit Lithium oder Aluminium eingehen können (Abbildung 40).

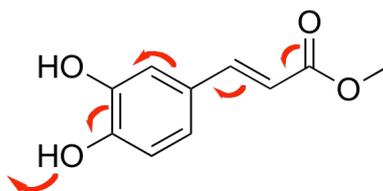


Abbildung 40: Mögliche Konjugation der Doppelbindungen in DOZS-Me-Ester.

Aus diesem Grund liegt die Schützung der Diol-Gruppen als Acetonid nahe.

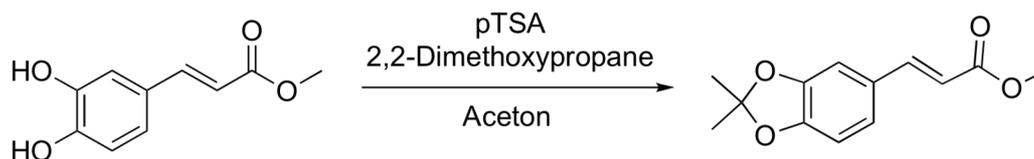


Abbildung 41: *p*-Toluensulfonsäure (pTSA)-katalysierte Schützung der phenolischen Diole vom DOZS-Me-Ester.

Diese Methode stellte sich ebenfalls als nicht erfolgreich heraus. Daher wurde nach Alternativen zu LiAlH_4 gesucht. Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) stellte eine etwas teurere aber vielversprechende Alternative dar. Da kein Lithium enthalten ist, entstehen wesentlich weniger Nebenprodukte, wodurch die Aufarbeitung wesentlich vereinfacht wurde.

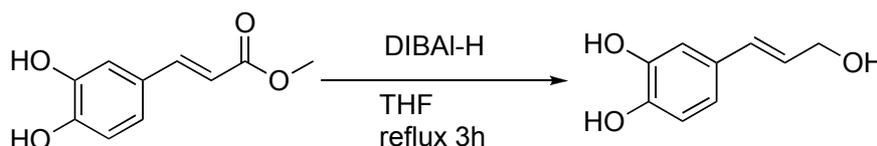


Abbildung 42: Reduktion des DOZS-Me-Esters zum Alkohol mit DIBAL-H.

Tatsächlich konnte diese Methode schließlich erfolgreich angewandt werden, sodass, bei einer Ausbeute von 26%, schließlich 200 mg DOZS-Ol gewonnen wurden.

4.17. Etablierung der Rückreaktion

Da zur Umkehrung der von PAL und TAL katalysierten Reaktion hohe Konzentrationen von Ammonium notwendig sind, musste die Rückreaktion zunächst getestet und etabliert werden.

Dazu sollten zunächst verschiedene Biokatalysen mit unterschiedlichen Substraten in 4 M NH_4^+ -Lösung bei pH 10 getestet werden.

Assay

Photometrische Assays stellten sich als eher ungeeignet heraus, da bei diesen Reaktionen die stark absorbierenden α,β -ungesättigten Substrate in transparente Produkte umgesetzt werden. Daher wurde zur Verfolgung der Reaktion auf Dünnschichtchromatographie (DC) zurückgegriffen. Durch die spezifische und sehr empfindliche Färbung von Aminen durch Ninhydrin kann das entstehende Produkt der Enzymkatalyse nachgewiesen werden. Die Substrate hingegen sind mit Ausnahme von *p*-Aminozimtsäure, nur durch UV-Detektion zu identifizieren. Als Laufmittel stellte sich *n*-Butanol:Eisessig:Wasser im Verhältnis 4:1:1 als besonders geeignet heraus (Abbildung 43).

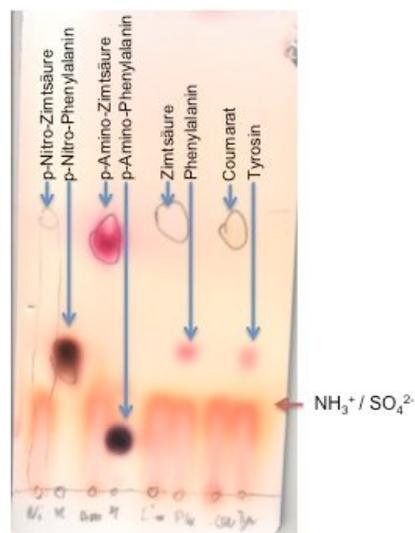


Abbildung 43: Dünnschichtchromatographie verschiedener Substrat- und Produktstandards nach Anfärbung mit Ninhydrin. Die nicht-aminieren Substrate sind, mit Ausnahme von *p*-Aminozimtsäure, nur im UV-Licht sichtbar und wurden auf der DC-Karte mit Bleistift eingezeichnet.

Biokatalysen mit *pc*PAL-Phe137His

Die Biokatalysen wurden in Gegenwart von 4 M NH_4^+ bei pH 10 und 25°C in 1,2 ml durchgeführt. Es wurden Substratkonzentrationen von 5 mM eingesetzt. Es wurde stets 200 μl aufgereinigtes Enzym eingesetzt (0,5-2 mg/ml Enzym).

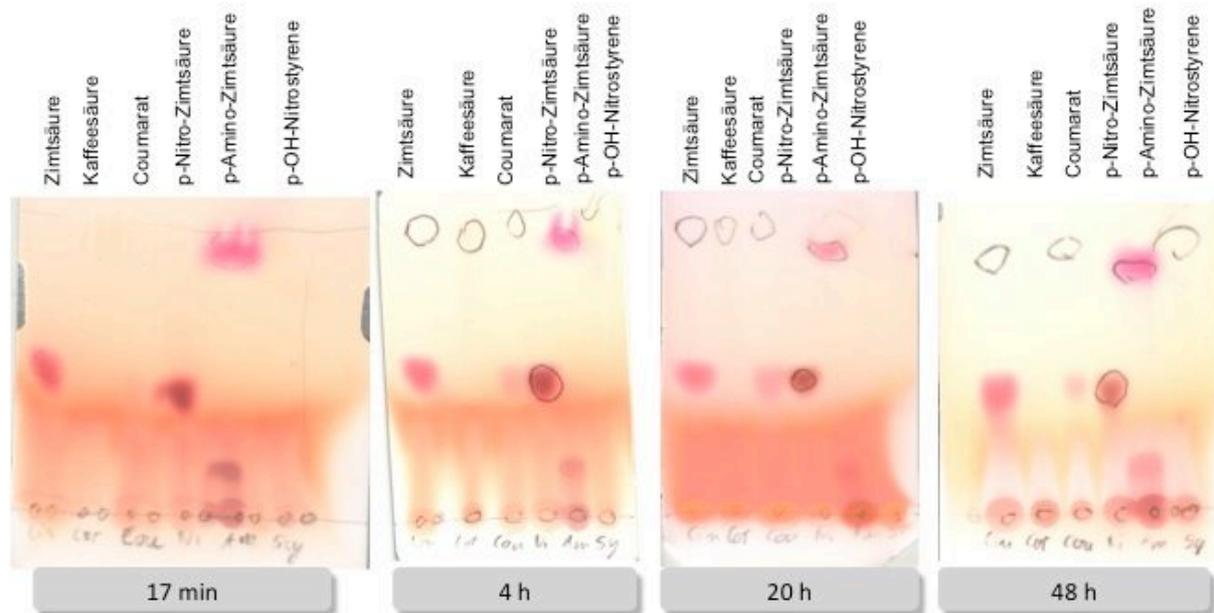


Abbildung 44: Biokatalyse mit 0,95 mg/ml *pcPAL-Phe137His* und unterschiedlichen Substraten mit 4 M NH_4^+ .

Aus Abbildung 44 geht hervor, dass mit der *pcPAL-Phe137His* bei Zimtsäure, Coumarat, *p*-Nitrozimtsäure und *p*-Aminozimtsäure Umsatz zu beobachten war. Nach vier Stunden ist keine deutliche Veränderung mehr festzustellen. Bemerkenswert ist der anscheinend schnelle Umsatz von *p*-Nitrozimtsäure, mit der bereits nach 17 min sehr deutlicher Umsatz festzustellen war. Nach vier Stunden war keine Säure durch UV-Detektion mehr sichtbar, was auf einen vollständigen Umsatz hindeutete.

Kaffeesäure stellte sich als besonders schwierig zu handhabendes Substrat heraus, da es offenbar in alkalischer Lösung zu Oxidation neigt (Abbildung 45), was ebenfalls auf das synthetisierte DOZS-OI zutrifft und ein Grund ist, weshalb photometrisch keine Aktivitäten gegenüber diesen Substraten gemessen werden konnte.



Abbildung 45: Dieselbe alkalische Kaffeesäure-Lösung aufgeteilt in zwei Kolben. Der linke wurde durch Vakuum entgast und mit Stickstoff gespült, der Rechte wurde nicht behandelt.

Daher müssen die Biokatalysen mit diesen Substraten in Zukunft anaerob durchgeführt werden, was einen besonderen experimentellen Aufwand darstellt, weshalb diese Substrate für die Etablierung der Rückreaktion zunächst nicht weiter verwendet wurden.

Vergleich *pcPAL*-Phe137His und *rsTAL*

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Biokatalyse der *pcPAL*-F137H parallel mit der *rsTAL* durchgeführt (Abbildung 46). Da ein photometrischer Assay zur Überprüfung der Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenylalanin aufgrund der hohen Absorption des Substrates nicht möglich war, wurde eine Biokatalyse ohne NH_4^+ und dem *p*-Nitrophenylalanin mitgeführt um die Deaminierung zu beobachten. Die *rsTAL* zeigte insgesamt eine niedrigere Aktivität in der Aminierungsreaktion. Erneut war die scheinbare Aktivität gegenüber der Nitro-Zimtsäure am höchsten.

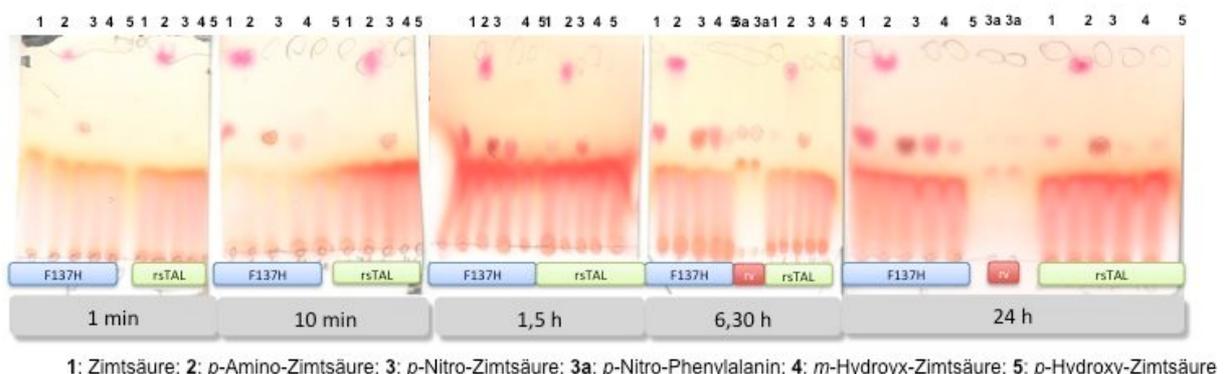


Abbildung 46: Biokatalyse der *pcPAL*-Phe137His und der *rsTAL* (jeweils 0,7 mg/ml) mit unterschiedlichen Substraten. Zur Überprüfung der Deaminierung wurden zusätzlich die zwei Biokatalysen mit *p*-Nitro-Phenylalanin in Tris-Puffer mitgeführt (in rot mit rv gekennzeichnet).

Aufgrund der unterschiedlichen Substituenten in *para*-Position wurden ebenfalls die zuvor generierten Mutanten *pcPAL*-Phe137Asp und -Glu getestet (Abbildung 47). Es wurde vor allem ein gesteigerter Umsatz der *p*-Aminozimtsäure erwartet, da diese Mutanten besonders gut die *p*-Aminogruppe binden sollten.

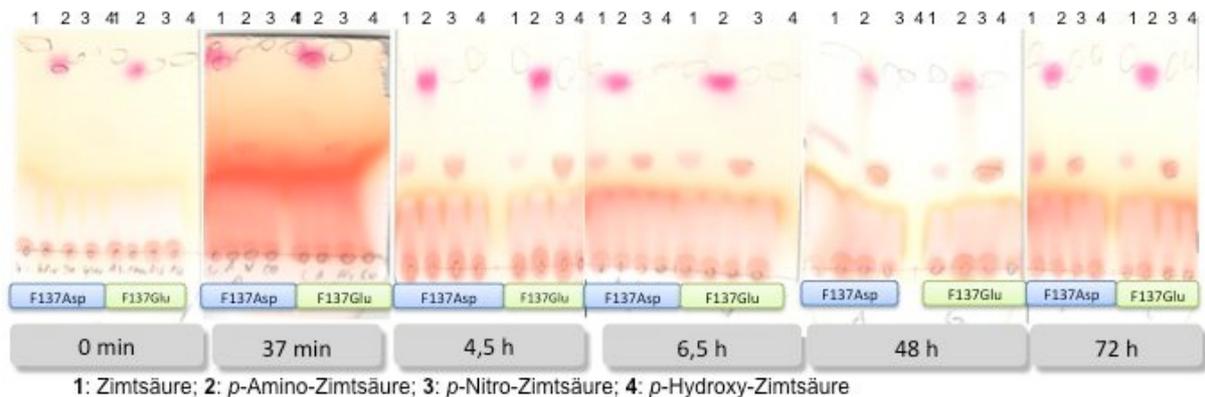


Abbildung 47: Biokatalyse der *pcPAL-F138Asp* und *pcPAL-F138Glu* Mutante (jeweils 2 mg/ml) mit unterschiedlichen Substraten.

Beide Mutanten zeigten Aktivität gegenüber Zimtsäure und *p*-Nitrozimtsäure, jedoch keine gegenüber *p*-Hydroxizimtsäure und *p*-Aminozimtsäure.

Quantitative Analytik

Die Aminierungsreaktion wurde mit verschiedenen Enzymen und Substraten etabliert. Als Assay wurde Dünnschichtchromatographie verwendet. Diese Methode ist eher qualitativ und lässt keine konkrete Quantifizierung zu. Eine alternative, quantitative Methode zur Analyse wäre eine Dünnschichtchromatographie die mit einem Flammenionisationsdetektor ausgewertet wird. Diese Methode wurde mit Hilfe einem Iatroscan[®] MK-6 Analysensystem getestet. Leider eignet sich das verwendete Laufmittel nicht für den Iatroscan[®], sodass alternativ ein Methanol:Chloroform:Eisessig-Gemisch (2:2:1) verwendet wurde. Das Laufverhalten der beim Iatroscan[®] verwendeten Quarzstäbchen (Chromarods[®]) unterscheidet sich allerdings deutlich von den Dünnschichtkarten und die Analyse-Ergebnisse stellten sich als nicht reproduzierbar heraus.

Alternativ kann „reverse phase HPLC“ (Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) zur quantitativen Analytik mit C18-Säulen verwendet werden. Dazu müssen jedoch die Proteine vor der Analytik entfernt werden. Quantitative Proteinfällung ist zum Beispiel durch Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) möglich.

Aufgrund des Endes der Projektlaufzeit war es nicht mehr möglich, die quantitative Analytik mit der HPLC zu etablieren. Erste Versuche mit Acetonitril:Wasser:TFA als Laufmittel und einer C18-Säure waren aber vielversprechend.

Biokatalyse mit dem *pcPAL*-WT

Die Aktivität in der Aminierungsreaktion wurde ebenfalls für den WT der *pcPAL* getestet. Im Hinblick auf eine quantitative HPLC-Analytik wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Proben genommen und mit Trifluoressigsäure (TFA) versetzt um die Proteine auszufällen und die Reaktion zu stoppen. Dies führe allerdings zu Komplikationen bei der Dünnschichtanalytik (Abbildung 48) weshalb nur eine 24-Stunden DC-Analyse vorlag.

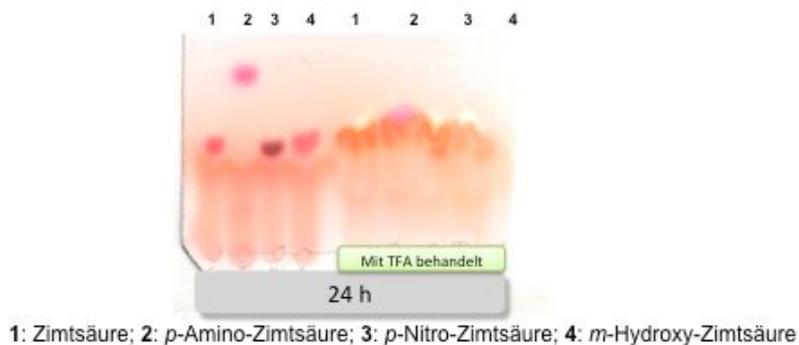


Abbildung 48: Biokatalyse des pcPAL-WT mit unterschiedlichen Substraten nach 24 h.

Zusammenfassung

Alle getesteten Biokatalysen zeigten Aktivität gegenüber α,β -ungesättigten Substraten. Auffällig hoch waren die Aktivitäten gegenüber *p*-Nitrozimtsäure. Im Gegensatz dazu zeigte *p*-Aminozimtsäure meist keine oder nur kaum Aktivität. Dies könnte auf den $-M$ -Effekt der Nitrogruppe und dem in der organischen Chemie damit verbundenen *meta*-dirigierenden Einfluss zusammenhängen. Die MIO-Gruppe greift den aromatischen Ring, von der Nitrogruppe aus gesehen, in *meta*-Stellung an. Dies könnte zu der schnellen Reaktion mit *p*-Nitrozimtsäure führen. Die Aminogruppe besitzt einen $+M$ -Effekt der in *para*- oder *ortho*-Stellung dirigiert und zu geringerer Aktivität führen könnte. Da sich diese Beobachtungen bisher aber nur auf DC-Analysen stützen, ist eine quantitative Aussage daher nicht möglich.

Eine quantitative Analyse der Biokatalysen konnte vor dem Ende der Projektlaufzeit nicht etabliert werden.

Als besonders vielversprechend könnten sich Biokatalysen unter Verwendung α,β -ungesättigter *p*-Nitroderivate wie z.B. *p*-Nitrozimtsäurealkohol, -aldehyd oder -cyanid herausstellen. Diese Substrate sind kommerziell verfügbar.

Literatur

- [1] H. Ritter, G. E. Schulz, *Plant Cell* **2004**, *16*, 3426-3436.
- [2] S. Pilbak, A. Tomin, J. RETEY, L. Poppe, *FEBS Journal* **2006**, *273*, 1004-1019.
- [3] D. Rother, L. Poppe, G. Morlock, S. Viergutz, J. Retey, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3065-3075.
- [4] K. T. Watts, B. N. Mijts, P. C. Lee, A. J. Manning, C. Schmidt-Dannert, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1317-1326.
- [5] L. Poppe, J. Rétey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3668-3688.
- [6] M. Rettig, A. Sigrist, J. RETEY, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2246-2265.
- [7] B. Schuster, J. Retey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8433-8437.
- [8] C. V. Christianson, T. J. Montavon, G. M. Festin, H. A. Cooke, B. Shen, S. D. Bruner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15744-15745.
- [9] L. Wang, A. Gamez, H. Archer, E. Abola, C. Sarkissian, P. Fitzpatrick, D. Wendt, Y. Zhang, M. Vellard, J. Bliesath, *J. Mol. Biol.* **2008**, *380*, 623-635.
- [10] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3rd Edition ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [11] R. Capasso, A. Evidente, S. Avolio, F. Solla, *J. Agr. Food Chem.* **1999**, *47*, 1745-1748.
- [12] X. Wang, X. Li, J. Xue, Y. Zhao, Y. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 413-415.

Veröffentlichung im Rahmen des Projekts:

Bartsch, S., Bornscheuer, U.T. A single residue influences the reaction mechanism of ammonia lyases and mutases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3362-3365

Posterpräsentation: Barsch, S., Bornscheuer, U.T. Change of Substrate Specificity of a Phenylalanine Ammonia Lyase. Enzyme Engineering XX Conference, Groningen, September 20-24th, 2009.