

Studien zur biotechnologischen Anwendung und ökologischen Funktion von Pyrrolochinolinchinon(PQQ)-abhängigen Alkoholdehydrogenasen

**Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität
Stuttgart genehmigte Abhandlung zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Vorgelegt von

Matthias Wehrmann

aus Düren

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Mitberichter: Prof. Dr. Ralf Takors

Vorsitzende: Prof. Dr. Ingrid Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2021

Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart

-2021-

Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Wehrmann, M., Billard, P., Martin-Meriadec, A., Zegeye, A., and Klebensberger, J. (2017). Functional role of lanthanides in enzymatic activity and transcriptional regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenases in *Pseudomonas putida* KT2440. *MBio* **8**, e00570-17. doi:10.1128/mBio.00570-17.

Autorenbeiträge:

M.W. hat die Enzyme charakterisiert. M.W. und J.K. haben die Wachstumsexperimente durchgeführt. P.B., A.M.M. und A.Z. führten die Reportergeren-Assays durch.* Der Originalentwurf des Manuskripts wurde von M.W. und J.K. erstellt. Alle Autoren haben zum Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts, zur Datenanalyse und zur Datenvisualisierung beigetragen. J.K. und P.B. haben das Projekt koordiniert und die finanzielle Unterstützung für das Projekt akquiriert.

Wehrmann, M. and Klebensberger, J. (2018). Engineering thermal stability and solvent tolerance of the soluble quinoprotein PedE from *Pseudomonas putida* KT2440 with a heterologous whole-cell screening approach. *Microb. Biotechnol.* **11**, 399–408. doi:10.1111/1751-7915.13036.

Autorenbeiträge:

M.W. und J.K. haben den Enzymtest entwickelt und die Mutantenbibliotheken konzipiert. M.W. hat die Mutantenbibliotheken erstellt und durchmustert und die Enzyme charakterisiert.* Der Originalentwurf des Manuskripts wurde von M.W. und J.K. erstellt. Alle Autoren haben zum Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts, zur Datenanalyse und zur Datenvisualisierung beigetragen. J.K. hat das Projekt koordiniert und die finanzielle Unterstützung für das Projekt akquiriert.*

Wehrmann, M., Berthelot, C., Billard, P., and Klebensberger, J. (2018). The PedS2/PedR2 two-component system is crucial for the rare earth element switch in *Pseudomonas putida* KT2440. *mSphere* **3**, 1–12. doi:10.1128/mSphere.00376-18.

Autorenbeiträge:

M.W. und J.K. haben die Wachstumsexperimente durchgeführt. C. B. und P.B. führten die Reportergeren-Assays durch.* Der Originalentwurf des Manuskripts wurde von M.W. und J.K. erstellt. Alle Autoren haben zum Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts, zur Datenanalyse und zur Datenvisualisierung beigetragen. J.K. und P.B. haben das Projekt koordiniert und die finanzielle Unterstützung für das Projekt akquiriert.

Wehrmann, M., Berthelot, C., Billard, P., and Klebensberger, J. (2019). Rare earth element (REE)-dependent growth of *Pseudomonas putida* KT2440 relies on the ABC-transporter PedA1A2BC and is influenced by iron availability. *Front. Microbiol.* **10**, 670216. doi:10.3389/fmicb.2019.02494.

Autorenbeiträge:

M.W. und P.B. haben die Wachstumsexperimente durchgeführt. C. B. und P.B. führten die Reportergeren-Assays durch.* Der Originalentwurf des Manuskripts wurde von M.W. und J.K. erstellt. Alle Autoren haben zum Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts, zur Datenanalyse und zur

Datenvisualisierung beigetragen. J.K. und P.B. haben das Projekt koordiniert und die finanzielle Unterstützung für das Projekt akquiriert.

Wehrmann, M., Toussaint, M., Pfannstiel, J., Billard, P., and Klebensberger, J. (2020). The Cellular Response to Lanthanum Is Substrate Specific and Reveals a Novel Route for Glycerol Metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *MBio* **11**, 567529. doi:10.1128/mBio.00516-20.

Autorenbeiträge:

M.W., M.T. und P.B. haben die Wachstumsexperimente durchgeführt. M.W. hat die Enzymtests durchgeführt. J.P. hat die Proteommessungen durchgeführt.* Der Originalentwurf des Manuskripts wurde von M.W. und J.K. erstellt. Alle Autoren haben zum Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts, zur Datenanalyse und zur Datenvisualisierung beigetragen. J.K. und P.B. haben das Projekt koordiniert und die finanzielle Unterstützung für das Projekt akquiriert.

Wehrmann, M., Elsayed, E.M., Köbbing, S., Bendz, L., Lepak, A., Schwab, J., Wierckx, N., Bange, G., Klebensberger, J. (2020). Engineered PQQ-dependent alcohol dehydrogenase for the oxidation of 5-(hydroxymethyl)furoic acid. *ACS Catal.* **10**, 7836–7842. doi:10.1021/acscatal.0c01789

Autorenbeiträge:

M.W. und L.B. haben den Enzymtest entwickelt und die Mutantenbibliotheken durchmustert. M.W. und J.K. haben die Mutantenbibliotheken konzipiert. M.W. und E.M.E. haben die Enzyme charakterisiert. E.M.E., A.L. und J.S. haben die Enzyme kristallisiert und die Enzymstruktur bestimmt. S.K. hat die HPLC-Messungen durchgeführt.* Der Originalentwurf des Manuskripts wurde von M.W. und J.K. erstellt. Alle Autoren haben zum Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts, zur Datenanalyse und zur Datenvisualisierung beigetragen. J.K., P.B. und N.W. haben das Projekt koordiniert und J.K. und G.B. haben die finanzielle Unterstützung für das Projekt akquiriert.

**Für Experimente, die nicht von Matthias Wehrmann durchgeführt wurden, ist der jeweilige Experimentator in der Sektion Material und Methoden angegeben.*

Weitere Ergebnisse, die nicht in dieser Arbeit enthalten sind:

Li W., Jayakody L. N., Franden M. A., **Wehrmann M.**, Daun T., Hauer B., Blank L. M., Beckham G. T., Klebensberger J., Wierckx N. (2019). Laboratory evolution reveals the metabolic and regulatory basis of ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **21**, 3669–3682. doi:10.1111/1462-2920.14703.

Eigenständigkeitserklärung

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Studien zur Biotechnologische Anwendungen und ökologische Funktion von Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängigen Alkoholdehydrogenasen*“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled '*Biotechnological applications and ecological relevance of pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent alcohol dehydrogenases*' is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Toulouse, den 24.04.2021

Matthias Wehrmann

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Hauer für die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die Übernahme der offiziellen Promotionsbetreuung sowie die großartigen Arbeitsbedingungen am Institut für Biochemie und Technische Biochemie bedanken.

Frau Prof. Dr. Ingrid Weiss und Herrn Prof. Dr. Ralf Takors danke ich herzlich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bzw. der Zweitkorrektur.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Janosch Klebensberger für die Überlassung eines solch interessanten Promotionsprojekts, die herausragende Betreuung, die unzähligen hilfreichen Ratschläge sowie die vielen spannenden und inspirierenden Diskussionen bedanken.

Herzlichst möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Dr. Patrick Billard, Dr. Charlotte Berthelot, Dr. Maxime Toussaint und Dr. Asfaw Zegeye von der Université de Lorraine in Nancy möchte ich für die Zusammenarbeit bei den Reportergeratemessungen und den Wachstumsexperimenten danken. Dr. Jens Pfannstiel von der Universität Hohenheim möchte ich für die Proteom-Messungen danken und für die Hilfe bei der Auswertung der Proteomdaten. Prof. Dr. Nick Wierckx vom Forschungszentrum Jülich und Sebastian Köbbing von der RWTH Aachen möchte ich für die Bestimmung und Messung der verschiedenen Furanderivate danken. Prof. Dr. Gert Bange, Dr. Alexander Lepak und Eslam Elsayed von der Philipps-Universität in Marburg möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der PQQ-Enzyme danken. Prof. Dr. Scott Rice und Prof. Dr. Julien Lescar von der Nanyang Technological University in Singapur möchte ich für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen während meines Forschungsaufenthalts danken. Bei Lin Jianqing und Dr. Zhu Xinyi von der Nanyang Technological University in Singapur möchte ich mich für die Einführung in die Proteinkristallisation bzw. die Unterstützung bei verschiedenen physiologischen Experimenten bedanken.

Lena Stehle, Svenja Moors und Laura Bendz gilt mein aufrichtiger Dank für Ihre großartige Arbeit an verschiedenen Teilprojekten während ihrer Zeit als Bachelor- bzw. Masterstudenten.

Bei Frau Christiane Klumpp-Klug möchte ich mich für die vielfache organisatorische Hilfe bedanken.

Für die tolle gemeinsame Zeit, viele schöne Momente und die großartige Kollegialität untereinander möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanken. Ganz besonderer Dank gilt hierbei Dr. Bernd Nebel für die Unterstützung im Bereich der Analytik sowie Dr. Sven Benson und Dr. Patrick Buchholz dafür, dass sie einen Teil ihres bioinformatischen Wissens mit mir geteilt haben.

Meiner Familie möchte ich für die stetige Unterstützung in allen meinen Vorhaben danken. Ein besonderer Dank geht an Julie für den Rückhalt, die Kraft und die Freude die Sie mir in den letzten Jahren gespendet hat. Am allermeisten möchte ich aber meinen Eltern danken dafür, dass sie immer für mich da waren und mich mein Leben lang unterstützt haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung der Arbeit innerhalb des Förderprojekts „Proteindesign und Stammentwicklung für die Ganzzellbiokatalyse mittels Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängiger Oxidoreduktasen“ (Projektnummer: 254226746 [KL 2340/2-1]).

Inhaltsverzeichnis

VERÖFFENTLICHUNGEN	I
EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	III
DANKSAGUNG	IV
INHALTSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
ZUSAMMENFASSUNG	XVI
ABSTRACT	XIX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Biokatalyse	1
1.1.1 <i>Steuerung und Veränderung von Biokatalysatoren</i>	2
1.1.1.1 Gerichtete Evolution von Enzymen.....	2
1.1.1.2 Semi-rationales Enzymdesign	4
1.1.1.3 Rationales Design und de-novo-Design von Enzymen	5
1.1.2 <i>Isolierte Enzyme und Ganzzellkatalyse</i>	6
1.1.3 <i>Wahl des Wirtsorganismus für die Ganzzellkatalyse</i>	7
1.1.4 <i>Pseudomonas putida als Wirtsorganismus für die Biokatalyse</i>	8
1.2 Die Oxidation von Alkoholen in der Biokatalyse	11
1.2.1 <i>NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenasen</i>	11
1.2.2 <i>Alkoholoxidasen</i>	12
1.2.2.1 Cu-abhängige Alkoholoxidasen.....	13
1.2.2.2 Flavincofaktor-abhängige Alkoholoxidasen.....	14
1.2.3 <i>Pyrrlochinolinchinon(PQQ)-abhängige Glucosedehydrogenasen</i>	14
1.2.4 <i>PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen</i>	15
1.2.4.1 PQQ-Methanoldehydrogenasen.....	18
1.2.4.2 PQQ-Ethanoldehydrogenasen	21
1.2.4.3 Reaktionsmechanismus von PQQ-ADHs	23
1.2.4.4 Biotechnologische Anwendungen von PQQ-ADHs.....	26
1.3 Motivation.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 Materialien	31
2.1.1 <i>Bakterienstämme und Plasmide</i>	31

2.1.2	Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	39
2.2	Mikrobiologische Methoden	45
2.2.1	Stammhaltung.....	45
2.2.2	Wachstumsexperimente.....	45
2.2.3	Konstruktion der verwendeten <i>P. putida</i> -Stämme.....	46
2.2.4	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	48
2.2.5	Aufreinigung His ₆ -getagter Proteine.....	48
2.2.6	Reportergen-Assay.....	49
2.2.7	Proteinextraktion zur vergleichenden Proteomanalyse	49
2.2.7.1	Proteinverdau und Peptidaufreinigung	50
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	51
2.3.2	DNA-Aufreinigung.....	51
2.3.3	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	51
2.3.4	DNA-Sequenzierung	51
2.3.5	Restriktionsverdau.....	52
2.3.6	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion.....	52
2.3.7	Herstellung elektrokompenter Zellen	53
2.3.8	Transformation mittels Elektroporation.....	53
2.3.9	Assemblierung von DNA-Fragmenten.....	54
2.3.10	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	54
2.3.11	Konstruktion und Evaluation von Mutantenbibliotheken.....	55
2.3.12	Konstruktion der Deletionsplasmide	55
2.3.13	Konstruktion der mini-Tn7-Plasmide.....	56
2.3.14	Konstruktion der Punktmutanten <i>Ped</i> ^{ES295D} , <i>Ped</i> ^{HD295S} , <i>Ped</i> ^{HD295T} und <i>Ped</i> ^{HD295A}	56
2.3.15	Konstruktion der Mutantenbibliotheken zur Änderung der Substratspezifität von <i>PedH</i>	57
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	59
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	59
2.4.2	Kolorimetrischer Aktivitätstest für PQQ-abhängige Alkohol-dehydrogenasen	59
2.4.3	Enzym-Kinetiken.....	60
2.4.4	Stabilitätsbestimmung aufgereinigter PQQ-ADHs.....	61
2.4.5	Ganzzell-Aktivitätstest für heterolog in <i>E. coli</i> BL21(DE3) produzierte PQQ-ADHs	61
2.4.6	Durchmusterung von Mutantenbibliotheken für erhöhte Temperaturbeständigkeit.....	62

2.4.7	<i>Biotransformation von 2-Phenylethanol</i>	63
2.4.8	<i>Enzymaktivitätstest mit Zellkolonien (Solid-Phase-Assay)</i>	63
2.4.9	<i>Durchmusterung der Mutantenbibliotheken nach Varianten hinsichtlich Enzymaktivität mit 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) bzw. Glycolsäure</i>	64
2.4.10	<i>Biotransformation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA)</i>	65
2.5	Analytische Methoden	66
2.5.1	<i>Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)</i>	66
2.5.2	<i>Gaschromatographie</i>	66
2.5.3	<i>Proteinmassenspektrometrie</i>	67
2.6	<i>In-silico-Methoden</i>	69
2.6.1	<i>Erstellung von Homologiemodellen</i>	69
2.6.2	<i>Molekulares Docking</i>	69
2.6.3	<i>Sequenzidentitätsbestimmung</i>	70
2.6.4	<i>Proteinquantifizierung und Analyse der Proteomdaten</i>	70
2.6.5	<i>Statistische Auswertung</i>	71
3	ERGEBNISSE	72
3.1	Charakterisierung der PQQ-ADHs PedE und PedH	72
3.1.1	<i>Substratspektrum</i>	75
3.1.2	<i>Kinetische Konstanten von PedE und PedH</i>	76
3.2	Verbesserung der Enzymstabilität der PQQ-ADH PedE durch semi-rationales Design 78	
3.2.1	<i>Entwicklung eines heterologen Ganzzell-Aktivitätstests für PQQ-ADHs</i>	78
3.2.2	<i>Heterologer Ganzzell-Aktivitätstest in Flüssigkulturen</i>	78
3.2.3	<i>Identifizierung von Positionen in PedE zur Erhöhung der Thermostabilität</i>	80
3.2.4	<i>Durchsuchung der Mutantenbibliotheken und Identifizierung kombinatorischer Stabilitätsvarianten</i>	81
3.2.5	<i>Charakterisierung der thermostabilen Varianten</i>	83
3.3	Änderung der Metallcofaktor-Spezifität von PedE.....	86
3.4	Entwicklung einer PQQ-ADH für die Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA)	90
3.5	Physiologische Rolle der PQQ-ADHs PedE und PedH.....	97
3.5.1	<i>Lanthanide beeinflussen das Wachstum von P. putida KT2440 auf verschiedenen volatilen Alkoholverbindungen</i>	97
3.5.2	<i>Ln³⁺ verursacht eine inverse Regulierung von pedE und pedH während des Wachstums auf alkoholischen VOCs</i>	99

3.5.3	<i>Das PedH-Protein beeinflusst die Ln³⁺-abhängige Genregulation in P. putida KT2440.</i>	102
3.5.4	<i>Die Sensorhistidinkinase PedS2 ist essentiell für die Ln³⁺-abhängige Regulation von pedE.</i>	103
3.5.5	<i>Das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 reguliert die La³⁺-abhängige Transkription von pedE.</i>	105
3.5.6	<i>Das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 reguliert die partielle Repression von pedH in Abwesenheit von La³⁺.</i>	107
3.5.7	<i>Die konservierte Phosphorylierungsstelle D53 in PedR2 ist essentiell für die La³⁺-abhängige Genregulation von pedE und pedH.</i>	108
3.6	<i>Übergangsmetalle beeinflussen das Ln³⁺-abhängige Wachstum von P. putida KT2440.</i>	110
3.6.1	<i>Eisen beeinflusst das Ln³⁺-abhängige Wachstum von P. putida KT2440.</i>	110
3.6.2	<i>Pyoverdine sind nicht notwendig für PedH-abhängiges Wachstum bei niedrigen La³⁺-Konzentrationen.</i>	112
3.6.3	<i>Die Ln³⁺-abhängige Genregulation in P. putida KT2440 wird durch das Konzentrationsverhältnis von Fe^{2+/3+} zu La³⁺ beeinflusst.</i>	114
3.7	<i>Aufnahme von Seltenerdmetallen in P. putida KT2440.</i>	116
3.7.1	<i>Das ABC-Transportsystem pedA1A2BC ist notwendig für PedH-abhängiges Wachstum bei niedrigen La³⁺-Konzentrationen.</i>	116
3.8	<i>La³⁺-bedingten Veränderungen im Proteom von P. putida KT2440 sind substratspezifisch und zeigen einen neuen Glycerolstoffwechselweg auf.</i>	122
3.8.1	<i>Bewertung der Proteomdaten</i>	122
3.8.2	<i>La³⁺-abhängige Veränderungen im Proteom während des Wachstums auf verschiedenen Substraten</i>	123
3.8.3	<i>La³⁺-bedingte Unterschiede im Wachstum von P. putida KT2440 auf Glycerol</i>	125
4	DISKUSSION	133
4.1	<i>Charakterisierung der PQQ-ADHs PedE und PedH aus P. putida KT2440.</i>	133
4.2	<i>Verbesserung der Enzymstabilität der PQQ-ADH PedE durch semi-rationales Design</i>	136
4.3	<i>Änderung der Metallcofaktor-Spezifität von PedE</i>	139
4.4	<i>Entwicklung einer PQQ-ADH zur Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA)</i>	142
4.5	<i>Physiologische Rolle der PQQ-ADHs PedE und PedH</i>	146

4.6	Die Kontrolle der Ln^{3+} -abhängigen Regulation von <i>pedE</i> und <i>pedH</i> erfolgt durch das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 und das PedH-Protein.	149
4.7	Übergangsmetalle beeinflussen das Ln^{3+} -abhängige Wachstum von <i>P. putida</i> KT2440.	153
4.8	Das ABC-Transportsystem PedA1A2BC ist essentiell für effektives Ln^{3+} -abhängiges Wachstum von <i>P. putida</i> KT2440.	155
4.9	La^{3+} -bedingte Veränderungen im Proteom von <i>P. putida</i> KT2440 sind substratspezifisch und zeigen einen neuen Glycerolstoffwechselweg auf.	158
5	AUSBLICK	163
6	ANHANG	166
7	LITERATURVERZEICHNIS	189

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	micro
μ _{max}	Maximale Wachstumsrate
5-FU	5-Fluorouracil
6-APA	6-Aminopenicillansäure
A	Ampère
Å	Ångström
ADH	Alkoholdehydrogenase
AGC	automatische Verstärkungsregelung (engl. <i>automatic gain control</i>)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
CASTing	engl. <i>Combinatorial Active-Site Saturation Test</i>
CDW	Zellrockengewicht (engl. <i>cell dry weight</i>)
C _{end}	Endkonzentration
COG	engl. <i>cluster of orthologous protein groups</i>
CTP	Cytidintriphosphat
<i>D</i>	dextro aus lat. <i>dexter</i> = rechts
Da	Dalton
DCPIP	2,6-Dichlorophenolindophenol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonikleunsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Enzymaktivität
EDH	Ethanoldehydrogenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Enantiomerenüberschuss
EGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
ESI	Elektrosprayionisation
ExaA	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-EDH aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1
F	Faraday

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDCA	2,5-Furandicarbonsäure
FDR	Falscherkennungsrate (engl. <i>false discovery rate</i>)
FFCA	5-Formyl-2-furancarbonsäure
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanosin
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
GDH	Glucosedehydrogenase
Gent	Gentamicin
Ggf.	gegebenenfalls
GLDH	Glyceroldehydrogenase
GOX	Galactoseoxidase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCD	engl. <i>high-energy collision dissociation</i>
HF	engl. <i>high-fidelity</i>
HMF	5-(Hydroxymethyl)furfural
HMFA	5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure
HMF-OH	2,5-Bis(hydroxymethyl)furan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
k	kilo
K	degenerierter Codon der für Guanosin oder Thymin steht
<i>K. vulgare</i>	<i>Ketogulonigenium vulgare</i>
Kan	Kanamycin
k_{cat}	Wechselzahl/katalytische Konstante
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	katalytische Effizienz
K_{d}	Dissoziationskonstante
K_{M}	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
<i>L</i>	laevo aus lat. <i>laevus</i> = links
LB	engl. Lysogeny broth (Lauria-Bertani)
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LFQ	Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (engl. <i>label-free quantification</i>)
Ln	Lanthanide
\log_x	Logarithmus zur Basis x

m	milli oder Meter
M	molar
<i>M. buryatense</i>	<i>Methylomicrobium buryatense</i>
<i>M. extorquens</i>	<i>Methylorubrum extorquens</i> oder <i>Methylobacterium extorquens</i>
<i>M. mobilis</i>	<i>Methylotenera mobilis</i>
<i>M. tundripaludum</i>	<i>Methylobacter tundripaludum</i>
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MD	Molekulardynamik
MDH	Methanoldehydrogenase
min	Minute oder minimal
MISO	engl. Multichange Isothermal Mutagenesis
MIT	maximal Injektionszeit
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
MS/MS	Tandemmassenspektroskopie
MWCO	engl. <i>molecular weight cut off</i>
MxaFI	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-MDH
n	nano
N	degenerierter Codon der für Adenosin, Cytidin, Guanosin oder Thymidin steht
n. d.	nicht detektiert
n. t.	nicht getestet
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ /NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
o/n	über Nacht
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OD ₆₀₀ ^{max}	maximale OD ₆₀₀ in der stationären Wachstumsphase
p	pico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PedE	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-EDH aus <i>P. putida</i> KT2440
PedH	REE-abhängige PQQ-EDH aus <i>P. putida</i> KT2440
PedR2	LuxR-artiges Regulationsprotein in <i>P. putida</i> KT2440 welches zusammen in REE-abhängiger Regulation der PQQ-ADHs involviert ist.
PedS2	Sensorhistidinkinase in <i>P. putida</i> KT2440 welche in REE-abhängiger Regulation der PQQ-ADHs involviert ist
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat

pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PIPES	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethansulfonsäure)
PLP	Pyridoxylphosphat
PMS	Phenazinmethosulfat
ppm	engl. <i>parts per million</i>
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PQQ-ADH	PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenase
PQQ-EDH	PQQ-abhängige Ethanoldehydrogenase
PQQ-GDH	PQQ-abhängige Glucosedehydrogenase
PQQ-MDH	PQQ-abhängige Methanoldehydrogenase
REE	Seltenerdmetall (engl. <i>Rare earth element</i>)
RMSD	Wurzel aus der mittleren quadratischen Verschiebung engl. <i>root-mean-square-deviation</i>
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEL	Spurenelementlösung
SOC	engl. <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
T ₅₀ ⁶⁰	Temperatur die bei einstündiger Inkubation notwendig ist um die Restaktivität 50 % der Anfangsaktivität zu reduzieren
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	engl. <i>Twin-arginin-translocation</i>
TCS	Zweikomponentensystem (engl. <i>two-component system</i>)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxyl
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Enzymeinheit
V	Volt
v	Volumen
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vergl.	vergleiche
VOC	Volatile Kohlenstoffverbindungen (engl. <i>volatile organic compound</i>)
vs.	lat. <i>versus</i>
w	Gewicht (engl. <i>weight</i>)
XoxF	REE-abhängige PQQ-MDH
z. B.	zum Beispiel
α	Signifikanzniveau

ε	Extinktionsfaktor
λ	Latenzzeit
Ω	Ohm

Zusammenfassung

Pyrrolochinolinchinon-abhängige Alkoholdehydrogenasen (PQQ-ADHs) kommen im Periplasma einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien vor, wo sie verschiedene Alkohole und Aldehyde irreversibel oxidieren. Neben PQQ benötigen sie ein Ca^{2+} - oder ein Lanthanidion (Ln^{3+}) als Metallcofaktor und sind somit die einzigen in der Natur bekannten Seltenerdmetall (REE)-abhängigen Enzyme. Besonders für Ganzzellanwendungen versprechen PQQ-ADHs aufgrund ihrer periplasmatischen Lage eine einfache Produktaufreinigung und eine hohe Toleranz gegenüber potentiell cytotoxischen Reaktionsprodukten. Bis heute sind jedoch nur wenige biotechnologische Anwendungen bekannt. Mit dem Ziel PQQ-ADHs für die Biokatalyse zu etablieren, wurden deshalb in einem ersten Schritt die beiden PQQ-ADHs PedE und PedH aus *P. putida* KT2440 eingehend charakterisiert. Während PedE ein Ca^{2+} -abhängiges Enzym ist, konnte PedH als erste REE-abhängige PQQ-ADH aus einem nicht-methylotrophen Organismus identifiziert werden. Es stach besonders hervor, dass PedH im Gegensatz zu bisher bekannten REE-abhängigen PQQ-ADHs auch schwere Lanthanide, wie Tb^{3+} oder Yb^{3+} , sowie das nicht-lanthanidische REE-Ion Y^{3+} als Metallcofaktor verwenden kann.

PedH besitzt einen für alle Ln^{3+} -abhängigen PQQ-ADHs charakteristischen Aspartat-Rest (D195) in der Koordinationssphäre des Metallcofaktors, wohingegen in PedE an gleicher Position ein Serin-Rest (S195) anzutreffen ist. Durch die Substitution S295D konnte PedE von einem Ca^{2+} -abhängigen Enzym in ein ausschließlich mit REE-Ionen aktives Enzym (PedE^{S295D}) verwandelt werden. Eine genaue Charakterisierung ergab, dass PedE^{S295D} mit dem gleichen Spektrum an REEs wie PedH enzymatisch aktiv ist und mit schweren Ln^{3+} -Ionen wie Yb^{3+} oder dem nicht-lanthanidischen REE-Ion Y^{3+} eine im Vergleich zu PedH weitaus höhere spezifische Enzymaktivität aufweist.

Enzymstabilität ist für biotechnologische Anwendungen von großer Bedeutung, da sie die Funktion eines Enzyms unter den jeweiligen Prozessbedingungen gewährleistet und die Toleranz eines Enzyms gegenüber Mutationen in Enzym-Engineering-Verfahren stark verbessert. Mithilfe eines neuentwickelten Enzymtests, der es erlaubt, Aktivitäten von PQQ-ADHs direkt in *E. coli* BL21(DE3)-Flüssigkulturen zu messen, wurden PedE-Mutantenbibliotheken durchmustert. Hierbei wurden drei Aminosäurepositionen identifiziert, die zu signifikanten Verbesserungen der

Thermostabilität von PedE beitragen. Durch die Kombination der besten Mutationen an den jeweiligen Positionen wurde die Variante PedE^{R91D/E408P/N410K} generiert, welche eine um 7°C erhöhte Thermostabilität aufweist und eine zweifach höhere Restaktivität nach Inkubation in Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösung besitzt im Vergleich zum Wildtypenzym.

2,5-Furandicarbonsäure (FDCA) ist eine nachhaltige Alternative zur Phthalsäure, da sie aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden kann. Ein entscheidender Schritt in der enzymatischen Produktion von FDCA aus 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) ist die Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA). Mithilfe eines neu entwickelten Enzymtests, welcher Aktivitätsmessungen von PQQ-ADHs in *E. coli*-Kolonien ermöglicht, wurden PedH-Mutantenbibliotheken nach HMFA-Aktivität durchmustert. Hierbei wurden drei Varianten identifiziert, welche HMFA zu FFCA oxidieren können. Die aktivste Variante PedH^{F375V/W521A} zeigte bessere kinetische Parameter als bekannte HMFA-oxidierende Enzyme und kann somit als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse zur Produktion von FDCA aus HMF dienen.

Da *P. putida* KT2440 nicht nur in seinem natürlichen Lebensraum, sondern auch in biotechnologischen Anwendungen einer Vielzahl an alkoholischen Kohlenstoffverbindungen ausgesetzt ist, wurde in dieser Arbeit auch die Funktionsweise des PQQ-ADH-abhängigen Oxidationssystems sowie dessen Einfluss auf das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PedE und PedH essentiell für das Wachstum von *P. putida* KT2440 auf verschiedenen Alkoholverbindungen sind und Ln³⁺-abhängig invers reguliert werden. Das Zweikomponentensystem, bestehend aus der Sensorhistidinkinase PedS2 und dem Regulationsprotein PedR2, fungiert hierbei als zentrales Element für die Ln³⁺-abhängige Regulation von *pedE* und *pedH*. Auch die Gegenwart von Cu, Zn und Fe beeinflusst die Ln³⁺-bedingte Regulation der PQQ-ADHs. Die Anwesenheit von Fe erhöht die minimale Ln³⁺-Konzentration, ab der eine inverse Genregulation der PQQ-ADHs beobachtet werden kann, um mehrere Größenordnungen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Fehlmetallierung von potentiell Ln³⁺-bindenden Proteinen, wie der Sensorhistidinkinase PedS2, sein.

Mithilfe von Wachstumsexperimenten und Reportergergenmessungen wurde der ABC-Transporter PedA1A2BC identifiziert, der essentiell für PedH-bedingtes Wachstum

bei geringer (nanomolarer) Ln^{3+} -Verfügbarkeit ist und höchstwahrscheinlich die cytoplasmatische Aufnahme von Ln^{3+} -Ionen ermöglicht. Nach Deletion von *pedA1A2BC* ist eine ungefähr 100-fach höhere Ln^{3+} -Konzentration für PedH-abhängiges Wachstum erforderlich, wohingegen die Ln^{3+} -bedingte Unterdrückung PedE-abhängigen Wachstums von dieser Deletion nicht beeinflusst wird.

Proteommessungen während des Wachstums auf verschiedenen Modellsubstraten zeigten, dass abgesehen von der PQQ-ADH PedE, die unter jeder getesteten Bedingung identifiziert wurde, die La^{3+} -bedingten Unterschiede im Proteinvorkommen zum überwiegenden Teil substratspezifisch sind. Einhergehend mit den Veränderungen im Proteom konnte ein neuer Glycerolstoffwechselweg in *P. putida* KT2440 identifiziert werden, der durch PedE- bzw. PedH-katalysierte Glycerol-Oxidation eingeleitet wird. Dieser Stoffwechselweg verläuft parallel zu dem von *glpFKRD* kodierten Stoffwechselweg und ermöglicht ein früheres Eintreten in die exponentielle Wachstumsphase, was *P. putida* KT2440 einen Wettbewerbsvorteil während des Wachstums auf Glycerol bereitet.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit nicht nur PQQ-ADHs für industriell wertvolle Anwendungen entwickelt werden, sondern auch entscheidende neue Einblicke in die Metallcofaktor-Interaktion, die Funktionsweise, die Regulation sowie die physiologische Rolle von PQQ-ADHs unter einer Vielzahl von Kultivierungsbedingungen gewonnen werden.

Abstract

Pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent alcohol dehydrogenases (PQQ-ADHs) reside in the periplasm of a plethora of Gram-negative bacteria where they catalyze the oxidation of various alcohols and aldehydes. Next to PQQ, they either rely on a Ca^{2+} -ion or a lanthanide (Ln^{3+})-ion as metal cofactor and are the only known enzyme class that utilizes rare earth elements (REEs) for catalytic activity. PQQ-ADHs represent ideal enzymes for whole cell applications due to their periplasmic localization, which not only facilitates product purification but also promises high tolerance towards potentially cytotoxic reaction products. However, biotechnological applications of PQQ-ADHs are still scarce. With the aim of establishing PQQ-ADHs for biocatalysis, the two PQQ-ADHs PedE and PedH of *P. putida* KT2440 were characterized in a first step. While PedE is dependent on Ca^{2+} as metal cofactor, PedH was identified as the first Ln^{3+} -dependent PQQ-ADH in a non-methylotrophic organism. In contrast to known PQQ-ADHs, PedH also exhibits catalytic activity with „heavy“ lanthanides such as Tb^{3+} or Yb^{3+} as well as the non-lanthanide rare earth element (REE) Y^{3+} .

PedH possesses an aspartate residue in the metal cofactor coordination sphere (D195) that is characteristic for all Ln^{3+} -dependent PQQ-ADHs, whereas in PedE a serine (S195) can be found at the corresponding position. By replacing S295 with aspartate, PedE was converted from a Ca^{2+} -dependent enzyme into a PQQ-ADH (PedE^{S295D}) that is only functional in the presence of REEs. A detailed characterization revealed that PedE^{S295D} is active with the same spectrum of REEs as PedH and displays compared to PedH higher catalytic activities with heavy lanthanides like Yb^{3+} or the non-lanthanide REE Y^{3+} .

Enzyme stability is of crucial importance for biotechnological applications, as it ensures the productivity under a given process condition and increases robustness towards mutations, which are necessary when engineering enzymes with novel functionalities. PedE mutant libraries were screened for increased enzyme stability using a newly developed enzyme assay suitable for probing PQQ-ADH activity in liquid *E. coli* cultures. Three different positions were identified that significantly increase temperature stability of PedE. By combining the best variants at each position, the variant PedE^{R91D/E408P/N410K} was generated that exhibited an about 7°C

increased thermal stability and an about two-fold increased residual activity upon incubation in DMSO in comparison to the wildtype enzyme.

Furan-2,5-dicarboxylic acid (FDCA) is considered a promising alternative to phthalic acid as it can be produced from renewable resources. An important step in the biocatalytic production of FDCA from 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF) is the oxidation of 5-(hydroxymethyl)furoic acid (HMFA) to 5-formylfuroic acid (FFCA). Based on semi-rationally designed mutant libraries and a newly developed high-throughput method for screening PQQ-ADH activity in *E. coli* colonies PedH was engineered for HMFA oxidation. Thereby, several PedH variants with activity towards HMFA were identified and the most active variant PedH^{F375V/W521A} displayed kinetic characteristics superior to known HMFA oxidizing enzymes. This variant could serve as a starting point for the development of new biocatalytic processes for the production of FDCA from HMF.

P. putida K2400 is exposed to a variety of alcoholic compounds, not only in its natural environment but also during various biotechnological applications. Therefore, also the functionality of the PQQ-ADH dependent oxidation system as well as its phenotypic consequences under various culture conditions were characterized. PedE and PedH were discovered to be essential for growth on various alcohol containing C-sources and to be inversely regulated in response to Ln³⁺. The two-component system consisting of the sensor histidine kinase PedS2 and the LuxR-like response regulator PedR2 were identified to be essential for the Ln³⁺-dependent regulation of *pedE* and *pedH*. Also the transition metals Cu, Zn and Fe were found to manipulate the Ln³⁺-dependent regulation of the PQQ-ADHs. In the presence of Fe, the minimal Ln³⁺ concentration required for a transition from PedE-dependent to PedH-dependent growth was elevated by several orders of magnitude. High Fe^{2+/3+}/Ln³⁺ ratios most likely cause mismetallation of putative Ln³⁺-binding proteins, such as the sensor histidine kinase PedS2, and thereby alter the outcome of the “Ln³⁺-switch”.

Based on growth experiments and reporter gene assays, the ABC-transporter *pedA1A2BC* was identified to be essential for PedH-dependent growth under conditions of low (nanomolar) Ln³⁺ availability. While Ln³⁺-dependent repression of *pedE* was not affected in a *pedA1A2BC* deletion strain about 100-fold increased Ln³⁺-concentrations were required for PedH-dependent growth of strain Δ *pedE*

$\Delta pedA1A2BC$. This suggests that the cytoplasmic uptake of Ln^{3+} is essential for proper functioning of PedH when Ln^{3+} bioavailability is limited.

Proteomics measurements during growth on four different carbon sources revealed that the cellular response of *P. putida* KT2440 towards La^{3+} is mostly substrate specific apart from the “ Ln^{3+} -switch”, as only PedE was identified to be differentially abundant under all tested culture conditions. Along with the proteomic changes a novel pathway for glycerol metabolism was identified in *P. putida* KT2440 that is initiated by the PedE- and/or PedH-catalyzed oxidation of glycerol. This pathway works in parallel to the known glycerol degradation pathway encoded by *glpFKRD* and provides a growth advantage for *P. putida* cells as it allows a faster onset of growth on glycerol.

In summary, this work not only describes the engineering of PQQ-ADHs with valuable functionalities for industrial applications but also provides a deeper understanding on their metal-binding mode, their regulation and their physiological function under various culture conditions.

1 Einleitung

1.1 Biokatalyse

Als Geburtsstunde der modernen Biokatalyse, definiert als die Verwendung von Enzymen zur chemischen Synthese, werden heutzutage häufig die Studien zur kinetischen Racematspaltung von Weinsäure genannt (Hughes and Lewis, 2018; Liese and Seelbach, 2006). Im Jahr 1858 gelang Louis Pasteur mithilfe von *Penicillium glaucum* die Isolation von (-)-Weinsäure aus einem racemischem Gemisch (Pasteur, 1858). Die Verwendung von Enzymen zur gezielten chemischen Transformation von Stoffen kann jedoch bis auf das Jahr 11000 v. Chr. zurückgeführt werden (Liu et al., 2018b). Ohne Wissen um ihre eigentliche Existenz wurden Enzyme als Teil von Mikroorganismen schon in der Frühgeschichte, sowohl in China als auch im vorderen Orient, zur Produktion von Nahrungsmitteln, wie Wein, Bier oder Brot, eingesetzt (Liese and Seelbach, 2006; McGovern et al., 2004). Da Enzyme eine bis zu 10^{17} -fache Beschleunigung von Reaktionsraten und exzellente Regio- und Stereospezifität bei milden Reaktionsbedingungen ermöglichen, werden sie heutzutage gerne als kostengünstige und umweltfreundliche Alternative zur klassischen, chemischen Synthese eingesetzt (Hollmann et al., 2011; Radzicka and Wolfenden, 1995). Eine große Anzahl an biokatalytischen Prozessen hat deshalb seitdem in der chemischen, pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie Einzug gehalten (Bornscheuer et al., 2012; Choi et al., 2015; Hughes and Lewis, 2018; Liese and Seelbach, 2006; Nestl et al., 2014; Schmid et al., 2001). Ein vielzitiertes Beispiel hierfür ist die Produktion von 6-Aminopenicillansäure (6-APA), die als Grundbaustein für die Synthese einer Vielzahl an β -Lactam-Antibiotika verwendet wird. 6-APA wird industriell durch Hydrolyse von Penicillin G oder Penicillin V hergestellt. Die chemische Hydrolyse ist aufwendig und teuer, da sie mehrere Reaktionsschritte sowie extreme Temperaturen und eine wasserfreie Umgebung erfordert. Durch Verwendung des Enzyms Penicillin-Acylase konnte dies durch einen einzigen Reaktionsschritt bei moderaten Reaktionsbedingungen ersetzt werden (Bruggink et al., 1998; Elander, 2003).

Trotz der vielen Vorteile, welche die moderne Biokatalyse mit sich bringt, ist sie noch nicht so weit verbreitet wie klassische, chemische Synthesemethoden (Bommarius, 2015). Dies liegt unter anderem daran, dass im Vergleich zu chemischen

Katalysatoren nur eine sehr kleine Anzahl an Enzymen bekannt und genau charakterisiert ist. Außerdem sind Enzyme meist nur in einem eng abgesteckten Rahmen an Reaktionsbedingungen, wie Temperaturen, pH-Werten, dem Salzgehalt und der Lösungsmittelzusammensetzung, katalytisch aktiv (Polizzi et al., 2007). Ein entscheidender Schritt für die Etablierung neuer biokatalytischer Prozesse ist daher die Identifizierung und Entwicklung neuer Enzyme, die die jeweiligen spezifischen Anforderungen bestmöglich erfüllen.

1.1.1 Steuerung und Veränderung von Biokatalysatoren

Neben der Identifizierung von noch nicht entdeckten, natürlich vorkommenden Enzymen hat vor allem die künstliche Entwicklung von Enzymen entscheidend zur Etablierung der Biokatalyse beigetragen. Hierbei ist vor allem die gerichtete Evolution zu nennen, wobei heutzutage auch daten- und computerbasierte Methoden, wie das rationale Enzymdesign, zusehends an Bedeutung gewinnen.

1.1.1.1 Gerichtete Evolution von Enzymen

Im Einklang mit der Darwin'schen Evolutionstheorie folgt auch die gerichtete Evolution von Enzymen im Labor dem Muster wiederkehrender Zyklen von Mutation und Selektion (**Abbildung 1**)(Cobb et al., 2013). Basierend auf einem Ausgangsenzym werden durch verschiedene Randomisierungstechniken, wie z. B. PCR-Mutagenese, der Verwendung von bakteriellen Mutationsstämmen (Mutator strains) oder DNA-Shuffling, teil- oder komplett-randomisierte Bibliotheken von Mutanten erstellt und anschließend nach Varianten mit neuer oder verbesserter Funktionalität durchmustert (Packer and Liu, 2015; Zeymer and Hilvert, 2018). Die so identifizierten Enzyme fungieren dann als Ausgangspunkt für die nächste Runde an Mutation und Selektion. Dieser Zyklus wird solange fortgesetzt, bis ein Enzym mit der gewünschten Funktionalität generiert wurde. Was in der Natur bis zu mehreren Millionen Jahre dauert, kann somit im Labor, unter anderem durch das Fokussieren auf ein Gen und die Verwendung von schnellwachsenden Mikroorganismen und hocheffizienten Selektionsmethoden, auf den Zeitraum von wenigen Wochen reduziert werden. Obwohl die Grundzüge der Methode theoretisch schon in den frühen 80er Jahren des letzten Jahrhunderts ersonnen wurden (Eigen and Gardiner, 1984), dauerte es fast

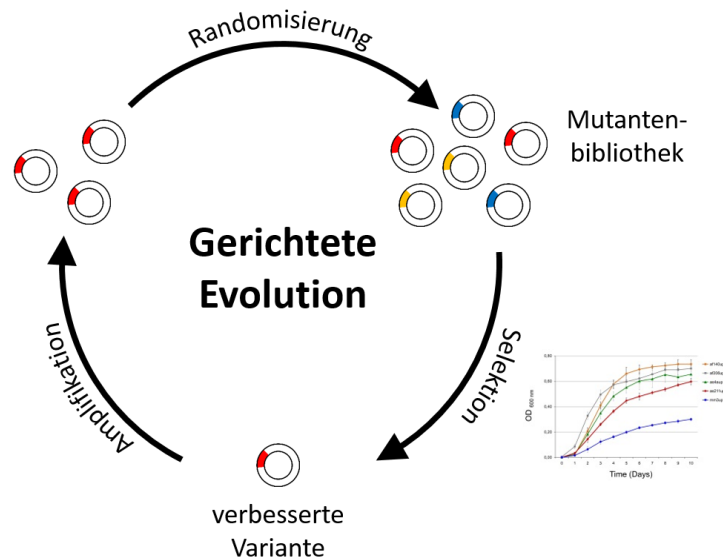


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Zyklus der gerichteten Evolution. Ausgehend von einem Ausgangs-Gen wird eine Mutantenbibliothek erstellt. Diese wird nach Varianten mit gesuchten Eigenschaften durchmustert. Die verbesserten Varianten können dann ihrerseits als Startpunkt einer neuen Runde gerichteter Evolution genutzt werden. Dieser Zyklus wird solange wiederholt, bis Varianten mit den gewünschten Eigenschaften erzielt werden.

zehn weitere Jahre bis die erste Studie erschien, welche die erfolgreiche Anwendung gerichteter Evolution im Labor beschrieb. In ihren wegweisenden Arbeiten konnten Arnold *et al.* mittels gerichteter Evolution die Aktivität der Protease Subtilisin E im organischen Lösungsmittel Dimethylformamid um mehr als das 250-fache erhöhen (Chen and Arnold, 1991, 1993). Heute wird die gerichtete Evolution standardmäßig unter anderem zur Entwicklung von Enzymen mit erhöhter Stabilität (Eijsink *et al.*, 2005), mit veränderten Regio- und Enantioselektivitäten (Reetz, 2017; Zeymer and Hilvert, 2018) oder mit erhöhter Aktivität mit nicht-natürlichen Substraten verwendet (Hammer *et al.*, 2015; Renata *et al.*, 2015). Außerdem konnte sie in den letzten Jahren auch für neue Anwendungen, wie die Entwicklung von Enzymen, welche nicht-natürliche Reaktionen katalysieren, beispielsweise die Bildung von Kohlenstoff-Siliziumbindungen, eingesetzt werden (Chen and Arnold, 2020; Kan *et al.*, 2016). Gerichtete Evolution setzt jedoch stets das Vorhandensein einer geringen Anfangsaktivität oder promiskuitive Aktivität für das gewünschte Substrat voraus, welche dann durch mehrere Runden von Mutation und Selektion verbessert wird (Khersonsky and Tawfik, 2010; Renata *et al.*, 2015).

1.1.1.2 Semi-rationales Enzymdesign

Ein großer Vorteil der klassischen, gerichteten Evolution liegt darin, dass sie ohne strukturelles oder mechanistisches Vorwissen über das jeweilige Enzym eingesetzt werden kann. Durch Hinzuziehen von Struktur- und/oder Sequenzinformationen sowie spezifischen Algorithmen lassen sich jedoch die Chancen drastisch erhöhen, Varianten zu finden, welche die gewünschten neuen Funktionen aufweisen (Chica et al., 2005; Lutz, 2010). Das sogenannte semi-rationale Enzymdesign basiert auf der Durchmusterung von intelligenten, fokussierten Mutantenbibliotheken, bei welchen der zu untersuchende Sequenzraum deutlich reduziert ist. Ein häufig angewendeter Ansatz ist das Fokussieren der Randomisierung auf das aktive Zentrum des Enzyms. Dieses Fokussieren basiert auf der Beobachtung, dass Mutationen, die zur Veränderung oder Verbesserung der Enzymspezifität bzw. -aktivität führen, besonders häufig in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums gefunden wurden oder in Regionen, welche einen Einfluss auf die Form und Dynamik dieses Enzymbereichs haben (Morley and Kazlauskas, 2005; Park et al., 2005). Eine bekannte Methode, die hierauf aufbaut, ist CASTing (Combinatorial Active-Site Saturation Test). Beim CASTing werden zwei oder drei Aminosäurepositionen, welche sich in unmittelbarer Nähe der Substratbindestelle befinden, gleichzeitig randomisiert (Reetz et al., 2005). Durch das Fokussieren auf wenige Positionen des Enzyms kann die Größe der Mutantenbibliothek drastisch reduziert werden, während sich durch das gleichzeitige Mutieren mehrerer Aminosäurepositionen die Chancen erhöhen, auch Mutationen mit einem kooperativen Effekt zu identifizieren. Mithilfe von CASTing konnte unter anderem die Substratspezifität der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* drastisch verändert und die Enantioselektivität der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* signifikant erhöht werden (Reetz et al., 2005, 2006b).

Eine weitere strukturbasierte Technik, die speziell zur Erhöhung der Enzymstabilität entwickelt wurde, ist die sogenannte B-FIT Methode (Reetz et al., 2006a; Sun et al., 2019). Sie beruht auf der Annahme, dass die Denaturierung von Enzymen an den flexibelsten Stellen einer Proteinstruktur beginnt und dass durch eine Stabilisierung dieser Positionen die Gesamtstabilität eines Enzyms gesteigert wird. Positionen mit hohen B-Werten, einem Maß für die Flexibilität einer Aminosäureposition in der Röntgenkristallstruktur eines Proteins, werden hierbei einzeln randomisiert, nach stabilisierenden Varianten durchmustert und die nutzbringenden Mutationen

anschließend miteinander kombiniert. Sowohl die Thermostabilität als auch die Lösungsmitteltoleranz verschiedener Enzyme, wie unter anderem der Lipase LipA aus *Bacillus Subtilis* oder der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger*, konnten somit um ein Vielfaches erhöht werden (Gumulya and Reetz, 2011; Reetz et al., 2006a, 2010).

Ein Ansatz, der rein auf Sequenzinformationen beruht, ist die sogenannte Konsensusmethode (Lehmann et al., 2002). Es wird angenommen, dass während der natürlichen Evolution von Proteinen instabile oder inaktive Varianten einen Selektionsnachteil haben. Folglich trägt die an einer bestimmten Position in einem Sequenzalignment am häufigsten vorkommende Aminosäure zu einer höheren Proteinstabilität bei als weniger häufig vorkommende Aminosäuren. Durch Austausch selten vorkommender Aminosäuren mit den an der jeweiligen Position am häufigsten auftretenden Aminosäuren konnte in einer Modellstudie die Thermostabilität einer Phytase um mehr 20°C gesteigert werden (Lehmann et al., 2000). Die Erfolgchancen der Konsensusmethode lassen sich noch weiter steigern durch das Hinzuziehen von B-Faktoren oder indem basierend auf Strukturinformationen verhindert wird, dass Aminosäuren ausgetauscht werden, welche Teil der aktiven Tasche sind, in Wasserstoff- oder Salzbrücken involviert sind oder für die Bildung von Helices entscheidend sind (Blum et al., 2012; Polizzi et al., 2006).

Weitere Methoden zur Minimierung des zu untersuchenden Sequenzraumes basieren unter anderem auf der Verwendung von reduzierten Codon- bzw. Aminosäuresets (Hammer et al., 2015; Kille et al., 2013; Reetz et al., 2008), der Untersuchung von evolutionären Enzymvorfahren (Chen et al., 2010), der Analyse von korrelierenden Mutationen (Kuipers et al., 2009; Nobili et al., 2015) oder sind häufig auch eine Kombination verschiedener Methoden (Reetz, 2017; Zeymer and Hilvert, 2018).

1.1.1.3 Rationales Design und de-novo-Design von Enzymen

Eine weitere Methode zur Entwicklung neuer Biokatalysatoren ist das rationale Enzymdesign. Hierbei werden, basierend auf strukturellem und mechanistischem Vorwissen, durch gezielte Mutation einiger weniger Positionen die gewünschten Eigenschaften eingeführt. Mit einer einfachen Aminosäuresubstitution in der aktiven Tasche konnte eine Pyruvatdecarboxylase in eine Carboligase bzw. eine

Pyridoxylphosphat (PLP)-abhängige Racemase in eine Aldolase verwandelt werden (Meyer et al., 2011; Seebeck and Hilvert, 2003). Auch das gezielte Verändern anderer Proteinbereiche, wie z. B. von Lösungsmittel- und Substratzugangstunnel oder von Proteinschleifen, kann zu den gewünschten Erfolgen führen (Biedermannová et al., 2012; Nestl and Hauer, 2014). Außerdem werden häufig neben biochemischen, strukturellen und mechanistischen Daten auch *in-silico*-Methoden, wie Homologiemodelle, Sequenzalignments, molekulardynamische (MD) Simulationen oder Substratdocking, hinzugezogen, um die entscheidenden Aminosäuresubstitutionen zu identifizieren (Damborsky and Brezovsky, 2014).

Über die letzten Jahre hat auch das sogenannte *de-novo*-Enzymdesign zusehends an Bedeutung gewonnen. Durch das Rekonstruieren bekannter Enzymfunktionen in neuen Proteinstrukturen oder durch das Einführen von in der Natur nicht vorkommenden Aktivitäten in eine beliebige, neue oder bekannte Proteinstruktur werden komplett neue Enzyme erschaffen (Chen and Arnold, 2020; Davis and Ward, 2019; Kries et al., 2013; Siegel et al., 2010; Studer et al., 2018; Zhou and Roelfes, 2020). Mithilfe ausgeklügelter Algorithmen wie Rosetta (Richter et al., 2011) konnten somit unter anderem Enzyme generiert werden, welche in der Natur nicht vorkommende Reaktionen, wie die Diels-Alder-Reaktion, die Retroaldolreaktion oder die Kemp-Eliminierung, katalysieren (Jiang et al., 2008; Röthlisberger et al., 2008; Siegel et al., 2010). Die so entstandenen Enzyme weisen jedoch meist nur sehr minimale Aktivitäten auf, welche anschließend durch Strategien der gerichteten Evolution weiter verbessert werden können (Brustad and Arnold, 2011).

1.1.2 Isolierte Enzyme und Ganzzellkatalyse

Für eine erfolgreiche und effiziente Biokatalyse spielt neben der Identifizierung bzw. Entwicklung der geeigneten Enzyme und Enzymwege auch die Anwendungsform der Biokatalysatoren eine entscheidende Rolle (Tufvesson et al., 2010). Je nach Prozess kann entweder die Anwendung isolierter Enzyme oder die Verwendung von Zellen, die die gewünschten Enzyme oder Enzymwege produzieren, besser geeignet sein. Isolierte Enzyme haben den Vorteil, dass sich mit ihnen die Reaktionsbedingungen besser und genauer kontrollieren lassen, sie nicht limitiert sind durch Substrat- oder Produkttransport und sie meist höhere Substrat- und Produktkonzentrationen aushalten können als Ganzzellsysteme, welche häufiger mit Problemen der Substrat-

bzw. Produkttoxizität konfrontiert sind (Basso and Serban, 2019; Di Cosimo et al., 2013). Zusätzlich lassen sich isolierte Enzyme, besonders wenn sie immobilisiert sind, leicht wiederverwenden und meist ist auch die Produktaufbereitung einfacher als beim Einsatz ganzer Zellen. Als Nachteil können neben den erhöhten Kosten, die mit der Proteinaufreinigung verbunden sind, eine niedrigere Stabilität des Katalysators sowie der zusätzliche Aufwand, der mit der eventuell erforderlichen Anwendung passender Cofaktorzuführungssystemen verbunden ist, angesehen werden.

Obwohl die Verwendung isolierter Enzyme zunehmend an Bedeutung gewinnt, werden industriell insbesondere Redoxreaktionen häufig im Ganzzellansatz durchgeführt (Dong et al., 2018; Hollmann et al., 2011; Liese and Seelbach, 2006). Als Grund hierfür kann unter anderem die hohe Stabilität der Enzyme in der schützenden Umgebung der Zelle aufgeführt werden, die auch Anwendungen unter rauen Reaktionsbedingungen ermöglicht (Lin and Tao, 2017). Außerdem bietet die Zelle eine konstante und kostengünstige Versorgung mit einer Vielzahl an Cofaktoren (Ladkau et al., 2014). Auch ist die Produktion des Katalysators relativ kostengünstig, da Arbeitsschritte wie die Zellyse und die Enzymreinigung entfallen und dieselben Zellen häufig auch mehrfach wiederverwendet werden können (Lin et al., 2013; Wachtmeister and Rother, 2016). Die Anwendung ganzer Zellen birgt jedoch auch Probleme, so muss das Substrat meist erst die Zellmembran passieren, bevor es den Katalysator erreicht. Dasselbe gilt umgekehrt auch für das Produkt, bevor es weiterverwertet werden kann. Dies kann insbesondere bei der Produktaufbereitung zu Problemen führen, sollte jedoch auch in Betracht gezogen werden, wenn mit potentiell cytotoxischen oder wasserunlöslichen Stoffen gearbeitet wird (De Carvalho and Da Fonseca, 2002; Wierckx et al., 2012). Zusätzlich können ungewünschte Nebenreaktionen oder Weiterreaktionen der Substrate und Produkte sowie schlechte Cofaktorgleichgewichte auftreten.

1.1.3 Wahl des Wirtsorganismus für die Ganzzellkatalyse

Bei der Wahl des Organismus für die biokatalytische Anwendung ist eine Vielzahl an Anforderungen zu berücksichtigen (Kadisch et al., 2017; Lin and Tao, 2017; Trinh et al., 2015). Ein idealer Wirtsorganismus sollte unter anderem über mehrere Generationszyklen hinweg genetisch stabil und außerdem leicht und kostengünstig

kultivierbar sein. Zudem sollte der genetische Hintergrund des Organismus bekannt sein und eine Vielzahl an Werkzeugen zur genetischen Manipulation des Organismus zur Verfügung stehen. Wichtig ist auch, dass der Organismus metabolisch sowie physikalisch und chemisch robust ist, was besonders für Anwendungen im großtechnischen Maßstab und unter harschen Reaktionsbedingungen von Vorteil ist (Wachtmeister and Rother, 2016). Da es keinen idealen Organismus gibt, der alle Anforderungen gleich gut erfüllt, werden je nach Anwendung meist unterschiedliche Bakterienstämme verwendet, wobei historisch *E. coli*, *Bacillus*, *Corynebacterium* und *Streptomyces* am weitesten verbreitet sind (Lam et al., 2012).

1.1.4 *Pseudomonas putida* als Wirtsorganismus für die Biokatalyse

In den letzten Jahren haben zunehmend auch Stämme aus der Gattung *Pseudomonas* spp. und insbesondere das Bakterium *Pseudomonas putida* als Organismus für die Biokatalyse an Bedeutung gewonnen (Nikel et al., 2016; Nickel and de Lorenzo, 2018). *P. putida* ist ein *aerobes*, Gram-negatives, Pflanzenwachstumsförderndes Bodenbakterium, bekannt für seine außerordentlich hohe metabolische Diversität, die es ihm erlaubt, eine Vielzahl schlecht zersetzlicher und xenobiotischer Stoffe abzubauen (Wackett, 2003). *P. putida* weist eine hohe Resistenz gegen äußere Einflüsse auf, wie extreme Temperaturen (Dethlefsen et al., 2019; Gumley and Inniss, 1996), extreme pH-Werte (Reva et al., 2006), Kohlenstoffmangel (Ankenbauer et al., 2020; Lieder et al., 2016) sowie der Gegenwart organischer Lösungsmittel (Blank et al., 2008; Hosseini et al., 2017; Inoue and Horikoshi, 1989). Außerdem ist *P. putida* außerordentlich tolerant gegenüber oxidativem Stress, was es für Redoxprozesse besonders attraktiv macht (Blank et al., 2010; Ebert et al., 2011; Kim and Park, 2014). Das Genom des wohl am meisten untersuchten und kultivierten Stamms *P. putida* KT2440 ist vollständig sequenziert (Belda et al., 2016; Nelson et al., 2002; Nickel et al., 2014b). Eine Vielzahl an Systemen zur Genexpression und Gendeletion sowie weitreichende Transkriptom-, Proteom-, Metabolom- und Fluxdaten sind für diesen Stamm verfügbar (Beckers et al., 2016; Loeschcke and Thies, 2015; Nickel et al., 2014b; Zobel et al., 2015). Aufgrund seiner hohen metabolischen Flexibilität kann *P. putida* nicht nur zum Abbau xenobiotischer Stoffe eingesetzt werden, sondern sie erlaubt ihm auch auf einer Vielzahl an günstigen und leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen rasch zu wachsen (Poblete-Castro et al., 2012). Außerdem kann *P. putida* zur

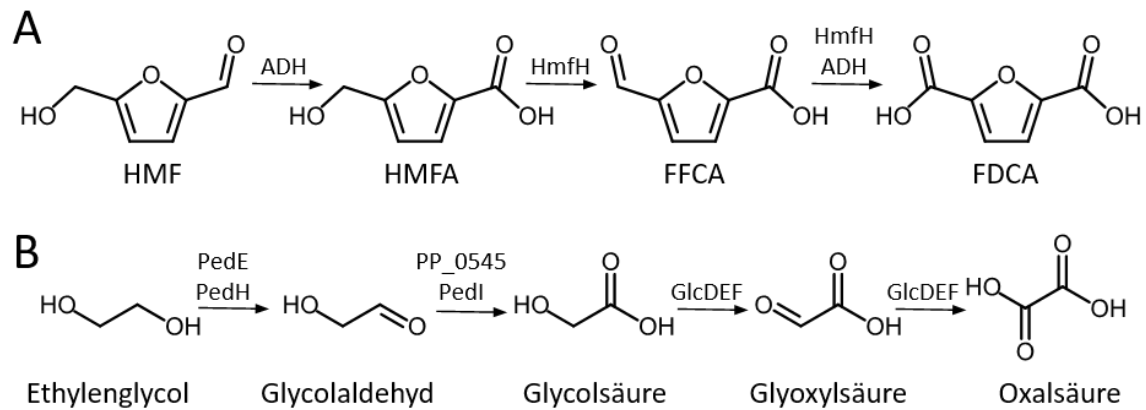


Abbildung 2: **A)** Schematische Darstellung des Oxidationswegs von HMF zu FDCA in *P. putida* S12_HmfH. Die Oxidation von HMF zu HMFA und FFCA zu FDCA kann von endogenen Enzymen, vermutlich PQQ-ADHs, durchgeführt werden. Da der Oxidationsschritt von HMFA zu FFCA nicht von nativen Enzymen in *P. putida* katalysiert wird, wird hierfür die HMF-Oxidase HmfH aus *C. basilensis* heterolog im Produktionsstamm exprimiert (Wierckx *et al.*, 2015). **B)** Schematische Darstellung des Oxidationswegs von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure und weiter zu Oxalsäure in *P. putida* KT2440 (Mückschel *et al.*, 2012). Ethylenglycol wird von den Alkoholdehydrogenasen PedE bzw. PedH zu Glycolaldehyd und von den Aldehyddehydrogenasen PedI bzw. PP_0545 weiter zu Glycolsäure oxidiert. Die Glycolatoxidase GlcDEF oxidiert Glycolsäure zu Glyoxylsäure und katalysiert wahrscheinlich auch die weitere Oxidation zu Oxalsäure.

Produktion biotechnologisch interessanter, sekundärer Metaboliten, wie Alginat oder Polyhydroxyalkanoaten genutzt werden (Beckers *et al.*, 2016; Loeschcke and Thies, 2015) und auch die Biosynthese von Feinchemikalien, Rhamnolipiden, Terpenoiden sowie nichtribosomaler Peptide kann mithilfe von *P. putida* realisiert werden (Loeschcke and Thies, 2015).

Ein interessantes Beispiel ist die Produktion von 2,5-Furandicarbonsäure (FDCA), welche als umweltfreundliche, gänzlich aus Biomasse herstellbare Alternative zur Terephthalsäure in der Polymerproduktion gilt (Werpy and Petersen, 2004; Yuan *et al.*, 2020). Polyethylen-, Polypropylen-, und Polybutylen-FDCA weisen allesamt ähnliche Charakteristika wie ihre Terephthalsäure-basierten Gegenstücke auf (Wierckx *et al.*, 2015). Koopmann *et al.* konnten mit *Pseudomonas putida* S12 bis zu 30.1 g/L FDCA aus 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) herstellen (**Abbildung 2A**) (Koopman *et al.*, 2010a; Wierckx *et al.*, 2012). In *P. putida* erfolgt die Oxidation von HMF zu 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) durch endogene Enzyme, vermutlich periplasmatische Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängige Alkoholdehydrogenasen (PQQ-ADHs) (Wierckx *et al.*, 2015), wohingegen für die weitere Oxidation von HMFA zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA) die exogene HMF/Furfural Oxidoreduktase HmfH aus *Cupriavidus basilensis* HMF14 heterolog

exprimiert wurde (Koopman et al., 2010b). Die anschließende Oxidation von FFCA zu FDCA kann sowohl von endogenen Enzymen als auch von HmfH katalysiert werden (Koopman et al., 2010b; Wierckx et al., 2015).

Glyoxylsäure ist ein wichtiger Baustein in der Produktion von Chemikalien der Agrar-, Aroma-, Polymer- und Pharmaindustrie (Mattioda and Christidis, 2000; Sajtos, 1991; Yue et al., 2012). Sie kann mithilfe von *P. putida* KT2440 biotechnologisch aus Ethylenglycol hergestellt werden (Mückschel et al., 2012). In *P. putida* erfolgt die Oxidation von Ethylenglycol zu Glycolaldehyd periplasmatisch durch die PQQ-ADHs PedE und PedH (**Abbildung 2B**). Die weitere Oxidation zu Glycolat und Glyoxylat wird cytoplasmatisch durch die Aldehyddehydrogenasen PedI und PP_0545 sowie durch die Glycolatoxidase GlcDEF katalysiert. Da GlcDEF sowie vermutlich zusätzliche, noch nicht identifizierte Enzyme Glyoxylat zu Oxalat weiteroxidieren können, und auch noch weitere Stoffwechselwege für Glyoxylat existieren, konnten bisher jedoch noch keine hohen Produkttiter mit dieser Methode generiert werden. Wie die oben aufgeführten Beispiele verdeutlichen, bringt *P. putida* eine außerordentliche Vielzahl an Eigenschaften mit, die es als Wirtsorganismus für die Biokatalyse prädestinieren. Jedoch zeigt das Beispiel von HMFH auch auf, dass *P. putida* trotz seiner hohen metabolischen Variabilität längst nicht alle gewünschten Reaktionen mit endogenen Enzymen katalysieren kann. Außerdem wird aus dem beschriebenen Prozess zur Produktion von Glyoxylsäure ersichtlich, dass trotz der großen Anzahl an Proteom-, Metabolom- und Transkriptionsstudien, welche für *P. putida* existieren, nicht alle Stoffwechselwege und Enzyme ausreichend charakterisiert sind.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb unter anderem, die in diesen beiden Prozessen involvierten PQQ-ADHs eingehend zu charakterisieren und sie mithilfe von Protein-Engineering-Methoden so zu verändern, dass sie die Oxidationsschritte von HMFA zu FFCA sowie von Glycolsäure zu Glyoxylsäure katalysieren können. Aus diesem Grund wird in den nächsten Abschnitten genauer auf die Oxidation von Alkoholen in der Biokatalyse eingegangen.

1.2 Die Oxidation von Alkoholen in der Biokatalyse

Die Oxidation von Alkoholen zu den jeweiligen Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren stellt einen der wichtigsten Reaktionsschritte in der organischen Chemie dar. Konventionelle Methoden beinhalten die Verwendung von stöchiometrische Mengen an Übergangsmetallen wie Ag-, Mn-, Cr-, Periodanverbindungen, schwefelhaltige Oxidationsmittel oder Radikal-basierte Oxidationsmittel wie N-Methylmorpholin-N-oxid (NMO) oder 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) (Mijs and de Jonge, 1986; Tojo and Fernandez, 2006). Da bei diesen Verfahren jedoch häufig große Mengen an giftigen Nebenprodukten anfallen oder extreme Reaktionsbedingungen erforderlich sind, ist die Nachfrage nach umweltschonenderen Alternativen hoch. Neben homogen-, heterogen- und nanokatalytischen Verfahren, basierend auf Übergangsmetallen, welche molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel verwenden (Parmeggiani and Cardona, 2012; Punniyamurthy et al., 2005; Sheldon, 2015), sind insbesondere biologische Oxidationsverfahren mit Enzymen als Katalysatoren von großem Interesse, da diese bei moderaten Drücken, Temperaturen und pH-Werten aktiv sind. Außerdem bieten sie hohe Chemo-, Regio- und Stereospezifität (Dong et al., 2018; Kroutil et al., 2004; Liu et al., 2018a). Die heutzutage meist verwendeten Enzyme zur Oxidation von Alkoholgruppen sind NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenasen sowie FAD-abhängige und Cu-abhängige Alkoholoxidasen (Liu et al., 2018a; Romano et al., 2012).

1.2.1 NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenasen

Die Oxidation des Alkoholproduktes erfolgt bei NAD(P)⁺-abhängigen Alkoholdehydrogenasen durch den Transfer eines Hydridions vom C1-Kohlenstoffatom auf den Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)- oder Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺)-Cofaktor und ist reversibel (Sellés Vidal et al., 2018). Viele verschiedene Varianten von NAD(P)⁺-abhängigen Alkoholdehydrogenasen sind bekannt, die primäre oder sekundäre kurz-, mittel-, oder langkettige Alkoholverbindungen zum jeweiligen Aldehyd oder Keton oxidieren können (Dong et al., 2018; Zheng et al., 2017). Da bei der Reaktion stöchiometrische Mengen an NAD(P)⁺-Cofaktor benötigt werden, sind Systeme zur Cofaktor-Regenerierung unabdingbar, um NAD(P)⁺-abhängige ADHs wirtschaftlich einsetzen zu

können (Kroutil et al., 2004; Liu and Wang, 2007; Wu et al., 2013). Eine Möglichkeit ist die Verwendung eines günstigen Zweitsubstrates wie Aceton, welches durch dasselbe Enzym zu Isopropanol reduziert wird und gleichzeitig als Lösungsmittel für schlecht lösliche, hydrophobe Substrate dienen kann (Stampfer et al., 2002). Dieses Verfahren erlaubt eine einfache Produktisolation aus der organischen Phase und ermöglicht es, das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der Substratoxidation einzustellen. Große Mengen an Isopropanol, welche während dieses Verfahrens gebildet werden, können jedoch zu Enzyminhibition führen. Eine Alternative hierzu ist die Verwendung einer zweiten ADH, die denselben Cofaktor verwendet, wodurch die Cofaktor-Regenerierung von der Substratoxidation entkoppelt wird (Kroutil et al., 2004). Die Verwendung von zwei Enzymen erhöht jedoch die Kosten und ist nur dann effizient anwendbar, wenn die idealen Reaktionsbedingungen der beiden Enzyme nicht zu unterschiedlich sind. Von immer größerer Bedeutung ist die Verwendung von NAD(P)⁺-Oxidasen, da bei diesen die Regenerierung des NAD(P)⁺-Cofaktors an die Reduktion von O₂ zu H₂O gekoppelt ist (Riebel et al., 2003). Für industrielle Anwendungen werden häufig Ganzzellsysteme verwendet, da bei diesen die Cofaktor-Regenerierung über die Atmungskette erfolgt und zusätzlich Probleme und Kosten, die mit der Enzymaufreinigung und schlechter Enzymstabilität isolierter Enzyme verbunden sind, vermieden werden können (Hollmann et al., 2011; Zheng et al., 2017).

1.2.2 Alkoholoxidasen

Im Gegensatz zu Alkoholdehydrogenasen verwenden Alkoholoxidasen molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel, der zu Wasserstoffperoxid oder in seltenen Fällen zu H₂O reduziert wird (Pickl et al., 2015; Turner, 2011). Besonders für biotechnologische Anwendungen als isolierte Enzyme sind Alkoholoxidasen von großem Interesse, da nur katalytische Mengen an Cofaktor gebraucht werden und mit molekularem Sauerstoff ein äußerst günstiges und fast unbegrenzt vorhandenes Oxidationsmittel genutzt werden kann (Romano et al., 2012). Sowohl bei der Verwendung als isoliertes Enzym als auch im Ganzzellansatz können jedoch anfallende Nebenprodukte wie Wasserstoffperoxid oder O₂⁻ ein Problem darstellen, da diese in größeren Mengen sowohl cytotoxisch als auch enzyminhibierend wirken (Linley et al., 2012; Toftgaard Pedersen et al., 2015). Außerdem können sie ungewünschte Nebenreaktionen,

sowohl mit Reaktionsedukten als auch mit Reaktionsprodukten, eingehen (Imlay, 2003). Diesem Problem wird meist durch den Einsatz von Katalase oder Peroxidase entgegengewirkt (Geissler et al., 1986; Toftgaard Pedersen et al., 2015). Zusätzlich kann aufgrund der niedrigen Löslichkeit von molekularem Sauerstoff in wässrigen Lösungen die ausreichende Verfügbarkeit von Sauerstoff zu einem limitierenden Faktor werden (Baldwin and Woodley, 2006). Die am meisten verwendeten Alkoholoxidasen sind entweder abhängig von einem Cu-Metallcofaktor oder einem der Flavincofaktoren, Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavinadenindinukleotid (FAD) (Dong et al., 2018).

1.2.2.1 Cu-abhängige Alkoholoxidasen

Die Oxidation des organischen Substrats folgt bei Cu-abhängigen Alkoholoxidasen einem Radikalmechanismus (Whittaker, 2005). Während der reduktiven Halbreaktion werden die zwei Elektronen des Alkoholsubstrats sukzessive auf ein Cu^{2+} -Ion sowie auf ein an dieses Ion koordiniertes Tyrosinradikal im aktiven Zentrum übertragen, wobei ein nichtradikaler Cu^+ -Tyrosinkomplex entsteht (Himo et al., 2000). Dieser wird in der oxidativen Halbreaktion durch molekularem Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid wieder zum Cu^{2+} -Tyrosinradikalkomplex reoxidiert. Im Gegensatz zu Flavincofaktor-abhängigen Alkoholoxidasen, die unter Bildung des Gem-Diols primäre Alkohole bis zur Carbonsäure oxidieren können, endet die von Cu-abhängigen Alkoholoxidasen katalysierte Reaktion stets beim Aldehyd (Monti et al., 2011; Pickl et al., 2015). Die Vielfalt an bekannten Cu-abhängigen Alkoholoxidasen ist jedoch recht klein, weshalb nur wenige Enzyme bekannt sind, die biotechnologisch angewendet werden. Die am meisten verwendete Cu-abhängige Oxidase ist die Galactoseoxidase (Parikka et al., 2015). Galactoseoxidase und Varianten davon können unter anderem zur Modifizierung und Markierung von Glycoproteinen, zur Produktion von industriell wertvollen Stoffen, wie zum Beispiel 2,5-Furandicarbonsäure oder 2,5-Diformylfuran, sowie zur kinetischen Racematspaltung verschiedener sekundärer Alkohole genutzt werden (Escalettes and Turner, 2008; McKenna et al., 2015; Qin et al., 2015; Rannes et al., 2011).

1.2.2.2 *Flavincofaktor-abhängige Alkoholoxidasen*

Im Gegensatz zu Cu-abhängigen Alkoholoxidasen ist eine weitaus größere Bandbreite an Flavincofaktor-abhängigen Alkoholoxidasen bekannt, welche verschiedene primäre und sekundäre Alkohole sowie Aldehyde zu den jeweiligen Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren oxidieren können (Dijkman et al., 2013). Der katalytische Zyklus von Flavincofaktor-abhängigen Alkoholoxidasen besteht aus zwei Reaktionsschritten. Die reduktive Halbreaktion beinhaltet einen Hydridtransfer vom C1-Kohlenstoffatom des Alkoholsubstrats zum aktivierten N5-Stickstoffatom des Flavincofaktors. Die Reoxidation des reduzierten Flavincofaktors erfolgt während der zweiten Halbreaktion, bei der molekularer Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid oxidiert wird (Geissler et al., 1986). Auch eine der industriell wohl am meisten verwendeten Alkoholoxidasen, die Glucoseoxidase (GOx) ist abhängig von einem Flavincofaktor (Bankar et al., 2009). Sie oxidiert Glucose zu Gluconolacton und wird nicht nur bei einer Vielzahl von Prozessen in der Lebensmittelindustrie verwendet, sondern auch für die Produktion von Biosensoren, die heute zur Bestimmung von Glucose-Werten - sowohl in der Industrie als auch in der Medizin - kaum noch wegzudenken sind (Ferri et al., 2011). Weitere Anwendungen liegen in der Synthese von Molekülen für die Pharma- und Parfümindustrie (Turner, 2011), in der Bioproduktion von grünen Alternativen zu Polyethylenterephthalat (PET) (Koopman et al., 2010b) sowie in der Entwicklung von verschiedenen Biosensoren zur zügigen Detektion von Ethanol, Methanol, Cholesterol oder Isopropanol (Goswami et al., 2013).

1.2.3 **Pyrrolochinolinchinon(PQQ)-abhängige Glucosedehydrogenasen**

Eine weitere Enzymklasse, die Alkoholgruppen oxidiert und insbesondere für die Verwendung in Blutglucosemessgeräten von Bedeutung ist, sind die Pyrrolochinolinchinon-abhängigen Glucosedehydrogenasen (PQQ-GDHs) (Ferri et al., 2011). PQQ-GDHs kommen als lösliche Enzyme im Periplasma (sPQQ-GDHs) oder als an die periplasmatische Membran gebundene Enzyme (mPQQ-GDHs) in einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien vor und können verschiedene Aldosezucker umsetzen, unter anderem Hexosen, Pentosen, Disaccharide und Trisaccharide (Anthony, 2001). Die Oxidation des Substrats erfolgt durch einen basenkatalysierten, direkten Hydridtransfer vom C1 des Zuckerrings auf das C5 des PQQ-Cofaktors (**Abbildung 3**) (Oubrie et al., 1999). Die Reoxidation von PQQ erfolgt über die

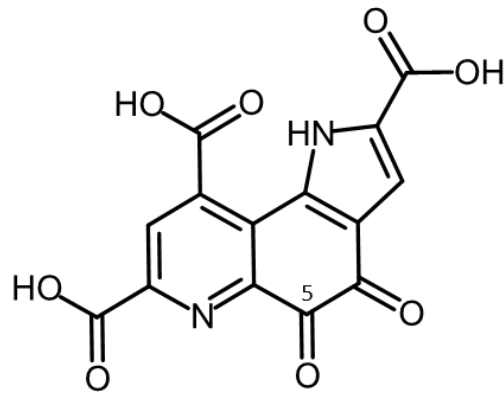


Abbildung 3: Chemische Struktur des Pyrrolochinolinchinon(PQQ)-Cofaktors. Das C5-Kohlenstoffatom ist vermerkt.

Atmungskette *via* des Elektronenmediators Ubiquinon (mPQQ-GDHs) bzw. *via* eines noch unbekanntem Elektronenmediators (sPQQ-GDHs) (Matsushita et al., 2002). Besonders aufgrund seiner hohen katalytischen Effizienz, die ca. 25-fach höher ist als die der Glucoseoxidase sowie seiner breiten Spezifität für verschiedene Elektronenakzeptoren, sind sPQQ-GDHs besonders geeignet für die Entwicklung von Glucosebiosensoren (Ferri et al., 2011; Hoenes and Unkrig, 1993; Solnica et al., 2003). Da die Messungen mit PQQ-GDHs, welche Elektronen nicht auf O₂ übertragen, im Gegensatz zu GOx nicht durch variierende Blutsauerstoffkonzentrationen beeinflusst werden können, sind PQQ-GDHs auch wesentlich präziser (Tang et al., 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass Probleme wie die im Vergleich zu GOx niedrige Substratspezifität oder ungenügende Enzymstabilität leicht mit Enzym-Engineering-Maßnahmen behoben werden können (Durand et al., 2010; Igarashi et al., 2004; Sode et al., 2000). Aufgrund der oben genannten Aspekte sind PQQ-GDHs auch für die Entwicklung von Biobrennstoffzellen, die Synthese von pharmazeutischen Wirkstoffen sowie die Entwicklung neuer Biosensoren von Bedeutung (Durand et al., 2010; Guo et al., 2016; Lisdat, 2020; Scherbahn et al., 2014; Vajdič et al., 2014).

1.2.4 PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen

Im Gegensatz zu PQQ-GDHs sind nur wenige biotechnologische Anwendungen von PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenasen bekannt, obwohl auch PQQ-ADHs eine Vielzahl an Eigenschaften aufweisen, die für biokatalytische Anwendungen nützlich sind (Matsushita et al., 2002) (vergl. Abschnitt 1.2.4.5). Neben der hohen katalytischen Effizienz und ihrem breiten Substratspektrum macht ihre

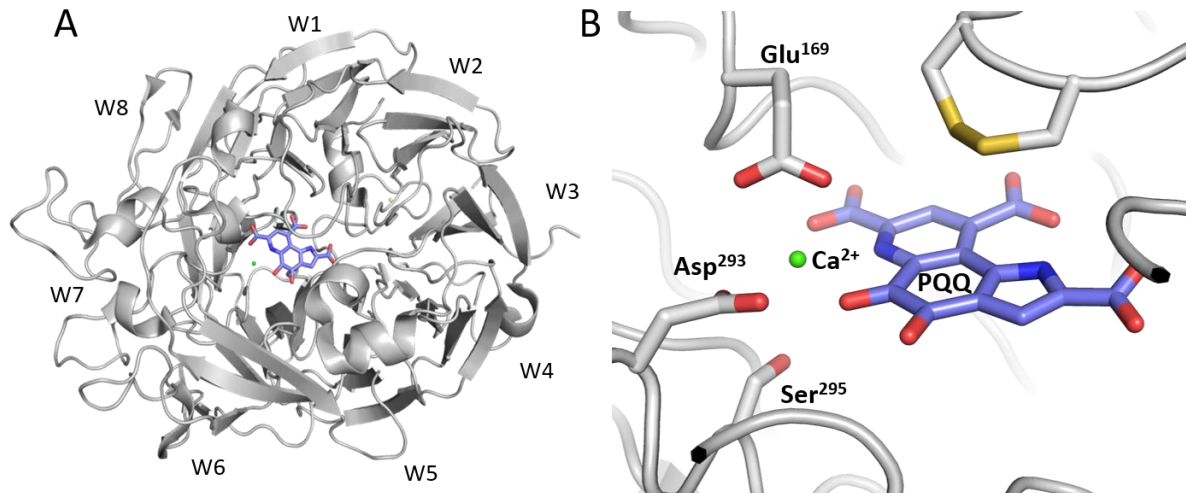


Abbildung 4: Kristallstruktur der PQQ-ADH ExaA aus *P. aeruginosa* PAO1 (PDB-Code: 1FLG). **A)** Blick von oben auf die achtblättrige β -Propellerstruktur (grau). β -Propellerblätter sind mit W1 – W8 nummeriert. **B)** Detailansicht der aktiven Tasche mit PQQ (violett), Ca^{2+} -Ion (grün) und Ca^{2+} -koordinierenden Aminosäureresten Glu¹⁶⁹, Asp²⁹³ und Ser²⁹⁵ (grau).

periplasmatische Lage sie für die Anwendung in Ganzzellbiokatalysen besonders attraktiv (Adachi et al., 2007). Da es Ziel dieser Arbeit war, PQQ-ADHs für die Biokatalyse zu etablieren, soll im folgenden Abschnitt deshalb besonders detailliert auf diese Enzymklasse eingegangen werden.

PQQ-ADHs kommen im Periplasma einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien vor, wo sie die Oxidation von Alkoholen und Aldehyden zu den jeweiligen Produkten irreversibel katalysieren (Anthony, 2001; Toyama et al., 2004). Dabei werden diese in die weniger flüchtigen Carbonsäurederivate umgewandelt, welche dann in den Metabolismus der Zelle eingeschleust werden können. Eine weitere Funktion ist die Detoxifizierung von schädlichen Alkohol- und Aldehydverbindungen (Adachi et al., 2007). Aufgrund ihrer Lage im Periplasma und der Irreversibilität der Reaktion sind sie für diese Aufgabe besonders prädestiniert (Toyama et al., 2004). Nicht umsonst enthalten Bakterienstämme wie *P. putida* KT2440, die für ihre hohe Robustheit und Toleranz gegenüber harschen Umwelt- und Laborbedingungen bekannt sind, eine oder mehrere PQQ-ADHs in ihrem Genom (Belda et al., 2016). PQQ-ADHs sind charakterisiert durch die Präsenz von je einem nicht-kovalent gebundenem PQQ-Molekül pro Protein als Cofaktor in der aktiven Tasche sowie einem Metallion, welches durch das Protein und den PQQ-Cofaktor koordiniert ist (**Abbildung 4B**) (Anthony and Ghosh, 1998). Am besten erforscht sind PQQ-ADHs, welche ein Ca^{2+} -Ion koordinieren (Chen et al., 2002; Goodwin and Anthony, 1998; Keitel et al., 2000;

Matsushita et al., 2002; Moonmangmee et al., 2001). Jedoch wurde jüngst nachgewiesen, dass in einigen Fällen auch Ln^{3+} -Ionen essentiell für die katalytische Aktivität sein können (Farhan Ul Haque et al., 2015; Fitriyanto et al., 2011a; Good et al., 2016; Keltjens et al., 2014; Pol et al., 2014).

PQQ-ADHs können aufgrund ihrer Zusammensetzung in drei Typen unterschieden werden (Anthony, 2001; Anthony and Ghosh, 1998; Matsushita et al., 2002):

- Typ I-Proteine kommen löslich im Periplasma vor und bestehen entweder aus Homodimeren (α_2) oder aus Heterotetrameren vom Typ $\alpha_2\beta_2$. Heterotetramere vom Typ $\alpha_2\beta_2$ setzen sich aus der großen α -Untereinheit, welche den PQQ-Cofaktor und das Metallion enthält, sowie einer kleinen β -Untereinheit, deren genaue Funktion noch unbekannt ist, zusammen.
- Typ II-Proteine weisen neben der PQQ- und Metallion-bindenden Domäne eine zusätzliche funktionelle Domäne auf, welche eine kovalent gebundene Häm *c*-Gruppe enthält. Sie werden deshalb auch als Quinohemoproteine bezeichnet.
- Typ III-PQQ-ADHs sind Proteinkomplexe, bestehend aus einer membrangebundenen Quinohemoproteineinheit sowie einer Cytochrom *c*-Untereinheit.

Allen PQQ-ADHs gemein ist die Tertiärstruktur der PQQ-koordinierenden Untereinheit (Chen et al., 2002; Keitel et al., 2000; Oubrie and Dijkstra, 2000; Pol et al., 2014). Diese wird als achtblättriger β -Propeller beschrieben und ist aus acht radialsymmetrisch angeordneten Einheiten von je vier antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut. Im Zentrum dieser Struktur sind der PQQ-Cofaktor und das Metallion koordiniert (**Abbildung 4A**).

PQQ-ADHs lassen sich auch aufgrund ihrer Substratspezifität klassifizieren. So gibt es Methanoldehydrogenasen (MDHs), die mit großer Spezifität Methanol und Formaldehyd oxidieren, sogenannte Ethanoldehydrogenasen, die Alkohol- und Aldehydverbindungen mit zwei und mehr Kohlenstoffatomen effektiv umsetzen sowie Polyoldehydrogenasen, die im Gegensatz zu Ethanoldehydrogenasen selektiv sekundäre oder tertiäre Hydroxylgruppen oxidieren.

1.2.4.1 PQQ-Methanoldehydrogenasen

PQQ-MDHs katalysieren die Oxidation von Methanol und Formaldehyd zu Formaldehyd und Ameisensäure im Periplasma von methanotrophen und methylophen Bakterien. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil für deren methanotrophen bzw. methylophen Lebensstil (Anthony et al., 1994; Chistoserdova et al., 2009; Chistoserdova and Kalyuzhnaya, 2018). Zuerst entdeckt und am meisten untersucht wurde die sogenannte MxaFI-MDH, welche ein Ca^{2+} -Ion als Metallcofaktor verwendet und in einer Vielzahl methanotropher und methylopher Spezies vorkommt (Anthony, 2004; Anthony et al., 1994; Anthony and Ghosh, 1998; Anthony and Zatman, 1964, 1967). MxaFI-MDHs sind Typ I-Quinoproteine vom Typ $\alpha_2\beta_2$, wobei *mxoF* für die große, Cofaktor-bindende α -Untereinheit und *mxoI* für die β -Untereinheit kodiert. Die genaue Funktion von *mxoI* ist bis heute nicht geklärt. Aufgrund der hohen Homologie zu *mxoF* wurde auch für das Gen *xoxF* vermutet, dass es für eine PQQ-MDH kodiert (Chistoserdova and Lidstrom, 1997; Schmidt et al., 2010). Im Gegensatz zu MxaFI enthält XoxF keine kleine Untereinheit, jedoch sind die PQQ- und Metallcofaktor-bindenden Aminosäurereste der aktiven Tasche weitgehend konserviert (Kalyuzhnaya et al., 2008; Pol et al., 2014; Wu et al., 2015). Lange Zeit konnte keine MDH-Aktivität für XoxF nachgewiesen werden, obwohl methylophen Spezies bekannt waren, die nur ein *xoxF*-Gen und keine *mxoFI*-Gene im Genom enthielten (Op den Camp et al., 2009). Somit war die Entdeckung, dass für die Aktivität von XoxF Seltenerdmetalle (REEs) der Lanthanid-Serie (Ln) essentiell sind und diese an Stelle von Ca^{2+} als Metallcofaktor fungieren, ein fundamentaler Durchbruch auf diesem Gebiet (Nakagawa et al., 2012; Pol et al., 2014). PQQ-ADHs sind bis heute die einzigen bekannten REE-abhängigen Enzyme.

Als REEs sind die Metalle der Lanthanid (Ln)-Serie von La bis Lu definiert sowie die sich im Periodensystem direkt über La befindlichen Sc und Y (Huheey, J. E., Keiter, E. A., & Keiter, 1993). Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie, mit seltenen Ausnahmen, alle im gleichen +3-Oxidationszustand natürlich vorkommen und dadurch, dass die Metalle der Ln-Serie aufgrund der schlechten Ladungsabschirmung der 4f-Elektronen mit zunehmender Ordnungsnummer einen kleineren Elektronenradius aufweisen (Bünzli and McGill, 2018; Shannon, 1976). REEs sind ubiquitär in der Erdkruste vorhanden, jedoch bilden sie extrem unlösliche Phosphat-

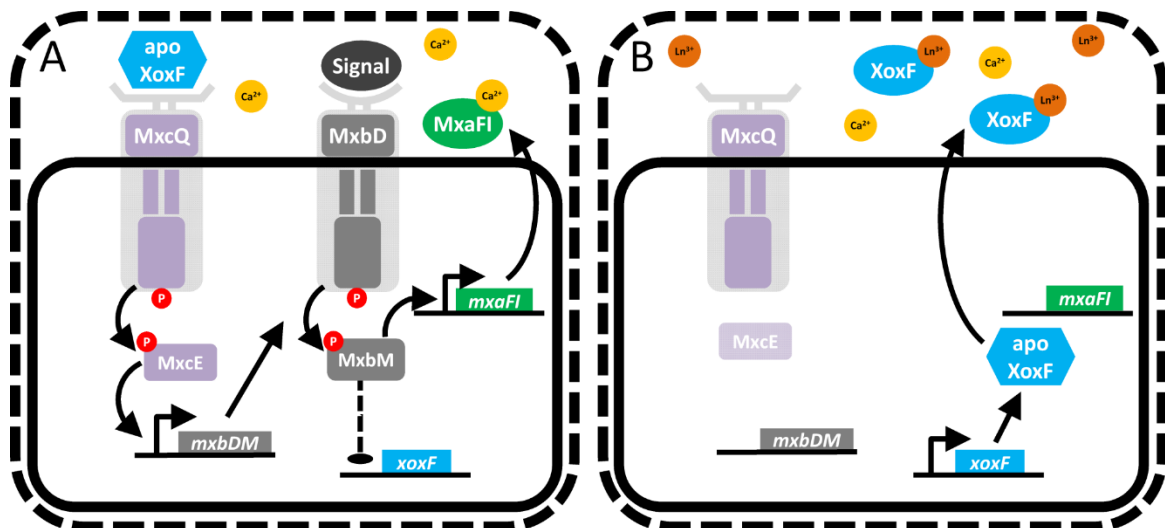


Abbildung 5: Vermuteter Mechanismus der Ln^{3+} -abhängigen Regulation von *xoxF* und *mxoFI* in *M. extorquens* AM1 (Vu *et al.*, 2016). **(A)** In Abwesenheit von Ln^{3+} bindet apo-XoxF an MxcQ, was zur Phosphorylierung von MxcE und letztendlich zur Expression der Zweikomponentensystem-codierenden Gene *mxoDM* führt. MxbD phosphoryliert MxbM, welches die Expression der *mxoFI*-Gene ermöglicht und die *xoxF*-Gene reprimiert. **(B)** In Gegenwart von Ln^{3+} liegt XoxF in seiner katalytisch aktiven Form vor und bindet nicht an MxcQ. Die *mxoFI*-Gene reprimiert und die *xoxF*-Gene exprimiert.

, Carbonat- oder Hydroxidsalze, weshalb sich die Konzentration freier Ln^{3+} -Ionen in Gewässern und Böden im Pico- bzw. Nanomolarbereich bewegt (Firsching and Brune, 1991; Meloche and Vrátný, 1959). Deshalb wurden sie lange Zeit als bedeutungslos für biologische Prozesse erklärt, obwohl sie aufgrund ihrer physiochemischen Eigenschaften als potentiell interessante Metallcofaktoren beschrieben wurden (Lim and Franklin, 2004).

Basierend auf Mutationsstudien, Kristallstrukturen und Homologiestudien wird angenommen, dass die Unterschiede in der Metallcofaktor-Abhängigkeit von einem Aspartat-Rest herrühren, der in XoxF-Proteinen als zusätzlicher Metallkoordinationsanker vorhanden ist (Good *et al.*, 2016, 2020; Pol *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu ist in allen bekannten MxaFI-Proteinen ein Alanin an dieser Position konserviert (siehe **Tabelle 40**, Abschnitt 4.3). Die häufig beobachtete höhere katalytische Aktivität der XoxF-MDHs gegenüber MxaFI-MDHs wird darauf zurückgeführt, dass Ln^{3+} -Ionen eine stärkere Lewis-Säure sind als Ca^{2+} (Bogart *et al.*, 2015). XoxF- und MxaFI-MDHs sind äußerst spezifisch für Methanol und Formaldehyd. Obwohl auch Organismen bekannt sind, welche ausschließlich *xoxF*-Gene enthalten, besitzen die meisten untersuchten Methyloprophen sowohl *mxoFI* als auch ein oder gar mehrere *xoxF*-Gene in ihrem Genom (Chistoserdova, 2016; Chistoserdova and Lidstrom, 1997; Chu *et al.*, 2016; Farhan Ul Haque *et al.*, 2015;

Huang et al., 2019; Keltjens et al., 2014; Krause et al., 2017; Op den Camp et al., 2009). In diesen Stämmen ist die Expression der alternativen MDHs streng reguliert. In Abwesenheit von Ln^{3+} -Ionen wird das *mxoFI* Operon transkribiert, wohingegen schon die Gegenwart nur geringer, nanomolarer Mengen an Ln^{3+} ausreichen, um eine starke Transkription des *xoxF*-Gens sowie die gleichzeitige Repression von *mxoFI* zu bewirken (Chu and Lidstrom, 2016). Dieses Ln^{3+} -abhängige Regulationsschema, die sogenannte „ Ln^{3+} -Switch“, konnte in einer Vielzahl methano- und methylo-tropher Organismen nachgewiesen werden. Sie wird durch ein komplexes Regulationsnetzwerk gesteuert, das von Bakterienstamm zu Bakterienstamm unterschiedlich erscheint (Akberdin et al., 2018; Chu and Lidstrom, 2016; Farhan Ul Haque et al., 2015; Gu and Semrau, 2017; Krause et al., 2017; Masuda et al., 2018; Ochsner et al., 2019; Vu et al., 2016). In *Methylobacterium extorquens* AM1, einem der am besten erforschten methylo-trophen Organismen, wird die Produktion von MxoFI sowie der beiden Ln^{3+} -abhängigen MDHs XoxF1 und XoxF2 in Abwesenheit von Ln^{3+} durch zwei verschiedene Zweikomponentensysteme (TCS) (MxcQE und MxbDM) sowie durch das orphanes Regulationsprotein MxoB kontrolliert (Springer et al., 1997; Vu et al., 2016; Xu et al., 1995). Zusätzlich ist für die Expression der *mxoFI*-Gene die Präsenz des *xoxF1*- sowie des *xoxF2*-Gens zwingend erforderlich (Skovran et al., 2011). Es wird vermutet, dass die Ln^{3+} -abhängige Regulation durch verschiedene Bindeaffinitäten der *apo*- und *holo*-Form von XoxF an die Sensorhistidinkinase MxcQ reguliert wird (**Abbildung 5**):

- In Abwesenheit von Ln^{3+} aktiviert die *holo*-Form von XoxF die Expression von *mxoFI* und reprimiert ihre eigene Expression mittels der TCS MxcQE und MxbDM (**Abbildung 5A**).
- In Gegenwart von Ln^{3+} liegt die Ln^{3+} -gebundene *apo*-Form von XoxF vor. Diese interagiert nicht mit MxcQ, weshalb die *mxoFI*-Gene reprimiert und die *xoxF*-Gene exprimiert werden (**Abbildung 5B**).

Der Typ I-Methanotroph *Methylobacterium buryatense* 5GB1C enthält keine homologen Gene zu *mxcQE* oder *mxbDM* (Chu and Lidstrom, 2016). In diesem Stamm wird die „ Ln^{3+} -Switch“ hauptsächlich durch die Sensorhistidinkinase MxoY reguliert (Chu et al., 2016). In Abwesenheit von Ln^{3+} aktiviert MxoY die Transkription von *mxoFI* mithilfe eines unbekanntes Regulationsproteins. Auch die Ln^{3+} -bedingte Aktivierung der Transkription von *xoxF* erfolgt über MxoY. Zusätzlich können auch

andere Metalle neben den Seltenerdmetallen einen Einfluss auf die „Ln³⁺-Switch“ ausüben. So wurde in *Methylosinus trichosporium* Ob3B beobachtet, dass sowohl die Ln³⁺-bedingte Repression von *mxoFI* als auch die Expression der *xoxF*-Gene in Gegenwart von Cu dramatisch reduziert sind (Gu et al., 2016; Gu and Semrau, 2017; Semrau et al., 2018). Nicht zuletzt kann auch die Interaktion unterschiedlicher Stämme dazu führen, dass die Expression der alternativen PQQ-MDHs verschieden reguliert wird. Im methanotrophen Stamm *Methylobacter tundripaludum* wechselt die Expression von *xoxF* zu *mxoFI*, wenn er mit nicht-methanotrophen methylo-trophen Stämmen wie *Methylo-tenera mobilis* 13 oder *Methylo-tenera mobilis* JLW8 kokultiviert wird (Krause et al., 2017). Da einhergehend mit dem MDH-Wechsel die Abgabe von Methanol in das Wachstumsmedium beobachtet wurde, wird davon ausgegangen, dass diese MDH-Regulation Teil eines Kreuzfütterungsmechanismus ist, welcher die nicht-methanotrophen Partner mit Substrat versorgt.

1.2.4.2 PQQ-Ethanoldehydrogenasen

Im Gegensatz zu MDHs weisen PQQ-abhängige Ethanoldehydrogenasen ein viel breiteres Substratspektrum auf, das primäre und sekundäre Alkohole mit Kettenlänge C2 bis C8, Polyole sowie sterisch anspruchsvolle Alkohole aber auch eine Vielzahl an Aldehyden beinhalten kann (Chattopadhyay et al., 2010; Takeda et al., 2013; Toyama et al., 1995). Die wohl am besten untersuchte PQQ-EDH ist das Typ I-Quinoprotein ExaA aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Chattopadhyay et al.,

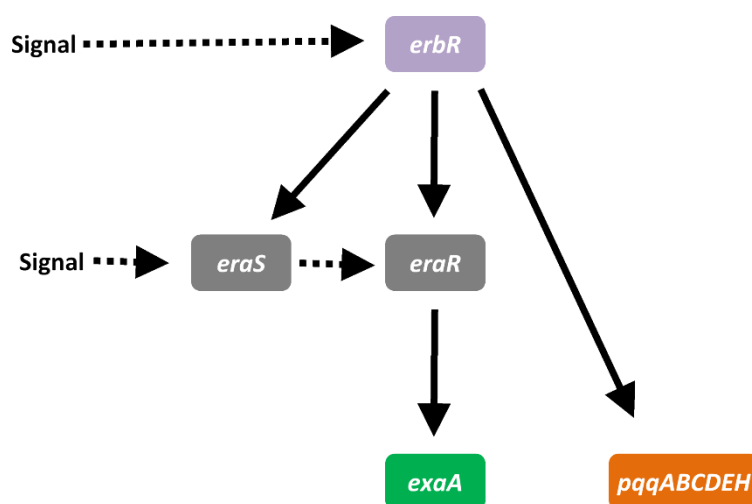


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Regulationsnetzwerks von *exaA* in *P. aeruginosa* nach Mern *et al.*, 2010. Das Regulationsprotein ErbR kontrolliert die Expression des Zweikomponentensystems *eraSR* sowie die Expression des PQQ-Synthesecusters *pqqABCDEH*. EraSR kontrolliert die Expression von *exaA*.

2010; Diehl et al., 1998; Keitel et al., 2000; Rupp and Görisch, 1988; Schobert and Görisch, 1999, 2001). Sie ist ein Homodimer, der je ein PQQ-Molekül und ein Ca^{2+} -Ion im aktiven Zentrum jeder Untereinheit enthält und weist ein breites Substratspektrum auf, das unter anderem auch einige azyklische Terpenalkohole und -aldehyde beinhaltet. Die Expression von *exaA* wird durch alkoholische Substrate induziert und durch ein hochkomplexes Signalnetzwerk kontrolliert, das hierarchisch organisiert ist (**Abbildung 6**) (Hempel et al., 2013; Mern et al., 2010). Im Zentrum dieses Netzwerks steht das Regulationsprotein *erbR*, welches sowohl die Expression des Zweikomponentensystems, bestehend aus der Sensorhistidinkinase *eraS* und dem Regulationsprotein *eraR*, als auch die des PQQ-Syntheseoperons *pqqABCDEH* kontrolliert (Gliese et al., 2004). Das TCS EraSR wiederum kontrolliert die Expression von *exaA* (Schobert and Görisch, 2001).

Homologe zu *exaA* kommen in einer Vielzahl von alpha-, beta- und gamma-Proteobakterien vor, unter anderem in den ökologisch wichtigen und/oder weit verbreiteten Klassen der Rhizobia, Burkholderia, Vibrionales, Rhodobacterales, Chromatiales und der Pseudomonaden (Huang et al., 2019). Auch der biotechnologisch vielfach verwendete Stamm *P. putida* KT2440 kodiert für ein Paar alternativer Typ I-Quinoproteine, *pedE* und *pedH*. Diese weisen eine hohe Sequenzsimilarität mit *exaA* auf und sind am Metabolismus verschiedener alkoholischer Substrate, wie *n*-Butanol, Ethanol, Ethylenglycol und 2-Phenylethanol, beteiligt (Arias et al., 2008; Mückschel et al., 2012; Simon et al., 2015; Takeda et al., 2013; Vallon et al., 2015; Vrionis, A. Daugulis, A. Kropinski, 2002). Zusätzlich konnte in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie demonstriert werden, dass in *M. extorquens* AM1 eine PQQ-EDH existiert, welche ein Ln^{3+} -Ion als Metallcofaktor nutzt, wodurch die Klasse der Ln^{3+} -abhängigen PQQ-Enzyme auf PQQ-EDHs erweitert werden konnte (Good et al., 2016).

Weit weniger untersucht sind PQQ-EDHs des Typs II. Es konnten jedoch einzelne Enzyme aus Pseudomonaden, Rhodopseudomonaden, Ralstonia und Comamonas isoliert werden (Chen et al., 2002; Oubrie et al., 2002; Toyama et al., 2004, 2005). Membrangebundene PQQ-EDHs des Typs III hingegen kommen ausschließlich in Essigsäurebakterien vor. Sie weisen ein vergleichsweise enges Substratspektrum auf, welches ausschließlich aus primären Alkoholen mit Kettenlänge C2 bis C6 sowie aus einigen Aldehyden besteht (Matsutani and Yakushi, 2018; Peters et al., 2013; Yakushi

and Matsushita, 2010).

1.2.4.3 PQQ-abhängige Polyoldehydrogenasen

PQQ-abhängige Polyoldehydrogenasen oxidieren eine Vielzahl verschiedener Polyolsubstrate und kommen fast ausschließlich in der periplasmatischen Membran von Essigsäurebakterien vor (Adachi et al., 2007). Im Gegensatz zu PQQ-EDHs bevorzugen PQQ-abhängige Polyoldehydrogenasen die sekundäre oder tertiäre Hydroxylgruppe und zeigen nur minimale Aktivität mit primären Hydroxylgruppen (Adachi and Yakushi, 2016). Der bekannteste Vertreter ist die Glyceroldehydrogenase (GLDH) aus *Gluconobacter* spp., die selektiv die sekundäre Hydroxylgruppe von einer Vielzahl an Substraten oxidiert. Neben Glycerol gehören besonders weitere Zuckeralkohole, wie Arabitol, Sorbitol, Mannitol, Erythritol, Ribitol oder D-Gluconsäure, zum Substratspektrum der GLDH (Matsushita et al., 2003). Andere bekannte Vertreter sind die Sorbitoldehydrogenase aus *Ketogulonicigenium vulgare* (Pappenberger and Hohmann, 2013), die Chinatdehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans* IF03244 (Vangnai et al., 2004) und die Inositoldehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H (Hölscher et al., 2007).

1.2.4.4 Reaktionsmechanismus von PQQ-ADHs

Unabhängig vom Typ wird angenommen, dass der Reaktionsmechanismus für alle PQQ-ADHs gleich verläuft (Oubrie and Dijkstra, 2000). Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass die Substratoxidation *via* eines Additions-/Eliminations-Mechanismus vonstattengeht, wird heutzutage ein direkter Hydridtransfer-Mechanismus als am wahrscheinlichsten betrachtet (Anthony et al., 1994; Kay et al., 2006b, 2006a; Leopoldini et al., 2007; McSkimming et al., 2018; Oubrie et al., 2002; Zheng et al., 2001). Der Hydridtransfer-Mechanismus wird initiiert durch eine basenkatalysierte Deprotonierung des Substrats, gefolgt von einem direkten Hydridtransfer vom Substrat auf das C5-Kohlenstoffatom des PQQ-Cofaktors (**Abbildung 7.1**). Das reduzierte PQQ tautomerisiert daraufhin unter der Bildung des Hydroquinons (**Abbildung 7.2 - Abbildung 7.3**). Die Reoxidation des reduzierten Cofaktors erfolgt anschließend durch zwei sequentielle Einelektronen-Transferschritte auf einen Elektronenakzeptor mit dem deprotonierten PQQ⁻-Radikal als Intermediat (Zhang et al., 2007). Neben dem PQQ-Cofaktor wird ein Aspartat-Rest, der sich in unmittelbarer Nähe des PQQ-Moleküls befindet, als essentiell für die

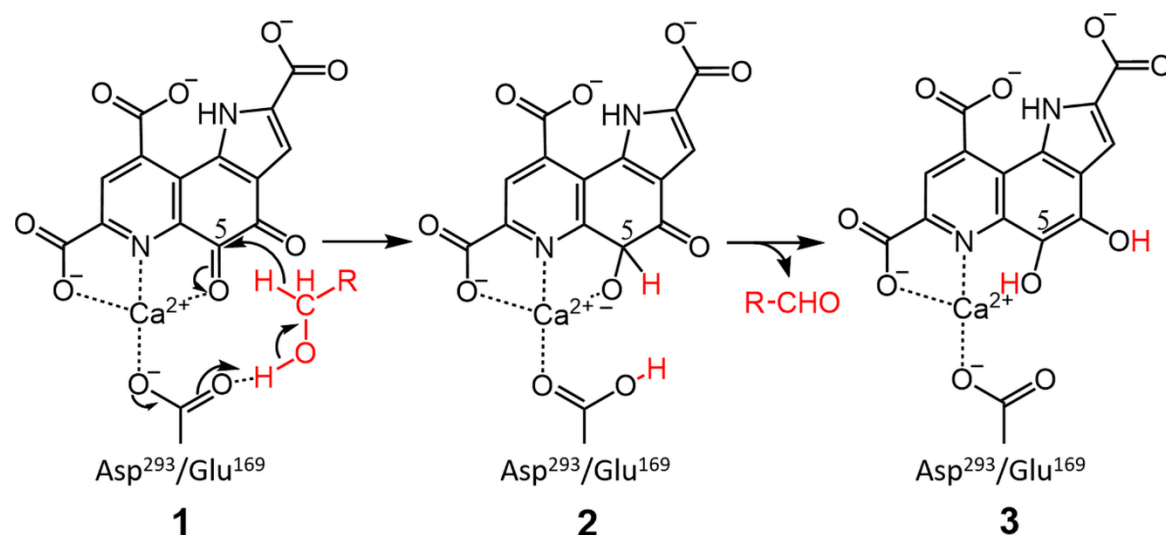


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Alkoholoxidation von PQQ-ADHs. Das C5-Kohlenstoffatom sowie die als katalytische Base fungierende Seitenkette sind eingezeichnet. Nummerierung entsprechend des Nummerierungsschemas aus der 3DM-Datenbank.

katalytische Aktivität eingestuft (Asp²⁹³ nach 3DM-Nummerierungsschema (Kuipers et al., 2010)). Asp²⁹³ ist konserviert in allen bis heute bekannten PQQ-ADHs und basierend auf Kristallstrukturen, Mutationsstudien und Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie (ENDOR)-Messungen wird angenommen, dass es bei der Protonenabstraktion vom Substratmolekül als Base fungiert (Afolabi et al., 2001; Kay et al., 2006b). Es existieren jedoch auch molekulardynamische Simulationen, welche nahelegen, dass ein weniger konservierter Glutamat-Rest (Glu¹⁶⁹), der sich ebenfalls in unmittelbarer Umgebung des PQQ-Cofaktors befindet, als katalytische Base dient (Reddy and Bruice, 2003). Für den katalytischen Mechanismus ist außerdem ein Ca²⁺ bzw. Ln³⁺-Metallion unerlässlich, welches in der aktiven Tasche sowohl von PQQ als auch von mehreren Aminosäureresten koordiniert wird. Es fungiert als Lewis-Säure und polarisiert dabei die O5-C5-Bindung des PQQ-Cofaktors, wodurch das C5-Kohlenstoffatom zu einem stärkeren Nukleophil wird und den Hydridtransfer somit ermöglicht (Anthony et al., 1994; Goodwin and Anthony, 1996; Oubrie and Dijkstra, 2000; Zheng et al., 2001). Es wird angenommen, dass ein entscheidender Vorteil des Ln³⁺-Ions gegenüber des Ca²⁺-Ions dessen größere Lewis-Acidität ist (Pol et al., 2014). Tatsächlich konnte basierend auf DFT-Kalkulationen gezeigt werden, dass die Aktivierungsenergie für den Hydridtransfer des Ce³⁺-PQQ-Komplexes deutlich niedriger ist als die des Ca²⁺-PQQ-Komplexes (Bogart et al., 2015). Auch bei der von PQQ-ADHs katalysierten Oxidation von Aldehyden wird von einem Hydridtransfer-Mechanismus als wahrscheinlichstem Reaktionsweg ausgegangen

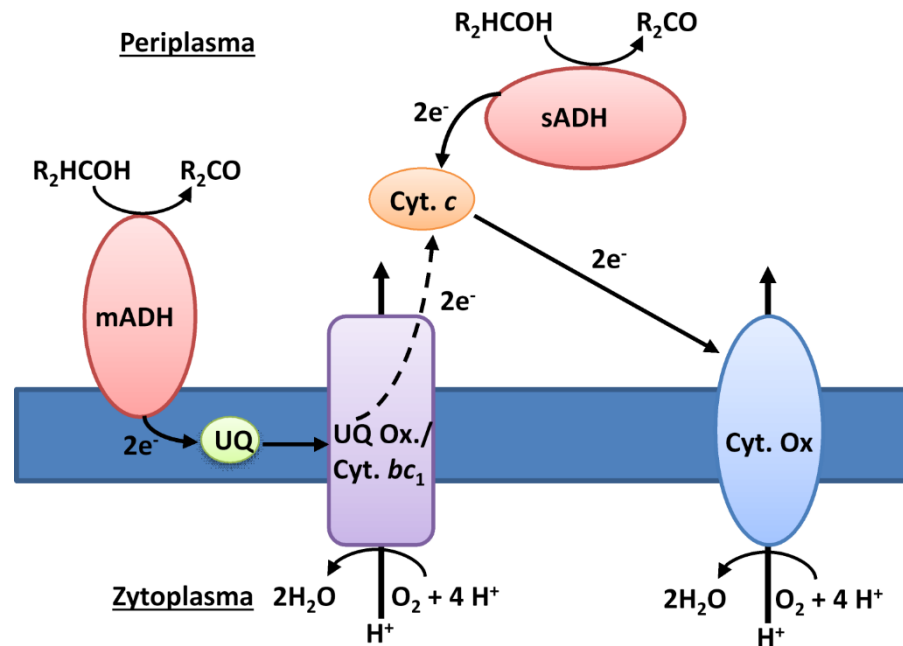


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Oxidationssystems der PQQ-ADHs. Membrangebundene PQQ-ADHs (mADHs) reduzieren Ubichinon (UQ) in der cytoplasmatischen Membran. Die Elektronen werden von UQ entweder direkt auf eine terminale Ubichinon-Oxidase (UQ Ox.) oder via Cytochrom *bc*₁ (Cyt. *bc*₁) und Cytochrom *c* (Cyt. *c*) auf eine terminalen Cytochrom-*c*-Oxidase (Cyt. Ox) übertragen. Diese zum Aufbau eines Protonengradienten verwendet. Lösliche PQQ-ADHs reduzieren Cytochrom *c* im Periplasma. Elektronen von Cytochrom *c* werden von einer terminalen Cytochrom-*c*-Oxidase zur Erstellung eines Protonengradienten verwendet.

(Anthony, 1986). Im Gegensatz zur Alkoholoxidation wird hier die Reaktion durch einen basenkatalysierten nukleophilen Angriff eines Hydroxidions auf das C1-Atom des Aldehyds initiiert. Auch für diesen Reaktionsschritt wird angenommen, dass Asp²⁹³ als katalytische Base fungiert, jedoch in diesem Fall durch Protonenabstraktion von einem Wassermolekül (Oubrie et al., 2002).

Nach der Substratoxidation übertragen PQQ-ADHs vom Typ I die gewonnenen Elektronen direkt auf ein periplasmatisches Cytochrom *c*, wohingegen PQQ-ADHs vom Typ II die Elektronen von PQQ zuerst auf ein intramolekulares Häm *c* und anschließend auf einen periplasmatischen Elektronenmediator wie Cytochrom *c* transferieren (**Abbildung 8**) (Anthony, 2001; Matsushita et al., 1999; Schobert and Görisch, 1999). In PQQ-ADHs vom Typ III werden die Elektronen zuerst auf die proteineigene Cytochrom-*c*-Untereinheit und von dort auf Ubichinon übertragen, das in der periplasmatischen Membran zu finden ist (Toyama et al., 2004). Unter anderem basierend auf Mutationsstudien und DFT-Kalkulation wird vermutet, dass für den Elektronentransfer vom PQQ-Cofaktor auf den primären Elektronenakzeptor ein ungewöhnlicher Disulfidring eine entscheidende Rolle spielt (Chen et al., 2002; Kay et

al., 2006a; Mennenga et al., 2009; Oubrie et al., 2002). Dieser besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Cystein-Resten und befindet sich unmittelbar oberhalb des PQQ-Cofaktors in der aktiven Tasche aller bisher charakterisierten PQQ-ADHs (Davidson, 2004; Jahn et al., 2018; Keitel et al., 2000; Oubrie et al., 2002; Pol et al., 2014; Xia et al., 2003). Von Cytochrom *c* werden die Elektronen letztendlich auf die terminale Cytochrom-*c*-Oxidase übertragen, wo sie zur Energiegewinnung beitragen. Ubichinon überträgt die Elektronen zur Energiegewinnung entweder direkt auf eine terminale Ubichinonoxidase oder mit Zwischenschritt *via* Cytochrom *bc*₁ und Cytochrom *c* auf eine Cytochrom-*c*-Oxidase (García-Horsman et al., 1994; Matsushita et al., 1994).

1.2.4.5 Biotechnologische Anwendungen von PQQ-ADHs

PQQ-ADHs bringen eine Vielzahl biotechnologisch interessanter Eigenschaften mit, wie die Irreversibilität der katalysierten Reaktion und ihrer Fähigkeit den PQQ-Cofaktor effizient über die Atmungskette oder gar mittels einer Elektrode zu regenerieren (Goodwin and Anthony, 1998; Takeda et al., 2013). Aufgrund ihrer Lage im Periplasma sind Substrattransportschritte über die periplasmatische Membran nicht erforderlich und auch potentiell cytotoxische Substrate und Produkte können besser von der Zelle toleriert werden, wenn sie nicht im Zytoplasma akkumulieren. Abgesehen von dem um 1670 etablierten Orlean-Verfahren zur Essigproduktion sind jedoch nur wenige biotechnologische Anwendungen bis heute bekannt (Adachi et al., 2007).

Die wohl bekannteste biotechnologische Anwendung von PQQ-ADHs ist die industrielle Produktion von Vitamin C aus D-Sorbitol (Pappenberger and Hohmann, 2013). Am weitesten verbreitet ist ein zweistufiger Fermentationsprozess, bei welchem im ersten Schritt D-Sorbitol durch *G. oxydans* zu L-Sorbose oxidiert wird. Katalytisch aktiv ist hierbei die in Abschnitt 1.2.4.3 erwähnte PQQ-GLDH. L-Sorbose wird anschließend von *K. vulgare* zu L-Sorboson und weiter zu 2-Keto-L-Gulonsäure oxidiert. Auch diese Reaktionsschritte werden von PQQ-ADHs katalysiert, wobei es sich in diesem Fall um die sogenannte Sorbose/Sorbosondehydrogenase handelt, einer für primäre Hydroxylgruppen spezifische PQQ-ADH mit breitem Substratspektrum (Akira et al., 1996). Die anschließende Lactonisierung zur L-Ascorbinsäure erfolgt basenkatalysiert in einem chemischen Syntheseschritt.

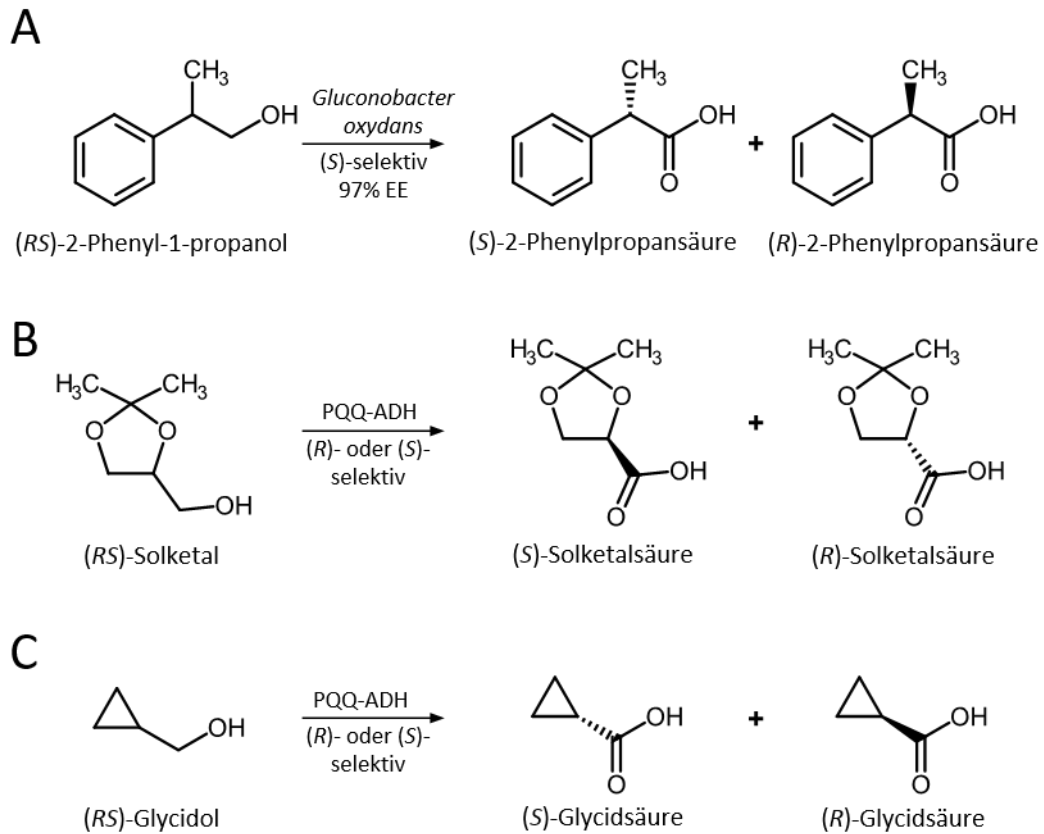


Abbildung 9: Strukturen von 2-Phenyl-1-propanol (**A**), Solketal (**B**) und Glycidol (**C**) sowie ihrer jeweiligen Oxidationsprodukte. In der kinetischen Racematspaltung von 2-Phenyl-1-propanol mit *Gluconobacter oxydans* entsteht (*S*)-2-Phenylpropansäure mit einem EE von 97% (Molinari et al., 1999). Für die kinetische Racematspaltung von Solketal und Glycidol sind PQQ-ADHs aus unterschiedlichen Organismen mit verschiedenen Stereoselektivitäten bekannt, was die Produktion des (*S*)- als auch des (*R*)-Stereoisomers ermöglicht (Geerlof et al., 2014).

Neben den in Abschnitt 1.1.4 beschriebenen Biotransformationen von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) zu 2,5-Furandicarbonsäure (FDCA) und Ethylenglycol zu Glyoxylsäure, in welchen auch PQQ-ADHs einen der Reaktionsschritte katalysieren, können PQQ-ADHs und PQQ-ADH produzierende Mikroorganismen auch für die kinetische Racematspaltung genutzt werden. Beispiele hierfür sind die stereoselektive Oxidation von racemischem Solketal, Glycidol und 2-Phenyl-1-propanol (**Abbildung 9**) (Geerlof et al., 2014; Molinari et al., 1999; Wandel et al., 2001).

Eine weitere potentielle Anwendung ist die Produktion von Glycerinsäure aus Glycerol. Habe *et al.* konnten mit *Acetobacter tropicalis* aus Glycerol bis zu 101.8 g/l D-Glycerat mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % EE D-Glycerat erzeugen und zeigen, dass eine membrangebundene PQQ-ADH vom Typ III das essentielle Enzym in diesem Prozess ist (Habe et al., 2009). Ähnliche Anwendungen, bei denen

PQQ-ADH produzierende Stämme zur Produktion von Carbonsäuren aus den jeweiligen Alkoholvorläufern verwendet werden, sind die biokatalytische Darstellung von Phenyllessigsäure aus 2-Phenylethanol, (*R*)-3-Hydroxybutansäure aus 2-Methyl-1,3-propandiol oder (*R*)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure aus 2-Methyl-1,3-propandiol (Gandolfi et al., 2004; León et al., 2001; Molinari et al., 2003).

Aufgrund ihrer Fähigkeit eine Vielzahl verschiedener Substrate zu oxidieren und Elektronen direkt auf Carbonelektroden übertragen zu können, sind PQQ-ADHs auch als amperometrische Biosensoren und bei der Konstruktion von Biobrennstoffzellen von großem Nutzen (Laurinavicius et al., 2004; Ramanavicius et al., 2005; Treu and Minter, 2008).

REE-abhängige PQQ-ADHs sowie REE-abhängige PQQ-ADH produzierende Mikroorganismen könnten zusätzlich eine bedeutende Rolle sowohl als REE-Biosensoren als auch für die Gewinnung und Wiederverwertung von REEs spielen. In einem Modellexperiment konnte gezeigt werden, dass der Methylothermophil *M. extorquens* AM1 das Seltenerdmetall Nd aus einer Computerfestplatte nicht nur detektieren, sondern auch aktiv aufnehmen und zum Wachstum verwenden kann (Martinez-Gomez et al., 2016). Im Gegensatz zur konventionellen Gewinnung von REEs, die bei hohen Temperaturen und dem Einsatz von starken Säuren erfolgt, wodurch giftige und gar radioaktive Abfallprodukte entstehen, wäre somit die Verwendung von REE-abhängigen PQQ-ADH produzierenden Mikroorganismen eine deutlich umweltschonendere Variante (Zhuang et al., 2015). Bis es jedoch soweit ist, müssen noch viele Hindernisse aus dem Weg geräumt werden. Wichtig wäre es, die spezifische Selektivität für die einzelnen REEs zu erhöhen. Zudem konnten noch keine Stämme identifiziert werden, die auch die industriell besonders wertvollen, schweren Lanthanide (Terbium - Lutetium) zum Wachstum verwenden. Bisher konnten außerdem noch keine PQQ-ADHs identifiziert werden, welche die nicht-lanthanidischen Seltenerdmetalle Y oder Sc als Metallcofaktor verwenden.

1.3 Motivation

PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen katalysieren die irreversible Oxidation einer Vielzahl an Alkohol- und Aldehydverbindungen zu den jeweiligen Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren. Besonders für Ganzzellsysteme weisen sie viele Eigenschaften auf, die sie zu idealen Enzymen für biokatalytische Anwendungen machen. Aufgrund ihrer Lage im Periplasma des Wirtsorganismus erfolgt die jeweilige Reaktion außerhalb der Zelle. Dies vereinfacht die Produktaufreinigung und führt außerdem dazu, dass Reaktionssubstrate nicht erst in das Cytoplasma gelangen und Reaktionsprodukte außerhalb der Zelle akkumulieren. Für Reaktionen, in denen toxische Substrate oder Produkte involviert sind, könnte dies höhere Substrat- bzw. Produkttiter ermöglichen und auch den damit assoziierten Stress für den jeweiligen Wirtsorganismus verringern. Weiterhin ist die cytoplasmatische Aufnahme von Kohlenstoffverbindungen häufig nur unter Einsatz von Energie in Form von ATP oder Konzentrationsgradienten möglich, was sich negativ auf die Energiebilanz und somit letztendlich auf die Effizienz eines Prozesses auswirken kann. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Regenerierung des Cofaktors, die bei PQQ-ADHs effizient über die Atmungskette erfolgt und gleichzeitig zur Energieproduktion beiträgt. Trotz all dieser Vorzüge sind bis heute kaum biotechnologische Anwendungen von PQQ-ADHs bekannt.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung von PQQ-ADHs für die Biokatalyse. Aufgrund der in Abschnitt 1.1.4 aufgeführten, vorteilhaften Eigenschaften von *P. putida* für biotechnologische Prozesse, wie z.B. der hohen metabolischen Flexibilität, der Fähigkeit feindlichen Umweltbedingungen zu widerstehen sowie den aus der Arbeitsgruppe bestehenden Vorkenntnissen (Mückschel et al., 2012; Simon et al., 2015), wurden die zwei PQQ-ADHs PedE und PedH aus *P. putida* KT2440 hierfür ausgewählt. Anhand dieser Enzyme sollten zwei grundlegende Meilensteine erreicht werden:

1. Die genaue Charakterisierung der beiden PQQ-ADHs, einschließlich deren Regulationsmechanismen, sowie deren Einfluss auf das Wachstum unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.

2. Die Etablierung von Methoden zur Entwicklung von PQQ-ADHs mit neuen oder veränderten Funktionen.

3. Modellprojekte zur Validierung der etablierten Methoden, die gleichzeitig das Potential von PQQ-ADHs für biotechnologischen Anwendungen aufzeigen. Exemplarisch sollte die Enzymstabilität verbessert sowie die Substratspezifität hinsichtlich neuer, industriell wertvoller Reaktionsschritte erweitert werden. Hierfür wurde die Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA), einem wichtigen Reaktionsschritt in der Herstellung von nachhaltigen Alternativen zu Terephthalsäure, sowie die Oxidation von Glycolsäure zu Glyoxylsäure, einem wichtigen Baustein für die Agrar-, Aroma-, Polymer- und Pharmaindustrie, ausgewählt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und Plasmide sind in **Tabelle 1** und **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz/Quelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F</i> - <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B m_B) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F</i> - <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ</i> -	Invitrogen
<i>E. coli</i> HB101	<i>F</i> - <i>mcrB mrr hsdS20(r_B- m_B-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) gln V44 λ</i> -	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
<i>E. coli</i> PIR2	<i>F</i> - <i>Δlac169 rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA reacA1 uidA(ΔMlui)::pir</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 λpir</i> phage lysogen	(Herrero et al., 1990)
KT2440	Wildtyp-Stamm von <i>Pseudomonas putida</i> (ATC 47054)	
KT2440*	KT2440 mit markerloser Deletion von <i>upp</i> ; Ursprungsstamm für Deletionsstämme	(Graf and Altenbuchner, 2011)
Δ <i>pedE</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>pedE</i>	(Mückschel et al., 2012)
Δ <i>pedH</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>pedH</i>	(Mückschel et al., 2012)
Δ <i>pedE</i> Δ <i>pedH</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>pedE</i> und <i>pedH</i>	(Mückschel et al., 2012)
Δ <i>pqq</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>pqqABCDE</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedE</i> Δ <i>pedS2</i>	Δ <i>pedE</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedS2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedE</i> Δ <i>pedR2</i>	Δ <i>pedE</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedR2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedE</i> _PedS2 ^{S178P}	Δ <i>pedE</i> Stamm mit S178P Mutation in <i>pedS2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedE</i> _PedS2 ^{S178P} Δ <i>pedR2</i>	Δ <i>pedE</i> _PedS2 ^{S178P} Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedR2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedH</i> Δ <i>pedS2</i>	Δ <i>pedH</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedS2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedH</i> Δ <i>pedR2</i>	Δ <i>pedH</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedR2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedH</i> _PedS2 ^{S178P}	Δ <i>pedH</i> Stamm mit S178P Mutation in <i>pedS2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>pedH</i> _PedS2 ^{S178P} Δ <i>pedR2</i>	Δ <i>pedH</i> _PedS2 ^{S178P} Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedR2</i>	Diese Arbeit
Δ <i>glcDEF</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>glcDEF</i>	Diese Arbeit
Δ <i>garK</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>garK</i>	Erstellt von P. Billard
Δ <i>calA</i>	KT2440* mit markerloser Deletion von <i>calA</i>	Erstellt von P. Billard
Δ <i>pedE</i> Δ <i>pedA1</i>	Δ <i>pedE</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedA1</i> (PP_5538)	Diese Arbeit
Δ <i>pedE</i> Δ <i>pedA2</i>	Δ <i>pedE</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedA2</i> (PP_2669)	Diese Arbeit
Δ <i>pedE</i> Δ <i>pedBC</i>	Δ <i>pedE</i> Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedB</i> (PP_2668) und <i>pedC</i> (PP_2667)	Diese Arbeit

$\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$	$\Delta pedE$ Stamm mit markerloser Deletion von Operon <i>pedA1A2BC</i>	Diese Arbeit
$\Delta pedE \Delta pvdD$	$\Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von <i>pvdD</i> (PP_4219)	Diese Arbeit
$\Delta pedH \Delta pedA1$	$\Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedA1</i> (PP_5538)	Diese Arbeit
$\Delta pedH \Delta pedA2$	$\Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedA2</i> (PP_2669)	Diese Arbeit
$\Delta pedH \Delta pedBC$	$\Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von <i>pedB</i> (PP_2668) und <i>pedC</i> (PP_2667)	Diese Arbeit
$\Delta pedH \Delta pedA1A2BC$	$\Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von Operon <i>pedA1A2BC</i>	Diese Arbeit
$\Delta pedH \Delta pvdD$	$\Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von <i>pvdD</i> (PP_4219)	Diese Arbeit
$\Delta glpFKRD$	KT2440* mit markerloser Deletion von Operon <i>glpFKRD</i> (PP_1076 - PP_1073)	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$	$\Delta pedE \Delta pedH$ Stamm mit markerloser Deletion von Operon <i>glpFKRD</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta glpFKRD \Delta gark$	Stamm $\Delta glpFKRD$ mit markerloser Deletion von <i>gark</i>	Erstellt von P. Billard
KT2440*:: <i>Tn7-pedE-lux</i>	KT2440* mit integriertem mini <i>Tn7-pedE-lux</i>	Erstellt von P. Billard
KT2440*:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	KT2440* mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE$:: <i>Tn7-pedE-lux</i>	$\Delta pedE$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedE-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE$:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	$\Delta pedE$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedH$:: <i>Tn7-pedE-lux</i>	$\Delta pedH$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedE-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedH$:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	$\Delta pedH$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE \Delta pedS2$:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	$\Delta pedE \Delta pedS2$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE \Delta pedR2$:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	$\Delta pedE \Delta pedR2$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE_PedS2^{S178P}$:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	$\Delta pedE_PedS2^{S178P}$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedH \Delta pedS2$:: <i>Tn7-pedE-lux</i>	$\Delta pedH \Delta pedS2$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedE-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedH \Delta pedR2$:: <i>Tn7-pedE-lux</i>	$\Delta pedH \Delta pedR2$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedE-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedH_PedS2^{S178P}$:: <i>Tn7-pedE-lux</i>	$\Delta pedH_PedS2^{S178P}$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedE-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedA1A2BC$:: <i>Tn7-pedH-lux</i>	$\Delta pedA1A2BC$ mit integriertem mini <i>Tn7-pedH-lux</i>	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE/H \Delta glp$ - <i>Tn7M-pedE</i>	$\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ mit ektopischer <i>pedE</i> Komplementierung von natürlichem <i>pedE</i> Promotor	Erstellt von P. Billard
$\Delta pedE/H \Delta glp$ - <i>Tn7M-pedH</i>	$\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ mit ektopischer <i>pedH</i> Komplementierung von natürlichem <i>pedH</i> Promotor	Erstellt von P. Billard

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJEM1	Rhamnose induzierte Produktion von EGFP (pBBR1MCS-Derivat)	(Jeske and Altenbuchner, 2010)
pJoe4036.1:: <i>exaA</i> (His) ₆	Rhamnose induzierte Produktion von ExaA	(Chattopadhyay et al., 2010)
pJEM[PedR2]	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedR2	Diese Arbeit
pJEM[PedR2 ^{D53A}]	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedR2 ^{D53A}	Diese Arbeit

pJOE6261.2	Suizid-Vektor zur Gendeletion in <i>P. putida</i>	(Graf and Altenbuchner, 2011)
pMW08	pJOE6261.2 basierte Deletion von <i>glcDEF</i> (PP_3745 bis PP_3747)	Diese Arbeit
pMW09	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedE mit C-terminalem 6x His-tag	Diese Arbeit
pMW10	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedH mit C-terminalem 6x His-tag	Diese Arbeit
pMW12	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedE ^{S295D} mit C-terminalem 6x His-tag	Diese Arbeit
pMW30	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedE ^{E408P} mit C-terminalem 6x His-tag	Diese Arbeit
pMW33	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedE ^{R91D/E408P} mit C-terminalem 6x His-tag	Diese Arbeit
pMW35	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedE ^{R91D/E408P/N410K} mit C-terminalem 6x His-tag	Diese Arbeit
pMW43	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion des PQQ-Biosynthese Genclusters <i>pqqABCDE</i>	Diese Arbeit
pMW50	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>pvdD</i> (PP_4219)	Diese Arbeit
pMW55	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>pedS2</i>	Diese Arbeit
pMW56	pJOE6261.2-basierter Vektor um S178P Mutation in <i>pedS2</i> einzufügen	Diese Arbeit
pMW57	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Operon <i>pedA1A2BC</i> (PP_2669, PP_2668, PP_2667, PP_5538)	Diese Arbeit
pMW61	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>pedR2</i>	Diese Arbeit
pMW62	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion der Gene <i>pedB</i> (PP_2668) und <i>pedC</i> (PP_2667)	Diese Arbeit
pMW63	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>pedA2</i> (PP_2669)	Diese Arbeit
pMW64	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>pedA1</i> (PP_5538)	Diese Arbeit
pLB01	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedH ^{D295S} mit C-terminalem 6x His-tag	Kloniert von L. Bendz
pLB13	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedH ^{D295A} mit C-terminalem 6x His-tag	Kloniert von L. Bendz
pSM07	pJEM1-basierter Vektor zur Rhamnose induzierten Produktion von PedH ^{D295T} mit C-terminalem 6x His-tag	Kloniert von S. Moors
pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lux</i>	Vektor zur chromosomalen Integration einer <i>lux</i> -transkriptionellen Reporterfusion mithilfe des mini-TN7 Elements	(Choi et al., 2005)
pUC18-mini-Tn7T- <i>pedE-lux</i> -Gm	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lux</i> Plasmid mit <i>pedE</i> -Promotor abhängiger Transkription von <i>luxCDABE</i>	Kloniert von P. Billard
pUC18-mini-Tn7T- <i>pedH-lux</i> -Gm	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lux</i> Plasmid mit <i>pedH</i> -Promotor abhängiger Transkription von <i>luxCDABE</i>	Kloniert von P. Billard
pTNS2	Helferplasmid zur chromosomalen Integration von TN7	(Choi et al., 2005)
pJOE- <i>calA</i>	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>calA</i> (PP_2426)	Kloniert von P. Billard
pJOE- <i>garK</i>	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Gen <i>garK</i> (PP_3178)	Kloniert von P. Billard
pJOE- <i>glp</i>	pJOE6261.2-basierter Vektor zur Deletion von Operon <i>glpFKRD</i> (PP_1076 – PP_1073)	Kloniert von P. Billard
pTn7-M	Km ^R Gm ^R , <i>ori R6K</i> , <i>Tn7L</i> and <i>Tn7R</i> extremities, standard multiple cloning site, <i>oriT</i> RP4	(Zobel et al., 2015)
pRK600	Cm ^R , <i>ori ColE1</i> , Tra ⁺ Mob ⁺ of RK2	(Keen et al., 1988)
pTNS1	Ap ^R , <i>ori R6K</i> , <i>TnSABC+D</i> Operon	(Choi et al., 2005)
pTn7M-pedE	pTn7M mit <i>pedE</i> Genexpression von dessen natürlichem Promotor	Kloniert von P. Billard
pTn7M-pedH	pTn7M mit <i>pedH</i> Genexpression von dessen natürlichem Promotor	Kloniert von P. Billard

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Name	Verwendung	Sequenz 5' → 3'	T _{Anlagerung}
MWH11	Konstruktion von pMW09; Fwd-Primer	CAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGACAATAA GATCGCTACCCGCCCTTTCC	63°C
MWH12	Konstruktion von pMW09; Rev-Primer	GTCAATAAACCGGTAAGCTTAGTGGTGGTGGTGGT GGTGCTCGAGAGAGCCAGAGCCACGTTGTGCAGTCT TGTGTGCC	63°C
MWH13	Konstruktion von pMW10; Fwd-Primer	CAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGACCCGAT CCCCACGTCG	63°C
MWH14	Konstruktion von pMW10; Rev-Primer	AGTCAATAAACCGGTAAGCTTAGTGGTGGTGGTGG TGGTCTCGAGAGAGCCAGAGCCTGGCTTGACGCTT GCCGTTTG	63°C
MWH34	Konstruktion von pMW43; Upstreamregion Fwd- Primer	GCCGCTTTGGTCCCGGCCCTTGATGCTCAAGCC	60°C
MWH35	Konstruktion von pMW43; Upstreamregion Rev-Primer	GCGCTGAATGGAATTACTCCTCCGAATGAGG	60°C
MWH36	Konstruktion von pMW43; Downstreamregion Fwd- Primer	AGTAATTCCATTCAGCGCGGCC	65°C
MWH37	Konstruktion von pMW43; Downstreamregion Rev- Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGCGGCACCACCGGC	65°C
MWH56	Konstruktion von pMW50; Upstreamregion Fwd- Primer	GCCGCTTTGGTCCCGGCCACCGGCGAGTTGCA	60°C
MWH57	Konstruktion von pMW50; Upstreamregion Rev-Primer	CCCGAAAGCTTGAACATCTCCTACCAGGGC	60°C
MWH58	Konstruktion von pMW50; Downstreamregion Fwd- Primer	ATGTTCAAGCTTTCGGGGCCG	60°C
MWH59	Konstruktion von pMW50; Downstreamregion Rev- Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGCTTACAGATGCTGCTGCAG TGC	60°C
MWH85	Amplifikation von <i>pedS2</i> ; Fwd-Primer	GGAAATATGCAGAAAGTAGCGCTCG	60°C
MWH86	Amplifikation von <i>pedS2</i> ; Rev-Primer	TCTTACCCTGGCGCCT	60°C
MWH90	Konstruktion von pMW55; Upstreamregion Fwd- Primer	GCCGCTTTGGTCCCGCAGGCACTGGCTGCTGC	60°C
MWH91	Konstruktion von pMW55; Upstreamregion Rev-Primer	CGATATTCAAAGCGGTTCTCCTCAGGC	60°C
MWH92	Konstruktion von pMW55; Downstreamregion Fwd- Primer	GAACCGCTTTGAATATCGTGTTGGTCGATGACCAC	60°C
MWH93	Konstruktion von pMW55; Downstreamregion Rev- Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGGATGCACAAGCTCGGCG	60°C
MWH94	Konstruktion von pMW57; Upstreamregion Fwd- Primer	GCCGCTTTGGTCCCGCAACAACGCCAGGCCAC	60°C
MWH95	Konstruktion von pMW57; Upstreamregion Rev-Primer	GCCAGGTTTAACACACTCCACGGCAGATGG	60°C

MWH96	Konstruktion von pMW57; Downstreamregion Fwd-Primer	AGTGTGTTAAACCTGGCGTGTAACCCG	60°C
MWH97	Konstruktion von pMW57; Downstreamregion Rev-Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGCCAGGGAGGTTGCTATGC	60°C
MWH98	Konstruktion von pMW56; Upstreamregion Fwd-Primer	GCCGCTTTGGTCCCAGGTTAGTAATTCAGTGCGGGG G	60°C
MWH99	Konstruktion von pMW56; Upstreamregion Rev-Primer	TGCCCCCTGGGACCTGGTG	60°C
MWH100	Konstruktion von pMW56; Downstreamregion Fwd-Primer	GGTCCCAGGCGGGCAATTG	60°C
MWH101	Konstruktion von pMW56; Downstreamregion Rev-Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGGCAGCCATTGTGCGGAATG	60°C
MWH106	Konstruktion von pMW61; Upstreamregion Fwd-Primer	GCCGCTTTGGTCCCAGGAGCAGGAGCGTAC	65°C
MWH107	Konstruktion von pMW61; Upstreamregion Rev-Primer	TGAAATACCCACACCTCCTGGGGAATGTTAAG	65°C
MWH108	Konstruktion von pMW61; Downstreamregion Fwd-Primer	GGAGGTGTGGGTATTTTCATTGCACCTGTTGGGGC	65°C
MWH109	Konstruktion von pMW61; Downstreamregion Rev-Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGGAGCCAACCTGACCC	65°C
MWH110	Konstruktion von pMW62; Upstreamregion Fwd-Primer	GCCGCTTTGGTCCCAGGACACCGTCACCGACA	65°C
MWH111	Konstruktion von pMW62; Upstreamregion Rev-Primer	CCAGGTTTGGTGTACACCACCGCC	65°C
MWH112	Konstruktion von pMW62; Downstreamregion Fwd-Primer	GTGACACCAAACCTGGCGTGTAACCCG	65°C
MWH113	Konstruktion von pMW62; Downstreamregion Rev-Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGCCAGGGAGGTTGCTATGC	65°C
MWH114	Konstruktion von pMW63; Upstreamregion Fwd-Primer	GCCGCTTTGGTCCCAGGCGGAAAAACCTGGACCTTC GACAAC	65°C
MWH115	Konstruktion von pMW63; Upstreamregion Rev-Primer	GAGGGCGTGGCGGATTCTTATTGTTGTG	65°C
MWH116	Konstruktion von pMW63; Downstreamregion Fwd-Primer	ATCCGCCACGCCCTCGACGTCAG	65°C
MWH117	Konstruktion von pMW63; Downstreamregion Rev-Primer	GCAGGTCGACTCTAGAGCGCTGGGCTGCACT	65°C
MWH118	Konstruktion von pMW64; Upstreamregion Fwd-Primer	GCCGCTTTGGTCCCAGCAACAACGCCAGGCCAC	65°C
MWH119	Konstruktion von pMW64; Upstreamregion Rev-Primer	TTGTGCGGAACACACTCCACGGCAGAT	65°C

MWH120	Konstruktion von pMW64; Downstreamregion Fwd-Primer	AGTGTGTTCCCGACAACCACAACAATAAGGAAT	65°C
MWH121	Konstruktion von pMW64; Downstreamregion Rev-Primer	GCAGGTGACTCTAGAGGAAGCGGGGCGCTGGTCG	65°C
IHO01	Mutantenbibliothek Position 307; Deg. Codon: ATC; Fwd-Primer	GTTGCGACTACAAG AT CAAGAACGGCAAC	65°C
IHO02	Mutantenbibliothek Position 307; Deg. Codon: ATC; Rev-Primer	GTTGCCGTTCTT GAT CTTGTAGTCGAAC	65°C
IHO03	Mutantenbibliothek Position 307; Deg. Codon: RHG; Fwd-Primer	GTTGCGACTACAAG RHGA AAGAACGGCAAC	65°C
IHO04	Mutantenbibliothek Position 307; Deg. Codon: RHG; Rev-Primer	GTTGCCGTTCTT CDY CTTGTAGTCGAAC	65°C
IHO05	Mutantenbibliothek Position 310; Deg. Codon: VMG; Fwd-Primer	GACAAGAACGGC VMG GTGGTCAAGGCCAC	65°C
IHO06	Mutantenbibliothek Position 310; Deg. Codon: VMG; Rev-Primer	GTGGCCTTGACCAC CKB GCCGTTCTTGTC	65°C
IHO07	Mutantenbibliothek Position 310; Deg. Codon: CGC; Fwd-Primer	GACAAGAACGGC CGC GTGGTCAAGGCCAC	65°C
IHO08	Mutantenbibliothek Position 310; Deg. Codon: CGC; Rev-Primer	GTGGCCTTGACCAC CGG CCGTTCTTGTC	65°C
IHO09	Mutantenbibliothek Position 408; Deg. Codon: MHG; Fwd-Primer	CTGGACCGAG MHG GTGAACTACAAG	55°C
IHO10	Mutantenbibliothek Position 408; Deg. Codon: MHG; Rev-Primer	CTTGTAGTTCAC CDK CTCGGTCCAG	70°C
IHO11	Mutantenbibliothek Position 408; Deg. Codon: KRC; Fwd-Primer	CTGGACCGAG KRC GTGAACTACAAG	55°C
IHO12	Mutantenbibliothek Position 408; Deg. Codon: KRC; Rev-Primer	CTTGTAGTTCAC GYM CTCGGTCCAG	70°C
IHO17	Mutantenbibliothek Position 410; Deg. Codon: NCG; Fwd-Primer	GACCGAGGAAGT GNC GTACAAGAAGG	65°C
IHO18	Mutantenbibliothek Position 410; Deg. Codon: NCG; Rev-Primer	CCTTCTTGTAC GNC ACTTCCTCGGTC	65°C
IHO19	Mutantenbibliothek Position 410; Deg. Codon: RAM; Fwd-Primer	GACCGAGGAAGT GRAM TACAAGAAGG	65°C
IHO20	Mutantenbibliothek Position 410; Deg. Codon: RAM; Rev-Primer	CCTTCTTGT AKTY CACTTCCTCGGTC	65°C

IHO25	Mutantenbibliothek Position 91; Deg. Codon: VAG; Fwd-Primer	GACCTACAACCACVAGCTGCCCGACAAC	65°C
IHO26	Mutantenbibliothek Position 91; Deg. Codon: VAG; Rev-Primer	GTTGTGCGGCAGCTBGTGGTTGTAGGTC	65°C
IHO27	Mutantenbibliothek Position 91; Deg. Codon: GSC; Fwd-Primer	GACCTACAACCACGSCCTGCCCGACAAC	65°C
IHO28	Mutantenbibliothek Position 91; Deg. Codon: GSC; Rev-Primer	GTTGTGCGGCAGGSCGTGGTTGTAGGTC	65°C
IHO61	Mutantenbibliothek Position 352; Deg. Codon: GMM; Fwd-Primer	AGCCATATCGACCTGGMMACCGGGCGCCCGGTG	67°C
IHO62	Mutantenbibliothek Position 352; Deg. Codon: GMM; Rev-Primer	CACCGGGCGCCCGGT KKCC CAGGTCGATATGGCT	55°C
IHO63	Mutantenbibliothek Position 352; Deg. Codon: CGC; Fwd-Primer	AGCCATATCGACCTG CGC ACCGGGCGCCCGGTG	63°C
IHO64	Mutantenbibliothek Position 352; Deg. Codon: CGC; Rev-Primer	CACCGGGCGCCCGGT GCG CAGGTCGATATGGCT	55°C
IHO65	Mutantenbibliothek Position 352; Deg. Codon: TGG; Fwd-Primer	AGCCATATCGACCTG TGG ACCGGGCGCCCGGTG	70°C
IHO66	Mutantenbibliothek Position 352; Deg. Codon: TGG; Rev-Primer	CACCGGGCGCCCGGT CCAC CAGGTCGATATGGCT	70°C
MWH_QC26	Konstruktion von <i>pedE</i> - Mutantenbibliotheken, Homologie zu pMW09 bei NdeI Schnittstelle	CAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGACAATAA GATCGCTACCC	Variabel
MWH_QC33	Konstruktion von <i>pedE</i> - Mutantenbibliotheken, Homologie zu pMW09 bei HindIII Schnittstelle	CGGTAGTCAATAAACCGGTAAGCTTAGTGG	Variabel
p2674-FSac	Amplifizierung des <i>pedE</i> - Promotors; Fwd-Primer	CGGAGCTCGCAAGCAACACATTGCATTT	60 °C
p2674-RPst	Amplifizierung des <i>pedE</i> - Promotors; Rev-Primer	ACGCTGCAGGTGGTCAGGTGGTCATTGG	60 °C
p2679-FSac	Amplifizierung des <i>pedH</i> - Promotors; Fwd-Primer	CGGAGCTCAGTGTACGCCACCTGTACCC	60 °C
p2679-RPst	Amplifizierung des <i>pedH</i> - Promotors; Rev-Primer	ACGCTGCAGTGCATCGTATTGCCACAGTT	60 °C
PcalA1	Konstruktion von pJOE- <i>calA</i> ; Upstreamregion Fwd- Primer	CGATGGCCGCTTTGGTCCCGAGCCGTTCCACACTTT CGC	67°C
PcalA2	Konstruktion von pJOE- <i>calA</i> ; Upstreamregion Rev- Primer	AACCGATCAAGCAGGGCCTCGCAGTGAA	67°C
PcalA3	Konstruktion von pJOE- <i>calA</i> ; Downstreamregion Fwd-Primer	GAGGCCCTGCTTGATCGGTTGCCTGTACG	65°C

PcalA4	Konstruktion von pJOE- <i>calA</i> ; Downstreamregion Rev-Primer	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGCGTGGGTGAGCAAGGC AG	65°C
PgarK1	Konstruktion von pJOE- <i>garK</i> ; Upstreamregion Fwd-Primer	CGATGGCCGCTTTGGTCCCGAGTCGTTGCTGTGGTG CC	62°C
PgarK2	Konstruktion von pJOE- <i>garK</i> ; Upstreamregion Rev-Primer	TACAGGGTGTGGGGTTTCTCCTGTCCTG	62°C
PgarK3	Konstruktion von pJOE- <i>garK</i> ; Downstreamregion Fwd-Primer	GAGAAACCCACACCCTGTAGAAATGGCCTTATTG	67°C
PgarK4	Konstruktion von pJOE- <i>garK</i> ; Downstreamregion Rev-Primer	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGCAGCGCAAAGTACC ATC	67°C
Pglp1	Konstruktion von pJOE- <i>glp</i> ; Upstreamregion Fwd-Primer	CGATGGCCGCTTTGGTCCCGTCATCAATAAAGGTC CG	55°C
Pglp2	Konstruktion von pJOE- <i>glp</i> ; Upstreamregion Rev-Primer	ACCGTAGGTAGTATGACCTCGTTTTTTTTG	55°C
Pglp3	Konstruktion von pJOE- <i>glp</i> ; Downstreamregion Fwd-Primer	GAGGTCATACTACCTACGGTGAAGCCCTC	62°C
Pglp4	Konstruktion von pJOE- <i>glp</i> ; Downstreamregion Rev-Primer	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTTGTGAAGACCGCCT GC	62°C
MWH_QC20	Konstruktion von pMW12; PCR zusammen mit MWH_QC33	AACAACGAGCTGGTGCTGTTCCG	63°C
MWH_QC21	Konstruktion von pMW12; PCR zusammen mit MWH_QC26	CAGCTCGTTGTTGCCGTCGAAGTCCCAGG	63°C
MWH_QC13 8	Konstruktion von pLB01; PCR zusammen mit MWH14	GCTGGGACTTCAGCGGCGTCAACGAG	70°C
MWH_QC13 9	Konstruktion von pLB01; PCR zusammen mit MWH13	CTCGTTGACGCCGCTGAAGTCCCAGC	70°C
MWH_QC14 0	Konstruktion von pSM07; PCR zusammen mit MWH14	GCTGGGACTTCACCGGCGTCAACGAG	70°C
MWH_QC14 1	Konstruktion von pSM07; PCR zusammen mit MWH13	CTCGTTGACGCCGCTGAAGTCCCAGC	70°C
MWH_QC14 2	Konstruktion von pLB13; PCR zusammen mit MWH14	GCTGGGACTTCCCAGGCGTCAACGAG	70°C
MWH_QC14 3	Konstruktion von pLB13; PCR zusammen mit MWH13	CTCGTTGACGCCGGAAGTCCCAGC	70°C
P2674-FSac	Konstruktion von pTn7M-pedE; Fwd-Primer	CGGGAGCTCGCAAGCAACACATTGCATTT	62°C
P2674-RHind	Konstruktion von pTn7M-pedE; Rev-Primer	ACGAAGCTTGGTCAAGGGCAGGTAATTCA	62°C
P2679-FSac	Konstruktion von pTn7M-pedH; Fwd-Primer	CGGGAGCTCAGTGTGACCCACCTGTACCC	65°C
P2674-RHind	Konstruktion von pTn7M-pedH; Rev-Primer	ACGAAGCTTTTTGGTAGTAGGGCCGCTTG	65°C
MWH03	Konstruktion von pMW08; Upstreamregion Fwd-Primer	AGGCACGATGGCCGCTTTGGTCCCGCCTGCTCGGG CAGTTGTTCC	63°C

MWH04	Konstruktion von pMW08; Upstreamregion Rev-Primer	GCTAAGCATGGCCATCGGCTCACTCGCAAC	63°C
MWH05	Konstruktion von pMW08; Downstreamregion Fwd-Primer	AGTGAGCCGATGGCCATGCTTAGCAAGTTCGTATCG	63°C
MWH06	Konstruktion von pMW08; Downstreamregion Rev-Primer	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGCCAGGGCAATGCGTATCAC	63°C

2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Zusammensetzung des LB-Mediums (Maniatis et al., 1982)

LB Medium	Endkonzentration
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

Tabelle 5: Zusammensetzung des SOC-Mediums

SOC Medium	Endkonzentration
Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	0.5 g/L
Glucose	5 mM

Tabelle 6: Zusammensetzung des LB-Agars (Maniatis et al., 1982)

LB-Agar	Endkonzentration
Agar-agar	15 g/L
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Selektionsmarker und Konzentrationen

Selektionsmarker	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	40 µg/ml
Gentamicin	15 µg/ml

Tabelle 8: Zusammensetzung des modifizierten M9-Mediums

Modifiziertes M9-Medium	Endkonzentration
Phosphatpuffer (pH 7)	69 mM
NH ₄ Cl	18.6 mM
NaCl	8.6 mM
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	100 µM
SEL	1x

Tabelle 9: Zusammensetzung der 100x Spurenelementlösung (SEL)

Spurenelementlösung (SEL, 100x)	Endkonzentration
Na ₃ -Citrat	5.1 mM
H ₃ BO ₃	500 µM
CuSO ₄	400 µM
FeSO ₄	3.6 mM
MnCl ₂	500 µM
NaMoO ₄	13.7 µM
NiCl ₂	8.4 µM
ZnSO ₄	700 µM

Tabelle 10: Zusammensetzung des modifizierten MP-Mediums

Modifiziertes MP-Medium	Endkonzentration
PIPES-Puffer (pH 6.75)	30 mM
K ₂ HPO ₄	1.45 mM
NaH ₂ PO ₄	1.88 mM
MgCl ₂	0.5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 mM
CaCl ₂	100 µM
C7-Metalllösung	1x

Tabelle 11: Zusammensetzung der C7-Metalllösung

C7-Metalllösung (1000x)	Endkonzentration
Na ₃ -citrate	45.5 mM
CoCl ₂	2 mM
CuSO ₄	1 mM
FeSO ₄	18 mM
MnCl ₂	1 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2 mM
Na ₂ WO ₄	330 µM
ZnSO ₄	1.2 mM

Tabelle 12: Übersicht über die in Wachstumsexperimenten verwendeten Kohlenstoffquellen*

Kohlenstoffquelle	Endkonzentration
Citrat	10 mM
Ethanol	20 mM
Glucose	10 mM
Glycerol	20 mM
2-Phenylethanol	5 mM
Succinat	25 mM

*Sofern nicht anders angegeben, wurden die in dieser Tabelle angegebenen Endkonzentrationen verwendet.

Tabelle 13: Zum Zellaufschluss verwendeter Lyse-Puffer

Lysepuffer	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	1 mM
BugBuster 10x Protein Extraktionsreagenz	1x
Lysozym	30 µg/ml
DNase	30 µg/ml

Tabelle 14: Residualpuffer für die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Residualpuffer	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	500 mM

Tabelle 15: Ladepuffer für die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Ladepuffer	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	1 mM

Tabelle 16: Waschpuffer für die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Waschpuffer	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	5 mM

Tabelle 17: Elutionspuffer für die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Elutionspuffer	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	150 mM

Tabelle 18: Zusammensetzung der Agarosegele

Agarosegel	Endkonzentration
Agarose	1 - 3 % (w/v)
Midori Green	3 µl pro 50 µl Gel

Tabelle 19: Zusammensetzung des Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffers

TAE-Puffer	Endkonzentration
Tris	40 mM
Essigsäure	40 mM
EDTA (pH 8)	2 mM

Tabelle 20: Zusammensetzung des 5xISO-Reaktionspuffers

ISO-Reaktionspuffer	Volumen/Menge
25 % (w/v) PEG-8000	1.5 g
500 mM Tris-HCl (pH 7.5)	3 ml
50 mM MgCl ₂	150 µl
50 mM DTT	300 µl
1 mM dATP	60 µl
1 mM dCTP	60 µl
1 mM dGTP	60 µl
1 mM dTTP	60 µl
5 mM NAD	300 µl
ddH ₂ O	auf 6 ml auffüllen

Tabelle 21: Zusammensetzung des Trenngels für SDS-PAGE

Trenngel (12 %)	Volumen/Menge
ddH ₂ O	6.6 ml
30 % Acrylamid-Mix	8.0 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	5.0 ml
10 % SDS-Lösung	0.2 ml
10 % APS-Lösung	0.2 ml
TEMED	8 µl

Tabelle 22: Zusammensetzung des Sammelgels für SDS-PAGE

Sammelgel (5 %)	Volumen/Menge
ddH ₂ O	2.7 ml
30 % Acrylamid-Mix	0.67 ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.5 ml
10 % SDS-Lösung	40 µl
10 % APS-Lösung	40 µl
TEMED	4 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung des Lämmli-Ladepuffers für SDS-PAGE

Lämmli-Ladepuffer (20 ml)	Volumen/Menge
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 ml
MgCl ₂	190 mg
Glycerol	1 ml
SDS	0.8 g
Bromphenolblau	2 mg
DTT	0.31 g
ddH ₂ O	auf 20 ml auffüllen

Tabelle 24: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers für SDS-PAGE

SDS-Laufpuffer	Endkonzentration
Tris	192 mM
SDS	0.1 % (w/v)
Glycin	25 mM

Tabelle 25: Zusammensetzung der Färbelösung für SDS-PAGE

Färbelösung	Endkonzentration
1 Coomassie®-Blau	2.5 g/L
Methanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
H ₂ O	70 % (v/v)

Tabelle 26: Zusammensetzung der Entfärbelösung für SDS-PAGE

Entfärbelösung	Endkonzentration
Methanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
H ₂ O	70 % (v/v)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Stammhaltung

Die vorübergehende Stammhaltung erfolgte auf LB-Agarplatten (**Tabelle 6**) bei 4°C – 8°C, falls erforderlich mit entsprechendem Selektionsmarker (**Tabelle 7**). Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden ausgewachsene Flüssigkulturen in LB-Medium, versetzt mit 30 % Glycerol (v/v), resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Wachstumsexperimente

Alle Wachstumsexperimente wurden entweder in modifiziertem M9-Medium (**Tabelle 8**) oder modifiziertem MP-Medium (**Tabelle 10**) (Delaney et al., 2013), versetzt mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (**Tabelle 12**), durchgeführt. Um potenziellen REE-Verunreinigungen der Glaswaren vorzubeugen, wurden alle Experimente in Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat (Corning Inc., Corning, USA), 2 ml-Deepwell-Platten aus Polypropylen (Carl Roth, Karlsruhe) oder 96-Well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich) durchgeführt. Die Vorkulturen wurden in 5 ml SEL (Spurenelementlösung)-freiem M9-Medium (in 15 ml Zentrifugenröhrchen), versetzt mit 25 mM Succinat als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle, in einem Inkubationsschüttler (Minitron; Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei 30°C und 180 rpm inkubiert, falls nicht anders angegeben. Die ausgewachsenen Zellkulturen wurden am nächsten Tag dreimal mit kohlenstoffquellenfreiem Medium gewaschen. Mit den gewaschenen Zellen wurden anschließend 1/5 des Kolbenvolumens (Erlenmeyerkolben), 1 ml pro Schacht (2 ml-Deepwell-Platten) oder 200 µl pro Schacht (96-Well-Mikrotiterplatten) frischen Mediums auf eine OD₆₀₀ zwischen 0.02 bzw. 0.05 eingestellt. Je nach Anforderung und Fragestellung wurden die Spurenelementkonzentrationen und REE-Konzentrationen des Mediums verändert oder Selektionsmarker sowie Induktoren zum Medium zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 180 rpm (Erlenmeyerkolben) in einem Inkubationsschüttler (Minitron; Infors HT, Bottmingen, Schweiz), bei 30°C und 350 rpm (2 ml-Deepwell-Platten) in einem Inkubationsschüttler (Minitron; Infors HT, Bottmingen, Schweiz), bei 30°C und 250 rpm (96-Well-Mikrotiterplatten, t < 2 d) in einem Mikroplattenlesegerät (FLUOstar

Omega; BMG Labtech, Ortenberg oder Xenius, Safas Monaco) oder bei 28°C und 220 rpm (96-Well-Mikrotiterplatten, $t > 4$ d) in einem Inkubationsschüttler (Forma, Thermo Fisher, Waltham, USA), sofern nicht anders angegeben. Für Experimente, die in Erlenmeyerkolben durchgeführt wurden, erfolgte eine Messung der Zelldichte in regelmäßigen Abständen mithilfe eines Photometers (BioPhotometer; Eppendorf AG, Hamburg). Zur Ermittlung der Zelldichte der 2 ml-Deepwell-Platten-Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen 100-200 μ l Zellkultur in eine Mikrotiterplatte transferiert und die OD₆₀₀ in einem Mikroplattenlesegerät (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenburg) ermittelt. Bei Experimenten in 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgte ein Messzyklus zur Bestimmung der OD₆₀₀ automatisch alle 10 min während der Inkubation. Alle Daten entsprechen dem Mittelwert aus biologischen Triplikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung. Für einige Wachstumsexperimente, die in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt wurden, erfolgte zusätzlich eine Bestimmung der Wachstumsparameter. Maximale Wachstumsraten (μ_{\max}) und Latenzzeiten (λ) wurden durch Anpassung der natürlichen Logarithmen der relativen OD₆₀₀ ($\ln(N/N_0)$, wobei N die OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t darstellt) an das Richards-Wachstumsmodell ermittelt (Richards, 1959). Dies erfolgte mithilfe des „grofit“-Softwarepakets in R (Kahm et al., 2015). Da direkt nach Beginn der Wachstumsexperimente eine Abnahme der OD₆₀₀ beobachtet wurde, wurde zur besseren Ermittlung der Wachstumsparameter $\ln(N/N_{t=4\text{ h}})$ anstelle von $\ln(N/N_0)$ verwendet. Ein Teil der Wachstumsexperimente (Wachstum auf Glycerol in 96-Well-Mikrotiterplatten) wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Patrick Billard (Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, Frankreich) von Dr. Patrick Billard durchgeführt.

2.2.3 Konstruktion der verwendeten *P. putida*-Stämme

Zur Deletion von Genen und Operons sowie zur Mutation kurzer Gensequenzen im Genom von *P. putida* KT2440 wurde eine auf dem *upp/5*-Fluorouracil-Gegenselektionssystem basierende Methode zur markerlosen Gendeletion verwendet (Graf and Altenbuchner, 2011). Integrationsvektoren, welche die Regionen stromauf- und stromabwärts des Zielgens bzw. der Zielsequenz (inklusive der gewünschten Mutation) sowie das *upp*-Gen enthielten, wurden hierzu in die gewünschten 5-Fluorouracil-resistenten (5-FUR^R) *P. putida*-Stämme transformiert. Daraufhin

wurden Kanamycin-resistente (Kan^r) und 5-Fluorouracil-sensitive (5-FU^s) Transformanten auf LB_{Kan} -Agarplatten selektioniert. Nachfolgend wurde einer der erhaltenen Kan^r 5-FU^s Klone in LB-Medium ohne Selektionsmarker bei 30°C für 24 h inkubiert und auf M9-Agarplatten, versetzt mit 20 µg/ml 5-FU und 10 mM Glucose, ausplattiert. Eine erfolgreiche Gendeletion wurde mittels Kolonie-PCR von Kan^s 5-FU^r Klonen identifiziert. Die Verifizierung der Mutation von Gensequenzen erfolgte durch Sanger-Sequenzierung der bei der Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 2.3.6) amplifizierten Genregion. Alle hierzu verwendeten Oligonukleotide sind in **Tabelle 3** verzeichnet.

Die Konstruktion der Reporterstämme zur Messung der *pedE*- und *pedH*-Promotoraktivitäten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Patrick Billard (Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, Frankreich) und wurde von Dr. Patrick Billard, Dr. Maxime Toussaint und Dr. Charlotte Berthelot durchgeführt. Hierzu wurden die Plasmide pUC18-mini-Tn7T-*pedE-lux-Gm* oder pUC18-mini-Tn7T-*pedH-lux-Gm* zusammen mit dem Helferplasmid pTNS2 in die jeweiligen *P. putida*-Stämme per Elektroporation eingeführt. Anschließend wurde die korrekte chromosomale Integration der mini-Tn7-Elemente in Gentamicin-resistenten Transformanten durch PCR mit den Primern $P_{\text{put-}glmSDN}$ und P_{Tn7R} verifiziert (Choi et al., 2005).

Die pTn7-M-basierten Konstrukte zur ektopischen Komplementierung von *pedE* und *pedH* wurden durch tetraparentale Paarung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Patrick Billard (Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, Frankreich) durch Dr. Patrick Billard in *P. putida* eingebracht. Es wurden PIR2/pTn7M-*pedH* oder PIR2/pTn7M-*pedE* als Donoren, *E. coli* CC118 λ_{pir} /pTNS1 und *E. coli* HB101/pRK600 als Hilfsstämme und der jeweilige KT2440 Stamm als Empfänger verwendet (Zobel et al., 2015). Die vier Stämme wurden unter selektiven Bedingungen kultiviert, die Kulturen gemischt, anschließend auf LB-Agarplatten ausgebracht und bei 28°C inkubiert (o/n). Die Selektion der Transkonjugaten erfolgte auf Gentamicin-haltigem Cetrimid-Agar. Anschließend wurde die korrekte chromosomale Integration in Gentamicin-resistenten Kolonien durch PCR mit den Primern $P_{\text{put-}glmSDN}$ und P_{Tn7R} verifiziert (Choi et al., 2005).

2.2.4 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli* BL21(DE3)

Die heterologe Produktion von C-terminal His₆-getaggtten PQQ-ADHs im Stamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgte ausgehend von Varianten des L-Rhamnose-induzierbaren Expressionsplasmids pJEM1 (Jeske and Altenbuchner, 2010). Hierzu wurde aus einer Vorkultur eine 50 ml- bzw. 200 ml-Hauptkultur in LB-Medium (250 ml- bzw. 1-l-Erlenmeyerkolben), versetzt mit Kanamycin und 1 mM CaCl₂, auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0.1 eingestellt und bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.7 erreicht wurde. Nach Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von L-Rhamnose (c_{end} = 0.2 % (w/v)) wurde die Kultur mit PQQ (c_{end} = 0.6 μM) versetzt und bei 16°C und 180 rpm (HT Aquatron, Infors, Bottmingen, Schweiz) für 16 h inkubiert. Die mittels Zentrifugation (6000 x g, 30 min, 4°C) geernteten Zellen wurden anschließend direkt aufgeschlossen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5 Aufreinigung His₆-getaggtter Proteine

In einem ersten Schritt wurden die in Sektion 2.2.4 geernteten Zellen mithilfe des BugBuster-Proteinextraktionsreagenzes (Merck KGaA, Darmstadt) chemisch aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellpellets in 5 ml/g_{Zellpellett} Lysepuffer (**Tabelle 13**) resuspendiert und für 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Abtrennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation (20 000 x g, 20 min, 4°C) wurden die PQQ-ADHs aus der löslichen Proteinfraction mithilfe von Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt (His GraviTrap Talon® Säulen; GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien). Nachdem die Säulen mit 5 ml Residualpuffer (**Tabelle 14**) von Proteinverunreinigungen befreit und mit 10 ml Ladepuffer (**Tabelle 15**) equilibriert waren, wurden 2-20 ml zellfreier Extrakt je Säule geladen. Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml Waschpuffer (**Tabelle 16**) wurden die gebundenen Proteine in 5 ml Elutionspuffer (**Tabelle 17**) eluiert. Nachfolgend wurden überschüssige Ionen mittels Dialyse (MWCO 6 – 8 kDa; Spectra/Por, Spectrum Chemical, New Brunswick, USA) gegen Tris-Puffer (pH 7.5) 10 000-fach verdünnt. Nach Konzentration der Proteinlösung mithilfe der Vivaspin-Ultrafiltrationssäulen (Vivaspin 10 kDa, Sartorius AG, Göttingen) erfolgte die Evaluierung der Proteinreinheit durch SDS-PAGE (vergl. Abschnitt 2.4.1). Die Proteinkonzentrationen wurden basierend auf der Absorption bei 280 nm ermittelt

(NanoDrop 2000; Thermo Fisher, Waltham, USA). Schließlich wurden die aufgereinigten Proteine bei einer Konzentration von 1 mg/ml in einer 1 mg/ml-Lösung Bovines Serumalbumin (BSA) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6 Reporteragen-Assay

Die quantitative Messung der Aktivitäten des *pedE*- und *pedH*-Promotors erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Patrick Billard (Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, Frankreich) und wurde von Dr. Patrick Billard, Dr. Maxime Toussaint und Dr. Charlotte Berthelot durchgeführt. Hierzu wurden *P. putida*-Stämme verwendet, die ein Tn7-basiertes, transkriptionelles *pedE-lux* oder *pedH-lux* Reporterfusionskonstrukt enthielten. Nach Kultivierung über Nacht in LB_{Gent}-Medium, M9-Medium versetzt mit Succinat oder MP-Medium versetzt mit Succinat und dreimaligem Waschen in M9- oder MP-Medium ohne Kohlenstoffquelle wurden diese Zellen verwendet, um frisches M9- oder MP-Medium, versetzt mit 1 mM 2-Phenylethanol, auf eine OD₆₀₀ von 0.1 oder 0.2 einzustellen. Anschließend wurden 198 µl Zellsuspension mit 2 µl 100-fach konzentrierter Metallsalzlösung versetzt und in 96-Well-Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden (μ Clear; Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich) bei 30°C und 200 - 600 rpm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) inkubiert. Die Messung der Lichtemission und der OD₆₀₀ erfolgte nach 3 - 5 h. Die ermittelten Promotoraktivitäten sind als relative Lichteinheiten, normiert auf die zugehörige OD₆₀₀, angegeben. Alle gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert von drei Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung.

2.2.7 Proteinextraktion zur vergleichenden Proteomanalyse

Die vergleichende Proteomanalyse wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jens Pfannstiel (Core Facility Hohenheim, Mass Spectrometry Module, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden 50 ml M9-Medium versetzt mit Citrat, Glucose, Glycerol oder 2-Phenylethanol als Kohlenstoffquelle und 0 oder 10 µM LaCl₃ mit gewaschenen Succinat-Vorkulturen des Stamms *P. putida* KT2440* auf eine OD₆₀₀ von 0.05 eingestellt und in 250 ml-Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Sobald die

Kulturen eine Zelldichte von $OD_{600} > 0.4$ erreichten, wurden die Zellen mittels Zentrifugation (6000 x g, 15 min, 4°C) geerntet. Anschließend wurden die Zellpellets in 1 ml Probenpuffer (150 mM Tris-HCl pH 6.8; 2 % SDS; 20 mM Dithiotreitol) resuspendiert und bei 95°C und leichtem Schütteln für 5 min aufgekocht. Nachfolgend wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 21000 x g, 4°C) und der Überstand in neuen Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Jens Pfannstiel durchgeführt. Die Proteinfällung erfolgte mit einer Chloroform-Methanol-Lösung (Wessel and Flügge, 1984). Die erhaltenen Pellets wurden in gepufferter Harnstofflösung (6 M Harnstoff in 50 mM Tris-Puffer, pH 8.5) resuspendiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mithilfe des Bradford-Assays (Bradford, 1976).

2.2.7.1 *Proteinverdau und Peptidaufreinigung*

Der Proteinverdau und die Peptidaufreinigung erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Jens Pfannstiel (Core Facility Hohenheim, Mass Spectrometry Module, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland) und wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Jens Pfannstiel durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass alle Cystein-Reste reduziert vorlagen, wurde Dithiotreitol ($c_{\text{end}} = 10 \text{ mM}$) zu 25 µg Protein (gelöst in 60 µl 6 M Harnstoff in 50 mM Tris-Puffer, pH 8.5) gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 56°C und 1000 rpm wurden die Cystein-Reste mit Iodoacetamid für 45 min bei RT in Dunkelheit alkyliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Dithiotreitol gestoppt und die Proteinlösung für 10 min bei RT inkubiert. Der Proteinverdau erfolgte anschließend mit 500 ng Protease Lys-C (Roche, Basel, Schweiz) pro Probe in Tris-Puffer (50 mM, pH 8.5) o/n bei 30°C. Daraufhin wurde der Harnstoff im Reaktionsgemisch durch Zugabe von Tris-Puffer (50 mM, pH 8.5) auf 2 M verdünnt. Nach Zugabe von 1 µg Trypsin (Roche, Basel, Schweiz), gelöst in Tris-Puffer (50 mM, pH 8.5), wurde der Proteinverdau bei 37°C fortgesetzt. Nach 4 h wurde der Verdau durch Zugabe von 3 µl 10%-iger (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt und die Peptidmischung mit C18-StageTips aufkonzentriert, entsalzt und schließlich unter Vakuum getrocknet (Rappsilber et al., 2003). Nachfolgend wurden die Proben in 20 µl 0.1%-iger (v/v) TFA gelöst und 1 µl Aliquot zur nanoLC-MS/MS-Analyse verwendet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente wurden, je nach Größe der Fragmente, 1%-ige oder 3%-ige Agarosegele (**Tabelle 18**) verwendet. Als Referenz wurden 5 µl DNA-Leiter (Gene Ruler™ 1 kb Plus; ThermoFischer, Waltham, USA) verwendet. Die mit in DNA-Ladepuffer gelösten DNA-Proben geladenen Gele wurden in TAE-Puffer (**Tabelle 19**) für 45 min einer Spannung von 120 mV ausgesetzt. Die Visualisierung der DNA erfolgte unter Blaulicht.

2.3.2 DNA-Aufreinigung

Je nach Anwendung wurden verschiedene DNA-Aufreinigungsmethoden verwendet:

- Die Isolation von Plasmid-DNA aus 3 – 5 ml LB-Übernachtskulturen erfolgte mit Hilfe des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kits (ZYMO Research Corp., Irvine, USA) nach Herstellerangaben. Zur Elution der DNA wurden 30 µl ddH₂O verwendet.
- Nach Auftrennung von Gelfragmenten mittels Gelelektrophorese wurde die DNA aus den ausgeschnittenen DNA-Banden isoliert. Hierzu wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO Research Corp., Irvine, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte mit 10 µl ddH₂O.
- Die Aufreinigung von DNA-Proben erfolgte mithilfe des DNA Clean & Concentrator™-5 Kits (ZYMO Research Corp., Irvine, USA) nach Herstellerangaben (Elution in 10 µl ddH₂O) oder durch Dialyse auf einer Nitrozellulosemembran (0.025 µm VSWP02500; Merck Millipore, Billerica, USA) gegen 50 ml ddH₂O für 30 min.

2.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA erfolgte mit 1 – 3 µl DNA-Probe auf einem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

2.3.4 DNA-Sequenzierung

Der SupremeRun-Service der GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) wurde zur Sequenzierung von DNA genutzt. Hierfür wurden 20 µl einer DNA-Probe (30 – 100 ng/µl) bereitgestellt.

2.3.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen im vorgegebenen Puffersystem nach Herstellerangaben. Die geschnittenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, aufgereinigt.

2.3.6 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) mithilfe spezifischer Primer (**Tabelle 3**). Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in **Tabelle 27** aufgelistet. Als DNA-Matrize wurde genomische DNA, Plasmid-DNA oder 2 µl einer in 20 µl ddH₂O gelösten Zellkolonie eingesetzt. Bei Reaktionsansätzen mit ganzen Zellen oder bei einem hohen GC-Gehalt der DNA wurde Q5 High GC Enhancer-Lösung zusätzlich hinzugefügt. Die Amplifizierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Mastercycler EP; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit wiederholten Heiz- und Kühlphasen, die ausreichende Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation garantierten, durchgeführt (**Tabelle 28**). Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente entweder direkt aufgereinigt oder per Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tabelle 27: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

Komponente	Endkonzentration
Q5-Reaktionspuffer	1x
dNTPs	200 µM
Vorwärtsprimer	0.5 µM
Rückwärtsprimer	0.5 µM
DNA-Matrize	variabel
Q5 Hot Start HF DNA Polymerase	0.02 U/µl

Tabelle 28: Verwendetes Temperaturprogramm für der Amplifizierungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	98°C	5 min
2. Denaturierung	98°C	1 min
3. Primeranlagerung	X°C*	1 min
4. Elongation	72°C	20 – 30 s/kb
Wiederholung der Schritte 2. bis 4.		28x – 33x
5. Abschließende Elongation	72°C	2 min

*Die Anlagerungstemperaturen sind von den verwendeten Primern (**Tabelle 3**) abhängig.

2.3.7 Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation wurden elektrokompente *E. coli* BL21(DE3)- und *P. putida*-Zellen hergestellt. Hierfür wurde eine LB-Kultur (falls notwendig mit entsprechendem Selektionsmarker) bei 30°C (*P. putida*) bzw. 37°C (*E. coli*) und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.5 – 0.7 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 x g, 10 min, 4°C) geerntet. Alle folgenden Schritte wurden mit gekühlten Lösungen auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellpellets wurden zweimal mit ddH₂O und einmal mit 10%-iger Glycerollösung gewaschen, in 0.5 % des Kulturvolumens 10%-iger Glycerollösung resuspendiert, als 50 µl-Aliquote in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.8 Transformation mittels Elektroporation

Zu einem 50 µl-Aliquot elektrokompenter Zellen wurden 1 – 10 µl DNA gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Probe in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt und für 4 – 5 ms einem elektrischen Puls ausgesetzt (2.5 V, 200 Ω, 25 µF). Hierzu wurde das GenePulser™ Elektroporationssystem von Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA) verwendet. Unmittelbar darauf wurde das Gemisch in 1.95 ml SOC-Medium (**Tabelle 5**) resuspendiert und die Zellen bei 30°C (*P. putida*) oder 37°C (*E. coli* BL21(DE3)) und 180 rpm regeneriert. Nach 30 – 60 min wurde eine adäquate Menge Zellen auf LB-Agarplatten, versetzt mit entsprechendem Selektionsmarker, ausplattiert und über Nacht bei 30°C (*P. putida*) oder 37°C (*E. coli* BL21(DE3)) inkubiert.

2.3.9 Assemblierung von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurde die Assemblierungsreaktion von DNA-Fragmenten verwendet (Gibson, 2011). Hierbei wurden mittels PCR und Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente eingesetzt, welche überlappende Sequenzbereiche zu den 5'- bzw. 3'-Enden der benachbarten DNA-Fragmente oder des linearisierten Vektors enthielten. Das molare Verhältnis des Vektors zu den Insertionsfragmenten betrug 1:3. Für eine Assemblierungsreaktion wurden zu 15 µl Assemblierungsreaktionsgemisch (**Tabelle 29**) 0.1 – 0.5 pmol Vektor-DNA und entsprechende Mengen an DNA-Fragmenten hinzugefügt (ggf. mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt) und für 60 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Verhältnis 2:1 mit ddH₂O verdünnt und 2 – 10 µl der Verdünnung direkt in 50 µl elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert (vergl. Abschnitt 2.3.8).

Tabelle 29: Zusammensetzung des Assemblierungsreaktionsgemisches*

Komponente	Menge
5 x ISO-Reaktionspuffer (Tabelle 20)	320 µl
T5 Exonuklease (10 U/µl)	0.64 µl
<i>Taq</i> DNA Ligase (40 U/µl)	20 µl
<i>Phusion</i> HF DNA Polymerase (2 U/µl)	160 µl
ddH ₂ O	699.36 µl

*Die Mischung wurde in 10 µl Aliquote aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

2.3.10 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die Gene *pedE* und *pedH* aus *P. putida* KT2440 wurden mittels der Primerpaare MWH11/MWH12 und MWH13/MWH14 von genetischer DNA amplifiziert. Die Primer enthielten neben einem C-terminalen His₆-Tag eine beidseitige > 15-bp Homologiesequenz zu den Insertionsseiten im Plasmid pJeM1. Das *eGFP*-Gen in pJeM1 wurde durch Restriktionsverdau mit NdeI und HindIII entfernt und mit den aufgereinigten PCR-Produkten *via* Assemblierungsreaktion ersetzt (vergl. Abschnitt 2.3.9). Die erhaltenen Konstrukte wurden anschließend in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert und durch Sanger-Sequenzierung verifiziert.

2.3.11 Konstruktion und Evaluation von Mutantenbibliotheken

Die zur Erhöhung der Thermostabilität verwendeten Mutantenbibliotheken wurden mithilfe der MISO (Multichange Isothermal Mutagenesis)-Methode erstellt (Mitchell et al., 2013). In einem ersten Schritt wurden die minimal notwendigen Kombinationen von degenerierten Codons, welche für die gewünschte Varianz an den jeweiligen Positionen kodieren, unter Verwendung der MDC-Analysesoftware ermittelt (Tang et al., 2014). Anschließend wurden selbstkomplementäre Primer, welche die gewünschten degenerierten Codons in ihrer Mitte enthielten, sowie Primer, die Homologien zum Plasmid pMW09 enthielten, generiert (**Tabelle 3**). Die je zwei mittels PCR-Amplifikation erhaltenen DNA-Fragmente sowie der mit HindIII und NdeI geschnittene Vektor wurden anschließend in einer Assemblierungsreaktion (siehe Abschnitt 2.3.9) zusammengefügt. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde 1:3 in ddH₂O verdünnt und direkt in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Um die Qualität der konstruierten Mutantenbibliotheken zu verifizieren, wurden die Kolonien von je einer Platte pro transformierter Assemblierungsreaktion mithilfe eines Drigalski-Spatels in 2 ml ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA extrahiert und mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Entsprechend der Peak-Höhenverteilung des Sequenzierungs-Chromatogramms nicht dem Erwartungswert des jeweiligen degenerierten Codons (Acevedo-Rocha et al., 2015), wurde entweder die Anzahl der zu durchmusternden Klone entsprechend erhöht oder die fehlenden Varianten einzeln generiert.

2.3.12 Konstruktion der Deletionsplasmide

Zur Konstruktion der Integrationsvektoren (**Tabelle 2**), die für das in dieser Arbeit verwendete Gendeletionsverfahren benötigt wurden, wurde Plasmid pJOE6261.2 (Graf and Altenbuchner, 2011) mit BamHI geschnitten. Zusätzlich wurden die Genomregionen 500 – 1000 bp stromaufwärts und stromabwärts des zu deletierenden Gens oder Operons mithilfe der in **Tabelle 3** aufgeführten Primer amplifiziert. Für die Konstruktion des Mutationsplasmids pMW56 enthielten die Primer, neben den für die Assemblierungsreaktion notwendigen komplementären Überhängen, zusätzlich den gewünschten Polymorphismus. Der aufgereinigte, verdaute Vektor und die zwei aufgereinigten PCR-Fragmente wurden anschließend mittels Assemblierungsreaktion (Gibson et al., 2009) zusammengefügt und in *E. coli*

BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Verifizierung der neu konstruierten Plasmidabschnitte erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung.

2.3.13 Konstruktion der mini-Tn7-Plasmide

Zur Quantifizierung der *pedE*- und *pedH*-Promotoraktivitäten in *P. putida* wurden die Plasmide pUC18T-mini-Tn7T-*pedE-lux-Gm* und pUC18T-mini-Tn7T-*pedH-lux-Gm* konstruiert, die zur chromosomalen Integration der Reporterfusionskonstrukte an der *attTn7*-Seite in *P. putida* genutzt werden können (Choi et al., 2005). Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Patrick Billard (Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, Frankreich) und wurde von Dr. Patrick Billard, Dr. Maxime Toussaint und Dr. Charlotte Berthelot durchgeführt. Hierzu wurden die DNA-Regionen, die den *pedE*- bzw. *pedH*-Promotor enthalten, per PCR mithilfe der Primerpaare p2674-FSac/p2674-RPst und p2679-FSac/p2679-RPst amplifiziert (**Tabelle 3**), mit ScaI und PstI verdaut und in Plasmid pUC18T-mini-Tn7T-*lux-Gm* direkt vor das *luxCDABE*-Operon kloniert. Die Verifizierung der neu konstruierten Plasmidabschnitte erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung.

Zur ektopischen Komplementierung von *pedE* und *pedH* wurden die DNA-Fragmente des *pedE*- bzw. *pedH*-Gens inklusive des natürlichen Promotors von der genomischen DNA von *P. putida* KT2440 mithilfe der Primerpaare P2674-FSac/P2674-RHind und P2679-FSac/P2674-RHind amplifiziert und in mit SacI und HindIII verdautes pTn7-M kloniert. Die Verifizierung der neu konstruierten Plasmidabschnitte erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Patrick Billard (Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, Frankreich) und wurde von Dr. Patrick Billard durchgeführt.

2.3.14 Konstruktion der Punktmutanten PedE^{S295D}, PedH^{D295S}, PedH^{D295T} und PedH^{D295A}

Zur Konstruktion der Plasmide pMW12, pLB01, pLB13 und pSM07 (**Tabelle 2**) zur Expression der PQQ-ADH Varianten PedE^{S295D}, PedH^{D295S}, PedH^{D295T} und PedH^{D295A} wurde ein ortsspezifischer Mutageneseansatz verwendet, welcher auf der Assemblierungsreaktion von Gibson *et al.* beruht (Gibson, 2011). Als erstes wurden selbstkomplementäre Primer, welche die gewünschte Mutation und die 10 bp stromaufwärts und stromabwärts liegenden Abschnitte der zu mutierenden Position

enthielten, konstruiert (**Tabelle 3**). Durch PCR, mit den in Tabelle 3 aufgeführten Primern, wurden je zwei Fragmente generiert, die an einem Ende jeweils die gewünschte Mutation und am anderen Ende Homologien zu dem mit HindIII und NdeI verdauten Ausgangsvektor pMW09 bzw. pMW10 enthielten. Der aufgereinigte, verdaute Vektor und die zwei Fragmente wurden anschließend mithilfe der Assemblierungsreaktion (siehe Abschnitt 2.3.9) zusammengefügt und in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Verifizierung der neu konstruierten Plasmidabschnitte erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Die Konstruktion der Plasmide pLB01 und pLB13 wurde von Laura Bendz und die Konstruktion des Plasmids pSM07 wurde von Svenja Moors durchgeführt.

2.3.15 Konstruktion der Mutantenbibliotheken zur Änderung der Substratspezifität von PedH

Die Konstruktion der Mutantenbibliotheken erfolgte als Teil der Masterarbeit von Laura Bendz (Bendz, 2017). Hierzu wurden die DNA-Fragmente des *pedH*-Gens, welche an den gewünschten Positionen (**Abbildung 23A**) mit NNK-Codon randomisiert waren und an den jeweiligen Enden Homologien zu dem mit SrfI und HindIII verdauten Zielvektor (pMW10) enthielten, von einem externen Dienstleister synthetisiert (Synbio Technologies, Monmouth Junction, USA). Der aufgereinigte, verdaute Zielvektor und die jeweiligen DNA-Fragmente wurden mittels Assemblierungsreaktion (siehe Abschnitt 2.3.9) zusammengefügt und in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Es wurde ausreichend Zellmaterial ausplattiert, um eine Mindestanzahl von 2500 individuellen Klonen zu erhalten. Somit war mit 80%-iger Wahrscheinlichkeit garantiert, dass alle möglichen Varianten mindestens einmal in der Mutantenbibliothek vorkommen (Reetz et al., 2008). Die erhaltenen Klone wurden anschließend in LB-Medium resuspendiert und in 20%-iger Glycerollösung bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung der Qualität der Mutantenbibliotheken wurden pro Bibliothek 3 – 8 individuelle Klone mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Ein Überblick über die Größe der Bibliothek und die Sequenzierungsergebnisse befindet sich in **Tabelle 30**. Da in ca. 20 % der Sequenzierungen nur der Leervektor gefunden werden konnte, wurde dieser Faktor bei der Anzahl der zu durchmusternden Klone berücksichtigt (siehe Abschnitt 2.4.9).

Tabelle 30: Überblick über Größe und Qualität der Mutantenbibliotheken.

Bibliothek	Anzahl Klone	Sequenzierte Klone	Klone mit Insert
1	> 4000	6	5
2	> 4000	6	4
3	3512	8	6
4	2984	3	2
5	2544	6	6
6	> 4000	8	6
7	> 4000	4	2
8	2608	6	6
9	> 4000	6	4
10	3320	6	6
11	> 4000	6	4
12	3192	3	3

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinaufreinigung und Proteinreinheit wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) überprüft. In einem ersten Schritt wurde hierzu das Trenngel (**Tabelle 21**) gegossen und für 20 min ausgehärtet. Hiernach wurde dieses mit dem Sammelgel (**Tabelle 22**) überschichtet. Zur Bildung der Sammeltaschen wurde ein Kamm während des Aushärtens benutzt. Im Verlaufe des Projekts wurde auf kommerziell erhältliche ExpressPlus PAGE Gele (Genscript Biotech Corp., Hongkong, China) umgestellt. Diese wurden nach Herstellerangaben zusammen mit dem mitgelieferten Tris-MOPS-Puffer in einem Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) verwendet. Anschließend wurden entweder $2 \cdot 10^8$ Zellen, 10 μ l Gesamtproteinlösung oder 20 μ g aufgereinigtes Protein in 20 μ l 1x Lämmli-Ladepuffer (**Tabelle 23**) für 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Gel geladen. 5 μ l eines Referenzstandards (PAGERuler Prestained Protein ladder; Thermo Fisher, Waltham, USA) wurden in eine separate Gelkammer geladen. Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer (**Tabelle 24**) bei 12 mA pro Gel für 20 min, gefolgt von 25 mA pro Gel für 45 min, durchgeführt. Das Gel wurde durch mehrstündige Inkubation in Färbelösung (**Tabelle 25**) und Inkubation o/n in Entfärbelösung (**Tabelle 26**) entwickelt.

2.4.2 Kolorimetrischer Aktivitätstest für PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen

Zur Untersuchung der Enzymaktivitäten von PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenasen (PQQ-ADHs) wurde ein kolorimetrischer Aktivitätstest, basierend auf den artifiziellen Elektronenakzeptoren 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) und Phenazinmethosulfat (PMS), verwendet (Anthony and Zatman, 1964; Chattopadhyay et al., 2010). Elektronen, die nach der Substratoxidation vom Cofaktor PQQ auf den intermediären Elektronenakzeptor PMS übertragen werden, führen zur Reduktion des terminalen Akzeptors DCPIP. Dies geht einher mit einer Entfärbung von DCPIP, welche bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt werden kann (siehe **Abbildung 10**). Nach Optimierung mehrerer Parameter für die Anwendung in Mikrotiterplatten (**Abbildung A 1**, **Abbildung A 2**, **Abbildung A 3** und **Abbildung A**

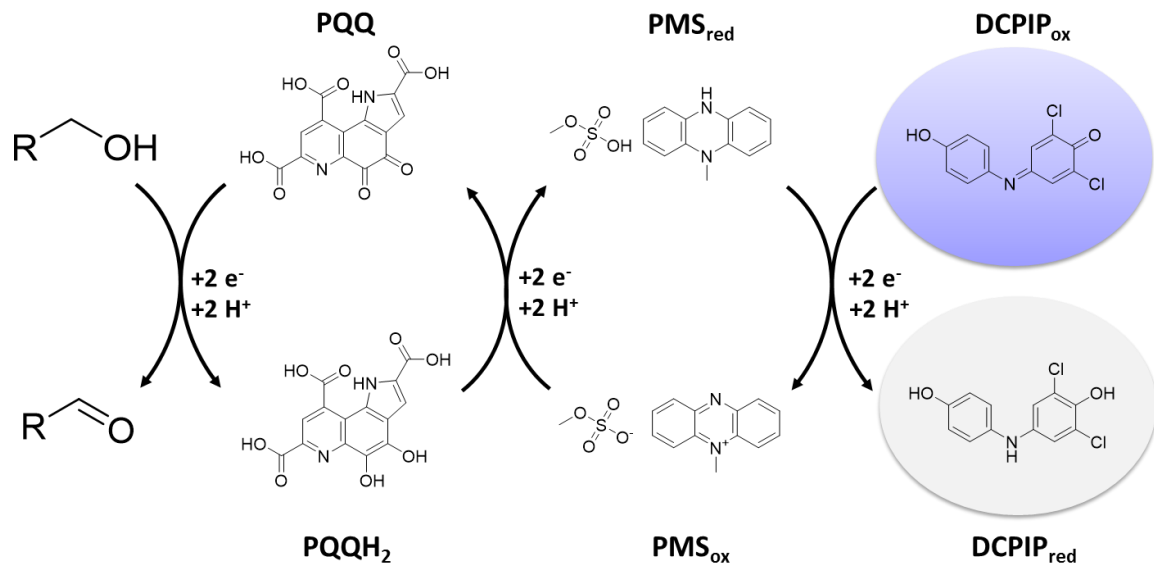


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Elektronentransduktionswegs während des Aktivitätstests. Elektronen werden von der Alkoholgruppe des Substrats auf den Cofaktor PQQ im Enzym übertragen, von dort weiter auf den künstlichen Elektronenmediator PMS weitergegeben und letztlich auf den terminalen Elektronenakzeptor DCPIP weitergereicht. Reduktion von DCPIP geht einher mit einem Farbumschlag von blau nach farblos.

4) enthielt ein Schacht einer 96-Well-Mikrotiterplatte 250 μl Probenlösung, bestehend aus 100 mM Tris-Puffer (pH 7.5), 500 μM PMS, 150 μM DCPIP, 25 mM Imidazol, 1 mM CaCl_2 und 50 μM PQQ bei Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADHs oder 1 – 5 μM LnCl_3 und 1 – 5 μM PQQ bei Ln^{3+} -abhängigen PQQ-ADHs, 12.5 μl Substrat sowie 2.5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigtem Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats zur Probenlösung gestartet. Die Enzymaktivität wurde direkt anschließend, basierend auf der Abnahme der OD_{600} während der ersten Minute nach Substratzugabe, ermittelt. Der molare Extinktionskoeffizient von DCPIP wurde experimentell bestimmt und betrug $24.1 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei pH 8 (**Abbildung A 5**). Aufgrund substratunabhängiger Hintergrundaktivität wurde die Probenlösung vor der Aktivitätsbestimmung für 45 min bei 30°C inkubiert. Alle Aktivitätsbestimmungen wurden im Triplikat durchgeführt und die angegebenen Messwerte bestehen aus deren Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung.

2.4.3 Enzym-Kinetiken

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten wurden die Enzymaktivitäten mithilfe des in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen kolorimetrischen Aktivitätstests bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Triplikat bestimmt. Das Fitting der Enzymaktivitäten an

die Michaelis-Menten-Gleichung erfolgte durch nichtlineare Regression. Hierzu wurde die Methode der kleinsten Fehlerquadrate in GraphPad Prism (Version 7.03; GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet. Da während der Arbeit PMS von verschiedenen Herstellern verwendet wurde und die Enzymaktivitäten sich in Abhängigkeit davon unterschieden, wurden die Referenzwerte mit den jeweiligen PedE- und PedH-Wildtyp-Enzymen stets unter gleichen Bedingungen neu ermittelt.

2.4.4 Stabilitätsbestimmung aufgereinigter PQQ-ADHs

Zur Stabilitätsbestimmung wurden die Enzyme wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben aufgereinigt, abgesehen von einer Abweichung. Da die *apo*-Formen der Enzyme keine Restaktivität nach einstündiger Inkubation bei 45°C aufwiesen, wurde im letzten Dialyseschritt anstatt eines Tris-Puffers (100 mM, pH 7.5) ein mit 10 µM PQQ und 10 mM CaCl₂ versetzter Tris-Puffer (100 mM, pH 7.5) verwendet, um die Rekonstitution der Enzyme mit den Cofaktoren noch vor den Temperaturbeständigkeitstests zu ermöglichen (**Abbildung A 12**). Für die Temperaturbeständigkeitstests wurden anschließend 100 µl einer Enzymlösung ($c = 100 \mu\text{g ml}^{-1}$) bei verschiedenen Temperaturen für 1 h inkubiert. Die verbleibenden Enzymaktivitäten wurden anschließend mit einer Enzymendkonzentration von 10 µg ml⁻¹ und 10 mM Ethanol als Substrat mithilfe des in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Aktivitätstests bestimmt. Durch Auftragen der verbleibenden Enzymaktivität gegen die eingesetzte Inkubationstemperatur konnten die T₅₀⁶⁰-Werte (Temperatur, die bei einstündiger Inkubation notwendig ist, um die Restaktivität auf 50 % der Anfangsaktivität zu reduzieren) bestimmt werden. Zur Bestimmung der Lösungsmittelbeständigkeit wurden die rekonstituierten Enzyme für 1 h bei 30°C in verschiedenen konzentrierten Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösungen inkubiert. Direkt anschließend wurden die Restaktivitäten mit 10 mM Ethanol als Substrat bestimmt.

2.4.5 Ganzzell-Aktivitätstest für heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produzierte PQQ-ADHs

Zur Aktivitätsbestimmung der PQQ-ADHs ohne vorherige Zellyse und Proteinaufreinigung wurde ein kolorimetrischer Ganzzell-Aktivitätstest entwickelt. Hierzu wurden die PQQ-ADHs heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Ausgehend

von einem für *Gluconobacter oxydans* 621H beschriebenen Aktivitätstest (Peters et al., 2013) wurden mehrere Testparameter, wie die Aminquelle, die Pufferzusammensetzung und der pH, die Zelldichte sowie die PQQ- und CaCl₂- bzw. PrCl₃-Konzentrationen, optimiert (**Tabelle A 1, Abbildung A 6**) und das nachfolgende Versuchsprotokoll etabliert. *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, welche die zu untersuchende PQQ-ADH produzierten (nach Protokoll in Abschnitt 2.2.4), wurden zweimal mit Tris-Puffer (100 mM, pH 8) gewaschen, resuspendiert und auf eine Zelldichte von $1 \leq OD_{600} \leq 4$ eingestellt. Um einen hohen Durchsatz zu ermöglichen, wurde der Aktivitätstest in Mikrotiterplatten (96-Well PS, F-bottom, Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich) durchgeführt. Ein Schacht enthielt jeweils 250 µl Probenlösung, bestehend aus 25 µl Zellsuspension, 100 mM Tris-Puffer (pH 8), 1 µM PQQ, 150 µM DCPIP, 150 µM PMS, 25 mM Imidazol, 10 mM Substrat und entweder 1 mM CaCl₂ oder 1 µM PrCl₃, abhängig davon ob eine Ca²⁺- oder REE-abhängige PQQ-ADH untersucht wurde. Aufgrund substratunabhängiger Hintergrundaktivität wurde das Reaktionsgemisch vor der Substratzugabe für 30 min bei 30°C inkubiert. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde anschließend die Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors DCPIP ($\epsilon = 24.1 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei pH 8) in der ersten Minute nach Substratzugabe bei 600 nm mithilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts (POLARstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) verfolgt. Die Aktivitäten sind angegeben als Enzymeinheiten pro Zelltrockenmasse (U gCDW⁻¹) unter der Annahme, dass 1 l einer Zelllösung mit OD₆₀₀ = 4 genau 1 g Zelltrockenmasse entsprechen.

2.4.6 Durchmusterung von Mutantenbibliotheken für erhöhte Temperaturbeständigkeit

Für die erste Durchmusterungsrunde wurde je 1 ml LB-Medium, welches zusätzlich 10 mM Tris-Puffer (pH 7.5), 1 mM CaCl₂, 40 µg ml⁻¹ Kanamycin, 0.6 µM PQQ und 0.2 % Rhamnose in 2 ml-Deepwell-Platten (Carl Roth, Karlsruhe) enthielt, mit je einer Kolonie inokuliert und bei 16°C und 180 rpm in einem Inkubationsschüttler (HT Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen mittels Zentrifugation (3000 x g, 10 min, 4°C) geerntet, zweimal mit je 1 ml Tris-Puffer (100 mM, pH 8) gewaschen und in 250 µl Tris-Puffer (100 mM, pH 8) resuspendiert. 25 µl der Zellsuspension wurden direkt verwendet, um die anfängliche Enzymaktivität (EA_i) mithilfe des in Abschnitt 2.4.5 beschriebenen Ganzzell-

Aktivitätstests mit 10 mM Ethanol als Substrat zu bestimmen. Weitere 20 μl wurden im Verhältnis 1:10 in Tris-Puffer (100 mM, pH 8) verdünnt und zur Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600}) verwendet. Zusätzlich wurden 100 μl Zellsuspension bei 45°C in einem Thermocycler (Mastercycler EP, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 1 h inkubiert und 25 μl davon anschließend direkt zur Bestimmung der Restaktivität (EA_R) verwendet. Von Proben, welche eine $\text{OD}_{600} > 1$ und eine höhere relative Restaktivität (EA_R/EA_I) als der Wildtyp aufwiesen, wurden je sechs Kolonien erneut nach dem oben beschriebenen Verfahren getestet. Um etwaige hostspezifische Effekte auszuschließen, wurde von Klonen, welche eine signifikant höhere relative Restaktivität als der Wildtyp aufwiesen (zweiseitiger t -Test, $\alpha = 0.05$, $N = 6$), das Plasmid extrahiert, in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen retransformiert und die Temperaturbeständigkeit reevaluiert (zweiseitiger t -Test, $\alpha = 0.05$, $N = 5$).

2.4.7 Biotransformation von 2-Phenylethanol

Biotransformationen wurden als Triplikate in 1.5 ml-Mikroreaktionsgefäßen mit 500 μl Reaktionsgemisch in Dunkelheit durchgeführt. Das Reaktionsgemisch bestand aus 100 mM Tris-Puffer (pH 8), 1 μM PQQ, 150 μM DCPIP, 150 μM PMS, 25 mM Imidazol, 8 mM 2-Phenylethanol (Substrat) und entweder 50 μl *E. coli* BL21(DE3)-Zellen ($\text{OD}_{600} = 3$), welche heterolog die gewünschte PQQ-ADH produzierten, oder 10 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigtem Enzym. Zu spezifischen Zeitpunkten wurden Proben genommen, filtriert (0.2 μm) und durch Zugabe von zwei Äquivalenten 50 mM H_2SO_4 -Lösung angesäuert. Die Extraktion der Substrate und Reaktionsprodukte erfolgte mit einem Äquivalent Ethylacetat. Die organische Phase wurde anschließend zur Konzentrationsbestimmung mittels Gaschromatographie (siehe Abschnitt 2.5.2) eingesetzt.

2.4.8 Enzymaktivitätstest mit Zellkolonien (Solid-Phase-Assay)

Zur Evaluierung mehrerer tausend PQQ-ADH-Varianten in wenigen Tagen wurde ein Solid-Phase-Assay entwickelt, mit welchem die Enzymaktivität in auf Nylonmembranen gewachsenen Zellkolonien gemessen werden kann (Entwicklung des Solid-Phase-Assays siehe Masterarbeit Laura Bendz (Bendz, 2017)). Im finalen Protokoll wurden je 200 μl einer Zellsuspension ($\text{OD}_{600} = 3 \times 10^6$) von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen auf Nylonmembranen (0.45 μm , GVS Life Sciences)

ausplattiert, welche sich auf mit 100 μM PrCl_3 versetzten LB_{Kan} -Agarplatten befanden (siehe **Abbildung 24**). Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Membranen zur Induktion der Proteinproduktion auf neue LB_{Kan} -Agarplatten, welche zusätzlich 100 μM PrCl_3 , 10 μM PQQ und 0.2 % Rhamnose enthielten, transferiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 16°C wurden die Membranen direkt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der Mutantenkolonien verwendet. Vor der Aktivitätsbestimmung wurden die Membranen gewaschen. Hierzu wurden diese für 10 min auf einen mit 3 ml Tris-Puffer (pH 8) getränkten Rundfilter (Rotilabo Typ 113A, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gelegt und anschließend 5 min auf Zellulosepapier getrocknet. Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die Membranen auf einen frischen, mit 3 ml Reaktionslösung (**Tabelle 31**) getränkten Rundfilter gelegt und in Dunkelheit bei Raumtemperatur für 1 – 24 h inkubiert. Kolonien, welche Enzymvarianten produzierten, die Aktivität mit dem getesteten Substrat aufwiesen, konnten durch eine Entfärbung von blau zu farblos identifiziert werden (Beispiel: **Abbildung 24** links unten, Kolonien mit rotem Pfeil markiert). Aufgrund der Verwendung von 30 mM Kaliumcyanid (KCN) in der Reaktionslösung erfolgte die Aktivitätsbestimmung unter dem Abzug.

Tabelle 31: Zusammensetzung der Reaktionslösung für den Solid-Phase-Assay

Komponente	Endkonzentration
Tris-Puffer (pH 8)	100 mM
PQQ	1 - 5 μM
PrCl_3	1 - 5 μM
PMS	500 μM
Imidazol	25 mM
KCN	30 mM
DCPIP	1 mM
Substrat	10 mM

2.4.9 Durchmusterung der Mutantenbibliotheken nach Varianten hinsichtlich Enzymaktivität mit 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) bzw. Glycolsäure

Um mit 80%-iger Wahrscheinlichkeit garantieren zu können, dass jede Variante der jeweiligen Mutantenbibliothek mindestens einmal untersucht wurde, wurden pro Mutantenbibliothek jeweils mehr als 1978 (32 [NNK] x 32 [NNK] x 1.2 [Korrektur für

Leervektoren nach Assemblierungsreaktion] x 1.61 [Oversampling-Faktor]) Klone durchmustert (Reetz et al., 2008). Dies erfolgte mithilfe des in Abschnitt 2.4.8 beschriebenen Solid-Phase-Assays und 10 mM HMFA oder 10 mM Glycolsäure als Substrat. Die erste Durchmusterungsrunde wurde von Laura Bendz durchgeführt (Bendz, 2017). Klone, die Aktivitäten mit einem Substrat aufwiesen, wurden auf LB_{Kan}-Agarplatten isoliert und anschließend in einer zweiten Durchmusterungsrunde im Triplikat reevaluiert, um falsch-positive Klone zu eliminieren. Hierzu wurde von jedem identifizierten Klon eine Kolonie in 20 µl ddH₂O resuspendiert und dreimal je 2 µl dieser Lösung auf eine Nylonmembran im Abstand von ca. 5 mm getropft. Als Referenz wurden zusätzlich dreimal je 2 µl Zelllösung, sowohl von PedH- als auch EGFP-produzierenden Zellen, auf dieselbe Membran getropft. Zellwachstum, Proteinexpression und Aktivitätsbestimmung der Kolonien erfolgte anschließend wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben. Von Klonen, die auch in der zweiten Durchmusterungsrunde höhere Aktivitäten als die Referenzkolonien aufwiesen, wurde anschließend das Plasmid isoliert und sequenziert. Die abschließende Evaluierung der identifizierten Klone erfolgte mit aufgereinigten Enzymen.

2.4.10 Biotransformation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA)

Biotransformationen wurden als Duplikate in 1.5 ml-Reaktionsgefäßen mit 500 µl Reaktionsgemisch bei 30°C, 180 rpm und Dunkelheit durchgeführt. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 100 mM Tris-Puffer (pH 8), 5 µM PQQ, 5 µM PrCl₃, 150 µM DCPIP, 500 µM PMS, 25 mM Imidazol, 10 mM HMFA (Substrat) sowie aufgereinigtem PedH oder PedH^{F375V/W521A} (C_{end} = 20 µg/ml) zusammen. Für die Kontrollreaktionen wurde kein Protein hinzugefügt. Proben wurden zu mehreren Zeitpunkten genommen, filtriert und bei -80°C bis zur Analyse mittels HPLC (siehe Abschnitt 2.5.1) gelagert.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Probenanalyse der 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) Biotransformationen erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Nick Wierckx (Institute of Bio- and Geosciences IBG-1: Biotechnology, Forschungszentrum Jülich, Jülich, und Institut für Angewandte Mikrobiologie, RWTH Aachen, Aachen) und wurde von Sebastian Köbbing (Institut für Angewandte Mikrobiologie, RWTH Aachen, Aachen) mit einem Beckman System Gold 126 Solvent Modul (Beckman Coulter, Brea, USA) ausgestattet mit einem Diodenarraydetektor (Beckman Coulter, Brea, USA) und einer SUPELCOSIL™ LC-8-DB HPLC-Säule (15 cm x 4.6 mm, 5 µm, Supelco, Bellefonte, USA), durchgeführt. Die Probentrennung erfolgte mit einem Gradientenprogramm bei einem Fluss von 0.8 ml/min. Als Laufmittel wurden 20 mM KH₂PO₄ (pH 7) mit 1 % Acetonitril (Laufmittel A) und 100 % Acetonitril (Laufmittel B) verwendet und als mobile Phase wurde 100 % Laufmittel A verwendet. Als Einspritzvolumen wurden 20 µl gewählt. Das Gradientenprogramm begann mit einer linearen Erhöhung von 0 – 5 % Laufmittel B während 3.5 min und einer anschließenden Erhöhung von 5 – 40 % Laufmittel B während 2.5 min. Anschließend wurde die Säule für 2 min mit Laufmittel A gespült. Quantitative und qualitative Produktbestimmung erfolgte durch Vergleich mit einem externen Standard. Dazu wurden die Retentionszeiten von HMFA, FFCA und FDCA auf 2.45 min, 2.54 min und 2.2 min bestimmt. Da sich die Retentionszeiten von HMFA und FFCA kaum unterschieden, erfolgte die Unterscheidung über eine Analyse des Absorptionspektrums. FFCA konnte durch einen Peak bei 287 nm (**Abbildung A 8**) von HMFA (Peaks bei 200 nm und 250 nm, **Abbildung A 7**) unterschieden werden.

2.5.2 Gaschromatographie

Die Probenanalyse der Biotransformationen von 2-Phenylethanol aus Abschnitt 2.4.7 erfolgte mit dem GC-2010 Gaschromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) ausgestattet mit einem AOC-20i Autosampler, FI-Detektor und einer HP-1ms UI Säule (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Als Trägergas wurde Wasserstoff mit einer Lineargeschwindigkeit von 30 cm/s verwendet. Das Temperaturprogramm startete bei einer Ofentemperatur von 70°C und wurde mit

einer Heizrate von 20°C/min auf 140°C geheizt, weiter bei einer Heizrate von 40°C/min auf 320°C aufgeheizt und schließlich für 2 min bei 320°C gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl bei einem Split von 1:10. Die quantitative und qualitative Substrat- und Produktbestimmung erfolgte durch Vergleich mit einem externen Standard. Dazu wurden die Retentionszeiten von 2-Phenylethanol, Phenylacetaldehyd und Phenyllessigsäure auf 3.7 min, 3.2 min und 4.5 min bestimmt.

2.5.3 Proteinmassenspektrometrie

Proteinmassenspektrometrische Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jens Pfannstiel (Core Facility Hohenheim, Mass Spectrometry Module, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde ein EASY-nLC 1200 System (Thermo Fisher, Waltham, USA) gekoppelt mit einem Q-Exactive Plus Massenspektrometer (Thermo Fisher, Waltham, USA) und EASY-Spray Nanoelektrospray Ionenquelle (Thermo Fisher, Waltham, USA) für die NanoLC-ESI-MS/MS Experimente verwendet. Die verdauten Peptide wurden direkt in eine EASY-Spray Analysensäule (2 µm, 100 Å PepMapRSLC C18, 25 cm x 75 µm, Thermo Fisher, Waltham, USA) injiziert, welche bei einer konstanten Säulentemperatur von 35°C verwendet wurde. Die Auftrennung der Peptide erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 250 nL/min mittels eines 240-minütigen Laufmittelgradienten, der sich wie folgt zusammensetzte: in 100 min von 2 % – 10 % Laufmittel B; nächste 80 min von 10 % – 22 % Laufmittel B; nächste 55 min von 22 % – 45 % Laufmittel B; nächste 5 min von 45 % – 95 % Laufmittel B. Danach 15 min isokratisch bei 90 % Laufmittel B. Als Laufmittel wurden 0.5 % Essigsäure (Laufmittel A) und 0.5 % Essigsäure in Acetonitril/H₂O (80 % / 20 %, v/v, Laufmittel B) verwendet. MS-Spektren ($m/z = 300 - 1600$) wurden mithilfe der Orbitrap Ionenfalle bei einer Auflösung von 70000 ($m/z = 200$) mit einer maximalen Injektionszeit (MIT) von 100 ms und einer automatischen Verstärkungsregelung (AGC) von 1×10^6 detektiert. Die interne Kalibrierung der Orbitrap erfolgte wie anderweitig beschrieben (de Godoy et al., 2005). Datenabhängige MS-Spektren wurden in der Orbitrap mithilfe von High-Energy-Collision-Dissociation (HCD)-Fragmentation für die zehn häufigsten Peptidvorläufer mit einer Auflösung von 17500, einem normalisierten Kollisionsenergiewert von 27 und einem Intensitätsschwellenwert von 1.3×10^5 generiert. Nur Ionen mit einer Ladung von +2

bis +5 wurden mit einer Isolationsbreite von 1.6 Da zur Fragmentierung ausgesucht. Für jeden MS/MS-Scan wurde der AGC auf 5×10^5 festgelegt und die MIT entsprach 100 ms. Um wiederholte Fragmentierungen zu vermeiden, wurden fragmentierte Vorläuferionen für 30 s in einem 5 ppm Massenbereich ausgeschlossen.

2.6 *In-silico*-Methoden

2.6.1 Erstellung von Homologiemodellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Homologiemodelle wurden mithilfe von Swiss-Model erstellt (Biasini et al., 2014). Die Kristallstruktur der PQQ-ADH ExaA aus *P. aeruginosa* (PDB-Code: 1FLG) wurde hierfür als Vorlage benutzt, da ExaA von allen in der Swiss-Modell-Bibliothek hinterlegten Strukturen die höchste Sequenzsimilarität zu PedE (60 %) und PedH (49 %) aufweist. Die graphische Darstellung der Modelle erfolgte mithilfe von PyMOL 2.4.0 (Schrodinger LLC, 2015).

2.6.2 Molekulares Docking

Molekulares Docking wurde mit der AutoDock Vina-Implementation (Trott and Olson, 2010) in Yasara (Version 16.12.29, www.yasara.org) durchgeführt (Krieger and Vriend, 2014). Hierzu wurde im energieminierten Homologiemodell der jeweiligen PQQ-ADH oder PQQ-ADH-Variante eine Simulationszelle mit einer Kantenlänge von 10 Å so platziert, dass sie die aktive Tasche und alle die aktive Tasche formenden Aminosäurereste umfasst, welche nicht am katalytischen Mechanismus beteiligt sind. Als Substrat wurde ein energieminiertes Modell des zu untersuchenden Substrats verwendet. Die Modelle der Substrate wurden mithilfe von ChemSpider generiert (ChemSpider Synthetic Pages, 2001, <http://cssp.chemspider.com/123>). Das Docking erfolgte anschließend mit den Standardeinstellungen in Yasara mit wenigen Ausnahmen:

- Die Anzahl der Dockingdurchläufe wurde auf 100 festgelegt und der rmsd_{min} -Wert wurde auf 0.5 festgelegt (Der rmsd_{min} -Wert legt die minimale mittlere räumliche Abweichung vom zwei Dockingergebnissen fest, die notwendig ist, um sie als unterschiedlich zu bewerten).
- Als Forcefield wurde AMBER03 verwendet (Salomon-Ferrer et al., 2013).

Je nach Anwendung wurde entweder das gesamte Modell fixiert oder einzelne Aminosäurereste der aktiven Tasche, welche nicht am katalytischen Mechanismus beteiligt sind, als flexibel gewählt. Die graphische Darstellung der Dockingergebnisse erfolgte mit PyMOL 2.4.0 (Schrodinger LLC, 2015).

2.6.3 Sequenzidentitätsbestimmung

Sequenzidentitäten wurden basierend auf einem Aminosäuresequenzvergleich mithilfe von Clustal Omega (Sievers et al., 2014) generiert.

2.6.4 Proteinquantifizierung und Analyse der Proteomdaten

Die Proteinidentifizierung und -quantifizierung (markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung, LFQ) der Proteine erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jens Pfannstiel (Core Facility Hohenheim, Mass Spectrometry Module, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland) und wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Jens Pfannstiel mithilfe des MaxQuant Softwarepakets (Version 1.6.0.1.) durchgeführt (Cox and Mann, 2008). Hierzu wurden die in Abschnitt 2.5.3 gewonnen Rohdaten in MaxQuant geladen und die Proteine mithilfe der Andromeda-Suchfunktion identifiziert (Cox et al., 2011). Die MS-Spektren und MS/MS-Spektren wurden mit der *P. putida* KT2440-Proteinsequenzdatenbank aus Uniprot verglichen (Bateman et al., 2017). Reverse Sequenzen als Decoydatenbank und bekannte Kontaminantensequenzen wurden automatisch von MaxQuant hinzugefügt. Als Massentoleranzwerte wurden 4.5 ppm für MS-Spektren und 20 ppm für MS/MS-Spektren gewählt. Trypsin wurde als Proteaseenzym ausgewählt und zwei falsche Schnittstellen waren erlaubt. Carbamidomethylation von Cystein-Resten wurde als eine fixe Modifikation festgelegt und N-terminale Acetylierung und Oxidation wurden als variable Modifizierungen erlaubt. Die „Match between runs“-Funktion von MaxQuant wurde ausgewählt mit einem „Match“-Zeitfenster von 1 min und einem „Alignment“-Zeitfenster von 20 min. Die Peptid-Falscherkennungsrate (FDR) und Protein-FDR Schwellenwerte wurden auf 0.01 festgelegt.

Die statistische Analyse und die prinzipielle Komponenteanalyse erfolgte mithilfe der Perseus Software Version 1.6.0.2. (Tyanova et al., 2016). Übereinstimmungen mit Kontaminanten (z.B. Keratin, Trypsin) sowie Übereinstimmungen mit den reversen Sequenzen, welche in MaxQuant identifiziert wurden, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Proteine wurden zur LFQ (label-freie Quantifizierung) zugelassen, sofern sie durch mindestens zwei Peptide identifiziert wurden. Zunächst wurden die normalisierten LFQ-Werte aus MaxQuant log₂-transformiert und anschließend fehlende Werte aus der Normalverteilung aufgefüllt mit einem *downshift* von 2.0 und

einer *width* von 0.02. Statistische Unterschiede zwischen zwei Probengruppen wurden mithilfe eines einseitigen *t*-Tests bestimmt. Proteine mit einem *P*-Wert < 0.01 und einem Regulationsfaktor > 2 (\log_2 Proteininduktion > 1) wurden als signifikant unterschiedlich im Proteinvorkommen gewertet. Die Massenspektrometriedaten wurden zum ProteomXchange Consortium mit Hilfe von PRIDE hinzugefügt (Vizcaíno et al., 2016).

2.6.5 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit präsentierten statistischen Auswertungen wurden mithilfe von GraphPad Prism Version 7.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der PQQ-ADHs PedE und PedH

Pyrrolochinolinchinon(PQQ)-abhängige Alkoholdehydrogenasen (PQQ-ADHs) katalysieren die Oxidation eines breiten Spektrums an Alkoholen und Aldehyden (Chattopadhyay et al., 2010; Takeda et al., 2013). Dabei übertragen sie die bei der Oxidation aufgenommenen Elektronen direkt auf die Atmungskette, was nicht nur Energie für die Zelle bereitstellt, sondern auch die effiziente Nutzung von molekularem Sauerstoff als günstiges Oxidationsmittel ermöglicht (Goodwin and Anthony, 1998). Aufgrund ihrer periplasmatischen Lage erfordern sie keinen Produkt- oder Substrattransport über die periplasmatische Membran und akkumulieren die Reaktionsprodukte folglich außerhalb des Cytoplasmas (Adachi et al., 2007). Dies kann in biotechnologischen Prozessen nicht nur die Produktaufbereitung vereinfachen, sondern auch ein Vorteil bei potentiell toxischen Reaktionsprodukten sein. Besonders für die Verwendung in Ganzzellbiokatalysatoren stellen PQQ-ADHs somit eine vielversprechende Alternative zu Alkoholoxidasen oder NAD(P)-abhängigen Alkoholdehydrogenasen dar. Bis heute sind jedoch nur wenige Anwendungen von PQQ-ADHs bekannt (siehe Abschnitt 1.2.4.5).

Mit dem Ziel PQQ-ADHs für biotechnologische Applikationen zu etablieren, wurden in einem ersten Schritt die zwei PQQ-ADHs PedE (PP_2674; GenInfo Identifikator [GI]: 26989393) und PedH (PP_2679; GI: 26989398) aus *Pseudomonas putida* KT2440 eingehend charakterisiert. PedE und PedH wurden insbesondere deshalb ausgewählt, da *P. putida* KT2440 aufgrund seiner hohen Toleranz gegenüber cytotoxischen Chemikalien und anderen Stressfaktoren (Ankenbauer et al., 2020; Kim and Park, 2014; Nickel et al., 2016; Ramos et al., 2015) sowie seiner großen metabolischen Vielfalt für industrielle Ganzzellprozesse besonders geeignet ist (Loeschcke and Thies, 2015; Poblete-Castro et al., 2012; Sajid et al., 2018; Wierckx et al., 2012). Zunächst wurden die Gene *pedE* und *pedH* samt des natürlichen Signalpeptids und einem C-terminalen His-Tag in das pBBR1MCS2-basierte Expressionsplasmid pJEM1 (Jeske and Altenbuchner, 2010) eingebracht und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Mittels einer einstufigen Affinitätschromatographie wurden die Quinoproteine anschließend aus den lysierten Zellen aufgereinigt. Eine nachfolgende Analyse der

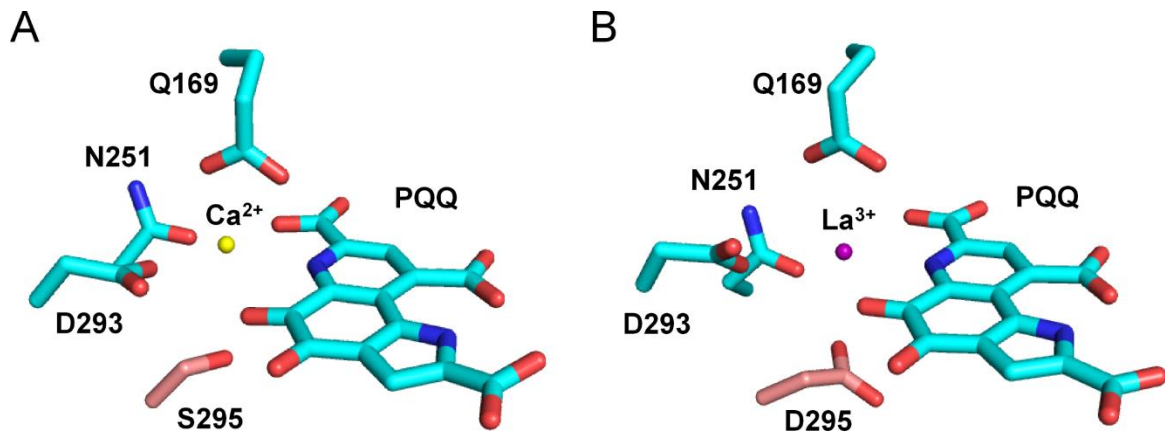


Abbildung 11: Homologiemodelle von PedE (A) und PedH (B), generiert mithilfe von SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) unter Verwendung der Kristallstruktur von ExaA aus *P. aeruginosa* (PDB-Code: 1FLG). Die Visualisierung erfolgte mittels der Softwaresuite PyMol (Schrodinger LLC, 2015). Die Aminosäurereste welche das katalytische Kation (gelbe oder violette Sphären) koordinieren, sowie der PQQ Cofaktor sind als Stocksymbole dargestellt und nach einem Elementabhängigen Farbschema gefärbt (C, cyan, O, rot, N, blau). Die Aminosäure an Position 295 ist durch Verwendung eines anderen Farbschemas hervorgehoben (C, lachsfarben, O, rot). Abbildung wurde bereits veröffentlicht in (Wehrmann et al., 2017).

Proteinreinheit mittels SDS-PAGE ergab je eine distinkte Bande in der Größenordnung von 60 – 70 kDa, welche sehr gut mit den berechneten molaren Massen der Proteine (PedE = 67.3 kDa; PedH = 63.4 kDa PedH) übereinstimmte (**Abbildung A 9**).

Für die Bestimmung physiochemischer Parameter, wie Cofaktorabhängigkeit, Substratspektrum und kinetische Konstanten, wurde ein kolorimetrischer Aktivitätstest, basierend auf dem terminalen Elektronenakzeptor DCPIP, verwendet (siehe Abschnitt 2.4.2). Die gemessene Enzymaktivität der PQQ-ADH PedE mit dem Modellsubstrat Ethanol war proportional zur eingesetzten Menge der Cofaktoren PQQ und Ca^{2+} , mit Aktivitätsspitzen bei einer Konzentration von 50 μM PQQ und 1 mM CaCl_2 . Die aus den Konzentrationskurven errechneten Dissoziationskonstanten K_d von PedE betragen 3.5 μM für PQQ und 64 μM für Ca^{2+} (**Abbildung A 4**, **Abbildung A 10**). Überraschenderweise konnten unter denselben Bedingungen keine Enzymaktivitäten mit PedH detektiert werden. Mithilfe von Homologiemodellen, basierend auf der Kristallstruktur der PQQ-ADH ExaA aus *P. aeruginosa* (PDB-Code: 1FLG), wurden deshalb die aktiven Zentren beider Enzyme genauer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das PedE-Protein, genau wie ExaA und viele weitere charakterisierte PQQ-ADHs (Chistoserdova, 2016; Keitel et al., 2000; Keltjens et al., 2014), an der Ca^{2+} -koordinierenden Position 295 ein Serin trägt (**Abbildung 11A**). Im

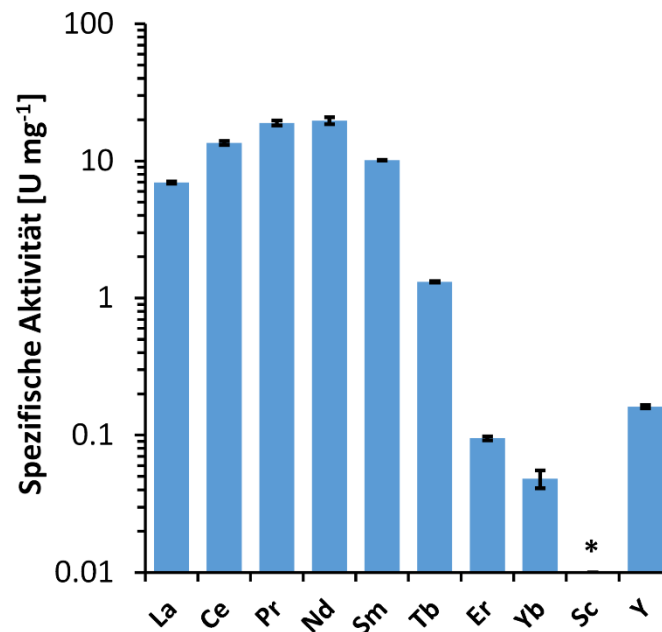


Abbildung 12: Spezifische Enzymaktivitäten von PedH in Gegenwart verschiedener REEs (1 µM) mit 10 mM Ethanol als Substrat. Aktivitäten unter dem Detektionslimit sind markiert (*). Balken stellen den Mittelwert von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

Gegensatz dazu befindet sich im PedH-Protein ein Aspartat-Rest an dieser Position (**Abbildung 11B**). Da mehrere Studien mit PQQ-ADHs aus methylo trophen Bakterien vermuten lassen, dass ein Zusammenhang zwischen diesem Aspartat-Rest und der Koordination von dreiwertigen Lanthanidionen (Ln^{3+}) besteht (Good et al., 2016; Keltjens et al., 2014), wurde PedH auf Enzymaktivität mit Ethanol in Gegenwart verschiedener Seltenerdmetalle (REEs) getestet (**Abbildung 12**). Hierbei konnten Enzymaktivitäten in Gegenwart von La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} und Y^{3+} nachgewiesen werden. Die höchsten Aktivitäten wurden mit Pr^{3+} und Nd^{3+} gemessen. Im Gegensatz dazu entsprachen die Aktivitäten mit den schweren REEs Er^{3+} , Yb^{3+} und Y^{3+} als Metallcofaktor weniger als 0.05 % der mit Pr^{3+} oder Nd^{3+} gemessenen Werte und konnten nur unter Einsatz von erhöhten Enzymkonzentrationen detektiert werden. Von allen getesteten REEs konnte einzig mit Sc^{3+} keine Enzymaktivität mit PedH nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PedE, welches Aktivität im Konzentrationsbereich von 10 µM – 10 mM CaCl_2 aufweist, konnte mit PedH bei REE-Konzentrationen von 10 nM – 100 µM Enzymaktivität detektiert werden, mit einer Aktivitätsspitze bei 1 µM. Die errechneten Dissoziationskonstanten von PedH mit verschiedenen REEs lagen im Bereich von $K_d = 25 - 75$ nM (**Abbildung**

A 10). Dies entspricht einer 850- bis 2500-fach höheren Metallaffinität als bei PedE mit Ca^{2+} ($K_d = 64 \mu\text{M}$; **Abbildung A 10**). Auch die Affinität von PedH für den Cofaktor PQQ ($K_d = 41 \text{ nM}$; **Abbildung A 4**) war mehr als 85-fach höher im Vergleich zu PedE.

3.1.1 Substratspektrum

Die Analyse des Substratspektrums der PQQ-ADH PedE fand unter optimierten Reaktionsbedingungen, welche unter anderem die Präsenz von 25 mM Imidazol, 50 μM PQQ und 1 mM CaCl_2 einschlossen, statt (**Tabelle 32**). Mit allen linearen, primären Alkoholen und Aldehyden wurden vergleichbar hohe Enzymaktivitäten im Bereich von 1.9 ± 0.2 bis $6.7 \pm 0.9 \text{ U mg}^{-1}$ gemessen. Auch 2-Phenylethanol, 2-Butanol, Zimtalkohol, Ethylenglycol und das azyklische Sesquiterpen Farnesol wurden effizient umgesetzt. Die spezifischen Enzymaktivitäten hierbei lagen zwischen

Tabelle 32: Spezifische Enzymaktivitäten von PedE und PedH mit verschiedenen Substraten. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

Substrat	Spezifische Aktivität [U mg^{-1}]*	
	PedE	PedH
Methanol	0.61 ± 0.10	0.80 ± 0.05
Ethanol	6.7 ± 0.9	11.0 ± 0.3
Ethanolamin	0.55 ± 0.09	1.6 ± 0.2
1-Butanol	5.8 ± 0.1	11.5 ± 0.7
2-Butanol	4.4 ± 0.7	7.6 ± 0.4
2,3-Butandiol	0.39 ± 0.03	0.78 ± 0.04
1-Hexanol	5.2 ± 0.1	10.4 ± 1.1
1-Octanol ^a	3.5 ± 0.2	4.7 ± 0.7
2-Phenylethanol	6.7 ± 1.1	10.2 ± 1.4
Acetaldehyd	4.7 ± 0.5	6.7 ± 0.4
Butyraldehyd	6.1 ± 0.4	10.3 ± 0.6
Hexanal ^a	3.8 ± 0.1	6.2 ± 0.3
Octanal ^a	1.9 ± 0.2	3.6 ± 0.6
Zimtalkohol ^a	2.4 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Zimtaldehyd ^b	n. d.	n. d.
Farnesol ^b	2.0 ± 0.3	3.8 ± 0.5
Ethylenglycol	2.8 ± 0.2	5.4 ± 0.4
Glycolsäure	n. d.	n. d.
HMF	n. t.	0.13 ± 0.02
HMFA	n. d.	n. d.

*Daten sind Mittelwerte von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Sofern nicht anders angegeben wurden 10 mM in H_2O gelöstes Substrat verwendet. Aktivitäten unter dem Detektionslimit oder Enzym-Substratkombinationen, die nicht getestet wurden, sind mit n. d. bzw. n. t. angegeben.

^a10 mM Substrat in DMSO.

^b500 μM Substrat in DMSO.

6.7 ± 1.1 und 2.0 ± 0.3 U mg^{-1} . Bei Butanol lässt sich jedoch eine klare Präferenz des Enzyms für den primären Alkohol gegenüber dem sekundären Alkohol erkennen. Methanol, 2,3-Butandiol und Ethanolamin wurden schlecht umgesetzt mit spezifischen Aktivitäten, die weniger als einem Zehntel der Aktivitäten mit Ethanol oder 2-Phenylethanol entsprachen. Keine Aktivitäten konnten mit Zimtaldehyd, Glycolsäure sowie 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) detektiert werden. Das Aktivitätsspektrum von PedH unter optimierten Reaktionsbedingungen, welche die Verwendung von $1 \mu\text{M Pr}^{3+}$ an Stelle von CaCl_2 als Metallcofaktor und $1 \mu\text{M PQQ}$ an Stelle von $50 \mu\text{M PQQ}$ beinhalteten, war identisch zu dem von PedE, jedoch mit ungefähr doppelt so hohen spezifischen Aktivitäten.

3.1.2 Kinetische Konstanten von PedE und PedH

Mit den drei Substraten Ethanol, Acetaldehyd und 2-Phenylethanol wurden zusätzlich die kinetischen Parameter der beiden PQQ-ADHs bestimmt (**Abbildung 13**). Für Ethanol wurde eine ungefähr 1.7-fach höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit

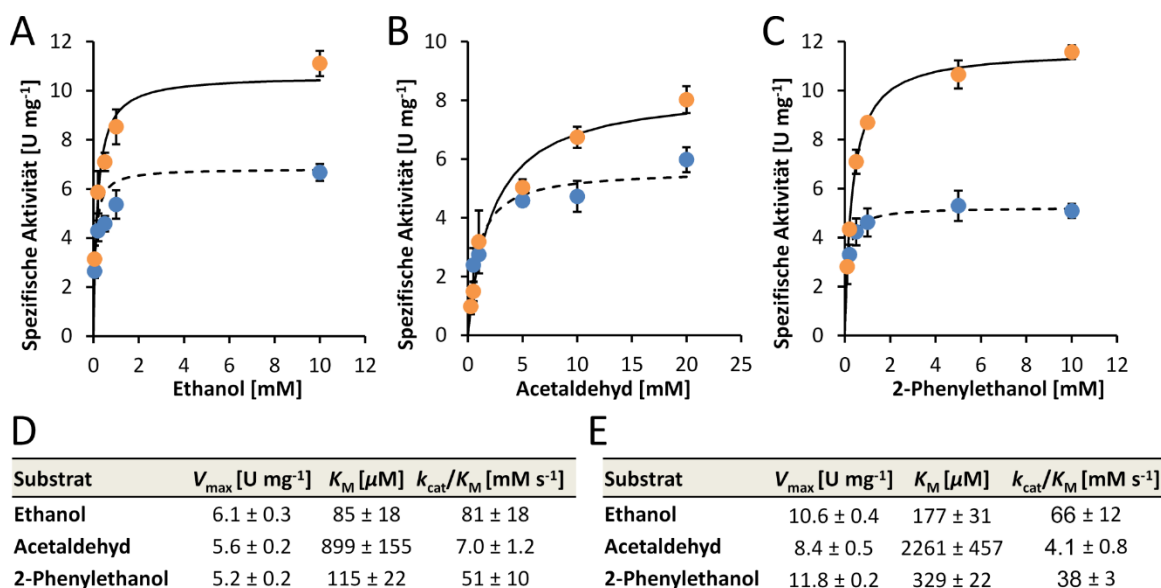


Abbildung 13: (A bis C) Die Michaelis-Menten-Kurve zeigt die spezifischen Enzymaktivitäten von PedE (blaue Punkte) und PedH (orangene Punkte) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für Ethanol (A), Acetaldehyd (B) und 2-Phenylethanol (C). Für PedE wurden 1 mM Ca^{2+} und $50 \mu\text{M PQQ}$ im Reaktionspuffer verwendet, wohingegen für PedH $1 \mu\text{M Pr}^{3+}$ und $1 \mu\text{M PQQ}$ verwendet wurden. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}), die Substrataffinitäten (K_M), und die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M , wobei k_{cat} die Wechselzahl darstellt) von PedE (D) und PedH (E) wurden durch nichtlineare Regression der in A bis C dargestellten Werte an das Michaelis-Menten-Modell bestimmt (gestrichelte Linie für PedE und durchgezogene Linie für PedH). Die abgeleiteten kinetischen Konstanten sind mit zugehörigem Standardfehler angegeben. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

(V_{\max}) mit PedH als mit PedE ermittelt (10.6 vs. 6.1 U mg⁻¹). Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) von PedE entsprach jedoch nur ca. der Hälfte des mit PedH bestimmten Wertes (85 vs. 177 μM), was einer doppelt so hohen Substrataffinität entspricht. Ein ähnliches Muster im Verhältnis von V_{\max} und K_M konnte auch mit den Substraten Acetaldehyd und 2-Phenylethanol nachgewiesen werden, jedoch bei ungefähr 1.6-fach (2-Phenylethanol) bzw. 10 – 15-fach (Acetaldehyd) niedrigerer katalytischer Effizienz. Eine statistische Analyse ergab (zweiseitiger t -Test, $\alpha = 0.05$, $N = 3$), dass die V_{\max} - und K_M -Werte signifikant unterschiedlich waren zwischen PedE und PedH ($P < 0.05$), wobei der K_M -Wert mit Ethanol eine Ausnahme darstellte. Bei den katalytischen Effizienzen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.2 Verbesserung der Enzymstabilität der PQQ-ADH PedE durch semi-rationales Design

Die Enzymstabilität spielt eine bedeutende Rolle für eine Vielzahl biokatalytischer Prozesse (Polizzi et al., 2007; Woodley, 2013). Dies gilt besonders für die Anwendung von aufgereinigten oder periplasmatisch produzierten Enzymen, welche sich außerhalb der cytoplasmatischen Membran befinden und somit im direkten Kontakt mit ihrer Umgebung stehen. Außerdem geht eine erhöhte Enzymstabilität auch mit einer erhöhten Evolvierbarkeit und Mutationsbeständigkeit einher, was besonders bei der Entwicklung von Biokatalysatoren mit neuen oder verbesserten Funktionalitäten von großem Nutzen sein kann (Bloom et al., 2006; Bloom and Arnold, 2009; Tokuriki and Tawfik, 2009). Auf dem Weg PQQ-ADHs für die Biokatalyse zu etablieren, wurde deshalb als erster Schritt die Verbesserung der Enzymstabilität gewählt. Hierzu sollte die Temperatur- und Lösungsmittelbeständigkeit des Modellenzym PedE mithilfe eines semi-rationalen Designansatzes verbessert werden.

3.2.1 Entwicklung eines heterologen Ganzzell-Aktivitätstests für PQQ-ADHs

Für die Entwicklung von Enzymen mit neuen oder verbesserten Funktionalitäten, sei es mittels gerichteter Evolution oder mittels semi-rationalen Designs, sind Enzymaktivitätstests mit ganzen Zellen von großem Nutzen, da sie die Durchmusterung von Mutantenbibliotheken ohne vorherige Aufreinigung der einzelnen Proteinvarianten ermöglichen. Im Verlaufe dieser Arbeit wurden deshalb zwei Aktivitätstests entwickelt, welche die gleichzeitige Untersuchung von mehreren Hundert bis mehreren Tausend in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen heterolog produzierten PQQ-ADH-Varianten ermöglichen. Der für die Durchmusterung der Mutantenbibliotheken zur Erhöhung der Enzymstabilität von PedE verwendete Aktivitätstest wurde mit Flüssigkulturen in 96-Well-Platten durchgeführt und erlaubte die parallele Durchmusterung von mehreren Hundert Varianten in einem Zeitraum von drei Tagen.

3.2.2 Heterologer Ganzzell-Aktivitätstest in Flüssigkulturen

Für die Analyse von in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen produzierten PQQ-ADHs wurde ein DCPIP-abhängiger, kolorimetrischer Aktivitätstest entwickelt. Dieser basierte auf

Ganzzell-Aktivitätstests, welche die Untersuchung von Quinoproteinen in *Gluconobacter oxydans* 621H-Zellen bzw. in *M. extorquens* AM1-Zellen ermöglichen (Peters et al., 2013; Vemuluri et al., 2017). Hierfür wurde mithilfe von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, welche heterolog die PQQ-ADH PedE aus *P. putida* KT2440 produzierten, die Pufferzusammensetzung, die Zelldichte sowie die Supplementierung mit Aminquellen und den Cofaktoren PQQ und Ca^{2+} optimiert. Wie aus **Tabelle A 1** zu entnehmen ist, konnten die höchsten Aktivitäten mit in einer Tris-gepufferten Lösung (pH 8) in Gegenwart von 25 mM Imidazol als Aminquelle sowie in Gegenwart von 1 μM PQQ und 1 mM Ca^{2+} gemessen werden. Konstante, hohe Enzymaktivitäten wurden in einem Zelldichtebereich von $1 \leq \text{OD}_{600} \leq 4$ detektiert (siehe Abschnitt 2.4.5).

Um das breite Anwendungsspektrum des neu entwickelten Aktivitätstests zu demonstrieren, wurden Ca^{2+} - und Ln^{3+} -abhängige PQQ-ADHs aus verschiedenen Organismen in *E. coli* BL21(DE3) produziert und deren Enzymaktivitäten mittels des Ganzzell-Aktivitätstests bestimmt. Hierzu wurden die Enzyme PedE (Ca^{2+}) und PedH (Ln^{3+}) aus *P. putida* KT2440 sowie ExaA (PA1982; Ca^{2+}) aus *P. aeruginosa* (Chattopadhyay et al., 2010; Rupp and Görisch, 1988) verwendet. Für alle getesteten

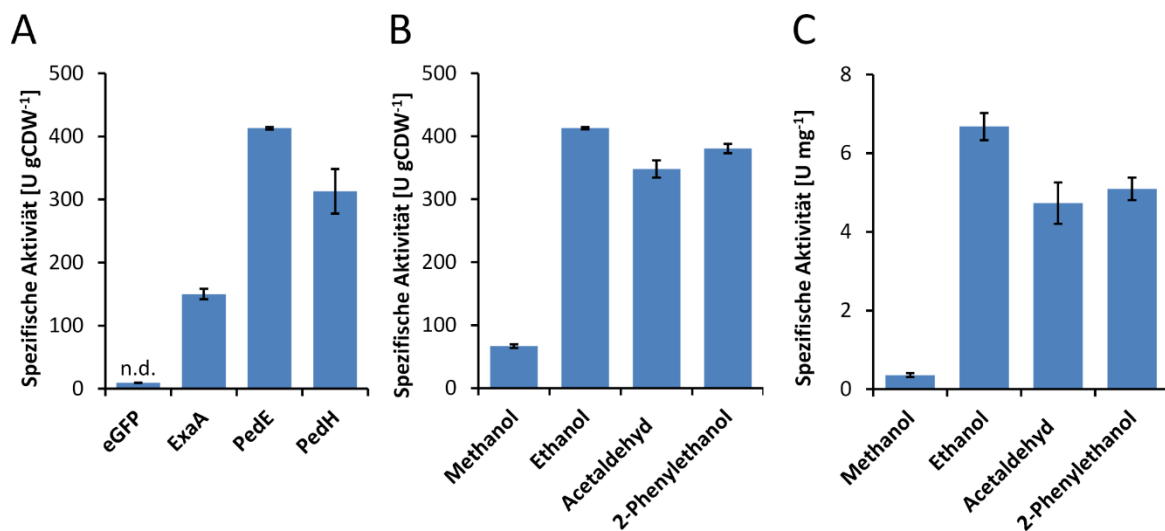


Abbildung 14: (A) Spezifische Enzymaktivitäten der Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADHs ExaA aus *P. aeruginosa* und PedE aus *P. putida* sowie der REE-abhängigen PQQ-ADH PedH aus *P. putida* bestimmt mit dem *E. coli* BL21(DE3)-basierten Ganzzell-Aktivitätstest in Flüssigkulturen und 10 mM Ethanol als Substrat. (B und C) Spezifische Enzymaktivitäten von PedE bestimmt mit *E. coli* BL21(DE3)-basiertem Ganzzell-Aktivitätstest in Flüssigkulturen (B) oder aufgereinigtem PedE-Protein (C) mit verschiedenen Modellsubstraten (10mM). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Aktivitäten unter dem Detektionslimit sind mit n. d. angegeben. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

PQQ-ADHs konnten Enzymaktivitäten mit 10 mM Ethanol als Substrat nachgewiesen werden (**Abbildung 14A**). Mit Kontrollzellen, welche eGFP von demselben Expressionsvektor produzierten, konnte keine Enzymaktivität gemessen werden. Um die Vielseitigkeit des Ganzzell-Aktivitätstests weiter zu veranschaulichen, wurde zudem die Enzymaktivität der PQQ-ADH PedE, sowohl im Ganzzellformat als auch mit aufgereinigtem Enzym, mit den vier Substraten Methanol, Ethanol, 2-Phenylethanol und Acetaldehyd gemessen (**Abbildung 14B – C**). Ein Vergleich der mit den verschiedenen Methoden gemessenen Werte zeigte, dass unabhängig von der eingesetzten Methode die höchsten spezifischen Aktivitäten mit Ethanol als Substrat detektiert wurden ($413 \pm 2 \text{ U gCDW}^{-1}$ und $6.7 \pm 0.3 \text{ U mg}^{-1}$). Mit aufgereinigtem Enzym entsprachen die gemessenen Werte für 2-Phenylethanol bzw. Acetaldehyd $76 \pm 6 \%$ bzw. $71 \pm 9 \%$ der mit Ethanol detektierten Aktivität. Im Gegensatz dazu entsprach die mit Methanol gemessene Aktivität weniger als einem Zehntel der Ethanol-Aktivität ($5 \pm 1 \%$). Ein ähnlicher Trend konnte auch mit dem Ganzzell-Aktivitätstest beobachtet werden, wenn auch mit leicht höheren relativen Aktivitäten ($92 \pm 2 \%$, $84 \pm 3 \%$ bzw. $16 \pm 1 \%$ für 2-Phenylethanol, Acetaldehyd bzw. Methanol). Zusätzlich wurden Biotransformationen mit PedE durchgeführt, sowohl im Ganzzellansatz als auch mit aufgereinigtem Enzym, um zu demonstrieren, dass die gemessenen Enzymaktivitäten mit Produktbildung einhergehen. Hierbei konnte nicht nur gezeigt werden, dass Phenylacetaldehyd das Hauptoxidationsprodukt ist, welches mit 2-Phenylethanol als Substrat gebildet wird, sondern auch, dass Produktbildung nur in Gegenwart der artifiziellen Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP abläuft (**Tabelle A 2**).

3.2.3 Identifizierung von Positionen in PedE zur Erhöhung der Thermostabilität

Für die Entwicklung thermostabiler PedE-Varianten wurde eine Kombination aus zwei etablierten Ansätzen, der B-FIT-Methode und der Konsensus-Methode, verwendet (Lehmann et al., 2000; Reetz et al., 2006a). Das Konzept der B-FIT-Methode beruht darauf, dass die temperaturbedingte Denaturierung von Proteinstrukturen an den flexibelsten Stellen eines Proteins beginnt und folglich eine Stabilisierung dieser Entfaltungs-Ausgangspunkte zu einer erhöhten Thermostabilität führt (Vihinen, 1987). Zuerst wurden deshalb die flexibelsten

Tabelle 33: Zusammensetzung der sechs Mutantenbibliotheken. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

Position	WT-Sequenz	B-Faktor	Zusammensetzung	Verwendete Codons	Getestete Klone
91	R	39	A•, D•, Q•, E•, K•	VAG, GSC	36
307	D	63	E•, I•, K•, T•, V•	RHG, ATC	30
310	N	63	R•, E•, Q•, K•, T•	VMG, CGC	30
352	K	41	A•, R•, D•, Q•, W•	GMM, CGC, TGG	42
408	Q	46	G•, K•, M•, P•, Y•	MHG, KRC	84
410	N	39	A•, Q•, K•, S•, T•	NCG, RAM	25

•Aminosäure wurde ausgewählt, da sie in einem Subset der 3DM-Datenbank, der nur Sequenzen von PQQ-ADHs enthielt, an dieser Position gehäuft vorkam.

•Aminosäure wurde ausgewählt, da sie in einem Subset der 3DM-Datenbank, der nur Sequenzen von extremophilen Organismen enthielt, an dieser Position gehäuft vorkam.

Aminosäurereste in PedE identifiziert. Da keine Kristallstruktur von PedE vorhanden war, wurden die B-Werte aus der Kristallstruktur von ExaA (Sequenz-Identität: 88 %; PDB-Code: 1FLG), der PQQ-ADH aus *P. aeruginosa* (Keitel et al., 2000), mithilfe der B-FIT-Anwendung berechnet (Reetz et al., 2006a). Unter Verwendung einer 3DM-Datenbank (Kuipers et al., 2010), bestehend aus über 12.000 Sequenzen von Proteinen mit struktureller Ähnlichkeit zu PedE, wurden anschließend die entsprechenden Positionen in PedE ermittelt. Von den Positionen mit den höchsten B-Werten, die mit der 3DM-Datenbank ermittelt werden konnten, wurden die Positionen R91, D307, N310, K352, E408 und N410 ausgewählt. Zur Erstellung von gerichteten Mutantenbibliotheken wurden die an diesen Positionen in Teilmengen der 3DM-Datenbank am häufigsten vorkommenden Aminosäuren verwendet. Hierzu wurde sowohl eine Teilmenge der 3DM-Datenbank in Betracht gezogen, welche nur aus PQQ-ADH-kodierenden Sequenzen bestand (1315 Sequenzen), als auch eine Teilmenge, die ausschließlich Sequenzen extremophiler Organismen enthielt (111 Sequenzen). Unter Verwendung der minimalen notwendigen Anzahl an degenerierten Codons konnten somit sechs Mutantenbibliotheken kreiert werden, welche aus je fünf bis zehn Varianten bestanden (**Tabelle 33**).

3.2.4 Durchsuchung der Mutantenbibliotheken und Identifizierung kombinatorischer Stabilitätsvarianten

Mehr als 200 Klone wurden mithilfe des in Abschnitt 2.4.5 beschriebenen Ganzzell-Aktivitätstests in Flüssigkulturen durchmustert. Dies garantierte mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit, dass jede Variante der sechs Mutantenbibliotheken mindestens einmal getestet wurde (Reetz et al., 2008). Nach drei aufeinanderfolgenden

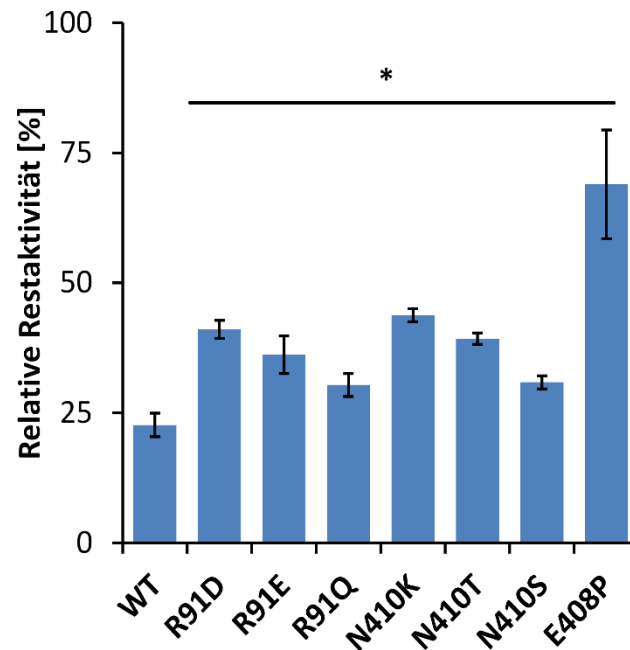


Abbildung 15: Relative Restaktivitäten der identifizierten Einzelmutanten nach einstündiger Inkubation bei 45°C. Die Restaktivität jedes Mutanten ist signifikant (*; $p < 0.01$) höher als die des Wildtyps. Daten repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit zugehörigem Standardfehler. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

Durchmusterungen mit steigender Selektionsstringenz (siehe Abschnitt 2.4.6) konnten sieben Varianten identifiziert werden, die eine signifikant verbesserte Thermostabilität (zweiseitiger t -Test, $\alpha = 0.05$, $N = 5$) nach einstündiger Inkubation bei 45°C aufwiesen (relative Restaktivität; **Abbildung 15**). Die Analyse der Proteinsequenzen zeigte, dass drei Varianten eine Mutation an Position R91 (D, Q, E) enthielten, weitere drei Varianten eine Mutation an Position N410 (K, S, T) aufwiesen und eine Variante eine Mutation an Position E408 (P) trug. Die Varianten mit der höchsten Thermostabilität an der jeweiligen Position waren PedE^{R91D}, PedE^{N410K} und PedE^{E408P} mit 41 ± 1.7 %, 44 ± 1.3 % bzw. 69 ± 10 % relativer Restaktivität. Im Vergleich dazu wies der PedE-Wildtyp nur eine Restaktivität von 23 ± 2.3 % auf. Auffallend war, dass sowohl die Variante PedE^{R91D} als auch PedE^{N410K} aus der Teilmenge der 3DM-Datenbank stammten, welche nur Sequenzen von extremophilen Organismen enthielt. Es ist anzumerken, dass aus den Mutantenbibliotheken an Position 307, 310 und 352 keine Varianten mit erhöhter Thermostabilität gefunden wurden.

Um die Thermostabilität weiter zu verbessern, wurden die Mutationen, die den größten stabilisierenden Effekt an den jeweiligen Positionen aufwiesen, miteinander

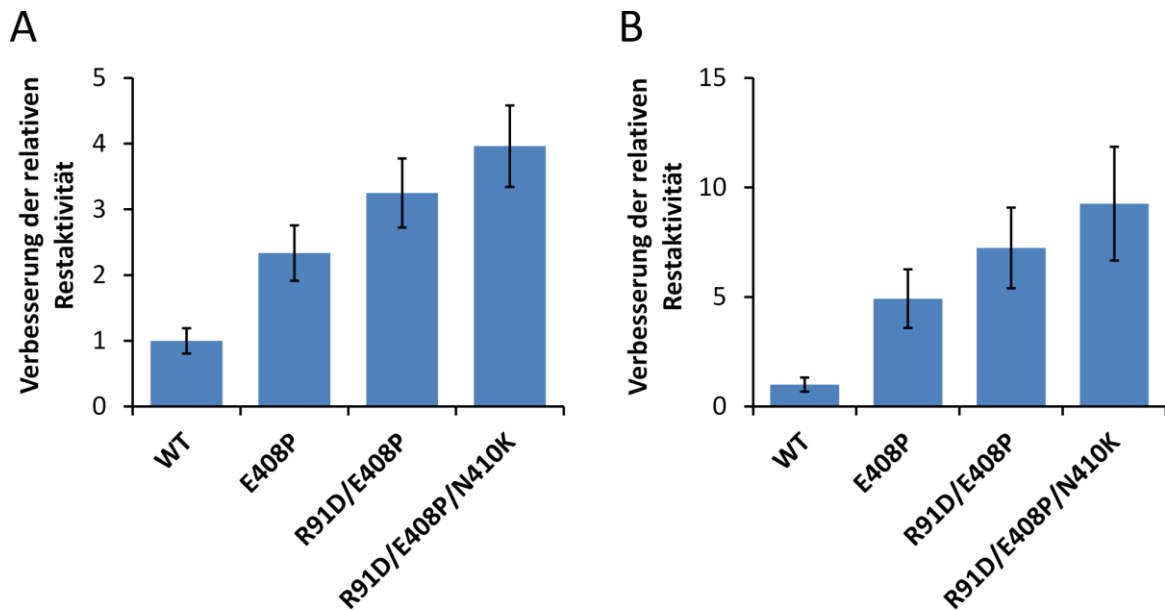


Abbildung 16: Verbesserung der relativen Restaktivität im Vergleich zum Wildtyp, gemessen mit dem *E. coli* BL21(DE3)-basierten Ganzzell-Aktivitätstest in Flüssigkulturen nach einstündiger Inkubation bei 45°C (A) oder gemessen mit aufgereinigten Proteinen nach einstündiger Inkubation bei 65°C (B). Balken stellen Mittelwerte von drei Messungen mit dazugehörigem Standardfehler dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

kombiniert. Ausgehend von PedE^{E408P} konnte im Ganzzellansatz gezeigt werden, dass jede zusätzliche Mutation die Thermostabilität weiter erhöht. Im Vergleich zu PedE^{E408P}, welche eine um 2.3 ± 0.4 -fach erhöhte relative Restaktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies, zeigte die Doppelmutante PedE^{R91D/E408P} eine 3.2 ± 0.5 -fach und die Dreifachmutante PedE^{R91D/E408P/N410K} gar eine 4.0 ± 0.6 -fach erhöhte relative Restaktivität nach einstündiger Inkubation bei 45°C im Vergleich zum Wildtyp (**Abbildung 16A**).

3.2.5 Charakterisierung der thermostabilen Varianten

Um die Ergebnisse aus dem Ganzzell-Aktivitätstest zu verifizieren, wurden der Wildtyp sowie PedE^{E408P}, PedE^{R91D/E408P} und PedE^{R91D/E408P/N410K} mithilfe einer einstufigen Affinitätschromatographie aufgereinigt (**Abbildung A 11**). Da mit den apo-Formen der Enzyme nach einstündiger Inkubation bei 45°C keine Restaktivität zeigten (**Abbildung A 12**), fanden alle darauffolgenden Experimente mit Enzymen statt, die davor mit PQQ und CaCl₂ rekonstituiert wurden. Wider Erwarten wies das rekonstituierte Wildtyp-Enzym nach einstündiger Inkubation bei 45°C eine drastisch höhere Restaktivität ($87 \pm 8\%$) im Vergleich zu dem im Ganzzelltest gemessenen Wert ($23 \pm 2\%$) auf. Nach Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 65°C wurde mit den

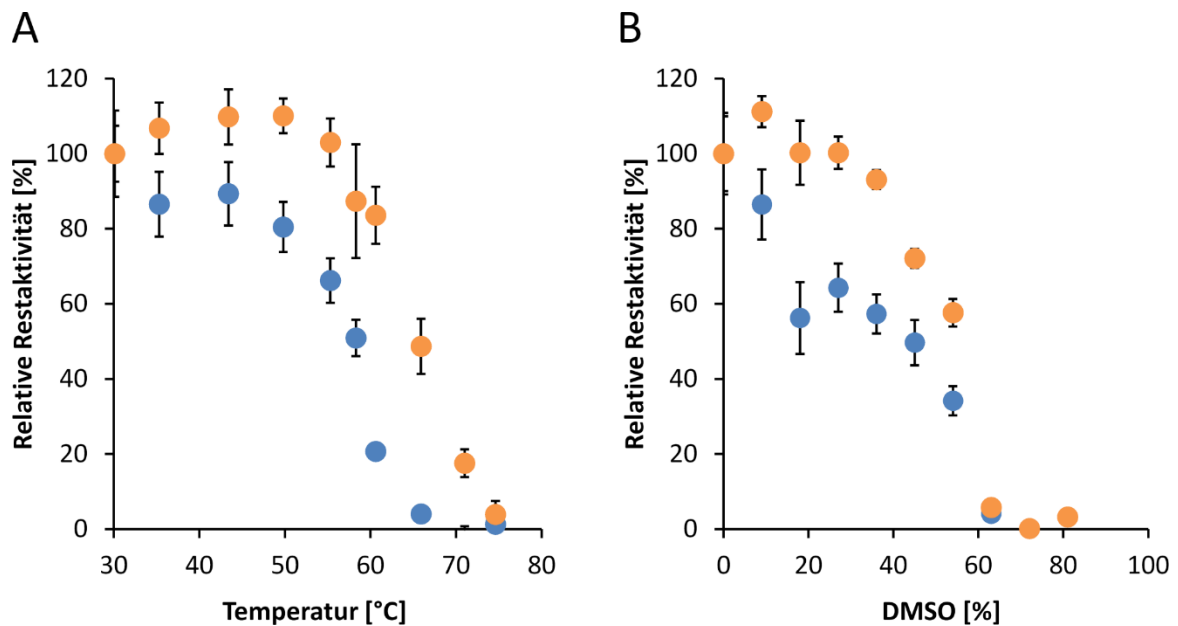


Abbildung 17: (A) Relative Restaktivitäten von aufgereinigtem PedE (blaue Punkte) und PedE^{R91D/E408P/N410K} (orangene Punkte) nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. (B) Relative Restaktivitäten von aufgereinigtem PedE (blaue Punkte) und PedE^{R91D/E408P/N410K} (orangene Punkte) nach einstündiger Inkubation in verschiedenen DMSO-Konzentrationen. Datenpunkte stellen Mittelwerte von drei Messungen mit dazugehörigem Standardfehler dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

aufgereinigten Enzymen jedoch ein ähnlicher Trend wie in den Ganzzelltests beobachtet. Die Einzelmutante PedE^{E408P} war 4.9 ± 1.3 -fach, die Doppelmutante PedE^{R91D/E408P} 7.2 ± 1.8 -fach und die Dreifachmutante PedE^{R91D/E408P/N410K} 9.3 ± 2.6 -fach stabiler als der Wildtyp unter diesen Bedingungen (**Abbildung 16B**). Auch der T_{50}^{60} -Wert, welcher die Temperatur darstellt, bei der nach einstündiger Inkubation die Restaktivität des Enzyms nur noch 50 % der Ausgangsaktivität entspricht, konnte mit Einführung der drei Mutationen R91D/E408P/N410K um 7°C gesteigert werden (**Abbildung 17A**). Abgesehen von der Erhöhung der Thermostabilität wurde auch eine erhöhte Lösungsmittelbeständigkeit gemessen. Die Variante PedE^{R91D/E408P/N410K} wies eine ungefähr doppelt so hohe Restaktivität nach einstündiger Inkubation in 20 – 50%-iger Lösung Dimethylsulfoxid (DMSO) im Vergleich zum Wildtyp auf (**Abbildung 17B**). Mit Lösungen, die einen DMSO-Anteil von ≥ 60 % enthielten, wurde weder mit dem Wildtyp noch mit der Variante PedE^{R91D/E408P/N410K} Restaktivität detektiert.

Abschließend wurden die kinetischen Parameter der stabilsten Variante PedE^{R91D/E408P/N410K} sowie des PedE-Wildtyps mit Ethanol bestimmt. Die maximale

Umsatzgeschwindigkeit des Wildtyps war signifikant höher als die der Dreifachmutante PedE^{R91D/E408P/N410K} (zweiseitiger *t*-Test, $\alpha = 0.05$, $N = 3$). Bei den Substrataffinitäten und der katalytischen Effizienz konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Enzymen festgestellt werden (**Abbildung 18**).

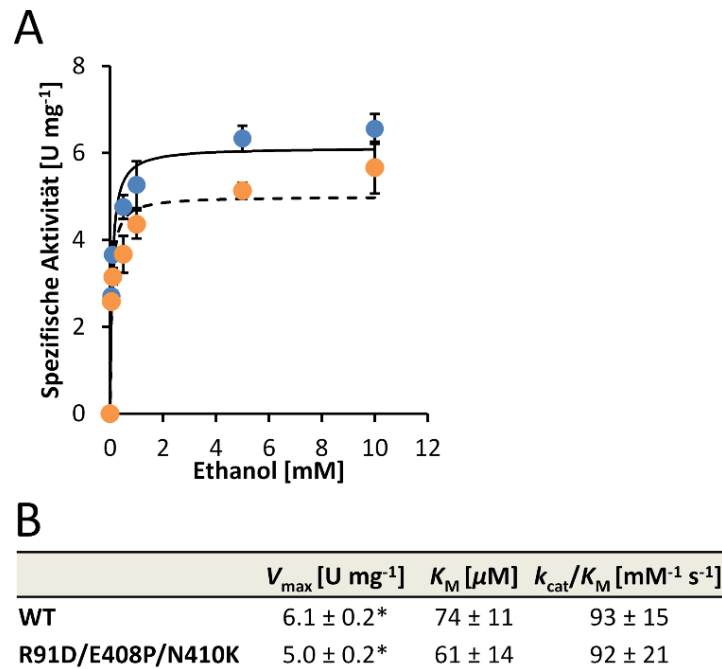


Abbildung 18: (A) Michaelis-Menten-Kurven zeigen die spezifischen Enzymaktivitäten von PedE (blaue Punkte) und PedE^{R91D/E408P/N410K} (orangene Punkte) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für Ethanol. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. (B) Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{\max}), die Substrataffinitäten (K_M) und die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M , wobei k_{cat} die Wechselzahl darstellt) wurden durch nichtlineare Regression der dargestellten Werte an das Michaelis-Menten-Modell bestimmt (durchgezogene Linie für PedE und gestrichelte Linie für PedE^{R91D/E408P/N410K}). Die abgeleiteten kinetischen Konstanten sind mit zugehörigem Standardfehler angegeben. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *t*-Test, $\alpha = 0.05$, $N = 3$) sind mit * markiert. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

3.3 Änderung der Metallcofaktor-Spezifität von PedE

Wie in Abschnitt 3.1 erwähnt, liegt der größte Unterschied zwischen den beiden PQQ-ADHs PedE und PedH in ihrer Metallcofaktor-Abhängigkeit. So benötigt PedE für katalytische Aktivität neben dem Redoxcofaktor PQQ auch noch ein Ca^{2+} -Ion als Metallcofaktor, das als Lewis-Säure dient. Im Gegensatz dazu konnte mit der PQQ-ADH PedH nur in Gegenwart von REEs enzymatische Aktivität gemessen werden. Mehrere Studien, einschließlich der Ergebnisse aus Abschnitt 3.1., lassen vermuten, dass für die Metallcofaktor-Abhängigkeit ein axialer, Metall-koordinierender Aminosäurerest in der aktiven Taschen verantwortlich ist (vergl. **Abbildung 11** in Abschnitt 3.1.). Während bei den charakterisierten REE-abhängigen Enzymen wie PedH (PQQ-ADH aus *P. putida*; siehe Abschnitt 3.1), ExaF (PQQ-ADH aus *M. extorquens* AM1) (Good et al., 2016) oder XoxF (PQQ-MDH in einer Vielzahl methylotropher Organismen) (Jahn et al., 2018; Pol et al., 2014) ein Aspartat-Rest die axiale Position einnimmt, ist in den PQQ-ADHs PedE aus *P. putida* (siehe Abschnitt 3.1) und ExaA aus *P. aeruginosa* (Keitel et al., 2000) an dieser Stelle ein Serin-Rest zu finden. Bei verschiedenen anderen Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADHs bzw. PQQ-MDHs kann man an dieser Position auch ein Alanin (z.B. MxaFI aus *M. extorquens* AM1 oder PPQ-MDH aus *Paraccocus denitrificans*) (Williams et al., 2005; Xia et al., 2003) oder Threonin (z.B. PQQ-ADHs aus *P. putida* HK5) (Chen et al., 2002; Toyama et al., 2005) antreffen. Um zu überprüfen, ob die Metallcofaktor-Abhängigkeit einzig über den axialen, Metall-koordinierenden Aminosäurerest (Position 295 in PedE und PedH nach 3DM-Schema) bestimmt wird, wurden die Varianten PedE^{S295D} sowie PedH^{D295A}, PedH^{D295S} und PedH^{D295T} konstruiert. Diese wurden daraufhin gemäß dem in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Protokoll aufgereinigt (**Abbildung A 13**) und hinsichtlich ihre Metallcofaktor-Spezifität überprüft. Dazu wurden die spezifischen Enzymaktivitäten mit dem Modells substrat Ethanol in Gegenwart verschiedener REEs sowie Ca^{2+} bestimmt. Hierbei konnte für die Variante PedE^{S295D} Enzymaktivität mit allen getesteten REEs außer Sc^{3+} detektiert werden (**Abbildung 19A**). Im Gegensatz dazu wurde mit Ca^{2+} keine Enzymaktivität festgestellt. Beachtenswert ist, dass der Unterschied zwischen der höchsten gemessenen Enzymaktivität ($0.61 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$ mit Yb^{3+}) und der niedrigsten Enzymaktivität ($0.41 \pm 0.04 \text{ U mg}^{-1}$ mit Nd^{3+}) weniger

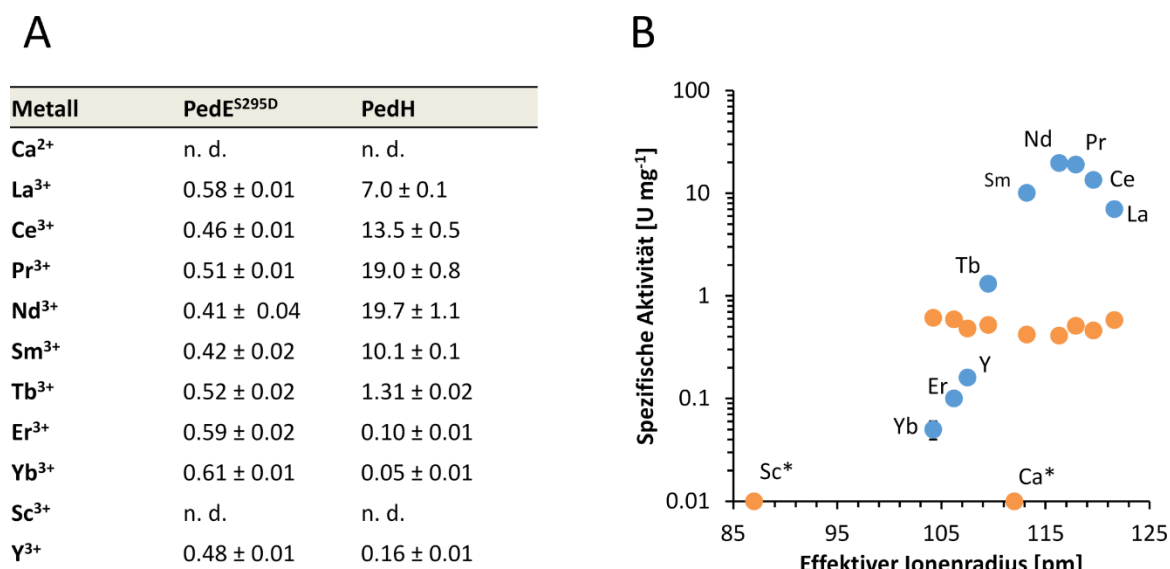


Abbildung 19: (A) Spezifische Aktivität von PedE^{S295D} und PedH (selber Datensatz wie in Abbildung 12 verwendet) mit Ca²⁺ (500 μ M) oder verschiedenen REEs (1 μ M) als Metallcofaktor mit dem Modellsubstrat Ethanol (10 mM). (B) Spezifische Aktivitäten aus (A) aufgetragen gegen die effektiven Ionenradien (Koordinationszahl (KZ) = 9 für alle REEs außer Sc und Ca (KZ = 8)) der Metallionen (2+ für Ca und 3+ für REEs) nach Shannon, 1976. Spezifische Aktivitäten sind Mittelwerte aus drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Aktivitäten unter dem Detektionslimit sind mit n. d. (A) oder * (B) markiert.

als 50 % betrug. Im Kontrast dazu war bei PedH die spezifische Aktivität mit dem katalytisch aktivsten Seltenerdmetall (19.7 ± 1.1 U mg⁻¹ mit Nd³⁺) um mehr als 390-fach höher als mit dem am wenigsten aktiven Seltenerdmetall (0.05 ± 0.01 U mg⁻¹ mit Yb³⁺). Auffallend war, dass die Variante PedE^{S295D} mit den schweren REEs Er³⁺ und Yb³⁺ sowie mit dem nicht-lanthanidischen REE Y³⁺ höhere spezifische Enzymaktivitäten aufwies als das PedH-Enzym. Nach Auftragen der spezifischen Enzymaktivitäten gegen die jeweiligen effektiven Ionenradien (Shannon, 1976) fiel auf, dass die Aktivitäten von PedH sich proportional zu den Ionenradien verhalten und ein Maximum zwischen 113 und 123 pm existiert (**Abbildung 19B**). Dies war bei der Variante PedE^{S295D} nicht der Fall. Hier waren die Aktivitäten mit allen Metallen, unabhängig vom Ionenradius, in einem ähnlichen Bereich. Es ist deshalb auch davon auszugehen, dass aufgrund des deutlich niedrigeren Ionenradius von Sc³⁺ keine Enzymaktivitäten mit diesem Seltenerdmetall detektiert wurden.

Um weitere Hinweise auf die Ursachen für die großen Unterschiede bei den Enzymaktivitäten zu erhalten, wurden die Dissoziationskonstanten von PedH und PedE^{S295D} mit dem leichten Lanthanid La³⁺, dem schweren Lanthanid Yb³⁺ sowie mit

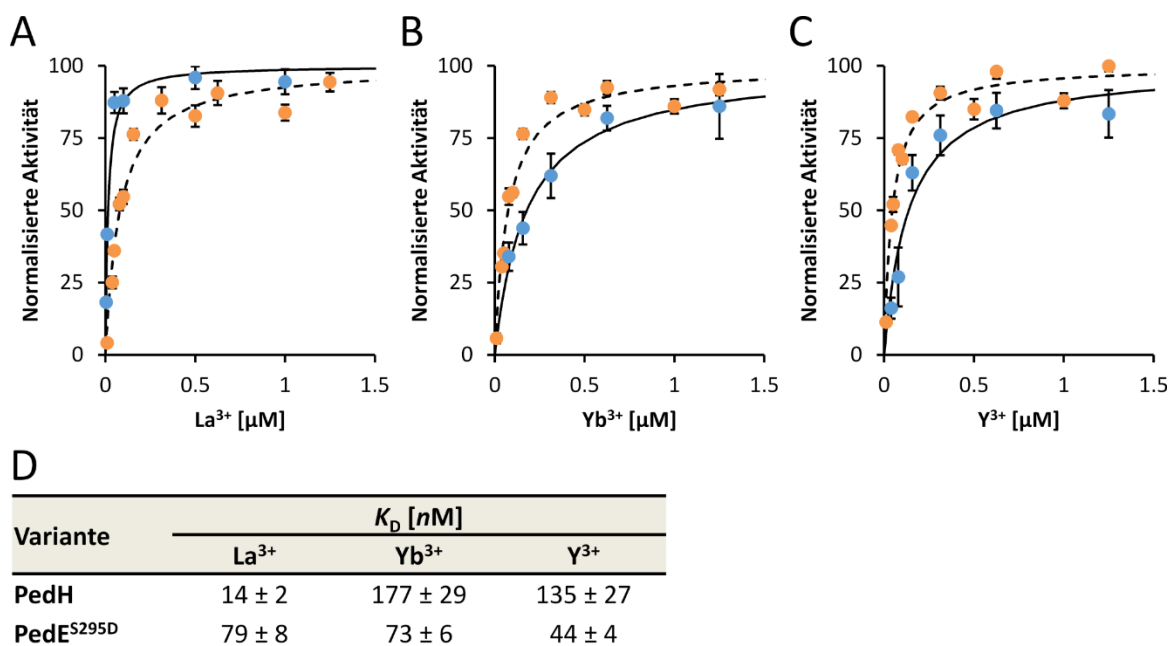


Abbildung 20: (A bis C) Normalisierte spezifische Enzymaktivitäten von PedH (blaue Punkte) und PedE^{S295D} (orangene Punkte) in Abhängigkeit von der La³⁺- (A), Yb³⁺- (B) und Y³⁺-Konzentration (C) mit 10 mM Ethanol als Substrat. Enzymaktivitäten wurden auf die ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die jeweilige Enzym-Metall-Kombination normalisiert. (D) Dissoziationskonstanten (K_D) wurden durch nichtlineare Regression der dargestellten Werte an ein Bindemodell mit einer Bindestelle pro Metallion ermittelt. Datenpunkte stellen Mittelwerte von drei Messungen mit dazugehörigem Standardfehler dar.

dem nicht-lanthanidischen REE Y³⁺ bestimmt (**Abbildung 20**). Die höchste Affinität wurde für das Paar PedH/La³⁺ (K_D = 14 ± 2 nM) ermittelt. Im Gegensatz dazu war die Affinität von PedH für Yb³⁺ (K_D = 177 ± 29 nM) und Y³⁺ (K_D = 135 ± 32 nM) ca. 10-fach niedriger. Die Affinitäten von PedE^{S295D} für La³⁺ (K_D = 79 ± 8 nM), Yb³⁺ (K_D = 73 ± 6 nM) und Y³⁺ (K_D = 44 ± 4 nM) waren zwar niedriger als die des Paares PedH/La³⁺, jedoch deutlich höher als die Affinitäten von PedH für Yb³⁺ oder Y³⁺. Dies entspricht auch den spezifischen Aktivitäten, welche mit den jeweiligen Enzym/REE-Paaren gemessen wurden. Somit konnte in Form von PedE^{S295D} durch einfache Aminosäuresubstitution ein Enzym generiert werden, das höhere Enzymaktivitäten mit den REEs Yb³⁺ und Y³⁺ und auch deutlich höhere Affinitäten für diese beiden Seltenerdmetalle aufweist als das natürlich vorkommende REE-abhängige Enzym PedH.

Zusätzlich wurden die kinetischen Konstanten mit PedH und PedE^{S295D} in Gegenwart von 1 μM La³⁺ mit dem Substrat Ethanol bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass das PedH-Enzym nicht nur eine deutlich höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit besitzt (V_{max} = 6.4 ± 0.1 vs. 0.62 ± 0.02 U mg⁻¹), sondern, im Einklang mit den jeweiligen

Metallaffinitäten, auch eine deutlich höhere Substrataffinität ($K_M = 20.1 \pm 1.8$ vs. 363 ± 48) und eine mehr als 100-fach höhere katalytische Effizienz ($k_{cat}/K_M = 350 \pm 32$ vs. 1.9 ± 0.3) aufweist (**Abbildung 21**).

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Umwandlung einer Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADH in eine REE-abhängige PQQ-ADH konnte die umgekehrte Umwandlung von REE- zu Ca^{2+} -Abhängigkeit durch eine einfache Mutation an Position 295 in PedH nicht erreicht werden. Weder mit PedH^{D295A} noch mit PedH^{D295S} oder PedH^{D295T} konnten Enzymaktivitäten mit Ca^{2+} detektiert werden (keine Abbildung).

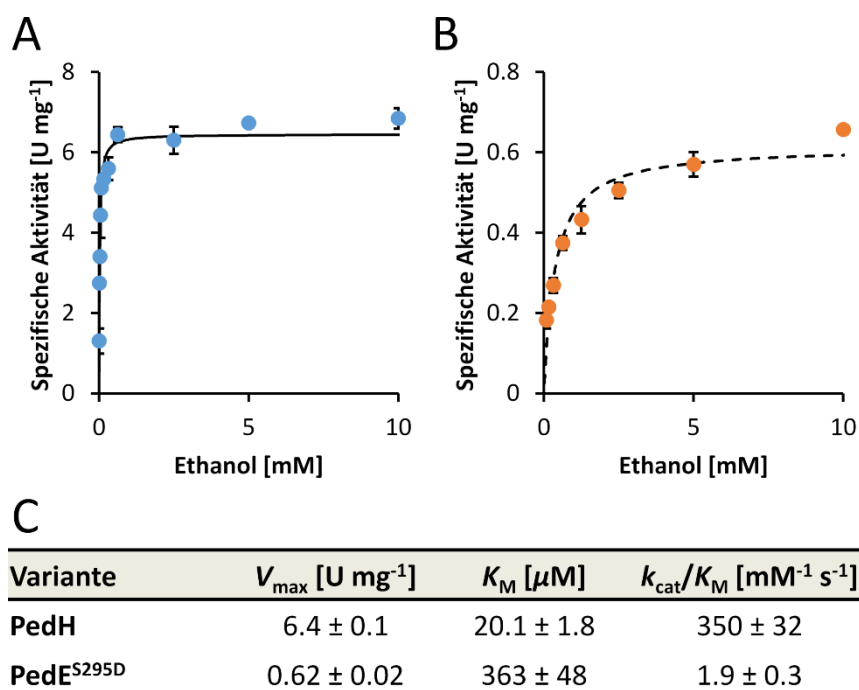


Abbildung 21: (A und B) Michaelis-Menten-Kurven zeigen die spezifischen Enzymaktivitäten von PedH (A, blaue Punkte) und PedE^{S295D} (B, orangene Punkte) in Abhängigkeit von der Ethanol-Konzentration mit $1 \mu\text{M}$ La^{3+} als Metallcofaktor. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. (C) Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}), die Substrataffinitäten (K_M) und die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M , wobei k_{cat} die Wechselzahl darstellt) wurden durch nichtlineare Regression der dargestellten Werte an das Michaelis-Menten-Modell bestimmt (durchgezogene Linie für PedH und gestrichelte Linie für PedE^{S295D}). Die abgeleiteten kinetischen Konstanten sind mit zugehörigem Standardfehler angegeben

3.4 Entwicklung einer PQQ-ADH für die Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA)

2,5-Furandicarbonsäure (FDCA) und Glyoxylsäure stellen zwei Chemikalien von hohem industriellen Interesse dar, welche mit Hilfe von *P. putida* als Ganzzell-Katalysator aus 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) bzw. Ethylenglycol synthetisiert werden können (Hsu et al., 2020; Koopman et al., 2010a; Mückschel et al., 2012). Den entscheidenden Schritt in der biokatalytischen Produktion beider Chemikalien stellt die Oxidation der Hydroxycarbonsäuren Glycolsäure bzw. 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) zum jeweiligen Säurealdehyd Glyoxylsäure bzw. 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA) dar (**Abbildung 22**). Dieser Oxidationsschritt wird in den jeweiligen *P. putida*-Stämmen von Oxidasen im Cytoplasma katalysiert (Mückschel et al., 2012; Wierckx et al., 2015). Die mit der Verwendung von Oxidasen einhergehende Abhängigkeit von equimolaren Mengen an molekularem Sauerstoff als Co-Substrat sowie die gleichzeitige Produktion von Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt können sich jedoch, besonders in Ganzzellverfahren, negativ auf die Ausbeute auswirken (Baldwin and Woodley, 2006; Linley et al., 2012). Außerdem erfordert die cytoplasmatische Lage der Oxidasen den Transport des Edukts bzw. des Produkts über die cytoplasmatische Membran und kann gleichzeitig zur Akkumulation toxischer Aldehyde im Cytoplasma führen (Heer and Sauer, 2008; Wierckx et al., 2015).

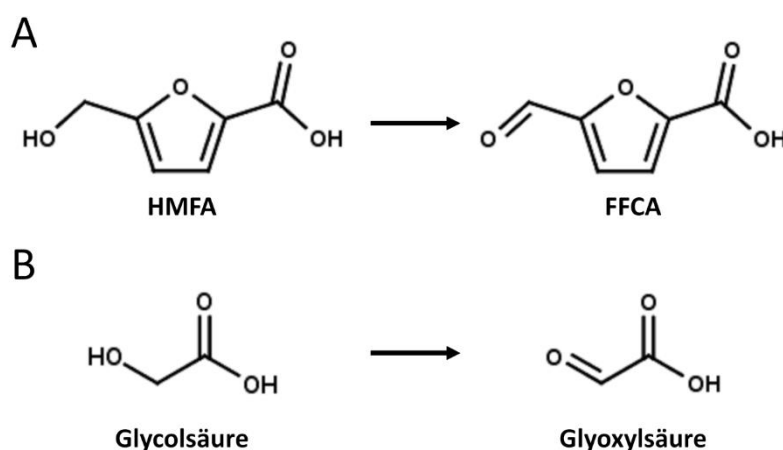


Abbildung 22: Schematische Darstellung der gesuchten Reaktionen. (A) Umsetzung von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA). (B) Umsetzung von Glycolsäure zu Glyoxylsäure.

Im Gegensatz dazu sind PQQ-ADHs im Periplasma aktiv, was sowohl Substrat- bzw. Produkttransportschritte entbehrlich macht als auch zur extrazellulären Akkumulation potentiell toxischer Reaktionsprodukte führt (Toyama et al., 2004). PQQ-ADHs übertragen die Elektronen aus der Oxidationsreaktion mithilfe der Atmungskette des Organismus auf molekularen Sauerstoff, was nicht nur die Oxidation von zwei Substratmolekülen pro Sauerstoffmolekül erlaubt, sondern auch elektrochemische Energie in Form eines Protonengradienten generiert (García-Horsman et al., 1994; Goodwin and Anthony, 1998). Ein periplasmatischer Oxidationsweg in *P. putida*, basierend auf PQQ-ADHs, könnte folglich für die Produktion von FDCA aus HMF bzw. von Glyoxylsäure aus Ethylenglycol von großem Nutzen sein. Da die nativen PQQ-ADHs aus *P. putida* (PedE und PedH) keine Aktivität mit HMFA oder Glycolsäure im kolorimetrischen Aktivitätstest aufwiesen (siehe Abschnitt 3.1.1), wäre der entscheidende Schritt hin zu solch einem periplasmatischen Oxidationsweg die Entwicklung von PQQ-ADHs, welche die Oxidationsschritte von HMFA zu FFCA bzw. von Glycolsäure zu Glyoxylsäure katalysieren. Deshalb wurde angestrebt ausgehend von PedH PQQ-ADHs zu entwickeln, welche die Oxidation dieser Hydroxycarbonsäuren zu den jeweiligen Säurealdehyden katalysieren. Hierzu wurden in einem ersten Schritt alle Aminosäurepositionen, die Teil der aktiven Tasche sind oder sich im Bereich des Substratzugangs befinden, eingehend analysiert. Darauf basierend wurden kombinatorische Mutantenbibliotheken generiert, in denen jeweils zwei Aminosäurereste gleichzeitig variiert wurden. Um das Generieren inaktiver Varianten zu vermeiden, wurden Aminosäurereste, die direkt am katalytischen Mechanismus beteiligt sind (Oubrie and Dijkstra, 2000), nicht für die Mutantenbibliotheken berücksichtigt. Eine 3DM-Datenbank, bestehend aus mehr als 1300 PQQ-ADHs mit struktureller Ähnlichkeit zu PedH, wurde anschließend verwendet, um die vielversprechendsten Kombinationen von Positionen zu identifizieren (Kuipers et al., 2010). Dazu wurden die Varianzen der Aminosäurereste an der jeweiligen Position sowie die Korrelationswerte der Positionen zueinander mithilfe der 3DM-Datenbank ermittelt (**Tabelle A 3**). Die Varianz stellt hierbei das relative Vorkommen einer bestimmten Aminosäure an der jeweiligen Position dar. Über den Korrelationswert können Aminosäurepositionen identifiziert werden, die mit einer bestimmten Position coevolvierten und somit für kombinatorische Mutantenbibliotheken von

Bibliothek	Position
1	A517 + W521
2	F375 + W521
3	F375 + A517
4	L417 + W521
5	F375 + L417
6	F421 + W521
7	F375 + F421
8	I423 + F375
9	I423 + L417
10	I423 + F421
11	I423 + A517
12	I423 + W521

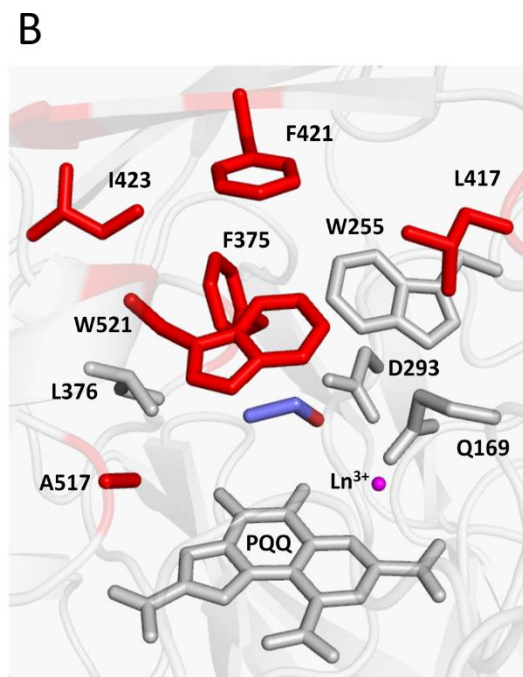


Abbildung 23: (A) Übersicht über die Zusammensetzung der zwölf Mutantenbibliotheken. Jede Position wurde mit dem NNK-Codon randomisiert. (B) Schematische Darstellung der aktiven Tasche von PedH basierend auf einem Homologiemodell, erzeugt mit der Kristallstruktur von ExaA aus *P. aeruginosa* als Templat. Seitenketten von Positionen, die zur Randomisierung ausgewählt wurden, sind in rot eingefärbt. Grau dargestellt sind der PQQ-Cofaktor und Positionen, welche Teil der aktiven Tasche sind aber nicht für die Mutantenbibliotheken verwendet wurden. Der Ln^{3+} -Cofaktor ist in magenta dargestellt. Ein Ethanolmolekül, das als Modellsubstrat durch Docking (Autodock) in der aktiven Tasche platziert wurde, ist zur Orientierung in blau (Kohlenstoffatome) und rot (Sauerstoffatome) dargestellt.

besonderem Nutzen sein können (Kuipers et al., 2009). Aufgrund ihrer zentralen Position in der aktiven Tasche (Position 521) beziehungsweise ihrer großen Anzahl an hohen Korrelationswerten zu den anderen untersuchten Positionen (Position 375 und 423) wurden die Positionen 375, 423 und 521 als Ankerpunkte für die Mutantenbibliotheken festgelegt (**Abbildung 23B**). Die Positionen 255 und 376 hingegen wurden wegen ihrer niedrigen Varianz (Position 255; > 86% W) beziehungsweise ihrer niedrigen Korrelationswerte (Position 255 und 376) nicht in die Mutantenbibliotheken berücksichtigt. Die sich daraus ergebenden zwölf kombinatorischen Mutantenbibliotheken sind in **Abbildung 23A** aufgelistet. Nach deren Synthese durch einen externen Dienstleister (Synbio Technologies, Monmouth Junction, USA) wurden diese mittels Assemblierungsreaktion in den induzierbaren Expressionsvektor pJEM1 eingebracht und in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Um mit 80%-iger Wahrscheinlichkeit garantieren zu können, dass jede Variante mindestens einmal untersucht wurde, mussten pro Mutantenbibliothek und zu

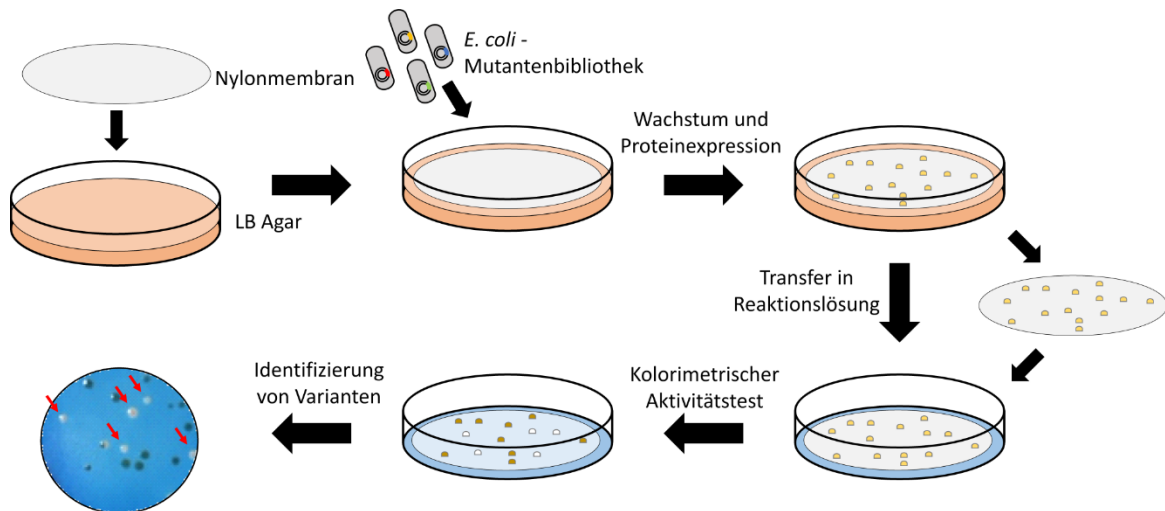


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Solid-Phase-Aktivitätstests. Eine Nylonmembran wird auf eine LB-Agarplatte mit Selektionsmarker gelegt und inokuliert mit *E. coli* Zellen, welche die Mutantenbibliotheken exprimieren. Nach Wachstum und Proteinexpression wird die Membran in Reaktionslösung zur kolorimetrischen Aktivitätsbestimmung inkubiert. Kolonien, die Mutanten produzieren, welche eine Aktivität mit dem getesteten Substrat aufweisen, können durch helle Färbung identifiziert werden. Dies ist in Ausschnitt links unten exemplarisch mit dem Substrat Ethanol und Kolonien, die PedH (rote Pfeile, helle Kolonien) oder eGFP (dunkle Kolonien) produzieren dargestellt. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020b).

untersuchendem Substrat je 1978 Klone ($32 \text{ [NNK]} \times 32 \text{ [NNK]} \times 1.2 \text{ [Korrektur für Leervektoren nach Assemblierungsreaktion]} \times 1.61 \text{ [Oversampling-Faktor]}$) durchmustert werden (Reetz et al., 2008). Da dies mit dem in Abschnitt 2.4.5 beschriebenen Ganzzell-Aktivitätstest in Flüssigkulturen einen enormen zeitlichen Aufwand dargestellt hätte, wurde ein Solid-Phase-Aktivitätstest entwickelt (Bendz, 2017), der die Durchmusterung von mehreren Tausend Klonen in wenigen Tagen ermöglichte (**Abbildung 24**). Dazu wurden die Mutantenbibliotheken mit einer Dichte von je 200 – 400 Klonen pro Membran auf Nylonmembranen ausplattiert und zum Wachstum für 48 h auf LB-Agarplatten inkubiert. Nach Induktion der Proteinproduktion wurden die Membranen zur Aktivitätsbestimmung in einem Reaktionspuffer des kolorimetrischen Enzymaktivitätstests inkubiert. Klone, die Enzymvarianten produzierten, welche Aktivität mit dem getesteten Substrat aufwiesen, konnten durch einen Farbumschlag von blau zu weiß um die jeweilige Kolonie identifiziert werden (siehe Abschnitt 2.4.8). In **Abbildung 24** (links unten) ist dies mit Klonen, die entweder eGFP (dunkle Kolonien) oder PedH (helle Kolonien) produzieren, und dem Substrat Ethanol exemplarisch dargestellt.

Tabelle 34: Spezifische Enzymaktivitäten von aufgereinigtem PedH, PedH^{F375I/W521S}, PedH^{F375V/W521A} und PedH^{F375I/W521Q} mit 10 mM HMFA. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020b)

Variante	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]*
PedH	n. d.
PedH ^{F375I/W521S}	0.12 ± 0.02
PedH ^{F375I/W521Q}	0.35 ± 0.01
PedH ^{F375V/W521A}	1.23 ± 0.07

*Daten sind Mittelwerte von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Aktivitäten unter dem Detektionslimit sind mit n. d. angegeben.

Insgesamt wurden mit diesem Verfahren mehr als je 30 000 Klone pro Substrat durchmustert (siehe Abschnitt 2.4.9). Hierbei wurden 27 Kolonien identifiziert, Aktivität mit Glycolsäure zeigten und 15 Kolonien, welche Aktivität mit HMFA aufwiesen. Nach einer zweiten Evaluierungsrunde im Triplikate und anschließender Sequenzverifizierung wurden die drei Varianten PedH^{F375I/W521S}, PedH^{F375V/W521A} und PedH^{F375I/W521Q} identifiziert, die eine erhöhte Aktivität mit HMFA aufwiesen. Außerdem wurde Variante PedH^{F375V/I423A} identifiziert, der eine potentielle Aktivität mit Glycolsäure zugeschrieben wurde. Es ist beachtenswert, dass die Varianten PedH^{F375I/W521S}, PedH^{F375V/W521A} und PedH^{F375I/W521Q} alle derselben Mutantenbibliothek PedH^{F375N/W521N} entstammten. Um Host-spezifische Effekte auszuschließen, wurden für die letzte Evaluierungsrunde die identifizierten Varianten in *E. coli* BL21(DE3)-Flüssigkulturen produziert und mittels Affinitätschromatographie, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, aufgereinigt (**Abbildung A 14**). Anschließend wurden deren Enzymaktivitäten mithilfe des in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen kolorimetrischen Aktivitätstests bestimmt. Die im Solid-Phase-Assay detektierte Aktivität von Variante PedH^{F375V/I423A} mit Glycolsäure konnte mit aufgereinigtem Enzym nicht bestätigt werden (keine Abbildung). Die HMFA-Aktivität der drei Varianten PedH^{F375I/W521S}, PedH^{F375V/W521A} und PedH^{F375I/W521Q} hingegen konnte mit aufgereinigtem Enzym verifiziert werden (**Tabelle 34**). Für das PedH-Wildtyp-Enzym konnte erneut keine Aktivität mit HMFA und Glycolsäure detektiert werden. Variante PedH^{F375I/W521S} wies eine spezifische Aktivität von 0.12 ± 0.02 U mg⁻¹ auf und mit PedH^{F375I/W521Q} konnte eine im Vergleich dazu ca. dreifach höhere spezifische Aktivität von 0.35 ± 0.01 U mg⁻¹ detektiert werden. Da PedH^{F375V/W521A} die mit Abstand höchste spezifische Aktivität mit HMFA aufwies (1.23 ± 0.07 U mg⁻¹), wurde diese Variante anschließend genauer charakterisiert. Dazu wurden die kinetischen Konstanten sowohl mit dem

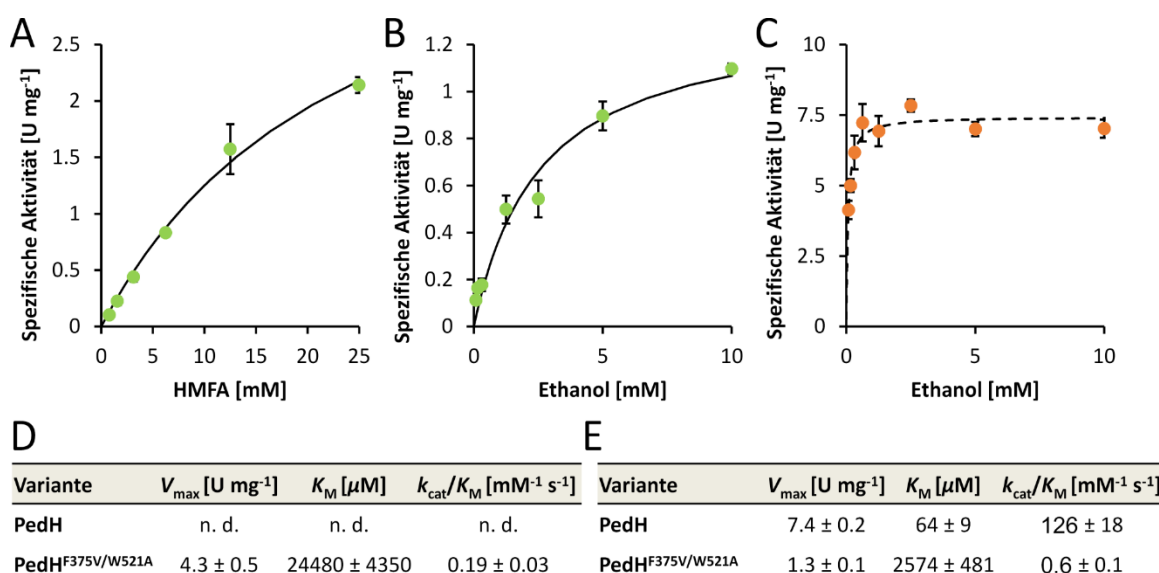


Abbildung 25: (A bis C) Michaelis-Menten-Kurve zeigt die spezifischen Enzymaktivitäten von PedH^{F375V/W521A} (A und B, grüne Punkte) und PedH (C, orangene Punkte) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für HMFA* (A) und Ethanol (B und C) in Gegenwart von 5 μM Pr³⁺ und 5 μM PQQ. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{\max}), die Substrataffinitäten (K_M) und die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M , wobei k_{cat} die Wechselzahl darstellt) mit HMFA (D) und Ethanol (E) wurden durch nichtlineare Regression der in A bis C dargestellten Werte an das Michaelis-Menten-Modell bestimmt (durchgezogene Linie für PedH^{F375V/W521A} und gestrichelte Linie für PedH). Die abgeleiteten kinetischen Konstanten sind mit zugehörigem Standardfehler angegeben. Da keine Aktivität für PedH mit HMFA detektiert wurde, konnten hier auch keine kinetischen Konstanten ermittelt werden (n. d.). *Gelöst in DMSO.

Modellsubstrat Ethanol als auch mit HMFA bestimmt (**Abbildung 25**). Aufgrund der verwendeten hohen HMFA-Konzentrationen wurde für dieses Substrat die Pufferkonzentration während der Aktivitätsmessungen von 100 mM auf 250 mM erhöht. Da jedoch trotz dieser Maßnahme der kolorimetrische Enzymaktivitätstest mit HMFA-Konzentrationen > 25 mM nicht zuverlässig funktionierte, wurden nur Werte, die mit maximal 25 mM HMFA ermittelt wurden, zur Berechnung der kinetischen Konstanten verwendet. Während mit dem PedH-Wildtyp erneut keine Aktivität mit HMFA detektiert werden konnte, wurden mit PedH^{F375V/W521A} eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) von 4.3 ± 0.5 U mg⁻¹ gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit von PedH^{F375V/W521A} mit HMFA war somit mehr als dreifach höher im Vergleich zur Reaktionsgeschwindigkeit, welche mit Ethanol als Substrat detektiert wurde (1.3 ± 0.1 U mg⁻¹). Die Substrataffinität (K_M) mit HMFA war jedoch im Vergleich zu Ethanol ca. zehnfach niedriger und auch die katalytische Effizienz mit HMFA fiel deutlich geringer aus als diese mit Ethanol (k_{cat}/K_M ; 0.19 ± 0.03 vs.

Tabelle 35: Biotransformationen von 10 mM HMFA mit aufgereinigten Enzymen^a. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020b)

Zeit [h]	FFCA [mM]		
	Kontrolle	PedH	PedH ^{F375V/W521A}
0	n. d.	n. d.	0.31 ± 0.01
1	n. d.	n. d.	1.20 ± 0.03
24	n. d.	n. d.	2.24 ± 0.15

^aBiotransformationen wurden in Gegenwart des Elektronenmediators PMS und des terminalen Elektronenakzeptors DCPIP durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte ohne Zugabe von aufgereinigtem Protein. Daten sind der Mittelwert von zwei individuellen Messungen mit dazugehöriger Varianz. Proben, in denen kein FFCA detektiert werden konnte, sind mit n. d. angegeben.

$0.6 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Im Vergleich zum K_M -Wert des PedH-Wildtyps mit Ethanol ($64 \pm 9 \mu\text{M}$) war der K_M -Wert der Variante PedH^{F375V/W521A} mit Ethanol bzw. HMFA ca. 40- bzw. 400-fach höher. Daraus lässt sich folgern, dass dies die Ursache für die insgesamt niedrigere katalytische Effizienz von PedH^{F375V/W521A} ist. Um das Reaktionsprodukt sowie den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu bestimmen, wurden Biotransformationen von HMFA mit aufgereinigtem Enzym in Gegenwart des Elektronenmediators PMS sowie des terminalen Elektronenakzeptors DCPIP durchgeführt (**Tabelle 35**). Dabei zeigte sich, dass in Umsetzungen mit PedH^{F375V/W521A} einzig FFCA aus HMFA gebildet wurde. Nach 1 h wurden 1.2 mM und nach 24 h 2.1 mM FFCA ausgehend 10 mM HMFA detektiert. Bei Kontrollexperimenten unter gleichen Bedingungen ohne Enzym oder mit dem PedH-Wildtyp-Enzym konnte kein FFCA gefunden werden, womit die Ergebnisse aus den kolorimetrischen Aktivitätstests bestätigt wurden.

3.5 Physiologische Rolle der PQQ-ADHs PedE und PedH

Aufgrund seiner hohen metabolischen Vielfältigkeit sowie seiner Fähigkeit extremen Umweltbedingungen zu widerstehen, ist *Pseudomonas putida* nicht nur als *Chassis* für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse, sondern kann auch unter den vielfältigen Umweltbedingungen der Rhizosphäre gedeihen (Koopman et al., 2010a; Molina et al., 2019; Nikel et al., 2016; Quesada et al., 2016; Wierckx et al., 2015). In der Rhizosphäre ist *P. putida* einer Vielzahl an pflanzlich, pilzlich und bakteriell produzierten, volatilen alkoholischen Kohlenstoffverbindungen (alkoholische VOCs) ausgesetzt (Bitas et al., 2013; Insam and Seewald, 2010). Auch in biotechnologischen Prozessen, wie der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Herstellung von FDCA, spielen Alkohole und Aldehyde eine wichtige Rolle, sowohl als Edukte und Zwischenprodukte als auch als Kohlenstoffquelle (Wierckx et al., 2015). Welche Rolle die zwei PQQ-ADHs PedE und PedH in der Oxidation von alkoholischen Kohlenstoffverbindungen spielen und wie sich dies auf die Physiologie von *P. putida* auswirkt, ist somit nicht nur von grundlegendem Interesse, sondern könnte auch entscheidende Auswirkungen auf biotechnologische Anwendungen haben – und wurde deshalb in den folgenden Abschnitten eingehend untersucht.

3.5.1 Lanthanide beeinflussen das Wachstum von *P. putida* KT2440 auf verschiedenen volatilen Alkoholverbindungen.

Um die physiologische Rolle von PedE und PedH genauer zu untersuchen, wurde als erster Schritt das Wachstum mehrerer Einfach- ($\Delta pedE$, $\Delta pedH$ und Δpqq) und Mehrfachdeletionsstämme ($\Delta pedE \Delta pedH$ und Δpqq) mit verschiedenen alkoholischen VOCs auf Agarplatten in Gegenwart und in Abwesenheit von $20 \mu\text{M La}^{3+}$ getestet (**Abbildung 26A**). In Abwesenheit von La^{3+} zeigten die Stämme KT2440, KT2440* (Δupp -Stamm, welcher als Ausgangsstamm für die Deletionsstämme diente) und $\Delta pedH$ effizientes Wachstum auf Ethanol, 1-Butanol, 1-Octanol und 2-Phenylethanol. Unter denselben Bedingungen konnte für Stamm $\Delta pedE$ kein Wachstum registriert werden. Auffallend war, dass die Zugabe von La^{3+} nicht nur zu Wachstum des $\Delta pedE$ -Deletionsstamms führte, sondern auch das Wachstum des Stamms $\Delta pedH$ während der 48-stündigen Inkubationszeit unterdrückte. Sowohl der $\Delta pedE \Delta pedH$ -Doppeldeletionsstamm als auch der Δpqq -Stamm, in welchem das für die PQQ-Synthese verantwortliche Gencluster *pqqABCDE* deletiert ist, wuchsen unter

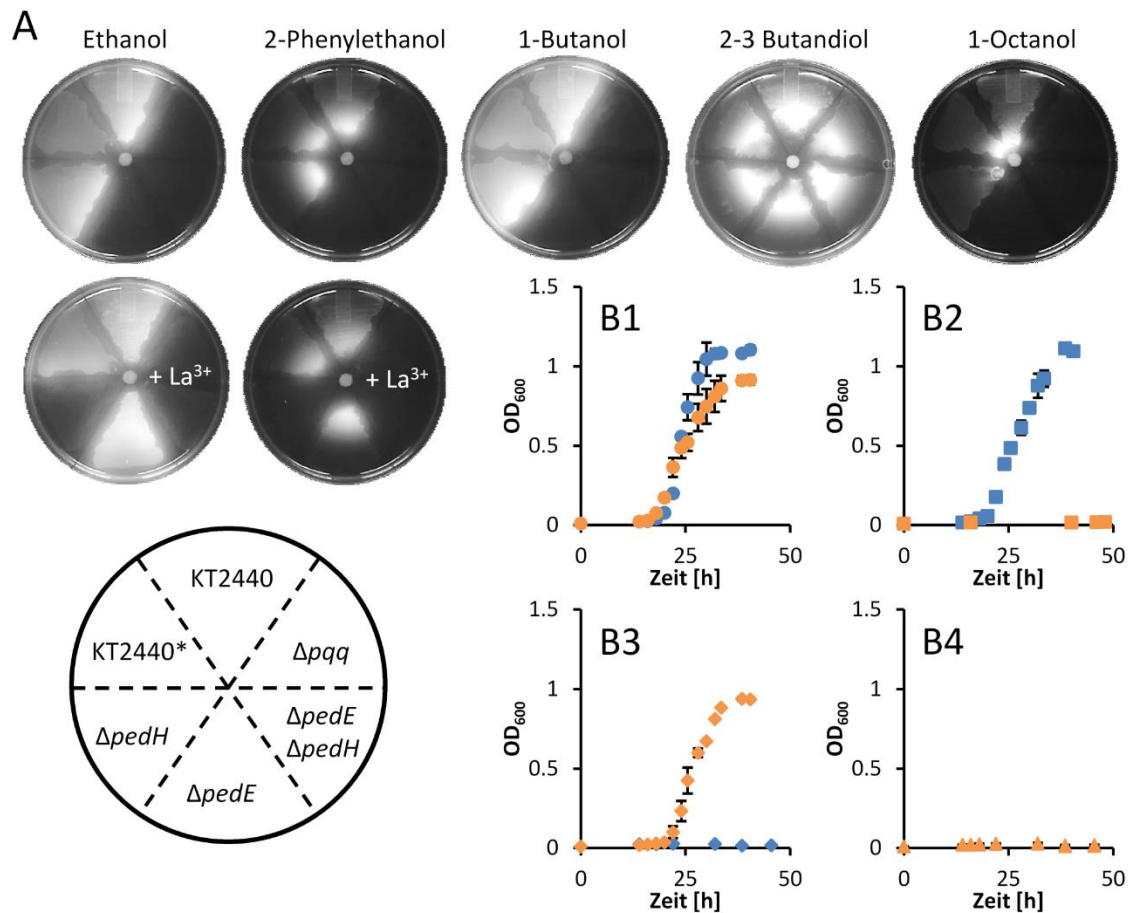


Abbildung 26: (A) Wachstum verschiedener *P. putida*-Stämme mit unterschiedlichen Substraten (10 μ l Tropfen einer 1:1 Mischung mit DMSO) auf M9-Agarplatten. Das Wachstum wurde nach 48-stündiger Inkubation unter Kombination von Weißlicht und UV-Beleuchtung aufgenommen (Anregungswellenlänge: 254 nm). Alle Bilder wurden zugeschnitten, der Hintergrund wurde abgezogen und Schärfe (+ 50%), Kontrast (+ 40%) sowie Helligkeit (+ 20%) wurden bearbeitet. (B1 - B4) Wachstum von KT2440* (B1, Punkte), $\Delta pedH$ (B2, Rechtecke), $\Delta pedE$ (B3, Karos) sowie $\Delta pedE \Delta pedH$ (B4, Dreiecke) auf 2-Phenylethanol in Abwesenheit (blaue Symbole) oder Gegenwart (orangene Symbole) von 20 μ M La^{3+} . Experimente wurden in 25 ml (125 ml Erlenmeyerkolben) bei 30°C und 180 rpm durchgeführt. Datenpunkte geben den Mittelwert von zwei individuellen Kulturen mit zugehöriger Varianz wieder. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

beiden Bedingungen nicht. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass für alle getesteten alkoholischen VOCs, mit Ausnahme des Fermentationsprodukts 2,3-Butandiol, die funktionelle Expression mindestens einer der beiden PQQ-ADHs PedE und PedH essentiell für effizientes Wachstum ist.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde zusätzlich ein Wachstumsexperiment in einer M9-Flüssigkultur mit 2-Phenylethanol als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt (**Abbildung 26B1 - B4**). Durch Verwendung von Erlenmeyerflaschen aus Polycarbonat wurde einer potenziellen REE-Kontamination von Glaswaren vorgebeugt (Pol et al., 2014). Das Wachstum in M9-Flüssigkulturen verlief ähnlich

dem auf Agarplatten. Während der KT2440*-Stamm sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von $20 \mu\text{M La}^{3+}$ nach einer 18- bis 20-stündigen Latenzphase wuchs und nach ca. 35 h die maximale OD_{600} erreichte, konnte für den Doppeldeletionsstamm $\Delta pedE \Delta pedH$ unter beiden Bedingungen kein Wachstum beobachtet werden. Ebenso konnte bei dem Einzeldelentionsstamm $\Delta pedE$ Wachstum ausschließlich in Gegenwart von La^{3+} detektiert werden. Bei Stamm $\Delta pedH$ wiederum war ein Wildtyp-ähnliches Wachstumsverhalten nur in Abwesenheit von La^{3+} zu beobachten, wohingegen in Gegenwart von La^{3+} kein Wachstum während der 48-stündigen Inkubationszeit registriert wurde.

3.5.2 La^{3+} verursacht eine inverse Regulierung von *pedE* und *pedH* während des Wachstums auf alkoholischen VOCs.

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass für ein effizientes Wachstum auf verschiedenen alkoholischen VOCs die funktionelle Expression von mindestens einer der zwei PQQ-ADHs zwingend erforderlich ist. Der wachstumshemmende Effekt von La^{3+} auf den Einzeldelentionsstamm $\Delta pedH$ deutet

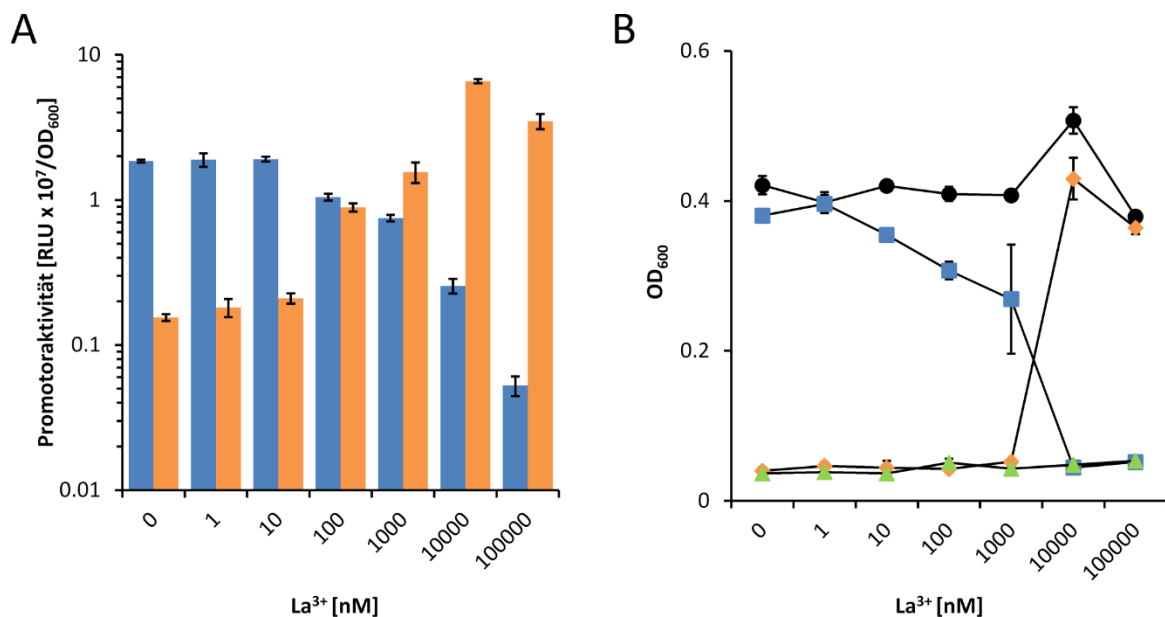


Abbildung 27: (A) Aktivitäten des *pedE*-Promotors (blaue Balken) sowie des *pedH*-Promotors (orangene Balken) in Stamm KT2440* während Inkubation in M9-Medium mit 1 mM 2-Phenylethanol und verschiedenen La^{3+} -Konzentrationen. Die Promotoraktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) x 10⁷/OD₆₀₀ angegeben. (B) Wachstum von Stamm KT2440* (schwarze Punkte), $\Delta pedH$ (blaue Rechtecke), $\Delta pedE$ (orangene Karos) sowie $\Delta pedE \Delta pedH$ (grüne Dreiecke) in M9-Medium auf 2-Phenylethanol in Gegenwart verschiedener La^{3+} -Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C und 350 rpm in 2 ml-Deepwell-Platten. Datenpunkte stellen Mittelwert von drei Messungen mit zugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

zusätzlich auf eine mögliche La^{3+} -abhängige Regulation des *pedE*-Gens hin, ähnlich der „ Ln^{3+} -Switch“, welche für mehrere methylo trope Bakterien beschrieben ist (Chu et al., 2016; Farhan Ul Haque et al., 2015; Vu et al., 2016). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei Reporterstämme konstruiert, mit welchen die Aktivitäten der *pedE*- und *pedH*-Promotoren in KT2440* gemessen werden konnten. Experimente in M9-Flüssigkulturen mit 1 mM 2-Phenylethanol zeigten, dass die *pedE*-Promotoraktivität durch die Zugabe von ≤ 10 nM La^{3+} kaum beeinflusst wurde im Vergleich zur Referenz ohne La^{3+} -Zugabe (**Abbildung 27A**). Konzentrationen von 100 nM – 100 μM La^{3+} führten jedoch zu deutlicher, dosisabhängiger Abnahme der Promotoraktivität. Eine genau gegenteilige Korrelation konnte bei der *pedH*-Promotoraktivität beobachtet werden. In Gegenwart von ≤ 10 nM La^{3+} wurden nur geringe *pedH*-Promotoraktivitäten detektiert. Nach Zugabe von La^{3+} -Konzentrationen ≥ 100 nM wurde hingegen eine deutliche Induktion der Promotoraktivität beobachtet, mit einer Aktivitätsspitze bei 10 μM La^{3+} .

Die Konsequenzen der beobachteten, La^{3+} -abhängigen Genregulation auf das Wachstumsverhalten wurden mit den Stämmen KT2440*, $\Delta pedE$, $\Delta pedH$ und $\Delta pedE \Delta pedH$ in M9-Flüssigkulturen mit 2-Phenylethanol als Kohlenstoffquelle anschließend genauer untersucht (**Abbildung 27B**). Hierbei zeigte sich, dass das Wachstum des KT2440*-Stamms durch die Gegenwart von ≤ 100 μM La^{3+} kaum beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu zeigte der $\Delta pedH$ -Stamm linear abnehmende optische Dichten als Reaktion auf steigende La^{3+} -Konzentrationen von ≤ 1 μM La^{3+} . Ab La^{3+} -Konzentrationen ≥ 10 μM konnte kein Wachstum beobachtet werden. Für den $\Delta pedE$ -Deletionsstamm hingegen wurde Wachstum nur in Gegenwart von ≥ 10 μM La^{3+} detektiert. Der Doppeldeletionsstamm $\Delta pedE \Delta pedH$ wuchs unter keiner der getesteten Bedingungen. Mit den Seltenerdmetallen Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} und Sm^{3+} wurde ein gleichartiger Zusammenhang zwischen Wachstum und den *pedE*- und *pedH*-Promotoraktivitäten beobachtet (**Abbildung A 15**).

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass *P. putida* KT2440 die *pedE*- und *pedH*-Promotoraktivitäten als Reaktion auf verschiedene Ln^{3+} -Konzentrationen invers reguliert und dass das jeweilige Wachstumsverhalten durch diese Regulation bestimmt wird. Im Vergleich zur „ Ln^{3+} -Switch“ in *M. extorquens* AM1 ist die effektive La^{3+} -Konzentration, welche für La^{3+} -abhängiges Wachstum gebraucht wird, mit 10 μM im Vergleich zu 5 nM für *M. extorquens* jedoch um ein Vielfaches höher (Vu et

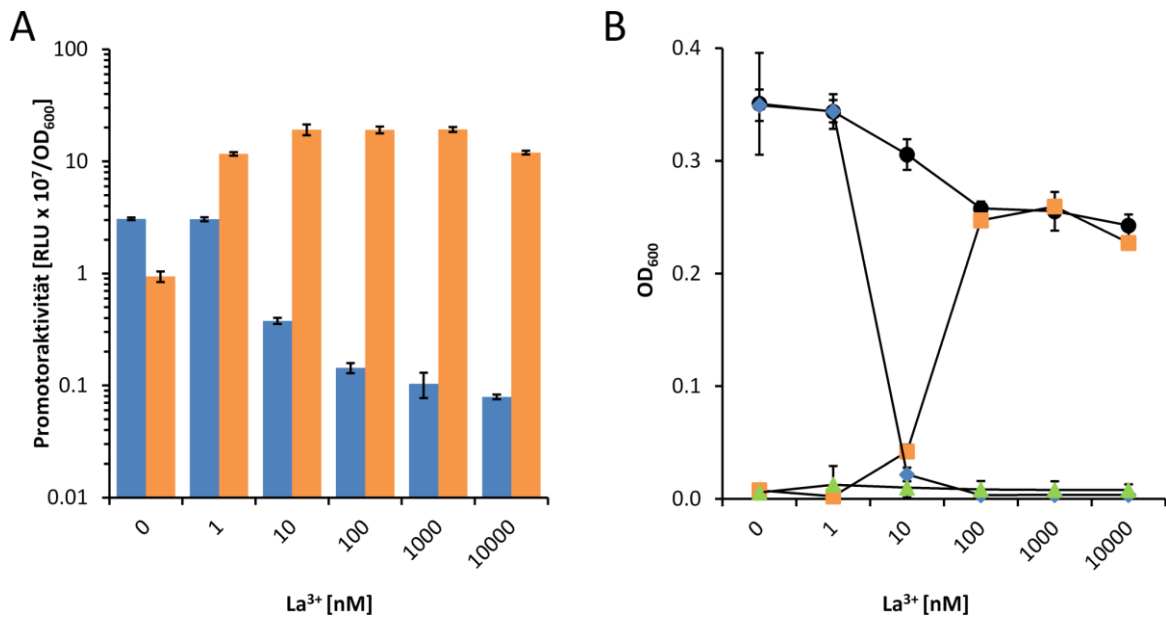


Abbildung 28: (A) Aktivitäten des *pedE*-Promotors (blaue Balken) sowie des *pedH*-Promotors (orangene Balken) in Stamm KT2440* während Inkubation in MP-Medium mit 1 mM 2-Phenylethanol und verschiedenen La³⁺-Konzentrationen. Die Promotoraktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) x 10⁷/OD₆₀₀ angegeben. (B) Wachstum von Stamm KT2440* (schwarze Punkte), $\Delta pedH$ (blaue Rechtecke), $\Delta pedE$ (orangene Karos) sowie $\Delta pedE \Delta pedH$ (grüne Dreiecke) in MP-Medium auf 2-Phenylethanol in Gegenwart verschiedener La³⁺-Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C und 350 rpm in 2 ml-Deepwell-Platten. Datenpunkte stellen Mittelwert von drei Messungen mit zugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

al., 2016). Da der augenscheinlichste Unterschied zwischen den Experimenten in den verwendeten Minimalmedien (M9 vs. MP) lag, wurden die obenstehenden Experimente in MP-Medium wiederholt (**Abbildung 28**). Dabei zeigte sich derselbe generelle Zusammenhang zwischen Promotoraktivitäten und Wachstum. Die „kritischen“ La³⁺-Konzentrationen, welche benötigt wurden, um eine transkriptionelle Reaktion hervorzurufen und um La³⁺-abhängiges Wachstum zu ermöglichen, waren jedoch deutlich geringer in M9-Medium (1 bzw. 10 nM). Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass bei einer La³⁺-Konzentration von 10 nM minimales Wachstum beider Einzeldelensionsstämme ($\Delta pedE$ und $\Delta pedH$) zu beobachten war. Dies deutet daraufhin, dass Umweltbedingungen existieren, unter welchen sowohl PedE als auch PedH funktionell produziert werden. Dies konnte mit einem zusätzlichen Wachstumsexperiment demonstriert werden, in welchem sowohl für den $\Delta pedE$ - als auch für den $\Delta pedH$ -Stamm in einem Konzentrationsbereich von 1 – 15 nM La³⁺ Wachstum detektiert wurde (**Abbildung A 16**).

3.5.3 Das PedH-Protein beeinflusst die Ln^{3+} -abhängige Genregulation in *P. putida* KT2440.

In *M. extorquens* AM1 wird die Transkription der verschiedenen PQQ-MDHs teilweise durch die Quinoproteine selbst reguliert (siehe Abschnitt 1.2.4.1) (Skovran et al., 2011). Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Mechanismus auch in *P. putida* KT2440 vorhanden ist, wurden die *pedE*- und *pedH*-Promotoraktivitäten in den Einzeldelensionsstämmen $\Delta pedE$ und $\Delta pedH$ während des Wachstums auf 2-Phenylethanol gemessen (**Abbildung 29**). In Abwesenheit von La^{3+} wurde in Stamm $\Delta pedH$ eine viermal höhere und in Stamm $\Delta pedE$ eine minimal niedrigere (0.5-fach) *pedE*-Promotoraktivität gemessen als im Referenzstamm KT2440* (**Abbildung 29A**). Die Gegenwart von 10 nM La^{3+} führte zu einer starken Verminderung der *pedE*-Promotoraktivität in allen untersuchten Stämmen im Vergleich zu den Bedingungen ohne La^{3+} (21-fach für KT2440*, 6-fach für $\Delta pedE$ und 127-fach für $\Delta pedH$). Die Aktivität des *pedH*-Promotors war in der Abwesenheit von La^{3+} in allen untersuchten Stämmen deutlich kleiner als die des *pedE*-Promotors (**Abbildung 29B**). Nach Zugabe von La^{3+} erfolgte jedoch eine starke Induktion des *pedH*-Promotors in den Stämmen KT2440* (37-fach) und $\Delta pedE$ (29-fach). Im

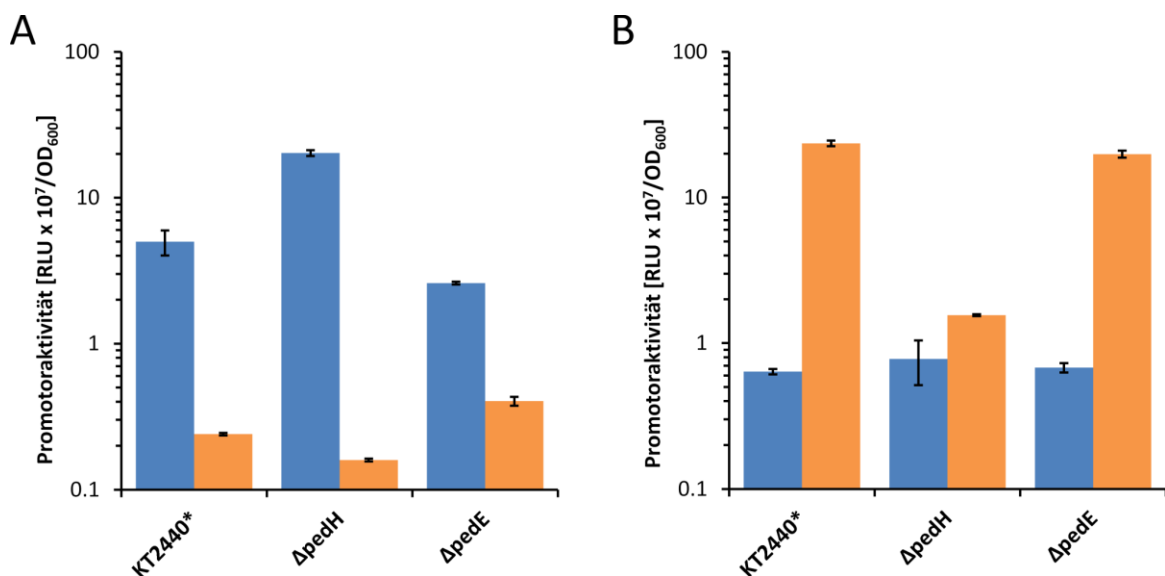


Abbildung 29: (A) Aktivitäten des *pedE*-Promotors (A) sowie des *pedH*-Promotors (B) in Stamm KT2440*, $\Delta pedH$ sowie $\Delta pedE$ in MP-Medium mit 1 mM 2-Phenylethanol in Abwesenheit (blaue Balken) oder Gegenwart (orangene Balken) von 10 nM La^{3+} . Die Promotoraktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) x 10⁷/OD₆₀₀ angegeben. Datenpunkte stellen Mittelwert von drei Messungen mit zugehöriger Standardabweichung dar. Die *pedE*- und *pedH*-Promotoraktivitäten in jedem Stamm in Abwesenheit von La^{3+} waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.01$) zu den zugehörigen Aktivitäten in der Gegenwart von La^{3+} . Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

Vergleich dazu fiel die La^{3+} -bedingte Induktion des *pedH*-Promotors im ΔpedH -Stamm deutlich geringer aus (2-fach vs. 37-fach).

3.5.4 Die Sensorhistidinkinase *PedS2* ist essentiell für die Ln^{3+} -abhängige Regulation von *pedE*.

Aufgrund der Ln^{3+} -abhängigen Genregulation von *pedE* kann ein ΔpedH -Einzeldelionsstamm ab einer „kritischen“ La^{3+} -Konzentration nicht mit 2-Phenylethanol als Kohlenstoffquelle während 48-stündiger Inkubation wachsen (siehe Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2). Um diese La^{3+} -bedingte Genrepression zu überwinden, wurde ein adaptives Evolutionsexperiment in Gegenwart von La^{3+} durchgeführt (**Abbildung 30A – C**).

Wenn die Inkubationszeit einer ΔpedH -Kultur in M9-Medium, versetzt mit $10\ \mu\text{M}\ \text{La}^{3+}$ und 2-Phenylethanol als einziger Kohlenstoffquelle, auf > 5 Tage verlängert wurde, konnte Zellwachstum registriert werden. Klone, welche aus diesen Experimenten isoliert und mehrmals auf LB-Agarplatten subkultiviert wurden, wuchsen anschließend nach einer deutlich kürzeren Inkubationszeit (< 2 Tage) mit einem Wachstumsphänotyp, der sich kaum von dem des Ausgangsstamms KT2440* unterschied. Auch in den methylo trophen Organismen *Methylobacterium extorquens* AM1, *Methylo microbium buryatense* 5GB1C und *Methylobacterium aquaticum* 22A wurde das Aufkommen spontaner, sogenannter Suppressormutanten während des Wachstums in Gegenwart von Ln^{3+} -Ionen beobachtet (Chu and Lidstrom, 2016; Masuda et al., 2018; Skovran et al., 2011). Im Falle von *M. buryatense* 5GB1C konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in der membrangebundenen Sensorhistidinkinase MxaY für den Suppressorphänotyp verantwortlich ist (Chu et al., 2016). In *P. putida* KT2440 kodiert das Gen PP_2671 (von hieran *pedS2*), welches nicht weit von *pedE* (PP_2674) auf dem Genom entfernt ist, für eine Sensorhistidinkinase, die eine 25%-ige Sequenzidentität mit *mxay* aufweist (**Abbildung 30D – F**). Um zu überprüfen, ob – ähnlich zu *M. Buryatense* 5GB1C – Mutationen in *pedS2* für das Aufkommen des Suppressorphänotypen verantwortlich waren, wurde das *pedS2*-Gen dreier individuell isolierter Suppressormutanten ($\Delta\text{pedH}^{\text{S1}}$ - $\Delta\text{pedH}^{\text{S3}}$) sequenziert. Dabei wurde in jedem dieser Stämme eine nicht-synonyme Mutation im Gen *pedS2* gefunden. Diese Mutationen befanden sich entweder in der Region einer periplasmatischen Domäne unbekannter Funktion

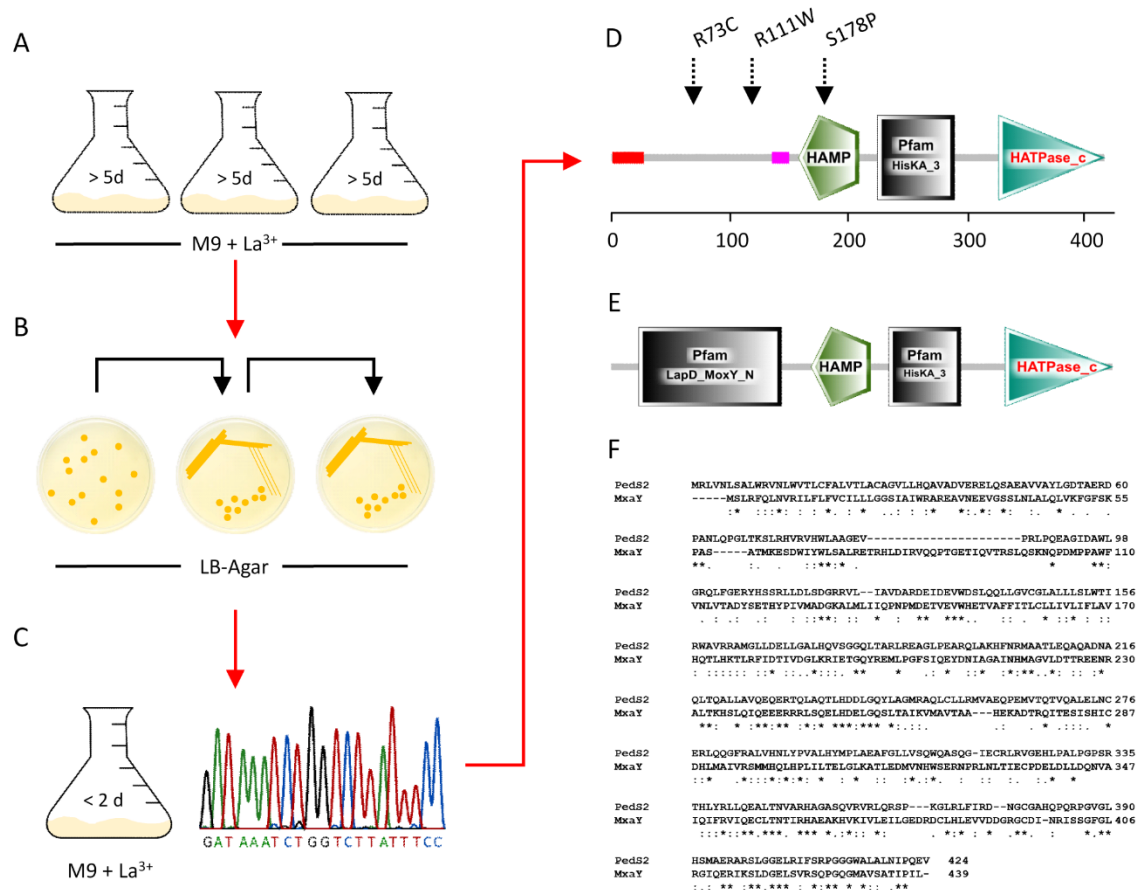


Abbildung 30: (A - C) Schematische Darstellung des adaptiven Evolutionsexperiments, welches zur Identifizierung der Suppressormutanten geführt hat. Alle identifizierten Mutanten wiesen Mutationen in der Sensorhistidinkinase PedS2 ($\Delta pedH^S1$ (R73C), $\Delta pedH^S2$ (R111W) und $\Delta pedH^S3$ (S178P)) auf. (A) Zellen des Stamms $\Delta pedH$ wurden in M9-Medium mit 2-Phenylethanol und 10 μM La³⁺ in Erlenmeyerkolben (N = 3) bei 30°C und 180 rpm inkubiert. (B) Nachdem Wachstum registriert wurde (> 5 d), wurden verdünnte Lösungen aus jedem Kolben auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Individuelle Klone wurden weitere zweimal auf LB-Agarplatten ausgestrichen, bevor sie charakterisiert wurden. (C) Die Klone wurden basierend auf ihrem Wachstum in M9-Medium mit 2-Phenylethanol und 10 μM La³⁺ charakterisiert. Von Klonen, die deutlich früher wuchsen als der $\Delta pedH$ -Ursprungsstamm, wurde anschließend das Gen *pedS2* per PCR amplifiziert, sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz von *pedS2* aus der Pseudomonas-Genomdatenbank verglichen. (D und E) Graphische Darstellung der verschiedenen Domänen, aus welchen PedS2 aus *P. putida* (D) bzw. MxaY aus *M. buryatense* 5GB1C (E) zusammengesetzt sind, erstellt mithilfe des Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (Letunic et al., 2015). (F) Aminosäuresequenzvergleich von PedS2 und MxaY, erstellt mithilfe von Clustal Omega (Sievers et al., 2014). Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2018).

(R73C [$\Delta pedH^S1$] und R111W [$\Delta pedH^S2$]) oder der HAMP-Domäne (S178P [$\Delta pedH^S3$]), welche für die Signaltransduktion über die periplasmatische Membran zuständig ist (Abbildung 30D). Um nachzuweisen, dass die gefundenen Mutationen für den beobachteten Suppressorphänotyp verantwortlich sind, wurde Stamm $\Delta pedH_PedS^{S178P}$ konstruiert, bei welchem die Mutation S178P in *pedS2* aus $\Delta pedH^S3$

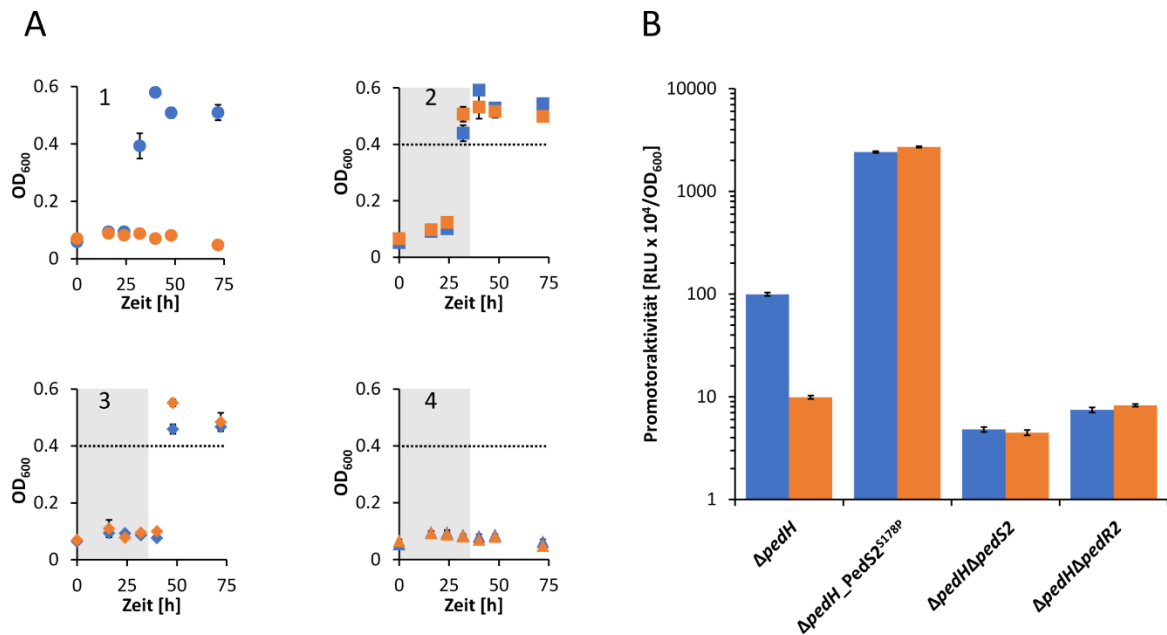


Abbildung 31: (A) Wachstum der Stämme $\Delta pedH$ (A1, Punkte), $\Delta pedH_PedS2^{S178P}$ (A2, Rechtecke), $\Delta pedH \Delta pedS2$ (A3, Karos) und $\Delta pedH \Delta pedR2$ (A4, Dreiecke) in M9-Medium mit 2-Phenylethanol in Abwesenheit (blaue Symbole) oder Gegenwart (orangene Symbole) von 10 μM La³⁺. Die Inkubation erfolgte in 2 ml-Deepwell-Platten bei 30°C und 350 rpm. Der Zeitpunkt, zu dem der Ursprungsstamm $\Delta pedH$ eine OD > 0.4 erreicht hat, ist durch einen grauen Bereich in A2 - A4 gekennzeichnet. (B) Aktivitäten des *pedE*-Promotors in den Stämmen $\Delta pedH$, $\Delta pedH_PedS2^{S178P}$, $\Delta pedH \Delta pedS2$ und $\Delta pedH \Delta pedR2$ in Abwesenheit (blaue Balken) oder in Anwesenheit (orangene Balken) von 1 μM La³⁺ in M9-Medium mit 1 mM 2-Phenylethanol. Die Promotoraktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) x 10⁴ normalisiert auf OD₆₀₀ angegeben. Alle Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2018).

in Stamm $\Delta pedH$ eingebracht wurde. In Wachstumsexperimenten mit 2-Phenylethanol in Abwesenheit von La³⁺ wurde ein Wachstumsverhalten gleich dem des $\Delta pedH$ - Stamms registriert, das nach einer Latenzphase (Lag-Phase) von < 32 h begann (**Abbildung 31A1 - A2**). Während der $\Delta pedH$ -Stamm im Verlauf der 72-stündigen Inkubation in Gegenwart von La³⁺ nicht wuchs, erreichte Stamm $\Delta pedH_PedS2^{S178P}$ auch in Gegenwart von 10 μM La³⁺ maximale optische Dichte nach gut 32-stündiger Inkubation. Dies ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass die Mutationen in der Sensorhistidinkinase *pedS2* ausreichen, um den Suppressorphänotyp zu generieren.

3.5.5 Das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 reguliert die La³⁺-abhängige Transkription von *pedE*.

Auf dem Genom von *P. putida* KT2440 befindet sich direkt neben *pedS2* das Gen für das LuxR-artige Regulationsprotein *exaE* (PP_2672; von hieran als *pedR2* bezeichnet).

PedR2 ist ein Homolog (65 % Aminosäuresequenzidentität) des Regulationsproteins EraR (ExaE; PA1980), welches in *P. aeruginosa* zusammen mit EraS (ExaD; PA1979) ein Zweikomponentensystem bildet, das die Expression der PQQ-ADH *exaA* aktiviert (Mern et al., 2010). Um zu testen, ob PedS2 zusammen mit PedR2 in *P. putida* ein Zweikomponentensystem bildet, das die Expression des *exaA*-Homologs *pedE* aktiviert, wurden die Stämme $\Delta pedH \Delta pedS2$ und $\Delta pedH \Delta pedR2$ konstruiert. Zusätzlich wurden Stämme generiert, welche die Messung der *pedE*-Promotoraktivität in $\Delta pedH$, $\Delta pedH_PedS^{S178P}$, $\Delta pedH \Delta pedS2$ und $\Delta pedH \Delta pedR2$ erlauben, und in Experimenten mit 2-Phenylethanol in Gegenwart oder in Abwesenheit von La^{3+} verwendet (**Abbildung 31B**).

Die *pedE*-Promotoraktivitäten des $\Delta pedH_PedS^{S178P}$ -Stamms waren, analog zu den Wachstumsdaten (**Abbildung 31A2**), fast identisch in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von La^{3+} (*pedE*-Promotoraktivitätsverhältnis $La^+/La^- = 0.89 \pm 0.02$; $La^+ \triangleq$ Zellen, die mit La^{3+} inkubiert wurden; $La^- \triangleq$ Zellen, die in Abwesenheit von La^{3+} inkubiert wurden), jedoch mehr als 24-fach höher (24 ± 1 -fach bzw. 27 ± 1 -fach) als die *pedE*-Promotoraktivität des $\Delta pedH$ -Stamms in Abwesenheit von La^{3+} (**Abbildung 31B**). Der Wachstumsphänotyp des Doppeldelensionsstamms $\Delta pedH \Delta pedS2$ war La^{3+} -unabhängig und ähnlich dem des $\Delta pedH_PedS^{S178P}$ -Stamms, das Wachstum begann jedoch nach einer deutlich längeren Latenzphase (Latenzphase ≈ 40 h, im Vergleich zu ≈ 24 h) (**Abbildung 31A3**). Auch die *pedE*-Promotoraktivität in Stamm $\Delta pedH \Delta pedS2$ war La^{3+} -unabhängig (*pedE*-Promotoraktivitätsverhältnis $La^+/La^- = 1.07 \pm 0.09$) und deutlich niedriger als die *pedE*-Promotoraktivität des $\Delta pedH$ -Stamms in Gegenwart von La^{3+} (**Abbildung 31B**). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Stämmen wuchs $\Delta pedH \Delta pedR2$ weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von La^{3+} nach 72-stündiger Inkubation (**Abbildung 31A4**) bzw. siebentägiger Inkubation (keine Abbildung) auf 2-Phenylethanol. Auch die *pedE*-Promotoraktivität in diesem Stamm war sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von La^{3+} niedrig (**Abbildung 31B**).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 das zentrale Element in der Regulation von *pedE* ist und dass PedR2 für PedE-abhängiges Wachstum essentiell ist. $\Delta pedH \Delta pedS2$ ist jedoch noch immer zu einem, wenn auch verzögerten, PedE-abhängigen Wachstum fähig. Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass mindestens eine weitere Kinase PedR2

La³⁺-unabhängig phosphorylieren kann und damit die Produktion von funktionalem PedE unter diesen Bedingungen gewährleistet.

3.5.6 Das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 reguliert die partielle Repression von *pedH* in Abwesenheit von La³⁺.

LuxR-ähnliche Regulationsproteine können sowohl als transkriptionelle Aktivatoren als auch als Repressoren fungieren (Van Kessel et al., 2013; Waters and Bassler, 2006). Da das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 das zentrale Element in der Regulation von *pedE* ist, wurde untersucht, ob PedS2/PedR2 auch in der Regulation von *pedH* eine Rolle spielt. Hierfür wurden die Stämme $\Delta pedE$, $\Delta pedE_PedS2^{S178P}$, $\Delta pedE \Delta pedS2$ und $\Delta pedE \Delta pedR2$ konstruiert und transkriptionelle Reporter in deren Genom integriert, welche die Messung der *pedH*-Promotoraktivität ermöglichten. In Experimenten mit 2-Phenylethanol wuchsen die Stämme $\Delta pedE$, $\Delta pedE \Delta pedS2$ und $\Delta pedE \Delta pedR2$ nach einer Latenzphase (Lag-Phase) von < 24 h und erreichten ihre

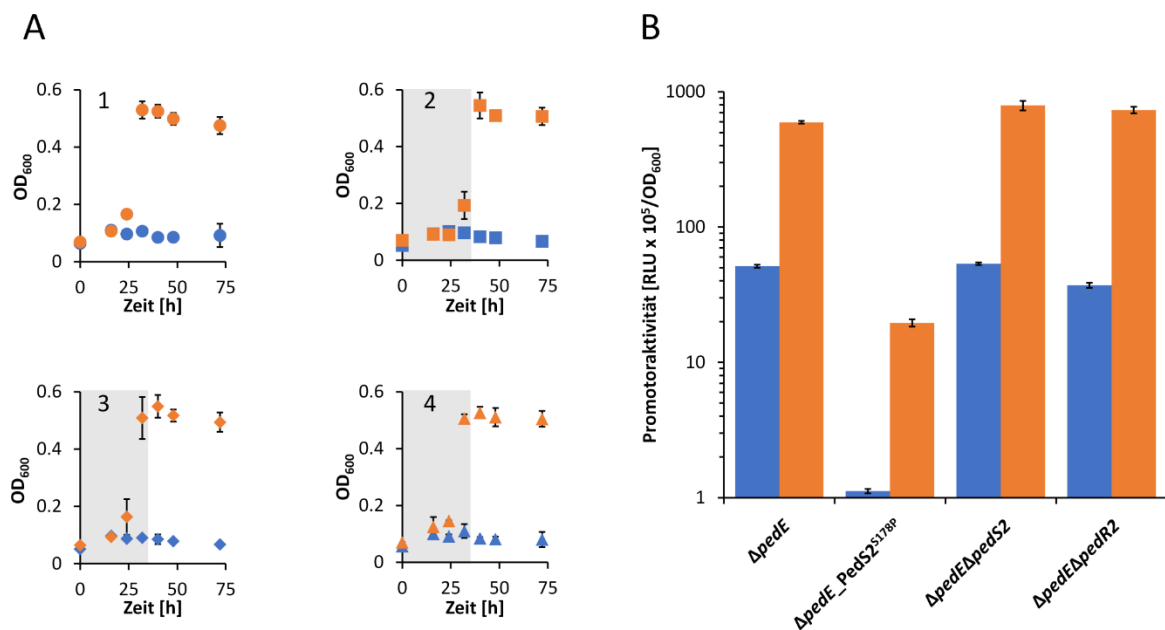


Abbildung 32: (A) Wachstum der Stämme $\Delta pedE$ (A1, Punkte), $\Delta pedE_PedS2^{S178P}$ (A2, Rechtecke), $\Delta pedE \Delta pedS2$ (A3, Karos) und $\Delta pedE \Delta pedR2$ (A4, Dreiecke) in M9-Medium mit 2-Phenylethanol in der Abwesenheit (blaue Symbole) oder Gegenwart (orangene Symbole) von 10 μ M La³⁺. Die Inkubation erfolgte in 2 ml-Deepwell-Platten bei 30°C und 350 rpm. Der Zeitpunkt in dem der Ursprungstamm $\Delta pedE$ eine OD > 0.4 erreicht hat, ist durch einen grauen Bereich in A2 bis A4 gekennzeichnet. (B) Aktivitäten des *pedH*-Promotor in den Stämmen $\Delta pedE$, $\Delta pedE_PedS2^{S178P}$, $\Delta pedE \Delta pedS2$ und $\Delta pedE \Delta pedR2$ in der Abwesenheit (blaue Balken) oder Gegenwart von 1 μ M La³⁺ in M9-Medium mit 1 mM 2-Phenylethanol. Die Promotoraktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) x 10⁴ normalisiert auf OD₆₀₀ angegeben. Alle Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2018).

maximale OD₆₀₀ nach ≤ 32 h (**Abbildung 32A1, A3 – A4**). Im Gegensatz dazu wuchs Stamm $\Delta pedE_PedS^{S178P}$ erst deutlich später (Latenzphase > 24 h und maximale OD₆₀₀ nach > 32 h, **Abbildung 32A2**). In Übereinstimmung mit den Wachstumsdaten war auch die *pedH*-Promotoraktivität der Stämme $\Delta pedE$, $\Delta pedE \Delta pedS2$ und $\Delta pedE \Delta pedR2$ sehr ähnlich, wohingegen die *pedH*-Promotoraktivität von Stamm $\Delta pedE_PedS^{S178P}$ 45 ± 2 -fach bzw. 30 ± 2 -fach niedriger war als die des $\Delta pedE$ -Stamms in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von La^{3+} (**Abbildung 32B**). Unter der Annahme, dass die Mutation S178P in PedS2 zu einer Sensorkinaseaktivität führt, die der des Wildtyp-Proteins in Abwesenheit von La^{3+} ähnelt, ist die naheliegende Erklärung für das verzögerte Wachstum von Stamm $\Delta pedE_PedS^{S178P}$, dass PedS2 in Abwesenheit von La^{3+} auch für die Repression von *pedH* verantwortlich ist. Um herauszufinden, ob ein solcher regulatorischer Effekt auf *pedH*, ähnlich der Regulation von *pedE*, auch über PedR2 übertragen wird, wurde Stamm $\Delta pedE_PedS^{S178P} \Delta pedR2$ generiert und dessen Wachstum genauer untersucht (**Abbildung 33A**). Auch in diesen Experimenten wurden deutliche Unterschiede in den jeweiligen Latenzphasen und maximalen Wachstumsraten (0.087 ± 0.003 h⁻¹ im Vergleich zu 0.057 ± 0.001 h⁻¹) zwischen den Stämmen $\Delta pedE$ und $\Delta pedE_PedS^{S178P}$ festgestellt. Nach der zusätzlichen Deletion des Regulationsproteins PedR2 konnte kein $PedS^{S178P}$ -bedingter Wachstumsdefekt mehr festgestellt werden, was daran zu erkennen war, dass der Wachstumsphänotyp des $\Delta pedE_PedS^{S178P} \Delta pedR2$ -Stamms (maximale Wachstumsrate 0.089 ± 0.003 h⁻¹) sich kaum von Stamm $\Delta pedE$ unterschied.

3.5.7 Die konservierte Phosphorylierungsstelle D53 in PedR2 ist essentiell für die La^{3+} -abhängige Genregulation von *pedE* und *pedH*.

Um zu überprüfen, ob die konservierte Phosphorylierungsstelle D53 in PedR2 für die beobachtete Regulation essentiell ist (Bourret et al., 1990; Milani et al., 2005), wurden induzierbare Plasmide für die Produktion von PedR2 (pJEM[PedR2]) und einer Variante von PedR2, in der die konservierte Phosphorylierungsstelle D53 in der CheY-ähnlichen Empfängerdomäne von PedR2 durch ein Alanin ersetzt wurde (pJEM[PedR2^{D53A}]), verwendet. Beide Plasmide wurden dafür zuerst in die Stämme $\Delta pedH \Delta pedR2$ und $\Delta pedE_PedS^{S178P} \Delta pedR2$ transformiert und die daraus resultierenden Stämme daraufhin für Wachstumsexperimente mit 2-Phenylethanol in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von La^{3+} verwendet (**Abbildung 33B – C**).

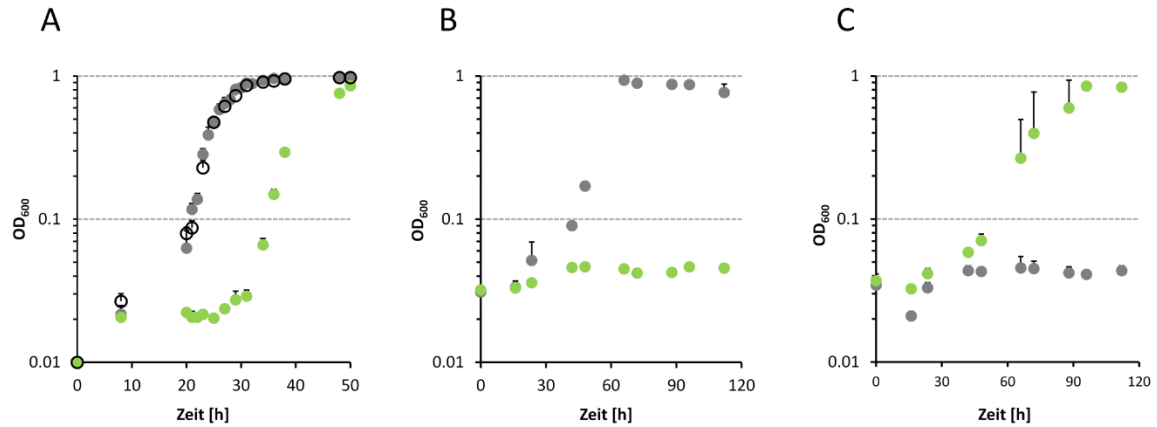


Abbildung 33: Wachstum verschiedener *P. putida*-Stämme in M9-Medium mit 5 mM 2-Phenylethanol und 10 μM La^{3+} in Abwesenheit (A) bzw. in Gegenwart (B - C) von Kanamycin zur Plasmiderhaltung. Wachstum wurde in Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat bei 30°C und 180 rpm durchgeführt. Medien wurden auf eine Anfangs- OD_{600} von 0.1 bzw. 0.03 mit gewaschenen Zellen von M9-Übernachtskulturen beimpft. Übernachtskulturen enthielten Succinat und, falls erforderlich, Kanamycin und 0.2% (w/v) Rhamnose (B - C) zur Induktion der Plasmide pJEM[PedR2] bzw. pJEM[PedR2^{D53A}]. (A) Wachstum der Stämme ΔpedE (schwarze Kreise), $\Delta\text{pedE_PedS2}^{\text{S178P}}$ (grüne Punkte) und $\Delta\text{pedE_PedS2}^{\text{S178P}} \Delta\text{pedR2}$ (graue Punkte). (B) Wachstum des Stamms $\Delta\text{pedH_PedS2}^{\text{S178P}} \Delta\text{pedR2}$ mit Plasmid pJEM[PedR2] (graue Punkte) bzw. Plasmid pJEM[PedR2^{D53A}] (grüne Punkte). (C) Wachstum des Stamms $\Delta\text{pedE_PedS2}^{\text{S178P}} \Delta\text{pedR2}$ mit Plasmid pJEM[PedR2] (graue Punkte) bzw. pJEM[PedR2^{D53A}] (grüne Punkte). Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen mit zugehöriger Standardabweichung. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2018).

Nachdem die Plasmid-basierte Produktion des PedR2-Wildtyp-Proteins in Stamm $\Delta\text{pedH} \Delta\text{pedR2}$ induziert wurde, konnte PedE-abhängiges Wachstum nach einer Latenzphase von < 24 h detektiert werden (maximale Wachstumsrate: $0.032 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$). Im Gegensatz dazu führte die Produktion von PedR2^{D53A} im selben Stamm zu keinem messbaren Wachstum (**Abbildung 33B**). Die Resultate für Stamm $\Delta\text{pedE_PedS}^{\text{S178P}} \Delta\text{pedR2}$ waren genau gegensätzlich dazu. In diesem Fall erlaubte nur die Komplementierung mit PedR2^{D53A} PedH-abhängiges Wachstum (maximale Wachstumsrate: $0.026 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$), wohingegen bei Plasmid-basierter Produktion des Wildtyp-Proteins PedR2 kein Wachstum registriert wurde (**Abbildung 33C**).

3.6 Übergangsmetalle beeinflussen das Ln³⁺-abhängige Wachstum von *P. putida* KT2440.

3.6.1 Eisen beeinflusst das Ln³⁺-abhängige Wachstum von *P. putida* KT2440.

Wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, war in M9-Minimalmedium eine „kritische“ La³⁺-Konzentration von etwa 10 µM La³⁺ für PedH-abhängiges Wachstum erforderlich. In MP-Medium hingegen wurden nur 20 – 100 nM La³⁺ für PedH-abhängiges Wachstum benötigt. Bei genauer Betrachtung der Zusammensetzung beider Minimalmedien fiel auf, dass sich insbesondere die Komposition und Konzentration der Spurenelemente der Medien stark unterscheiden (**Tabelle 36**). So sind die Eisen-, Kupfer-, Mangan- und Zinkkonzentrationen in M9-Medium zwei- bis siebenfach höher als in MP-Medium, wohingegen andere Spurenelemente wie Bor, Kobalt, Nickel oder Wolfram nur in einem der beiden Medien vorkommen. Um den Einfluss der Spurenelemente auf das La³⁺-abhängige Wachstum genauer zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente mit 2-Phenylethanol als Kohlenstoffquelle mit den Einzeldelentionsstämmen $\Delta pedE$ und $\Delta pedH$ in M9-Medium sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Spurenelementlösung (SEL) durchgeführt (**Abbildung 34**). Hierbei konnte erneut gezeigt werden, dass in Gegenwart von SEL eine Konzentration von mindestens 10 µM La³⁺ für PedH-bedingtes Wachstum des $\Delta pedE$ -Stamms benötigt wird (**Abbildung 34A**). Im Gegensatz dazu reichte in M9-Medium, zu dem kein SEL zugesetzt wurde, eine La³⁺-Konzentration von nur 10 nM für PedH-bedingtes

Tabelle 36: Spurenelement-Endkonzentrationen in M9-Medium und MP-Medium. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

	M9-Medium	MP-Medium
Na ₃ -citrate	51 µM	45.6 µM
H ₃ BO ₃	5 µM	-
CoCl ₂	-	2 µM
CuSO ₄	4 µM	1 µM
FeSO ₄	36 µM	18 µM
MnCl ₂	5 µM	1 µM
Na ₂ MoO ₄ /(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.137 µM	2 µM
NiCl ₂	0.084 µM	-
Na ₂ WO ₄	-	0.33 µM
ZnSO ₄	7 µM	1.2 µM

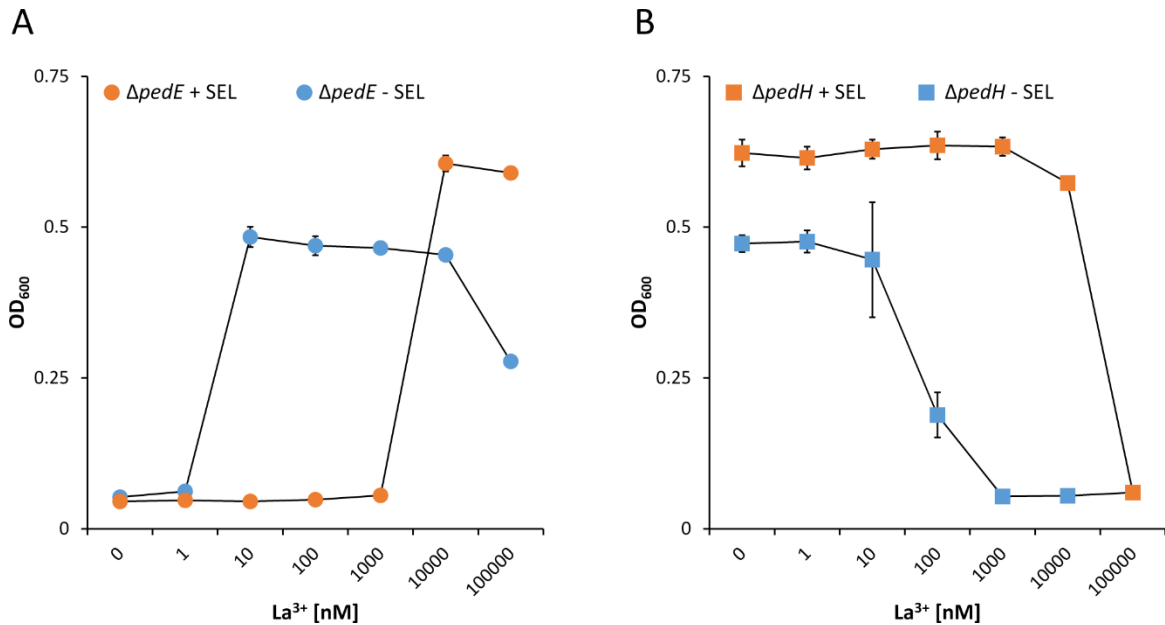


Abbildung 34: Wachstum des $\Delta pedE$ -Stamms (A) bzw. des $\Delta pedH$ -Stamms (B) in M9-Flüssigkulturen mit 5 mM 2-Phenylethanol und verschiedenen La^{3+} -Konzentrationen in Abwesenheit (blaue Symbole) oder in Gegenwart (orangene Symbole) von Spurenelementlösung (SEL). Die optische Dichte (OD_{600}) wurde nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C und 350 rpm in 2 ml-Deepwell-Platten bestimmt. Datenpunkte stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit zugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

Wachstum aus. Auch die La^{3+} -bedingte Inhibition von PedE-abhängigem Wachstum des Stamms $\Delta pedH$ wurde stark durch die Gegenwart von SEL beeinflusst (**Abbildung 34B**). Während in Gegenwart von SEL mindestens 100 μM La^{3+} benötigt wurden, um PedE-bedingtes Wachstum zu unterbinden, reichten in Abwesenheit von SEL La^{3+} -Konzentrationen $\geq 1 \mu M$ hierzu aus.

Anschließend wurden weitere Wachstumsexperimente mit dem $\Delta pedE$ -Stamm in Gegenwart von 10 nM La^{3+} durchgeführt, um herauszufinden, ob ein spezielles Spurenelement oder die Spurenelementlösung als Ganzes für die beträchtlichen Unterschiede in der „kritischen“ La^{3+} -Konzentration verantwortlich sind (**Abbildung 35A**). In diesen Versuchen wurde beobachtet, dass das Wachstum des $\Delta pedE$ -Stamms in Gegenwart von 10 nM La^{3+} durch die Zugabe von H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , $NiSO_4$, und $MnCl_2$ in Konzentrationen, welche denen in M9-Medium entsprechen, nicht inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte nach der individuellen Zugabe von 4 μM $CuSO_4$, 36 μM $FeSO_4$ oder 7 μM $ZnSO_4$, genau wie nach Zugabe von SEL, kein Wachstum detektiert werden. Da die Spurenelementlösung zusätzlich Citrat als Chelator enthält, wurde untersucht, ob $CuSO_4$, $FeSO_4$ und $ZnSO_4$ auch in Gegenwart von Citrat wachstumsinhibierend wirken (**Abbildung 35B**). Tatsächlich konnte der

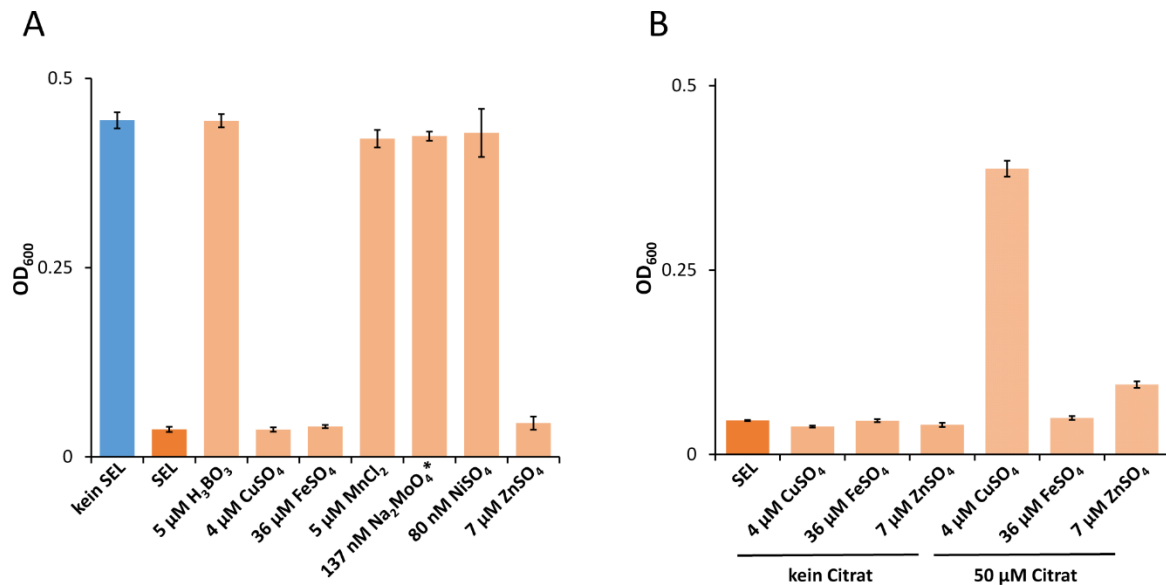


Abbildung 35: (A) Wachstum des $\Delta pedE$ -Stamms in M9-Medium mit 2-Phenylethanol und 10 nM La^{3+} in Gegenwart verschiedener Spurenelemente bzw. Spurenelementlösung. (B) Wachstum des $\Delta pedE$ -Stamms in M9-Medium mit 2-Phenylethanol und 10 nM La^{3+} und verschieden Übergangsmetallen in Abwesenheit oder in Gegenwart von 50 μM Citrat. Die optische Dichte (OD_{600}) wurde nach 48-stündiger Inkubation in 2 ml-Deepwell-Platten bei 30°C und 350 rpm bestimmt. Datenpunkte geben den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung wieder. *Proben mit 137 nM Na_2MoO_4 enthielten zusätzlich 5 $\mu M H_3BO_3$ und 84 nM $NiSO_4$. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

$\Delta pedE$ -Stamm nach Zugabe von 50 $\mu M Na_3$ -Citrat in Gegenwart von 4 $\mu M CuSO_4$ bzw. 7 $\mu M ZnSO_4$ mit 10 nM La^{3+} PedH-abhängig wachsen. Das Wachstum in Gegenwart von 7 $\mu M ZnSO_4$ war jedoch noch immer leicht beeinträchtigt im Vergleich zur spurenelementfreien Kontrolle. Im Gegensatz dazu hatte Citrat keinen erkennbaren Effekt auf die Zellkulturen in Gegenwart von 36 $\mu M FeSO_4$. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass insbesondere $FeSO_4$ für die Wachstumsinhibition des $\Delta pedE$ -Stamms in SEL-haltigem M9-Medium in Gegenwart von niedrigen La^{3+} -Konzentrationen verantwortlich ist.

3.6.2 Pyoverdine sind nicht notwendig für PedH-abhängiges Wachstum bei niedrigen La^{3+} -Konzentrationen.

In Gegenwart von niedrigen Eisenkonzentrationen sondert *P. putida* KT2440 zwei verschiedene Varianten des Siderophors Pyoverdin in die Umgebung ab, um die Bioverfügbarkeit dieses Übergangsmetalls zu erhöhen (Salah El Din et al., 1997). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Pyoverdine neben Eisen auch andere Metallionen wie z.B. Al^{3+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} oder Tb^{3+} binden können, allerdings mit einer

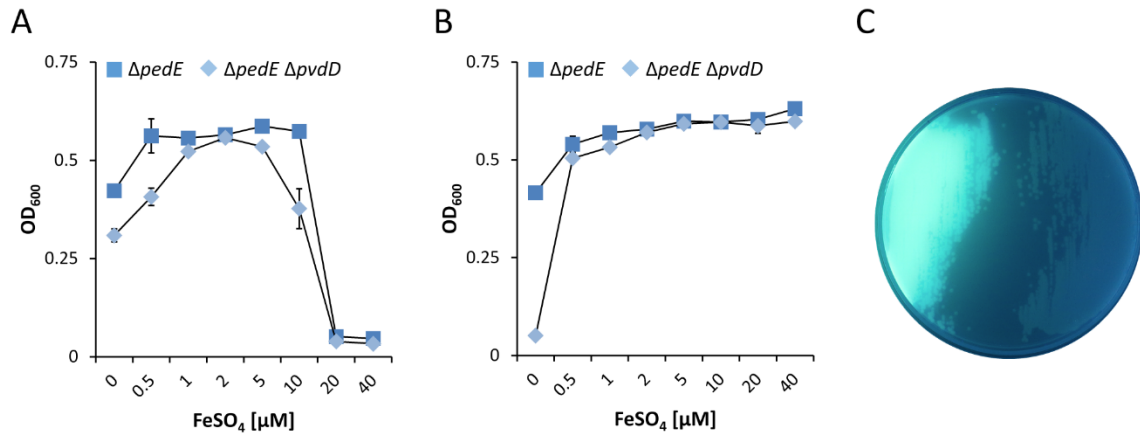


Abbildung 36: (A und B) Wachstum der Stämme *ΔpedE* (dunkelblaue Rechtecke) und *ΔpedE ΔpvdD* (hellblaue Karos) in M9-Medium mit 2-Phenylethanol und 10 nM La³⁺ (A) oder 10 μM La³⁺ (B) in Gegenwart verschiedener FeSO₄-Konzentrationen, ohne Zugabe von Spurenelementlösung. Die optische Dichte (OD₆₀₀) wurde nach 48-stündiger Inkubation in 2 ml-Deepwell-Platten bei 30°C und 350 rpm bestimmt. Datenpunkte geben den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung wieder. (C) Unter Blaulicht aufgenommenes Bild zeigt Pyoverdinproduktion der Stämme *ΔpedE* (links) und *ΔpedE ΔpvdD* (rechts) während des Wachstums auf Cetrimid-Agar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

deutlich niedrigeren Affinität als dies für Fe³⁺ der Fall ist (Braud et al., 2009a, 2009b). Um zu überprüfen, ob die vermehrte Pyoverdinproduktion unter Fe-limitierten Wachstumsbedingungen auch für das verbesserte PedH-abhängige Wachstum bei niedrigen La³⁺-Konzentrationen verantwortlich ist, wurde der Stamm *ΔpedE ΔpvdD* konstruiert. Aufgrund der Deletion des Gens, das für die nichtribosomale Peptidsynthetase *pvdD* (PP_4219, auch bekannt als *ppsD*) kodiert, war es diesem Stamm nicht möglich Pyoverdine zu synthetisieren (Matilla et al., 2007). Dies konnte visuell während des Wachstums auf Cetrimid-Agar bestätigt werden (**Abbildung 36C**). Bei Wachstumsexperimenten mit den Stämmen *ΔpedE* und *ΔpedE ΔpvdD* in Gegenwart niedriger (10 nM) und hoher (10 μM) La³⁺-Konzentrationen sowie verschiedenen FeSO₄-Konzentrationen (0 – 40 μM) zeigte sich, dass sowohl Stamm *ΔpedE* als auch Stamm *ΔpedE ΔpvdD* mit niedrigen La³⁺-Konzentrationen nur in Gegenwart von ≤ 10 μM FeSO₄ wachsen konnten (**Abbildung 36A**). In Gegenwart von ≥ 20 μM FeSO₄ konnte mit beiden Stämme kein Wachstum bei niedrigen La³⁺-Konzentrationen detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte der *ΔpedE*-Stamm in Gegenwart aller getesteter FeSO₄-Konzentrationen wachsen, wenn 10 μM La³⁺ zum Medium zugesetzt waren (**Abbildung 36B**). Abgesehen davon, dass ohne Zugabe von

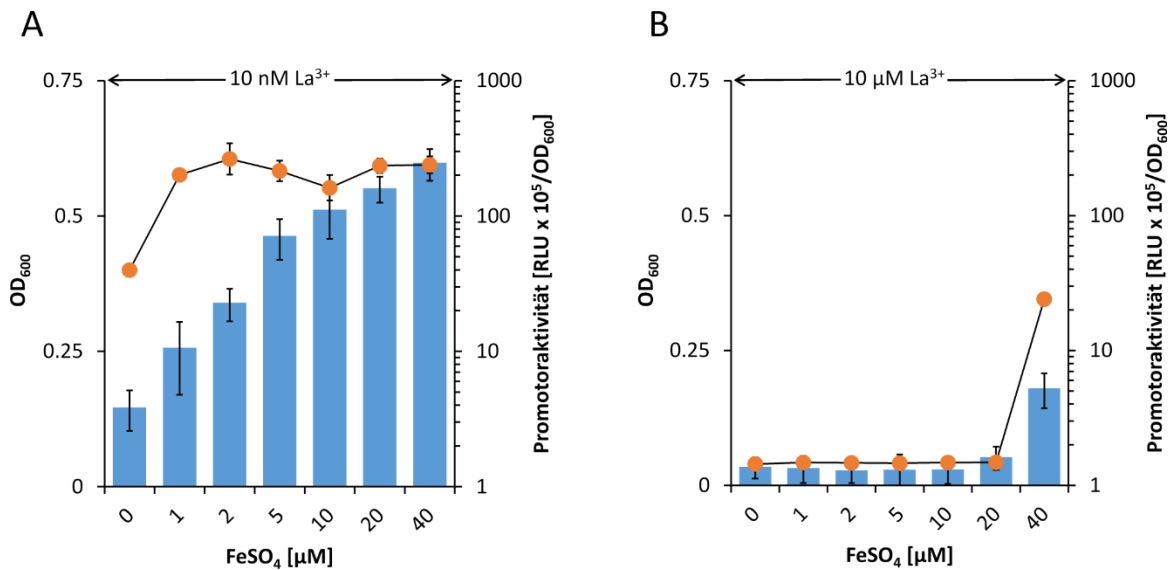


Abbildung 37: Aktivität des *pedE*-Promotors (blaue Balken) in Stamm KT2440* während Inkubation in SEL-freiem M9-Medium versetzt mit 2-Phenylethanol, 10 nM (A) bzw. 10 µM La³⁺ (B) sowie verschiedenen Konzentrationen an FeSO₄. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte nach 8-stündiger Inkubation bei 30°C und 600 rpm. Werte sind angegeben in relativen Lichteinheiten (RLU) x 10⁵ normalisiert auf OD₆₀₀. Orangene Punkte stellen OD₆₀₀ des $\Delta pedH$ -Stamms nach 48-stündiger Inkubation in SEL-freiem M9-Medium versetzt mit 5 mM 2-Phenylethanol, 10 nM (A) oder 10 µM La³⁺ (B) sowie verschiedenen Konzentrationen an FeSO₄ dar. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 350 rpm in 2 ml-Deepwell-Platten. Alle Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

FeSO₄ kein Wachstum detektiert wurde, unterschied sich der Wachstumsphänotyp des $\Delta pedE \Delta pvdD$ -Doppeldeletionsstamms auch in Gegenwart von 10 µM La³⁺ nicht von dem des $\Delta pedE$ -Stamms.

3.6.3 Die Ln³⁺-abhängige Genregulation in *P. putida* KT2440 wird durch das Konzentrationsverhältnis von Fe^{2+/3+} zu La³⁺ beeinflusst.

Aus den in Abschnitt 3.6.2 gezeigten Daten kann gefolgert werden, dass PedE-bedingtes Wachstum direkt durch das Fe^{2+/3+}/La³⁺-Konzentrationsverhältnis beeinflusst wird. Um zu überprüfen, ob und wenn ja, wie das PedE-bedingte Wachstum direkt durch das Konzentrationsverhältnis dieser beiden Metalle beeinflusst wird, wurden sowohl PedE-bedingtes Wachstum als auch die *pedE*-Promotoraktivität unter verschiedenen Fe^{2+/3+}/La³⁺-Konzentrationsverhältnissen untersucht. In Gegenwart von 10 nM La³⁺ war die *pedE*-Promotoraktivität selbst ohne Zugabe von FeSO₄ vergleichsweise hoch und stieg mit zunehmender FeSO₄-Konzentration weiter an (Abbildung 37A). Ebenso konnte in Gegenwart von 10 nM La³⁺ unter allen getesteten FeSO₄-Konzentrationen (0 – 40 µM FeSO₄) Wachstum auf

2-Phenylethanol detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in Gegenwart von 10 μM La^{3+} und FeSO_4 -Konzentrationen $\leq 20 \mu\text{M}$ kein Wachstum und nur geringe *pedE*-Promotoraktivität gemessen (**Abbildung 37B**). Wenn jedoch 40 μM FeSO_4 , was einen vierfachen Überschuss im Vergleich zur La^{3+} -Konzentration darstellt, zum Medium hinzugefügt wurde, konnte eine deutlich erhöhte *pedE*-Promotoraktivität sowie Wachstum in Gegenwart von 10 μM La^{3+} registriert werden.

3.7 Aufnahme von Seltenerdmetallen in *P. putida* KT2440

3.7.1 Das ABC-Transportsystem *pedA1A2BC* ist notwendig für PedH-abhängiges Wachstum bei niedrigen La³⁺-Konzentrationen.

Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit und der Tatsache, dass schon nanomolare REE-Konzentrationen zum Wachstum ausreichen können, wird häufig spekuliert, dass Bakterien, die REE-abhängige PQQ-ADHs produzieren, auch spezifische REE-Aufnahmesysteme besitzen (Cotruvo et al., 2018; Gu et al., 2016; Gu and Semrau, 2017; Picone and Op den Camp, 2019). In diesem Zusammenhang wurde die genomische Umgebung des *ped*-Genclusters in *P. putida* KT2440 (Mückschel et al., 2012) nach Proteinen abgesucht, die mit dem Transport von Metallionen assoziiert werden könnten. Hierbei wurde ein vermeintliches ABC-Transportsystem identifiziert, das sich auf dem *ped*-Gencluster in der Nähe der beiden PQQ-ADH-kodierenden Gene *pedE* und *pedH* befindet (**Abbildung 38A**). Der vermeintliche ABC-Transporter wird laut Operon-Mapper (Taboada et al., 2018) von einem einzelnen Transkript kodiert und besteht aus den Genen PP_2667 (*pedC*), PP_2668 (*pedB*), PP_2669 (*pedA2*) und PP_5538 (*pedA1*). In der Pseudomonas-Datenbank sind *pedC* als ABC-Transporter-Permease, *pedB* als ein ABC-Transporter-ATP-Bindeprotein, *pedA2* als ein YVTN- β -Propeller-Repeat-Protein von unbekannter Funktion und *pedA1* als ein periplasmatisches ABC-Transporter-Substratbindeprotein annotiert (Winsor et al., 2016). Es ist anzumerken, dass bei ABC-Transportern die Richtung des Transports auf Basis der Anwesenheit bzw. der Abwesenheit eines Substratbindeproteins bestimmt werden kann (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Während exportierende ABC-Transportsysteme normalerweise aus einer transmembranen Domäne und einer Nukleotid-Bindedomäne bestehen, enthalten exportierende ABC-Transportsysteme zusätzlich ein periplasmatisches Substratbindeprotein (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Da im ABC-Transportsystem-Operon *pedA1A2BC* das Gen *pedA1* vermeintlich für ein periplasmatisches Substratbindeprotein kodiert, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein Import-System handelt. Um zu überprüfen, ob *pedA1A2BC* für PQQ-ADH-bedingtes Wachstum in Gegenwart von La³⁺ relevant ist, wurden die Deletionsstämme $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ sowie $\Delta pedH \Delta pedA1A2BC$ konstruiert.

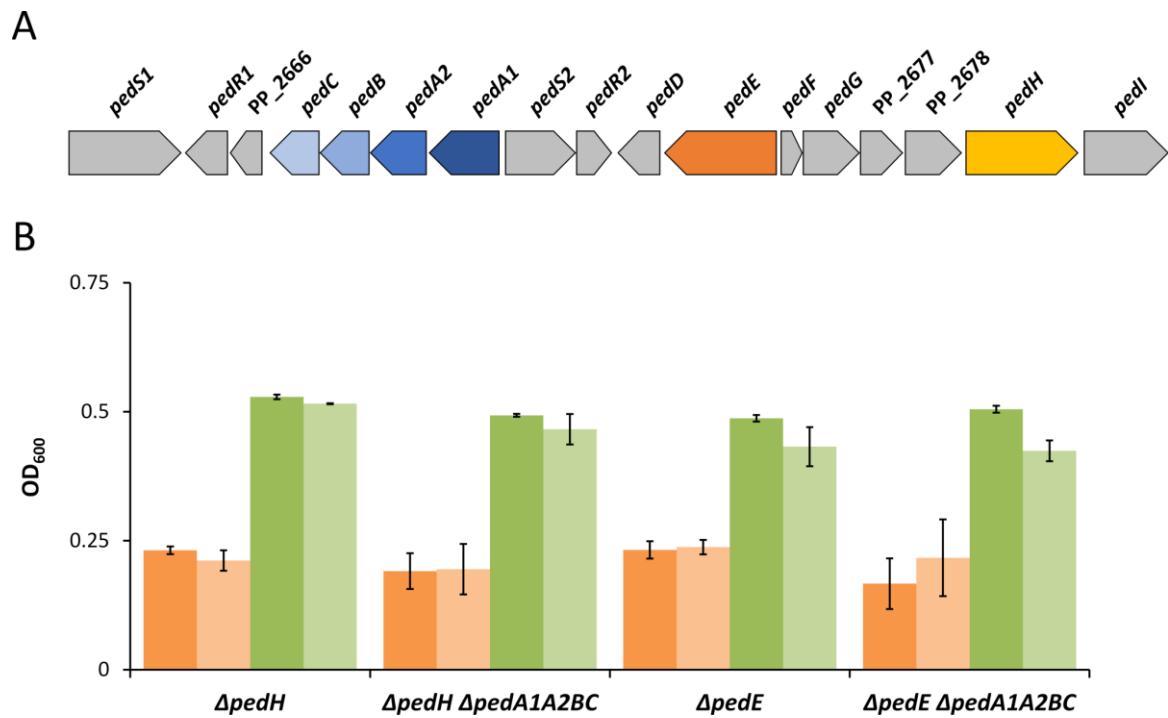


Abbildung 38: (A) Schematische Darstellung der Anordnung des *ped*-Genclusters in *P. putida* KT2440. Nomenklatur in Analogie zu *P. putida* U nach Arias *et al.* (B) Wachstum der Stämme $\Delta pedH$, $\Delta pedH \Delta pedA1A2BC$, $\Delta pedE$ und $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ in M9-Medium mit SEL sowie 5 mM Phenylacetaldehyd (orangene Balken) oder 5 mM Phenylessigsäure (grüne Balken) in Abwesenheit (dunkelorange und dunkelgrüne Balken) oder in Gegenwart (hellorange und hellgrüne Balken) von 10 μM La^{3+} . Die optische Dichte (OD_{600}) wurde nach 48-stündiger Inkubation in 2 ml-Deepwell-Platten bei 30°C und 350 rpm bestimmt. Datenpunkte geben den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung wieder. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann *et al.*, 2019).

Da ABC-Transporter nicht nur auf den Transport von Metallionen, sondern auch auf den Transport von Kohlenstoffverbindungen spezialisiert sein können (Maqbool *et al.*, 2015; Rees *et al.*, 2009), wurde zuerst überprüft, ob das ABC-Transportsystem *pedA1A2BC* in der Aufnahme der Oxidationsprodukte von 2-Phenylethanol, nämlich 2-Phenylacetaldehyd oder Phenylessigsäure, involviert ist. In Wachstumsexperimenten mit den Stämmen $\Delta pedE$, $\Delta pedH$, $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$, und $\Delta pedH \Delta pedA1A2BC$ konnte bei allen Stämmen Wachstum auf 2-Phenylacetaldehyd und Phenylessigsäure detektiert werden, unabhängig von der Gegenwart von La^{3+} (100 μM). Außerdem erreichten alle Stämme unter den verschiedenen Bedingungen ähnliche optische Dichten nach 48-stündiger Inkubation (**Abbildung 38B**). Daher erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass das ABC-Transportsystem in die Aufnahme dieser Kohlenstoffquellen involviert ist.

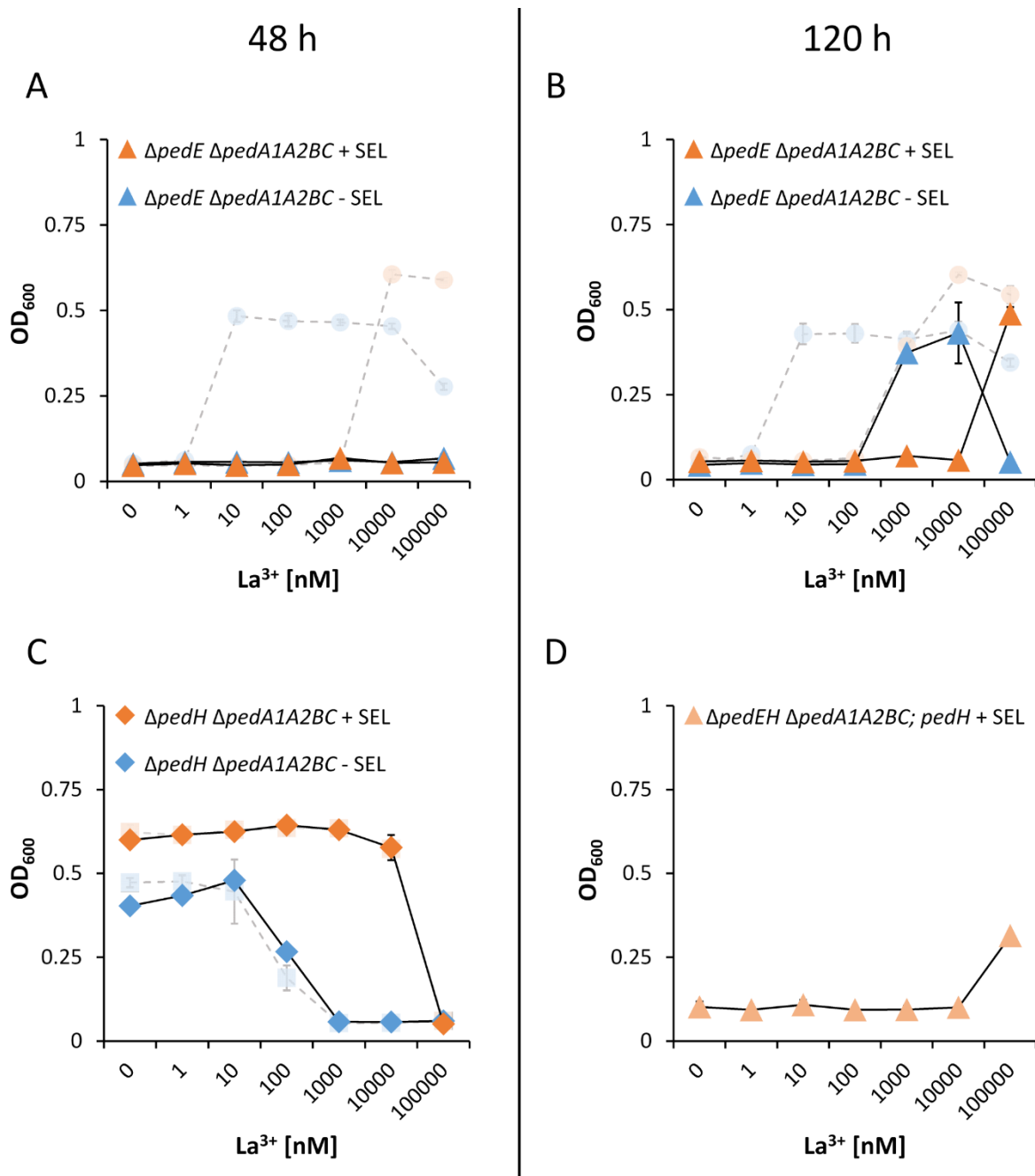


Abbildung 39: Wachstum der Stämme $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ (A und B, Dreiecke) und $\Delta pedH \Delta pedA1A2BC$ (C, Karos) in M9-Medium mit 5 mM 2-Phenylethanol und verschiedenen La^{3+} -Konzentrationen in Gegenwart (orangene Symbole) oder in Abwesenheit (blaue Symbole) von Spurenelementlösung (SEL). Helle Punkte (A und B) und helle Rechtecke (C) zeigen das zugehörige Wachstum der jeweiligen Ausgangsstämme $\Delta pedE$ (A und B) bzw. $\Delta pedH$ (C). Das Wachstum von $\Delta pedE$ in (A) ist eine Wiederverwendung der Daten aus Abbildung 34. (D) Wachstum des Stamms $\Delta pedE \Delta pedH \Delta pedA1A2BC$ mit Plasmid pJEM[PedH] (lachsfarbene Dreiecke) in M9-Medium mit 5 mM 2-Phenylethanol, 20 $\mu g/ml$ Kanamycin, SEL sowie verschiedenen La^{3+} -Konzentrationen. Die optische Dichte (OD_{600}) wurde nach 48-stündiger (A und C) bzw. 120-stündiger (B und D) Inkubation in 2 ml-Deepwell-Platten bei 30°C und 350 rpm bestimmt. Alle Datenpunkte geben den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung wieder. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

In einem nächsten Schritt wurde mit denselben Stämmen das Wachstum auf 2-Phenylethanol in Gegenwart verschiedener La^{3+} -Konzentrationen untersucht. Hierbei konnte Stamm $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ unter keiner der getesteten Bedingungen, unabhängig von SEL-Zugabe, während 48-stündiger Inkubation wachsen (**Abbildung 39A**). Dies ist ein deutlicher Unterschied zum $\Delta pedE$ -Ursprungsstamm, der, abhängig von SEL-Zugabe, in Gegenwart von $\geq 10 \text{ nM La}^{3+}$ bzw. $\geq 10 \mu\text{M La}^{3+}$ wachsen konnte (**Abbildung 34** und **Abbildung 39A**). Nach einer verlängerten Inkubationszeit von 120 h konnte jedoch in Gegenwart von $1 - 10 \mu\text{M La}^{3+}$ (ohne SEL-Zugabe) bzw. $100 \mu\text{M La}^{3+}$ (mit SEL-Zugabe) eingeschränktes Wachstum des $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ -Stamms beobachtet werden (**Abbildung 39B**). Abgesehen von den Unterschieden in den jeweiligen Latenzphasen fiel auf, dass die La^{3+} -Konzentrationen, die $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ für PedH-abhängiges Wachstum benötigte, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von SEL 100-fach höher waren als die, welche für Wachstum des $\Delta pedE$ -Ursprungsstamms erforderlich waren.

Dies lässt die Folgerung zu, dass das ABC-Transportsystem $pedA1A2BC$ für PedH-abhängiges Wachstum bei niedrigen La^{3+} -Konzentrationen essentiell ist. Falls das ABC-Transportsystem für die Aufnahme von REEs in das Cytoplasma der Zelle verantwortlich wäre, sollte die Deletion von $pedA1A2BC$ das Wachstum mit der Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADH PedE nicht beeinflussen. Diese Hypothese konnte in Wachstumsexperimenten mit den Stämmen $\Delta pedH$ und $\Delta pedH \Delta pedA1A2BC$ bestätigt werden. Beide Stämme zeigten einen ähnlichen Wachstumsphänotyp, der sich dadurch auszeichnete, dass Wachstum nur in Gegenwart von La^{3+} -Konzentrationen $< 1 \mu\text{M La}^{3+}$ (ohne SEL-Zugabe) bzw. $< 100 \mu\text{M La}^{3+}$ (mit SEL-Zugabe) detektiert wurde (**Abbildung 39C**).

Sowohl die von ABC-Transportsystemen beförderten Substrate als auch Komponenten von ABC-Transportsystemen selbst können in Signalkaskaden involviert sein, welche transkriptionelle Regulationprozesse beeinflussen (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Das verminderte Wachstum des Stamms $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ könnte somit auf mangelhafte Induktion des $pedH$ -Promotors zurückzuführen sein. Um dies zu überprüfen, wurde Stamm $\Delta pedE \Delta pedH \Delta pedA1A2BC$ konstruiert und in diesem neukonstruierten Stamm wurde PedH von Plasmid pMW10 produziert. Das Plasmid pMW10 erlaubt die Rhamnose-induzierbare Expression von $pedH$ unabhängig von dessen natürlichem Promotor. In Wachstumsexperimenten mit

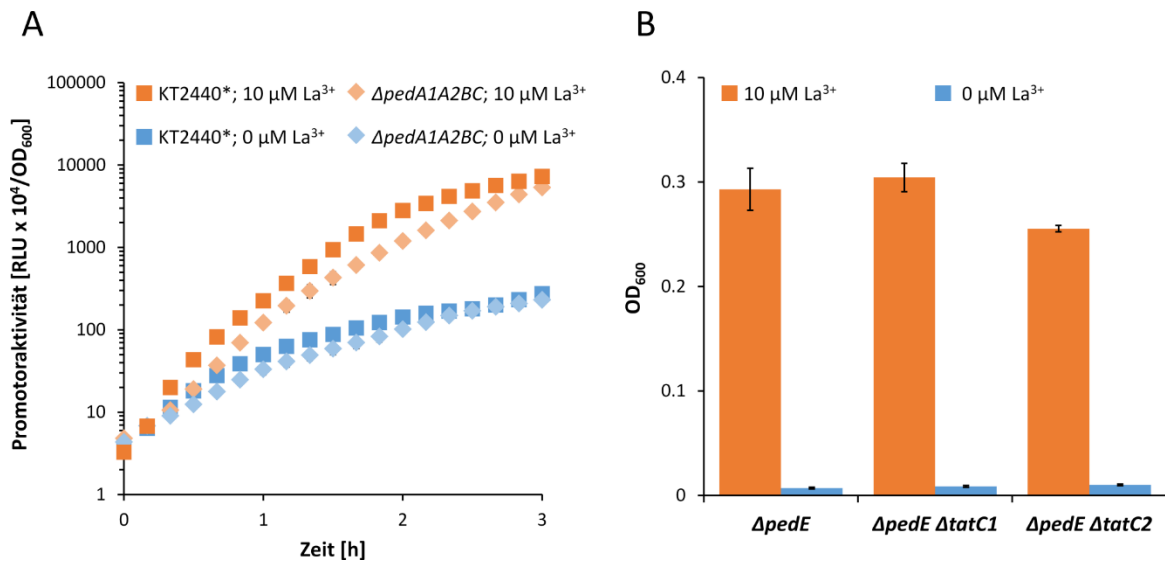


Abbildung 40: (A) *pedH*-Promotoraktivität in den Stämmen KT2440* (dunkle Symbole) sowie $\Delta pedA1A2BC$ (helle Symbole) während Inkubation in M9-Medium versetzt mit SEL und 1 mM 2-Phenylethanol in Abwesenheit oder in Gegenwart von 10 μM La^{3+} . Promotoraktivitäten wurden in regelmäßigen Abständen während dreistündiger Inkubation bei 30°C und 600 rpm gemessen und sind angegeben in relativen Lichteinheiten (RLU) $\times 10^4$ normalisiert auf OD_{600} . (B) Wachstum der Stämme $\Delta pedE$, $\Delta pedE \Delta tatC1$ und $\Delta pedE \Delta tatC2$ in M9-Medium versetzt mit SEL und 5 mM 2-Phenylethanol in Abwesenheit (blaue Balken) oder in Gegenwart (orangene Balken) von 10 μM La^{3+} . Die optische Dichte (OD_{600}) wurde nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C und 180 rpm gemessen. Alle Datenpunkte geben den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung wieder. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2019).

2-Phenylethanol und verschiedenen La^{3+} -Konzentrationen zeigte jedoch auch dieser Stamm den gleichen Wachstumsphänotyp wie $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$: Nur Wachstum in Gegenwart von erhöhten La^{3+} -Konzentrationen und nach einer deutlich längeren Inkubationszeit im Vergleich zum $\Delta pedE$ -Referenzstamm (**Abbildung 39D**). Zusätzlich wurde die *pedH*-Promotoraktivität im Stamm $\Delta pedA1A2BC$ und im KT2440*-Referenzstamm sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von La^{3+} gemessen (**Abbildung 40A**). Hierbei zeigten beide Stämme eine ähnliche, mehr als 20-fache, La^{3+} -bedingte Induktion des *pedH*-Promotors nach dreistündiger Inkubationszeit (26-fache Induktion bei $\text{KT2440}^*::\text{Tn7-}pedH\text{-lux}$ und 23-fache Induktion bei $\Delta pedA1A2BC::\text{Tn7-}pedH\text{-lux}$). Daraus lässt sich schließen, dass die *pedH*-Promotoraktivität durch die Deletion von *pedA1A2BC* nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz zu PedE enthält das Signalpeptid von PedH zwei direkt aufeinanderfolgende Arginine. Dies ist ein Indiz dafür, dass PedH als gefaltetes Protein mithilfe des Twin-arginin-translocation (Tat)-Transportsystems in das Periplasma befördert wird (Berks et al., 2000). Ein möglicher Grund für den

postulierten Transport von La^{3+} ins Cytoplasma könnte folglich sein, dass der Einbau von Lanthaniden im Cytoplasma effizienter verläuft als die periplasmatische Komplementierung des gefalteten *apo*-Enzyms. Eine Untersuchung des Signalpeptids von PedH mit verschiedenen Softwaretools (TatP, PRED-TAT, SignalP 5.0, TatFind) konnte darauf keine eindeutige Antwort liefern, da das PedH-Signalpeptid von den verschiedenen Softwaretools teils als Tat-spezifisches Signalpeptid, teils jedoch auch nicht als Tat-spezifisches Signalpeptid klassifiziert wurde (Almagro Armenteros et al., 2019; Bagos et al., 2010; Bendtsen et al., 2005; Rose et al., 2002). Deshalb wurden anschließend Stämme konstruiert, mit dem Ziel das Tat-Transportsystem zu inaktivieren. Hierzu wurden die *tatC*-Gene *tatC1* [PP_1039] und *tatC2* [PP_5018] einzeln deletiert. Daraus ergaben sich die Stämme $\Delta pedE \Delta tatC1$ und $\Delta pedE \Delta tatC2$. Wäre PedH ein Substrat des Tat-Transportsystems dann sollten diese Stämme entweder nicht mehr zu La^{3+} -abhängigem Wachstum auf 2-Phenylethanol fähig sein oder das La^{3+} -abhängige Wachstum auf 2-Phenylethanol müsste zumindest deutlich beeinträchtigt sein. Sowohl bei Stamm $\Delta pedE \Delta tatC1$ als auch von Stamm $\Delta pedE \Delta tatC2$ konnte jedoch La^{3+} -abhängiges Wachstum beobachtet werden, das sich kaum von dem des $\Delta pedE$ -Referenzstamms unterschied (**Abbildung 40B**). Trotz mehrerer Versuche gelang es jedoch nicht einen $\Delta pedE \Delta tatC1 \Delta tatC2$ -Deletionsstamm zu erstellen.

3.8 La³⁺-bedingten Veränderungen im Proteom von *P. putida* KT2440 sind substratspezifisch und zeigen einen neuen Glycerolstoffwechselweg auf.

Die vorausgegangenen Resultate zeigen, dass die PQQ-ADHs PedE und PedH während des Wachstums auf alkoholischen Kohlenstoffquellen, wie 2-Phenylethanol, Ln³⁺-abhängig reguliert werden und dass in dem zugrundeliegenden komplexen Signalnetzwerk das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 und das PedH-Protein eine entscheidende Rolle spielen. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass noch weitere Faktoren, wie die Eisenkonzentration in der Umgebung, einen Einfluss auf die Ln³⁺-abhängige Regulation der PQQ-ADHs haben. Außerdem deuten mehrere Indizien darauf hin, dass die periplasmatische Membran von *P. putida* ein ABC-Transportsystem enthält, das Ln³⁺-Ionen aktiv ins Cytoplasma transportiert. Um zu überprüfen, ob es weitere Reaktionen von *P. putida* KT2440 auf Seltenerdmetalle gibt, wurden die La³⁺-bedingten Veränderungen im Proteom während des Wachstums auf den vier verschiedenen Kohlenstoffquellen 2-Phenylethanol, Citrat, Glucose und Glycerol untersucht.

3.8.1 Bewertung der Proteomdaten

Cytoplasmatische und transmembrane Proteine wurden mithilfe von SDS extrahiert und anschließend mittels markerloser nano-LC-MS/MS quantifiziert. Hierbei wurden insgesamt 2771 Proteine mit mindestens zwei einzelnen Peptiden und einer Falscherkennungsrate von $\leq 1\%$ identifiziert und quantifiziert. Dies entspricht 50 % des Proteoms von *P. putida* KT2440. Bei einer anschließenden Hauptkomponentenanalyse wurde eine hohe Reproduzierbarkeit der Probenreplikate und klar voneinander unterscheidbare, Kohlenstoffquellen-abhängige Muster festgestellt. Die La³⁺-abhängigen Unterschiede beim Wachstum auf den jeweiligen Kohlenstoffquellen waren im Gegensatz dazu nur sehr gering (**Abbildung A 17**). Proteine wurden dann als unterschiedlich im Vorkommen gewertet, wenn sie zwischen zwei Wachstumsbedingungen ein mehr als zweifach erhöhtes bzw. zweifach verringertes Vorkommen aufwiesen bei einem *P*-Wert ≤ 0.01 (einseitiger *t*-Test, *N* = 3).

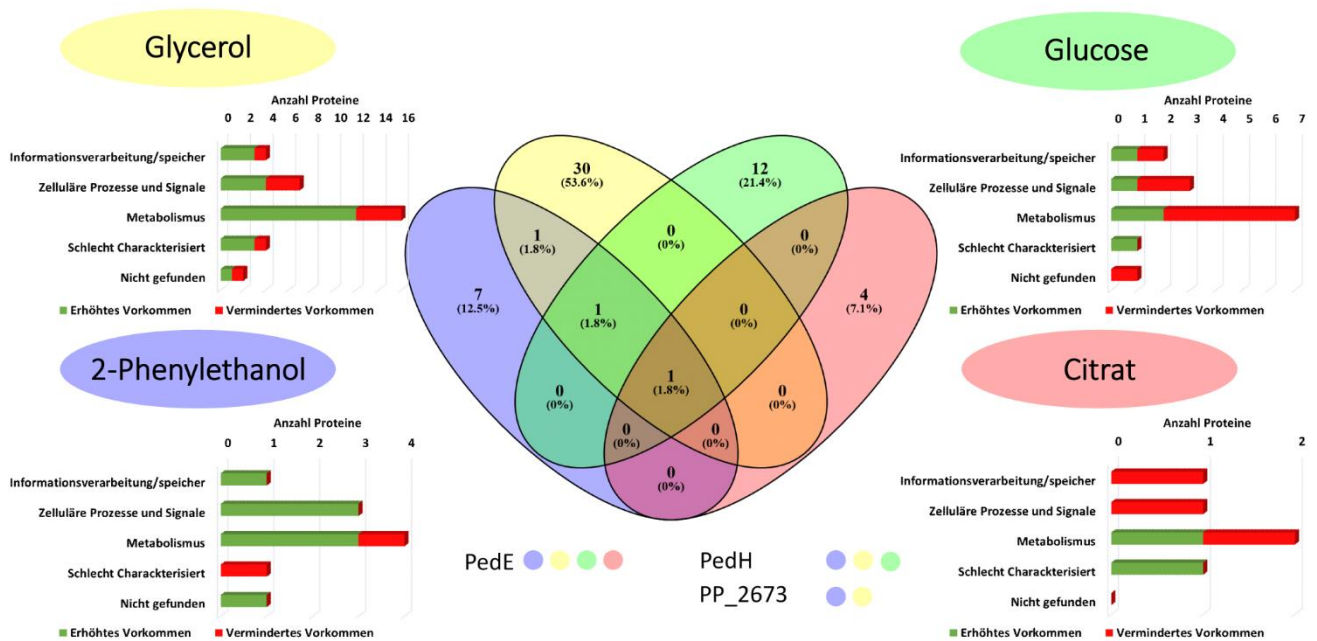


Abbildung 41: Venn-Diagramm (Mitte) der La³⁺-bedingt verschieden vorkommenden Proteine während des Wachstums auf Glycerol, Glucose, 2-Phenylethanol oder Citrat. Proteine, die unter mehreren Wachstumsbedingungen identifiziert wurden, sind unter dem Diagramm angegeben und nach Farbschema klassifiziert (gelber Punkt = Glycerol, grüner Punkt = Glucose, blauer Punkt = 2-Phenylethanol, roter Punkt = Citrat). Die Klassifizierung der La³⁺-bedingt verschieden vorkommenden Proteine wurden mithilfe der COG (Cluster of Orthologous Groups)-Datenbank durchgeführt und ist graphisch für jedes Substrat dargestellt (Galperin et al., 2015). Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

3.8.2 La³⁺-abhängige Veränderungen im Proteom während des Wachstums auf verschiedenen Substraten

Insgesamt 56 Proteine kamen La³⁺-abhängig unterschiedlich häufig während des Wachstums auf den Kohlenstoffquellen 2-Phenylethanol, Citrat, Glucose und Glycerol vor (**Abbildung 41, Tabelle 37, Tabelle A 4 – Tabelle A 6**). Einzig die Ca²⁺-abhängige PQQ-ADH PedE zeigte La³⁺-bedingte Unterschiede im Protein vorkommen während des Wachstums auf allen vier verwendeten Kohlenstoffquellen. Die Ln³⁺-abhängige PQQ-ADH PedH zeigte erhöhtes Vorkommen während des Wachstums auf Glycerol, 2-Phenylethanol und Glucose. Das Vorkommen von PP_2673, einem uncharakterisierten Protein, welches sich auf dem Genom direkt stromaufwärts von *pedE* befindet, war La³⁺-bedingt vermindert während des Wachstums auf Glycerol und 2-Phenylethanol (**Abbildung 41**). Die übrigen 53 identifizierten Proteine wiesen nur unter einer spezifischen Wachstumsbedingung La³⁺-abhängige Unterschiede in ihrem Vorkommen auf (**Tabelle 37, Tabelle A 4 – Tabelle A 6**). Sowohl während des auf 2-Phenylethanol als auch während des Wachstums auf Glycerol wies die Mehrheit

Tabelle 37: Liste der Proteine, die La³⁺-bedingt signifikant unterschiedlich vorkamen während des Wachstums auf Glycerol. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Locus	Protein-name	Prognostizierte Proteinfunktion	Induktion (log ₂)	- log ₁₀ (p-Wert)
PP_2426	CalA	Coniferyl alcohol dehydrogenase	6.28	4.03
PP_2679	PedH	Quinoprotein ethanol dehydrogenase	4.75	3.80
PP_3426	MexF	Multidrug efflux RND transporter	3.93	3.24
PP_3425	MexE	Efflux transporter RND family	3.74	2.18
PP_4921		Transporter, NCS1 nucleoside transporter family	3.65	2.46
PP_2440	AhpF	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	3.13	3.08
PP_3745	GlcD	Glycolate oxidase, putative FAD-linked subunit	3.12	3.32
PP_3747	GlcF	Glycolate oxidase, iron-sulfur subunit	2.67	3.50
PP_3746	GlcE	Glycolate oxidase, putative FAD-binding subunit	2.64	2.98
PP_4922	ThiC	Phosphomethylpyrimidine synthase	2.21	3.84
PP_3748	GlcG	Conserved hypothetical protein	2.06	3.71
PP_3622		Isoquinoline 1-oxidoreductase, beta subunit	1.97	2.82
PP_3178	GarK	Glycerate kinase	1.77	2.85
PP_3621	IorA-II	Isoquinoline 1-oxidoreductase subunit alpha (2Fe-2S clusters)	1.60	2.34
PP_0554	AcoB	Acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase subunit beta	1.54	2.27
PP_3623	AdhB	Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit	1.54	3.67
PP_2484		Transcriptional regulator, ArsR family	1.52	2.37
PP_0734	HemK	Release factor-(glutamine-N5) methyltransferase	1.51	2.67
PP_2439	AhpC	Peroxiredoxin, alkylhydroperoxide reductase - small subunit	1.39	2.02
PP_0556		Acetoin catabolism protein	1.35	2.34
PP_1125		putative Helicase	1.30	3.01
PP_0555	AcoA	Acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase subunit alpha	1.20	2.52
PP_1548		Unknown function	1.19	2.03
PP_1351	PanE	Putative 2-dehydropantoate 2-reductase	-1.45	2.06
PP_2258		Sensory box protein	-1.84	2.40
PP_5658		Unknown function	-1.99	2.93
PP_3557		Methyl-accepting chemotaxis transducer	-2.41	2.33
PP_3603		Transcriptional regulator, GntR family	-2.46	2.73
PP_4313		Putative peptidylprolyl isomerase	-2.55	2.50
PP_0588		Putative copper-binding chaperone	-2.75	2.62
PP_2674	PedE	Quinoprotein ethanol dehydrogenase	-4.25	3.78
PP_2673		Pentapeptide repeat family protein	-5.37	3.71
PP_3732		Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	-5.78	3.07

der identifizierten Proteine (80 % bei Wachstum auf 2-Phenylethanol, 70 % bei Wachstum auf Glycerol) ein erhöhtes Vorkommen auf. Im Gegensatz dazu wies die Mehrheit der identifizierten Proteine (64 % bei Wachstum auf Glucose, 60 % bei Wachstum auf Citrat) während des Wachstums auf Glucose und Citrat ein vermindertes Vorkommen in Gegenwart von La³⁺ auf. Zusätzlich ist laut der COG

Tabelle 38: Spezifische Enzymaktivitäten von aufgereinigtem PedE und aufgereinigtem PedH mit den vier verwendeten Wachstumssubstraten (10 mM). Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Substrat	Spezifische Aktivität (U mg ⁻¹) ^a	
	PedE (1 mM Ca ²⁺)	PedH (1 μM La ³⁺)
Citrat	n.d.	n.d.
Glucose	n.d.	n.d.
Glycerol	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1
2-Phenylethanol	8.0 ± 0.4	6.3 ± 0.3

^aDie Daten stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Aktivitäten unter dem Detektionslimit sind mit n. d. gekennzeichnet.

(Cluster of Orthologous Protein Groups)-Datenbank die Mehrheit der identifizierten Proteine mit einer metabolische Funktion assoziiert (Galperin et al., 2015).

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der La³⁺-bedingten Proteomantwort und der Enzymaktivität von PedE und PedH besteht, wurden die zugehörigen Enzymaktivitäten mit allen vier verwendeten Kohlenstoffquellen gemessen (**Tabelle 38**). Abgesehen von dem bereits bekannten Substrat 2-Phenylethanol wurde auch Glycerol von den PQQ-ADHs PedE und PedH oxidiert. Im Gegensatz dazu konnte weder mit Glucose noch mit Citrat Enzymaktivität detektiert werden.

3.8.3 La³⁺-bedingte Unterschiede im Wachstum von *P. putida* KT2440 auf Glycerol

Basierend auf den Resultaten der Proteom-Messungen und den biochemischen Daten stellte sich die Frage, ob die Enzymaktivität von PedE und PedH mit Glycerol einen Einfluss auf den Glycerolmetabolismus von *P. putida* KT2440 hat. Da der Glycerolmetabolismus von *P. putida* KT2440 ausführlich charakterisiert ist (Nikel et al., 2014a, 2015), wurde der Einfluss von La³⁺ auf das Wachstum von *P. putida* KT2440 auf Glycerol genauer untersucht (**Abbildung 42A, Tabelle 39**). In Gegenwart von La³⁺ war die Latenzphase (λ) deutlich kürzer als in Abwesenheit von La³⁺ ($\text{La}^+ \triangleq 9.8 \pm 0.2$ h, $\text{La}^- \triangleq 18.4 \pm 0.3$ h). Die Anwesenheit von La³⁺ beeinflusste auch die maximale Wachstumsrate (μ_{max} ; $\text{La}^+ \triangleq 0.277 \pm 0.007$ h⁻¹, $\text{La}^- \triangleq 0.351 \pm 0.008$ h⁻¹) sowie die maximale OD₆₀₀, die während der stationären Phase erreicht wurde ($\text{OD}_{600}^{\text{max}}$; $\text{La}^+ \triangleq 0.771 \pm 0.020$, $\text{La}^- \triangleq 0.894 \pm 0.007$).

Da das aufgereinigte PedH-Enzym in *in-vitro*-Experimenten eine dreifach höhere spezifische Aktivität mit Glycerol im Vergleich zu PedE aufwies (**Tabelle 38**), wurde

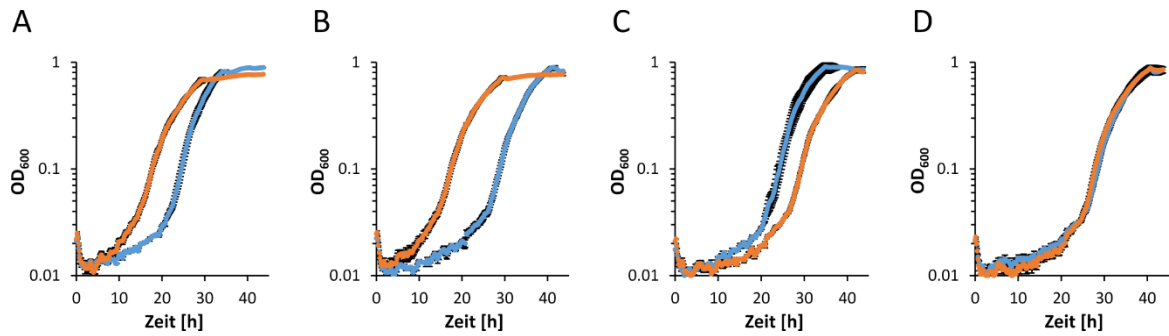


Abbildung 42: Wachstum der *P. putida*-Stämme KT2440* (A), $\Delta pedE$ (B), $\Delta pedH$ (C) und $\Delta pedE \Delta pedH$ (D) in M9-Medium versetzt mit 20 mM Glycerol in Abwesenheit (blaue Punkte) oder in Gegenwart (orangene Punkte) von $10 \mu\text{M La}^{3+}$. Die Inkubation erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten bei 30°C und 250 rpm. Datenpunkte stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und dem Wachstumsverhalten besteht. Bei Wachstumsversuchen mit den Deletionsstämmen $\Delta pedE$, $\Delta pedH$ und $\Delta pedE \Delta pedH$ konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von funktionellem PedE- oder PedH-Enzym und der Länge der Latenzphase festgestellt werden (**Abbildung 42, Tabelle 39**). Stämme, die entweder aufgrund von Gendeletion ($\Delta pedE \Delta pedH$) oder infolge einer Kombination aus Gendeletion und La^{3+} -abhängiger Genregulation ($\Delta pedE$ in Abwesenheit von La^{3+} und $\Delta pedH$ in Gegenwart von La^{3+}) kein funktionelles PedE- und PedH-Enzym produzieren konnten, wiesen die längsten Latenzphasen auf, und zwar im Bereich von $21.0 \pm 0.2 \text{ h}$ bis $21.8 \pm 0.1 \text{ h}$. Im Gegensatz dazu wuchsen Stämme mit funktionell aktivem PedH-Enzym (KT2440* und $\Delta pedE$ in Gegenwart von La^{3+}) schon nach einer fast halb so langen Latenzphase ($\lambda = 9.8 \pm 0.2 \text{ h}$ bzw. $10.5 \pm 0.1 \text{ h}$). Auch Stämme mit aktivem PedE-Enzym wuchsen nach einer kürzeren Latenzphase ($\lambda = 17.9 \pm 0.3 \text{ h}$ bzw. $18.4 \pm 0.3 \text{ h}$ für $\Delta pedH$ respektive KT2440* in Abwesenheit von La^{3+}) als die Stämme, die keine PQQ-ADH zur Glyceroloxidation nutzen konnten. Die Latenzphasen der Stämme, die PedE zur Glyceroloxidation nutzen konnten, waren jedoch deutlich länger als die Latenzphasen der Stämme, die ein funktionelles PedH-Enzym produzierten. Auch bei den $\text{OD}_{600}^{\text{max}}$ -Werten und den μ_{max} -Werten konnte ein Zusammenhang mit PedE- bzw. PedH-Aktivität festgestellt werden. Stämme, die PedH funktional produzieren konnten, erreichten $\text{OD}_{600}^{\text{max}}$ -Werte im Bereich von 0.771 ± 0.020 bis 0.774 ± 0.026 (KT2440* bzw. $\Delta pedE$ in Gegenwart von La^{3+}). Stämme, die PedE funktional produzieren konnten (KT2440* und $\Delta pedH$ in Abwesenheit von La^{3+}) oder Stämme,

Tabelle 39: Latenzzeiten (λ), maximale OD₆₀₀ während stationärer Phase (OD₆₀₀^{max}) und maximale Wachstumsraten (μ_{\max}) von verschiedenen *P. putida*-Stämmen in Abhängigkeit von La³⁺ während des Wachstums auf 20 mM Glycerol^a. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Stamm	λ [h]		OD ₆₀₀ ^{max}		μ_{\max} [h ⁻¹]	
	0 $\mu\text{M La}^{3+}$	10 $\mu\text{M La}^{3+}$	0 $\mu\text{M La}^{3+}$	10 $\mu\text{M La}^{3+}$	0 $\mu\text{M La}^{3+}$	10 $\mu\text{M La}^{3+}$
KT2440*	18.4 ± 0.3	9.8 ± 0.2	0.894 ± 0.007	0.771 ± 0.020	0.351 ± 0.008	0.277 ± 0.007
$\Delta pedE$	21.4 ± 0.4	10.5 ± 0.1	0.916 ± 0.007	0.774 ± 0.026	0.299 ± 0.008	0.289 ± 0.006
$\Delta pedH$	17.9 ± 0.3	21.6 ± 0.5	0.849 ± 0.012	0.887 ± 0.001	0.352 ± 0.028	0.292 ± 0.006
$\Delta pedE \Delta pedH$	21.8 ± 0.1	21.0 ± 0.2	0.887 ± 0.001	0.880 ± 0.066	0.305 ± 0.006	0.315 ± 0.007
$\Delta garK$	21.4 ± 0.1	n.d.	0.858 ± 0.005	0.042 ± 0.002	0.322 ± 0.004	n.d.
$\Delta calA$	18.7 ± 0.5	10.6 ± 0.1	0.891 ± 0.001	0.783 ± 0.009	0.350 ± 0.013	0.307 ± 0.006
$\Delta glcDEF$	19.6 ± 0.1	11.0 ± 0.1	0.885 ± 0.003	0.775 ± 0.006	0.335 ± 0.003	0.287 ± 0.001

^aDie Inkubation erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten bei 30°C und 250 rpm (siehe auch Abbildung 42 und Abbildung 46). Latenzzeiten und maximale Wachstumsraten wurden durch Kurvenfitting an das Richards-Modell (Richards, 1959) mithilfe des „grofit“-Packets in R bestimmt (Kahm et al., 2015). Werte stellen Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung (OD₆₀₀^{max}) oder dem dazugehörigen Standardfehler (λ und μ_{\max}) dar. Für Kulturen, die während der Inkubationszeit die stationäre Phase nicht erreichten, konnten keine Wachstumsparameter bestimmt werden (n. d.).

die unter der jeweiligen Wachstumsbedingung keine der beiden PQQ-ADHs funktional produzieren konnten ($\Delta pedH$ und $\Delta pedE \Delta pedH$ in Gegenwart von La³⁺, $\Delta pedE$ und $\Delta pedE \Delta pedH$ in Abwesenheit von La³⁺), erreichten deutlich höhere OD₆₀₀^{max}-Werte, und zwar zwischen 0.849 ± 0.012 und 0.916 ± 0.007 . Hohe μ_{\max} -Werte wurden mit Stämmen und unter Bedingungen gemessen, in denen das PedE-Enzym zur Glyceroloxidation verfügbar war ($0.351 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0.352 \pm 0.028 \text{ h}^{-1}$ für die Stämme KT2440* bzw. $\Delta pedH$ in Abwesenheit von La³⁺). Deutlich niedrigere μ_{\max} -Werte ($0.277 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ – $0.315 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$) wurden unter Bedingungen detektiert, in denen aktives PedH-Enzym produziert werden konnte (KT2440* und $\Delta pedE$ in Gegenwart von La³⁺) oder unter Bedingungen, in welchen keine der beiden PQQ-ADHs aktiv war ($\Delta pedH$ in Gegenwart von La³⁺, $\Delta pedE$ in Abwesenheit von La³⁺ sowie $\Delta pedE \Delta pedH$ in Abwesenheit und in Gegenwart von La³⁺).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beiden PQQ-ADHs eine wichtige Aufgabe beim Wachstum von *P. putida* auf Glycerol erfüllen und dass sie die Dauer der Latenzphase (λ), die maximal erreichte Zelldichte (OD₆₀₀^{max}) sowie die Wachstumsgeschwindigkeit (μ_{\max}) beeinflussen. In den bekannten Glycerolstoffwechselweg von *P. putida* KT2440 sind ein Glyceroporin (GlpF), eine Glycerolkinase (GlpK), ein transkriptioneller Regulator (GlpR) sowie eine Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GlpD) involviert, welche auf dem *glp*-Operon *glpFKRD* codiert sind (Nikel et al., 2014a, 2015; Poblete-Castro et al., 2019). Auffallend war, dass sowohl die beiden PQQ-ADHs PedE und PedH

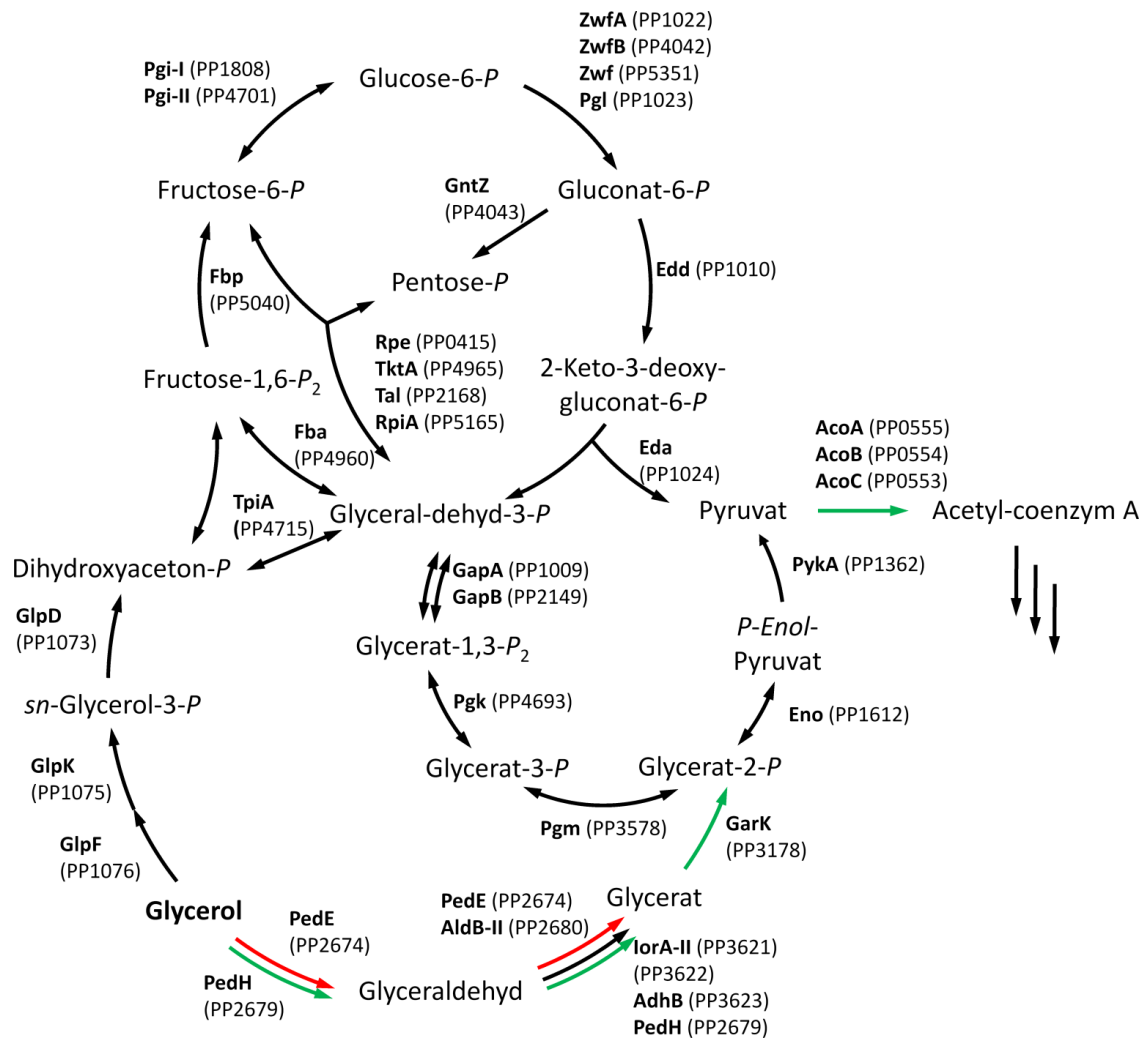


Abbildung 43: Proteine des zentralen Kohlenstoffmetabolismus in *P. putida* KT2440 sowie des neu entdeckten Glycerol-Stoffwechselwegs. Das La³⁺-bedingte Vorkommen der verschiedenen in diesen Reaktionsschritten involvierten Proteine ist mithilfe eines Farbcodes dargestellt (grün = erhöht, rot = vermindert, schwarz = unverändert). Die Abbildung ist angelehnt an ein von (Nikel et al. 2014) publiziertes Schema und wurde um den neu identifizierten Stoffwechselweg für Glycerol ergänzt. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

als auch alle anderen Proteine, die während des Wachstums auf Glycerol La³⁺-abhängig ein unterschiedliches Vorkommen aufwiesen (**Tabelle 37**), kein Teil des oben beschriebenen Glycerolstoffwechselwegs sind. Dies legte die Existenz eines weiteren Stoffwechselwegs für Glycerol in *P. putida* KT2440 nahe (**Abbildung 43**). Basierend auf den Proteom-Daten (**Tabelle 37**) könnte dieser Stoffwechselweg wie folgt aussehen: PedE und/oder PedH katalysieren die Oxidation von Glycerol zu Glyceraldehyd. Anschließend wird Glyceraldehyd zu Glycerat oxidiert entweder durch PedE und/oder PedH, mithilfe der Aldehyddehydrogenase AldB-II oder mittels der Aldehydoxidase, bestehend aus den Proteinen PP_3621 (IorA-II), PP_3622 und

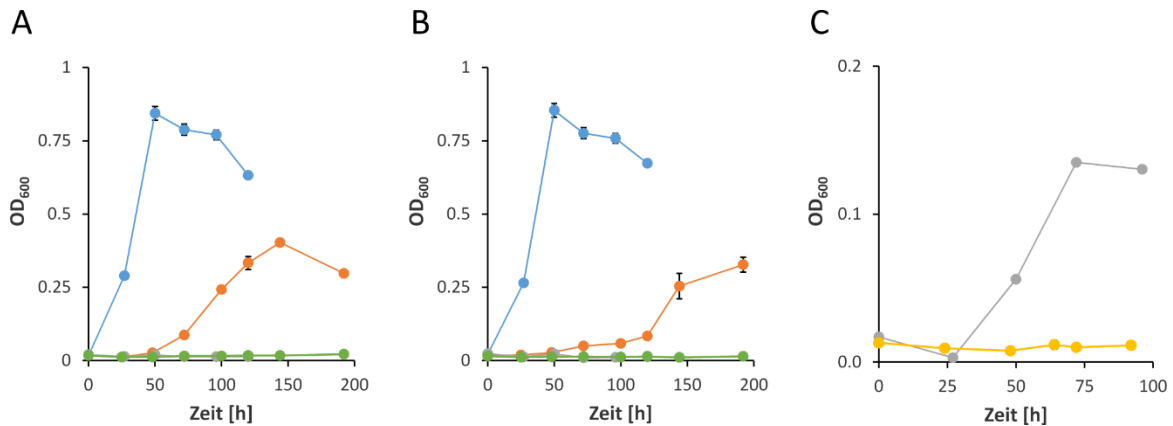


Abbildung 44: (A und B) Wachstum der Stämme $\Delta pedE \Delta pedH$ (blaue Punkte), $\Delta glpFKRD$ (orangene Punkte), $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ (graue Punkte) und $\Delta glpFKRD \Delta garK$ (grüne Punkte) in M9-Medium versetzt mit 20 mM Glycerol in Abwesenheit (A) oder in Gegenwart (B) von 10 μM La^{3+} . (C) Wachstum der Stämme $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ (graue Punkte) und $\Delta garK$ (gelbe Punkte) in M9-Medium versetzt mit 20 mM DL-Glycerat in Abwesenheit von La^{3+} . Inkubation erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten bei 28°C und 220 rpm. Datenpunkte stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

PP_3623 (AdhB). Nach Phosphorylierung durch die Glycerat-Kinase GarK wird Glycerat-2-Phosphat letztendlich in den zentralen Metabolismus eingeschleust.

Die Existenz eines solchen Stoffwechselwegs sollte *glpFKRD*-unabhängiges Wachstum von *P. putida* auf Glycerol erlauben. Folglich sollte ein $\Delta glpFKRD$ -Deletionsstamm auf Glycerol wachsen können. Unter der Annahme, dass außer dem bereits bekannten und dem hier postulierten Stoffwechselweg keine weiteren Stoffwechselwege für Glycerol in *P. putida* vorkommen, im Gegensatz dazu ein $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ -Deletionsstamm oder auch ein $\Delta glpFKRD \Delta garK$ -Deletionsstamm nicht auf Glycerol wachsen können. Um dies zu überprüfen, wurden die oben erwähnten Stämme konstruiert und deren Wachstumsverhalten auf Glycerol in Abwesenheit und in Gegenwart von La^{3+} untersucht (**Abbildung 44A – B**). Hierbei konnte Wachstum von Stamm $\Delta glpFKRD$ auf Glycerol detektiert werden, wenn auch nach einer deutlich längeren Latenzphase und mit einer deutlich niedrigeren Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum KT2440*-Ausgangsstamm und zum $\Delta pedE \Delta pedH$ -Doppeldelentionsstamm (**Abbildung 44A, Abbildung 42A**). Die deutlich längere Latenzphase von $\Delta glpFKRD$ in Gegenwart von La^{3+} deutete daraufhin, dass das Wachstum auf Glycerol in Gegenwart von La^{3+} noch stärker durch die Deletion von *glpFKRD* beeinträchtigt wurde als dies in Abwesenheit von La^{3+} der Fall war (**Abbildung 44B**). Selbst nach mehr als fünftägiger Inkubation konnte kein

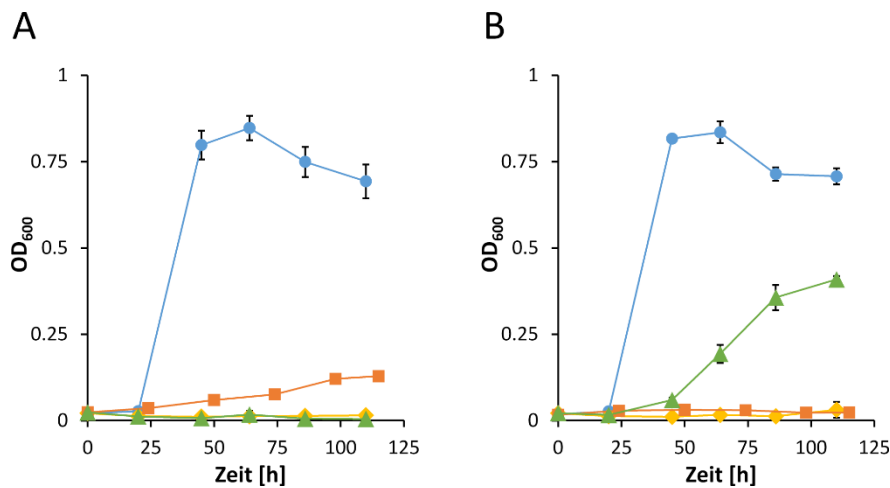


Abbildung 45: Wachstum der Stämme $\Delta pedE \Delta pedH$ (blaue Punkte), $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ (gelbe Karos), $\Delta pedE/H \Delta glp-Tn7M-pedE$ (orangene Rechtecke) und $\Delta pedE/H \Delta glp-Tn7M-pedH$ (grüne Dreiecke) in M9-Medium versetzt mit 20 mM Glycerol in Abwesenheit (A) oder in Gegenwart von 10 μM La^{3+} (B). Die Inkubation erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten bei 28°C und 220 rpm. Datenpunkte stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Wachstum der Stämme $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ und $\Delta glpFKRD \Delta garK$ auf Glycerol detektiert werden. Durch Komplementierung mit *pedE* oder *pedH*, je nach Zugabe von La^{3+} , konnte das Wachstum des Stamms $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ auf Glycerol jedoch wiederhergestellt werden (**Abbildung 45**). Auffallend war, dass das Wachstum des mit *pedE* komplementierten Stamms in Abwesenheit von La^{3+} deutlich langsamer verlief als das Wachstum des mit *pedH* komplementierten Stamms in Gegenwart von La^{3+} . Wie aufgrund der Cofaktorabhängigkeit und der Ln^{3+} -bedingten Genregulation erwartet, konnte durch die Komplementierung mit *pedH* in Abwesenheit von La^{3+} sowie durch die Komplementierung mit *pedE* in Gegenwart von La^{3+} das Wachstum auf Glycerol nicht restituiert werden.

Diese Daten bestätigten die Hypothese, dass ein zweiter Stoffwechselweg für Glycerol in *P. putida* existiert, welcher unabhängig von *glpFKRD* arbeitet und mit der Oxidation von Glycerol durch die PQQ-ADHs PedE und/oder PedH eingeleitet wird (**Abbildung 43**). Die Wachstumsdaten zeigten außerdem, dass auch die putative Glyceratkinase GarK eine essentielle Rolle in diesem Stoffwechselweg spielt, vermutlich indem sie die Phosphorylierung von Glycerat zu Glycerat-2-phosphat katalysiert. Dies hätte zur Folge, dass ein $\Delta garK$ -Deletionsstamm Glycerat nicht mehr als Glycerat-2-Phosphat in den zentralen Metabolismus schleusen kann und somit auch nicht mehr auf Glycerat als Kohlenstoffquelle wachsen kann. Tatsächlich konnte in Experimenten mit

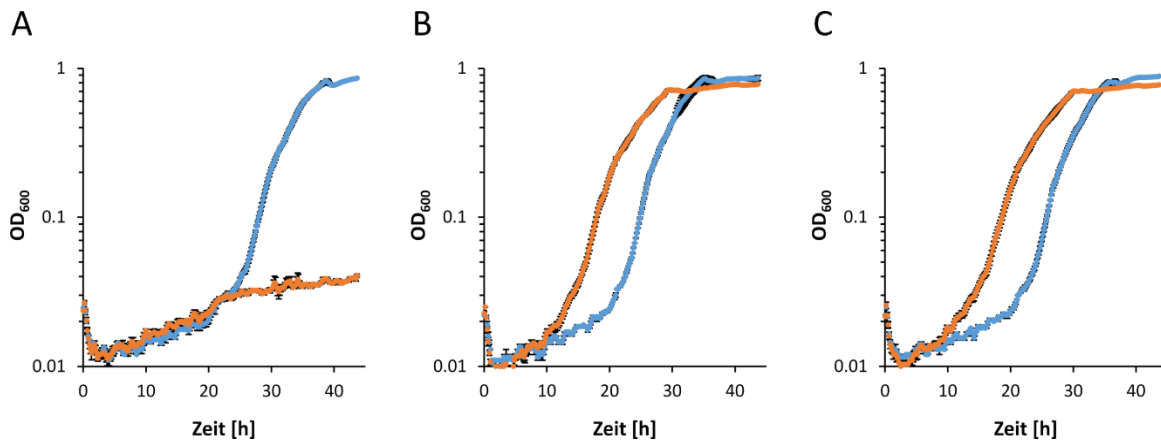


Abbildung 46: Wachstum der Stämme $\Delta garK$ (A), $\Delta calA$ (B) und $\Delta glcDEF$ (C) in M9-Medium versetzt mit 20 mM Glycerol in Abwesenheit (blaue Punkte) oder in Gegenwart (orangene Punkte) von 10 μM La^{3+} . Inkubation erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten bei 30°C und 250 rpm. Datenpunkte stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

dem $\Delta garK$ -Deletionsstamm selbst nach 5-tägiger Inkubation kein Wachstum auf Glycerat als Kohlenstoffquelle detektiert werden, wohingegen Stamm $\Delta pedE \Delta pedH \Delta glpFKRD$ nach 72 h ausgewachsen war (**Abbildung 44C**).

Auch bei Experimenten mit Glycerol als Kohlenstoffquelle war eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums des $\Delta garK$ -Deletionsstamms zu beobachten (**Abbildung 46A, Tabelle 37**). In Gegenwart von La^{3+} konnte nur minimales nicht-exponentielles Wachstum detektiert werden ($OD_{600}^{max} = 0.042 \pm 0.002$ nach 44-stündiger Inkubation). Folglich konnten für diese Bedingung auch keine λ -Werte und μ_{max} -Werte berechnet werden. Im Gegensatz dazu war das Wachstumsverhalten des $\Delta garK$ -Deletionsstamms in Abwesenheit von La^{3+} ($\lambda = 21.4 \pm 0.1$ h, $OD_{600}^{max} = 0.858 \pm 0.005$ und $\mu_{max} = 0.322 \pm 0.004$ h⁻¹) fast identisch mit dem des KT2440*-Ausgangsstamms und des $\Delta pedE \Delta pedH$ -Doppeldelusionsstamms.

In diesem Zusammenhang fiel auf, dass einige der Proteine, die während des Wachstums auf Glycerol am meisten La^{3+} -bedingt reguliert waren, entweder mit Stress assoziiert sind (Multisubstanz-Efflux-Pumpe MexEF (Fetar et al., 2011; Ramos et al., 2002) sowie Alkylhydroperoxid-Reduktase-Untereinheiten AhpC und AhpF (Hishinuma et al., 2006; Springer et al., 2001)) oder Enzyme sind, denen keine direkte Funktion im Glycerolmetabolismus zugeordnet werden kann (putative Corniferyl-Alkoholdehydrogenase CalA (García-Hidalgo et al., 2020) und Glycolatoxidase GlcDEF (Frandsen et al., 2018)). Um zu untersuchen, ob CalA oder GlcDEF einen messbaren Effekt auf das Wachstum auf Glycerol haben, wurden die Stämme $\Delta calA$ und $\Delta glcDEF$

konstruiert. Bei beiden Deletionsstämmen konnten keine bemerkenswerten Unterschiede im Wachstumsverhalten im Vergleich zum KT2440*-Ausgangsstamm beobachtet werden (**Abbildung 46B – C, Tabelle 37**).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der PQQ-ADHs PedE und PedH aus *P. putida* KT2440

Seltenerdmetall(REE)-abhängige PQQ-ADHs waren bisher einzig in methanotrophen und methylotrophen Bakterien bekannt (Fitriyanto et al., 2011b, 2011a; Good et al., 2016; Pol et al., 2014; Wu et al., 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch PedH, eine der zwei PQQ-ADHs aus dem nicht-methanotrophen und nicht-methylotrophen Stamm *P. putida* KT2440, ein REE-abhängiges Enzym ist. Im Gegensatz zu den bekannten REE-abhängigen Enzymen (Good et al., 2016; Huang et al., 2019; Jahn et al., 2018; Lumpe et al., 2018; Pol et al., 2014) kann PedH jedoch nicht nur die leichten und mittleren Lanthanide (La – Gd), sondern auch die schweren Lanthanide, wie Tb, Er und Yb, als Metallcofaktor verwenden (**Abbildung 47**). Außerdem zeigte PedH auch mit dem nicht-lanthanidischen Seltenerdmetall Yttrium als Metallcofaktor katalytische Aktivität. Bisher waren keine Enzyme bekannt, die Yttrium als Metallcofaktor verwenden können (Horovitz, 2000; Jahn et al., 2018). Somit wurde PedH erstes Enzym identifiziert, dass auch nicht-lanthanidische REEs als Metallcofaktor verwendet.

				leichte Lanthanide				mittlere Lanthanide	
Name	Calcium	Scandium	Yttrium	Lanthanum	Cerium	Praseodymium	Neodymium	Promethium	Samarium
Ordnungszahl	20	21	39	57	58	59	60	61	62
Symbol	Ca	Sc	Y	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm
Ionenradius in pm*	112	87	107.5	121.6	119.6	117.9	116.3	114.4	113.2

	mittlere Lanthanide		schwere Lanthanide						
Name	Europium	Gadolinium	Terbium	Dysprosium	Holmium	Erbium	Thulium	Ytterbium	Lutetium
Ordnungszahl	63	64	65	66	67	68	69	70	71
Symbol	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Ionenradius in pm*	112	110.7	109.5	108.3	107.2	106.2	105.2	104.2	103.2

Abbildung 47: Übersicht über die Ionenradien von Calcium, der verschiedenen Lanthanide sowie der nicht-lanthanidischen Seltenerdmetalle. *Ionenradien entsprechen Werten im +3 Oxidationszustand bzw. +2 für Calcium und Koordinationszahl KZ = 9 bzw. KZ = 8 für Scandium und Calcium nach Shannon, 1976.

Für alle getesteten Lanthanide, schwerer als Nd, nahm mit steigender Ordnungszahl auch die Enzymaktivität ab. Eine ähnliche Korrelation zwischen Enzymaktivität und Ordnungszahl der Lanthanide konnte auch bei der Ln³⁺-abhängigen PQQ-MDH aus *Methylococcus fumariolicus* SolV beobachtet werden (Lumpe et al., 2018). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die schwereren Lanthanidionen, welche als Folge der Lanthanidkontraktion mit zunehmender Ordnungszahl einen abnehmenden Ionenradius aufweisen (Bünzli and McGill, 2018), schlechter in die aktive Tasche inkorporiert werden. Tatsächlich wurde auch eine Korrelation zwischen dem Ionenradius und der gemessenen Enzymaktivität von PedH beobachtet (**Abbildung 19**). Die höchsten Enzymaktivitäten wurden bei REES mit Ionenradien zwischen 116.3 pm (Nd³⁺) und 117.9 pm (Pr³⁺) gemessen (Koordinationszahl = 9) (Shannon, 1976). Sowohl mit zunehmendem als auch mit abnehmendem Ionenradius der REEs nahm die Enzymaktivität ab. Außerdem konnte bei PedH eine deutlich höhere Affinität für La³⁺ im Vergleich zu Yb³⁺ und Y³⁺ gemessen werden. Folglich scheint eine positive Korrelation zwischen Affinität für das jeweilige REE-Ion und Enzymaktivität zu bestehen. Die REEs, mit denen die höchsten Affinitäten und Enzymaktivitäten gemessen wurden, sind auch die am häufigsten im Boden vorkommenden REEs (Markert, 1987; Migaszewski and Gałuszka, 2015). Dies lässt darauf schließen, dass die Spezialisierung auf die leichten Lanthanide eine evolutionäre Adaption des Bodenorganismus *P. putida* KT2440 an dessen natürlichen Lebensraum darstellt (Molina et al., 2019).

Kinetische Messungen, welche mit den Metallcofaktoren Pr³⁺ bzw. Ca²⁺ sowie den drei Modellsubstraten Ethanol, Acetaldehyd und 2-Phenylethanol durchgeführt wurden, zeigten, dass mit allen getesteten Substraten die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) von PedH ungefähr doppelt so hoch waren wie die der Ca²⁺-abhängigen PQQ-ADH PedE. Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Studien legen nahe, dass dies auf die im Vergleich zu Ca²⁺ stärkere Lewis-Acidität der REE-Ionen zurückgeführt werden kann (Bogart et al., 2015). Die Substrataffinitäten (K_M) von PedH für Acetaldehyd und 2-Phenylethanol waren signifikant niedriger im Vergleich zu den Affinitäten von PedE für diese Substrate (zweiseitiger *t*-Test, $\alpha = 0.05$, $N = 3$). Die aufgrund des trivalenten REE-Kations höhere Polarität der aktiven Tasche von PedH im Vergleich zur aktiven Tasche von PedE, welche nur ein zweiwertiges Kation (Ca²⁺) enthält, könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein. Trotz der Diskrepanzen in V_{max} und K_M konnten bei

keinen der untersuchten Substrate signifikante Unterschiede in den katalytischen Effizienzen zwischen den beiden Enzymen festgestellt werden (zweiseitiger t -Test, $\alpha = 0.05$, $N = 3$). Außerdem zeigten beide Enzyme Aktivitäten mit dem gleichen, breiten Substratspektrum, das eine Vielzahl an linearen und nicht-linearen, primären und sekundären Alkoholen sowie Aldehyde umfasste. Dies deutet daraufhin, dass es sich bei PedE und PedH um zwei funktionell redundante Enzyme handelt, deren Unterschied einzig in der Metallcofaktor-Abhängigkeit liegt.

4.2 Verbesserung der Enzymstabilität der PQQ-ADH PedE durch semi-rationales Design

Für viele biokatalytische Prozesse spielt die Enzymstabilität eine entscheidende Rolle (Polizzi et al., 2007; Woodley, 2013). Dies gilt besonders für Enzyme, welche wie PQQ-ADHs im Periplasma beheimatet sind oder für Enzyme, die isoliert von Zellen eingesetzt werden. Als erster Schritt hin zur biokatalytischen Anwendung von PQQ-ADHs wurde deshalb die Thermo- und Lösungsmittelstabilität von PedE verbessert. Dazu wurde ein Enzymaktivitätstest in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen entwickelt, der es erlaubt eine Vielzahl an heterolog produzierten PQQ-ADH-Varianten in wenigen Tagen zu durchmustern. Die breite Anwendbarkeit des ohne zeitintensiven Zellaufschluss und Proteinaufreinigung auskommenden Ganzzell-Aktivitätstests konnte in mehreren Experimenten demonstriert werden. Die relativen Enzymaktivitäten, welche mit dem Ganzzell-Aktivitätstest gemessen wurden, stimmten sehr gut mit Werten überein, die mit aufgereinigtem Enzym erzielt wurden. Außerdem konnte die Enzymaktivität von PQQ-ADHs aus verschiedenen Organismen und mit verschiedenen Metallcofaktor-Abhängigkeiten schnell und kohärent bestimmt werden. Zusätzlich konnte mittels Biotransformationen von 2-Phenylethanol gezeigt werden, dass die detektierten Aktivitäten mit der Bildung des Oxidationsprodukts korrespondieren.

Zur Entwicklung von Enzymvarianten mit erhöhter Stabilität wurde eine Kombination aus der B-Fit-Methode und der Konsensusmethode eingesetzt, um die Größe der Mutantenbibliotheken gezielt auf aussichtsreiche Substitutionen an ausgewählten Positionen zu beschränken (Lehmann et al., 2000; Reetz et al., 2006a). Bei der Durchmusterung der Mutantenbibliotheken, welche aus den in einer 3-DM-Datenbank am häufigsten vorkommenden Aminosäuresubstitutionen an sechs Positionen mit hohen B-Faktoren bestanden, wurden die Positionen 91, 408 und 410 identifiziert. An diesen Positionen führte die Substitution mit konservierten Aminosäureresten zu einer signifikanten Verbesserung der Thermostabilität von PedE. Es fiel auf, dass sich die Positionen 91, 408 und 410 auf der gleichen Seite der β -Propellerstruktur des Enzyms befinden, nicht weiter als 20 Å vom aktiven Zentrum entfernt (**Abbildung 48**). Die Positionen 307, 310 und 352, an denen keine

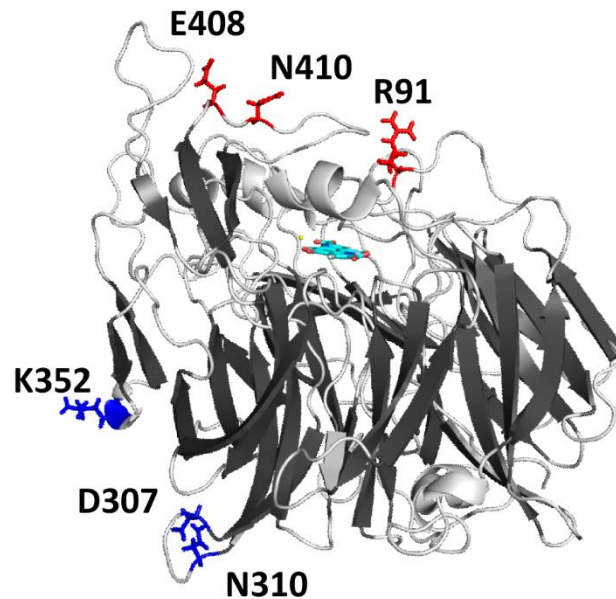


Abbildung 48: Homologiemodell der thermostabilen PedE-Variante PedE^{R91D/E408P/N410K}, dargestellt als Bändermodell. Die Aminosäurereste 91, 408 und 410 sind mit roten Stäben und die Aminosäurereste 307, 310 und 352 mit blauen Stäben dargestellt. Das Ca²⁺-Ion in der aktiven Tasche ist als gelbe Kugel und das PQQ-Molekül mit Stäben in elementabhängiger Färbung dargestellt (C = cyan, O = rot, N = blau). Abbildung ist übernommen aus (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

Mutationen mit stabilisierendem Effekt identifiziert wurden, liegen im Gegensatz dazu weiter vom aktiven Zentrum entfernt, auf der anderen Seite der β -Propellerstruktur. Dies lässt darauf schließen, dass flexible Aminosäurereste, die in der Nähe der aktiven Tasche liegen, einen größeren Einfluss auf die Thermostabilität von Enzymen ausüben als solche, die weiter vom aktiven Zentrum entfernt sind. Auch für die Lipasen CalB aus *Candida antarctica* und LIP1 aus *Candida rugosa* konnte ein ähnlicher Zusammenhang zwischen dem Einfluss einer Aminosäureposition auf die Thermostabilität und deren Entfernung von der aktiven Tasche beobachtet werden (Xie et al., 2014; Zhang et al., 2016b). Die Autoren dieser Studien vermuten, dass in großen Proteinstrukturen temperaturbedingte Konformationsänderungen in unmittelbarer Nähe der aktiven Tasche weitaus schneller zur Inaktivierung des Enzyms führen, als das für Konformationsänderungen abseits der aktiven Tasche der Fall ist. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die Gegenwart des PQQ-Cofaktors, neben seiner Funktion im katalytischen Mechanismus, auch einen starken Einfluss auf die Thermostabilität von PedE hatte. So zeigte sich, dass die PQQ-beladene *holo*-Form des Enzyms weitaus thermostabiler war als die Cofaktor-freie *apo*-Form von PedE.

Die Kombination der stabilisierenden Mutationen konnte die Thermostabilität weiter erhöhen und führte zu Variante PedE^{R91D/E408P/N410K}, welche im Vergleich zum PedE-Wildtyp eine etwa zehnfach höhere Restaktivität nach Inkubation bei 65°C und einen um 7°C erhöhten T_{50}^{60} -Wert von 65°C aufwies. PedE^{R91D/E408P/N410K} zeigte neben einer erhöhten Thermostabilität auch eine erhöhte Stabilität in Gegenwart des Lösungsmittels DMSO. Dies ist besonders für potentielle biotechnologische Anwendungen ein wichtiger Faktor, da in der Biokatalyse Lösungsmitteltoleranz oft eine große Rolle spielt (Bornscheuer et al., 2012; Schmid et al., 2001). Eine positive Korrelation zwischen Thermostabilität und Lösungsmittelbeständigkeit konnte bereits bei mehreren anderen Enzymen beobachtet werden, jedoch sind die genauen Zusammenhänge bis heute nicht vollständig geklärt (Cowan, 1997; Hao and Berry, 2004; Reetz et al., 2010).

Die Untersuchung der Enzym-Kinetiken zeigte für PedE^{R91D/E408P/N410K} eine leicht verminderte maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) gegenüber dem Wildtyp ($5.0 \pm 0.2 \text{ U mg}^{-1}$ vs. $6.1 \pm 0.2 \text{ U mg}^{-1}$), wohingegen kein signifikanter Unterschied bei der Substrataffinität (K_M) sowie der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) detektiert wurde (**Abbildung 18**). Durch das Stabilisieren von drei flexiblen Aminosäurepositionen konnte folglich eine PedE-Variante mit deutlich erhöhter Thermostabilität und Lösungsmitteltoleranz geschaffen werden, welche nur minimale Einbußen in ihren kinetischen Eigenschaften aufwies. Da keine Entwicklungsschritte zur Verbesserung der Enzymaktivität bei 30°C durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass durch den Einsatz weiterer Enzymverbesserungsschritte, wie z.B. gerichteter Evolution, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Variante wieder erhöht werden kann.

In diesem Abschnitt wurde ein neuer Ganzzell-Aktivitätstest für Quinoproteine entwickelt und dieser zur Identifizierung von PQQ-ADHs mit erhöhter Temperaturbeständigkeit eingesetzt. Die beste identifizierte Variante PedE^{R91D/E408P/N410K} wies nicht nur eine drastisch erhöhte Thermostabilität auf, sondern zeigte auch eine deutlich verbesserte Stabilität in Gegenwart des organischen Lösungsmittels DMSO. Dies kann als erster Schritt zur Entwicklung von PQQ-ADHs für biotechnologische Anwendungen angesehen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der PQQ-Cofaktor in PQQ-ADHs nicht nur für die katalytische Funktion essentiell ist, sondern auch entscheidend zur Enzymstabilität beiträgt.

4.3 Änderung der Metallcofaktor-Spezifität von PedE

In allen bis heute bekannten Strukturen REE-abhängiger PQQ-ADHs und PQQ-MDHs befindet sich an der Metallcofaktor-koordinierenden Position 295 der aktiven Tasche (3DM-Nummerierungsschema, siehe **Abbildung 11**) ein Aspartat-Rest (**Tabelle 40**) (Deng et al., 2018; Jahn et al., 2018; Pol et al., 2014). Demgegenüber wird diese Position bei Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADHs von einem Serin- oder Threonin-Rest und bei Ca^{2+} -abhängigen PQQ-MDHs von einem Alanin-Rest eingenommen (Chen et al., 2002; Keitel et al., 2000; Li et al., 2011; Oubrie et al., 2002; Toyama et al., 2005; Williams et al., 2005; Xia et al., 2003). Alle weiteren bekannten Metallcofaktor-koordinierenden Aminosäurereste in REE- und Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADHs und PQQ-MDHs stimmen hingegen miteinander überein.

Es wird deshalb häufig spekuliert, dass die REE-Spezifität von PQQ-ADHs durch die Gegenwart des Aspartat-Rests an Aminosäureposition 295 generiert wird (Good et al., 2016, 2020; Huang et al., 2019; Keltjens et al., 2014). Dies wurde in dieser Arbeit mittels der Variante PedE^{S295D} erstmals experimentell bewiesen. Während der PedE-Wildtyp nur in Gegenwart eines Ca^{2+} -Ions Aktivität aufweist, konnte durch die einfache Substitution S295D ein Enzym generiert werden, das einzig in Gegenwart von REE-Ionen katalytisch aktiv ist. Da der ionische Radius des Ca^{2+} -Ions (Koordinationszahl = 8) den Radien der Lanthanide (Koordinationszahl = 9) sehr ähnelt (**Abbildung 47**), liegt es nahe, dass die Substitution des ungeladenen Serin-Rests durch den negativ geladenen Aspartat-Rest vorwiegend benötigt wird, um die zusätzliche Ladung des jeweiligen REE-Ions zu kompensieren. Diskrepanzen in den bevorzugten Koordinationszahlen zwischen Ca^{2+} und REE-Ionen könnten zusätzlich auch eine Rolle spielen (Jahn et al., 2018). Im Gegensatz zu PedH zeigte die Variante PedE^{S295D} nur geringe Unterschiede in der Enzymaktivität und der Metallaffinität, abhängig von den verschiedenen getesteten, leichten, mittleren und schweren Lanthanidionen. Mit den schweren Lanthanidionen Er^{3+} und Yb^{3+} sowie dem nicht-lanthanidischen REE-Ion Y^{3+} wies PedE^{S295D} sogar eine deutlich höhere Enzymaktivität und Metallaffinität auf als das natürlich vorkommende, REE-abhängige Enzym PedH. Da die Metallcofaktor-koordinierenden Aminosäurereste in PedE^{S295D} identisch sind zu denen in PedH, müssen folglich andere Faktoren, wie z.B. die geringen Unterschiede in den nächstgelegenen Aminosäureresten (55 %

Tabelle 40: Übersicht über die Aminosäureverteilung an Position 295 in bekannten Strukturen von REE- und Ca²⁺-abhängigen PQQ-ADHs und PQQ-MDHs

Position 295	PDB-Code	Beschreibung
Aspartat	4MAEB /6FKW	REE-abhängige PQQ-MDH aus <i>M. fumariolicum</i> SolV (Jahn et al., 2018; Pol et al., 2014)
Aspartat	6DAM	REE-abhängige PQQ-MDH aus <i>M. buryatense</i> 5GB1C (Deng et al., 2018)
Alanin	1LRW	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-MDH aus <i>P. denitrificans</i> (Xia et al., 2003)
Alanin	1W6S	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-MDH aus <i>M. extorquens</i> (Williams et al., 2005)
Alanin	2AD6	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-MDH aus <i>Methylophilus</i> W3A1 (Li et al., 2011)
Serin	1FLG	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-ADH aus <i>P. aeruginosa</i> (Keitel et al., 2000)
Threonin	1KB0	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-ADH aus <i>C. testosteroni</i> (Oubrie et al., 2002)
Threonin	1KV9	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-ADH (ADH-IIB) aus <i>P. putida</i> HK5 (Chen et al., 2002)
Threonin	1YIQ	Ca ²⁺ -abhängige PQQ-ADH (ADH-IIG) aus <i>P. putida</i> HK5 (Toyama et al., 2005)

Sequenzidentität zwischen PedE und PedH), eine entscheidende Rolle für die Metallcofaktor-Spezifität spielen. Ausgehend von PedE^{S295D} sollte es deshalb mittels gezielter Veränderung dieser „second shell“-Aminosäurereste oder *via* unspezifischer gerichteter Evolution möglich sein, neue PQQ-ADHs zu generieren, die eine erhöhte Spezifität für schwere REE-Ionen oder nicht-lanthanidische REE-Ionen besitzen.

Es wird häufig darüber spekuliert, dass aufgrund der im Vergleich zu Ca²⁺ höheren Lewis-Acidität der Seltenerdmetalle, REE-abhängige PQQ-ADHs katalytisch aktiver sind als Ca²⁺-abhängige PQQ-ADHs (Bogart et al., 2015; Cotruvo, 2019). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}), die Substrataffinität (K_M) sowie folglich auch die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) der Variante PedE^{S295D} mit Ethanol war jedoch um ein Vielfaches geringer als diese des PedE-Wildtyps in Gegenwart von Ca²⁺ oder die des PedH-Enzyms in Gegenwart von Pr³⁺ (**Abbildung 13, Abbildung 21**). Folglich müssen andere Faktoren, wie z.B. die optimale Positionierung der Substrate und der Cofaktoren in der aktiven Tasche, eine ebenso wichtige Rolle für die Aktivität spielen. Um in diesem Zusammenhang Unterschiede verlässlich nachweisen zu können, sind jedoch weitere Datensätze, wie genaue Kristallstrukturdaten der verschiedenen Enzyme, unabdingbar.

Im Gegensatz zu PedE lässt sich PedH durch die einfache Mutation von Aspartat²⁹⁵ zu Alanin, Serin oder Threonin nicht in eine Ca²⁺-abhängige PQQ-ADH umwandeln.

Dies ist besonders hervorzuheben für PedH^{D295S}, da in dieser Variante alle Metallcofaktor-koordinierenden Aminosäurereste identisch zu denen in PedE sind und der effektive Ionenradius von Ca²⁺ sich kaum von dem der Ln³⁺-Ionen unterscheidet (Shannon, 1976). Für die Ca²⁺-abhängige Aktivität scheinen also noch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen, wie z.B. die Bindung des PQQ-Cofaktors (Anthony and Williams, 2003) oder die Regenerierung des Redoxcofaktors (Bogart et al., 2015), welche auch mit dem Metallion in Zusammenhang stehen können.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass durch eine einfache Aminosäuresubstitution von Serin zu Aspartat eine Ca²⁺-abhängige PQQ-ADH in eine REE-abhängige PQQ-ADH überführt werden kann. Hiermit konnte nicht nur experimentell belegt werden, dass die Position 295 entscheidend für die Metallcofaktor-Spezifität ist, sondern auch ein Grundstein gelegt werden für die Entwicklung von PQQ-ADHs mit neuen REE-Spezifitäten.

4.4 Entwicklung einer PQQ-ADH zur Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA)

2,5-Furandicarbonsäure (FDCA) ist ein vielversprechender Polymerbaustein zur Herstellung von Polyethylenfuranoat (PEF), dem ein großes Potential als nachhaltige Alternative zu Polyethylenterephthalat (PET) zugeschrieben wird (Hatti-Kaul et al., 2020; Prieto, 2016). Ein entscheidender Schritt in der bioskatalytischen Produktion von FDCA ist die Oxidation von 5-Hydroxymethyl-2-furancarbonsäure (HMFA) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA) (Koopman et al., 2010a; Sajid et al., 2018; Wierckx et al., 2012, 2015). Dieser Reaktionsschritt kann nicht von natürlichen Enzymen wichtiger Produktionsstämme wie *P. putida* (Wierckx et al., 2015), *Gluconobacter oxydans* (Sayed et al., 2019) oder *Comamonas testosteroni* (Zhang et al., 2017) katalysiert werden. Zur Produktion von FDCA werden deshalb in *P. putida* die HMF-Oxidase HmfH aus *Cupriavidus basilensis* HMF14 oder Varianten von HmfH, cytoplasmatisch produziert (Hsu et al., 2020; Koopman et al., 2010b; Pham et al., 2020; Wierckx et al., 2012).

Die Verwendung von Alkoholoxidasen in Ganzzellverfahren bringt jedoch Nachteile mit sich. Die Abhängigkeit des Katalysators von äquimolaren Mengen an molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel kann einen limitierenden Faktor in Hochzelldichtekulturen darstellen (Baldwin and Woodley, 2006). Auch die damit einhergehende Produktion von äquimolaren Mengen an cytotoxischem Wasserstoffperoxid (Linley et al., 2012) als Nebenprodukt sowie die cytoplasmatische Produktion von Furanaldehyden (Heer and Sauer, 2008; Zaldivar et al., 1999) können sich negativ auf die Produktivität auswirken. Obwohl *P. putida* bekannt für seine hohe Stresstoleranz ist, verbraucht die Stressreaktion Energie (Kim and Park, 2014), was zu verminderten Ausbeuten führen kann. Zusätzlich verlangt die zytoplasmatische Lage von HMF-Oxidasen die Expression des hmfT1-Transporters (Wierckx et al., 2015). PQQ-ADHs sind im Gegensatz dazu im Periplasma aktiv, was die cytoplasmatische Akkumulation von toxischen Reaktionsprodukten vermindert (Matsushita et al., 2002). Außerdem übertragen PQQ-ADHs die Elektronen aus der Oxidationsreaktion über die Atmungskette auf molekularen Sauerstoff (Adachi et al., 2007; Goodwin and Anthony, 1998). Dies erlaubt nicht nur die Oxidation von zwei

Substratmolekülen pro Sauerstoffmolekül, sondern stellt auch elektrochemische Energie für die Zelle bereit (García-Horsman et al., 1994).

Deshalb wurde als Teil dieser Arbeit nach einem alternativen Weg, basierend auf PQQ-ADHs, zur Oxidation von HMFA gesucht. Mittels eines neu entwickelten Hochdurchsatzverfahrens, das die Untersuchung mehrerer tausend PQQ-ADH-Varianten in wenigen Tagen ermöglichte, wurden PedH-Mutantenbibliotheken durchmustert, welche aus kombinatorischen Mutationen von je zwei Positionen der aktiven Tasche bestanden. Hierbei konnten die drei Varianten PedH^{F375I/W521S}, PedH^{F375I/W521Q} und PedH^{F375V/W521A} identifiziert werden, welche im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym messbare Enzymaktivität mit HMFA aufwiesen. Es ist hervorzuheben, dass alle drei Varianten derselben Mutantenbibliothek (F375X/W521X) entstammten. Dass keine Einzelmutanten mit HMFA-Aktivität identifiziert wurden, deutet auf einen kombinatorischen Einfluss der beiden Mutationen hin. Dies steht in Einklang mit dem hohen Korrelationsfaktor von 0.79 ($0 \triangleq$ keine Coevolution, $1 \triangleq$ vollständige Coevolution von zwei Aminosäurepositionen), welcher zwischen den beiden Positionen in einer strukturbasierten Sequenzdatenbank (3DM) von PQQ-ADHs ermittelt wurde (Kuipers et al., 2009, 2010). Ein Vergleich der aktiven Tasche von PedH und Variante PedH^{F375V/W521A}, die eine vielfach höhere spezifische Enzymaktivität mit HMFA aufwies als die anderen beiden identifizierten Varianten PedH^{F375I/W521S} und PedH^{F375I/W521Q}, lässt vermuten, dass besonders die räumliche Vergrößerung des Zugangs zur aktiven Tasche für die neu gewonnene Aktivität mit HMFA verantwortlich ist (**Abbildung 49**). In Anbetracht der Tatsache, dass der PedH-Wildtyp jedoch hohe Enzymaktivität mit anderen räumlich anspruchsvollen Substraten wie 1-Octanol und geringe Enzymaktivität mit dem fast identisch großen Substrat HMF aufwies, liegt es nahe, dass auch die höhere Polarität von HMFA für die nicht vorhandene Enzymaktivität des Wildtyps mit diesem Substrat verantwortlich ist. Da vor allem der Zugang zur aktiven Tasche in Variante PedH^{F375V/W521A} deutlich vergrößert erscheint, ist es durchaus möglich, dass für stärker polare Substrate wie HMFA hierdurch weniger unvorteilhafte Interaktionen mit unpolaren Seitenketten vorhanden sind.

Aus der Erhebung der kinetischen Parameter von PedH^{F375V/W521A} ging hervor, dass die katalytische Effizienz von PedH^{F375V/W521A} ($0.19 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) höher ist, als die katalytische Effizienz anderer, bisher charakterisierter HMFA-oxidierenden Enzyme.

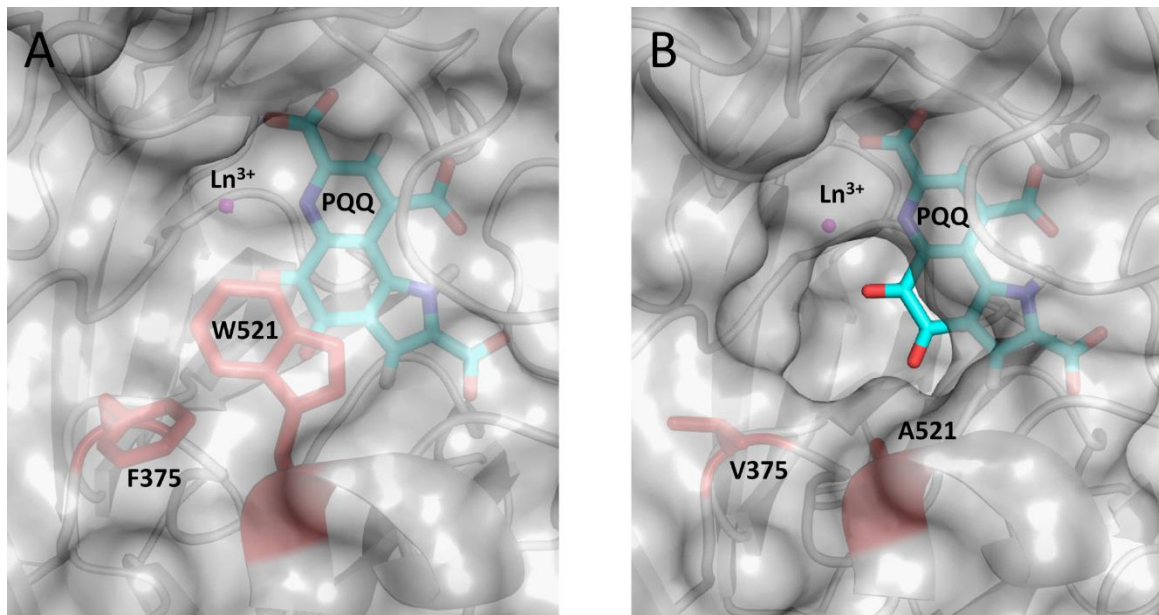


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Proteinoberfläche von PedH (A) und PedH^{F375V/W521A} (B) im Bereich des Eingangs zur aktiven Tasche. Darstellung basiert auf Homologiemodellen, welche mittels Swiss-Model und der Kristallstruktur von ExaA aus *P. aeruginosa* als Vorlage generiert wurden (REF). Die berechnete Proteinoberfläche von PedH ist in transparentem grau dargestellt, der PQQ-Cofaktor sowie die Seitenketten der mutierten Positionen 375 und 521 sind als rote bzw. elementabhängig kolorierte Strichmodelle (C = cyan, O = rot, N = blau) dargestellt. Der Ln³⁺-Metallcofaktor ist als Kugel (magenta) dargestellt.

Sowohl die Arylalkohol-Oxidase AAO aus *Pleurotus eryngii* ($0.017 \pm 0.002 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als auch die HMF-Oxidase HMFO aus *Methylovorus* sp. Stamm MP688 ($0.12 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) weisen teilweise deutlich niedrigere Werte mit HMFA auf (Carro et al., 2015; Dijkman and Fraaije, 2014). Für die im FDCA-Produktionsstamm *P. putida* S12_hmfh heterolog produzierte HMF/Furfural-Oxidoreduktase HmfH aus *Cupriavidus basilensis* HMF14 sind jedoch keine kinetischen Daten mit HMFA in der Literatur vorhanden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) von PedH^{F375V/W521A} mit HMFA ist nur wenig niedriger als die des PedH-Wildtyps mit Ethanol, wohingegen die Substrataffinität (K_M) um mehrere Größenordnungen geringer ausfällt (> 500-fach, **Abbildung 25**). Dies deutet darauf hin, dass durch weiteres Verbessern der Substrataffinität, z. B. mittels gerichteter Evolution oder rationalem Enzymdesigns, Enzymvarianten mit noch weitaus höheren katalytischen Effizienzen möglich sind.

Im Gegensatz zu HMFA konnte trotz der Durchmusterung von mehr als 30 000 Kolonien keine Variante identifiziert werden, die messbare Enzymaktivität mit Glycolsäure aufwies. Die genaue Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden, es ist

jedoch durchaus wahrscheinlich, dass die im Gegensatz zu HMFA in Glycolsäure noch größere Nähe der Karbonsäuregruppe zur Hydroxylgruppe hierbei eine Rolle spielt. Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt durch semi-rationales Design der aktiven Tasche von PedH eine PQQ-ADH generiert werden, welche bis heute bekannten HMFA-oxidierenden Enzymen katalytisch überlegen ist. Im Gegensatz zu diesen benötigt die hier entwickelte PQQ-ADH jedoch keine stöchiometrischen Mengen molekularen Sauerstoffs als Oxidationsmittel, sondern kann in einem Ganzzellansatz den Cofaktor über die Atmungskette regenerieren (Goodwin and Anthony, 1998; Schobert and Görisch, 1999). Dies ermöglicht nicht nur eine effizientere Sauerstoffnutzung, sondern stellt auch elektrochemische Energie für die Zelle bereit. Da PQQ-ADHs periplasmatische Enzyme sind, sollten durch Verwendung dieses Enzyms auch energieaufwendiger Substrat- und Produkttransport über die cytoplasmatische Membran sowie die cytoplasmatische Akkumulation toxischer Furanaldehyde vermieden werden können (Heer and Sauer, 2008; Zaldivar et al., 1999). Somit ist PedH^{F375V/W521A} ein vielversprechender Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer, effizienter FDCA-Produktionsprozesse, basierend auf PQQ-ADHs.

4.5 Physiologische Rolle der PQQ-ADHs PedE und PedH

In den vorherigen Abschnitten wurde unter anderem gezeigt, dass auch der nicht-methanotrophe und nicht-methylotrophe Organismus *P. putida* KT2440 über eine REE-abhängige PQQ-ADH verfügt. Da *P. putida* nicht nur für seine vielfältige Anwendbarkeit in biokatalytischen und bioremediativen Prozessen bekannt ist, sondern auch ein gut erforschtes Bodenbakterium mit Pflanzenwachstumsfördernden Eigenschaften ist, wurde in dieser Arbeit auch die physiologische Rolle des auf den PQQ-ADHs basierenden Oxidationssystems eingehend untersucht (Leveau and Lindow, 2005; Loeschcke and Thies, 2015; Nickel et al., 2014b; Wackett, 2003; Wu et al., 2011). In Wachstumsexperimenten auf Agarplatten zeigte bzw. bestätigte sich, dass die PQQ-ADHs PedE und PedH für effizientes Wachstum auf mehreren alkoholischen volatilen Kohlenstoffverbindungen (VOCs), wie Ethanol (diese Arbeit), Butanol (Simon et al., 2015), 1-Octanol (diese Arbeit) und 2-Phenylethanol (Arias et al., 2008), unabdingbar sind. Es ist hervorzuheben, dass das hier besprochene Experiment nur effizientes Wachstum widerspiegelt und *P. putida* KT2440 auf Ethanol und Butanol unabhängig von PedE und PedH wachsen kann, wenn auch weniger effizient. Im Gegensatz dazu sind die PQQ-ADHs für das Wachstum auf 2-Phenylethanol essentiell. Vor dem Hintergrund, dass sich außer der Metallcofaktor-Spezifität alle weiteren Enzymcharakteristiken, wie Substratspezifität und katalytische Effizienz, kaum zwischen den beiden Enzymen unterscheiden (siehe Abschnitt 4.1), kann davon ausgegangen werden, dass beide Enzyme funktionell redundant sind. Die Koexistenz der beiden Enzyme im Genom von *P. putida* KT2440 dient vermutlich der Gewährleistung der enzymatischen Funktion unter einer Vielzahl verschiedener Bedingungen (Wagner, 2005). Tatsächlich konnte experimentell gezeigt werden, dass für effizientes Wachstum auf verschiedenen alkoholischen VOCs in Gegenwart von La^{3+} die REE-abhängige PQQ-ADH PedH benötigt wird. Im Gegensatz dazu erforderte effizientes Wachstum in Abwesenheit von La^{3+} zwingend die Anwesenheit der Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADH PedE. Eine ähnliche funktionelle Redundanz wurde auch bei den Ln^{3+} - und Ca^{2+} -abhängigen PQQ-MDHs in mehreren methanotrophen bzw. methylotrophen Organismen beobachtet (Farhan Ul Haque et al., 2015; Masuda et al., 2018; Vu et al., 2016). Zudem enthalten viele weitere methanotrophe, methylotrophe sowie nicht-methylotrophe

Organismen mindestens zwei Gene in ihrem Genom, welche für Ln^{3+} - und Ca^{2+} -abhängige PQQ-MDHs bzw. PQQ-ADHs kodieren (Huang et al., 2018, 2019; Masuda et al., 2018; Vu et al., 2016; Yu et al., 2017; Yu and Chistoserdova, 2017).

In *P. putida* KT2440 werden während des Wachstums auf 2-Phenylethanol die PQQ-ADH-kodierenden Gene *pedE* und *pedH* Ln^{3+} -bedingt invers reguliert. Dieses Phänomen, das auch in mehreren methanotrophen bzw. methylotrophen Bakterien beobachtet werden konnte, ist als „ Ln^{3+} -Switch“ bekannt (Farhan Ul Haque et al., 2015; Masuda et al., 2018; Ochsner et al., 2019; Vu et al., 2016).

PedH-bedingtes Wachstum konnte nur in Gegenwart leichter Lanthanide bis einschließlich Sm^{3+} detektiert werden. Mit Lanthaniden, die eine größere Ordnungszahl als Sm^{3+} aufweisen, war hingegen kein Wachstum messbar, obwohl PedH, mit Ausnahme von Sc^{3+} , mit allen getesteten REEs katalytisch aktiv war. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die deutlich geringere Enzymaktivität sein, die PedH mit den mittleren und schweren Lanthaniden sowie dem nicht-lanthanidischen REE Y^{3+} aufwies. Alternativ dazu ist es möglich, dass die REEs erst mittels spezieller Transportmechanismen aufgenommen werden müssen, bevor sie in die Enzyme inkorporiert werden können und dass diese Transporter eine andere REE-Spezifität aufweisen als PedH. Folglich stünden dem Organismus nur die REEs zum Wachstum zur Verfügung, die auch mit dem spezifischen Transportsystem das PedH-Enzym erreichen würden (siehe Abschnitt 4.8).

Nicht nur in ökologischer Hinsicht, sondern auch im Kontext von biotechnologischen Anwendungen ist beachtenswert, dass selbst in Gegenwart von hohen Ca^{2+} -Konzentrationen schon nanomolare Mengen an La^{3+} die inverse Regulation der PQQ-ADHs induzierten und PedH-abhängiges Wachstum ermöglichten. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass PedH das bevorzugte Enzym ist, wenn beide Metallcofaktoren gleichzeitig vorhanden sind, ähnlich wie in *M. buryatense* und *M. extorquens* AM1 (Chu and Lidstrom, 2016; Vu et al., 2016). Es zeigte sich jedoch auch, dass bestimmte, niedrige La^{3+} -Konzentrationsbereiche existieren, in welchen beide PQQ-ADH-Einzelmutanten effizient wachsen können. Dies deutet darauf hin, dass die Produktion der beiden PQQ-ADHs von mehr als einem Regulationssystem gesteuert wird.

Es wird vermutet, dass REE-abhängige PQQ-ADHs bzw. PQQ-MDHs evolutionär früher entstanden sind und weiter verbreitet sind als Ca^{2+} -abhängige PQQ-ADHs bzw.

PQQ-MDHs (Chistoserdova, 2016; Keltjens et al., 2014; Vekeman et al., 2016). Die Entstehung Ca^{2+} -abhängiger PQQ-ADHs bzw. PQQ-MDHs könnte folglich eine Anpassung an Lebensräume sein, in welchen REEs nur schlecht verfügbar sind. Im Vergleich zum Erdboden, und speziell der Rhizosphäre, dem natürlichen Lebensraum von *P. putida* KT2440, sind die REE-Konzentrationen in überirdischen Lebensräumen, wie der Phyllosphäre oder der Endosphäre, meist deutlich geringer (Aubert et al., 2002; Carpenter et al., 2015; Kabata-Pendias and Mukherjee, 2007; Markert, 1987). Es kann daher vermutet werden, dass Ca^{2+} -abhängige PQQ-ADHs und PQQ-MDHs eine wichtige Rolle in der Eroberung neuer Lebensräume, wie z.B. der Kolonisierung von multizellulären Organismen, spielen.

Mikrobielle Gemeinschaften und Populationsstrukturen werden stark durch metabolische Abhängigkeiten unter den in ihnen befindlichen Spezies geprägt (Estrela and Brown, 2013; LaSarre et al., 2017; Zelezniak et al., 2015). Für PQQ-ADHs ist das von besonderer Relevanz, da deren Substrate und Produkte nicht nur entscheidende Zwischenprodukte im globalen Kohlenstoffzyklus sind, sondern auch als Signalmoleküle fungieren können (Jones and Elliot, 2017; Schmidt et al., 2015; Tyc et al., 2016). Die Regulation der Ca^{2+} - und Ln^{3+} -abhängigen PQQ-MDHs in einem methanotrophen Bakterium kann auch durch die Cokultur mit einem nicht-methanotrophen Methylothrop beeinflusst werden (Krause et al., 2017). Krause et al. haben beobachtet, dass einhergehend mit der durch die Cokultivierung induzierten Veränderung in der Genexpression der Ln^{3+} -abhängigen PQQ-MDH hin zur Ca^{2+} -abhängigen PQQ-MDH in einem methanotrophen Bakterium, Methanol in das Wachstumsmedium abgegeben wurde. Dieses diente dem nicht-methanotrophen Methylothrop als Kohlestoffquelle und begünstigte dessen Wachstum. Die genaue Ursache für dieses Phänomen konnte noch nicht geklärt werden, es zeigt jedoch auf, dass die verschiedenen PQQ-Enzyme auch für das Zusammenleben mikrobieller Gemeinschaften von großer Bedeutung sind. Dass REE-abhängige PQQ-Enzyme auch in nicht-methanotrophen und nicht-methylothropen Bakterien vorkommen, deutet darauf hin, dass solche oder ähnliche Zusammenhänge in einem viel breiteren ökologischen Kontext von Bedeutung sein könnten.

4.6 Die Kontrolle der Ln^{3+} -abhängigen Regulation von *pedE* und *pedH* erfolgt durch das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 und das PedH-Protein.

Die in Abschnitt 4.5 beschriebene Ln^{3+} -abhängige, inverse Genregulation von *pedE* und *pedH* in *P. putida* KT2440 ist die erste bekannte Variante der „ Ln^{3+} -Switch“ in einem nicht-methylotrophen Organismus. Promotoraktivitätstests zeigten, dass die Regulation von *pedH* stark durch das PedH-Protein selbst beeinflusst wird. Dies deutete darauf hin, dass PedH, neben seiner enzymatischen Funktion, auch als Ln^{3+} -Sensor fungiert.

Im methylotrophen Modellorganismus *M. extorquens* AM1 ist die Transkription der Ca^{2+} -abhängigen PQQ-MDH *mxoFI* von der Anwesenheit des XoxF-Proteins (Ln^{3+} -abhängige PQQ-MDH) abhängig (Skovran et al., 2011; Vu et al., 2016). Ein ähnlicher Zusammenhang scheint in der Regulation von *pedE*, welches in *P. putida* KT2440 für die Ca^{2+} -abhängige PQQ-ADH PedE kodiert, nicht vorhanden zu sein, da sowohl in einem $\Delta\textit{pedH}$ - als auch in einem $\Delta\textit{pedE}$ -Deletionsstamm eine hohe *pedE*-Promotoraktivität in Abwesenheit von La^{3+} gemessen wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, abgesehen von PedH, besonders das Zweikomponentensystem, bestehend aus der Sensorhistidinkinase PedS2 und dem Regulationsprotein PedR2, für die Ln^{3+} -abhängige Regulation von *pedE* und *pedH* verantwortlich ist.

Beobachtet wurde außerdem, dass ähnlich den spontanen Suppressormutanten, die in *M. buryatense* durch Mutationen der Sensorhistidinkinase MxaY hervorgerufen werden (Chu et al., 2016), auch in *P. putida* KT2440 Punktmutationen in der periplasmatischen Region von PedS2 (PedS2^{S178P}) die Ln^{3+} -bedingte Repression von *pedE* aufheben. Es ist anzumerken, dass mehrere unterschiedliche Punktmutationen gefunden wurden, die zu dem gleichen Suppressorphänotyp führten. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass das Auftreten von ähnlichen Suppressormutanten in einer Vielzahl weiterer Studien beobachtet wurde, zum Beispiel bei *Methylobacterium extorquens* AM1, *Methylobacterium buryatense* 5GB1C und *Methylobacterium aquaticum* 22A (Chu and Lidstrom, 2016; Masuda et al., 2018; Skovran et al., 2011).

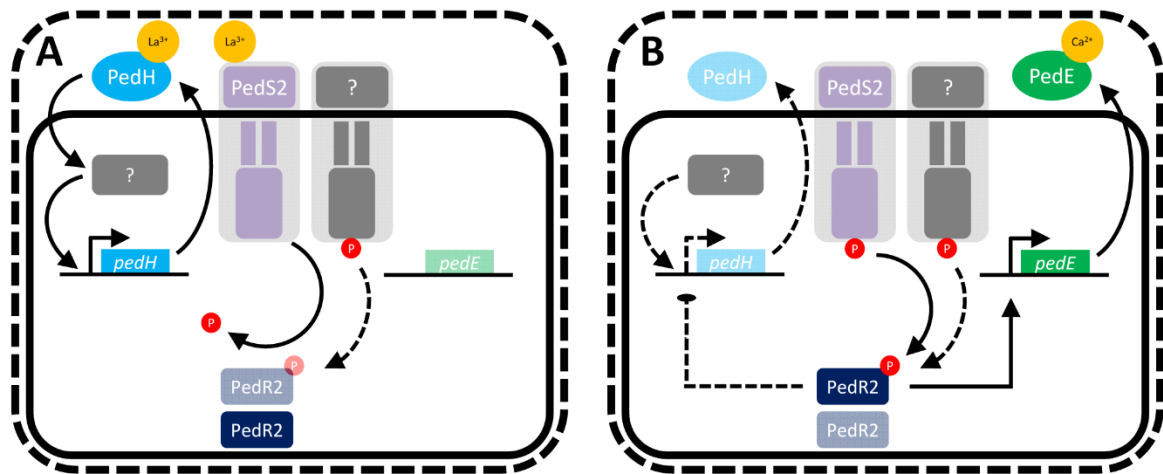


Abbildung 50: Schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus der Ln^{3+} -abhängigen Regulation von *pedE* und *pedH* in *P. putida* KT2440. (A) In Gegenwart von Ln^{3+} binden Ln^{3+} -Ionen an PedH, was zu enzymatischer Aktivität und Induktion von *pedH*-Promotoraktivität *via* eines noch ungeklärten Mechanismus führt (verdeutlicht durch graue Box). Ebenso binden Ln^{3+} -Ionen an die periplasmatische Domäne von PedS2, was zu Verlust der Kinaseaktivität führt. Vermutlich fungiert Ln^{3+} -gebundenes PedS2 auch als Phosphatase, um Interferenz von einer vermuteten zweiten Kinase (verdeutlicht durch graues Membranprotein), welche Ln^{3+} -unabhängig fungiert, zu vermindern. Folglich ist die Konzentration an phosphoryliertem PedR2 und somit auch die *pedE*-Promotoraktivität unter diesen Bedingungen niedrig. (B) In Abwesenheit von Ln^{3+} -Ionen ist PedS2 aktiv und phosphoryliert das Regulationsprotein PedR2 an Position D53. Phosphoryliertes PedR2 fungiert sowohl als Aktivator des *pedE*-Promotors als auch als Repressor von *pedH*. Durchgezogene Linien zeigen starken regulatorischen Effekt oder Proteinproduktion an, wohingegen gestrichelte Linien einen schwächeren regulatorischen Effekt oder geringere Proteinproduktion anzeigen. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2018).

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5.6 deuten außerdem daraufhin, dass PedS2 nicht nur für die Regulation von *pedE*, sondern auch für die Repression von *pedH* in Abwesenheit von Ln^{3+} verantwortlich ist. Dies basiert auf mehreren Beobachtungen: Sowohl der Wachstumsphänotyp des $\Delta pedE \Delta pedS2$ -Deletionsstamms als auch die *pedH*-Promotoraktivität in diesem Stamm unterscheiden sich nicht von denen des $\Delta pedE$ -Stamms. Im Vergleich dazu fällt jedoch im Supressorstamm $\Delta pedE pedS2^{S178P}$ die Latenzphase in Gegenwart von La^{3+} deutlich länger aus und auch die *pedH*-Promotoraktivität dieses Stamms ist unter diesen Bedingungen stark vermindert. Zusätzlich ergaben Komplementierungsexperimenten mit verschiedenen PedR2-Varianten, dass die *pedS2*-bedingte Regulation von *pedE* und *pedH* über das LuxR-ähnliche Regulationsprotein PedR2 erfolgt. Aus den Ergebnissen der Komplementierungsexperimente lässt sich zudem ableiten, dass die Sensorhistidinkinase PedS2 in Abwesenheit von La^{3+} aktiv ist und PedR2 an der konservierten Position D53 phosphoryliert (Bourret et al., 1990; Milani et al., 2005).

Phosphoryliertes PedR2 bewirkt sowohl die Aktivierung des *pedE*-Promotors als auch eine gleichzeitige Repression des *pedH*-Promotors (**Abbildung 50B**).

In *Azospirillum brasilense* Sp7 ist bei der Expression der PQQ-ADH *exaA* neben einem LuxR-ähnlichen Regulationsprotein, welches 45 % Sequenzidentität mit PedR2 aufweist, zusätzlich auch ein σ^{54} -Protein involviert, das mit dem LuxR-ähnlichen Regulationsprotein physisch interagiert (Singh et al., 2017). Es erscheint deshalb durchaus möglich, dass auch PedR2 mit einem spezifischen Sigma-Faktor interagiert, um den *pedE*-Promotor zu aktivieren. In dieser Arbeit wurden jedoch keine Experimente zu diesem Thema durchgeführt.

Es ist beachtenswert, dass der $\Delta pedH \Delta pedS2$ -Stamm sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von La^{3+} noch immer auf 2-Phenylethanol wachsen konnte. Das Wachstum erfolgte jedoch erst nach einer deutlich längeren Latenzphase. Auch waren bei diesem Stamm die *pedE*-Promotoraktivität deutlich verringert im Vergleich zum Ausgangsstamm $\Delta pedH$. Da in Abschnitt 3.5.5 bzw. in Abschnitt 3.5.7 gezeigt wurde, dass für das Wachstum von Stamm $\Delta pedH \Delta pedS2$ auf 2-Phenylethanol *pedE*-Expression essentiell ist und dass für *pedE*-Promotoraktivität phosphoryliertes PedR2 unabdingbar ist, muss in *P. putida* KT2440 neben PedS2 noch eine weitere Kinase präsent sein, die PedR2 phosphorylieren kann (angezeigt als graues Membranprotein in **Abbildung 50**). Unter der Annahme, dass eine solche zusätzliche Kinase existiert, ist es bemerkenswert, dass im Gegensatz zu Stamm $\Delta pedH \Delta pedS2$ ein $\Delta pedH$ -Einzeldelentionsstamm nur dann in Gegenwart von La^{3+} wächst, wenn PedS2 eine Suppressormutation enthält, wie es bei Stamm $\Delta pedH pedS2^{S178P}$ der Fall war (siehe **Abbildung 31A**). Die Aktivität der vermuteten Kinase müsste folglich unterdrückt sein und nicht zum Wachstum ausreichen, solange PedS2 funktional vorliegt. Es ist vielfach beschrieben, dass Sensorhistidinkinasen auch Phosphatase-Aktivität besitzen können (Agrawal et al., 2016; Rowland and Deeds, 2014; Stock et al., 2000). Deshalb liegt es nahe, dass PedS2, neben seiner Funktion als Kinase in Abwesenheit von La^{3+} , zusätzlich in Gegenwart von La^{3+} als Phosphatase aktiv ist, was der unspezifischen Kinase entgegenwirkt und die korrekte Funktion der La^{3+} -bedingten Regulation von *pedE* gewährleistet.

Der vermutete Mechanismus der Genregulation in Gegenwart von La^{3+} verläuft wie folgt (**Abbildung 50A**): La^{3+} bindet an die periplasmatische Domäne von PedS2, woraufhin PedS2 seine Kinaseaktivität verliert, als Phosphatase agiert und PedR2

dephosphoryliert. Dadurch sinkt die Konzentration an phosphoryliertem PedR2, weshalb sowohl die Repression von *pedH* als auch die Aktivierung von *pedE* aufgehoben werden. Gleichzeitig wird die Transkription von *pedH* aktiviert, mittels eines noch unbekanntes Mechanismus. Es liegt nahe, dass in diesem Mechanismus das PedH-Protein als Ln^{3+} -Sensor involviert ist.

In *M. extorquens* AM1 nehmen die zwei PQQ-Enzyme XoxF1 und XoxF2 eine zentrale Rolle in der Ln^{3+} -abhängigen Regulation der PQQ-ADHs ein, wohingegen in *M. buryatense* diese Regulation durch die Sensorhistidinkinase MxaY kontrolliert wird (Chu et al., 2016; Vu et al., 2016). In *P. putida* KT2440 hingegen scheint eine Kombination aus mehreren, unabhängigen Regulationswegen vorhanden zu sein, nämlich der PedS2/PedR2-abhängige Regulationsweg sowie der Regulationsweg, in welchem das PedH-Protein eine zentrale Rolle spielt.

Zusammenfassend ist der hier postulierte Mechanismus zur Ln^{3+} -abhängigen Genregulation in *P. putida* KT2440 deutlich verschieden zu bekannten Mechanismen in methanotrophen und methylotrophen Organismen, und ein weiterer Schritt auf dem Weg zu verstehen, welche biologischen Funktionen Seltenerdmetalle in der Natur erfüllen.

4.7 Übergangsmetalle beeinflussen das La^{3+} -abhängige Wachstum von *P. putida* KT2440.

Neben der in Abschnitt 4.6 besprochenen Regulation durch das Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 sowie das PedH-Protein, beeinflussen auch Übergangsmetalle wie Fe stark das La^{3+} -abhängige Wachstum von *P. putida* KT2440. Dies wurde besonders bei der minimalen La^{3+} -Konzentration deutlich, welche erforderlich war, um PedH-bedingtes Wachstum auf 2-Phenylethanol zu ermöglichen bzw. PedE-bedingtes Wachstum auf 2-Phenylethanol zu unterdrücken. Wenn Fe zum Wachstumsmedium zugesetzt wurde, erhöhte sich diese „kritische“ La^{3+} -Konzentration um mehrere Größenordnungen. Die mit geringer Eisenbioverfügbarkeit verknüpfte Produktion des Fe-Chelators Pyoverdine steht nicht im Zusammenhang mit diesem Effekt, wie Experimente mit *pvdD*-Mutanten belegten. Die Ergebnisse in Abschnitt 3.6 legen nahe, dass eine Fehlmetallierung (Mismetallation: Die unspezifische Besetzung von Metallbindestellen durch andere Metallionen (Foster et al., 2014; Tottey et al., 2008; Tripathi and Srivastava, 2006; Webb, 1970)) der Grund für die deutliche Erhöhung der „kritischen“ La^{3+} -Konzentration in Gegenwart großer Eisenverfügbarkeit ist. In diesem Szenario würden Fe-Ionen, welche nicht nur im relativen Überschuss im Verhältnis zu La^{3+} im Wachstumsmedium vorhanden sind, sondern auch den gleichen +3-Oxidationszustand wie La^{3+} einnehmen können, die La^{3+} -Bindestellen in La^{3+} -bindenden Proteinen besetzen und diese somit an ihrer korrekten Funktion hindern. Ein Indiz dafür ist, dass die La^{3+} -bedingte Repression von *pedE* konzentrationsabhängig durch Zugabe FeSO_4 aufgehoben wurde. Außerdem beeinflusste die Zugabe von FeSO_4 die minimale La^{3+} -Konzentration, die für PedH-bedingtes Wachstum notwendig war, unterschiedlich stark im Vergleich zur minimalen La^{3+} -Konzentration, welche zur Repression von PedE-bedingtem Wachstum führte. In Gegenwart hoher FeSO_4 -Konzentrationen war eine 1000-fach höhere La^{3+} -Konzentration für PedH-bedingtes Wachstum notwendig. Im Vergleich dazu erforderte die Repression PedE-bedingten Wachstum nur eine 100-fach höhere La^{3+} -Konzentration unter den gleichen Bedingungen. In Abschnitt 4.5 bzw. Abschnitt 4.6 wurde gezeigt, dass die Repression von *pedE* über PedS2 erfolgt, wohingegen für PedH-Enzymaktivität und vermutlich auch *pedH*-Promotoraktivität das PedH-Protein

selbst La^{3+} -Ionen binden muss. Unter der Annahme, dass sich die La^{3+} -Bindeaffinitäten von PedH und PedS2 voneinander unterscheiden, sind die Differenzen in den „kritischen“ La^{3+} -Konzentrationen folglich ein weiteres Indiz für eine $\text{Fe}^{2+/3+}$ -bedingte Fehlmetallierung von La^{3+} -bindenden Proteinen.

Der Pyoverdin-Deletionsstamm $\Delta pedE \Delta pvdD$ zeigte kein Wachstum, wenn dem Wachstumsmedium hohe Konzentrationen an La^{3+} und kein $\text{Fe}^{2+/3+}$ zugesetzt wurde. Auch hierfür ist Fehlmetallierung eine mögliche Ursache. In diesem Fall könnten die $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Bindestellen der Pyoverdin-unabhängigen Eisenaufnahmesysteme, wie z.B. die des Ferrichrom-, Ferrioxamin- oder Eisencitrat-Aufnahmemechanismus (Cornelis, 2010; Jurkevitch et al., 1992), von La^{3+} -Ionen besetzt sein und somit die Bindung von $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Ionen verhindern. Als Folge könnten aus den Spuren an $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Ionen, die vermutlich auch in Minimalmedium vorhanden sind, dem kein Fe zugesetzt wurde, nicht genügend $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Ionen für ein effektives Wachstum aufgenommen werden.

Nicht nur $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Ionen, sondern auch mikromolare Konzentrationen an Cu^{2+} oder Zn^{2+} inhibierten PedH-bedingtes Wachstum auf 2-Phenylethanol in Gegenwart geringer, nanomolarer La^{3+} -Konzentrationen. Dies ist besonders bemerkenswert, da Cu und Zn im Gegensatz zu Fe nicht im gleichen +3-Oxidationszustand wie La natürlich vorkommen. Cu und Zn sind jedoch die zweiwertigen Übergangsmetalle, welche unabhängig von ihrem Liganden die stabilsten Komplexe formen (Irving and Williams, 1953). Sie binden deshalb mit hoher Affinität auch Metallbindestellen, für die sie nicht spezifisch sind (Foster et al., 2014; Osman et al., 2017). Auch die Ln^{3+} -abhängige Regulation von PQQ-MDHs in *M. trichosporium* OB3b wird durch Cu^{2+} beeinflusst (Gu et al., 2016; Gu and Semrau, 2017). In diesem Kontext könnte die Fehlmetallierung von Ln^{3+} -Bindestellen ebenfalls eine Erklärung sein.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass nicht nur die Ln^{3+} -Ionen selbst, sondern auch andere Metallionen einen großen Einfluss auf die Ln^{3+} -abhängige Regulation von PQQ-ADHs in *P. putida* KT2440 ausüben. Vermutlich besetzen sie Ln^{3+} -Bindestellen und hindern somit die jeweiligen Proteine und Enzyme an ihrer Funktion. Dies verdeutlicht wie komplex das Zusammenspiel zwischen Bakterien und Metallen ist und wie sehr selbst kleine Veränderungen in der Umgebung dieses Zusammenspiels drastisch beeinflussen können.

4.8 Das ABC-Transportsystem PedA1A2BC ist essentiell für effektives Ln³⁺-abhängiges Wachstum von *P. putida* KT2440.

Wachstumsexperimente mit verschiedenen Deletionsstämmen ergaben, dass das ABC-Transportsystem PedA1A2BC essentiell für PedH-abhängiges Wachstum von *P. putida* KT2440 in Gegenwart niedriger La³⁺-Konzentrationen ist. Im Gegensatz dazu spielte PedA1A2BC keine Rolle bei der Ln³⁺-bedingten Repression PedE-abhängigem Wachstums. Eine mögliche Funktion von PedA1A2BC ist cytoplasmatische Aufnahme von Ln³⁺-Ionen. Diese Vermutung gründet unter anderem darauf, dass der $\Delta pedE \Delta pedA1A2BC$ -Deletionsstamm im Vergleich zum $\Delta pedE$ -Einzeldelentionsstamm nur in Gegenwart von mehr als 100-fach höheren La³⁺-Konzentrationen PedH-bedingt wuchs. Eine Analyse von Sequenzdaten mithilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) ergab, dass alle bekannten Stämme, die Ln³⁺-abhängige PQQ-ADHs produzieren, auch Homologe des *pedA1A2BC*-Transportsystems in ihrem Genom enthalten. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass auch in mehreren *M. extorquens*-Stämmen ein ABC-Transportsystem für Ln³⁺-abhängiges Wachstum essentiell ist (Ochsner et al., 2019; Roszczenko-Jasińska et al., 2019). Ein Sequenzvergleich ergab, dass die Gene dieser ABC-Transportsysteme eine hohe Sequenzsimilarität mit allen vier Genen des *pedA1A2BC*-Operons aufweisen (Sequenzidentität > 43 % für *pedA2* und > 50 % für *pedA1*, *pedB* und *pedC*). Für *M. extorquens* konnte gezeigt werden, dass leichte Lanthanide tatsächlich selektiv ins Cytoplasma aufgenommen werden und dass das erwähnte ABC-Transportsystem hierbei eine entscheidende Rolle spielt (Mattocks et al., 2019; Roszczenko-Jasińska et al., 2019).

Dies impliziert die Frage, welche biologische Funktion Ln³⁺-Ionen im Cytoplasma von *P. putida* KT2440 erfüllen. Dies gilt besonders vor dem Hintergrund, dass das PedH-Enzym, wie alle bekannten PQQ-ADHs, ein periplasmatisches Enzym ist und dass das PedH-Holoenzym *in vitro* durch Zugabe von Ln³⁺-Ionen zur Reaktionslösung funktionell komplementiert wird. Vorstellbar ist, dass das PedH-Protein im Cytoplasma gefaltet wird und *in vivo* der Einbau des Metallcofaktors ausschließlich im Cytoplasma erfolgt oder im Cytoplasma effizienter vollzogen wird. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass der Ort des Faltungsprozesses eines spezifischen Proteins große Auswirkungen auf die spätere Metallkomposition dieses

Proteins haben kann, da sich die Metallkonzentrationen im Cytoplasma stark von denen außerhalb des Cytoplasmas unterscheiden können (Tottey et al., 2008). Im Gegensatz zum Periplasma ist die Konzentration von Metallionen, wie z. B. $\text{Fe}^{2+/3+}$, Cu^{2+} oder Zn^{2+} , welche möglicherweise in PedH für dieselbe Ln^{3+} -Bindestelle konkurrieren, im Cytoplasma genau reguliert. Im Fall von PedH könnte es deshalb möglich sein, dass die Faltung und Metallinkorporation im Cytoplasma das PedH-Protein vor einer Fehlmetallierung mit z. B. $\text{Fe}^{2+/3+}$, Cu^{2+} oder Zn^{2+} bewahren (vergl. Abschnitt 4.7). Ein Beweis, dass das PedH-Protein cytoplasmatisch gefaltet und mittels des Tat-Sekretionswegs sekretiert wird, konnte jedoch nicht erbracht werden, da sowohl der Deletionsstamm $\Delta pedE \Delta tatC1$ als auch der Deletionsstamm $\Delta pedE \Delta tatC2$ PedH-abhängig in Gegenwart von La^{3+} auf 2-Phenylethanol wuchsen. Es kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden, dass PedH mittels des Tat-Sekretionswegs sekretiert wird, da es trotz mehrerer Versuche nicht möglich war, einen $\Delta tatC1 \Delta tatC2$ -Doppeldeletionsstamm zu generieren.

Eine weitere Erklärung für die cytoplasmatische Aufnahme von Ln^{3+} -Ionen wäre, dass Ln^{3+} -Ionen im Cytoplasma an bestimmte, bisher nicht bekannte Enzyme oder Regulationsproteine binden und dass dies für effizientes PedH-bedingtes Wachstum auf 2-Phenylethanol erforderlich ist. *pedH*-Promotoraktivitätstests zeigten jedoch, dass die Transkription von *pedH* unabhängig von *pedA1A2BC* funktioniert und somit nicht von der cytoplasmatischen Ln^{3+} -Aufnahme abhängt.

Aus den in Abschnitt 3.8.2 gezeigten Proteomdaten geht hervor, dass neben PedE und PedH auch das Vorkommen vieler weiterer Proteine durch La^{3+} beeinflusst wird. Es ist folglich durchaus möglich, dass eines oder mehrere dieser Proteine für die Funktion von PedH erforderlich sind.

In *M. extorquens* wurde ein TonB-abhängiges Rezeptorprotein identifiziert, das hochkonserviert sowohl in Stamm PA1 als auch in Stamm AM1 vorkommt (> 99 % Sequenzidentität) und in beiden Stämmen essentiell für Ln^{3+} -bedingtes Wachstum auf Methanol ist (Ochsner et al., 2019; Roszczenko-Jasińska et al., 2019). Es wurde deshalb spekuliert, dass ein Ln^{3+} -bindender Chelator existiere, der für die Aufnahme von Ln^{3+} -Ionen erforderlich ist. Ein TonB-abhängiges Rezeptorprotein, das essentiell für die Funktion der Ln^{3+} -abhängigen Regulation von PQQ-MDHs ist, wurde auch in *M. buryatense* 5GB1C identifiziert (Groom et al., 2019). Dieses weist jedoch weniger als 20 % Sequenzidentität mit den TonB-abhängigen Rezeptorproteinen aus

M. extorquens AM1 und PA1 auf und hätte folglich nicht mittels einer einfachen Homologie-Suche entdeckt werden können. In *P. putida* KT2440 konnte kein TonB-abhängiges Rezeptorprotein entdeckt werden, welches Homologie (> 30 % Sequenzidentität) zu den oben genannten Proteinen aus *M. extorquens* oder *M. buryatense* aufweist. Dies könnte bedeuten, dass in *P. putida* KT2440 ein strukturell verschiedenes Ln³⁺-Chelatorsystem existiert. Es ist jedoch auch möglich, dass *P. putida* aufgrund des unterschiedlichen Lebensraums kein spezifisches Chelatorsystem benötigt. *M. buryatense* wurde vom Grund eines Salzsees isoliert (pH 9 – 9.5) und *M. extorquens* PA1 aus der Phyllosphäre von *Arabidopsis thaliana*, beides Orte mit einer niedrigen Ln³⁺-Bioverfügbarkeit (Kaluzhnaya et al., 2001; Knief et al., 2010). Im Gegensatz dazu wird die Rhizosphäre als Hauptlebensraum von *P. putida* KT2440 angesehen und die Bioverfügbarkeit von Ln³⁺-Ionen in der Rhizosphäre ist aufgrund des hohen REE-Gehalts des Bodens und der für gewöhnlich hohen Konzentration an organischen Säuren im Vergleich hierzu deutlich höher (Raghothama and Karthikeyan, 2005; Ramos et al., 2016).

Es ist auch denkbar, dass die periplasmatische Aufnahme von Ln³⁺-Ionen mittels eines der Systeme erfolgt, die auch für die Pyoverdinin-unabhängige Aufnahme von Fe genutzt werden. Dies könnte auch den in Abschnitt 3.6 berichteten, großen Einfluss des Fe^{2+/3+}/La³⁺-Konzentrationsverhältnisses auf die Ln³⁺-abhängige Genregulation in *P. putida* KT2440 erklären.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass auch in nicht-methylotrophen Organismen ein ABC-Transportsystem für Ln³⁺-bedingtes Wachstum essentiell ist. Besonders für die Entwicklung biotechnologischer Prozesse zum Abbau oder zur Wiederverwertung von Seltenerdmetallen könnte das hier beschriebene Transportsystem einen fundamentalen Beitrag leisten. Physiologisch betrachtet bleibt jedoch ungeklärt, welche genaue Funktion Ln³⁺-Ionen im Cytoplasma erfüllen und ob auch für Bodenbakterien wie *P. putida* KT2440 ein spezielles Chelatorsystem für die Aufnahme von Ln³⁺-Ionen ins Periplasma erforderlich ist.

4.9 La³⁺-bedingte Veränderungen im Proteom von *P. putida* KT2440 sind substratspezifisch und zeigen einen neuen Glycerolstoffwechselweg auf.

Die proteomischen und physiologischen Reaktionen von *P. putida* KT2440 auf La³⁺-Ionen wurden während des Wachstums auf mehreren Kohlenstoffquellen genau untersucht. Einzig das Proteinvorkommen der Ca²⁺-abhängigen PQQ-ADH PedE veränderte sich unter allen Wachstumsbedingungen bei La³⁺-Zugabe signifikant. Daraus kann geschlossen werden, dass das PedS2/PedR2-Zweikomponentensystem, das für die Regulation von *pedE* hauptverantwortlich ist (vergl. Abschnitt 4.6), unter allen getesteten Bedingungen aktiv war. Auch die Proteine PedH und PP_2673, die als einzige weitere Proteine einen La³⁺-bedingten Unterschied im Proteinvorkommen unter mehreren Wachstumsbedingungen aufwiesen, sind Teil des *ped*-Genclusters. Dieses Gencluster enthält nicht nur die Gene für die beiden PQQ-ADHs, sondern hierin kommen auch viele Gene vor, die essentiell für die Regulation und Funktion von PedE und PedH sind (vergl. Abschnitte 4.6 und 4.8). Alle weiteren Proteine, die La³⁺-bedingte Unterschiede im Proteinvorkommen aufwiesen, konnten nur unter einer einzigen Wachstumsbedingung identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass in *P. putida* KT2440 die La³⁺-bedingte Proteomantwort substratspezifisch stark variiert. Glycerol wird nicht nur in hohen Konzentrationen von Pflanzen in die Rhizosphäre abgegeben (Carvalhais et al., 2011), sondern fällt auch in großen Mengen als Nebenprodukt in der Biodieselproduktion an (Yang et al., 2012). Aus diesem Grund hat Glycerol in den letzten 20 Jahren großes Interesse geweckt als leicht verfügbarer, günstiger und erneuerbarer Ausgangsstoff und Kohlenstoffquelle für bakterielle Biotransformationen (Mota et al., 2017; Pagliaro, 2017; Wierckx et al., 2015). Auch in einer Vielzahl biotechnologischer Anwendungen von *P. putida*, wie der Biotransformation von HMF zu FDCA oder der Biosynthese von Polyhydroxyalkanoaten, wird Glycerol als Ausgangsstoff und/oder Kohlenstoffquelle eingesetzt (Beckers et al., 2016; Koopman et al., 2010a). Für eine möglichst effiziente Nutzung ist jedoch ein genaues Wissen über den Glycerolstoffwechsel unabdingbar. Es ist bekannt, dass der Glycerolmetabolismus von *P. putida* KT2440 mit der cytoplasmatischen Aufnahme von Glycerol *via* GlpF beginnt (Escapa et al., 2013; Nikel et al., 2014a). Im Cytoplasma wird Glycerol durch die Glycerolkinase GlpK zu Glycerol-

3-phosphat phosphoryliert und anschließend durch die Glycerol-3-phosphatdehydrogenase GlpD zu Dihydroxyaceton-3-phosphate oxidiert. Nach Isomerisierung durch die Triosephosphatisomerase TpiA wird Glyceraldehyd-3-phosphat in den zentralen Metabolismus eingeschleust.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass noch ein weiterer, bis hierhin unbekannter Glycerolstoffwechselweg in *P. putida* KT2440 existiert. Dieser wird, je nach La^{3+} -Verfügbarkeit, entweder durch die Aktivität von PedE oder die Aktivität von PedH eingeleitet wird (**Abbildung 43**). Ob Glycerol von den PQQ-ADHs nur zu Glyceraldehyd oder direkt weiter zu Glycerat oxidiert wird, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es existieren jedoch weitere Enzyme im Genom von *P. putida* KT2440, die den Oxidationsschritt zu Glycerat ausführen könnten, wie z.B. die 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (Walsh et al., 2019), die Aldehyddehydrogenase AldB-II oder die Aldehydoxidase, bestehend aus den Proteinen PP_3621 (IorA-II), PP_3622 und PP_3623 (AdhB). Es ist anzumerken, dass die beiden letztgenannten Enzyme in den Proteommessungen auch ein La^{3+} -bedingt erhöhtes Proteinvorkommen während des Wachstums auf Glycerol aufwiesen. Das gebildete Glycerat wird anschließend höchstwahrscheinlich durch die Glyceratkinase GarK phosphoryliert und als Glycerat-2-Phosphat in den zentralen Metabolismus eingeschleust. Diese Vermutung basiert nicht nur auf den in dieser Arbeit gezeigten Wachstumsdaten des $\Delta\text{glpFKRD}$ ΔgarK -Deletionsstamms, sondern auch auf den Ergebnissen einer zeitgleich durchgeführten Studie von Walsh *et al.* (Walsh et al., 2019). In deren Studie wurde unter anderem das Metabolom des *P. putida* KT2440-Wildtyps mit dem des ΔglpK -Deletionsstamms während des Wachstums auf Glycerol verglichen. Ähnlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm $\Delta\text{glpFKRD}$ kann auch Stamm ΔglpK nur mittels des PedE/PedH-abhängigen Stoffwechselwegs auf Glycerol wachsen. Die Metabolom-Ergebnisse zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte Glycerat-Konzentration im ΔglpK -Stamm während des Wachstums auf Glycerol. Die Glyceraldehyd- und Glyceraldehyd-3-phosphat-Konzentrationen unterschieden sich jedoch kaum zwischen den beiden Stämmen.

Da die Deletion des *glpFKRD*-Genclusters das Wachstum auf Glycerol erheblich stärker beeinträchtigt als die ΔpedE ΔpedH -Doppeldelation, kann davon ausgegangen werden, dass der PedE/PedH-bedingte Stoffwechselweg in *P. putida* nicht den Hauptstoffwechselweg für Glycerol darstellt.

Laut mehreren Studien wird der *glpFKRD*-abhängige Glycerol-Stoffwechselweg in *P. putida* durch den Transkriptionsfaktor GlpR negativ reguliert (Escapa et al., 2013; Nickel et al., 2015). Nickel *et al.* gehen davon aus, dass diese Genrepression, welche auch als Ursache für die ungewöhnlich lange Latenzphase während des Wachstums auf Glycerol identifiziert wurde, direkt von der intrazellulären Glycerol-3-phosphat-Konzentration abhängt. In diesem Zusammenhang war bemerkenswert, dass nicht nur in Gegenwart von La^{3+} , sondern auch in Abwesenheit von La^{3+} der neuentdeckte Glycerolstoffwechselweg zu einer Verkürzung der Latenzphase beitrug. Eine mögliche Erklärung wäre, dass neben Glycerol-3-phosphat auch andere phosphorylierte Glycerolderivate, wie z.B. Glycerat-2-phosphat oder Glycerat-3-phosphat, die *glpR*-bedingte Repression des *glpFKRD*-Operons aufheben. Die noch kürzere Latenzphase in Gegenwart von La^{3+} könnte folglich dadurch erklärt werden, dass eine für das Wachstum ausreichend hohe Konzentration an phosphorylierten Glycerolderivaten unter diesen Bedingungen schneller erreicht wird. Dies könnte durch die höhere Enzymaktivität von PedH im Vergleich zu PedE bedingt sein. Unterschiede im Proteinvorkommen der beiden PQQ-ADHs oder im Proteinvorkommen anderer Enzyme, welche in die Bildung der phosphorylierten Glycerolderivate involviert sind, könnten jedoch auch hierfür verantwortlich sein.

Die Zugabe von La^{3+} führte nicht nur zu einer verkürzten Latenzphase, sondern auch zu einer verringerten $\text{OD}_{600}^{\text{max}}$ von Stämmen, die das PedH-Enzym aktiv produzierten. Auch dies ist vermutlich bedingt durch die im Vergleich zu PedE höhere Enzymaktivität von PedH mit Glycerol oder durch ein höheres Proteinvorkommen des PedH-Proteins im Vergleich zu PedE. Beide Möglichkeiten könnten zu höheren Konzentrationen des cytotoxischen Zwischenprodukts Glyceraldehyd (Benov and Beema, 2003) führen. Die niedrigeren $\text{OD}_{600}^{\text{max}}$ -Werte unter diesen Bedingungen wären somit eine Folge des erhöhten Zellstress, der mit den hohen Aldehydkonzentrationen verbunden ist (Kim and Park, 2014; Tessier et al., 2003). Dies könnte auch eine Erklärung für das stark beeinträchtigte Wachstum des ΔgarK -Stamms in Gegenwart von La^{3+} sein, da davon auszugehen ist, dass eine Störung des Glyceratmetabolismus zu noch höheren Konzentrationen an Glyceraldehyd führt. Sowohl die MexEF-Transporterproteine, die für den Abtransport von toxischen Stoffen aus der Zelle verantwortlich sind (Martínez-García and de Lorenzo, 2011), als auch die Alkylhydroxyperoxidreduktase-Untereinheiten AhpC und AhpF, die in die

Abreaktion von Sauerstoffradikalen involviert sind (Hishinuma et al., 2006), kamen während des Wachstums aus Glycerol vermehrt in Gegenwart von La^{3+} vor. Auch dies kann als Indiz für einen erhöhten Zellstress in Gegenwart von La^{3+} angesehen werden. Die Unterschiede im Proteom und der Physiologie von *P. putida* KT2440, die durch Zugabe von La^{3+} während des Wachstums auf Glycerol auftraten, können als Folge der unterschiedlichen Enzymaktivität oder der Unterschiede im Proteinvorkommen von PedE und PedH erklärt werden. Da auch 2-Phenylethanol ein Substrat von PedE und PedH ist, ist es wahrscheinlich, dass auch hier die La^{3+} -bedingten Unterschiede im Proteom eine Folge der verschiedenen Enzymaktivitäten bzw. des unterschiedlichen Proteinvorkommens von PedE und PedH sind. Weder Glucose noch Citrat sind ein Substrat von PedE oder PedH. Folglich lassen sich die La^{3+} -bedingten Unterschiede im Proteom während des Wachstums auf diesen beiden Kohlenstoffquellen nicht mit den Enzymaktivitäten oder dem Proteinvorkommen der PQQ-ADHs erklären. Es muss also noch weitere Wege geben, neben der Interaktion mit PedS2 und PedH, über die *P. putida*-Zellen durch Seltenerdmetalle beeinflusst werden. Bekannt ist beispielsweise, dass Ln^{3+} -Ionen die Physiologie der äußeren Zellmembran beeinflussen können (Peng et al., 2004). Wie in Abschnitt 4.7 diskutiert, könnten Ln^{3+} -Ionen auch zur Fehlmetallierung von Metallbindestellen in nicht- Ln^{3+} -spezifischen Proteinen führen. Beispiele von Fehlmetallierungen Ca^{2+} -bindender Proteine mit Ln^{3+} -Ionen wurden mehrfach beobachtet (Agarwal and Kalra, 1983; Brown et al., 1990). Ln^{3+} -Ionen gelangen außerdem, wie in Abschnitt 4.8 diskutiert, höchstwahrscheinlich mittels des PedA1A2BC-Transportsystems ins Cytoplasma, wo weitere, bisher unbekannte Interaktionen mit Enzymen oder Proteinen sehr gut vorstellbar sind.

Die Latenzphase von *P. putida* beim Wachstum auf Glycerol verkürzt sich, wenn der durch die PQQ-ADHs PedE und PedH eingeleitete Stoffwechselweg verwendet wird. Dieser Stoffwechselweg ist auch dafür verantwortlich, dass die Latenzphase in Gegenwart von La^{3+} deutlich kürzer ausfällt als unter La^{3+} -freien Bedingungen. Dies ist nicht nur für die Verbesserung bestehender oder die Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse mit Glycerol als Ausgangstoff und/oder Kohlenstoffquelle von Bedeutung, sondern kann auch einen entscheidenden Wettbewerbsvorteil für *P. putida* in natürlichen Lebensräumen darstellen, in denen REEs biologisch verfügbar sind. Die bodenverbessernde und düngende Wirkung von

REEs, welche für mehrere Nutzpflanzen bekannt ist (Diatloff et al., 1995; Pang et al., 2002; Wahid et al., 2000; Xie et al., 2002), könnte somit eine Folge der höheren Konkurrenzfähigkeit von Pflanzenwachstums-fördernden Bakterien wie *P. putida* in der Rhizosphäre dieser Pflanzen sein. Ein weiteres Indiz hierfür ist eine kürzlich veröffentlichte *in-vivo*-Studie, welche zeigt, dass Pseudomonaden besonders gut auf Wurzelexsudaten wachsen und folglich in der Rhizosphäre von *Arabidopsis thaliana* angereichert sind (Worsley et al., 2019). Zusammenfassend können die Ergebnisse der letzten Abschnitte als weitere Beispiele für die immense Komplexität von Bakterien-Metall-Interaktionen gewertet werden und lassen erahnen, dass viele weitere biologische Funktionen von Seltenerdmetallen bis heute unentdeckt sind.

5 Ausblick

Mithilfe von computergestütztem, rationalem sowie semi-rationalem Enzymdesign und neu entwickelten Enzymtests, die es ermöglichten, die Aktivität einer Vielzahl von PQQ-ADH-Varianten unter geringem Arbeits- und Zeitaufwand gleichzeitig zu untersuchen, konnten in dieser Arbeit verschiedene Eigenschaften von PQQ-ADHs verändert bzw. optimiert werden. Mit semi-rationalem Enzymdesign konnten die Thermo- und die Lösungsmittelstabilität der Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADH PedE signifikant gesteigert werden, ohne Einbußen in der katalytischen Effizienz des Enzyms. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu überprüfen, ob die gleichen Mutationen auch im PedH-Enzym, das 55 % Sequenzidentität mit PedE aufweist und Teil derselben 3DM-Datenbank ist, welche zur Identifizierung der Positionen verwendet wurde, zu signifikanten Verbesserungen in der Stabilität führen. Zusätzlich könnte die Stabilität von PedE mittels anderer Ansätze weiter verbessert werden. Vielversprechende Methoden wären das Einfügen von Disulfidbrücken (Matsumura et al., 1989), das Einfügen von Prolin-Resten (Watanabe and Suzuki, 1998), das Hinzufügen von stabilisierenden elektrostatischen Wechselwirkungen (Gribenko et al., 2009) oder Methoden, basierend auf der Berechnung von Faltungsenergien (Schymkowitz et al., 2005; Wijma et al., 2014).

Durch gezielte Mutation eines Metallcofaktor-koordinierenden Aminosäurerests (S295D) konnte die Ca^{2+} -abhängige PQQ-ADH PedE in eine ausschließlich REE-abhängige PQQ-ADH überführt werden. Im Gegensatz zur natürlich vorkommenden, REE-abhängigen PQQ-ADH PedH zeigte PedE^{S295D} erhöhte Aktivität mit schweren Lanthaniden und nur geringe Unterschiede in der spezifischen Aktivität mit den einzelnen Seltenerdmetallen als Metallcofaktor. PedE^{S295D} wäre folglich die ideale Basis für die Entwicklung eines allgemeinen REE-Biosensors. Die Entwicklung von PedE^{S295D} demonstriert auch, dass es möglich ist, die REE-Spezifität von PQQ-ADHs gravierend zu verändern. Ein weiterer Fortschritt wäre das Kreieren neuer PQQ-ADHs mit erhöhter Spezifität für schwere Lanthanide oder nicht-lanthanidische Seltenerdmetalle sowie letztendlich die Generierung von PQQ-ADHs, die ausschließlich mit einem bestimmten REE-Ion enzymatisch aktiv sind. Besonders vor dem Hintergrund, dass das Trennen der einzelnen Seltenerdmetalle einen der aufwendigsten Schritte in deren Wiederaufbereitung und Gewinnung darstellt (Zhang

et al., 2016a), könnte dies nicht nur für die Entwicklung spezifischer Biosensoren, sondern vor allem für die Wiederaufbereitung und den Abbau von REEs von großer Bedeutung sein.

Im Gegensatz zu PedE ließ sich die Veränderung der Metallcofaktor-Spezifität von PedH zu einem Ca^{2+} -abhängigen Enzym nicht durch eine einfache Mutation an Position 295 herbeiführen. Eine genauere Betrachtung der weiteren Umgebung der Metallbindestelle in PedH zeigte jedoch, dass auch an Position 168 und 254 Unterschiede zwischen PedE und PedH bestehen (PedH: 168 = Gly, 254 = Thr; PedE: 168 = Asp, 254 = Pro). Die Erstellung von Varianten, welche neben der Mutation an Position 295 auch die entsprechenden Mutationen an Position 168 und 254 beinhalten, wäre folglich ein vielversprechender Ansatz in diesem Zusammenhang. Letztendlich könnten Kristallstrukturen von PedE, PedE^{S295D}, PedH sowie einer möglichen Ca^{2+} -abhängigen PedH-Variante, entscheidende, zusätzliche Einblicke hinsichtlich der Mechanismen liefern, die zur REE- bzw. Ca^{2+} -Spezifität beitragen.

Durch zwei Mutationen in der aktiven Tasche von PedH konnte ein Variante generiert werden, welche die Oxidation von HMFA zu FFCA katalysiert. Dieser Oxidationsschritt ist entscheidend für die biotechnologische Produktion des Polymerbausteins FDCA aus HMF und kann nicht von nativen Enzymen relevanter Organismen wie *P. putida* katalysiert werden. Eine detaillierte *in-vivo*-Charakterisierung der HMFA-oxidierenden Variante PedH^{F375V/W521A} in *P. putida* sollte folglich der nächste Schritt in diesem Zusammenhang sein. Anschließend könnte ein PedH^{F375V/W521A}-exprimierender *P. putida*-Stamm für die Entwicklung neuer Prozesse zur biotechnologischen Produktion von FDCA aus HMF genutzt werden. Die kinetischen Daten mit HMFA und dem Referenzsubstrat Ethanol zeigten eine um mehrere Größenordnungen verminderte Substrataffinität der von PedH^{F375V/W521A} im Vergleich zum PedH-Wildtyp-Enzym, wohingegen die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nur leicht beeinträchtigt war. Eine Erhöhung der katalytischen Effizienz sollte folglich durch eine Verbesserung der Substrataffinität möglich sein. Dies könnte durch mehrere Runden gerichteter Evolution, entweder komplett randomisiert oder fokussiert auf die nähere Umgebung der aktiven Tasche und den Substratzugangskanal, erreicht werden. Zukünftig ist auch die Entwicklung eines komplett periplasmatisch ablaufenden, von PQQ-ADHs durchgeführten Produktionswegs von HMF zu FDCA vorstellbar.

Die Ln^{3+} -bedingte inverse Regulation der Ln^{3+} -abhängigen PQQ-ADH PedH und der Ca^{2+} -abhängigen PQQ-ADH PedE wird sowohl vom PedH-Protein selbst als auch vom Zweikomponentensystem PedS2/PedR2 gesteuert. Die Existenz eines *pedH*-Promotor-aktivierenden Regulationsproteins sowie einer zweiten PedR2-phosphorylierenden Sensor kinase konnte aufgrund der Datenlage jedoch nur prognostiziert werden. Nachgewiesen wurde jedoch, dass die Regulation der PQQ-ADHs nicht nur von REEs, sondern auch von anderen Metallen, wie Cu, Zn und Fe, entscheidend beeinflusst wird, vermutlich *via* Fehlmetallierung Ln^{3+} -spezifischer Bindestellen.

Zukünftige Arbeiten sollten deshalb den Fokus sowohl auf die eingehende Charakterisierung der in diesem Mechanismus involvierten Proteine setzen als auch die Identifizierung der in diesem Zusammenhang bisher noch unbekannt Proteine zum Ziel haben. Kristallstrukturen und isotherme Titrationskalorimetrie-Messungen könnten Aufschluss darüber geben, ob und wenn ja, wie potentiell Ln^{3+} -bindende Proteine, wie PedS2, Ln^{3+} -Ionen im Periplasma binden und ob diese kompetitiv durch Cu, Zn oder Fe verdrängt werden können. Besonders bezüglich biotechnologischer Anwendungen von *P. putida* wäre es von großem Nutzen zu untersuchen, inwieweit Cu, Zn und Fe auch die während des Wachstums auf Glycerol beobachteten wachstumsfördernden Eigenschaften von Ln^{3+} -Ionen beeinflussen.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass das ABC-Transportsystem PedA1A2BC essentiell für PedH-abhängiges Wachstum ist, vermutlich indem es die cytoplasmatische Aufnahme von Ln^{3+} -Ionen ermöglicht. Kristallstrukturen und isotherme Titrationskalorimetrie-Messungen mit dem prognostizierten Substratbindeprotein PedA1 könnten aufzeigen, ob und wenn ja, wie das PedA1-Protein Ln^{3+} -Ionen bindet. Dies würde weitere entscheidende Erkenntnisse bezüglich des Transports von Ln^{3+} -Ionen in *P. putida* KT2440 liefern. Mittels Überexpression eines solchen Ln^{3+} -Importers könnten anschließend Bakterienstämme generiert werden, welche im Recycling von Ln^{3+} -Ionen aus Metallabfällen oder in der Gewinnung von Ln^{3+} -Ionen Verwendung fänden.

6 Anhang

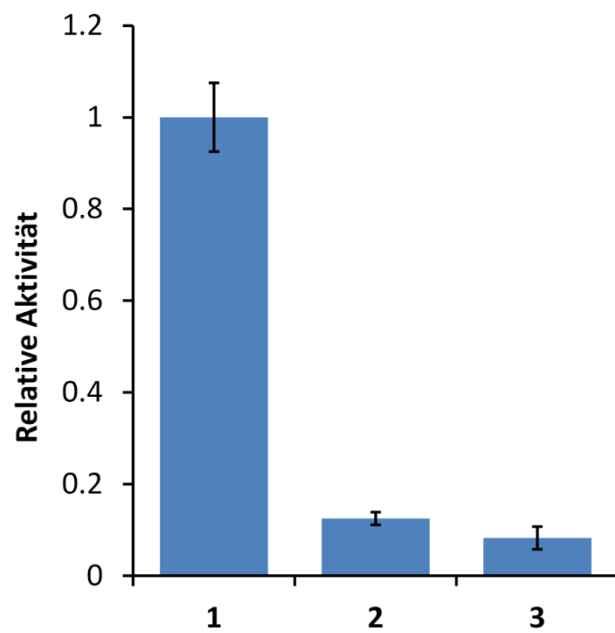


Abbildung A 1: Relative Enzymaktivität von PedE mit 10 mM Ethanol als Substrat in Gegenwart von 25 mM Imidazol (1), 45 mM Ammoniumchlorid (2) bzw. 5 mM Ethylamin (3). Die Aktivitäten mit 25 mM Imidazol sind ca. achtfach bzw. zwölfmal höher als diese mit 45 mM Ammoniumchlorid bzw. 5 mM Ethylamin. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

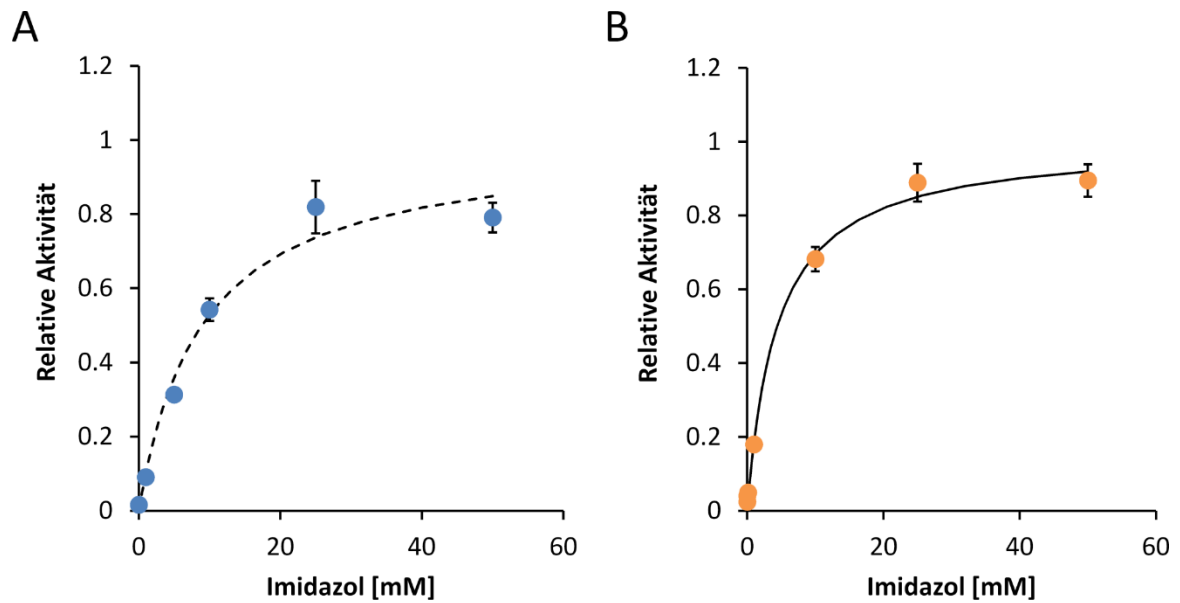


Abbildung A 2: Relative Enzymaktivitäten von PedE (A) und PedH (B) mit 10 mM Ethanol als Substrat in Gegenwart verschiedener Imidazolkonzentrationen. Die gestrichelte (PedE) oder durchgezogene (PedH) Linie repräsentiert die nichtlineare Annäherung an ein Bindemodell mit einer Bindestelle pro Protein, unter Annahme, dass bei 100% Enzymaktivität alle Bindestellen besetzt sind. Datenpunkte stellen den Mittelwert aus drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

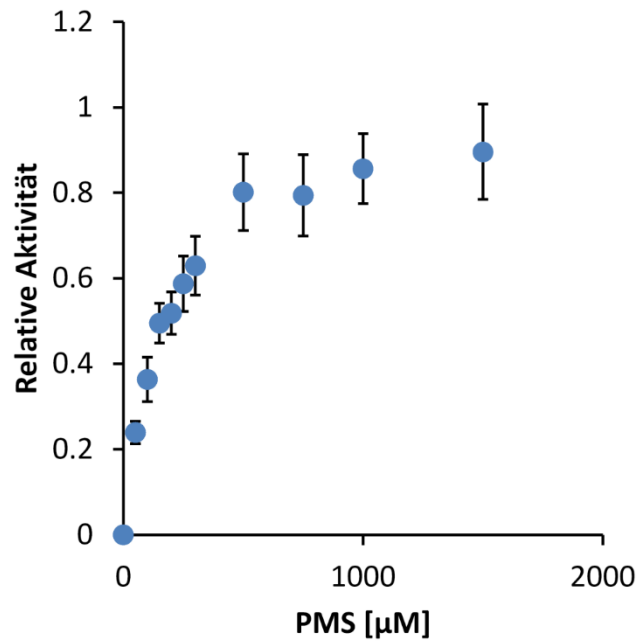


Abbildung A 3: Relative Enzymaktivität von PedH mit 10 mM Ethanol als Substrat in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Phenazinmethosulfat (PMS). Datenpunkte stellen den Mittelwert aus drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

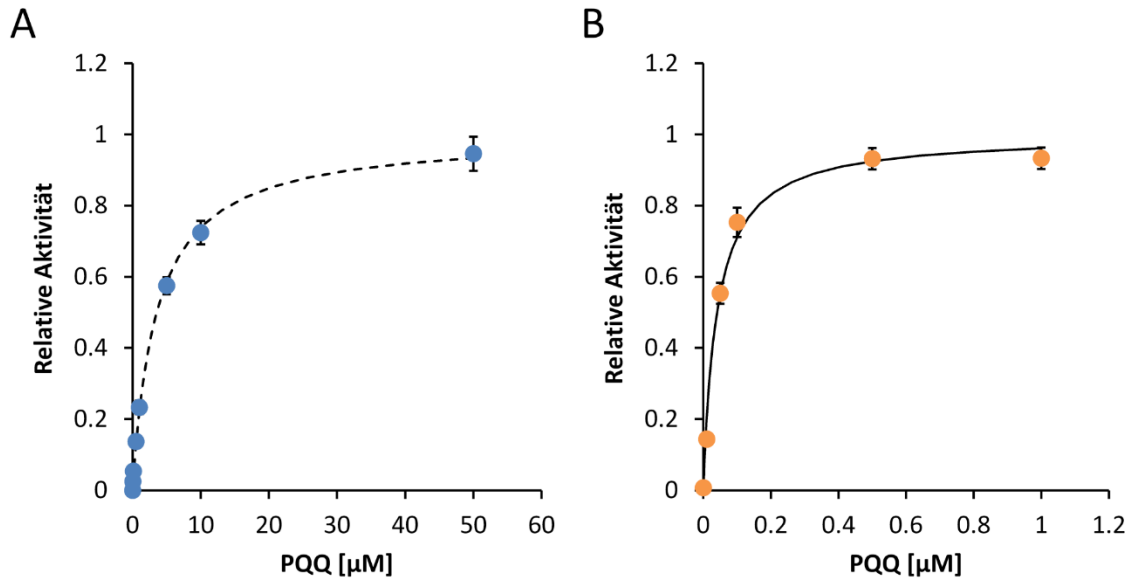


Abbildung A 4: Normierte spezifische Aktivitäten von PedE (A) und PedH (B) in Gegenwart verschiedener PQQ-Konzentrationen und 10 mM Ethanol als Substrat. Die gestrichelte (PedE) bzw. durchgezogene (PedH) Linie repräsentiert die nichtlineare Annäherung an ein Bindemodell mit einer Bindestelle pro Protein, unter der Annahme, dass bei 100% Enzymaktivität alle Bindestellen besetzt sind. Die ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) betragen 3.5 μM für PedE und 41 nM für PedH. Datenpunkte stellen den Mittelwert aus drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

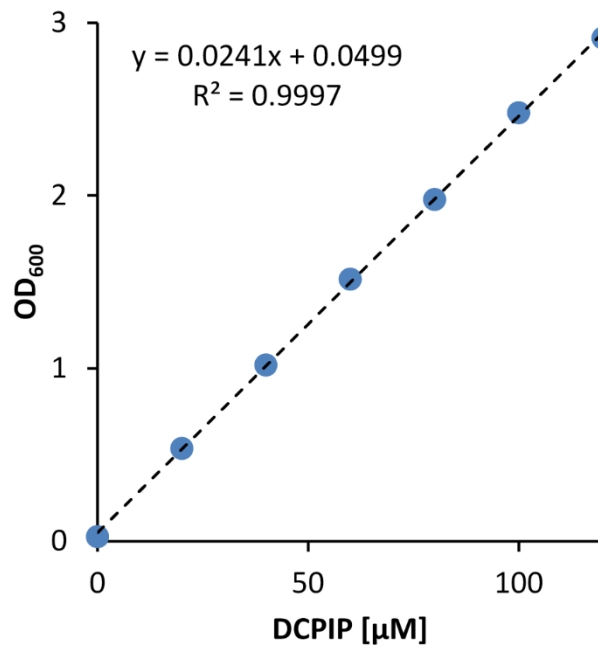


Abbildung A 5: Der Extinktionskoeffizient von 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) wurde über den linearen Zusammenhang zwischen der Absorption bei 600 nm (OD_{600}) und der DCPIP-Konzentration bestimmt und betrug $\epsilon = 24.1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

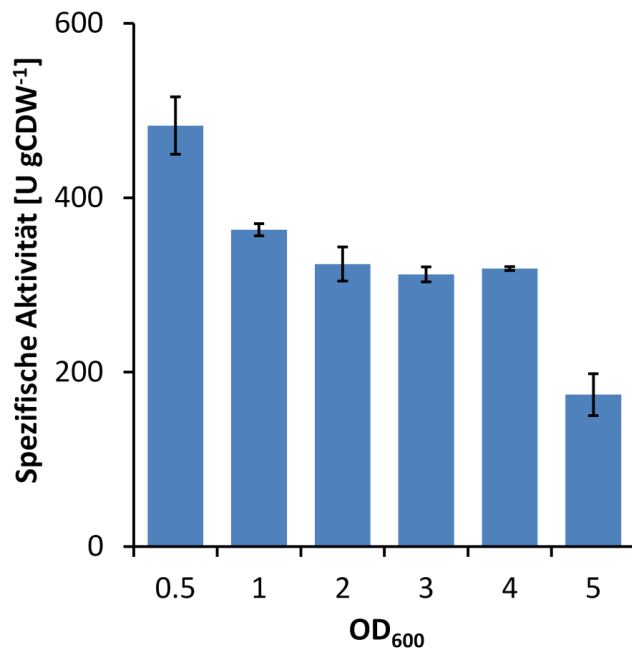


Abbildung A 6: Spezifische Aktivität von PedE-produzierenden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen in Abhängigkeit von der optischen Dichte (OD₆₀₀), welche im Ganzzell-Aktivitätstest eingesetzt wurde. Die spezifischen Aktivitäten sind als Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

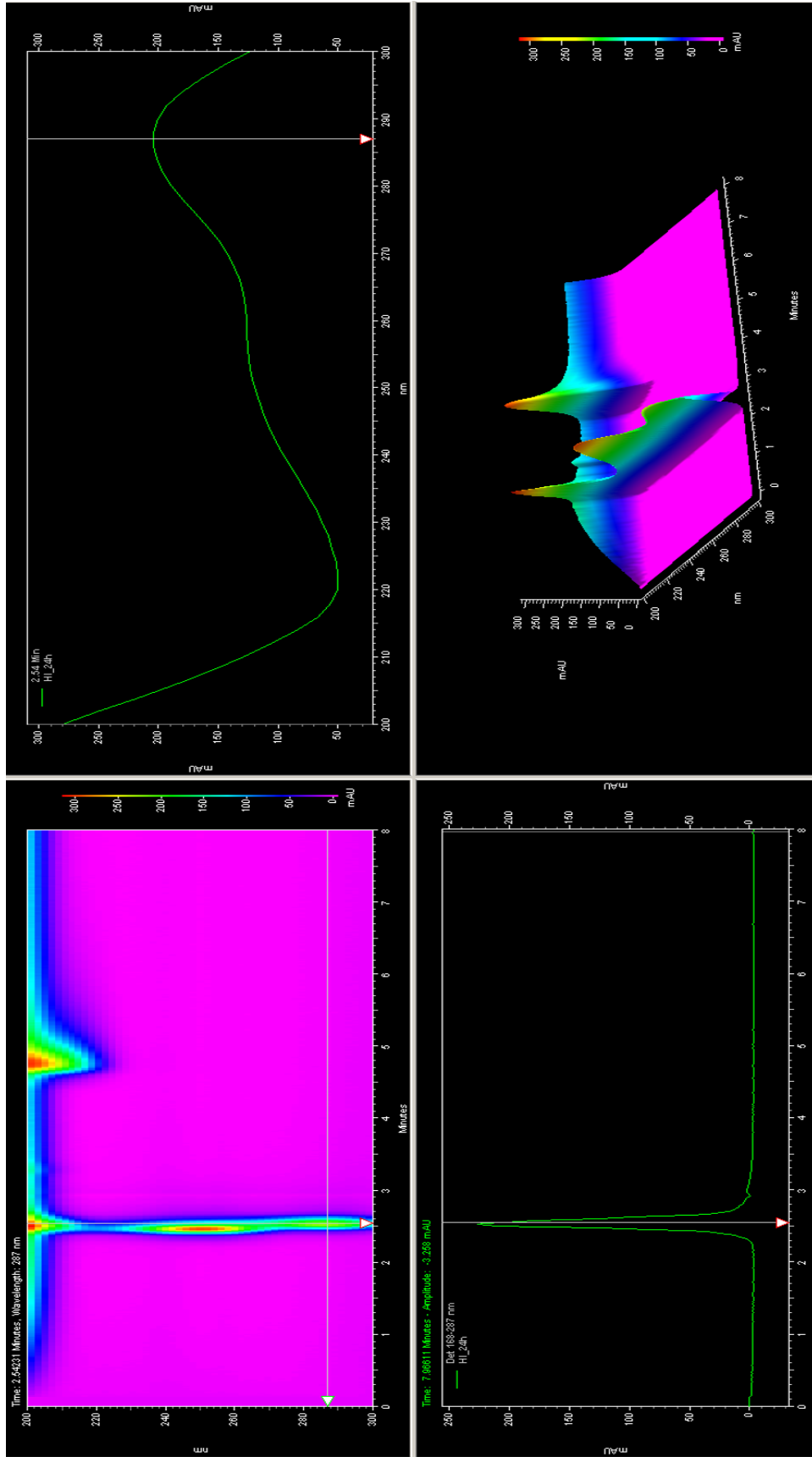


Abbildung A 7: Chromatogramm eines Gemisches von HMFA und FFCA. Peakmaximum von HMFA befindet sich bei 2.54 min und 287 nm.

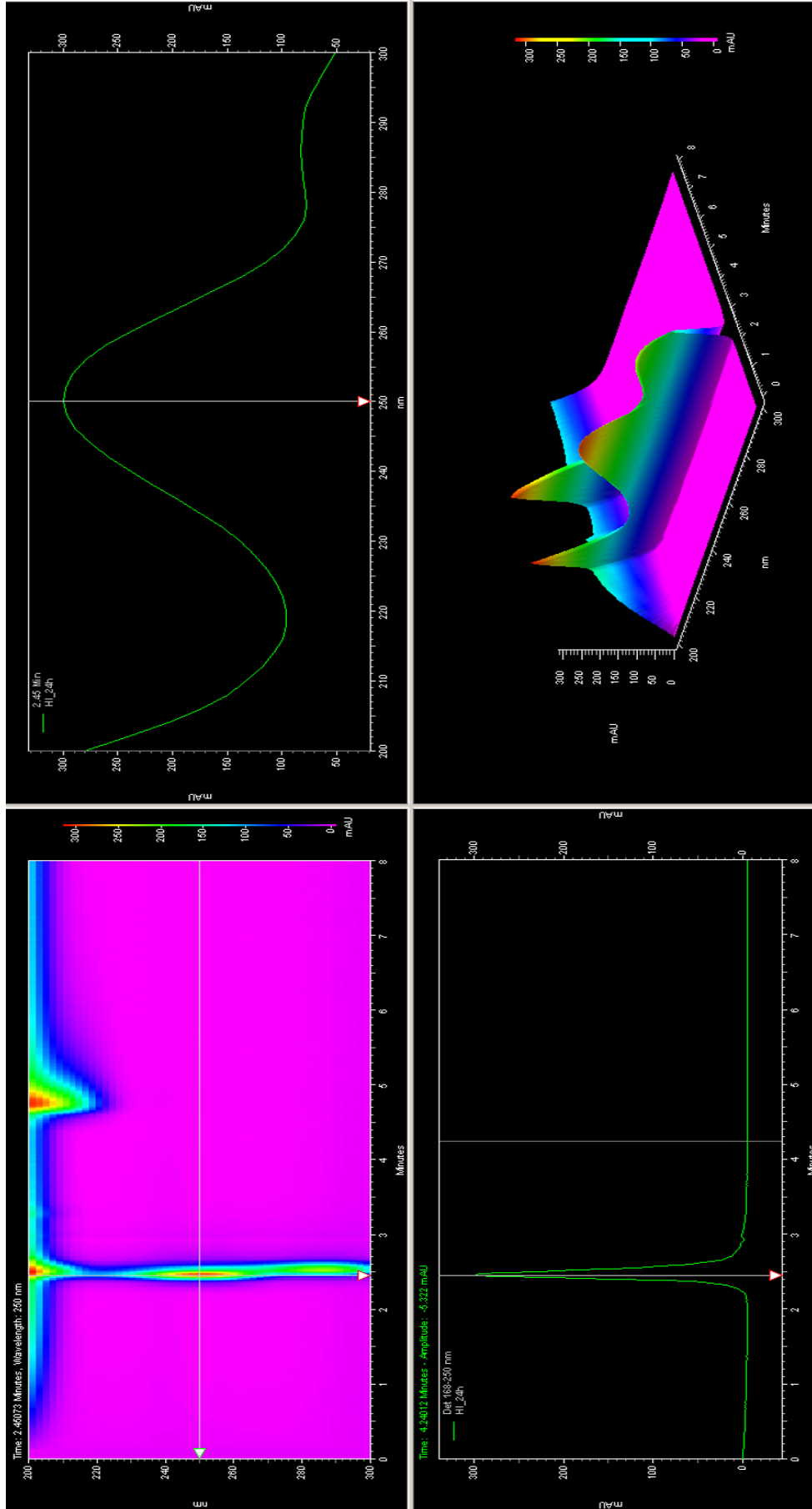


Abbildung A 8: Chromatogramm eines Gemisches von HMFA und FFCA. Peakmaximum von HMFA befindet sich bei 2.45 min und 250 nm.

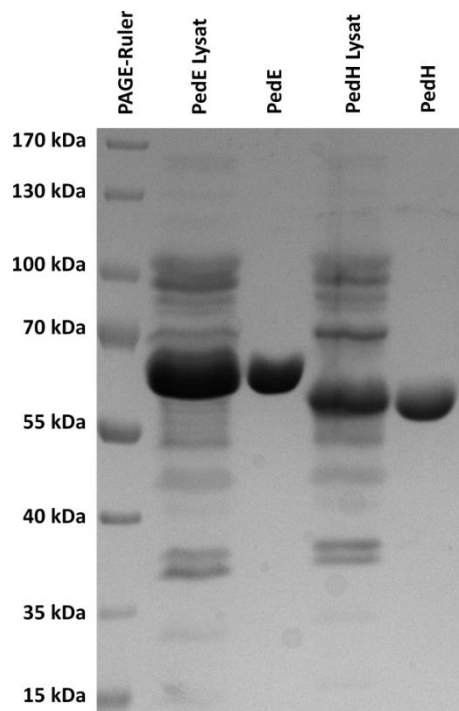


Abbildung A 9: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von PedE und PedH. Pro Bahn wurden 10 μ l Zellextrakt bzw. 20 μ g aufgereinigtes Protein aufgetragen. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

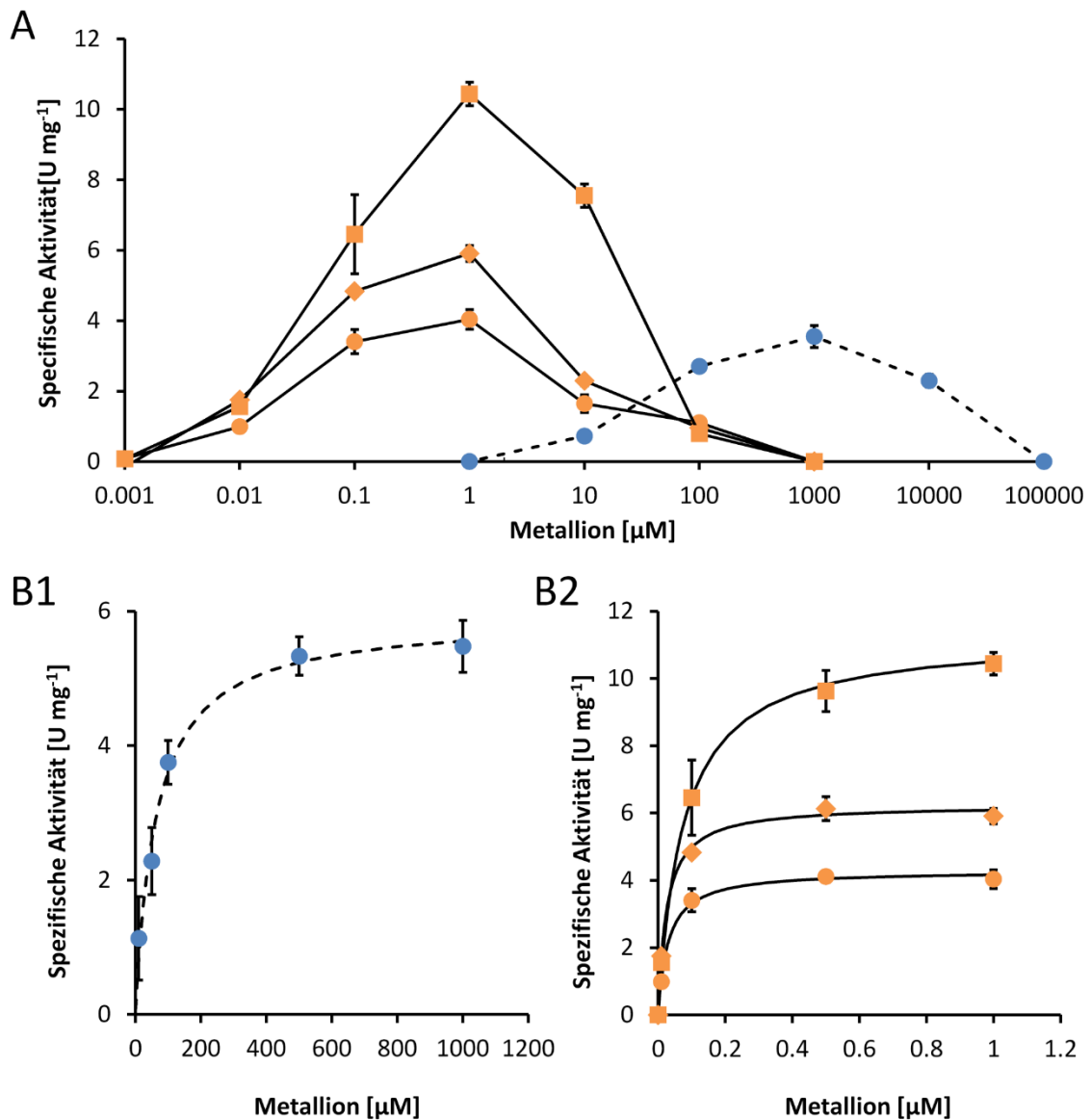


Abbildung A 10: (A) Spezifische Aktivitäten von PedE (blaue Punkte) und PedH (orangene Symbole) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Ca²⁺ (blaue Punkte), La³⁺ (orangene Punkte), Ce³⁺ (orangene Karos) bzw. Pr³⁺ (orangene Rechtecke). (B) Spezifische Aktivitäten von PedE (B1) und PedH (B2) in Gegenwart von verschiedenen Metallkonzentrationen. Symbole wie in (A). Durch nichtlineare Regression der Daten an ein Bindemodell mit einer Bindestelle pro Protein wurden die Dissoziationskonstanten K_D für PedE mit Ca²⁺ ($K_D = 64 \mu\text{M}$) und für PedH mit Pr³⁺ ($K_D = 64 \text{nM}$), Ce³⁺ ($K_D = 75 \text{nM}$) und La³⁺ ($K_D = 30 \text{nM}$) ermittelt. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

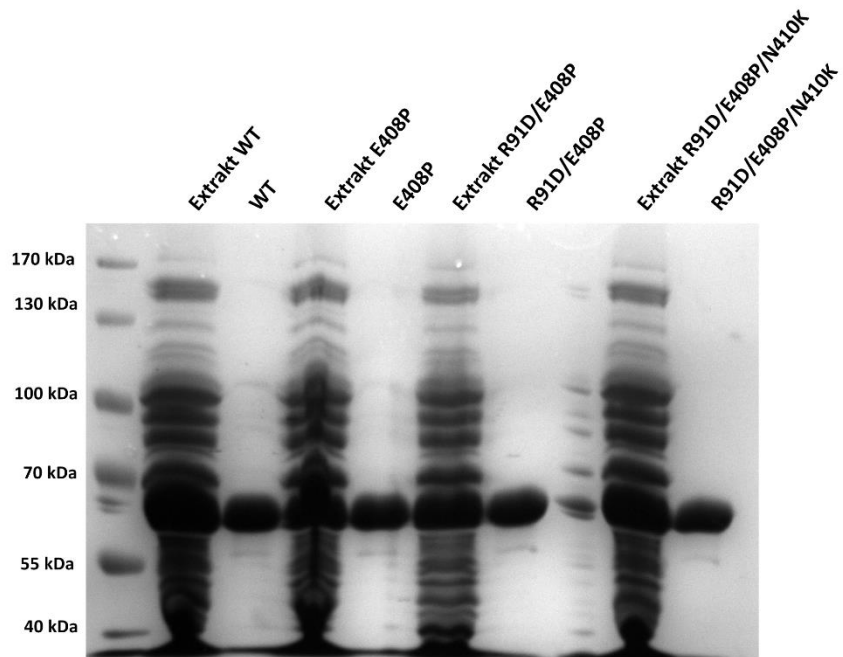


Abbildung A 11: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von PedE und der Stabilitätsmutanten. Pro Bahn wurden 10 μ l Zellextrakt oder 20 μ g aufgereinigtes Protein aufgetragen. Abbildung ist übernommen aus (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

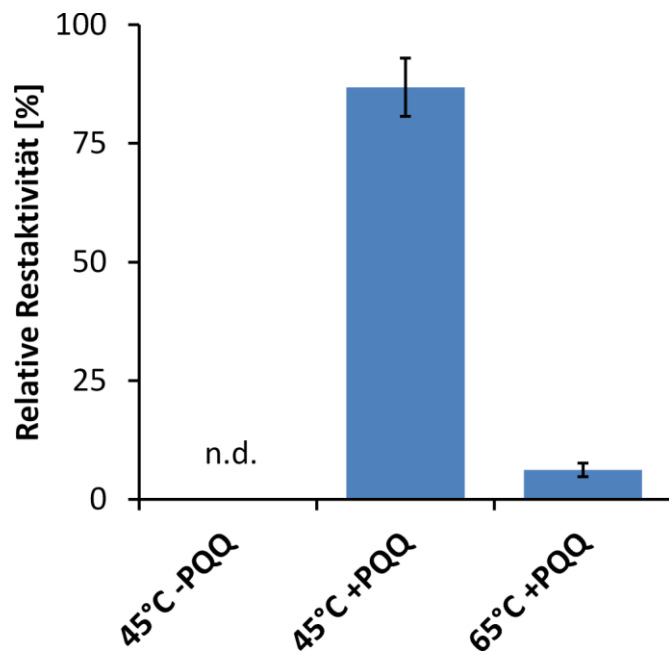


Abbildung A 12: Relative Restaktivität von aufgereinigtem PedE-Protein nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen mit und ohne CaCl₂- und PQQ-Rekonstitutionsschritt vor der Inkubation. Daten stellen den Mittelwert von drei individuellen Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Relative Restaktivitäten unter dem Detektionslimit sind angegeben (n. d.). Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

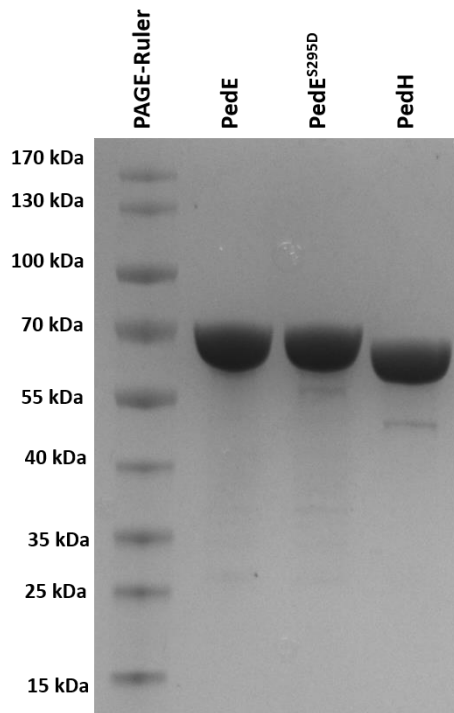


Abbildung A 13: : SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von PedE, PedE^{S295D} und PedH. Pro Bahn wurden 20 µg aufgereinigtes Protein aufgetragen.

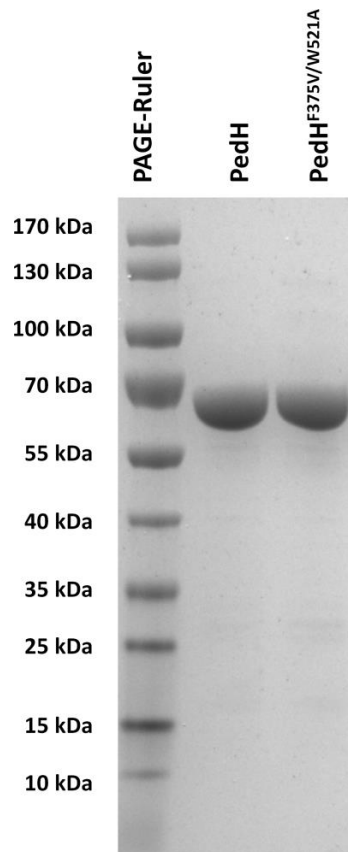


Abbildung A 14: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von PedH und PedH^{F375V/W521A}. Pro Bahn wurden 20 µg aufgereinigtes Protein aufgetragen.

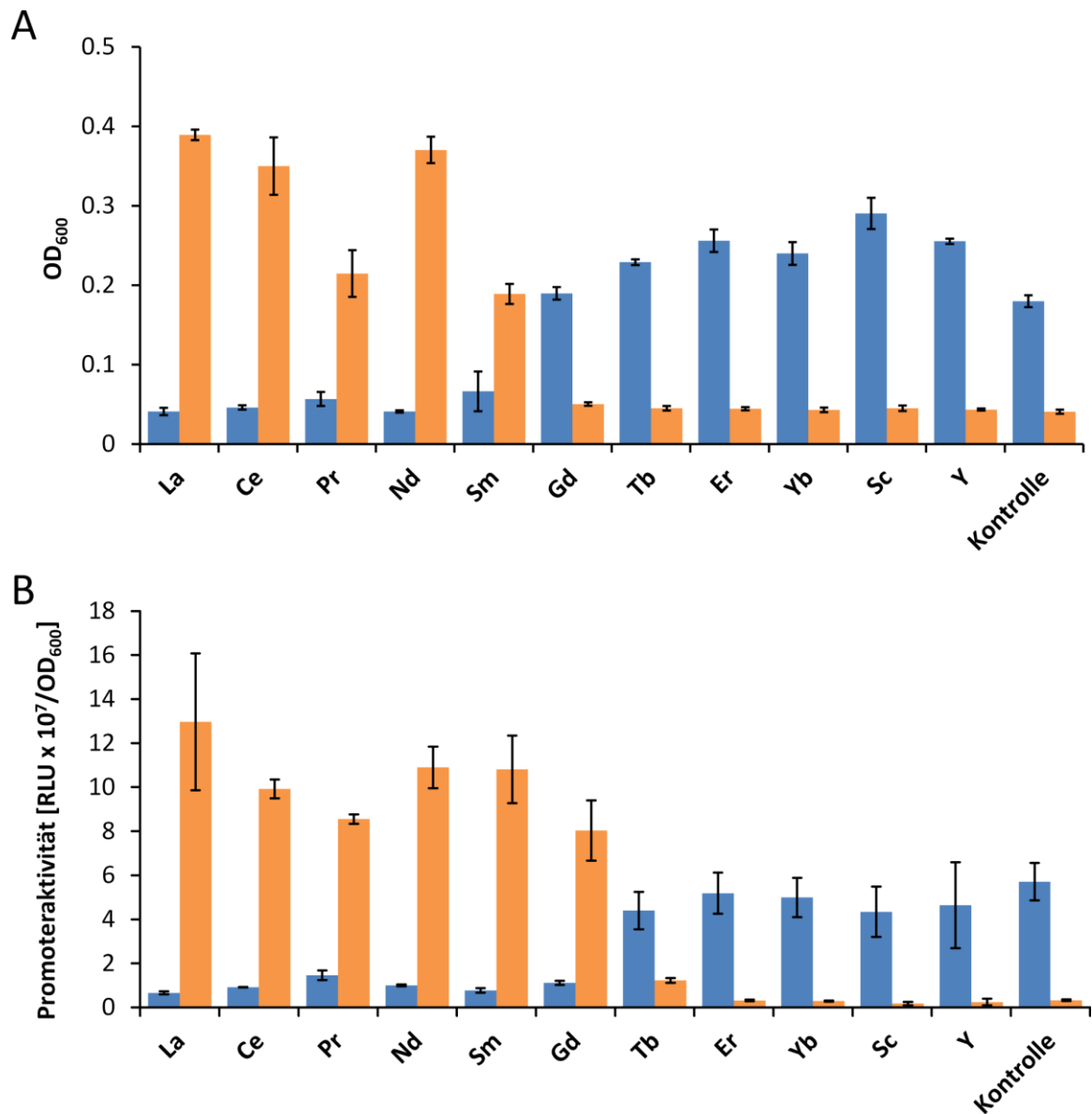


Abbildung A 15: (A) Wachstum von Stamm $\Delta pedH$ (blaue Balken) und $\Delta pedE$ (orangene Balken) in M9-Medium mit 2-Phenylethanol in Gegenwart von je 20 μM verschiedener REEs. Die Kontrolle erfolgte in Abwesenheit von REEs. Die OD_{600} wurde nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C und 350 rpm in 2 ml-Deepwell-Platten gemessen. (B) Aktivitäten des *pedE*-Promotors (blaue Balken) sowie des *pedH*-Promotors (orangene Balken) in Stamm KT2440* während Inkubation in MP-Medium mit 1 mM 2-Phenylethanol und verschiedenen REEs zu je 20 μM . Die Kontrolle erfolgte in Abwesenheit von REEs. Die Promotoraktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) $\times 10^7/\text{OD}_{600}$ angegeben. Datenpunkte stellen Mittelwert von drei Messungen mit zugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

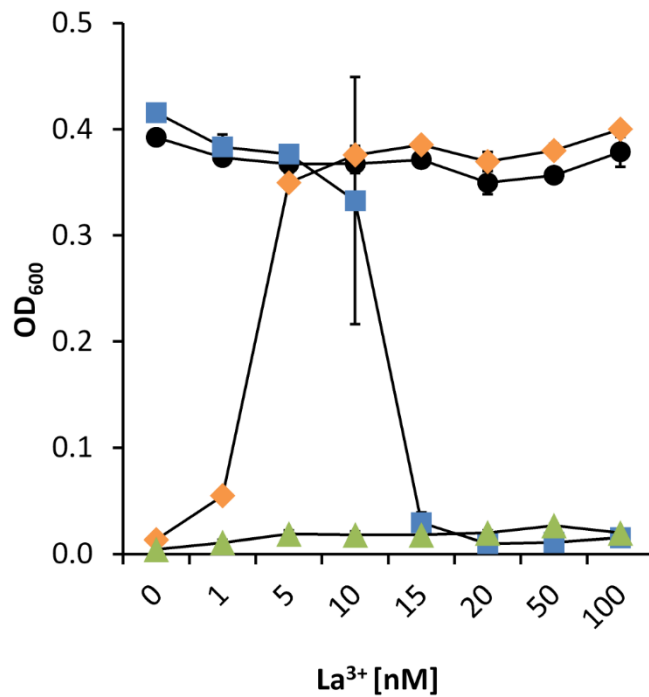


Abbildung A 16: Wachstum von Stamm KT2440* (schwarze Punkte), $\Delta pedH$ (blaue Rechtecke), $\Delta pedE$ (orangene Karos) sowie $\Delta pedE \Delta pedH$ (grüne Dreiecke) in M9-Medium versetzt mit 2-Phenylethanol und verschiedenen La³⁺-Konzentrationen nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C und 350 rpm in 2 ml-Deepwell-Platten. Datenpunkte stellen den Mittelwert von drei Messungen mit dazugehöriger Standardabweichung dar. Abbildung ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2017).

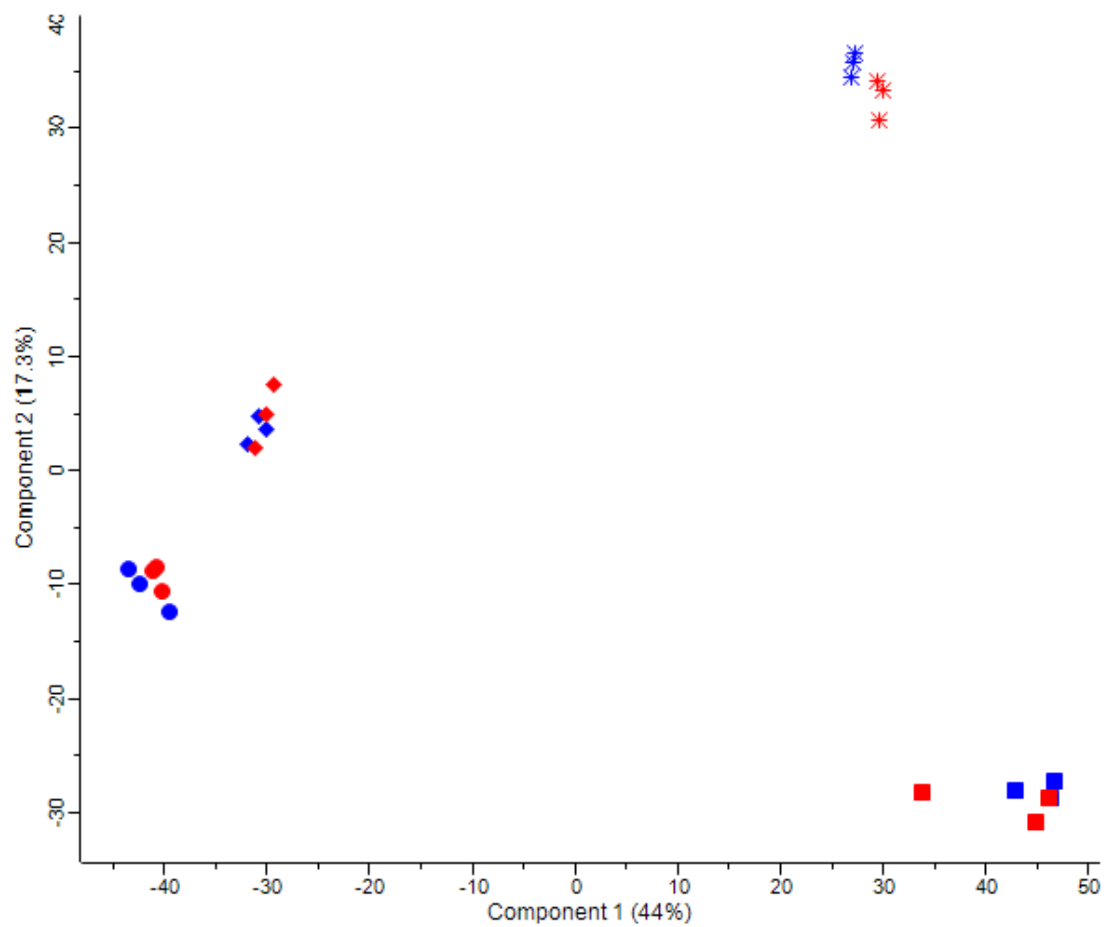


Abbildung A 17: Hauptkomponentenanalyse der Proteomdaten mit den vier verschiedenen Kohlenstoffquellen in Gegenwart und in Abwesenheit von La³⁺. Die verschiedenen Kohlenstoffquellen sind durch Rechtecke (2-Phenylethanol), Punkte (Citrat), Karos (Glucose) und Sterne (Glycerol) dargestellt. Proben in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 μM La³⁺ sind rot bzw. blau gefärbt. Abbildung ist übernommen aus (Wehrmann et al., 2020a).

Tabelle A 1: Übersicht über die Optimierung der verschiedenen Parameter des Ganzzell-Aktivitätstests mit PedE-produzierenden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

pH ^a	DCPIP [μM]	PMS [μM]	Imidazol [mM]	PQQ [μM]	CaCl ₂ [mM]	Spezifische Aktivität [U gCDW ⁻¹] ^b
8	150	150	-	-	-	n.d.
8	150	150	25	-	-	28 ± 2
8	150	150	-	1	-	n.d.
8	150	150	-	-	1	n.d.
8	150	150	-	1	1	10 ± 5
8	150	150	25	1	-	37 ± 1
8	150	150	25	-	1	53 ± 2
5	150	150	25	1	1	76 ± 10
8	150	150	25	1	1	358 ± 13

^aIn Abhängigkeit des gewünschten pH-Wertes wurden entweder 100 mM Tris-Puffer (pH 8) oder 100 mM Phosphat-Puffer (pH 5) verwendet.

^bSpezifische Aktivitäten sind als Mittelwert von drei individuellen Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Aktivitäten unter dem Detektionslimit sind aufgeführt (n. d.).

Tabelle A 2: Resultate von Biotransformationen mit 8 mM 2-Phenylethanol^a. Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann and Klebensberger, 2018).

	Zeit [h]	2-Phenylethanol [mM]	Phenylacetaldehyd [mM]	Phenyllessigsäure[mM]
A	0	7.3 ± 0.5	< 0.07*	n.d.
	1	6.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	n.d.
	24	2.9 ± 0.1	4.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
B	0	7.5 ± 0.1	< 0.07*	n.d.
	1	3.7 ± 0.2	3.9 ± 0.1	n.d.
	24	2.3 ± 0.2	4.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
C1	0	8.0 ± 0.1	< 0.07*	n.d.
	1	8.0 ± 0.1	< 0.07*	n.d.
	24	7.9 ± 0.1	< 0.07*	n.d.
C2	0	7.2 ± 0.4	< 0.07*	n.d.
	1	7.6 ± 0.2	< 0.07*	n.d.
	24	7.3 ± 0.2	< 0.07*	n.d.
C3	0	7.9 ± 0.1	< 0.07*	n.d.
	1	7.8 ± 0.1	< 0.07*	n.d.
	24	7.5 ± 0.1	< 0.07*	n.d.

^aBiotransformationen wurden mit PedE-produzierenden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (**A**) oder aufgereinigtem PedE-Protein (**B**) in Reaktionslösung des DCPIP-abhängigen kolorimetrischen Aktivitätstests durchgeführt. Kontrollexperimente wurden identisch wie die Biotransformationen in (**A**) durchgeführt, jedoch wurden entweder PedE-produzierende Zellen durch eGFP-produzierende Zellen ersetzt (**C1**), DCPIP und PMS nicht zur Reaktionslösung hinzugefügt (**C2**) oder die Reaktionslösung ohne Zellen inkubiert (**C3**). Produkte, die nicht detektiert werden konnten, sind angegeben (n. d.).

*Bis zu 0.06 mM Phenylacetaldehyd, die aus Verunreinigungen der 2-Phenylethanol-Lösung stammten, wurden in allen 0 h-Proben und Kontrollexperimenten detektiert.

Tabelle A 3: Korrelationsmatrix der Aminosäurepositionen der aktiven Tasche von PedH^a, Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020b).

Position	W255	F375	L376	L417	F421	I423	A517	W521
W255	-							
F375	0.14	-						
L376	0.11	0.36	-					
L417	0.19	0.77	0.32	-				
F421	0.15	0.74	0.29	0.71	-			
I423	0.24	0.88	0.39	0.84	0.78	-		
A517	0.18	0.92	0.36	0.84	0.76	0.93	-	
W521	0.19	0.79	0.32	0.74	0.74	0.78	0.79	-

^aNur Positionen der aktiven Tasche von PedH, die nicht im katalytischen Mechanismus involviert sind, wurden berücksichtigt. Werte sind extrahiert aus einer 3DM-Datenbank für PQQ-ADHs, welche aus Sequenzen besteht, die Homologie mit PedE bzw. PedH aufweisen. 0 entspricht keiner signifikanten Koevolution zwischen zwei Positionen und 1 entspricht 100%-iger Koevolution zwischen zwei Positionen in der 3DM-Datenbank.

Tabelle A 4: Liste der regulierten Proteine in Gegenwart von 10 μM La^{3+} während des Wachstums auf 2-Phenylethanol im Vergleich zu Wachstum ohne La^{3+} . Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Locus	Proteinname	Proteininduktion (\log_2)	$-\log_{10}(\text{p-Wert})$
PP_2679	PedH	3.41	2.48
PP_3357	Vdh	2.65	2.92
PP_5125	MutM	2.24	3.15
PP_4905	MotA	1.84	2.01
PP_0091		1.71	2.26
PP_5157		1.59	2.20
PP_0342	WaaC	1.43	2.46
PP_3722	Alr	1.04	2.40
PP_2674	PedE	-1.49	5.90
PP_2673		-2.41	3.91

Tabelle A 5: Liste der regulierten Proteine in Gegenwart von 10 μM La^{3+} während des Wachstums auf Glucose im Vergleich zu Wachstum ohne La^{3+} . Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Locus	Proteinname	Proteininduktion (\log_2)	$-\log_{10}(\text{p-Wert})$
PP_2679	PedH	4.35	3.17
PP_4508		1.74	2.97
PP_3713	CatA	1.44	2.43
PP_5221		1.39	2.21
PP_0367		1.27	2.47
PP_4796	HolA	-1.30	2.15
PP_4374	FliT	-1.95	2.45
PP_2666		-2.01	2.51
PP_3951	Pcal	-2.13	2.68
PP_2680	AldB-II	-2.79	2.41
PP_4632	FolM	-3.54	2.53
PP_2662		-3.61	3.62
PP_1757	BolA	-3.64	3.99
PP_2674	PedE	-6.97	4.13

Tabelle A 6: Liste der regulierten Proteine in Gegenwart von 10 μM La^{3+} während des Wachstums auf Citrat im Vergleich zu Wachstum ohne La^{3+} . Tabelle ist adaptiert nach (Wehrmann et al., 2020a).

Locus	Proteinname	Proteininduktion (\log_2)	$-\log_{10}(\text{p-Wert})$
PP_2491		2.27	4.32
PP_0365	BioC	1.12	2.06
PP_4157	KdpE	-1.41	2.72
PP_2674	PedE	-2.56	2.80
PP_0634	PilA	-3.08	3.88

7 Literaturverzeichnis

- Acevedo-Rocha, C. G., Reetz, M. T., and Nov, Y. (2015). Economical analysis of saturation mutagenesis experiments. *Sci. Rep.* 5, 10654. doi:10.1038/srep10654.
- Adachi, O., Ano, Y., Toyama, H., and Matsushita, K. (2007). "Biooxidation with PQQ- and FAD-Dependent Dehydrogenases," in *Modern Biooxidation* (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), 1–41. doi:10.1002/9783527611522.ch1.
- Adachi, O., and Yakushi, T. (2016). "Membrane-Bound Dehydrogenases of Acetic Acid Bacteria," in *Acetic Acid Bacteria*, eds. K. Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, and A. Okamoto-Kainuma (Tokyo: Springer Japan), 273–297. doi:10.1007/978-4-431-55933-7_13.
- Afolabi, P. R., Mohammed, F., Amaratunga, K., Majekodunmi, O., Dales, S. L., Gill, R., et al. (2001). Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c(L). *Biochemistry* 40, 9799–809. doi:10.1021/bi002932l.
- Agarwal, N., and Kalra, V. K. (1983). Interaction of lanthanide cations and uranyl ion with the calcium/proton antiport system in *Mycobacterium phlei*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 727, 285–292. doi:10.1016/0005-2736(83)90414-5.
- Agrawal, R., Sahoo, B. K., and Saini, D. K. (2016). Cross-talk and specificity in two-component signal transduction pathways. *Future Microbiol.* 11, 685–697. doi:10.2217/fmb-2016-0001.
- Akberdin, I. R., Collins, D. A., Hamilton, R., Oshchepkov, D. Y., Shukla, A. K., Nicora, C. D., et al. (2018). Rare Earth Elements Alter Redox Balance in *Methylobacterium alcaliphilum* 20ZR. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2018.02735.
- Akira, A., Tatsuo, H., Setsuko, O., Masako, S., and Noribumi, T. (1996). Alcohol/aldehyde Dehydrogenase.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., et al. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* 37, 420–423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ankenbauer, A., Schäfer, R. A., Viegas, S. C., Pobre, V., Voß, B., Arraiano, C. M., et al. (2020). *Pseudomonas putida* KT2440 is naturally endowed to withstand industrial-scale stress conditions. *Microb. Biotechnol.* doi:10.1111/1751-7915.13571.
- Anthony, C. (1986). "Bacterial oxidation of methane and methanol," in *Advances in microbial physiology*, 113–210. doi:10.1016/s0065-2911(08)60305-7.
- Anthony, C. (2001). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 757–74. doi:10.1089/15230860152664966.

- Anthony, C. (2004). The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 2–9. doi:10.1016/j.abb.2004.03.038.
- Anthony, C., and Ghosh, M. (1998). The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 69, 1–21. doi:10.1016/s0079-6107(97)00020-5.
- Anthony, C., Ghosh, M., and Blake, C. C. F. (1994). The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone. *Biochem. J.* 304, 665–674. doi:10.1042/bj3040665.
- Anthony, C., and Williams, P. (2003). The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 18–23. doi:10.1016/s1570-9639(03)00042-6.
- Anthony, C., and Zatman, L. J. (1964). The microbial oxidation of methanol. 2. The methanol-oxidizing enzyme of *Pseudomonas* sp. M 27. *Biochem. J.* 92, 614–21. doi:10.1042/bj0920614.
- Anthony, C., and Zatman, L. J. (1967). The microbial oxidation of methanol. Purification and properties of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem. J.* 104, 953–9. doi:10.1042/bj1040953.
- Arias, S., Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G., and Luengo, J. M. (2008). Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. *Environ. Microbiol.* 10, 413–432. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01464.x.
- Aubert, D., Stille, P., Probst, A., Gauthier-lafaye, F., Pourcelot, L., and Del nero, M. (2002). Characterization and migration of atmospheric REE in soils and surface waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 3339–3350. doi:10.1016/S0016-7037(02)00913-4.
- Bagos, P. G., Nikolaou, E. P., Liakopoulos, T. D., and Tsigirigos, K. D. (2010). Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics* 26, 2811–2817. doi:10.1093/bioinformatics/btq530.
- Baldwin, C. V. F., and Woodley, J. (2006). On oxygen limitation in a whole cell biocatalytic Baeyer–Villiger oxidation process. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 362–369. doi:10.1002/bit.20869.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., and Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 489–501. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- Basso, A., and Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Mol. Catal.* 479, 110607. doi:10.1016/j.mcat.2019.110607.
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., et al. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169. doi:10.1093/nar/gkw1099.
- Beckers, V., Poblete-Castro, I., Tomasch, J., and Wittmann, C. (2016). Integrated analysis of gene expression and metabolic fluxes in PHA-producing *Pseudomonas putida* grown on glycerol. *Microb. Cell Fact.* 15, 1–18. doi:10.1186/s12934-016-0470-2.
- Belda, E., van Heck, R. G. A., José Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., et al. (2016). The

- revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ. Microbiol.* 18, 3403–3424. doi:10.1111/1462-2920.13230.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., and Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6, 167. doi:10.1186/1471-2105-6-167.
- Bendz, L. (2017). Veränderung des Lanthanid-abhängigen Quinoproteins PedH in Richtung kurzkettiger Hydroxycarboxylsäuren.
- Benov, L., and Beema, A. F. (2003). Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 429–433. doi:10.1016/S0891-5849(02)01331-X.
- Berks, B. C., Sargent, F., and Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 35, 260–274. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01719.x.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, W252–W258. doi:10.1093/nar/gku340.
- Biedermannová, L., Prokop, Z., Gora, A., Chovancová, E., Kovács, M., Damborsky, J., et al. (2012). A single mutation in a tunnel to the active site changes the mechanism and kinetics of product release in haloalkane dehalogenase LinB. *J. Biol. Chem.* 287, 29062–29074. doi:10.1074/jbc.M112.377853.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K., and Poolman, B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* 580, 1023–1035. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.079.
- Bitas, V., Kim, H.-S., Bennett, J. W., and Kang, S. (2013). Sniffing on Microbes: Diverse Roles of Microbial Volatile Organic Compounds in Plant Health. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 835–843. doi:10.1094/MPMI-10-12-0249-CR.
- Blank, L. M., Ebert, B. E., Buehler, K., and Bühler, B. (2010). Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 349–394. doi:10.1089/ars.2009.2931.
- Blank, L. M., Ionidis, G., Ebert, B. E., Bühler, B., and Schmid, A. (2008). Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase. *FEBS J.* 275, 5173–5190. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06648.x.
- Bloom, J. D., and Arnold, F. H. (2009). In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9995–10000. doi:10.1073/pnas.0901522106.
- Bloom, J. D., Labthavikul, S. T., Otey, C. R., and Arnold, F. H. (2006). Protein stability promotes evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5869–5874. doi:10.1073/pnas.0510098103.
- Blum, J. K., Ricketts, M. D., and Bommarius, A. S. (2012). Improved thermostability of AEH by combining B-FIT analysis and structure-guided consensus method. *J. Biotechnol.* 160, 214–221. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.02.014.
- Bogart, J. a, Lewis, A. J., and Schelter, E. J. (2015). DFT Study of the Active Site of the XoxF-Type Natural,

- Cerium-Dependent Methanol Dehydrogenase Enzyme. *Chem. - A Eur. J.* 21, 1743–1748. doi:10.1002/chem.201405159.
- Bommarius, A. S. (2015). Biocatalysis: A Status Report. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 6, 319–345. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061114-123415.
- Bornscheuer, U., Huisman, G. W., Kazlauskas, R., Lutz, S., Moore, J. C., and Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185–194. doi:10.1038/nature11117.
- Bourret, R. B., Hess, J. F., and Simon, M. I. (1990). Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 41–45. doi:10.1073/pnas.87.1.41.
- Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41, 459–72. doi:10.1038/s41598-018-31191-1.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L. A., and Schalk, I. J. (2009a). The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J. Bacteriol.* 191, 3517–25. doi:10.1128/JB.00010-09.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., and Schalk, I. J. (2009b). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* 11, 1079–1091. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x.
- Brown, P. H., Rathjen, A. H., Graham, R. D., and Tribe, D. E. (1990). “Chapter 92 Rare earth elements in biological systems,” in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, 423–452. doi:10.1016/S0168-1273(05)80135-7.
- Bruggink, A., Roos, E. C., and de Vroom, E. (1998). Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. *Org. Process Res. Dev.* 2, 128–133. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/op9700643>.
- Brustad, E. M., and Arnold, F. H. (2011). Optimizing non-natural protein function with directed evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 201–210. doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.020.
- Bünzli, J.-C. G., and McGill, I. (2018). “Rare Earth Elements,” in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), 1–53. doi:10.1002/14356007.a22_607.pub2.
- Carpenter, D., Boutin, C., Allison, J. E., Parsons, J. L., and Ellis, D. M. (2015). Uptake and Effects of Six Rare Earth Elements (REEs) on Selected Native and Crop Species Growing in Contaminated Soils. *PLoS One* 10, e0129936. doi:10.1371/journal.pone.0129936.
- Carro, J., Ferreira, P., Rodríguez, L., Prieto, A., Serrano, A., Balcells, B., et al. (2015). 5-

- Hydroxymethylfurfural Conversion By Fungal Aryl-Alcohol Oxidase and Unspecific Peroxygenase. *FEBS J.* 282, 3218–3229. doi:10.1111/febs.13177.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., and Von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 3–11. doi:10.1002/jpln.201000085.
- Chattopadhyay, A., Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2010). PQQ-dependent alcohol dehydrogenase (QEDH) of *Pseudomonas aeruginosa* is involved in catabolism of acyclic terpenes. *J. Basic Microbiol.* 50, 119–24. doi:10.1002/jobm.200900178.
- Chen, F., Gauchera, E. A., Leal, N. A., Hutter, D., Havemann, S. A., Govindarajan, S., et al. (2010). Reconstructed evolutionary adaptive paths give polymerases accepting reversible terminators for sequencing and SNP detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1948–1953. doi:10.1073/pnas.0908463107.
- Chen, K., and Arnold, F. H. (1991). Enzyme engineering for nonaqueous solvents: Random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in Polar Organic Media. *Bio/Technology* 9, 1073–1077. doi:10.1038/nbt1191-1073.
- Chen, K., and Arnold, F. H. (1993). Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5618–5622. doi:10.1073/pnas.90.12.5618.
- Chen, K., and Arnold, F. H. (2020). Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nat. Catal.* 3, 203–213. doi:10.1038/s41929-019-0385-5.
- Chen, Z., Matsushita, K., Yamashita, T., Fujii, T., Toyama, H., Adachi, O., et al. (2002). Structure at 1.9 Å Resolution of a Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5. *Structure* 10, 837–849. doi:10.1016/S0969-2126(02)00774-8.
- Chica, R. A., Doucet, N., and Pelletier, J. N. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 378–384. doi:10.1016/j.copbio.2005.06.004.
- Chistoserdova, L. (2016). Lanthanides: New life metals? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 138. doi:10.1007/s11274-016-2088-2.
- Chistoserdova, L., and Kalyuzhnaya, M. G. (2018). Current Trends in Methylo-trophy. *Trends Microbiol.* 26, 703–714. doi:10.1016/j.tim.2018.01.011.
- Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G., and Lidstrom, M. E. (2009). The Expanding World of Methylo-trophic Metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 477–499. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073600.
- Chistoserdova, L., and Lidstrom, M. E. (1997). Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylo-trophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*

- 143, 1729–1736. doi:10.1099/00221287-143-5-1729.
- Choi, J. M., Han, S. S., and Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* 33, 1443–1454. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.
- Choi, K.-H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R., et al. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 443–448. doi:10.1038/nmeth765.
- Chu, F., Beck, D. A. C., and Lidstrom, M. E. (2016). MxaY regulates the lanthanide-mediated methanol dehydrogenase switch in *Methylobacterium buryatense*. *PeerJ* 4, e2435. doi:10.7717/peerj.2435.
- Chu, F., and Lidstrom, M. E. (2016). XoxF Acts as the Predominant Methanol Dehydrogenase in the Type I Methanotroph *Methylobacterium buryatense*. *J. Bacteriol.* 198, 1317–1325. doi:10.1128/JB.00959-15.
- Cobb, R. E., Chao, R., and Zhao, H. (2013). Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE J.* 59, 1432–1440. doi:10.1002/aic.13995.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1637–1645. doi:10.1007/s00253-010-2550-2.
- Cotruvo, J. A. (2019). The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Cent. Sci.*, acscentsci.9b00642. doi:10.1021/acscentsci.9b00642.
- Cotruvo, J. A., Featherston, E. R., Mattocks, J. A., Ho, J. V., and Laremore, T. N. (2018). Lanmodulin: A highly selective lanthanide-binding protein from a lanthanide-utilizing bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 15056–15061. doi:10.1021/jacs.8b09842.
- Cowan, D. A. (1997). Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* 118, 429–438. doi:10.1016/S0300-9629(97)00004-2.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511.
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., and Mann, M. (2011). Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J. Proteome Res.* 10, 1794–1805. doi:10.1021/pr101065j.
- Damborsky, J., and Brezovsky, J. (2014). Computational tools for designing and engineering enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 8–16. doi:10.1016/j.cbpa.2013.12.003.
- Davidson, V. L. (2004). Electron transfer in quinoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 32–40. doi:10.1016/j.abb.2004.03.022.
- Davis, H. J., and Ward, T. R. (2019). Artificial Metalloenzymes: Challenges and Opportunities. *ACS Cent. Sci.* 5, 1120–1136. doi:10.1021/acscentsci.9b00397.

- De Carvalho, C. C. C. R., and Da Fonseca, M. M. R. (2002). Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 19–20, 389–398. doi:10.1016/S1381-1177(02)00190-X.
- de Godoy, L. M. F., Mortensen, P., Makarov, A., Li, G., Macek, B., Horning, S., et al. (2005). Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 2010–2021. doi:10.1074/mcp.t500030-mcp200.
- Delaney, N. F., Kaczmarek, M. E., Ward, L. M., Swanson, P. K., Lee, M.-C., and Marx, C. J. (2013). Development of an Optimized Medium, Strain and High-Throughput Culturing Methods for *Methylobacterium extorquens*. *PLoS One* 8, e62957. doi:10.1371/journal.pone.0062957.
- Deng, Y. W., Ro, S. Y., and Rosenzweig, A. C. (2018). Structure and function of the lanthanide-dependent methanol dehydrogenase XoxF from the methanotroph *Methylobacterium buryatense* 5GB1C. *J. Biol. Inorg. Chem.* 23, 1037–1047. doi:10.1007/s00775-018-1604-2.
- Dethlefsen, S., Jäger, C., Klockgether, J., Schomburg, D., and Tümmler, B. (2019). Metabolite profiling of the cold adaptation of *Pseudomonas putida* KT2440 and cold-sensitive mutants. *Environ. Microbiol. Rep.* 00. doi:10.1111/1758-2229.12793.
- Di Cosimo, R., Mc Auliffe, J., Poulou, A. J., and Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6437–6474. doi:10.1039/c3cs35506c.
- Diatloff, E., Smith, F. W., and Asher, C. J. (1995). Rare earth elements and plant growth: III. Responses of corn and mungbean to low concentrations of cerium in dilute, continuously flowing nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 18, 1991–2003. doi:10.1080/01904169509365039.
- Diehl, A., von Wintzingerode, F., and Görisch, H. (1998). Quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a homodimer--sequence of the gene and deduced structural properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 257, 409–19. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2570409.x.
- Dijkman, W. P., De Gonzalo, G., Mattevi, A., and Fraaije, M. W. (2013). Flavoprotein oxidases: Classification and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5177–5188. doi:10.1007/s00253-013-4925-7.
- Dijkman, W. P., and Fraaije, M. W. (2014). Discovery and Characterization of a 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase from *Methylovorus* sp. Strain MP688. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1082–1090. doi:10.1128/AEM.03740-13.
- Dong, J. J., Fernández-Fueyo, E., Hollmann, F., Paul, C. E., Pesic, M., Schmidt, S., et al. (2018). Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57, 9238–9261. doi:10.1002/anie.201800343.
- Durand, F., Stines-Chaumeil, C., Flexer, V., André, I., and Mano, N. (2010). Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 750–4. doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.102.

- Ebert, B. E., Kurth, F., Grund, M., Blank, L. M., and Schmid, A. (2011). Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6597–6605. doi:10.1128/AEM.05588-11.
- Eigen, M., and Gardiner, W. (1984). Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. *Pure Appl. Chem.* 56, 967–978. doi:10.1351/pac198456080967.
- Eijsink, V. G. H., Gåseidnes, S., Borchert, T. V., and van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* 22, 21–30. doi:10.1016/j.bioeng.2004.12.003.
- Elander, R. P. (2003). Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 385–392. doi:10.1007/s00253-003-1274-y.
- Escalettes, F., and Turner, N. J. (2008). Directed evolution of galactose oxidase: Generation of enantioselective secondary alcohol oxidases. *ChemBioChem* 9, 857–860. doi:10.1002/cbic.200700689.
- Escapa, I. F., del Cerro, C., García, J. L., and Prieto, M. A. (2013). The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environ. Microbiol.* 15, 93–110. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02790.x.
- Estrela, S., and Brown, S. P. (2013). Metabolic and demographic feedbacks shape the emergent spatial structure and function of microbial communities. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003398. doi:10.1371/journal.pcbi.1003398.
- Farhan Ul Haque, M., Kalidass, B., Bandow, N., Turpin, E. A., DiSpirito, A. A., and Semrau, J. D. (2015). Cerium Regulates Expression of Alternative Methanol Dehydrogenases in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7546–7552. doi:10.1128/AEM.02542-15.
- Ferri, S., Kojima, K., and Sode, K. (2011). Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J. Diabetes Sci. Technol.* 5, 1068–76. doi:10.1177/193229681100500507.
- Fetar, H., Gilmour, C., Klinoski, R., Daigle, D. M., Dean, C. R., and Poole, K. (2011). mexEF-oprN Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation by the MexT Activator in Response to Nitrosative Stress and Chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 508–514. doi:10.1128/AAC.00830-10.
- Firsching, F. H., and Brune, S. N. (1991). Solubility products of the trivalent rare-earth phosphates. *J. Chem. Eng. Data* 36, 93–95. doi:10.1021/jc00001a028.
- Fitriyanto, N. A., Fushimi, M., Matsunaga, M., Pertiwinigrum, A., Iwama, T., and Kawai, K. (2011a). Molecular structure and gene analysis of Ce³⁺-induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 613–617. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.01.015.
- Fitriyanto, N. A., Nakamura, M., Muto, S., Kato, K., Yabe, T., Iwama, T., et al. (2011b). Ce³⁺-induced exopolysaccharide production by *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 146–

152. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.09.008.
- Foster, A. W., Osman, D., and Robinson, N. J. (2014). Metal preferences and metallation. *J. Biol. Chem.* 289, 28095–103. doi:10.1074/jbc.R114.588145.
- Franden, M. A., Jayakody, L. N., Li, W.-J., Wagner, N. J., Cleveland, N. S., Michener, W. E., et al. (2018). Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization. *Metab. Eng.* 48, 197–207. doi:10.1016/j.ymben.2018.06.003.
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2015). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res.* 43, D261–D269. doi:10.1093/nar/gku1223.
- Gandolfi, R., Cavenago, K., Gualandris, R., Gago, J. V. S., and Molinari, F. (2004). Production of 2-phenylacetic acid and phenylacetaldehyde by oxidation of 2-phenylethanol with free immobilized cells of *Acetobacter aceti*. *Process Biochem.* 39, 749–753. doi:10.1016/S0032-9592(03)00185-7.
- García-Hidalgo, J., Brink, D. P., Ravi, K., Paul, C. J., Lidén, G., and Gorwa-Grauslund, M. F. (2020). Vanillin Production in *Pseudomonas*: Whole-genome sequencing of *Pseudomonas* sp. strain 9.1 and reannotation of *Pseudomonas putida* CalA as a vanillin reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–17. doi:10.1128/AEM.02442-19.
- García-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R. B. (1994). The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* 176, 5587–5600. doi:10.1128/jb.176.18.5587-5600.1994.
- Geerlof, A., Van Tol, J. B. a., Jongejan, J. a., and Duine, J. A. (2014). Enantioselective conversions of the racemic C3-alcohol synthons, glycidol (2,3-Epoxy-1-propanol), and solketal (2,2-Dimethyl-4-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolane) by quinohaemoprotein alcohol dehydrogenases and bacteria containing such enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1028–1036. doi:10.1271/bbb.58.1028.
- Geissler, J., Ghisla, S., and Kroneck, P. M. H. (1986). Flavin-dependent alcohol oxidase from yeast: Studies on the catalytic mechanism and inactivation during turnover. *Eur. J. Biochem.* 160, 93–100. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09944.x.
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol.* 498, 349–61. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. a, and Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. doi:10.1038/nmeth.1318.
- Gliese, N., Khodaverdi, V., Schobert, M., and Görisch, H. (2004). AgmR controls transcription of a regulon with several operons essential for ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933. *Microbiology* 150, 1851–1857. doi:10.1099/mic.0.26882-0.
- Good, N. M., Fellner, M., Demirer, K., Hu, J., Hausinger, R. P., and Martinez-Gomez, N. C. (2020).

- Lanthanide-dependent alcohol dehydrogenases require an essential aspartate residue for metal coordination and enzymatic function. *J. Biol. Chem.*, jbc.RA120.013227. doi:10.1074/jbc.RA120.013227.
- Good, N. M., Vu, H. N., Suriano, C. J., Subuyuj, G. A., Skovran, E., and Martinez-Gomez, N. C. (2016). Pyrroloquinoline Quinone Ethanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 Extends Lanthanide-Dependent Metabolism to Multicarbon Substrates. *J. Bacteriol.* 198, 3109–3118. doi:10.1128/JB.00478-16.
- Goodwin, M. G., and Anthony, C. (1996). Characterization of a novel methanol dehydrogenase containing a Ba²⁺ ion at the active site. *Biochem. J.* 318, 673–9. doi:10.1042/bj3180673.
- Goodwin, P. M., and Anthony, C. (1998). The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* 40, 1–80. doi:10.1016/s0065-2911(08)60129-0.
- Goswami, P., Chinnadayala, S. S. R., Chakraborty, M., Kumar, A. K., and Kakoti, A. (2013). An overview on alcohol oxidases and their potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4259–4275. doi:10.1007/s00253-013-4842-9.
- Graf, N., and Altenbuchner, J. (2011). Development of a method for markerless gene deletion in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5549–5552. doi:10.1128/AEM.05055-11.
- Gribenko, A. V., Patel, M. M., Liu, J., McCallum, S. a, Wang, C., and Makhatadze, G. I. (2009). Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge–charge interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 2601–2606. doi:10.1073/pnas.0808220106.
- Groom, J., Ford, S. M., Pesesky, M. W., and Lidstrom, M. E. (2019). A mutagenic screen identifies a TonB-dependent receptor required for the lanthanide metal switch in the Type I methanotroph *Methylovium buryatense* 5GB1C. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00120-19.
- Gu, W., Farhan Ul Haque, M., DiSpirito, A. A., and Semrau, J. D. (2016). Uptake and effect of rare earth elements on gene expression in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw129. doi:10.1093/femsle/fnw129.
- Gu, W., and Semrau, J. D. (2017). Copper and cerium-regulated gene expression in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 8499–8516. doi:10.1007/s00253-017-8572-2.
- Gumley, A. W., and Inniss, W. E. (1996). Cold shock proteins and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas putida* Q5 and its transconjugant. *Can. J. Microbiol.* 42, 798–803. doi:10.1139/m96-100.
- Gumulya, Y., and Reetz, M. T. (2011). Enhancing the thermal robustness of an enzyme by directed evolution: Least favorable starting points and inferior mutants can map superior evolutionary pathways. *ChemBioChem* 12, 2502–2510. doi:10.1002/cbic.201100412.
- Guo, Z., Murphy, L., Stein, V., Johnston, W. A., Alcalá-Perez, S., and Alexandrov, K. (2016). Engineered PQQ-Glucose Dehydrogenase as a Universal Biosensor Platform. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 10108–

10111. doi:10.1021/jacs.6b06342.
- Habe, H., Shimada, Y., Yakushi, T., Hattori, H., Ano, Y., Fukuoka, T., et al. (2009). Microbial Production of Glyceric Acid, an Organic Acid That Can Be Mass Produced from Glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7760–7766. doi:10.1128/AEM.01535-09.
- Hammer, S. C., Marjanovic, A., Dominicus, J. M., Nestl, B. M., and Hauer, B. (2015). Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis. *Nat. Chem. Biol.* 11, 121–126. doi:10.1038/nchembio.1719.
- Hao, J., and Berry, A. (2004). A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 689–697. doi:10.1093/protein/gzh081.
- Hatti-Kaul, R., Nilsson, L. J., Zhang, B., Rehnberg, N., and Lundmark, S. (2020). Designing Biobased Recyclable Polymers for Plastics. *Trends Biotechnol.* 38, 50–67. doi:10.1016/j.tibtech.2019.04.011.
- Heer, D., and Sauer, U. (2008). Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microb. Biotechnol.* 1, 497–506. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00050.x.
- Hempel, N., Görisch, H., and Mern, D. S. (2013). Gene *ercaA*, encoding a putative iron-containing alcohol dehydrogenase, is involved in regulation of ethanol utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 195, 3925–3932. doi:10.1128/JB.00531-13.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6557–6567. doi:10.1128/jb.172.11.6557-6567.1990.
- Himo, F., Eriksson, L. A., Maseras, F., and Siegbahn, P. E. M. (2000). Catalytic Mechanism of Galactose Oxidase: A Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 8031–8036. doi:10.1021/ja994527r.
- Hishinuma, S., Yuki, M., Fujimura, M., and Fukumori, F. (2006). OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 8, 2115–2124. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01088.x.
- Hoenes, J., and Unkrig, V. (1993). Colorimetric determination using a PQQ-dependent dehydrogenase, test agents and nitrosoaniline compounds therefor.
- Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Buehler, K., Schallmey, A., and Bühler, B. (2011). Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* 13, 226–265. doi:10.1039/C0GC00595A.
- Hölscher, T., Weinert-Sepalage, D., and Görisch, H. (2007). Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* 153, 499–506. doi:10.1099/mic.0.2006/002196-0.
- Horowitz, C. T. (2000). *Biochemistry of Scandium and Yttrium, Part 2: Biochemistry and Applications*. Boston, MA: Springer US doi:10.1007/978-1-4615-4311-4.

- Hosseini, R., Kuepper, J., Koebbing, S., Blank, L. M., Wierckx, N., and Winde, J. H. (2017). Regulation of solvent tolerance in *Pseudomonas putida* S12 mediated by mobile elements. *Microb. Biotechnol.* 10, 1558–1568. doi:10.1111/1751-7915.12495.
- Hsu, C.-T., Kuo, Y.-C., Liu, Y.-C., and Tsai, S.-L. (2020). Green conversion of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2,5-dicarboxylic acid by heterogeneous expression of 5-hydroxymethylfurfural oxidase in *Pseudomonas putida* S12. *Microb. Biotechnol.* 0, 1–9. doi:10.1111/1751-7915.13564.
- Huang, J., Yu, Z., and Chistoserdova, L. (2018). Lanthanide-Dependent Methanol Dehydrogenases of XoxF4 and XoxF5 Clades Are Differentially Distributed Among Methylotrophic Bacteria and They Reveal Different Biochemical Properties. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2018.01366.
- Huang, J., Yu, Z., Groom, J., Cheng, J.-F., Tarver, A., Yoshikuni, Y., et al. (2019). Rare earth element alcohol dehydrogenases widely occur among globally distributed, numerically abundant and environmentally important microbes. *ISME J.*, 20–22. doi:10.1038/s41396-019-0414-z.
- Hughes, G., and Lewis, J. C. (2018). Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chem. Rev.* 118, 1–3. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00741.
- Huheey, J. E., Keiter, E. A., & Keiter, R. L. (1993). *Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity*. New York, NY: HarperCollins College Publishers.
- Igarashi, S., Okuda, J., Ikebukuro, K., and Sode, K. (2004). Molecular engineering of PQQGDH and its applications. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 52–63. doi:10.1016/j.abb.2004.06.001.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.
- Inoue, A., and Horikoshi, K. (1989). A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338, 264–266. doi:10.1038/338264a0.
- Insam, H., and Seewald, M. S. A. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol. Fertil. Soils* 46, 199–213. doi:10.1007/s00374-010-0442-3.
- Irving, H., and Williams, R. J. P. (1953). 637. The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.*, 3192. doi:10.1039/jr9530003192.
- Jahn, B., Pol, A., Lumpe, H., Barends, T. R. M., Dietl, A., Hogendoorn, C., et al. (2018). Similar but Not the Same: First Kinetic and Structural Analyses of a Methanol Dehydrogenase Containing a Europium Ion in the Active Site. *ChemBioChem* 19, 1147–1153. doi:10.1002/cbic.201800130.
- Jeske, M., and Altenbuchner, J. (2010). The *Escherichia coli* rhamnose promoter rhaP BAD is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp–cAMP activation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1923–1933. doi:10.1007/s00253-009-2245-8.
- Jiang, L., Althoff, E. A., Clemente, F. R., Doyle, L., Rothlisberger, D., Zanghellini, A., et al. (2008). De Novo Computational Design of Retro-Aldol Enzymes. *Science (80-.)*. 319, 1387–1391. doi:10.1126/science.1152692.

- Jones, S. E., and Elliot, M. A. (2017). Streptomyces Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. *Trends Microbiol.* 26, 3167–3170. doi:10.1016/j.tim.2017.02.001.
- Jurkevitch, E., Hadar, Y., Chen, Y., Libman, J., and Shanzer, A. (1992). Iron uptake and molecular recognition in *Pseudomonas putida*: receptor mapping with ferrichrome and its biomimetic analogs. *J. Bacteriol.* 174, 78–83. doi:10.1099/13500872-140-7-1697.
- Kabata-Pendias, A., and Mukherjee, A. B. (2007). *Trace Elements from Soil to Human*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-540-32714-1.
- Kadisich, M., Willrodt, C., Hillen, M., Bühler, B., and Schmid, A. (2017). Maximizing the stability of metabolic engineering-derived whole-cell biocatalysts. *Biotechnol. J.*, 1600170. doi:10.1002/biot.201600170.
- Kahm, M., Kschischo, M., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., and Hasenbrink, G. (2015). grofit : Fitting Biological Growth Curves with R. *J. Stat. Softw.* 33. doi:10.18637/jss.v033.i07.
- Kaluzhnaya, M., Khmelenina, V., Eshinimaev, B., Suzina, N., Nikitin, D., Solonin, A., et al. (2001). Taxonomic Characterization of New Alkaliphilic and Alkalitolerant Methanotrophs from Soda Lakes of the Southeastern Transbaikal Region and description of *Methylomicrobium buryatense* sp.nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 166–176. doi:10.1078/0723-2020-00028.
- Kalyuzhnaya, M. G., Hristova, K. R., Lidstrom, M. E., and Chistoserdova, L. (2008). Characterization of a Novel Methanol Dehydrogenase in Representatives of *Burkholderiales*: Implications for Environmental Detection of Methylotrophy and Evidence for Convergent Evolution. *J. Bacteriol.* 190, 3817–3823. doi:10.1128/JB.00180-08.
- Kan, S. B. J., Lewis, R. D., Chen, K., and Arnold, F. H. (2016). Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science (80-.)*. 354, 1048–1051. doi:10.1126/science.aah6219.
- Kay, C. W. M., Mennenga, B., Görisch, H., and Bittl, R. (2006a). Structure of the pyrroloquinoline quinone radical in quinoprotein ethanol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 281, 1470–6. doi:10.1074/jbc.M511132200.
- Kay, C. W. M., Mennenga, B., Görisch, H., and Bittl, R. (2006b). Substrate binding in quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* studied by electron-nuclear double resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5267–5272. doi:10.1073/pnas.0509667103.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70, 191–197. doi:10.1016/0378-1119(88)90117-5.
- Keitel, T., Diehl, A., Knaute, T., Stezowski, J. J., Höhne, W., and Görisch, H. (2000). X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 297, 961–974. doi:10.1006/jmbi.2000.3603.
- Keltjens, J. T., Pol, A., Reimann, J., and Op den Camp, H. J. M. (2014). PQQ-dependent methanol

- dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6163–83. doi:10.1007/s00253-014-5766-8.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D. S. (2010). Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 471–505. doi:10.1146/annurev-biochem-030409-143718.
- Kille, S., Acevedo-Rocha, C. G., Parra, L. P., Zhang, Z. G., Opperman, D. J., Reetz, M. T., et al. (2013). Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth. Biol.* 2, 83–92. doi:10.1021/sb300037w.
- Kim, J., and Park, W. (2014). Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6933–6946. doi:10.1007/s00253-014-5883-4.
- Knief, C., Frances, L., and Vorholt, J. A. (2010). Competitiveness of diverse *Methylobacterium* strains in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana* and identification of representative models, including *M. extorquens* PA1. *Microb. Ecol.* 60, 440–52. doi:10.1007/s00248-010-9725-3.
- Koopman, F., Wierckx, N., de Winde, J. H., and Ruijsenaars, H. J. (2010a). Efficient whole-cell biotransformation of 5-(hydroxymethyl)furfural into FDCA, 2,5-furandicarboxylic acid. *Bioresour. Technol.* 101, 6291–6. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.050.
- Koopman, F., Wierckx, N., De Winde, J. H., and Ruijsenaars, H. J. (2010b). Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4919–4924. doi:10.1073/pnas.0913039107.
- Krause, S. M. B., Johnson, T., Samadhi Karunaratne, Y., Fu, Y., Beck, D. A. C., Chistoserdova, L., et al. (2017). Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 358–363. doi:10.1073/pnas.1619871114.
- Krieger, E., and Vriend, G. (2014). YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 30, 2981–2982. doi:10.1093/bioinformatics/btu426.
- Kries, H., Blomberg, R., and Hilvert, D. (2013). De novo enzymes by computational design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 221–228. doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.012.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., and Faber, K. (2004). Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Adv. Synth. Catal.* 346, 125–142. doi:10.1002/adsc.200303177.
- Kuipers, R., Joosten, H. J., van Berkel, W. J. H., Leferink, N. G. H., Rooijen, E., Ittmann, E., et al. (2010). 3DM: Systematic analysis of heterogeneous superfamily data to discover protein functionalities. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78, NA-NA. doi:10.1002/prot.22725.
- Kuipers, R., Joosten, H. J., Verwiël, E., Paans, S., Akerboom, J., Van Der Oost, J., et al. (2009). Correlated mutation analyses on super-family alignments reveal functionally important residues. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 76, 608–616. doi:10.1002/prot.22374.
- Ladkau, N., Schmid, A., and Bühler, B. (2014). The microbial cell-functional unit for energy dependent

- multistep biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30, 178–189. doi:10.1016/j.copbio.2014.06.003.
- Lam, C. M. C., Suárez Diez, M., Godinho, M., and Martins dos Santos, V. A. P. (2012). Programmable bacterial catalysis - Designing cells for biosynthesis of value-added compounds. *FEBS Lett.* 586, 2184–2190. doi:10.1016/j.febslet.2012.02.030.
- LaSarre, B., McCully, A. L., Lennon, J. T., and McKinlay, J. B. (2017). Microbial mutualism dynamics governed by dose-dependent toxicity of cross-fed nutrients. *ISME J.* 11, 337–348. doi:10.1038/ismej.2016.141.
- Laurinavicius, V., Razumiene, J., Ramanavicius, A., and Ryabov, A. D. (2004). Wiring of PQQ-dehydrogenases. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1217–1222. doi:10.1016/j.bios.2004.05.012.
- Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S. F., Pasamontes, L., et al. (2002). The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng. Des. Sel.* 15, 403–411. doi:10.1093/protein/15.5.403.
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S. F., and Wyss, M. (2000). The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1543, 408–415. doi:10.1016/S0167-4838(00)00238-7.
- León, R., Prazeres, D. M. F., Fernandes, P., and Molinari, F. (2001). A multiphasic hollow fiber reactor for the whole-cell bioconversion of 2-methyl-1, 3-propanediol to (R)- β -hydroxyisobutyric acid. *Biotechnol. Prog.* 17, 468–473. doi:10.1021/bp010015g.
- Leopoldini, M., Russo, N., and Toscano, M. (2007). The preferred reaction path for the oxidation of methanol by PQQ-containing methanol dehydrogenase: Addition-elimination versus hydride-transfer mechanism. *Chem. - A Eur. J.* 13, 2109–2117. doi:10.1002/chem.200601123.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43, D257–D260. doi:10.1093/nar/gku949.
- Leveau, J. H. J., and Lindow, S. E. (2005). Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2365–2371. doi:10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005.
- Li, J., Gan, J.-H., Mathews, F. S., and Xia, Z.-X. (2011). The enzymatic reaction-induced configuration change of the prosthetic group PQQ of methanol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406, 621–6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.107.
- Lieder, S., Jahn, M., Koepff, J., Müller, S., and Takors, R. (2016). Environmental stress speeds up DNA replication in *Pseudomonas putida* in chemostat cultivations. *Biotechnol. J.* 11, 155–163. doi:10.1002/biot.201500059.
- Liese, A., and Seelbach, K. (2006). *Industrial Biotransformations*. 46th ed., eds. A. Liese, K. Seelbach, and C. Wandrey Wiley doi:10.1002/3527608184.
- Lim, S., and Franklin, S. J. (2004). Lanthanide-binding peptides and the enzymes that Might Have Been. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2184–2188. doi:10.1007/s00018-004-4156-2.

- Lin, B., and Tao, Y. (2017). Whole-cell biocatalysts by design. *Microb. Cell Fact.* 16, 1–12. doi:10.1186/s12934-017-0724-7.
- Lin, B. X., Zhang, Z. J., Liu, W. F., Dong, Z. Y., and Tao, Y. (2013). Enhanced production of N-acetyl-d-neuraminic acid by multi-approach whole-cell biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4775–4784. doi:10.1007/s00253-013-4754-8.
- Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., and Maillard, J.-Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1589–1596. doi:10.1093/jac/dks129.
- Lisdat, F. (2020). PQQ-GDH – Structure, function and application in bioelectrochemistry. *Bioelectrochemistry* 134, 107496. doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107496.
- Liu, J., Wu, S., and Li, Z. (2018a). Recent advances in enzymatic oxidation of alcohols. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 43, 77–86. doi:10.1016/j.cbpa.2017.12.001.
- Liu, L., Wang, J., Rosenberg, D., Zhao, H., Lengyel, G., and Nadel, D. (2018b). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *J. Archaeol. Sci. Reports* 21, 783–793. doi:10.1016/j.jasrep.2018.08.008.
- Liu, W., and Wang, P. (2007). Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnol. Adv.* 25, 369–384. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.03.002.
- Loeschcke, A., and Thies, S. (2015). *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6197–6214. doi:10.1007/s00253-015-6745-4.
- Lumpe, H., Pol, A., Op den Camp, H. J. M., and Daumann, L. (2018). Impact of the lanthanide contraction on the activity of a lanthanide-dependent methanol dehydrogenase – a kinetic and DFT study. *Dalt. Trans.* doi:10.1039/C8DT01238E.
- Lutz, S. (2010). Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 734–743. doi:10.1016/j.copbio.2010.08.011.
- Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J., and Laboratory, C. S. H. (1982). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Maqbool, A., Horler, R. S. P., Muller, A., Wilkinson, A. J., Wilson, K. S., and Thomas, G. H. (2015). The substrate-binding protein in bacterial ABC transporters: dissecting roles in the evolution of substrate specificity. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 1011–1017. doi:10.1042/BST20150135.
- Markert, B. (1987). The pattern of distribution of lanthanide elements in soils and plants. *Phytochemistry* 26, 3167–3170. doi:10.1016/S0031-9422(00)82463-2.
- Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 13, 2702–2716. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x.
- Martinez-Gomez, N. C., Vu, H. N., and Skovran, E. (2016). Lanthanide Chemistry: From Coordination in Chemical Complexes Shaping Our Technology to Coordination in Enzymes Shaping Bacterial

- Metabolism. *Inorg. Chem.* 55, 10083–10089. doi:10.1021/acs.inorgchem.6b00919.
- Masuda, S., Suzuki, Y., Fujitani, Y., Mitsui, R., Nakagawa, T., Shintani, M., et al. (2018). Lanthanide-Dependent Regulation of Methylotrophy in *Methylobacterium aquaticum* Strain 22A. *mSphere* 3, e00462-17. doi:10.1128/mSphere.00462-17.
- Matilla, M. A., Ramos, J., Duque, E., de Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M., and Ramos-González, M. I. (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 9, 1842–1850. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01286.x.
- Matsumura, M., Signor, G., and Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* 342, 291–293. doi:10.1038/342291a0.
- Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., et al. (2003). 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1959–66. doi:10.1128/aem.69.4.1959-1966.2003.
- Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O. (1994). “Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria,” in *Advances in Microbial Physiology*, 247–301. doi:10.1016/S0065-2911(08)60181-2.
- Matsushita, K., Toyama, H., Yamada, M., and Adachi, O. (2002). Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 13–22. doi:10.1007/s00253-001-0851-1.
- Matsushita, K., Yamashita, T., Aoki, N., Toyama, H., and Adachi, O. (1999). Electron Transfer from Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase to Blue Copper Protein Azurin in the Alcohol Oxidase Respiratory Chain of *Pseudomonas putida* HK5. *Biochemistry* 38, 6111–6118. doi:10.1021/bi990121f.
- Matsutani, M., and Yakushi, T. (2018). Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases of acetic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 9531–9540. doi:10.1007/s00253-018-9360-3.
- Mattioda, G., and Christidis, Y. (2000). “Glyoxylic Acid,” in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA). doi:10.1002/14356007.a12_495.
- Mattocks, J. A., Ho, J. V., and Cotruvo, J. A. (2019). A selective, protein-based fluorescent sensor with picomolar affinity for rare earth elements. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 2857–2861. doi:10.1021/jacs.8b12155.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17593–17598. doi:10.1073/pnas.0407921102.
- McKenna, S. M., Leimkühler, S., Herter, S., Turner, N. J., and Carnell, A. J. (2015). Enzyme cascade reactions: Synthesis of furandicarboxylic acid (FDCA) and carboxylic acids using oxidases in tandem. *Green Chem.* 17, 3271–3275. doi:10.1039/c5gc00707k.
- McSkimming, A., Cheisson, T., Carroll, P. J., and Schelter, E. J. (2018). Functional Synthetic Model for the

- Lanthanide-Dependent Quinoid Alcohol Dehydrogenase Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 1223–1226. doi:10.1021/jacs.7b12318.
- Meloche, C. C., and Vrátný, F. (1959). Solubility product relations in the rare earth hydrous hydroxides. *Anal. Chim. Acta* 20, 415–418. doi:10.1016/0003-2670(59)80090-8.
- Mennenga, B., Kay, C. W. M., and Görisch, H. (2009). Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: the unusual disulfide ring formed by adjacent cysteine residues is essential for efficient electron transfer to cytochrome c550. *Arch. Microbiol.* 191, 361–7. doi:10.1007/s00203-009-0460-4.
- Mern, D. S., Ha, S. W., Khodaverdi, V., Gliese, N., and Görisch, H. (2010). A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators. *Microbiology* 156, 1505–1516. doi:10.1099/mic.0.032847-0.
- Meyer, D., Walter, L., Kolter, G., Pohl, M., Müller, M., and Tittmann, K. (2011). Conversion of pyruvate decarboxylase into an enantioselective carboligase with biosynthetic potential. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 3609–3616. doi:10.1021/ja110236w.
- Migaszewski, Z. M., and Gałuszka, A. (2015). The Characteristics, Occurrence, and Geochemical Behavior of Rare Earth Elements in the Environment: A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 429–471. doi:10.1080/10643389.2013.866622.
- Mijs, W. J., and de Jonge, C. R. H. I. eds. (1986). *Organic Syntheses by Oxidation with Metal Compounds*. Boston, MA: Springer US doi:10.1007/978-1-4613-2109-5.
- Milani, M., Leoni, L., Rampioni, G., Zennaro, E., Ascenzi, P., and Bolognesi, M. (2005). An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation-dependent allosteric activation mechanism. *Structure* 13, 1289–1297. doi:10.1016/j.str.2005.05.014.
- Mitchell, L. A., Cai, Y., Taylor, M., Noronha, A. M., Chuang, J., Dai, L., et al. (2013). Multichange Isothermal Mutagenesis: A New Strategy for Multiple Site-Directed Mutations in Plasmid DNA. *ACS Synth. Biol.* 2, 473–477. doi:10.1021/sb300131w.
- Molina, L., Segura, A., Duque, E., and Ramos, J. (2019). *The versatility of Pseudomonas putida in the rhizosphere environment*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.aams.2019.12.002.
- Molinari, F., Gandolfi, R., Villa, R., and Kiener, A. (2003). Enantioselective oxidation of prochiral 2-methyl-1, 3-propandiol by *Acetobacter pasteurianus*. 14, 2041–2043. doi:10.1016/S0957-4166(03)00407-5.
- Molinari, F., Villa, R., Aragozzini, F., Leon, R., and Prazeres, D. M. F. (1999). Enantioselective oxidation of (RS)-2-phenyl-1-propanol to (S)-2-phenylpropanoic acid with *Gluconobacter oxydans*: Simplex optimization of the biotransformation. *Tetrahedron Asymmetry* 10, 3003–3009. doi:10.1016/S0957-4166(99)00309-2.
- Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G., and Riva, S. (2011). Redox reactions catalyzed by isolated enzymes.

- Chem. Rev.* 111, 4111–4140. doi:10.1021/cr100334x.
- Moonmangmee, D., Fujii, Y., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita, K., et al. (2001). Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein cyclic alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2763–72. doi:10.1271/bbb.65.2763.
- Morley, K. L., and Kazlauskas, R. (2005). Improving enzyme properties: When are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* 23, 231–237. doi:10.1016/j.tibtech.2005.03.005.
- Mota, C. J. A., Pinto, B. P., and de Lima, A. L. (2017). Glycerol: A Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry. *Glycerol A Versatile Renew. Feed. Chem. Ind.* 2015, 1–110. doi:10.1007/978-3-319-59375-3.
- Mückschel, B., Simon, O., Klebensberger, J., Graf, N., Rosche, B., Altenbuchner, J., et al. (2012). Ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8531–9. doi:10.1128/AEM.02062-12.
- Nakagawa, T., Mitsui, R., Tani, A., Sasa, K., Tashiro, S., Iwama, T., et al. (2012). A Catalytic Role of XoxF1 as La³⁺-Dependent Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* Strain AM1. *PLoS One* 7, e50480. doi:10.1371/journal.pone.0050480.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., et al. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 799–808. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x.
- Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A., and Hauer, B. (2014). New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53, 3070–3095. doi:10.1002/anie.201302195.
- Nestl, B. M., and Hauer, B. (2014). Engineering of flexible loops in enzymes. *ACS Catal.* 4, 3201–3211. doi:10.1021/cs500325p.
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Danchin, A., and de Lorenzo, V. (2016). From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34, 20–29. doi:10.1016/j.cbpa.2016.05.011.
- Nikel, P. I., and de Lorenzo, V. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metab. Eng.* 50, 142–155. doi:10.1016/j.ymben.2018.05.005.
- Nikel, P. I., Kim, J., and de Lorenzo, V. (2014a). Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 16, 239–254. doi:10.1111/1462-2920.12224.
- Nikel, P. I., Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2014b). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 368–79. doi:10.1038/nrmicro3253.
- Nikel, P. I., Romero-Campero, F. J., Zeidman, J. a, Goñi-Moreno, Á., and de Lorenzo, V. (2015). The

- Glycerol-Dependent Metabolic Persistence of *Pseudomonas putida* KT2440 Reflects the Regulatory Logic of the GlpR Repressor. *MBio* 6, 1–13. doi:10.1128/mBio.00340-15.
- Nobili, A., Tao, Y., Pavlidis, I. V., van den Bergh, T., Joosten, H. J., Tan, T., et al. (2015). Simultaneous Use of in Silico Design and a Correlated Mutation Network as a Tool To Efficiently Guide Enzyme Engineering. *ChemBioChem* 16, 805–810. doi:10.1002/cbic.201402665.
- Ochsner, A. M., Hemmerle, L., Vonderach, T., Nüssli, R., Bortfeld-Miller, M., Hattendorf, B., et al. (2019). Use of rare-earth elements in the phyllosphere colonizer *Methylobacterium extorquens* PA1. *Mol. Microbiol.*, 0–2. doi:10.1111/mmi.14208.
- Op den Camp, H. J. M., Islam, T., Stott, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., et al. (2009). Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 293–306. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x.
- Osman, D., Foster, A. W., Chen, J., Svedaite, K., Steed, J. W., Lurie-Luke, E., et al. (2017). Fine control of metal concentrations is necessary for cells to discern zinc from cobalt. *Nat. Commun.* 8. doi:10.1038/s41467-017-02085-z.
- Oubrie, A., and Dijkstra, B. W. (2000). Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymatic reactions. *Protein Sci.* 9, 1265–1273. doi:10.1110/ps.9.7.1265.
- Oubrie, A., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Huizinga, E. G., and Dijkstra, B. W. (2002). Crystal structure of quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer. *J. Biol. Chem.* 277, 3727–32. doi:10.1074/jbc.M109403200.
- Oubrie, A., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Olsthoorn, A. J. J., Duine, J. A., and Dijkstra, B. W. (1999). Structure and mechanism of soluble quinoxinoprotein glucose dehydrogenase. *EMBO J.* 18, 5187–5194.
- Packer, M. S., and Liu, D. R. (2015). Methods for the directed evolution of proteins. *Nat. Publ. Gr.* doi:10.1038/nrg3927.
- Pagliari, M. (2017). *Glycerol : the renewable platform chemical*. Waltham, MA: Elsevier.
- Pang, X., Li, D., and Peng, A. (2002). Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 143–148. doi:10.1007/BF02987462.
- Pappenberger, G., and Hohmann, H.-P. (2013). “Industrial Production of l-Ascorbic Acid (Vitamin C) and d-Isoascorbic Acid,” in *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 143–188. doi:10.1007/10_2013_243.
- Parikka, K., Master, E., and Tenkanen, M. (2015). Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 120, 47–59. doi:10.1016/j.molcatb.2015.06.006.
- Park, S., Morley, K. L., Horsman, G. P., Holmquist, M., Hult, K., and Kazlauskas, R. J. (2005). Focusing Mutations into the *P. fluorescens* Esterase Binding Site Increases Enantioselectivity More Effectively than Distant Mutations. *Chem. Biol.* 12, 45–54. doi:10.1016/j.chembiol.2004.10.012.
- Parmeggiani, C., and Cardona, F. (2012). Transition metal based catalysts in the aerobic oxidation of

- alcohols. *Green Chem.* 14, 547. doi:10.1039/c2gc16344f.
- Pasteur, L. (1858). Mémoire sur la fermentation de l'acide tartrique. *C.R. Seances Acad. Sci* 46, 615–618.
- Peng, L., Yi, L., Zhexue, L., Juncheng, Z., Jiabin, D., Daiwen, P., et al. (2004). Study on biological effect of La^{3+} on *Escherichia coli* by atomic force microscopy. *J. Inorg. Biochem.* 98, 68–72. doi:10.1016/j.jinorgbio.2003.08.012.
- Peters, B., Mientus, M., Kostner, D., Junker, A., Liebl, W., and Ehrenreich, A. (2013). Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6397–6412. doi:10.1007/s00253-013-4824-y.
- Pham, N. N., Chen, C., Li, H., Nguyen, M. T. T., Nguyen, P. K. P., Tsai, S., et al. (2020). Engineering Stable *Pseudomonas putida* S12 by CRISPR for 2,5-Furandicarboxylic Acid (FDCA) Production. *ACS Synth. Biol.* 9, 1138–1149. doi:10.1021/acssynbio.0c00006.
- Pickl, M., Fuchs, M., Glueck, S. M., and Faber, K. (2015). The substrate tolerance of alcohol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6617–6642. doi:10.1007/s00253-015-6699-6.
- Picone, N., and Op den Camp, H. J. M. (2019). Role of rare earth elements in methanol oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 49, 39–44. doi:10.1016/j.cbpa.2018.09.019.
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., dos Santos, V. M., and Wittmann, C. (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2279–2290. doi:10.1007/s00253-012-3928-0.
- Poblete-Castro, I., Wittmann, C., and Nikel, P. I. (2019). Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microb. Biotechnol.*, 1751-7915.13400. doi:10.1111/1751-7915.13400.
- Pol, A., Barends, T. R. M., Dietl, A., Khadem, A. F., Eygensteyn, J., Jetten, M. S. M., et al. (2014). Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environ. Microbiol.* 16, 255–264. doi:10.1111/1462-2920.12249.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., and Chaparro-Riggers, J. F. (2007). Stability of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 220–225. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.685.
- Polizzi, K. M., Chaparro-Riggers, J. F., Vazquez-Figueroa, E., and Bommarius, A. S. (2006). Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase. *Biotechnol. J.* 1, 531–536. doi:10.1002/biot.200600029.
- Prieto, A. (2016). To be, or not to be biodegradable... that is the question for the bio-based plastics. *Microb. Biotechnol.* 9, 652–657. doi:10.1111/1751-7915.12393.
- Punniyamurthy, T., Velusamy, S., and Iqbal, J. (2005). Recent advances in transition metal catalyzed oxidation of organic substrates with molecular oxygen. *Chem. Rev.* 105, 2329–2363. doi:10.1021/cr050523v.
- Qin, Y. Z., Li, Y. M., Zong, M. H., Wu, H., and Li, N. (2015). Enzyme-catalyzed selective oxidation of 5-

- hydroxymethylfurfural (HMF) and separation of HMF and 2,5-diformylfuran using deep eutectic solvents. *Green Chem.* 17, 3718–3722. doi:10.1039/c5gc00788g.
- Quesada, J. M., Fernández, M., Soriano, M. I., Barrientos-Moreno, L., Llamas, M. A., and Espinosa-Urgel, M. (2016). Rhizosphere selection of *Pseudomonas putida* KT2440 variants with increased fitness associated to changes in gene expression. *Environ. Microbiol. Rep.* 00, in press. doi:10.1111/1758-2229.12447.
- Radzicka, A., and Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science (80-.)*. 267, 90–93. doi:10.1126/science.7809611.
- Raghothama, K. G., and Karthikeyan, A. S. (2005). Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274, 37–49. doi:10.1007/s11104-004-2005-6.
- Ramanavicius, A., Kausaite, A., and Ramanaviciene, A. (2005). Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1962–1967. doi:10.1016/j.bios.2004.08.032.
- Ramos, J., Duque, E., Gallegos, M.-T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., et al. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 743–68. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161038.
- Ramos, J. L., Cuenca, M. S., Molina-Santiago, C., Segura, A., Duque, E., Gómez-García, M. R., et al. (2015). Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 555–566. doi:10.1093/femsre/fuv006.
- Ramos, S. J., Dinali, G. S., Oliveira, C., Martins, G. C., Moreira, C. G., Siqueira, J. O., et al. (2016). Rare earth elements in the soil environment. *Curr. Pollut. Reports* 2, 28–50. doi:10.1007/s40726-016-0026-4.
- Rannes, J. B., Ioannou, A., Willies, S. C., Grogan, G., Behrens, C., Flitsch, S. L., et al. (2011). Glycoprotein Labeling Using Engineered Variants of Galactose. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 8436–8439. doi:10.1021/ja2018477.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003). Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Anal. Chem.* 75, 663–670. doi:10.1021/ac026117i.
- Reddy, S. Y., and Bruice, T. C. (2003). In Silico Studies of the Mechanism of Methanol Oxidation by Quinoprotein Methanol Dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8141–8150. doi:10.1021/ja034406y.
- Rees, D. C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 218–227. doi:10.1038/nrm2646.
- Reetz, M. T. (2017). “Recent Advances in Directed Evolution of Stereoselective Enzymes,” in *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*, ed. M. Alcalde (Cham: Springer International Publishing), 69–99. doi:10.1007/978-3-319-50413-1_3.
- Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D., and Vogel, A. (2005). Expanding the range of substrate

- acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44, 4192–4196. doi:10.1002/anie.200500767.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., and Vogel, A. (2006a). Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability. *Angew. Chemie Int. Ed.* 45, 7745–7751. doi:10.1002/anie.200602795.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D., and Lohmer, R. (2008). Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution. *ChemBioChem* 9, 1797–1804. doi:10.1002/cbic.200800298.
- Reetz, M. T., Soni, P., Fernández, L., Gumulya, Y., and Carballeira, J. D. (2010). Increasing the stability of an enzyme toward hostile organic solvents by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis using the B-FIT method. *Chem. Commun.* 46, 8657. doi:10.1039/c0cc02657c.
- Reetz, M. T., Wang, L. W., and Bocola, M. (2006b). Directed evolution of enantioselective enzymes: Iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45, 1236–1241. doi:10.1002/anie.200502746.
- Renata, H., Wang, Z. J., and Arnold, F. H. (2015). Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution. *Angew. Chemie Int. Ed.*, n/a-n/a. doi:10.1002/anie.201409470.
- Reva, O. N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J. D., et al. (2006). Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* 188, 4079–92. doi:10.1128/JB.00101-06.
- Richards, F. J. (1959). A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.* 10, 290–301. doi:10.1093/jxb/10.2.290.
- Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S. D., Bjelic, S., and Baker, D. (2011). *De novo* enzyme design using Rosetta3. *PLoS One* 6, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0019230.
- Riebel, B. R., Gibbs, P. R., Wellborn, W. B., and Bommarius, A. S. (2003). Cofactor Regeneration of both NAD⁺ from NADH and NADP⁺ from NADPH:NADH Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Adv. Synth. Catal.* 345, 707–712. doi:10.1002/adsc.200303039.
- Romano, D., Villa, R., and Molinari, F. (2012). Preparative Biotransformations: Oxidation of Alcohols. *ChemCatChem* 4, 739–749. doi:10.1002/cctc.201200042.
- Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C., and Pohlschröder, M. (2002). Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol.* 45, 943–950. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03090.x.
- Roszczenko-Jasińska, P., Vu, H. N., Subuyuj, G. A., Crisostomo, R. V., Cai, J., Raghuraman, C., et al. (2019). Lanthanide transport, storage, and beyond: genes and processes contributing to XoxF function in *Methylobacterium extorquens* AM1. *bioRxiv*, 647677. doi:10.1101/647677.
- Röthlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A. M., Jiang, L., DeChancie, J., Betker, J., et al. (2008). Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* 453, 190–195.

- doi:10.1038/nature06879.
- Rowland, M. A., and Deeds, E. J. (2014). Crosstalk and the evolution of specificity in two-component signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 5550–5555. doi:10.1073/pnas.1317178111.
- Rupp, M., and Görisch, H. (1988). Purification, crystallisation and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 369, 431–9. doi:10.1515/bchm3.1988.369.1.431.
- Sajid, M., Zhao, X., and Liu, D. (2018). Production of 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) from 5-hydroxymethylfurfural (HMF): recent progress focusing on the chemical-catalytic routes. *Green Chem.* 20, 5427–5453. doi:10.1039/C8GC02680G.
- Sajtos, A. (1991). Process for the preparation of glyoxylic acid and glyoxylic acid derivatives.
- Salah El Din, A. L. M., Kyslík, P., Stephan, D., and Abdallah, M. A. (1997). Bacterial iron transport: Structure elucidation by FAB-MS and by 2D NMR (1H, 13C, 15N) of pyoverdine G4R, a peptidic siderophore produced by a nitrogen-fixing strain of *Pseudomonas putida*. *Tetrahedron* 53, 12539–12552. doi:10.1016/S0040-4020(97)00773-4.
- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., and Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 3, 198–210. doi:10.1002/wcms.1121.
- Sayed, M., Pyo, S.-H., Rehnberg, N., and Hatti-Kaul, R. (2019). Selective Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic Acid Using *Gluconobacter oxydans*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 4406–4413. doi:10.1021/acssuschemeng.8b06327.
- Scherbahn, V., Putze, M. T., Dietzel, B., Heinlein, T., Schneider, J. J., and Lisdat, F. (2014). Biofuel cells based on direct enzyme–electrode contacts using PQQ-dependent glucose dehydrogenase/bilirubin oxidase and modified carbon nanotube materials. *Biosens. Bioelectron.* 61, 631–638. doi:10.1016/j.bios.2014.05.027.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258–268. doi:10.1038/35051736.
- Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J., and Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J.* 9, 2329–2335. doi:10.1038/ismej.2015.42.
- Schmidt, S., Christen, P., Kiefer, P., and Vorholt, J. A. (2010). Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein XoxF in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 156, 2575–2586. doi:10.1099/mic.0.038570-0.
- Schobert, M., and Görisch, H. (1999). Cytochrome c550 is an essential component of the quinoprotein ethanol oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and sequencing of the genes encoding cytochrome c550 and an adjacent acetaldehyde dehydrogenase. *Microbiology* 145 (Pt 2, 471–481. doi:10.1099/13500872-145-2-471.
- Schobert, M., and Görisch, H. (2001). A soluble two-component regulatory system controls expression of quinoprotein ethanol dehydrogenase (QEDH) but not expression of cytochrome c(550) of the

- ethanol-oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147, 363–372. doi:10.1099/00221287-147-2-363.
- Schrodinger LLC (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., and Serrano, L. (2005). The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 33, W382–W388. doi:10.1093/nar/gki387.
- Seebeck, F. P., and Hilvert, D. (2003). Conversion of a PLP-dependent racemase into an aldolase by a single active site mutation. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10158–10159. doi:10.1021/ja036707d.
- Sellés Vidal, L., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., and Heap, J. T. (2018). Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1866, 327–347. doi:10.1016/j.bbapap.2017.11.005.
- Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., Gu, W., and Yoon, S. (2018). Metals and methanotrophy. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02289-17. doi:10.1128/AEM.02289-17.
- Shannon, R. D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. A* 32, 751–767. doi:10.1107/S0567739476001551.
- Sheldon, R. A. (2015). Recent advances in green catalytic oxidations of alcohols in aqueous media. *Catal. Today* 247, 4–13. doi:10.1016/j.cattod.2014.08.024.
- Siegel, J. B., Zanghellini, A., Lovick, H. M., Kiss, G., Lambert, A. R., St.Clair, J. L., et al. (2010). Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science (80-.)*. 329, 309–313. doi:10.1126/science.1190239.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2014). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539–539. doi:10.1038/msb.2011.75.
- Simon, O., Klebensberger, J., Mükschel, B., Klaiber, I., Graf, N., Altenbuchner, J., et al. (2015). Analysis of the molecular response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the next-generation biofuel n-butanol. *J. Proteomics* 122, 11–25. doi:10.1016/j.jprot.2015.03.022.
- Singh, V. S., Dubey, A. P., Gupta, A., Singh, S., Singh, B. N., and Tripathi, A. K. (2017). Regulation of a Glycerol-Induced Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase by σ 54 and a LuxR-Type Regulator in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriol.* 199, e00035-17. doi:10.1128/JB.00035-17.
- Skovran, E., Palmer, A. D., Rountree, A. M., Good, N. M., and Lidstrom, M. E. (2011). XoxF Is Required for Expression of Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 193, 6032–6038. doi:10.1128/JB.05367-11.
- Sode, K., Ootera, T., Shirahane, M., Witarto, A. B., Igarashi, S., and Yoshida, H. (2000). Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by single amino acid replacement. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 491–496. doi:10.1016/S0141-0229(99)00196-9.

- Solnica, B., Naskalski, J. W., and Sieradzki, J. (2003). Analytical performance of glucometers used for routine glucose self-monitoring of diabetic patients. *Clin. Chim. Acta* 331, 29–35. doi:10.1016/S0009-8981(03)00079-2.
- Springer, A. L., Morris, C. J., and Lidstrom, M. E. (1997). Molecular analysis of mxB and mxBM, a putative sensor-regulator pair required for oxidation of methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 143, 1737–1744. doi:10.1099/00221287-143-5-1737.
- Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J., et al. (2001). Silencing of Oxidative Stress Response in *Mycobacterium tuberculosis*: Expression Patterns of ahpC in Virulent and Avirulent Strains and Effect of ahpC Inactivation. *Infect. Immun.* 69, 5967–5973. doi:10.1128/IAI.69.10.5967-5973.2001.
- Stampfer, W., Kosjek, B., Moitzi, C., Kroutil, W., and Faber, K. (2002). Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 1014–7. doi:10.1002/1521-3773(20020315)41:6<1014::aid-anie1014>3.0.co;2-6.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183.
- Studer, S., Hansen, D. A., Pianowski, Z. L., Mittl, P. R. E., Debon, A., Guffy, S. L., et al. (2018). Evolution of a highly active and enantiospecific metalloenzyme from short peptides. *Science (80-.)*. 362, 1285–1288. doi:10.1126/science.aau3744.
- Sun, Z., Liu, Q., Qu, G., Feng, Y., and Reetz, M. T. (2019). Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. *Chem. Rev.* 119, 1626–1665. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00290.
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., and Merino, E. (2018). Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics*, 1–3. doi:10.1093/bioinformatics/bty496.
- Takeda, K., Matsumura, H., Ishida, T., Samejima, M., Igarashi, K., Nakamura, N., et al. (2013). The two-step electrochemical oxidation of alcohols using a novel recombinant PQQ alcohol dehydrogenase as a catalyst for a bioanode. *Bioelectrochemistry* 94, 75–8. doi:10.1016/j.bioelechem.2013.08.001.
- Tang, L., Wang, X., Ru, B., Sun, H., Huang, J., and Gao, H. (2014). MDC-Analyzer: A novel degenerate primer design tool for the construction of intelligent mutagenesis libraries with contiguous sites. *Biotechniques* 56, 301–310. doi:10.2144/000114177.
- Tang, Z., Louie, R. F., Lee, J. H., Lee, D. M., Miller, E. E., and Kost, G. J. (2001). Oxygen effects on glucose meter measurements with glucose dehydrogenase- and oxidase-based test strips for point-of-care testing. *Crit. Care Med.* 29, 1062–1070. doi:10.1097/00003246-200105000-00038.
- Tessier, F. J., Monnier, V. M., Sayre, L. M., and Kornfield, J. A. (2003). Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues.

- Biochem. J.* 369, 705–719. doi:10.1042/bj20020668.
- Toftgaard Pedersen, A., Birmingham, W. R., Rehn, G., Charnock, S. J., Turner, N. J., and Woodley, J. M. (2015). Process Requirements of Galactose Oxidase Catalyzed Oxidation of Alcohols. *Org. Process Res. Dev.* 19, 1580–1589. doi:10.1021/acs.oprd.5b00278.
- Tojo, G., and Fernandez, M. I. (2006). *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones*. New York: Springer-Verlag doi:10.1007/b135954.
- Tokuriki, N., and Tawfik, D. S. (2009). Stability effects of mutations and protein evolvability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 596–604. doi:https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.08.003.
- Tottey, S., Waldron, K. J., Firbank, S. J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., et al. (2008). Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* 455, 1138–1142. doi:10.1038/nature07340.
- Toyama, H., Chen, Z.-W., Fukumoto, M., Adachi, O., Matsushita, K., and Mathews, F. S. (2005). Molecular Cloning and Structural Analysis of Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *J. Mol. Biol.* 352, 91–104. doi:10.1016/j.jmb.2005.06.078.
- Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M., and Adachi, O. (1995). Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.* 177, 2442–2450. doi:10.1128/jb.177.9.2442-2450.1995.
- Toyama, H., Mathews, F. S., Adachi, O., and Matsushita, K. (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 10–21. doi:10.1016/j.abb.2004.03.037.
- Treu, B. L., and Minteer, S. D. (2008). Isolation and purification of PQQ-dependent lactate dehydrogenase from *Gluconobacter* and use for direct electron transfer at carbon and gold electrodes. *Bioelectrochemistry* 74, 73–7. doi:10.1016/j.bioelechem.2008.07.005.
- Trinh, C. T., Liu, Y., and Conner, D. J. (2015). Rational design of efficient modular cells. *Metab. Eng.* 32, 220–231. doi:10.1016/j.ymben.2015.10.005.
- Tripathi, V. N., and Srivastava, S. (2006). Ni²⁺-uptake in *Pseudomonas putida* strain S4: a possible role of Mg²⁺-uptake pump. *J. Biosci.* 31, 61–7. doi:10.1007/BF02705236.
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461. doi:10.1002/jcc.21334.
- Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J. S., and Woodley, J. M. (2010). Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* 88, 3–11. doi:10.1016/j.fbp.2010.01.003.
- Turner, N. J. (2011). Enantioselective Oxidation of C–O and C–N Bonds Using Oxidases. *Chem. Rev.* 111, 4073–4087. doi:10.1021/cr200111v.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., et al. (2016). The Perseus

- computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., and Garbeva, P. (2016). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends Microbiol.* 26, 3167–3170. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002.
- Vajdič, T., Ošljaj, M., Kopitar, G., and Mrak, P. (2014). Engineered, highly productive biosynthesis of artificial, lactonized statin side-chain building blocks: The hidden potential of *Escherichia coli* unleashed. *Metab. Eng.* 24, 160–72. doi:10.1016/j.ymben.2014.05.012.
- Vallon, T., Simon, O., Rendgen-Heugle, B., Frana, S., Mückschel, B., Broicher, A., et al. (2015). Applying systems biology tools to study n-butanol degradation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Eng. Life Sci.* 15, 760–771. doi:10.1002/elsc.201400051.
- Van Kessel, J. C., Rutherford, S. T., Shao, Y., Utria, A. F., and Bassler, B. L. (2013). Individual and combined roles of the master regulators *aphA* and *luxR* in control of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing regulon. *J. Bacteriol.* 195, 436–443. doi:10.1128/JB.01998-12.
- Vangnai, A. S., Toyama, H., De-Eknamkul, W., Yoshihara, N., Adachi, O., and Matsushita, K. (2004). Quinate oxidation in *Gluconobacter oxydans* IFO3244: purification and characterization of quinoprotein quinate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 157–62. doi:10.1016/j.femsle.2004.10.014.
- Vekeman, B., Kerckhof, F.-M., Cremers, G., de Vos, P., Vandamme, P., Boon, N., et al. (2016). New *Methyloceanibacter* diversity from North Sea sediments includes methanotroph containing solely the soluble methane monooxygenase. *Environ. Microbiol.* 18, 4523–4536. doi:10.1111/1462-2920.13485.
- Vemuluri, V. R., Shaw, S., Autenrieth, C., and Ghosh, R. (2017). A rapid procedure for the in situ assay of periplasmic, PQQ-dependent methanol dehydrogenase in intact single bacterial colonies. *J. Microbiol. Methods* 137, 46–49. doi:10.1016/j.mimet.2017.03.013.
- Vihinen, M. (1987). Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Eng. Des. Sel.* 1, 477–480. doi:10.1093/protein/1.6.477.
- Vizcaíno, J. A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., et al. (2016). 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D447–D456. doi:10.1093/nar/gkv1145.
- Vrionis, A., Daugulis, A., Kropinski, H. (2002). Identification and characterization of the AgmR regulator of *Pseudomonas putida*: role in alcohol utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 469–475. doi:10.1007/s00253-001-0912-5.
- Vu, H. N., Subuyuj, G. A., Vijayakumar, S., Good, N. M., Martinez-Gomez, N. C., and Skovran, E. (2016). Lanthanide-Dependent Regulation of Methanol Oxidation Systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and Their Contribution to Methanol Growth. *J. Bacteriol.* 198, 1250–1259.

- doi:10.1128/JB.00937-15.
- Wachtmeister, J., and Rother, D. (2016). Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* 42, 169–177. doi:10.1016/j.copbio.2016.05.005.
- Wackett, L. P. (2003). *Pseudomonas putida*—a versatile biocatalyst. *Nat. Biotechnol.* 21, 136–138. doi:10.1038/nbt0203-136.
- Wagner, A. (2005). Distributed robustness versus redundancy as causes of mutational robustness. *BioEssays* 27, 176–188. doi:10.1002/bies.20170.
- Wahid, P. A., Valiathan, M. S., Kamalam, N. V., Eapen, J. T., Vijayalakshmi, S., Prabhu, R. K., et al. (2000). Effect of rare earth elements on growth and nutrition of coconut palm and root competition for these elements between the palm and *calotropis gigantea*. *J. Plant Nutr.* 23, 329–338. doi:10.1080/01904160009382019.
- Walsh, M., Casey, W., Kenny, S. T., Narancic, T., Blank, L. M., Wierckx, N., et al. (2019). Insights into an alternative pathway for glycerol metabolism in a glycerol kinase deficient *Pseudomonas putida* KT2440. *bioRxiv*, 567230. doi:10.1101/567230.
- Wandel, U., Machado, S. S., Jongejan, J. A., and Duine, J. A. (2001). Enzymes involved in the glycidaldehyde (2,3-epoxy-propanal) oxidation step in the kinetic resolution of racemic glycidol (2,3-epoxy-1-propanol) by *Acetobacter pasteurianus*. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 233–239. doi:10.1016/S0141-0229(00)00321-5.
- Watanabe, K., and Suzuki, Y. (1998). Protein thermostabilization by proline substitutions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 4, 167–180. doi:10.1016/S1381-1177(97)00031-3.
- Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2006). The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev.* 20, 2754–2767. doi:10.1101/gad.1466506.
- Webb, M. (1970). The mechanism of acquired resistance to Co²⁺ and Ni²⁺ in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 222, 440–446. doi:10.1016/0304-4165(70)90134-0.
- Werpy, T., and Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I - Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Golden, CO (United States) doi:10.2172/15008859.
- Wessel, D., and Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141–143. doi:10.1016/0003-2697(84)90782-6.
- Whittaker, J. W. (2005). The radical chemistry of galactose oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 227–239. doi:10.1016/j.abb.2004.08.034.
- Wierckx, N., Elink Schuurman, T. D., Blank, L. M., and Ruijssenaars, H. J. (2015). “Whole-Cell Biocatalytic

- Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid," in *Molecular Microbiology* Microbiology Monographs., ed. B. Kamm (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 207–223. doi:10.1007/978-3-662-45209-7_8.
- Wierckx, N., Elink Schuurman, T. D., Kuijper, S., and Ruijsenaars, H. J. (2012). Genetically modified cell and process for use of said cell.
- Wijma, H. J., Floor, R. J., Jekel, P. A., Baker, D., Marrink, S. J., and Janssen, D. B. (2014). Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization. *Protein Eng. Des. Sel.* 27, 49–58. doi:10.1093/protein/gzt061.
- Williams, P. A., Coates, L., Mohammed, F., Gill, R., Erskine, P. T., Coker, A., et al. (2005). The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 61, 75–79. doi:10.1107/S09074444904026964.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., and Brinkman, F. S. L. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* 44, D646–D653. doi:10.1093/nar/gkv1227.
- Woodley, J. (2013). Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 310–316. doi:10.1016/j.cbpa.2013.03.017.
- Worsley, S. F., Macey, M. C., Newitt, J. T., Patrick, E., Yu, D. W., Wilkinson, B., et al. (2019). Investigating the role of exudates in recruiting *Streptomyces* bacteria to the *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *bioRxiv*, 532309. doi:10.1101/532309.
- Wu, H., Tian, C., Song, X., Liu, C., Yang, D., and Jiang, Z. (2013). Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chem.* 15, 1773. doi:10.1039/c3gc37129h.
- Wu, M. L., Wessels, J. C. T., Pol, A., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M., and van Niftrik, L. (2015). XoxF-type methanol dehydrogenase from the anaerobic methanotroph *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1442–51. doi:10.1128/AEM.03292-14.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., and van der Lelie, D. (2011). Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 299–323. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00249.x.
- Xia, Z.-X., Dai, W.-W., He, Y.-N., White, S. A., Mathews, F. S., and Davidson, V. L. (2003). X-ray structure of methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* and molecular modeling of its interactions with cytochrome c-551i. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 843–854. doi:10.1007/s00775-003-0485-0.
- Xie, Y., An, J., Yang, G., Wu, G., Zhang, Y., Cui, L., et al. (2014). Enhanced Enzyme Kinetic Stability by Increasing Rigidity within the Active Site. *J. Biol. Chem.* 289, 7994–8006. doi:10.1074/jbc.M113.536045.
- Xie, Z. B., Zhu, J. G., Chu, H. Y., Zhang, Y. L., Zeng, Q., Ma, H. L., et al. (2002). Effect of lanthanum on rice production, nutrient uptake, and distribution. *J. Plant Nutr.* 25, 2315–2331. doi:10.1081/PLN-

- 120014078.
- Xu, H. H., Janka, J. J., Viebahn, M., and Hanson, R. S. (1995). Nucleotide sequence of the *mxoQ* and *mxoE* genes, required for methanol dehydrogenase synthesis in *Methylobacterium organophilum* XX: a two-component regulatory system. *Microbiology* 141, 2543–2551. doi:10.1099/13500872-141-10-2543.
- Yakushi, T., and Matsushita, K. (2010). Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1257–1265. doi:10.1007/s00253-010-2529-z.
- Yang, F., Hanna, M. a, and Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels* 5, 13. doi:10.1186/1754-6834-5-13.
- Yu, Z., Beck, D. A. C., and Chistoserdova, L. (2017). Natural Selection in Synthetic Communities Highlights the Roles of *Methylococcaceae* and *Methylophilaceae* and Suggests Differential Roles for Alternative Methanol Dehydrogenases in Methane Consumption. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.02392.
- Yu, Z., and Chistoserdova, L. (2017). Communal Metabolism of Methane and the Rare Earth Element Switch. *J. Bacteriol.* 199, e00328-17. doi:10.1128/JB.00328-17.
- Yuan, H., Liu, H., Du, J., Liu, K., Wang, T., and Liu, L. (2020). Biocatalytic production of 2,5-furandicarboxylic acid: recent advances and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 527–543. doi:10.1007/s00253-019-10272-9.
- Yue, H., Zhao, Y., Ma, X., and Gong, J. (2012). Ethylene glycol: Properties, synthesis, and applications. *Chem. Soc. Rev.* 41, 4218–4244. doi:10.1039/c2cs15359a.
- Zaldivar, J., Martinez, A., and Ingram, L. O. (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanogenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 24–33. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2.
- Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D. R., Bork, P., and Patil, K. R. (2015). Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6449–6454. doi:10.1073/pnas.1421834112.
- Zeymer, C., and Hilvert, D. (2018). Directed Evolution of Protein Catalysts. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 131–157. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012034.
- Zhang, H., Mcdowell, R. G., Martin, L. R., and Qiang, Y. (2016a). Selective Extraction of Heavy and Light Lanthanides from Aqueous Solution by Advanced Magnetic Nanosorbents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 9523–9531. doi:10.1021/acsami.6b01550.
- Zhang, X.-F., Yang, G.-Y., Zhang, Y., Xie, Y., Withers, S. G., and Feng, Y. (2016b). A general and efficient strategy for generating the stable enzymes. *Sci. Rep.* 6, 33797. doi:10.1038/srep33797.
- Zhang, X., Reddy, S. Y., and Bruce, T. C. (2007). Mechanism of methanol oxidation by quinoprotein methanol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 745–749.

doi:10.1073/pnas.0610126104.

Zhang, X. Y., Zong, M. H., and Li, N. (2017). Whole-cell biocatalytic selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid. *Green Chem.* 19, 4544–4551. doi:10.1039/c7gc01751k.

Zheng, Y. G., Yin, H. H., Yu, D. F., Chen, X., Tang, X. L., Zhang, X. J., et al. (2017). Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 987–1001. doi:10.1007/s00253-016-8083-6.

Zheng, Y. J., Xia, Z.-X., Chen Zw, Mathews, F. S., and Bruice, T. C. (2001). Catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase: A theoretical and x-ray crystallographic investigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 432–434. doi:10.1073/pnas.98.2.432.

Zhou, Z., and Roelfes, G. (2020). Synergistic catalysis in an artificial enzyme by simultaneous action of two abiological catalytic sites. *Nat. Catal.* 3, 289–294. doi:10.1038/s41929-019-0420-6.

Zhuang, W.-Q., Fitts, J. P., Ajo-Franklin, C. M., Maes, S., Alvarez-Cohen, L., and Hennebel, T. (2015). Recovery of critical metals using biometallurgy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 327–335. doi:10.1016/j.copbio.2015.03.019.

Zobel, S., Benedetti, I., Eisenbach, L., de Lorenzo, V., Wierckx, N., and Blank, L. M. (2015). Tn7-Based Device for Calibrated Heterologous Gene Expression in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth. Biol.* 4, 1341–1351. doi:10.1021/acssynbio.5b00058.