

# Änderung der Substratspezifität von Transaldolasen

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

vorgelegt von  
**Sarah Schneider**  
aus Horb

Hauptberichter: Prof. Dr. G. A. Sprenger  
Mitberichter: PD Dr. Vlada Urlacher  
Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2009

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 2010

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst, nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass alle Stellen, welche wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entlehnt wurden, durch Angabe der Quellen gekennzeichnet sind.

Stuttgart, den 22. Juni 2009

Sarah Schneider

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Sprenger und Dr. A. K. Samland am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

## Abstract

Transaldolase (EC 2.2.1.2) belongs to the enzyme family of transferases and catalyses the formation of a new C-C bond by reversible transfer of a dihydroxyacetone moiety from a donor to an acceptor compound. Concomitantly, a new C-C bond is formed stereospecifically with 3*S*, 4*R* configuration. Transaldolases are wide spread and occur in Bacteria, Archaea and Eukarya. Transaldolases are enzymes of the pentose phosphate pathway which utilizes D-sedoheptulose 7-phosphate as donor and transfer a dihydroxyacetone moiety towards D-glyceraldehyde 3-phosphate and two novel products, D-fructose 6-phosphate and D-erythrose 4-phosphate are formed.

In biocatalysis enzymes which form a novel C-C bond like for example the aldolases form up to two new stereo centres and are therefore preferable adverse to chemical synthesis. Usually aldolases are strictly donor specific. These enzymes are highly chemo-, stereo-, regio-selective and are active under mild reaction conditions. Aldolases which utilize dihydroxyacetonephosphate (DHAP) as donor compound are used for the synthesis of for example, <sup>13</sup>C-labeled sugars, deoxysugars, fluoro sugars, antibiotics, flavour-compounds, azasugars and iminocyclitols. But DHAP possesses some disadvantages, it is unstable, difficult to synthesize and rather expensive. An enzyme which utilizes dihydroxyacetone (DHA) instead of DHAP would be of great interest.

Fructose 6-phosphate aldolase (FSA) of *E. coli* is utilizing DHA amongst other donor compounds. Advantages of FSA are its broad substrate scope and its fast enrichment by heat treatment. Disadvantages of FSA are that some muteins are denatured by heat treatment and that the expression level varies depending on the host strain. Another enzyme of *E. coli* is Transaldolase B (TalB). TalB forms novel C-C bonds, possesses a rather broad product scope and a high stereo specificity, but is so far not used in biocatalysis. A disadvantage of TalB is the formation of two products (D-sedoheptulose 7-phosphate, D-erythrose 4-phosphate) with an equimolar yield.

In the present work, the characterised TalB of *E. coli* should be changed by mutagenesis towards novel or improved substrate specificities.

In a first step, a His<sub>6</sub>-TalB variant with an improved activity for the formation of D-fructose 6-phosphate (D-F6P) from dihydroxyacetone (DHA) as donor compound and D-glyceraldehyde 3-phosphate (D-GAP) as acceptor compound was engineered by saturation mutagenesis. Thereby the novel His<sub>6</sub>-TalB muteins would utilise DHA as a donor compound whereas TalB transfers a DHA moiety from a donor compound to an acceptor compound. A TalB mutein would be of interest as a starting point for biocatalysis. To this end, TalB was compared with Fructose 6-phosphate aldolase (FSA). Eleven amino acid positions were chosen for the generation of saturation mutagenesis libraries. These positions are localised in the active site of TalB and differ in both enzymes. Each library was screened for the formation of D-F6P

from DHA and D-GAP (offered as D,L-GAP) with a novel colour assay in microtiter scale. In only one of these libraries (TalBF178X), the amino acid exchange from Phe to Tyr (TalBF178Y) led to the desired increase in activity for the formation of D-F6P from DHA and D-GAP [Schneider et al. 2008, JBC 283, p. 30064-30072].

His<sub>6</sub>-TalBF178Y was purified via Ni-NTA affinity chromatography (purity > 97%) and was characterized. As reference enzymes His<sub>6</sub>-TalB and FSA were purified. His<sub>6</sub>-TalBF178Y possesses a transaldolase activity with a  $V_{\max}$  value of 14 U/mg (~16% of the TalB wild type activity) in the transfer reaction. On the other hand His<sub>6</sub>-TalBF178Y exhibits a 70fold increase in activity for the formation of D-F6P from DHA and D-GAP, compared to the wild type (His<sub>6</sub>-TalBF178Y:  $7 \pm 1$  U/mg, adverse to the specific activity of His<sub>6</sub>-TalB:  $\leq 0,1$  U/mg) [Schneider et al. 2008, JBC 283, p. 30064-30072]. His<sub>6</sub>-TalBF178Y possesses a catalytic efficiency similar to FSA ( $k_{\text{cat}}/K_m$  of FSA:  $130 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , His<sub>6</sub>-TalBY:  $150 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). The affinity of His<sub>6</sub>-TalBF178Y for DHA is twice as high as the affinity of FSA ( $K_m$ -value for DHA of FSA:  $62 \pm 7$  mM, His<sub>6</sub>-TalBF178Y:  $30 \pm 4$  mM). Furthermore, it was shown that the exchange of the conserved amino acid residue in the human transaldolase (TALDO1, hTal) led to the same change in activity ( $V_{\max}$  value for DHA of hTalF189Y: 14 U/mg; hTal: < 0,1 U/mg). The hTal variants, hTal and hTalF189Y were purified as GST-fusion proteins and the Tag was cleaved off by digestion using Tev-Protease. Like the bacterial transaldolase, hTal and hTalY showed a dimeric structure ( $77 \pm 10$  kDa determined via size exclusion chromatography). The hTalF189Y possesses a transaldolase activity with a  $V_{\max}$  for D-F6P of  $12 \pm 2$  U/mg (hTal: 29 U/mg). His<sub>6</sub>-TalBF178Y and hTalF189Y catalyse also the cleavage of D-F6P into DHA and D-GAP ( $V_{\max}$  for D-F6P: His<sub>6</sub>-TalBF178Y:  $0,36 \pm 0,05$  U/mg; hTalBF189Y:  $0,32 \pm 0,04$  U/mg). The polyclonal antibody formed against TalB was able to detect the bacterial and the human variants.

In a second step, the affinity of His<sub>6</sub>-TalBF178Y towards D-glyceraldehyde (D-GA) as acceptor was improved. Based on the solved X-ray structure of His<sub>6</sub>-TalBF178Y (T. Sandalova und Prof. Schneider, Stockholm, Schweden), three amino acid residues (Arg181, Ser226, Arg228) in the putative phosphate binding site of His<sub>6</sub>-TalBF178Y were chosen for saturation mutagenesis. The obtained libraries were screened for the formation of D-fructose at low concentrations of the acceptor D-GA (offered as D,L-GA) using a modified colour assay in microtiter scale. The variant exhibiting an exchange from a positively charged amino acid to a negatively charged amino acid at position 181 (His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E) displayed the highest affinity for D,L-GA with  $K_m$  values of ~ 25 mM for D,L-GA and D-GA compared with His<sub>6</sub>-TalBF178Y (D,L-GA: > 120 mM; D-GA; 73 mM). His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E has no measurable activity with D-GAP as acceptor and DHA as donor but a residual transaldolase activity of 1 U/mg (~ 1% of the wild type activity). In cooperation with T. Sandalova und Prof. Schneider (Stockholm, Schweden) the crystal structure of His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E could be

solved. In the crystal structure of His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E a sulphate ion from the buffer is bound in the active site by Glu181 and Arg228 but at lower occupancy as in His<sub>6</sub>-TalBF178Y. Presumably the glutamate residue is uncharged or binds at the hydrogensulphate ion.

Binding properties of an enzyme can be elucidated by its inhibitors. Therefore D-tagatose 6-phosphate (D-T6P) was tested as an inhibitor for His<sub>6</sub>-TalBF178Y and His<sub>6</sub>-TalB. D-T6P is a stereoisomer of D-F6P with a 3S, 4S-configuration. His<sub>6</sub>-TalBF178Y and His<sub>6</sub>-TalB was incubated with different concentrations of D-T6P. His<sub>6</sub>-TalBF178Y was inhibited by D-T6P whereas the activity of the wild type enzyme was not measurably affected. For FSA D-GA was tested as an inhibitor. It could be shown that FSA was reversibly inhibited in a non-competitive manner by D-GA.

In another approach, we envisaged to create a novel variant of His<sub>6</sub>-TalB which is able to form a stereoisomer of D-fructose 6-phosphat (3R, 4S) with a 3S, 4S-configuration (D-tagatose 6-phosphate, D-T6P). Based upon the X-ray structure of TalB and a model of His<sub>6</sub>-TalB and D-F6P bound to the active site of two amino acid residues (Phe178, Ser226) in His<sub>6</sub>-TalB were chosen for saturation mutagenesis. Three libraries were generated: two saturation libraries at the positions Phe178 and Ser226 and one library for which the His<sub>6</sub>-TalBF178Y variant was used as template and position S226 was saturated. These three libraries were screened for the synthesis of D-T6P from DHA and D,L-GAP using a novel photometric assay in microtiter scale. Under the used screening conditions in none of the libraries an active clone was found. By error-prone polymerase chain reaction (epPCR) two libraries of the genes *talB* and *talBF178Y* were created with a low mutation rate. The epPCR libraries were generated to screen the encoded enzyme variants for the synthesis of D-T6P from DHA and D,L-GAP. As a consequence of the high number of false positive clones in the T6P screening using the saturation libraries the epPCR libraries were not screened with this screening system. They are available for screening with novel selection and screening methods.

In two rounds of saturation mutagenesis *talB* was mutated firstly towards the formation of D-F6P, the gained mutein TalBF178Y exhibits a catalytic efficiency like FSA, and secondly towards a lower K<sub>m</sub>-value for D-GA than TalBF178Y. TalBF178YR181E possess a threefold lower K<sub>m</sub>-value than TalBF178Y. Further it was shown that the amino acid positions Phe178 and Ser226 are not or not only responsible for the formation of products with novel stereo configurations.

## Zusammenfassung

Transaldolasen (EC 2.2.1.2) gehören zur Enzymklasse der Transferasen und katalysieren den reversiblen Transfer einer Dihydroxyacetoneinheit von einem Donor auf einen Akzeptor. Dabei entsteht eine neue C-C-Bindung mit einer 3*S*, 4*R*-Konfiguration. Transaldolasen sind weit verbreitete Enzyme des Pentosephosphat-Weges und kommen in *Bacteria*, *Eukarya* und *Archaea* vor. Transaldolasen verwenden u.a. D-Sedoheptulose-7-Phosphat als Donor und übertragen eine Dihydroxyacetoneinheit auf D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, dabei entstehen zwei neue Produkte D-Fruktose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat.

In der Biokatalyse sind C-C-Bindungen knüpfende Enzyme wie z. B. die Aldolasen, die Produkte mit bis zu zwei neuen Stereozentren bilden, gegenüber chemischen Synthesewegen von Vorteil. Im Gegensatz zu chemischen Synthesewegen sind Enzyme meist hoch chemo-, stereo-, regioselektiv und arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen. Aldolasen sind meist streng donorspezifisch. Aldolasen, die DHAP (Dihydroxyacetonphosphat) als Donor verwenden, werden zur Synthese von z. B. <sup>13</sup>C-markierten Zuckern, Desoxyzuckern, Fluorozuckern, Antibiotika, Geruch-/Geschmacksstoffen, Azazuckern und Iminocyclitolen eingesetzt. DHAP ist von Nachteil, weil es instabil, schwierig zu synthetisieren und teuer ist. Ein Enzym, das DHA (Dihydroxyaceton) als Donor verwendet, wäre von Vorteil. Die Fructose-6-Phosphat Aldolase (FSA) von *E. coli* verwendet u.a. DHA als Donor. Vorteile von FSA sind, dass es ein breites Substratspektrum besitzt und schnell über Hitzefällung anzureichern ist. Nachteile von FSA sind, dass Muteine bei einer Hitzefällung häufig denaturieren und die Expressionshöhe je nach Stamm starken Schwankungen unterliegt. Ein weiteres Enzym von *E. coli* ist die Transaldolase B (TalB) TalB bildet neue C-C-Bindungen, besitzt ein relativ breites Substratspektrum und eine hohe Stereospezifität, wird aber bislang in der Biokatalyse nicht eingesetzt. Bei TalB ist von Nachteil, dass das Enzym aus zwei Substraten nicht ein Produkt im Überschuss liefert, sondern zwei Produkte äquimolar.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Transaldolase B (TalB) von *E. coli* durch Mutagenese, so verändert werden, dass Muteine mit veränderter Substratspezifität entstehen.

Der erste Schritt war das rekombinante His<sub>6</sub>-TalB so zu verändern, dass eine neue Enzymvariante mit DHA als Donor und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (D-GAP) als Akzeptor D-Fruktose-6-Phosphat (D-F6P) mit einer höheren spezifischen Aktivität bildet als der Wildtyp. Damit würde die neue TalB-Variante DHA als Substrat verwenden und wäre damit als Ausgangspunkt für biokatalytische Synthesen von Interesse.

TalB wurde der FSA in einem strukturbasierten Sequenzvergleich gegenübergestellt. An insgesamt elf Aminosäurepositionen des aktiven Zentrums von TalB, in denen sich die beiden Enzyme unterscheiden, wurden diese Aminosäurereste durch Sättigungsmutagenese in die 19 anderen Aminosäuren ausgetauscht. Für jede der elf Positionen wurde eine Bank

mit bis zu 19 verschiedenen Proteinvarianten gebildet, die auf eine Synthese von D-F6P aus DHA und D-GAP (als D,L-GAP angeboten), mit einem neu entwickelten Farbnachweis im Mikrotitermaßstab, untersucht wurden. Nur der Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr an der Position 178 (TalBF178Y) führte zur gewünschten verbesserten Aktivität [Schneider et al. 2008, JBC 283, S. 30064-30072].

His<sub>6</sub>-TalBF178Y wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Reinheit: > 97%) und charakterisiert. Als Vergleich wurden die *E. coli* Enzyme His<sub>6</sub>-TalB und FSA verwendet. Für His<sub>6</sub>-TalBF178Y wurde eine verbleibende Transaldolaseaktivität mit einem V<sub>max</sub>-Wert für D-F6P von 14 ± 1 U/mg (~ 16% der TalB-Wildtypaktivität) in der Transferreaktion gemessen. Dagegen wurde eine 70fach verbesserte Aktivität in der D-F6P-Bildungsreaktion (7 ± 1 U/mg, gegenüber His<sub>6</sub>-TalB: ≤ 0,1 U/mg), mit DHA als Donor und D-GAP als Akzeptor, bestimmt. Darüber hinaus besitzt His<sub>6</sub>-TalBF178Y eine ähnliche katalytische Effizienz wie FSA (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> von FSA: 130 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, His<sub>6</sub>-TalBY: 150 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Die Affinität für DHA von His<sub>6</sub>-TalBF178Y ist doppelt so hoch wie die von FSA (K<sub>m</sub>-Wert für DHA von FSA: 62 ± 7 mM, His<sub>6</sub>-TalBF178Y: 30 ± 4 mM).

In der strukturell sehr ähnlichen humanen Transaldolase (TALDO1, hTal) führte der Austausch der konservierten Aminosäure Phe189, von Phe nach Tyr (hTalF189Y), ebenfalls zum Erwerb einer FSA-Aktivität. Bei der Kondensationsreaktion von DHA und D-GAP zu D-F6P wurde ein V<sub>max</sub>-Wert für DHA von 14 U/mg (hTal: < 0,1 U/mg) bestimmt. Die hTal-Varianten, hTal und hTalF189Y, wurden als GST-Fusionsproteine gereinigt, die GST-Tags wurden mittels Tev-Proteaseverdau entfernt. Wie die bakterielle Transaldolase lag sowohl die wildtypische hTal (berechnete molekulare Größe von hTal: 37,5 kDa) wie auch hTalF189Y als Dimer (77 ± 10 kDa durch Größenausschlusschromatographie bestimmt) vor. hTalF189Y besitzt eine Transaldolase-Aktivität mit einem V<sub>max</sub>-Wert für D-F6P von 12 ± 2 U/mg (hTal: 29 U/mg). Sowohl His<sub>6</sub>-TalBF178Y als auch hTalF189Y katalysieren neben der Kondensation von DHA und D-GAP zu D-F6P auch die Spaltungsreaktion von D-F6P in DHA und D-GAP (V<sub>max</sub>-Wert für D-F6P: His<sub>6</sub>-TalBF178Y: 0,36 ± 0,05 U/mg; hTalBF189Y: 0,32 ± 0,04 U/mg). Polyklonale Antikörper gegen TalB erkennen auch TalBF178Y, GST-hTal und GST-hTalF189Y.

Der zweite Schritt bestand darin His<sub>6</sub>-TalBF178Y so zu verändern, dass eine neue Enzymvariante den Akzeptor D-Glycerinaldehyd (D-GA, als D,L-GA angeboten) mit einer höheren Affinität verwendet als His<sub>6</sub>-TalBF178Y (K<sub>m</sub>-Wert: > 120 mM). Die Kristallstruktur von His<sub>6</sub>-TalBF178Y wurde in Kooperation mit T. Sandalova und Prof. Schneider (Stockholm, Schweden) gelöst [Schneider et al. 2008, JBC 283, S. 30064-30072]. Im Kristall von His<sub>6</sub>-TalBF178Y wird ein Sulfation des Puffers von den Aminosäuren Arg181, Ser226 und Arg228 gebunden. Das Sulfation ist ähnlich zu der Phosphatgruppe der Substrate, die wahrscheinlich von den drei Aminosäurereste (Arg181, Ser226, Arg228) gebunden wird.



Durch Sättigungsmutagenese wurden drei verschiedene Sättigungsmutagenesebanken (TalBF178YR181X, TalBF178YS226X, TalBF178YR228X) gebildet. Diese Banken wurden mit DHA und D,L-GA als Substrate auf die Synthese von D-Fruktose (D-Fru) in einem neu entwickelten Farbnachweis im Mikrotitermaßstab untersucht. In einer dieser Banken (TalBF178YR181X) wurden Enzymvarianten gefunden, die mit 10 mM D,L-GA und DHA eine höhere Aktivität zeigen als TalBF178Y. Die beste Variante, His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E, besitzt für D,L-GA und D-GA eine deutlich höhere Affinität mit K<sub>m</sub>-Werten von 24 mM bzw. 25 mM als His<sub>6</sub>-TalBF178Y (D,L-GA: > 120 mM; D-GA; 73 mM). Mit D-GAP als Akzeptor und DHA als Donor besitzt His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E keine messbare Aktivität. His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E zeigt eine verbleibende Transaldolaseaktivität von 1 U/mg (~ 1% der TalB-Wildtypaktivität). Die Kristallstruktur von His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E wurde aufgeklärt (T. Sandalova und Prof. Schneider, Stockholm, Schweden). In der Kristallstruktur von His<sub>6</sub>-TalBF178YR181E befindet sich im aktiven Zentrum eine Sulfation des Puffers und wird vermutlich von Glu181 und Arg288 mit schwächerer Bindung als in His<sub>6</sub>-TalBF178Y gebunden. Vermutlich ist Glu181 nicht geladen oder es bindet die Hydrogensulfation.

Die Bindungseigenschaften eines Enzyms können durch Inhibitoren näher charakterisiert werden. Als Inhibitor für His<sub>6</sub>-TalBF178Y und His<sub>6</sub>-TalB wurde D-Tagatose-6-Phosphat (D-T6P) getestet. D-T6P ist ein Stereoisomer von D-F6P mit 3S, 4S-Konfiguration. Durch Inkubation von His<sub>6</sub>-TalBF178Y und His<sub>6</sub>-TalB mit verschiedenen Konzentrationen D-T6P, wurde His<sub>6</sub>-TalBF178Y, nicht aber His<sub>6</sub>-TalB, irreversibel inhibiert.

Als Inhibitor für FSA wurde D-GA getestet. Es wurde gezeigt, dass FSA durch D-GA reversibel, nicht-kompetitiv inhibiert wird. Die Inhibitorkonstanten von FSA für D-GA wurden der K<sub>ic</sub> von 1,63 mM und der K<sub>iu</sub> von 35 µM bestimmt.

Ein weiterer Schritt sollte dazu führen, dass eine neue His<sub>6</sub>-TalB-Variante mit veränderter Stereospezifität entsteht, die aus DHA und D,L-GAP nicht D-F6P (3S, 4R) bildet, sondern dessen Stereoisomer D-Tagatose-6-Phosphat (3S, 4S; D-T6P). Aufgrund der Struktur von TalB und einem Modell mit D-F6P wurden zwei Aminosäurereste, Phe178 und Ser226, ausgewählt, die eventuell zu einer Änderung der Aktivität führen könnten. Drei verschiedene Sättigungsmutagenesebanken (TalBF178X, TalBS226X, TalBF178YS226X) wurden auf eine Synthese von D-T6P aus DHA und D-GAP (als D,L-GAP angeboten) mit einem neu entwickelten photometrischen Nachweis im Mikrotitermaßstab untersucht. In keiner der drei Banken wurde bislang eine positive Variante gefunden.

Durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion wurden zwei Banken, epTalB und epTalBF178Y, mit niedriger Mutationsfrequenz (~2,3 Nukleotidaustausche/kb) gebildet. Die beiden epBanken könnten auf eine Synthese von D-T6P überprüft werden. Bei dem Screening auf eine Synthese von D-T6P der Sättigungsmutagenesebanken (TalBF178X, TalBS226X, TalBF178YS226X) wurde eine hohe Anzahl falsch-positiver Klone gefunden,

deswegen wurde davon abgesehen epTalB und epTalBF178Y mit diesem Screening zu untersuchen. Die Banken stehen nun für neue bereits getestete Selektions- und Screeningmethoden zur Verfügung.

In zwei Runden Sättigungsmutagenese konnte TalB so verändert werden, dass erstens D-F6P von TalBF178Y mit einer katalytischen Effizienz gebildet wird wie von FSA (TalBF178Y) und zweitens dass eine Doppelmutante, TalBF178YR181E einen dreimal niedrigeren  $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd besitzt als TalBF178Y. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Aminosäurepositionen Phe178 und Ser226 nicht oder nicht allein an der Bildung von Produkten mit neuer Stereokonfiguration beteiligt sind.





# Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	IV
Abkürzungsverzeichnis	
<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Transaldolase und der Pentose-Phosphat-Weg	1
2. Transaldolase B von <i>E. coli</i>	2
3. Vergleich der Transaldolase B von <i>E. coli</i> mit der humanen Transaldolase	7
4. Vergleich der Transaldolase B mit Klasse I Aldolasen	8
5. Vergleich der Transaldolase B mit der Fructose-6-Phosphat Aldolase	11
6. Gerichtete Evolution	15
6.1. Mutagenesemethoden	16
6.2. Selektions- und Screeningsysteme	23
Zielsetzung	24
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>26</b>
1. Chemikalien, Enzyme, Materialien	26
2. Geräte	28
3. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	30
4. Nährmedien und Antibiotika	35
5. Puffer und Lösungen	36
6. Molekulargenetische Methoden	39
6.1. Kultivierung der Bakterien	39
6.2. Isolierung, Restriktion und Modifikation von DNA	39
Isolierung und Reinigung von DNA	39
Restriktion und Ligation von DNA	39
6.3. Transformation von Zellen	39
Herstellung von kompetenten Zellen	39
Transformation von Zellen	40
6.4. Polymerase-Kettenreaktion	40
Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion	40
Sättigungsmutagenese und Einzelaustausch von Aminosäuren	40
Fehlerhafte Polymerase-Kettenreaktion	41
6.5. Sequenzierung von DNA	42
7. Proteinbiochemische Methoden	43
7.1. Anzucht von rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämmen zur Expression von Proteinen	43

7.2. Zellaufschluss und Herstellung von zellfreien Rohextrakten	43
<i>E. coli</i> -Stämme, die das Plasmid pLysS tragen	43
<i>E. coli</i> -Stämme ohne pLysS	44
7.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung	44
7.4. SDS-Polyacrylamidgel Gelelektrophorese	44
7.5. Westernblot Analyse	45
7.6. Reinigung rekombinanter Proteine	45
Reinigung der Transaldolase B von <i>E. coli</i> und Transaldolase B Muteinen	45
Reinigung der humanen Transaldolase	46
Reinigung der Fructose-6-Phosphat-Aldolase	47
Reinigung der Fructokinase	47
Reinigung der Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase	48
Reinigung der Glycerin-Dehydrogenase	48
7.7. Größenausschlusschromatographie	49
7.8. Photometrische Bestimmungen	49
Transaldolase-Aktivität	49
Fructose-6-Phosphat-Aldolase Aktivität	50
Fructose-6-Phosphat-Spaltung	50
Fructose-Bildung	50
Fructose- und Tagatose-Spaltung	51
Tagatose-6-Phosphat-Bildung	51
Fructokinase-Aktivität	51
Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase-Aktivität	52
Glycerin-Dehydrogenase-Aktivität	52
7.9. Auftrennung der Reaktionsumsätze mittels HPLC	52
7.10. Reduktion des Schiff'sche Base Intermediats von TalBF178Y	53
7.11. Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat	54
Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat, Überprüfung der Aktivität mit D-Fructose-6-Phosphat als Substrat	54
Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat, Überprüfung der Aktivität mit D-Fructose-6-Phosphat als Donor und D-Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor	54
7.12. Einfluss von D-Glycerinaldehyd auf die Aktivität von FSA mit Dihydroxyaceton und D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat	54
Untersuchung des inhibitorischen Einflusses von D-Glycerinaldehyd auf FSA	54
K <sub>i</sub> -Wert-Bestimmung von FSA für D-Glycerinaldehyd	55
7.13. Zellanzucht und Screening im Deepwellplatten- bzw. Mikrotiterplatten-Maßstab	55

Zellanzucht in Deepwellplatten von rekombinanten <i>E. coli</i> XL1Blue-Zellen	55
Zellanzucht in Deepwellplatten von rekombinanten <i>E. coli</i> XL1Blue-Zellen	55
Stammhaltung der Sättigungsmutagenesebanken	56
Zellaufschluss im Mikrotitermaßstab	56
Bestimmung der Proteinkonzentration im Mikrotitermaßstab	56
Screening auf Synthese von Fructose-6-Phosphat	56
Screening auf Synthese von D-Fructose	57
Screening auf Synthese von Tagatose-6-Phosphat	57
a) Kalibrierung von Tagatose-6-Phosphat unter den Screening-Bedingungen	57
b) Screening auf die Synthese von Tagatose-6-Phosphat	58
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>60</b>
1. Sättigungsmutagenese von <i>talB</i> zur Generierung von Enzymen zur Synthese von D-Fructose-6-Phosphat	60
1.1. Überexpression des <i>talB</i> -Gens in <i>E. coli</i> und affinitätschromatographische Reinigung des korrespondierenden Proteins	60
1.2. Mutagenese des <i>talB</i> -Gens	62
1.3. Etablierung eines Farbnachweises von D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd im Mikrotitermaßstab	65
1.4. Screeningverfahren auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat	68
1.5. Reinigung von TalB, TalBF178Y und FSA	69
1.6. Charakterisierung von TalBY	72
Gerichteter Austausch der Aminosäure Phe 189 der humanen Transaldolase und Aufreinigung der humanen Transaldolasen hTal und hTalF189Y	72
Immundetektion von TalB, TalBY, hTal und hTalY	74
Bestimmung der kinetischen Konstanten von TalBY, hTal und hTalY	75
Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates	79
Inhibition von TalBY durch Tagatose-6-Phosphat	81
Röntgenstruktur von TalBY	84
2. Sättigungsmutagenese von <i>talBF178Y</i> zur Generierung von Enzymen mit einem verbesserten $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd	86
2.1. Mutagenese des <i>talBY</i> -Gens	87
2.2. Etablierung eines Farbnachweises von D-Fructose aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd im Mikrotitermaßstab	90
2.3. Screening von TalB-Varianten auf einen niedrigen $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd in der Synthese von D-Fructose	94
2.4. Untersuchung der TalBY-Varianten	97
2.5. Charakterisierung von TalBY und TalBYE	100
Bestimmung der kinetischen Konstanten von TalBY und TalBYE	100

Strukturaufklärung von TalBYE	106
3. Einfluss von D-Glycerinaldehyd auf die Aktivität von FSA mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat	108
4. Screening auf Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat	112
4.1. Auswahl der Sättigungsmutagenesebanken für eine Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat	112
4.2. Etablierung des Screening auf eine Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat	113
Kalibrierung von D-Tagatose-6-Phosphat unter den Screening-Bedingungen	114
4.3. Screening der Sättigungsmutagenesebanken TalBF178X, TalBS226X und TalBF178YS226X	117
5. Zufallsmutagenese des <i>talB</i> - und <i>talBF178Y</i> -Gens	119
<b>IV. Diskussion</b>	<b>124</b>
1. Auswahl des Enzyms	124
2. Mutagenese des <i>talB</i> -Gens zur Generierung von D-Fructose-6-Phosphat	126
2.1. Sättigungsmutagenese des <i>talB</i> -Gens	126
2.2. Etablierung eines Screenings zum Nachweis von D-Fructose-6-Phosphat	127
2.3. Überprüfung der elf Sättigungsmutagenesebanken auf Synthese von D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat	128
2.4. Charakterisierung von TalBY	129
2.5. Vergleich von TalB, TalBY mit hTal, hTalY	133
2.6. Struktur von TalBY und Bedeutung von Phe178	134
3. Mutagenese des <i>talBY</i> -Gens zur Generierung von Enzymen mit niedrigem $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd	135
3.1. Sättigungsmutagenese des <i>talBF178Y</i> -Gens	136
3.2. Etablierung eines Screenings zum Nachweis von D-Fructose	137
3.3. Überprüfung der drei Sättigungsmutagenesebanken auf die Synthese von D-Fructose	138
3.4. Charakterisierung der Muteine	138
3.5. Charakterisierung von TalBYE	139
3.6. Struktur und Bedeutung von Arg181	141
4. Einfluss von D-Glycerinaldehyd auf FSA	142
5. Sättigungsmutagenese des <i>talB</i> - / <i>talBF178Y</i> -Gens und Screening auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat	144
6. Zufallsmutagenese von <i>talB</i> und <i>talBF178Y</i>	145
Literaturverzeichnis	148
Danksagung	
Lebenslauf	





## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbum, Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoffatom
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
d	2'-Desoxy(ribo)-
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DERA	2-Deoxyribose-5-Phosphat Aldolase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i> ,
FSA	Fructose-6-Phosphat Aldolase
F6P	Fructose-6-Phosphat
GA	Glycerinaldehyd
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GSH	reduzierte Glutathion
HA	Hydroxyaceton
HPLC	engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hTal	humane Transaldolase, TALDO1
hTalY	humane Transaldolase Phe 189 zu Tyr
KDPG	D-2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphoglukonat
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NAL	N-Neuraminsäure Lyase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymeraseketten Reaktion
RSA	Rinderserum Albumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TalB	Transaldolase B
TalBY	Transaldolase B Phe 178 zu Ty
TalBYE	Transaldolase B Phe 178 zu Tyr / Arg 181 zu Glu
TALDO1	humane Transaldolase, hTal

---

Tev	<i>engl. tobacco etch virus</i>
U	Unit ( $\mu\text{mol}$ gebildetes Substrat pro min)
WT	Wildtyp
WWW	World Wide Web

Aminosäuren wurden entweder nach dem Standard-Einbuchstabencode oder dem Standard-Dreibuchstabencode angegeben. Nukleotide wurden nach dem Standard-Einbuchstabencode abgekürzt.

Alanin	Ala	A	Glycin	Gly	G	Serin	Ser	S
Arginin	Arg	R	Isoleucin	Ile	I	Threonin	Thr	T
Asparagin	Asn	N	Leucin	Leu	L	Tryptophan	Trp	W
Aspartat	Asp	D	Lysin	Lys	K	Tyrosin	Tyr	Y
Cystein	Cys	C	Methionin	Met	M	Valin	Val	V
Glutamat	Glu	E	Phenylalanin	Phe	F			
Glutamin	Gln	Q	Prolin	Pro	P			

Adenin	A	Guanin	G	Uracil	U
Cytosin	C	Thymin	T		
Adenin,	N	Guanin,	S		
Guanin,		Cytosin			
Cytosin,					
Thymin					

---



# I. Einleitung

## 1. Transaldolase und der Pentose-Phosphat-Weg

Die Transaldolase ist ein Enzym des nichtoxidativen Zweiges des Pentose-Phosphat-Weges (siehe Abb. I.1) [1-5]. Sie katalysiert die reversible Übertragung einer Dihydroxyaceton-Einheit von einem Ketose-Donor auf einen Aldose-Akzeptor und gehört damit zu der Enzymklasse der Transferasen (EC 2.2.X.X).

Der Pentose-Phosphat-Weg stellt zum Einen über die Intermediate des nicht-oxidativen Zweigs des Pentose-Phosphat-Weges eine Verbindung mit dem Embden-Meyerhof-Parnas-Weg dar und zum Anderen dient er der Zelle zur Bereitstellung des Reduktionsäquivalents NADPH und vielen anderen Bausteinen, wie D-Erythrose-4-Phosphat, zur Biosynthese komplexeren Verbindungen.

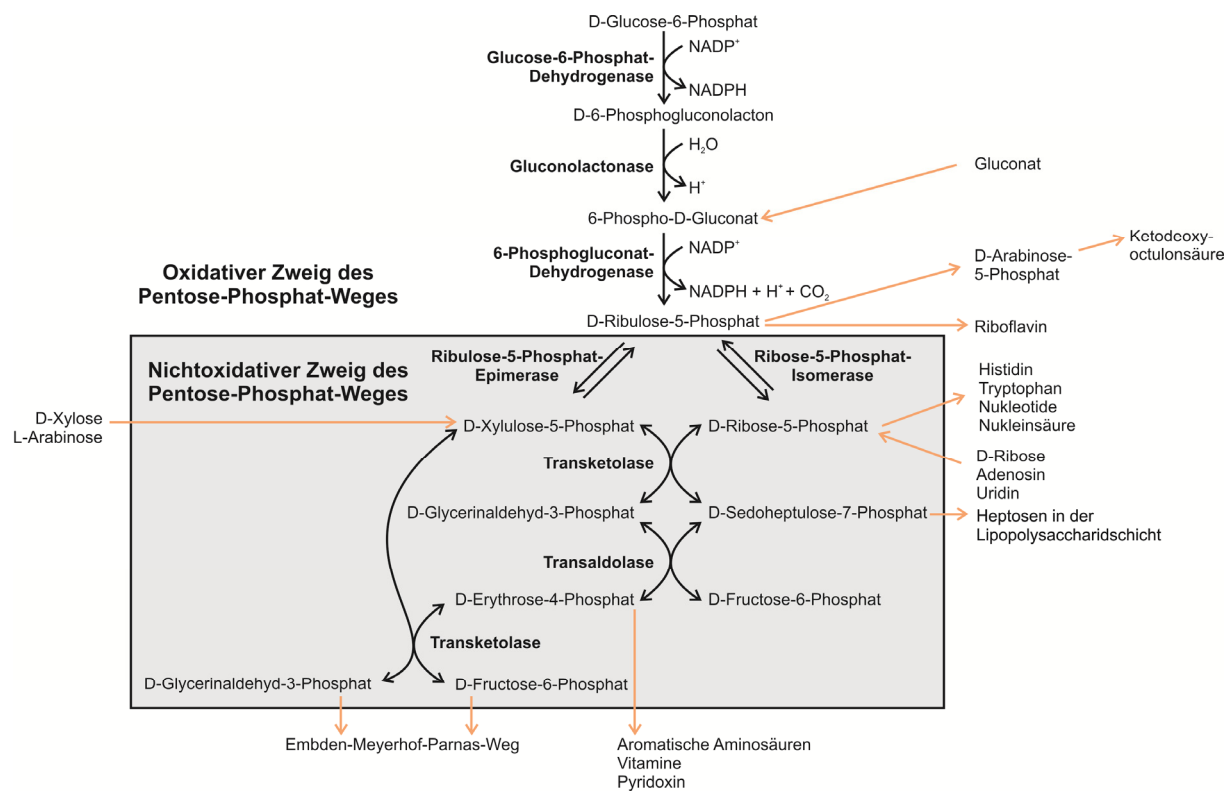


Abb. I.1: Schema des Pentose-Phosphat-Weges (abgeändert nach [5-6]). Pfeile in Orange zeigen, welche Metabolite des Pentose-Phosphat-Weges von *E. coli* für Biosynthesen genutzt werden können, oder welche Kohlenstoffquellen in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust werden können.

In Bakterien wie *Escherichia coli* stellt der nichtoxidative Pentose-Phosphat-Weg Metabolite von wichtigen Biosynthesewegen bereit [6-7] (siehe Abb. I.1). D-Sedoheptulose-7-Phosphat dient Gram-negativen Bakterien zur Bereitstellung von Heptose Untereinheiten in der Lipopolysaccharid-Schicht der äußeren Membran [1, 6]. D-Erythrose-4-Phosphat ist Ausgangssubstrat für die Synthese von aromatischen Aminosäuren und Vitaminen, die über

den Shikimat- und Pyridoxal-Stoffwechsel gebildet werden [6, 8]. Ausgehend von D-Ribose-5-Phosphat werden Nukleotide und Aminosäuren (Histidin und Tryptophan) synthetisiert [6]. D-Ribulose-5-Phosphat kann zu Riboflavin und D-Arabinose-5-Phosphat umgewandelt werden [9-10]. Gleichzeitig können über den nichtoxidativen Zweig Pentosen und Hexosen, wie L-Arabinose, D-Ribose, D-Xylose und D-Glucose, katabol verwertet werden [6].

In höheren Organismen, wie dem Mensch, stellt der Pentosephosphat-Weg einen alternativen Weg zur Glycolyse dar [11]. 10 – 20 % der Glucose-Oxidation erfolgt über diesen Weg im Cytosol der Zellen und hat ähnlich wie in Prokaryoten zwei Hauptfunktionen. Erstens die Synthese des Reduktionsäquivalents NADPH und zweitens die Synthese von D-Ribose-5-Phosphat. NADPH wird für den Schutz der Zelle vor oxidativem Stress benötigt, sowie zur Synthese von Lipiden, Cholesterin, einiger Hormone (wie Östradiol und Testosteron) und zur Fettsäurenverlängerung [11-12]. D-Ribose-5-Phosphat zu Desoxyribose umgewandelt werden und in das Rückgrat der DNA eingebaut werden Als Ribose dient es der Zelle zur Bildung von Intermediate, wie ATP, cAMP, Coenzym A, FAD und NAD(P)<sup>+</sup> [11].

Die Transaldolase katalysiert die reversible Übertragung einer Dihydroxyaceton-Einheit von D-Sedoheptulose-7-Phosphat auf D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (siehe Abb. I.2) [5, 13]. Bei dieser Reaktion entsteht D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat. Die Transaldolase (EC 2.2.1.2) gehört zu den Transferasen und kommt in *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya* vor [5, 14]. Dieses Enzym benötigt keine Kofaktoren und bildet mit dem Donorsubstrat ein Schiff'sche Base Intermediat.

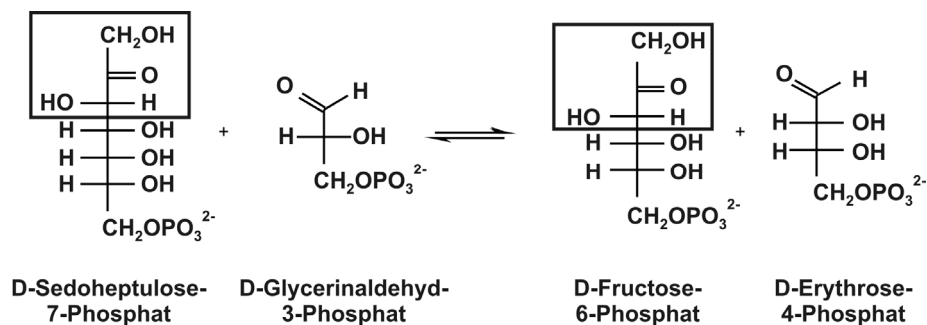


Abb. I.2: Von der Transaldolase katalysierte Transferreaktion.

## 2. Transaldolase B von *E. coli*

Transaldolase B (TalB) von *Escherichia coli* verwendet neben den bereits genannten Donoren (siehe Abb. I.2) eine Vielzahl anderer Substrate [5, 15-16]. Der Donor mit der höchsten Affinität ist mit einem  $K_m$ -Wert von 0,29 mM D-Sedoheptulose-7-Phosphat, mit absteigender Affinität wird D-Fructose-6-Phosphat ( $K_m$ -Wert: 1,2 mM) und D-Fructose ( $K_m$ -

Wert: 2000 mM) verwendet [15-16]. Als Akzeptoren wird eine Vielzahl von phosphorylierten und unphosphorylierten Substanzen verwendet, wobei kurzkettige, phosphorylierte Aldehyde, wie D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat bevorzugt werden [15-16]. Mit  $K_m$ -Werten oberhalb ihrer physiologischen Konzentrationen werden auch Akzeptoren, wie D-Glycerinaldehyd, D-Ribose-5-Phosphat, Formaldehyd, D,L-Glycerinaldehyd, Lactaldehyd, Glycolaldehyd, D-Erythrose, Propionaldehyd und Acetaldehyd (Reihenfolge mit aufsteigendem  $K_m$ -Wert von  $\geq 31$  mM) verwendet [16].

Transaldolase B bildet Homodimere. Die beiden Untereinheiten bestehen jeweils aus 316 Aminosäureresten und haben je eine Größe von 35 kDa [15]. Jede Untereinheit bildet ein  $(\beta/\alpha)_8$ -Faß. Der Kern des Fasses wird von 8  $\beta$ -Faltblättern gebildet und ist von 8  $\alpha$ -Helices umgeben [17] (siehe Abb. I.3).

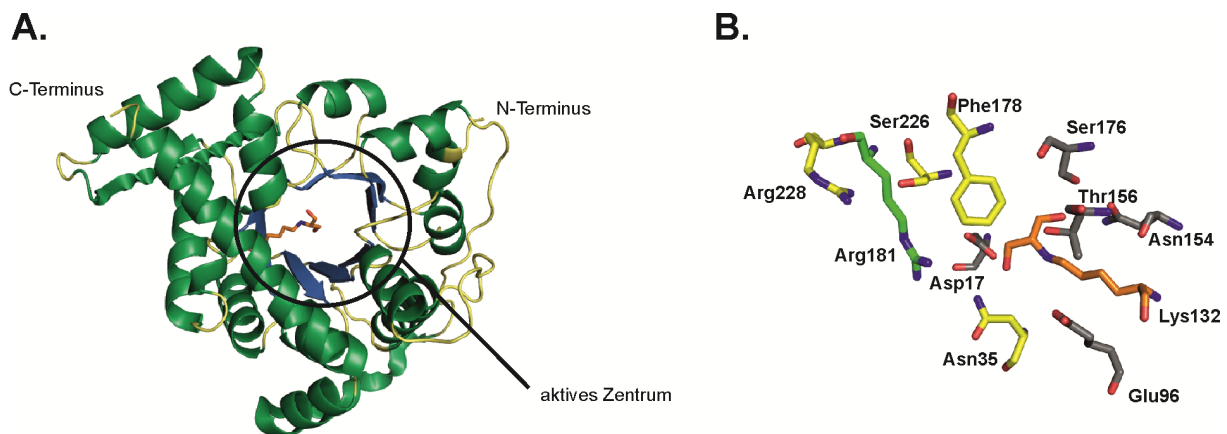


Abb. I.3: A. Monomer der Transaldolase B von *E. coli* mit reduziertem Schiff'sche Base Intermediat (orange). In grün dargestellt sind die  $\alpha$ -Helices, in dunkelblau die  $\beta$ -Faltblätter und in gelb die Loops. B. Sicht auf das aktive Zentrum von TalB. Das reduzierte Schiff'sche Base Intermediat ist dargestellt in Orange, die benachbarten Aminosäurereste sind nach der Lokalisation im  $(\beta/\alpha)_8$ -Faß eingefärbt. In grün: in einer  $\alpha$ -Helix, in grau: in einem  $\beta$ -Faltblatt und in gelb: in einem Loop (Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome in hellblau). Dargestellt wurden die Strukturen mit PyMOL (pdb-Nr. 1UCW verändert nach [17-18]).

Durch Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von TalB von der Aminosäure Arg 300 und dem pH-Wert abhängig ist [19]. Bei einem pH-Wert von 8,5 liegt TalBR300A und TalBR300E als Monomere vor und zeigen eine ähnliche Aktivität wie der Wildtyp. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Dimerisierung die Aktivität von TalB nicht beeinflusst. Bisher sind nur Transaldolasen bekannt, die wie TalB keine Kofaktoren benötigen und während der Übertragung einer Dihydroxyaceton ein Schiff'sche Base Intermediat formen. Dieser Dihydroxyaceton-Enzym Komplex konnte durch Reduktion mit Natriumborhydrid, anschließender Kristallisation und Aufklärung der Röntgenstruktur nachgewiesen werden [18]. Anhand dieses Komplexes

und vorangegangener Mutagenese der verwandten Transaldolase von *Saccharomyces cerevisiae* konnte der katalytisch aktive Lysinrest 144 (TalB: Lys132) im Zentrum des  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses lokalisiert werden (siehe Abb. I.3) [18, 20].

Aufgrund der Strukturen mit bzw. ohne reduziertem Schiff'sche Base Intermediat, gerichteten Mutagenesen an Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum von TalB (Asp17, Asn35, Glu96, Thr156, Ser176), der Analyse und Aufklärung der jeweiligen Röntgenstrukturen, konnte ein Reaktionsmechanismus von TalB postuliert werden (siehe Abb. I.4) [17-18, 21].

An dem postulierten Reaktionsmechanismus spielt der Aminosäurerest Lys132 eine zentrale Rolle. Am Protonentransfer, zu Beginn der Reaktion, sind die beiden sauren Aminosäuren Glu96 und Asp17, sowie ein Wassermolekül beteiligt [18].

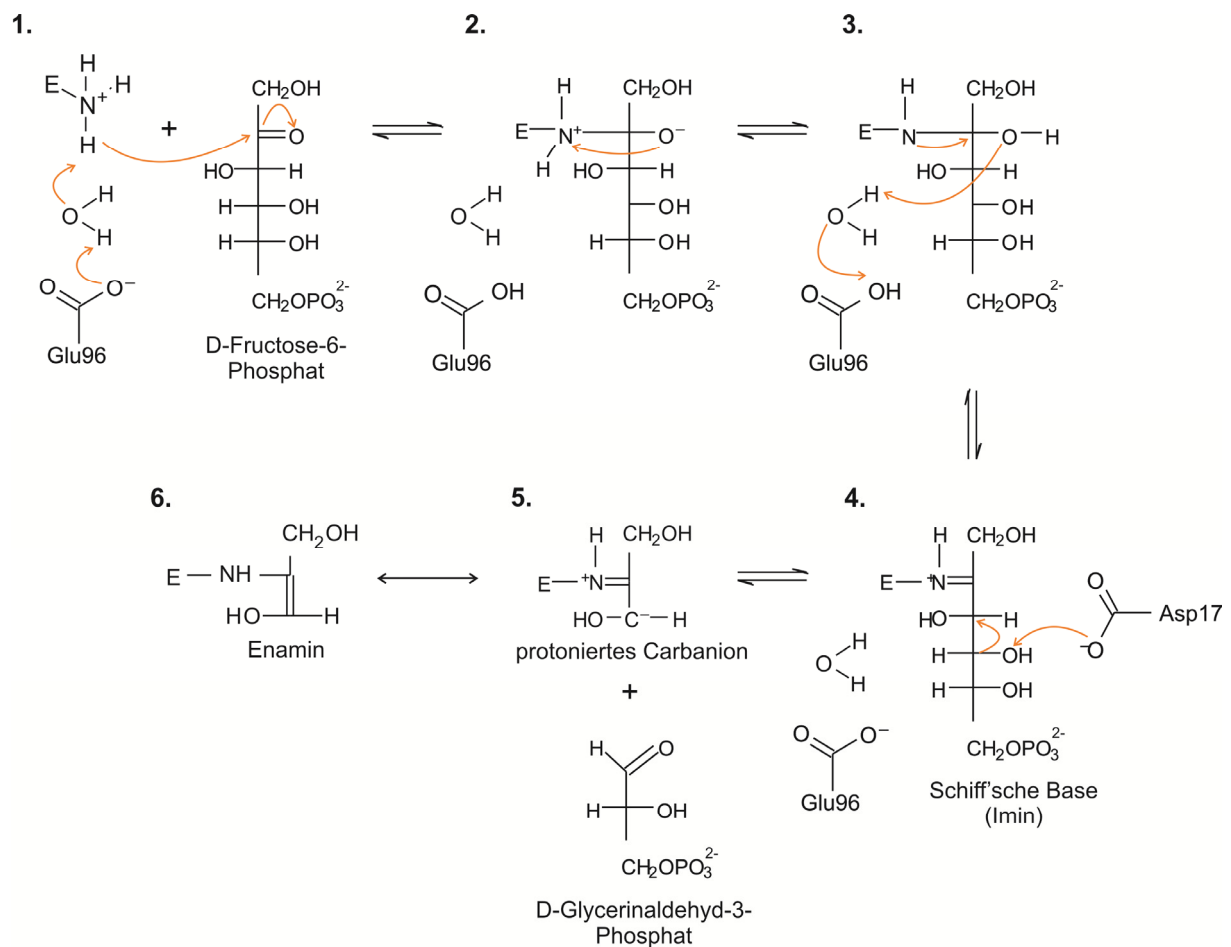


Abb. I.4: Postulierter Reaktionsmechanismus der TalB von *E. coli* (verändert nach [17-18, 21]).

Der postulierte Reaktionsmechanismus beginnt mit dem nukleophilen Angriff der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys132 auf das zweite Kohlenstoffatom des Substrates, in diesem Fall D-Fructose-6-Phosphat (siehe Abb. I.4 1.). Ein Protonentransfer von Lys132 findet wahrscheinlich auf ein Wassermolekül statt (siehe Abb. I.4 1.). Von dem gebildeten Oxonium wird das Proton auf die negativ geladene Seitenkette des Glu96 übertragen (siehe Abb. I.4 1.). Die negative Ladung der gebildeten Zwischenstufe (siehe Abb. I.4 2.) wird



wahrscheinlich durch ein katalytisches Wassermolekül und der Seitenketten von Thr156 stabilisiert (nicht gezeigt). Durch einen weiteren Protonentransfer von Lys132 auf das C2-Sauerstoffatom kann ein Carbinolamin gebildet werden (siehe Abb. I.4 3.). Durch Wasserabspaltung vom Carbinolamin wird eine Schiff'sche Base (Imin) gebildet (siehe Abb. I.4 4.). Die dabei freigesetzte Hydroxylgruppe kann durch die protonierte Seitenkette des Glu96 über ein katalytisch aktives Wassermolekül protoniert werden (siehe Abb. I.4 3.). Durch Deprotonierung der C4-Hydroxylgruppe des Imins (siehe Abb. I.4 4.) erfolgt die Abspaltung und Freisetzung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und ein protoniertes Carbanion entsteht (siehe Abb. I.4 5.). Asp17 ist wahrscheinlich an der Deprotonierung des Imins beteiligt (siehe Abb. I.4 4.). Durch Keto-Enol-Tautomerie wird aus dem Carbanion ein Enamin gebildet (siehe Abb. I.4 6.). Bindet ein Akzeptor, wie D-Erythrose-4-Phosphat, dann reagiert das Carbanion der Dihydroxyaceton-Einheit in umgekehrter Reihenfolge mit der Carbonylgruppe der Aldose. Durch die Freisetzung des zweiten Produktes ist die Reaktion abgeschlossen. Die Bindung der Hydroxylgruppe am C1 erfolgt wahrscheinlich durch die beiden Aminosäuren Ser176 und Asn154, wohingegen die Hydroxylgruppe am C3 durch die Aminosäuren Asp17 und Asn35 gebunden werden.

Anhand eines Sequenzvergleichs von repräsentativen Vertretern der drei Reiche (*Archaea*, *Bacteria* und *Eukaryota*) konnte die Familie der Transaldolasen in fünf Unterfamilien eingeteilt werden [5]. Die Transaldolase B von *E. coli* gehört zur Unterfamilie 1. Die Transaldolasen der Unterfamilie 1 kommen aus sehr verschiedenen Organismen, zu denen Vertreter der höheren (*Homo sapiens sapiens*, *Danio rerio* (Zebrafisch), *Drosophila melanogaster*) und niederen Eukaryoten (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum*), ein Pilz (*Phycomyces*) und Bakterien (*E. coli*, *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Anabaena sp.* PCC 7120, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421) gehören [5]. Aminosäurereste, die am postulierten Reaktionsmechanismus von TalB und an der Bindung der Phosphatgruppe gebundener Zucker beteiligt sind, sind in den Transaldolasen der erwähnten Spezies konserviert (siehe Abb. I. 5).

An dem Vergleich der bakteriellen Transaldolase B mit den anderen Vertretern der Subfamilie 1 ist besonders hervorzuheben, dass TalB den höchsten Grad an identischen Aminosäureresten mit den Transaldolasen von höheren Organismen wie *Homo sapiens sapiens* (56,3 %), *Danio rerio* (56,1 %) und *Drosophila melanogaster* (56,2 %) besitzt.

H. sapiens sapiens TALD01	D	-MSSSPVKRQRMESALDQLKQF -TTVVADTGDGFHAIDEYKPODATTNPSLILAAAMPAYQEIIVEAIAIYGRKLGQ -SOEDQ--IKNAIDKLVFLFGAEILKKTIP	100
Danio rerio Tal	N	-MSVSPDKRRME SALEQIKKF -TTVVADTGDGFNAIEEYKPODATTNPSLILAAAMPAYQPIVQDAIKYGTANGG -TEDEQ--VTNAMDKLVFNFLGFLILKQVP	100
Drosophila melanogaster Tal	N	-MGSDRTLKQKMSVLAQELKKI -TTTVADTGDGFNAINIYKPTDATTNPSLILSASSMERYQPIVQDAIKYAKGKGL -SVSEQ--VAEAMDYLCVLFCTEILKQVP	100
Dictyostelium discodenum Tal	N	-MSN-----ALEELKCY -TTVVADTADDFVLSKYQSODSTNPSLIFVAAASDPKYSLLDSDAIVAKSGLSEK -LSLAIDKLVFNFGVLEILKQVP	91
Synechocystis sp. PCC6803 Tal	N	-----MGKLLLEQLRFQ -TTVVADTGDIOALEFTPRDSTNPSLITAAAMPQYQEIIVDQTLTKAKDAGENASIKD IRLVAFDRDLAVAFGLKI LQIIP	94
Anabaena sp. PCC7120 Tal	N	-----MTKNLLEQLREM -TTVVADTGDIOALEFTPRDATTNPSLITAAAMPQYQEIIVDQTLTKAKDAGENASIKD IRLVAFDRDLAVAFGLKI LQIIP	94
Gleobacter violaceus PCC7421	N	-----MTGSLLDQLROM -TTVVADTGDIOALEFTPRDATTNPSLITAAAMPQYQEIIVDQTLTKAARALGPEAKAAAVATLAFDRDLAVAFGLKI LQIIP	94
Escherichia coli TalB	N	-----MTDKLTSLRQY -TTVVADTGDIAAMKLYOPDATTNPSLILNAAQIPEYRKLIDDAVAVAKQOQSNDRAGQ --IVDAITDKLVAVNIGLEILKQVP	90
Escherichia coli TalA	N	-----MNELDGIGKQF -TTVVADTGDIEIRHXYGPODATTNPSLILNAAQIPEYRKLIDDAVAVAKQOQSNDRAGQ --VVAACDKLAVNFGAEILKQVP	99
Saccharomyces cerevisiae Tal1	N	MSEPAQKQKVVANNLEQLKAVTGDGFSIAGLAFPODATTNPSLILAAAKQPTVAKLIDVAVYRKGKGTTEQQ --VENAVDRLLVDFGKELILKQVP	102
Saccharomyces cerevisiae Tal2	N	MSEPSEKQKQVATSSLEQLKAGTHVA DSGDFEATSKYEPDSTNPSLILAAAKQPTVAKLIDVAVYRKGKGTTEHQ --TENAMDKILVEFGTQILKQVP	102
Schizosaccharomyces pombe Tal	N	-----MSSLEQLKKAIGTIVVSDIGDFEATSKYKPODATTNPSLILAAAKQPTVAKLIDVAVYRKGKGTTEHQ --IETAFDRLLLEFGTQILKQVP	100
		* : *	
H. sapiens sapiens TALD01	K	GRVSTEDARLSFDKDMVARARRLIELYKAEAGISKDRILLI KLSSTWEGIOAGKELEEOHGHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	200
Danio rerio Tal	R	GRVSTEDARLSFDKDMVSRARRLSLYEDAGISKERILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEARVTLIS	200
Drosophila melanogaster Tal	R	GRVSTEDARLSFDTKKSVKALKLIALYKSLGVDKERILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	200
Dictyostelium discodenum Tal	R	GRVSTEDARLSYDIDANVKKGRELIALYKSLGVDKERILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	190
Synechocystis sp. PCC6803 Tal	R	GRVSTEDARLSYDTEATIAKARYLIGEYAKAGIDKRRILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	193
Anabaena sp. PCC7120 Tal	R	GRVSTEDARLSYDTEATIAKARELLIYKAAAGIDKRRILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	193
Gleobacter violaceus PCC7421	R	GRVSTEDARLSYDTEATIEKRSLLIYKAAAGIDKRRILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	193
Escherichia coli TalB	R	GRVSTEDARLSYDTEASIAKARHLIKLVNDAGISNDRILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	188
Escherichia coli TalA	R	GRVSTEDARLSYDTEASIAKARHLIKLVNDAGISNDRILLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	188
Saccharomyces cerevisiae Tal1	R	GRVSTEDARLSYDTEATIEKARHLIKLFEQGVSKERVLLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	202
Saccharomyces cerevisiae Tal2	R	GRVSTEDARLSYDTEATIEKARHLIKLFEQGVSKERVLLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	202
Schizosaccharomyces pombe Tal	R	GRVSTEDARLSYDTEATIEKARHLIKLFEQGVSKERVLLI KLSSTWEGIOAGRELEEEIGHHCNMTLLFSFAQAVACAEAGVTLIS	189
		* : *	
H. sapiens sapiens TALD01	S	YEPLDDPGVSKVTKIYNYKFKSFKYKIVMGA SFRNITGE IKALAGCDPLTITSPKLLGELLDQNAKLVPLVSAKAAQASDL -EKIHLD -EKSFRWLHNEQMAVEKL	298
Danio rerio Tal	R	YEPHEDPGVLSVTKIYNYKFKFDYRIVMGA SFRNITGEIKALAGCDPLTITSPKLLGELLDQNAKLVPLVSAKAAQASDL -ERLQLD -EKSFRWLHNEQMAVEKL	298
Drosophila melanogaster Tal	R	FEALKDPGLVSTNIIYNYKFKFQYKTLVGA SFRNVYGE IKALAGCDLLTITSPALLKELENE TE SVVYTLVSVNAKLODI -EKITVD -ESFRWLHNEQMAVTKL	298
Dictyostelium discodenum Tal	R	FEASKDPGLVISVQIYNYKFKHGYKTVMGA SFRNKQTFTELAGCDLLTITSPNLEELKNADASLVTKKLDSTKLPSDIPNKLDSV -HSNFWLWLNENEMAYFKT	289
Synechocystis sp. PCC6803 Tal	R	YDSEDPPGLSVSTIYNYKFKFQYKTVMGA SFRNITGEITELAGCDLLTITSPOLLQHRNTEGDLPRKLDPA -IVP -ODTEKIVMD -KATFDKHAADDPMASEKL	289
Anabaena sp. PCC7120 Tal	R	YPSAEDPGLSVSTIYNYKFKFQYKTVMGA SFRNITGEITELAGCDLLTITSPOLLQHRNTEGDLPRKLDPA -KAAITLDIKID -KATFDKHAADDPMASEKL	291
Gleobacter violaceus PCC7421	R	YAPHEDPGVSVTIIYNYKFKFQYKTVMGA SFRNITGEIVELAGCDLLTITSPKLELOQATDAELVRLKDDP -OAAAGLETEKIDMD -OATFEKHAEDRMASEKL	290
Escherichia coli TalA	R	YAPAEEDPGVSVIYQYKFKHGYEIVMGA SFRNITGEILELAGCDRLTITPALLKELAESEGAERKLSY --TGEVFRPARIT -ESEFLWQHNQDPMVAVDKL	285
Escherichia coli TalB	R	YVVEEDPGVSKVRNIYDYKQHHYETIVMGA SFRNITGEILELAGCDRLTITPALLKELAESEGAERKLSY --PSTQFRPARPMS -EAEFRFVHNDQDAMAVEKL	284
Saccharomyces cerevisiae Tal1	R	DEGIGKFTNALVALEKLLADRLARLEGEVALNOAFESIFRFDLDDGDFITREEMWGTDAVFDAIDLNDHGDKITAEELGAGIGAV SKLA --	389
Saccharomyces cerevisiae Tal2	R	YTAEDTDPGLSVKTIYNYKFKHGYATEVMAA SFRNITDELKALAGIDNMTLSPNLEQLYESTDPLENKLNSESAKEEGYEVKVSINDEPHFRVYVLENDQMAVEKL	291
Schizosaccharomyces pombe Tal	R	YTAQEDDPGLSVSVNIYNYKFKFQYKTVMGA SFRNVYGE IKELAGVDPLTITSPALLEQLNNSDVAVPKLDKASKASSLLEKVSYLTDPEKFRFDNNDQMAVVKL	286
		* : *	
H. sapiens sapiens TALD01	X	SDGIRKFAADAVKLEFMLETERMENAENK --	327
Danio rerio Tal	R	SDGIRKFAADAVKLEFMLETERMENAENK --	337
Drosophila melanogaster Tal	R	SEGIIRKFAVDVTKLENLIKTYLK --	331
Dictyostelium discodenum Tal	R	GEGIIRKFAEDLVKLENOIKKLL --	321
Synechocystis sp. PCC6803 Tal	R	AEGIGCFKALEVLEHLEELKVLDDGQEHKKGHAEIFHAYDLDDGDFITREEWAGTVDALDRDHDGKITAEMSAGLGAARLAVSG	391
Anabaena sp. PCC7120 Tal	R	DEGIGKFTKALELETLAERLARL --	332
Gleobacter violaceus PCC7421	R	DEGIGKFTKALELETLAERLARL --	332
Escherichia coli TalB	R	AEGIRKFAIDQEKLEKMIKDL --	317
Escherichia coli TalA	R	SEGIIRLFAVDQKLEDLAAKL --	316
Saccharomyces cerevisiae Tal1	R	SEGIIRKFSADIVLLEDLIEKQVTA --	335
Saccharomyces cerevisiae Tal2	R	SDGIRKFAADAVKLEFMLETERMENAENK --	333
Schizosaccharomyces pombe Tal	R	STGIAAFAKADTLRUILKAKLEA --	322
		* : *	

Abb. 1.5: Sequenzvergleich der Transaldolasen der Unterfamilie 1 [22],[23]. Farblich hervorgehoben ist das katalytisch aktive Lysin (rot), sowie Aminosäurereste, die an einem Protonentransfer (gelb), an der Bindung der Phosphatgruppe von Zuckern (grün) und an der Dimerisierung von TalB (Arg300) beteiligt sind (blau). Über den konservierten Aminosäureresten steht die jeweilige Aminosäure (D, E, K, N, R, S, T), nicht konservierte Aminosäurereste, die an der Dimerisierung von TalB beteiligt sind, sind mit einem X gekennzeichnet. Grau unterlegt sind Aminosäurereste putativer EF-Handmotive.

Die Aminosäure Arg300, die an der Dimerisierung von TalB beteiligt ist, ist nicht in allen Transaldolasen konserviert. An dieser Position befindet sich in *Synechocystis sp.* PCC 6803 und *Schizosaccharomyces pombe* ein Alanin (Ala304 und Ala303). Bei *Anabaena sp.* PCC 7120 und *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 befindet sich an den jeweiligen Positionen ein Lysinrest (Lys306 und Lys305). Von den Transaldolasen des Menschen [24], von *Saccharomyces cerevisiae* [25] und *Escherichia coli* [17] ist die Röntgenstruktur gelöst und bekannt, dass diese als Dimer vorliegen. Bei einem Vergleich der jeweiligen Primärstruktur der Proteine der Unterfamilie 1 mit mindestens 675000 Modellen von Proteinen mit SWISS-MODEL Repository kann die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur von Proteinen vorhergesagt werden [26-27]. Bei einem Vergleich der Proteine, von denen die Röntgenstruktur noch nicht gelöst wurde, mit diesen Modellen der Datenbank, besteht eine Sequenzidentität von mindestens 50% mit der humanen Transaldolase (pdb-Nr.: 1F05) bzw. mit der Transaldolase B Variante N34A (pdb-Nr.: 1I2N). Diese Vergleiche legen nahe, dass zwischen den Vertretern der Unterfamilie 1 nicht nur eine große Ähnlichkeit in der Primärstruktur besteht, sondern auch in der Sekundär- und Tertiärstruktur.

### 3. Vergleich der Transaldolase B von *E. coli* mit der humanen Transaldolase

Die humane Transaldolase und die Transaldolase B von *E. coli* sind sich nicht nur in ihrer Primärstruktur sehr ähnlich, sondern auch in ihren räumlichen Strukturen. Beide Transaldolasen liegen als Dimer vor [24]. Wie TalB formt auch die humane Transaldolase ein  $(\beta/\alpha)_8$ -Faß. Der Kern des Fasses wird, wie bei TalB, von 8  $\beta$ -Faltblättern gebildet, ist aber von 7 anstatt von 8  $\alpha$ -Helices umgeben.

Die Rolle der humanen Transaldolase (TALDO1) im Menschen wird bei Autoimmunkrankheiten, wie Multiple Sklerose und Gelenkrheumatismus kontrovers diskutiert [5]. Bei Multiple Sklerose (MS) Patienten wurden im Blutserum und im *Liquor cerebrospinalis* Antikörper gegen TALDO1 gefunden [28-30]. Es wird vermutet, dass TALDO1 in den Patienten eine T- und B-Zellantwort auslösen kann [30-31]. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante TALDO1 die Teilung und Aggregation von T-Lymphocyten bei MS-Patienten stimulieren kann [30-31]. Bei MS-Patienten kann TALDO1 an die Haupthistokompatibilitätskomplexe der T-Zellen binden und eventuell die cytotoxische T-Zellantwort auslösen [32]. Antikörper von MS-Patienten können rekombinante TALDO1 inaktivieren [28, 31]. Ein möglicher Zusammenhang könnte auch zwischen der Expressionsrate von TALDO1 und der Rückfallquote von Krebspatienten mit Kopf- und Nackenkarzinomen bestehen [33].

Bei insgesamt 10 Patienten wurde eine homozygote Tal-Defizienz beschrieben [11, 34-39]. Bei den beschriebenen Patienten kommen verschiedene Formen von TALDO1 vor. In fünf der Patienten liegt eine vollständige Deletion von Ser171 vor [34, 36], bei vier ist die

Aminosäure Arg192 gegen His [35, 37, 39] und bei einem Patienten gegen Cys ausgetauscht [38]. Die beschriebenen Symptome variieren in den Patienten. Häufig kommt es bereits im Kindesalter zu Leberdysfunktionen, Milzvergrößerung, Blutarmut und Herzproblemen. Konzentrationen an Erythritol, Arabitol, Ribitol, Sedoheptulose und Sedoheptulose-7-Phosphat sind im Urin und im Blut bei diesen Patienten erhöht [34, 36, 39-44]. Dies verdeutlicht zu welchen schwerwiegenden Effekten eine homozygote Transaldolasedefizienz im Menschen führen. Im Gegensatz dazu führt die Tal1-Defizienz in *Saccharomyces cerevisiae* zu keinem deutlichen Phänotyp, es kann jedoch eine Anreicherung von Sedoheptulose-7-Phosphat in der Zelle beobachtet werden [45]. Bei *E. coli* führt eine TalB-Defizienz ebenfalls zu keiner Änderung der Wachstumseigenschaften, aber auch in *E. coli* reichert sich Sedoheptulose-7-Phosphat an [21, 46]. Aufgrund von Umverteilungen der Metabolite im Pentose-Phosphat-Weg können diese Organismen mit dem Ausfall des Enzyms umgehen. Außerdem liegen in *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli* die Gene der Transaldolasen zweimal vor.

#### 4. Vergleich der Transaldolase B mit Klasse I Aldolasen

Weitere Enzyme, die wie Transaldolasen C-C-Bindungen knüpfen und spalten können sind z. B. die Aldolasen, die zu den Lyasen gehören (EC 4.1.X.X). Aldolasen lassen sich in zwei Klassen einteilen. Klasse I Aldolasen bilden, wie Transaldolasen, ein Schiff'sche Base Intermediat mit dem Donorsubstrat. Klasse II Aldolasen enthalten ein Metallion (z. B.  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), die als Elektrophile im aktiven Zentrum reagieren. Aldolasen sind meist sehr donorspezifisch und lassen sich anhand der Donoren einteilen [47-50]. Von Aldolasen verwendete Donoren sind Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), Dihydroxyaceton, Hydroxyaceton, Glycolaldehyd, Glycin, Acetaldehyd, Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat [47-51].

Am besten untersucht sind die DHAP-abhängigen Aldolasen. Neben der D-Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase [52] gehören zu den DHAP-abhängige Enzymen die L-Fuculose-1-Phosphat Aldolase [53], L-Rhamnulose-1-Phosphat Aldolase [54] und D-Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase [55]. Diese vier Aldolasen können bei der Bildung einer neuen C-C-Bindung alle vier möglichen Stereoisomere bilden (siehe Abb. I. 6). Die ersten drei Aldolasen bilden jeweils ein Stereoisomer, wohingegen die D-Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase ein Diastereoisomerengemisch bildet [49].

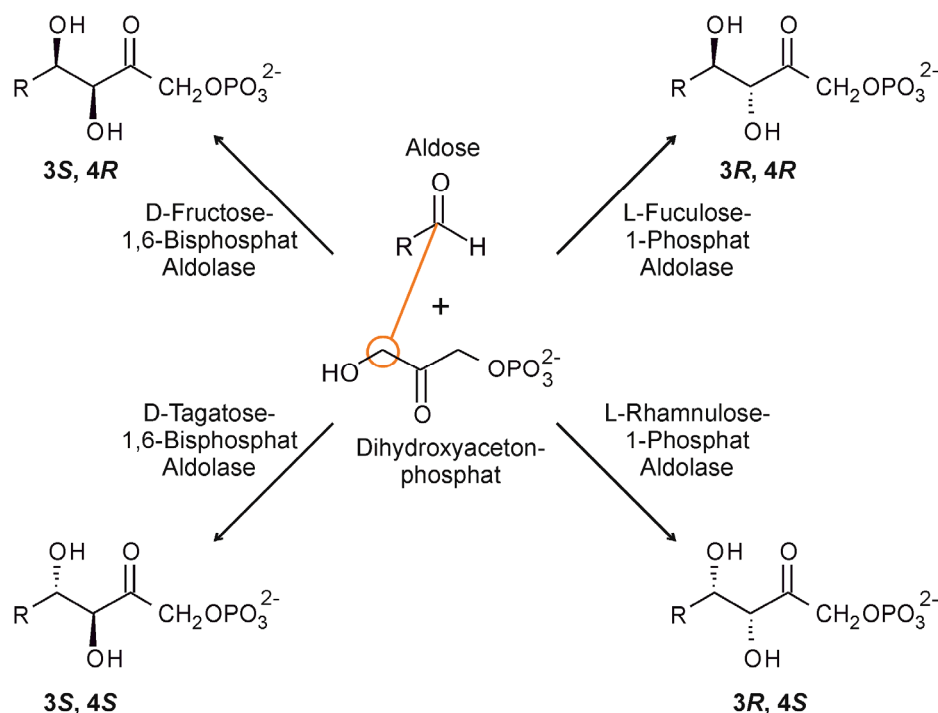


Abb. I.6: Vier Beispiele für DHAP-abhängige Aldolasen, die jeweils eine von vier Stereoisomeren an den Positionen C3 und C4 bildet (verändert nach [47]). Dabei wird neben DHAP ein Aldehyd als Akzeptor verwendet. Die Abkürzung R steht für einen organischen Rest.

Ein Vorteil dieser Aldolasen ist dass sie als Akzeptoren eine große Anzahl an unterschiedlichen Aldehyden verwenden. Neben den natürlichen Akzeptoren wie D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, D-Glycerinaldehyd, Formaldehyd und Glycolaldehyd, auch Akzeptoren mit Amino-, Nitro-, Azido-, Phosphono-, Sulfo-, Chloro-, Fluoro-, Deoxy- und andere Seitengruppen. Außerdem sind sie hoch regio-, chemo-, diastereo-, enantioselektiv, sind unter milden Reaktionsbedingungen aktiv und benötigen keine Schutzgruppen an den Substraten [47, 49]. Im Gegensatz zur Transaldolase B werden DHAP-abhängige Aldolasen zur Bildung von neuen C-C-Bindungen in der organischen Synthese eingesetzt.

Die D-Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase und die L-Rhamnulose-1-Phosphat Aldolase können zur Synthese von Pentosen, Hexosen, höherkettigen Zuckern [56], komplexeren Verbindungen, wie (-)-Syringolide [57], Pankratistatin [58], Azazuckern und deren Derivate, wie die Iminocyclitole, Desoxynojirimycin und Desoxymannojirimycin [59-60] verwendet werden (siehe Tab. I.6). Außerdem ist durch L-Fucose-1-Phosphat Aldolase und L-Rhamnulose-1-Phosphat Aldolase eine Racematspaltung möglich [61]. Bei der Verwendung der DHAP-abhängigen Aldolasen ist von Nachteil, dass die Produkte phosphoryliert sind. Diese Phosphatgruppe muss durch alkalische oder saure Phosphatase entfernt werden, damit die Produkte für weitere Syntheseschritte zur Verfügung stehen können [62]. Außerdem ist DHAP von Nachteil, weil es instabil, schwierig zu synthetisieren und teuer ist [47]. Bei Sigma Aldrich kosten 0,1 g DHAP 496,50 € (Reinheit  $\geq 93\%$  als Dihydroxyacetonphosphat-Dilithiumsalz; [www.sigmaaldrich.com/](http://www.sigmaaldrich.com/)). Wohingegen 100 g der

unphosphorylierten Form Dihydroxyaceton nur 28,60 € (Reinheit von 97% als 1,3-Dihydroxyacetondimer) kosten. DHA ist gegenüber DHAP von Vorteil, weil es unphosphoryliert ist, leichter zu synthetisieren und damit billiger ist.

Ein Lösungsansatz DHA anstatt DHAP einsetzen zu können wurde von Sanchez-Moreno *et al.* 2004 [63] gefunden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von Dihydroxyacetonkinase und Acetatkinase, DHAP in einem stetigen Recycling-Mechanismus aus DHA, ATP und Acetylphosphat gebildet werden kann. Das gebildete DHAP steht damit der D-Fucose-1-Phosphat Aldolase für eine Kondensationsreaktion mit L-Lactaldehyd zu L-Fucose-1-Phosphat zur Verfügung.

Bisher wurde L-Fructose aus DHAP und L-Glycerinaldehyd durch L-Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase gebildet [64]. Es konnte gezeigt werden, dass die L-Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase in Gegenwart eines Borat-Puffers, DHA als Donor akzeptiert [65]. Bei der Synthese von L-Fructose aus D,L-Glycerinaldehyd mit DHA, in Gegenwart von Borat, bildet das Enzym vermutlich mit dem Borat des Puffers einen reversiblen DHA-Borat-Ester. Dadurch kann in einer kostengünstigen Reaktion L-Fructose synthetisiert werden.

Vielversprechend ist die Entdeckung und Verwendung der Fructose-6-Phosphat Aldolase [66-68]. Eine Klasse I Aldolase, die DHA anstatt DHAP verwendet und ein breites Donorspektrum besitzt [51, 69-70].

## 5. Vergleich der Transaldolase B mit der Fructose-6-Phosphat Aldolase

Zu den Klasse I Aldolasen gehört die Fructose-6-Phosphat Aldolase (FSA) aus *Escherichia coli* [66] (siehe Abb. I.7), die in *E. coli* als FSA A und FSA B vorkommt. FSA bildet Homodekamere, die aus zwei übereinanderliegenden Homopentameren bestehen [68]. Jedes Homopentamer bildet einen Ring (siehe Abb. I.7 A.) bestehend aus fünf Monomeren (siehe Abb. I.7. B).

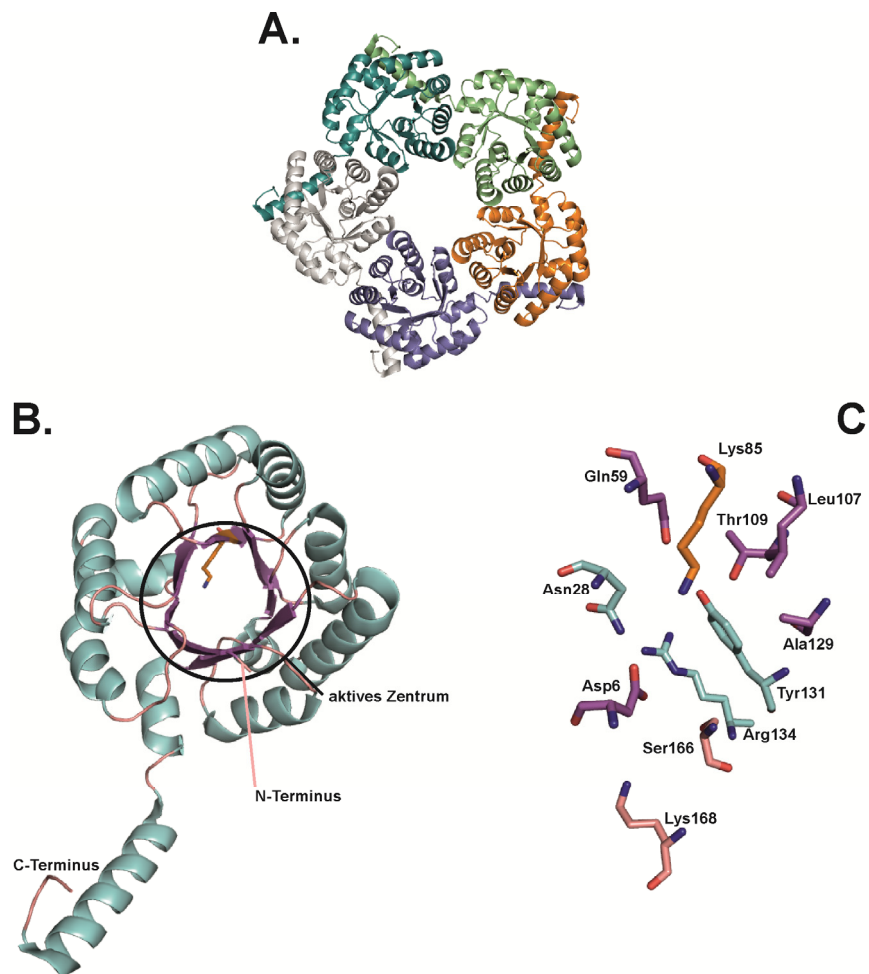


Abb. I.7: Homopentamer (A.), Monomer (B.) und Aminosäurereste im aktiven Zentrum (C.) der Fructose-6-Phosphat Aldolase (FSA) aus *Escherichia coli* (pdB-Nr.: 1L6W, verändert nach [66, 68]). In hellblau dargestellt sind die  $\alpha$ -Helices, in lila die  $\beta$ -Faltblätter und in rosa die Loops. Dargestellt wurden die Strukturen mit PyMOL. A. Sicht von oben auf die Ringstruktur eines Pentamers. B. Sicht auf das aktive Zentrum des Monomers. Der mit dem Substrat ein Schiff'sche Base Intermediat bildende Aminosäurerest Lysin 85 ist orange angefärbt. C. Sicht auf das aktive Zentrum von FSA. Der Lysinrest, der das Schiff'sche Base Intermediat bildet ist dargestellt in Orange, die benachbarten Aminosäurereste sind nach der Lokalisation im  $(\beta/\alpha)_8$ -Faß eingefärbt, in blau in einer  $\alpha$ -Helix, in lila in einem  $\beta$ -Faltblatt und in rosa in einem Loop (Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome in blau). Bei dieser zweidimensionalen Darstellung entsprechen die Abstände der Aminosäurereste, nicht den tatsächlichen Abständen in der dreidimensionalen Struktur des Enzyms.

Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei FSA um eine Transaldolase handelt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass FSA sowohl den Transfer einer Dihydroxyaceton-einheit als auch die Freisetzung von DHA, in Abwesenheit eines Akzeptors, katalysieren kann (siehe

Abb. I.8) [66]. Damit konnte FSA zu den Aldolasen zugeordnet werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sie ein Schiff'sche Base Intermediat, wie die andere Vertreter der Klasse I Aldolasen bildet. TalB kann DHA nur in Anwesenheit eines Akzeptors von einem Donor übertragen, aber nicht freisetzen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass ein bei der Katalyse beteiligtes Wassermolekül in der Nähe des Schiff'sche Base formenden Lysinrests (TalB: Lys132) bei FSA von drei Aminosäureresten (Glu96, Thr156, Phe178) positioniert wird und bei TalB nur von zwei (Glu96, Thr156) [18, 68]. Dadurch ändert sich neben der Position des Wassermoleküls auch die Nucleophilie und damit vermutlich auch die Stabilität des Schiff'sche Base Intermediates.

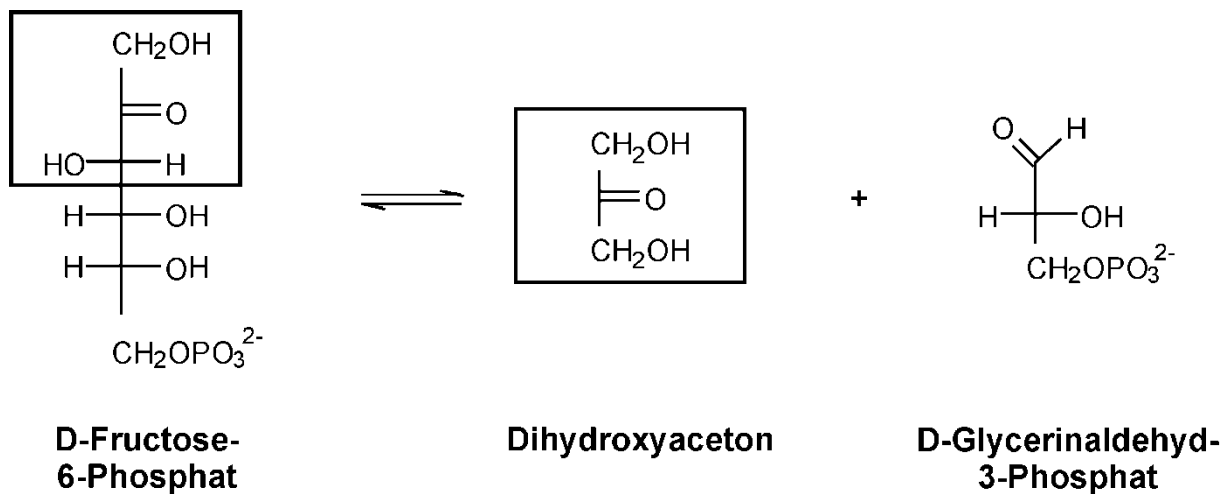


Abb. I.8: Von der Fructose-6-Phosphat Aldolase aus *E. coli* katalysierte reversible Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat in Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

FSA ist bisher die erste Aldolase, die ein breites Donorspektrum besitzt und Dihydroxyaceton, Glycolaldehyd, Hydroxyaceton (HA), und 1-Hydroxy-2-Butanon als Donoren verwenden kann [66, 69, 71]. Neben diesem breiten Donorspektrum zeigt FSA auch ein breites Akzeptorspektrum. Auffällig sind die Aktivitäten, die FSA je nach Donor, mit den gleichen Akzeptoren besitzt. FSA zeigte mit D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Akzeptor und DHA als Donor eine spezifische Aktivität von 45 U/mg [71]. Wohingegen das Enzym mit HA als Donor und dem gleichen Akzeptor nur eine Aktivität von 1 U/mg besitzt [71]. In neueren Untersuchungen von Garrabou *et al.* 2009 [51] wurde mit konstanten Konzentration D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und variierenden Konzentrationen an DHA ein niedrigerer  $V_{max}$ -Wert ( $1,46 \pm 0,05$  U/mg) gemessen werden als mit variierenden Konzentrationen HA ( $33,7 \pm 0,9$  U/mg). Der Unterschied der beiden Ergebnisse könnte damit zusammenhängen, dass bei vorangegangenen Versuchen weniger Akzeptor (D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat) eingesetzt wurde als bei den neueren Untersuchungen. Mit dem unphosphorylierten Akzeptor D-Glycerinaldehyd und HA als Donor (0,1 U/mg) besitzt FSA eine höhere Aktivität als mit DHA als Donor (0,01 U/mg). Es konnte in dieser Studie noch nicht geklärt werden, warum FSA diese Unterschiede zeigt. Eine kürzlich entdeckte herausragende Eigenschaft von FSA ist, dass sie Glycolaldehyd als Donor verwendet [51]. FSA bildet in einer



Aldoladdition aus Glycolaldehyd D-Threose. Die D-Threose kann mit Hydroxyaceton als Donor zu 1-Deoxy-D-ido-hept-2-ulose reagieren. Bietet man FSA neben Glycolaldehyd als Akzeptor, DHA als Donor an wird das erwartete Produkt D-Xylulose, im Gegensatz zu dem was von Schürmann *et al.* 2002 [71] publiziert wurde, nicht gebildet, sondern D-Threose [51, 70]. Diese kontroversen Aussagen hängen mit den unterschiedlichen Nachweismethoden zusammen. Von Schürmann *et al.* 2002 [71] konnte mittels der verwendeten HPLC- und Dünnschichtchromatographie-Methoden D-Xylulose nicht von D-Threose unterschieden werden. Dies wurde erst durch die NMR-Messungen, die von Garrbou *et al.* 2009 [51] durchgeführt wurden nachgewiesen. D-Threose und nicht D-Xylulose wird vermutlich gebildet, weil der  $K_m$ -Wert für DHA ( $32 \pm 2$  mM) höher ist als der für Glycolaldehyd ( $0,197 \pm 0,045$  mM). Der  $K_m$ -Wert für HA ( $17,4 \pm 0,5$  mM) ist wiederum niedriger als der für DHA, weshalb wahrscheinlich 1-Deoxy-D-Xylulose gebildet wird [51].

In einem strukturbasierten Sequenzvergleich der FSA mit Transaldolasen wurde deutlich, dass einige Aminosäuren und Strukturen, die an der Bildung des Schiff'sche Base Intermediates und am Reaktionsmechanismus von Transaldolasen beteiligt sind, in FSA konserviert sind (siehe Tab. I.1, Abb. I.10) [68]. Wie TalB formt FSA eine ( $\beta/\alpha$ )-Fass-Struktur und beide Zentren der jeweiligen Fässer sind sich ähnlich, mit dem Unterschied, dass das Fasszentrum von FSA kompakter ist. Dies ist dadurch zu begründen, dass bei FSA drei  $\alpha$ -Helices fehlen und einige Loops länger sind. Außerdem befindet sich das C-terminale Ende, nicht wie bei TalB am Eingang zum aktiven Zentrum der eigenen Untereinheit, sondern zeigt vom aktiven Zentrum weg und bedeckt das aktive Zentrum der nächstgelegenen Untereinheit.

Wie bereits erwähnt bildet TalB und FSA ein Schiff'sche Base Intermediat. Außerdem überträgt TalB eine Dihydroxyacetoneinheit, FSA verwendet Dihydroxyaceton als Donor. Einige der am postulierten Reaktionsmechanismus beteiligten Aminosäuren von TalB sind in den beiden Enzymen konserviert (siehe Tab. I.1). Von den elf Aminosäureresten, die wahrscheinlich am Reaktionsmechanismus beteiligt sind, sind fünf nicht konserviert.

Der Aminosäurerest Lys132 von TalB bildet mit der Dihydroxyaceton-Einheit ein Schiff'sche Base Intermediat. Es wurde vermutet, dass in FSA Lys85, wie Lys132 in TalB, ein Schiff'sche Base Intermediat mit DHA bildet. Zur Überprüfung wurde das Lysin an der Position 85 in Arginin ausgetauscht. FSA mit dem Austausch Lys85Arg besaß keine meßbare Aktivität mehr [72]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Quartärstruktur von FSA Lys85Arg erhalten blieb und damit nicht für den Aktivitätsverlust verantwortlich war. In TalB ist Arg300 für die Dimerisierung notwendig und ist in FSA nicht konserviert (Ala205). Bei FSA wurden einige der Aminosäuren, die in beiden Enzymen nicht konserviert sind in die Aminosäurereste von TalB ausgetauscht. Ala129 wurde gegen Serin ausgetauscht. Der Austausch führte zu einer deutlichen Erhöhung der Affinität für DHA und D-Fructose-6-

Phosphat und einer deutlichen Erhöhung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit [72]. Die Aminosäure Leu an der Position 107 wurde in Asn ausgetauscht. Der Austausch führt zu einer höheren Affinität für DHA und D-Fructose-6-Phosphat, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit blieb dabei unverändert [72]. Aus diesem Grund ist die Substratspezifität der beiden FSA-Varianten für DHA und D-Fructose-6-Phosphat deutlich höher als bei dem Wildtyp. Bei beiden Austauschen blieben die kinetischen Konstanten für D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat unverändert. Folglich hatten die Austausche eine Auswirkung auf die Bindung der Donoren, DHA und D-Fructose-6-Phosphat, nicht aber auf den Akzeptor, Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Aminosäureaustausche an der Position Tyr131 in Ala und Phe führten zu inaktiven Proteinen [73]. Der Austausch von Gln nach Glu an der Position 59 führte zu einer geringfügigen Verminderung der spezifischen Aktivität [73]. Im Gegensatz zur wildtypischen FSA denaturieren Proteine mit Aminosäureaustauschen an den Positionen Gln59 und Tyr 131, bei hohen Temperaturen [73].

Tab. I.1: Vergleich der Aminosäurereste im aktiven Zentrum von TalB und FSA aus *E. coli*, die wahrscheinlich am Reaktionsmechanismus beteiligt sind und deren Funktion [15, 17-19, 21, 66, 68].

Aminosäurerest in TalB	Aminosäurerest in FSA	Mögliche Funktion der Aminosäurereste
Asp17	Asp6	Im aktiven Zentrum lokalisiert; bildet eine Wasserstoffbrücke mit der C3-OH-Gruppe; am Protonentransfer von der C4-OH-Gruppe und Freisetzung des ersten Produktes beteiligt, sowie an der Protonierung der Aldehyd-Sauerstoffgruppe des Akzeptors und der Bindung des Akzeptorsubstrates
Asn35	Asn28	Im aktiven Zentrum lokalisiert; bildet eine Wasserstoffbrücke mit der C3-OH-Gruppe
Glu96	Gln59	Im aktiven Zentrum lokalisiert; am Protonentransfer beteiligt; bildet in beiden Enzymen eine Wasserstoffbrücke mit einem katalytisch aktiven Wassermolekül und stabilisiert so gemeinsam mit dem Rest Thr156 (TalB) das Carbinolaminintermediat
Lys132	Lys85	Im aktiven Zentrum lokalisiert; Schiff'sche Base Intermediat bildendes Lysin
Asn154	Leu107	Im aktiven Zentrum lokalisiert; bildet eine Wasserstoffbrücke mit der C1-OH-Gruppe; bei FSA mit Leu107 nicht möglich, da es sich hier um eine hydrophobe Seitenkette handelt
Thr156	Thr109	Im aktiven Zentrum lokalisiert; bildet eine Wasserstoffbrücke mit einem katalytisch aktiven Wassermolekül und stabilisiert so gemeinsam mit dem Rest Glu96 das Carbinolaminintermediat
Ser176	Ala129	Im aktiven Zentrum lokalisiert; bildet eine Wasserstoffbrücke mit der C1-OH-Gruppe; bei FSA mit Ala129 nicht möglich, da es sich hier um eine apolare Seitenkette handelt
Phe178	Tyr131	Im aktiven Zentrum lokalisiert; bei FSA bildet der Rest eine Wasserstoffbrücke mit einem katalytisch aktiven Wassermolekül gemeinsam mit den Resten Gln59 und Thr109 und stabilisiert damit wahrscheinlich das Carbinolaminintermediat
Arg181	Arg134	Im aktiven Zentrum lokalisiert; wahrscheinlich an der Phosphatbindung beteiligt
Ser226	Ser166	Im aktiven Zentrum lokalisiert; Substratbindung und wahrscheinlich an der Phosphatbindung beteiligt
Arg228	Lys168	Im aktiven Zentrum lokalisiert; wahrscheinlich an der Phosphatbindung beteiligt
Arg300	Ala205	Für die Dimerisierung in TalB notwendig

Die physiologische Funktion von FSA in *E. coli* ist noch unklar [66]. Aufgrund des breiten Substratspektrums lässt sich keine eindeutige Aussage treffen. FSA konnte in Rohextrakten

von *E. coli* durch immunologische Detektion nicht nachgewiesen werden [66]. Desweiteren wird FSA durch Phosphat mit einem  $K_i$ -Wert von 220  $\mu\text{M}$  inhibiert [72]. Dieser  $K_i$ -Wert liegt weit unter den intrazellulären Phosphatkonzentrationen (5 – 18 mM) von *E. coli* [74]. Damit könnte die Phosphatkonzentration eine regulatorische Wirkung auf FSA ausüben. TalB wird ebenfalls durch Phosphat inhibiert, dessen  $K_i$ -Wert von 20 mM liegt über der physiologischen Konzentration an Phosphat.

FSA ist ein Enzym, mit dem man Vorstufen von Iminocyclitole, polyhydroxylierte Komponenten und seltene Zucker wie D-Threose synthetisieren kann [59, 67, 69-70, 73, 75].

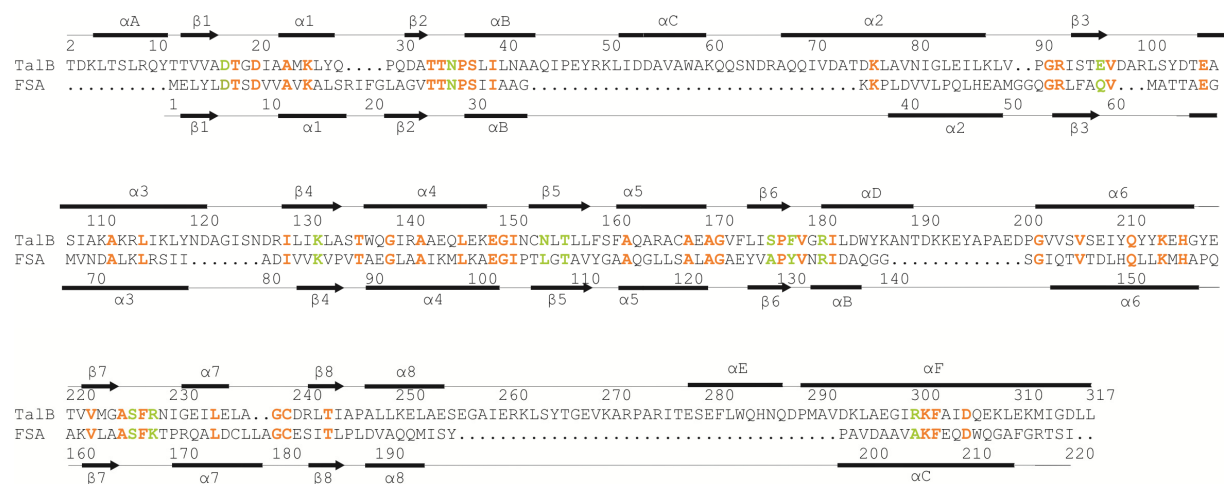


Abb. I.10: Strukturbasierter Sequenzvergleich der Transaldolase B und der Fructose-6-Phosphat Aldolase von *E. coli* (verändert nach [68]). Die sekundären Strukturelemente der TalB sind oberhalb der Sequenzvergleichs, die der FSA unterhalb des Sequenzvergleichs. In Orange sind die Aminosäurereste, die in beiden Enzymen gleich sind, in grün die Aminosäurereste, die am Reaktionsmechanismus von TalB und FSA vermutlich beteiligt sind (siehe Tab. I.1).

## 6. Gerichtete Evolution

In der chemischen und pharmazeutischen Industrie werden für einige komplexe Synthesewege Aldolasen als Katalysatoren eingesetzt [76-77]. Enzyme sind im Gegensatz zu chemischen Synthesewegen meist hoch chemo-, stereo-, regioselektiv und arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen. Darunter versteht man, dass sie bei niedrigeren Temperaturen aktiv sind als viele rein chemische Reaktionen ablaufen, im neutralen Bereich und bei Normaldruck aktiv sind. Zusätzlich kann der Einsatz von Schutzgruppen und Schwermetall-Katalysatoren durch Enzyme wegfallen [47]. Nachteilig bei Enzymen, die in der Biokatalyse eingesetzt werden (z. B. DHAP-abhängige Aldolasen) ist, dass sie meist phosphorylierte Donoren benötigen. Phosphorylierte Substrate sind meist schwierig zu synthetisieren, instabil und damit relativ teuer. Desweiteren entstehen phosphorylierte Produkte, von denen für eine weitere Synthese die Phosphatgruppe wieder abgespalten werden muss, so dass weitere Syntheseschritte notwendig werden.

In der Evolution wird es Organismen aller Arten möglich sich durch spontane nicht gerichtete Mutationen an neue bzw. veränderte Lebensbedingungen anzupassen. Bei der gerichteten Evolution wird ein bestimmtes Ziel verfolgt, das durch Mutagenese und Rekombination eines Gens und anschließender Selektion oder Screening erreicht wird [78-79]. Die gerichtete Evolution wird eingesetzt, um Eigenschaften und Funktionen von Enzyme zu verändern. Dies dient zum Einen dazu Enzyme besser verstehen zu können und zum Anderen deren Substratspezifität und Eigenschaften als Katalysatoren zu verbessern. Dabei wird das Gen, das für das Enzym codiert, durch Mutagenese verändert. Die neuen Enzymvarianten werden dann auf neue Eigenschaften durch spezifische Selektions- oder Screeningmethoden untersucht. Die Anzahl an möglichen Selektions- oder Screeningverfahren ist sehr groß und von der späteren Anwendung der veränderten Enzyme abhängig.

### 6.1. Mutagenesemethoden

Es gibt zahlreiche unterschiedliche Mutagenesemethoden, bei zufälligen Mutagenesemethoden werden Mutationen ungerichtet entweder in einem Chromosom oder einzelnen Gen, durch den Einsatz von chemischen Mutagenen, Bestrahlungen (UV-Licht, Röntgenstrahlung,  $\gamma$ -Strahlung) hervorgerufen. Neben diesen Methoden gibt es zahlreiche Methoden die auf der Polymeraseketten-Reaktion beruhen. Die meisten Mutagenesemethoden lassen sich in nicht-rekombinante (z. B. Sättigungsmutagenese, fehlerhafte Polymerasekettenreaktion) und rekombinante Methoden (DNA-Shuffling, mehrfach unterbrochene Polymerasekettenreaktion) einteilen. Die nicht-rekombinanten Methoden lassen sich weiter in rationale und nicht-rationale Methoden unterteilen. Die rekombinanten Methoden sind in der Regel nicht-rational. Eine Mischform von einer rekombinanten und einer nicht-rekobinanten Mutagenesemethode ist die Deletions-/Insertionsmutagenese [80].

Eine rationale Methode ist die Sättigungsmutagenese bei der die Röntgenstruktur oder NMR-Struktur eines Enzyms als Grundlage verwendet wird, gezielt einzelne Aminosäuren auszuwählen, die für die zu verändernde Eigenschaft zuständig sein könnten. Von der Sättigungsmutagenese gibt es mehrere Varianten. Die Sättigungsmutagenese kann mit Megaprimern [81], überlappender Verlängerungspolymerasekettenreaktion [82], gezielten Austausch in jede der anderen 19 möglichen Aminosäuren erfolgen oder mit der hier beschriebenen Methode durchgeführt werden. Bei dieser Methode werden durch degenerierte Primer Basen eines bestimmten Triplets ausgetauscht, so dass die vorhandene Aminosäure gegen alle anderen 19 möglichen proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht wird (siehe Abb. I.11).

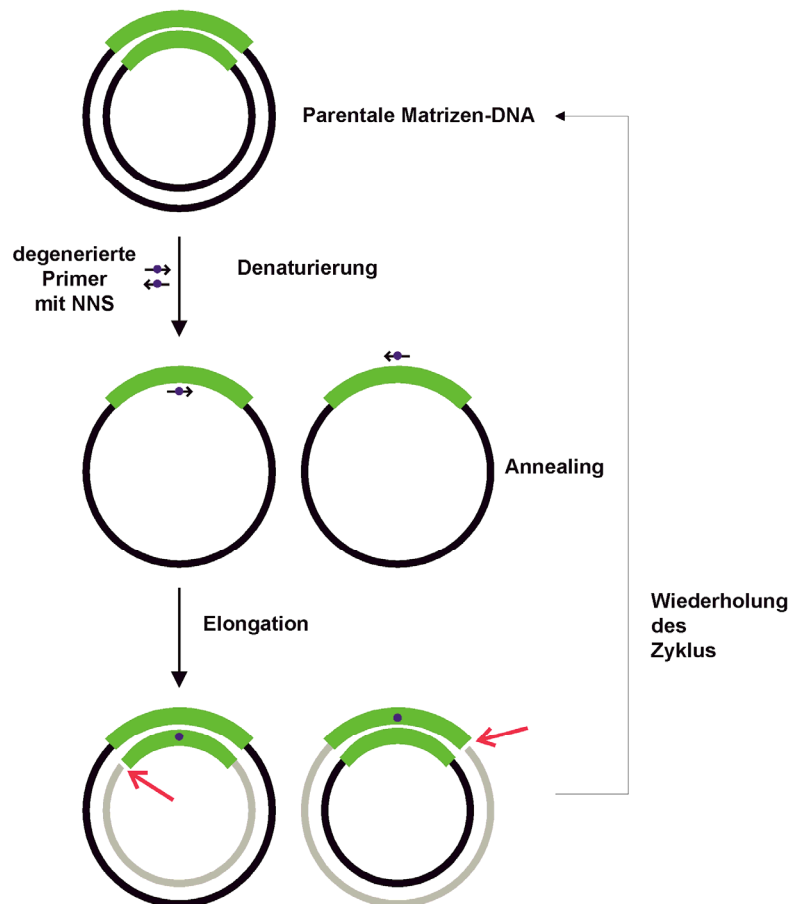


Abb. I.11: Schema der Sättigungsmutagenese (verändert nach [83]). Die parentale Matrizen-DNA (schwarz) wird denaturiert, die Primer mit dem degenerierten Triplet-Motiv NNS (N = G, A, T, C; S = G, C; schwarzer Pfeil mit blauem Punkt) binden an die Matrizen-DNA, das gesamte Plasmid (grau) mit dem Ziel-Gen (grün) wird synthetisiert. Dieser Zyklus wird mindestens 16mal wiederholt. Nach der Sättigungsmutagenese liegen vollständige Plasmide mit unterschiedlichen Codons an einer bestimmten Position vor, die an einem Ende nicht geschlossen sind (rote Pfeile).

Bei dieser Methode wird in nur einer PCR eine Sättigungsmutagenesebank mit bis zu 19 verschiedenen Proteinvarianten gebildet. Für diese Methode benötigt man ein Primerpaar, bei dem das ursprüngliche Triplet gegen ein Triplet-Motiv, wie NNS ausgetauscht ist [84]. Dabei steht N für alle vier möglichen Basen (A, G, C, T) und S für zwei mögliche Basen (C und G), so dass die Anzahl von 64 möglichen Codons, auf 32 Codons reduziert werden kann. Durch die 32 Codons sind alle 19 Aminosäuren möglich. Durch die verminderte Anzahl an möglichen Codons wird die Anzahl an zu überprüfenden Klonen verringert [85]. Ein Programm wie CASTER ([http://www.mpi-muelheim.mpg.de/kofo/institut/arbeitsbereiche/reetz/reetz\\_d.html](http://www.mpi-muelheim.mpg.de/kofo/institut/arbeitsbereiche/reetz/reetz_d.html)) kann bei der Reduktion möglicher Codons und der Planung von degenerierten Primern für die Sättigungsmutagenesebanken helfen [86]. Bei der Sättigungsmutagenese von jeweils einer Position ist von Vorteil, dass die Anzahl zu untersuchender Klone geringer als bei nicht-rationalen Banken [85]. Ein Nachteil ist, dass es Aminosäuren in einem Enzym gibt, die nicht in einem direkten Zusammenhang mit der zu verändernden Eigenschaft stehen und die Veränderung dieser Aminosäuren nicht bedacht

wird. Als Grundlage dieser Methode dient die Proteinstruktur eines Enzyms, die durch NMR-Spektroskopie oder die Röntgenstrukturanalyse bekannt ist [87]. Die Struktur eines Proteins ist aber nicht von allen Enzymen bekannt. Bei einer Variante dieser Methode kann dies dadurch umgangen werden, dass für jede einzelne Aminosäure eines Proteins eine Bank gebildet und untersucht wird [81]. Bei dieser Variante handelt es sich dann um eine nicht-rationale Methode [88-89].

Eine weitere nicht-rationale Methode ist die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion. Generell dient diese Methode dazu, durch eine Polymerasekettenreaktion über das gesamte Gen verteilt Mutationen mit einer bestimmten Mutageneserate einzuführen. Ein Nukleotidaustausch kann entweder durch fehlerhafte Polymerasen, einem Missverhältnis an Desoxynukleotiden, Einsatz von Nukleotidanaloga, Detergenzien oder durch eine erhöhte Mangankonzentration hervorgerufen werden [90-93]. Bei dieser Methode ist von Nachteil, dass sehr viele Klone überprüft werden müssen, um möglichst viele Aminosäureaustausche abzudecken [94]. Von Nachteil ist auch, dass manche Polymerasen den Einbau von bestimmten Nukleotiden bevorzugen [95]. Dies kann jedoch durch neue verbesserte Polymerasen, wie Mutazym II der Firma Stratagene umgangen werden [96]. Nachteil der fehlerhaften Polymerasekettenreaktion ist, dass aufgrund des degenerierten DNA-Codes nicht alle mutierten Codons zu einer veränderten Aminosäure führen und nicht alle Aminosäureaustausche möglich sind. Ein Vorteil ist, dass die Mutationen über das gesamte Gen und damit über das gesamte Protein verteilt sind, ungeachtet dessen Funktion.

Eine weitere nicht-rationale Methode wurde von der der Arbeitsgruppe um U. Schwaneberg entwickelt, die sogenannte SeSaM-Methode (Sequence Saturation Mutagenesis) [97-98]. Diese Methode besteht aus 4 Schritten, im ersten Schritt wird eine Polymerasekettenreaktion mit Desoxynukleotiden, Thiophosphat-Nukleotiden und einem mit Biotin markierten 5'-Primer durchgeführt. Nach dem Einbau eines Thiophosphat-Nukleotids bricht die Elongation ab. Da der Einbau zufällig erfolgt entstehen Produkte mit unterschiedlicher Länge. Anschließend werden nur die Biotin-markierten Fragmente aufgereinigt, diese werden im zweiten Schritt weiterverwendet. Die Thiophosphatether-Bindungen werden mit Jod unter alkalischen Bedingungen gespalten, es entstehen freie 3'-OH-Enden. An diese Enden werden universelle Basen angehängt. Im dritten Schritt wird erneut eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt, so dass das Volllänge-gen entsteht. An den Positionen der universellen Basen wird zufällig eine der vier Desoxynukleotide eingebaut. Der vierte Schritt dient dazu die mutierten Gene zu amplifizieren. Diese müssen dann in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Ein Nachteil ist, dass die Methode sehr aufwendig ist, da sie viele Schritte beinhaltet. Wie bei der fehlerhaften Polymerasekettenreaktion führt ein Nukleotidaustausch nicht immer zu einem Aminosäureaustausch. Auch bei dieser Methode ist von Vorteil, dass die Mutationen zufällig über das ganze Gen verteilt sind.

Zu den rekombinanten Methoden gehört das DNA-Shuffling [99]. Beim DNA-Shuffling werden entweder ähnliche Gene von verschiedenen Organismen kombiniert (Familien-Shuffling) oder es werden einzelne Punktmutationen in einem Gen eingeführt und einzelne Bereiche neu kombiniert. Diese Methode besteht aus mehreren Schritten. Zunächst wird die DNA durch DNaseI fragmentiert. Diese Fragmente dienen anschließend in einer erneuten Polymerasekettenreaktion als Primer. Am Ende der PCR liegt das vollständige neukombinierte Gen oder chimäre Gene von verschiedenen Organismen, mit einzelnen Punktmutationen vor [99]. Diese Methode erfordert wie die meisten PCR-Mutagenesemethoden einen Klonierungsschritt, der die Anzahl an möglichen Klonen reduziert. Ein Nachteil ist, dass der DNaseI-Verdau für jedes Gen, je nach Größe, neu etabliert werden muss und dies relativ viel Zeit beansprucht [100-101].

Eine weitere rekombinante Methode ist die StEP-PCR (staggered-extension) oder mehrfach unterbrochene PCR. Auch bei dieser Methode können verwandte Genfamilien oder Mutanten eines Gens miteinander kombiniert werden [102]. Eine gewöhnliche PCR besteht aus einem Schritt bei dem die Ausgangs-DNA in Einzelstränge denaturiert wird, einem Schritt in dem sich spezifische Primer anlagern (Annealing), gefolgt von der Verlängerung der Primer komplementär zu der Ausgangs-DNA (Elongation) und einem erneuten Denaturierungsschritt. Der Zyklus der Denaturierung, des Anlagerns der Primer und der Elongation wird so lange wiederholt bis genügend DNA-Material synthetisiert ist. Bei der StEP-PCR ist die Elongation stark verkürzt, so dass nur verkürzte Fragmente der Ausgangs-DNA entstehen. Diese dienen in einem erneuten Zyklus als Primer, die sich je nach Länge der Fragmente unspezifisch an die Ausgangs-DNA binden oder zu einer Neukombination von unterschiedlichen Genen führt. Der Zyklus wird so lange wiederholt bis das gesamte Gen entstanden ist. Auf der einen Seite erfolgt diese Methode in weniger Schritten als das DNA-Shuffling, weil der DNaseI-Verdau entfällt, auf der anderen Seite erfordert diese Methode eine exakte Abstimmung und Kontrolle der PCR-Zyklen, um die DNA-Fragmente mit jedem Zyklus verlängern zu können [100].

Die beschriebenen Methoden wurden bereits angewendet, um Aldolasen mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten (siehe Tab. I.2). Die Substratspezifität der N-Acetylneuraminsäure Lyase (NAL) wurde durch Sättigungsmutagenese verändert. Durch Sättigungsmutagenese konnte das Enzym so verändert werden, dass es neben den natürlichen Substraten Pyruvat (Donor) und N-Acetylmannosamin (Akzeptor) länger-kettige und verzweigtere Amine als Akzeptoren verwendet [103-104].

Die Arbeitsgruppe von C. H. Wong nahm die L-Rhamnulose-1-Phosphat Aldolase als Ausgangspunkt für mehrere Runden fehlerhafter Polymerasekettenreaktionen, um eine Aldolase zu erhalten, die nicht DHAP als Donor verwendet, sondern das unphosphorylierte Dihydroxyaceton [54, 88]. Die verschiedenen Varianten wurden in einem Selektionssystem

mit L-Rhamnose als einzige C-Quelle auf die Spaltung dieses unphosphorylierten Zuckers untersucht [54]. In dieser Bank wurde ein Klon mit zwei Aminosäureaustauschen (C142Y, T158S) gefunden, der die reversible Spaltung von L-Rhamnose katalysiert. Dieser Klon katalysiert auch die Kondensation von L-Fructose (siehe Tab. I.2).



Tab. 1.2: Beispiele für gerichtete Evolution von Enzymen [105].

EC	Enzym	Mutagenesemethode	Geänderte Eigenschaft	Ref.
1.14.14.1	Cytochrom P450 BM-3 ( <i>B. megaterium</i> )	epPCR	Erhöhung der Stabilität in organischen Lösungsmitteln	[106]
		Sättigungsmutagenese	Aktivität	[107]
3.2.1.31	$\beta$ -Glucuronidase ( <i>E. coli</i> )	Sättigungsmutagenese DNA-Shuffling StEP	Substratspezifität	[108]
3.3.2.3	Epoxid-Hydrolase ( <i>Aspergillus niger</i> )	epPCR	Enantioselektivität	[109]
3.4.4.16	Subtilisin ( <i>B. subtilis</i> )	epPCR	Aktivität in organischen Lösungsmitteln	[91]
3.5.5.1	l-Asparaginase ( <i>Erwinia chrysanthemi</i> , <i>Erwinia carotovora</i> )	StEP	Thermostabilität	[110]
4.1.2.13	Fructose-1,6- Bisphosphat Aldolase ( <i>E. coli</i> )	DNA-Shuffling	Thermostabilität Stabilität in organischen Lösungsmitteln	[111]
4.1.2.14	2-Keto-3-deoxy-6- phosphonoglukonat Aldolase ( <i>E. coli</i> )	epPCR DNA-Shuffling	Enantioselektivität	[112]
4.1.2.19	L-Rhamnulose-1- Phosphat Aldolase ( <i>E. coli</i> )	epPCR	Substratspektrum	[54, 88]
4.1.2.40	Tagatose-1,6- Bisphosphat Aldolase ( <i>E. coli</i> )	DNA-Shuffling	Stereospezifität	[88]
4.1.3.3	N-Acetylneuramin- säure Aldolase ( <i>E. coli</i> )	epPCR	Enantioselektivität	[113]
		DNA-Shuffling Sättigungsmutagenese	Substratspezifität	[114]
		Sättigungsmutagenese	Substratspektrum	[103- 104]
5.3.1.16	HisA* ( <i>Thermatoga maritima</i> )	epPCR gerichtete Sättigungsmutagenese	Substratspezifität	[115]

\*HisA = N'-[(5'-Phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid Ribonucleotid (ProFAR) Isomerase; TrpF = Phosphoribosylanthranilat (PRA) Isomerase

Durch drei Runden DNA-Shuffling der Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase, die natürlicherweise Tagatose-1,6-Bisphosphat aus DHAP und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat

bildet wurde das Enzym so verändert, dass es Fructose-1,6-Bisphosphat und Tagatose-1,6-Bisphosphat in einem Verhältnis von 4:1 bildet [88].

## 6.2. Selektions- und Screeningsysteme

Selektions- und Screeningsysteme unterscheiden sich grundlegend voneinander. Durch Selektionssysteme werden die Wachstumsbedingungen für Bakterienstämme, in die Mutagenesebanken transformiert wurden, so gewählt, dass nur die Klone mit der gewünschten Eigenschaft einen Wachstumsvorteil besitzen. Damit werden nur die Klone mit den gewünschten aktiven Enzymen erhalten. Der größte Vorteil von Selektionssystemen ist, dass eine große Anzahl von bis zu  $10^{10}$  Klonen untersucht werden können [116]. Die Anzahl der Klone ist dabei von der Anzahl der Transformanten abhängig [117]. *In vivo* Systeme sind dann von Nachteil, wenn Enzyme gesucht werden, die unter nicht natürlichen Bedingungen arbeiten, wie zum Beispiel in organischen Lösungsmitteln [91]. Bei Selektionssystemen zu vermeiden sind sogenannte falsch-positive Klone. Falsch-positive Klone sind Klone, die trotz des Selektionsdrucks wachsen, die aber nicht in dem Zielgen verändert sind, sondern die aufgrund von alternativen Strategien ein Wachstum zeigen [118].

Bei der Verwendung von Screeningssystemen wird eine möglichst große Anzahl an Klonen einzeln auf die gewünschte Eigenschaft untersucht [116, 119]. Anhand eines Hochdurchsatz-Screening kann eine große Anzahl an verschiedenen Klonen durch automatisierte Methoden mit einem Pick-Roboter auf neue Eigenschaften untersucht werden. Das Screeningssystem muss einigen Anforderungen entsprechen. Es sollte für das zu testende Enzym spezifisch sein und keine Neben- und Hintergrundaktivitäten aufweisen. Das zu verwendende Substrat muss unter Testbedingungen stabil sein. Der Test sollte schnell durchzuführen sein.

Eine der am häufigsten verwendeten Screeningmethoden ist die, bei der ein UV/Vis- oder Fluoreszenzsignale durch eine neue Enzymaktivität gebildet wird. Für Transaldolasen und verwandte Enzyme wurden drei fluorogene Substrate (6-O-Coumarinyl-D-Fructose, 6-O-Coumarinyl-5-Deoxy-D-threo-Hexulose, 6-O-Coumarinyl-5-Deoxy-D-erythro-Hexulose) für ein mögliches Screening auf invertierte Stereoselektivität, gefunden [120]. Bei der Spaltung dieser Substrate entsteht das blau-fluoreszierende Umbelliferon. Ein Problem ist, dass für ein Screening große Mengen an Substrat bereitgestellt werden muss und diese fluoreszierenden Verbindungen nicht käuflich zu erwerben sind.

Enzymatische Methoden beruhen auf der Idee, dass die nach einer enzymatischen Reaktion freiwerdenden Produkte, in einer Nebenreaktion von mindestens einem weiteren Enzym umgesetzt werden. Dabei entstehen nachweisbare Produkte, die entweder über die Ab- oder Zunahme von NAD(P)H oder der Entstehung eines Farbstoffes verfolgt werden können [121]. Tetrazoliumsalze wie Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT) können über die Produktion von NADPH und einer Dehydrogenase zu lilafarbenem Formazan reduziert werden. Die Reaktion ist irreversibel und kann visuell beobachtet werden. Mittels eines NBT/Phenazin-Methosulfat-Screenings wurden 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Varianten mit einer höheren Aktivität und höheren Thermostabilität gefunden [122].

## Zielsetzung

Die Transaldolase B von *Escherichia coli* ist ein Enzym des Pentose-Phosphat-Weges und knüpft bei der Übertragung einer Dihydroxyacetoneinheit von einem Donor auf einen Akzeptor eine neue C-C-Bindungen mit einer 3S, 4R-Konfiguration [15-16]. TalB besitzt ein breites Substratspektrum und verwendet neben phosphorylierten Zuckern auch nicht-phosphorylierte Zucker, wenngleich mit einer niedrigeren Affinität und Aktivität.

In der Biokatalyse werden DHAP-abhängige Aldolasen (DHAP Dihydroxyacetonphosphat) zur Synthese von Zuckeranaloge wie z.B. <sup>13</sup>C-markierten Zucker, Deoxyzucker, Fluorozucker und Iminocyclitole eingesetzt [123]. DHAP-abhängige Aldolasen sind sehr donorspezifisch, d.h. verwenden als Donor nur DHAP. DHAP besitzt für die Biokatalyse nachteilige Eigenschaften, da es instabil, schwierig zu synthetisieren und relativ teuer ist. Von Nachteil ist auch, dass phosphorylierte Produkte entstehen, deren Phosphatgruppe für weitere Syntheseschritte stört und meist entfernt werden muss [47, 62]. Dihydroxyaceton (DHA) ist billig und unphosphoryliert. Ein Enzym, das DHA als Donor verwendet wäre für die Biokatalyse von Vorteil. Fructose-6-Phosphat Aldolase (FSA) von *E. coli* ist ein Enzym, das unter anderem DHA als Donor verwendet [66, 71-72] und mit dem z.B. D-Fagomin synthetisiert worden ist [67, 75]. Durch Mutagenese könnte FSA für eine breitere biokatalytische Anwendung verändert werden. Ein Vorteil von FSA ist, dass es bei einer Hitzefällung im Überstand verbleibt und einfach für Synthesen angereichert werden kann [67, 73]. Von Nachteil ist, dass FSA-Varianten (FSA Q59E, FSA Y131A, FSA Y131F), die eventuell zur Synthese eingesetzt werden könnten, bei einer Hitzefällung denaturieren. N- und C-terminale His-Tags führen bei FSA zu einer verminderten Aktivität, somit ist eine Ni-NTA-Affinitätsreinigung keine Alternative für eine schnelle Aufreinigung von FSA-Varianten. Deswegen wurde nach einem Enzym gesucht, das wie FSA DHA verwendet und einfach z.B. über einen His-Tag angereichert werden kann. TalB, das eine Dihydroxyacetoneinheit überträgt, könnte ein solches Enzym sein bzw. so verändert werden, dass neue TalB-Varianten DHA als Donor verwenden.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich TalB eignet, um durch Mutagenese so verändert zu werden, dass neue einfach anzureichernde TalB-Muteine eine veränderte Substratspezifität besitzen, um so aus DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, D-Fructose-6-Phosphat zu bilden. Da phosphorylierte Substrate für viele Syntheseschritte von Nachteil sind sollte untersucht werden, ob durch Mutagenese Muteine entstehen können die nur unphosphorylierte Zucker enthalten. Außerdem sollte untersucht werden, ob es möglich ist ein Enzym so zu verändern, dass es Produkte mit einer anderen Stereokonfiguration bildet als normal üblich. Diese Untersuchungen könnten zum Verständnis von Struktur- und Funktionsbeziehungen von Transaldolasen und Aldolasen beitragen und einen Beitrag zur Enzymevolution leisten.



## II. Material und Methoden

### 1. Chemikalien, Enzyme, Materialien

ABgene (Hamburg)	Adhesive PCR-Film für Microtiterplatten
Amersham Bioscience/GE Healthcare (München)	Chromatographiesäulen und –materialien, Gelfiltrationskalibrierungskits: ‚High / Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit‘, PVDF-Blottingmembran
Biomers (Ulm)	Oligonukleotide
BIOMOL (Hamburg)	Glycylglycin
Biorad Laboratories (München)	Protein-Molekulargewichtsstandard
Brand (Radebeul)	Gasdurchlässige Verschlussfolie
Gerbu (Gaiberg)	IPTG, NAD <sup>+</sup> , NADH, NADP <sup>+</sup> , DTT
Genaxxon (Biberach)	DNA-Polymerasen, dNTPs
Greiner Bio-One (Frickenhausen)	96-Deepwellplatten, 96-Well Microtiterplatten
Operon (Köln)	Oligonukleotide
Macherey + Nagel (Düren)	NucleoSpin Kit II
MBI Fermentas (St. Leon-Rot)	DNA-Größenstandard, Restriktionsenzyme
Millipore (Bedford, USA)	Mikrofiltration Membranen
New England Biolabs (Frankfurt a. M.)	Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Quick Ligation Kit
Nordzucker (Nordstemmen)	Gaio Tagatose (kostenlose Probe von Nordzucker)
Qiagen GmbH (Hilden)	‘QIAquick Gel Extraction Kit‘, Ni-NTA-Matrix
Roche (Mannheim)	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase / Triosephosphatisomerase, Glucose-6-Phosphat Isomerase, Phosphoglucoseisomerase
Roth (Karlsruhe)	Agar, Antibiotika, Acrylamid-Bisacrylamid, Coomassie Brilliant Blue R/G 250, DNaseI, Hefe-Extrakt, Pufferbestandteile, Trypton, Glycerin, D-Fructose, Magermilchpulver
Sarstedt (Nümbrecht)	Halb-Mikro-Küvetten
Sigma /Fluka (Taufkirchen)	Dihydroxyaceton, D-Erythrose-4-Phosphat, D-Fructose-6-Phosphat, D,L-Glycerinaldehyd, D-Glycerinaldehyd, D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Glycolaldehyd, Hydroxyaceton, Tagatose, Sorbose, Psicose, Antikörper Anti-

	Meerschweinchen-AP, Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase / Triosephosphatisomerase
Stratagene (Amsterdam, Niederlande)	GeneMorph <sup>®</sup> II Random Mutagenesis Kit, QuikChange <sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit, PfuUltra <sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase, XL1-Blue Supercompetent Cells
Sartorius (Goettingen)	Vivascience Vivaspin Zentrifugationseinheiten

## 2. Geräte

Agarosegelkammer	Wide Midi – SUB, Biorad Laboratories, Richmond, USA Mini – SUB, Biorad Laboratories, Richmond, USA
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell, Biorad Laboratories, Richmond, USA Trans-Blot Cell, Biorad Laboratories, Richmond, USA
FPLC	ÄKTapurifier, Amersham Bioscience/GE Healthcare, München FPLC-System von Pharmacia Amersham Bioscience/GE Healthcare, München
Geltrockner	SLAB Dryer Model 483, Biorad Laboratories, Richmond, USA
HPLC	Waters HPLC System, Eschborn
Kühlgeräte	AEG Arctis, Nürnberg Liebherr ProfiLine, Biberach an der Riss Ultra Low Temperature Freezer, New Brunswick Scientific, Nürtingen
Magnetrührer	Heidolph MR2000, Schwabach Heidolph MR2002, Schwabach
Mikrotitenplatten- schüttler	MS1 Minishaker, KA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Netzgeräte	Powerpack P21, Biometra, Göttingen Power Pac300, Biorad Laboratories, Richmond, USA
PCR-Geräte	Biometra TGradient, Göttingen
pH-Meter	Microprocessor pH Meter p535 MultiCal WTW, Sartorius, Göttingen
Photometer	Cary 50 Bio UV-Visible Spektrophotometer, Varian, Darmstadt Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotometer, Varian, Darmstadt Nanodrop ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen Spectra Max Plus, Molecular Devices, Ismaning / München
Schüttler	Inkubationsschüttler, Infors HT, Einsbach
SDS-PAGE- Elektrophoresekammer	Biorad Laboratories, Richmond, USA
Thermoschüttler	Schutron Thermoshaker, CLF Laborgeräte, Emersacker
Ultraschallgeräte	Bandelin, Sonoplus HD 200, Berlin
Vortexgeräte	Whirli Mixer <sup>™</sup> FISON'S Scientific Equipment, Suffolk
Waagen	Sartorius research balance, Göttingen Sartorius L2200, Göttingen
Wasserbad	Inkubations- / Inaktivierungsbad 1002 und 1003, GFL -



Zentrifugen

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Eppendorf Centrifuge 5415C

Eppendorf Centrifuge 5417C

Hettich MIKRO 22R

Beckman, Avanti J-25, Krefeld

Beckman Coulter GmbH, Optima LE-80K, Krefeld

Sigma 4K10, Osterode

Sigma 3K-1, Osterode

### 3. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3.1 aufgeführt, die verwendeten Plasmide in Tabelle 3.2.

Tab. II.1: Verwendete *E. coli*-Stämme und deren genetische Marker

Bakterienstämme	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>F</i> , $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)U169$ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	[124]
BL21 (DE3) pLysS Star	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3), <i>pLysS</i> ( <i>Cam</i> <sup>R</sup> )	Invitrogen, Karlsruhe
LJ110	Wildtyp (W3110), prototroph	[125]
LJ110 (DE3) <i>talA</i> <sup>-</sup> , <i>talB</i> <sup>-</sup>	alias W3110, wild-type K-12, prototroph, DE3, <i>talA</i> <sup>-</sup> , <i>talB</i> <sup>-</sup> (Deletion durch die Methode von Datsenko & Wanner 2000 eingeführt [126])	Samland & Sprenger unveröffentlicht
LJ110 (DE3) <i>talA</i> <sup>-</sup> , <i>talB</i> <sup>-</sup> , <i>pLysS RARE2</i>	alias W3110, wild-type K-12, prototroph, <i>dcm</i> (DE3), <i>talA</i> <sup>-</sup> , <i>talB</i> <sup>-</sup> , <i>pLysS RARE2</i> [127]	[128]
Rosetta (DE3) pLysS RARE2	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> ( $r_B^-$ $m_B^-$ ) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) <i>pLysSRARE2</i> ( <i>Cam</i> <sup>R</sup> )	Novagen, Darmstadt
XL1Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> <i>hsdR17</i> ( $r_B^-$ , $m_B^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> <i>lac</i> [ <i>F'</i> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lac</i> <sup>I</sup> $\Delta ZM15::Tn10$ ( <i>tet</i> <sup>R</sup> )]	Stratagene, Amsterdam, NL

Tab. II.2: Plasmid-DNA und ihre Eigenschaften

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pET16b	$P_{T7}$ , $Amp^R$ , $ori_{pBR322}$ , $lacI$ , $N$ -term. $10xHis$	Novagen, Darmstadt
pET28a	$P_{T7}$ , $Kan^R$ , $ori_{pBR322}$ , $ori f1$ , $lacI$ , $T7$ Tag, $N$ -term. $6xHis$ , $C$ -term. $6xHis$	Novagen, Darmstadt
pJF119EH	$P_{tac}$ , $Amp^R$ , $lacI$	[129]
pJF119 $Kan^R$	alias pJF119EH mit zusätzlicher $Kan^R$ - Kassette ( $XbaI/XhoI$ )	Samland und Lakner unveröffentlicht
pGEXTN*	alias pGEX4T2: $P_{tac}$ , $Amp^R$ , $ori_{pBR322}$ , $lacI^q$ , $N$ -term GST-Tag mit Tev- Spaltungsstelle zwischen dem GST- Tag und dem ORF (Tev Erkennungsstelle: ENLY FQ↓G; Größe des GST-Tag: 234 AA, 27kDa, $NdeI$ Restriktionsenzymeschnittstelle anstatt einer $NcoI$ Schnittstelle	[128]
pLysS RARE2	$lacI$ , $Cam^R$ , $p15a$ ori, $tRNA$ genes: $proL$ , $leuW$ , $metT$ , $argW$ , $thrT$ , $glyT$ , $tyrU$ , $thrU$	Novagen, Darmstadt [127]
pET9tev	tev Gen (741 bp) in pET9d ( $NcoI/BamHI$ )	[130]
pET16fsa	fsa Gen (717bp) kloniert in pET16b ( $NcoI/NdeI$ )	[72]
pET28gatD	gatD Gen (1020 bp) in pET28a ( $NdeI/EcoRI$ )	Samland unveröffentlicht
pET28gldA	gldA Gen (1104 bp) aus <i>E. coli</i> LJ110 (DE3) in pET28a ( $NdeI/BamHI$ )	K. Ullrich unveröffentlicht
pET28talB	talB Gen (951bp) kloniert in pET28a ( $NdeI/XhoI$ )	[128]
pGEXTN* $hTal$	taldo1 cDNA mit N-term. GST-Tag (1717 bp) kloniert in pGEXTN* ( $NdeI/SmaI$ )	[128]
pGEXTN* $hTalF189Y$	taldo1F189Y cDNA mit N-terminalem GST-Tag (1716 bp)	[128]
pBM20frk	frk Gen (906 bp) aus <i>Zymomonas</i> <i>mobilis</i> in pUCBM20 ( $KpnI/BamHI$ )	[8]

pJF119 <i>fsa</i>	<i>fsa</i> Gen (663bp) kloniert in pJF119EH ( <i>XbaI/HindIII</i> )	T. Inoue [73]
pJF119 <i>frk</i>	<i>frk</i> Gen aus <i>Zymomonas mobilis</i> in pJF119EH ( <i>KpnI/BamHI</i> )	N. Trachtmann, unveröffentlicht
pJF119 <i>talB</i>	<i>talB</i> Gen von <i>E. coli</i> W3110 von pET28 <i>talB</i> in pJF119EH ( <i>NdeI/XhoI</i> )	[128]
pJF119 <i>talBF178Y</i>	<i>talBF178Y</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	[128]
pJF119 <i>talBF178M</i>	<i>talBF178M</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Stopp</i>	<i>talBF178Stopp</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226R</i>	<i>talBS226R</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226C</i>	<i>talBS226C</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226E</i>	<i>talBS226E</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226G</i>	<i>talBS226G</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226H</i>	<i>talBS226H</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226K</i>	<i>talBS226K</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226F</i>	<i>talBS226F</i> Gen mit C-term. 6xHis (1001bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226T</i>	<i>talBS226T</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226Y</i>	<i>talBS226Y</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pET16 <i>talBS226Stopp</i>	<i>talBS226Stopp</i> Gen mit C-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181A</i>	<i>talBF178Y/R181A</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit

---

pJF119 <i>talBF178Y/R181D</i>	<i>talBF178Y/R181D</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181E</i>	<i>talBF178Y/R181E</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181G</i>	<i>talBF178Y/R181G</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181N</i>	<i>talBF178Y/R181N</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181P</i>	<i>talBF178Y/R181P</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181S</i>	<i>talBF178Y/R181S</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit
pJF119 <i>talBF178Y/R181T</i>	<i>talBF178Y/R181T</i> Gen mit N-term. 6xHis (1011bp)	diese Arbeit

Tab. II.3: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung, Mutagenese und Sequenzierung. Die entsprechenden Aminosäureaustausche bzw. degenerierten Primermotive (N = G, A, T, C; S = G, C) sind in fett gedruckt, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotide	Oligonukleotidsequenzen (5' → 3')
GATC-T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
GATC-pET-RP	CTA GTT ATT GCT CAG CGG
hTal5'	GGA ATT <u>CCA TAT GTC</u> GAG CTC ACC CGT G
hTal3'	CTA CTT TCC ATT CTC TGC ATT G
hTalF189Y 5'	CAT CTC CCC ATA CGT TGG GCG CAT CCT TGA TTG GCA TG
hTalF189Y 3'	GCG CCC AAC GTA GGA GAT GAG GGT CAC ACC CGC
TalBepPCR 5'	CAG GAA ACA GAA TTC GAG CTC GGT ACC
TalBepPCR 3'	CTT CCT TTC GGG CTT TGT TAG CAG CCG
TalBseq 3'	CCG GAT ATA GTT CCT CCT TTC AGC
TalB 5' <i>NdeI</i>	G GAA TTC <u>CAT ATG</u> ACG GAC AAA TTG ACC TCC C
TalB 3' Stop <i>XhoI</i>	CC <u>GCT CGA GTT</u> ACA GCA GAT CGC CGA TCA T
TalBS94 5'	GTT CCG GGC CGT ATC NNS ACT GAA GTT GAT GCG
TalBS94 3'	CGC ATC AAC TTC AGT SNN GAT ACG GCC CGG AAC
TalBE96 5'	GGC CGT ATC TCA ACT NNS GTT GAT GCG CGT CTT
TalBE96 3'	AAG ACG CGC ATC AAC SNN AGT TGA GAT ACG GCC
TalBS135 5'	CTG ATC AAA CTG GCT NNS ACC TGG CAG GGT ATC
TalBS135 3'	GAT ACC CTG CCA GGT SNN AGC CAG TTT GAT CAG

---

TalBN154 5'	GAA GGC ATC AAC TGT NNS CTG ACC CTG CTG TTC
TalBN154 3'	GAA CAG CAG GGT CAG SNN ACA GTT GAT GCC TTC
TalBL157 5'	AAC TGT AAC CTG ACC NNS CTG TTC TCC TTC GCT
TalBL157 3'	AGC GAA GGA GAA CAG SNN GGT CAG GTT ACA GTT
TalBF159 5'	AAC CTG ACC CTG CTG NNS TCC TTC GCT CAG GCT
TalBF159 3'	AGC CTG AGC GAA GGA SNN CAG CAG GGT CAG GTT
TalBS176 5'	GC GTG TTC CTG ATC NNS CCG TTT GTT GGC CGT
TalBS176 3'	ACG GCC AAC AAA CGG SNN GAT CAG GAA CAC GC
TalBF178 5'	TTC CTG ATC TCG CCG NNS GTT GGC CGT ATT CTT
TalBF178 3'	AAG AAT ACG GCC AAC SNN CGG CGA GAT CAG GAA
TalBG180 5'	ATC TCG CCG TTT GTT NNS CGT ATT CTT GAC TGG
TalBG180 3'	CCA GTC AAG AAT ACG SNN AAC AAA CGG CGA GAT
TalBS220 5'	GAG CAC GGT TAT GAA NNS GTG GTT ATG GGC GCA
TalBS220 3'	TGC GCC CAT AAC CAC SNN TTC ATA ACC GTG CTC
TalBS226 5'	GTG GTT ATG GGC GCA NNS TTC CGT AAC ATC GGC
TalBS226 3'	GCC GAT GTT ACG GAA SNN TGC GCC CAR AAC CAC
TalBR228 5'	ATG GGC GCA AGC TTC NNS AAC ATC GGC GAA ATT
TalBR228 3'	AAT TTC GCC GAT GTT SNN GAA GCT TGC GCC CAT
TalBF178YR181 5'	CG CCG TAC GTT GGC NNS ATT CTT GAC TGG TAC
TalBF178YR181 3'	GTA CCA GTC AAG AAT SNN GCC AAC GTA CGG CG

---

4. Nährmedien und Antibiotika

Luria-Bertani (LB) Medium wurde für die Kultivierung von *E. coli* Zellen auf Agarplatten verwendet. Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden je nach Bedarf Antibiotika unter sterilen Bedingungen zugegeben Tabelle 4.1.

Nährmedien:

LB-Medium [131]	Trypton	1 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
LB-Agar [131]	Trypton	1 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
	Agar	1,5 % (w/v)
NZY <sup>+</sup> -Medium [83]	Trypton	1 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
	MgCl <sub>2</sub>	12,5 mM
	MgSO <sub>4</sub>	12,5 mM
	Glukose	20 mM
2YT-Medium [132]	Trypton	1,6 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	1 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
2YT-Medium [132] zur Stammhaltung	Trypton	1,6 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	1 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
	Glycerin	10 % (w/v)

Tab. II.4: Verwendete Antibiotika und deren Konzentration

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in Ethanol	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser	50 µg/ml

5. Puffer und Lösungen

Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliant Blue G250	0,1 % (w/v)
	Ethanol <sub>tech.</sub>	5 % (v/v)
	o-Phosphorsäure	10 % (v/v)
Coomassie-Färbung:		
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0,1 % (w/v)
	Isopropanol	10 % (v/v)
	Essigsäure	20 % (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	20 % (v/v)
Größenausschluss- chromatographie:		
Superdex 200pg	Glycylglycin pH 8.5	50 mM
	NaCl	150 mM
	DTT	1 mM
HEPES-Puffer	HEPES pH 8.0	50 mM
	DTT	1 mM
Kompetente Zellen:		
Puffer A	CaCl <sub>2</sub>	100 mM
Puffer B	CaCl <sub>2</sub>	100 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
Glycylglycin-Puffer	Glycylglycin	50 mM
Proteinreinigung:		
TalB/GatD/GldA		
Affinitätschromatographie:		
Ni-NTA-Reinigung (ÄKTA)		
Puffer A	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
Puffer B	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	500 mM
Ni-NTA-Reinigung (Gravitation):		
Puffer A	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Puffer A + Imidazol pH 8.0	10 mM
Puffer B	Puffer A + Imidazol pH 8.0	25 mM



Puffer C	Puffer A + Imidazol pH 8.0	50 mM
Puffer D	Puffer A + Imidazol pH 8.0	250 mM
Puffer E	Puffer A + Imidazol pH 8.0	500 mM
Puffer F		

hTal

Affinitätchromatographie:

GST-Reinigung:

Puffer A:

PBS 10x (Waschpuffer)	NaCl pH 7.4	1,5 M
	KCl	30 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mM

Puffer B:

Elutionspuffer	Tris-HCl pH 8.0	50 mM
	Glutathion reduziert	10 mM

FSA

Anionenaustauscher:

Q-Sepharose HP (16/10)

Puffer A	Glycylglycin pH 8.0	50 mM
	DTT	1 mM
Puffer B	Puffer A	
	NaCl	1 M

Frk

Anionenaustauscher:

Q-Sepharose HP (16/10)

Puffer A	Tris-HCl pH 7.5	20 mM
	DTT	1 mM
Puffer B	Puffer A	
	NaCl	1 M

SDS-PAGE:

SDS-Laufpuffer 10x	Glyzin	2 M
	SDS	1 % (w/v)
	Tris	0,25 M

## Material und Methoden

---

Probenpuffer 10x	SDS	2 % (w/v)
	Glycerin	10 % (v/v)
	Tris	60 mM
	Bromphenolblau pH 6.3	0,02 % (w/v)
	DTT	5 % (w/v)
Trenngelpuffer	Tris-HCl pH 8.8	1,5 M
Sammelgelpuffer	Tris-HCl pH 6.8	0,5 M
Sonstige-Puffer:		
Tal-Puffer	Glycylglycin pH 8.5	50 mM
	DTT	1 mM
TAE-Puffer 50x	Tris	2 M
	Essigsäure	5,7 % (v/v)
	EDTA pH 8.0	50 mM
Westernblot:		
AP-Puffer	Tris-HCl pH 9.5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Blockpuffer	NaCl pH 7.5	0,9 % (w/v)
	Tris-HCl	10 mM
	Magermilchpulver	3 % (w/v)
Blotpuffer	Methanol	15 % (v/v)
	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
Waschpuffer	NaCl pH 7.5	0,9 % (w/v)
	Tris-HCl	10 mM
	Magermilchpulver	0,3 % (w/v)

## 6. Molekulargenetische Methoden

### 6.1. Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigkultur unter Schütteln bei 145 rpm [131].

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 58 % (v/v) einer Übernachtskultur und aus 42 % (v/v) sterilem Glycerin bestanden. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -70°C.

### 6.2. Isolierung, Restriktion und Modifikation von DNA

#### Isolierung und Reinigung von DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem ‚NucleoSpin Kit II‘ von Macherey + Nagel (siehe II.1.). Zum Umpuffern von DNA-Lösungen, wie Restriktionsansätze und zur Reinigung von PCR-Ansätzen aus Agarosegelen wurde das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ von Qiagen (siehe II.1.) verwendet.

Die Größentrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung nach Sambrook et al. [131]: Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit Nanodrop ND-1000 (siehe II.2.).

#### Restriktion und Ligation von DNA

Restriktionsansätze umfassten mindestens ein Volumen von 10 µl und wurden für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Für einen analytischen Ansatz wurden 200 ng – 1 µg DNA und für einen präparativen Ansatz bis zu 6 µg DNA eingesetzt. Die Menge an verwendeten Enzymen betrug ~ 5 U/µg DNA. Die Ligation der DNA wurde wie vom Hersteller, New England Biolabs, beschrieben entweder mit T4 DNA Ligase oder mit dem ‚Quick Ligation Kit‘ durchgeführt.

### 6.3. Transformation von Zellen

#### Herstellung von kompetenten Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurden 100 ml LB-Medium (siehe II.4.) 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (145 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,38 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Eis für 10 min abgekühlt und anschließend zentrifugiert (3000 rpm / 10 min / 4°C). Die Bakterien wurden in 10 ml eiskaltem Puffer A (siehe II.5.) resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis

inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (3000 rpm / 10 min / 4°C). Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem Puffer B (siehe II.5.) aufgenommen und für mindestens 2 h auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 200 µl Aliquots aufgeteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### Transformation von Zellen

Die Transformation von Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden die kompetenten *E. coli* Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50 / 100 µl kompetente *E. coli* mit 50 – 200 ng Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad, gefolgt von einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl NZY<sup>+</sup>-Medium (siehe II.4.) wurde dieser zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikumresistenz für maximal eine 1 h bei 37°C geschüttelt (145 rpm). Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert (siehe II.4.).

## 6.4. Polymerase-Kettenreaktion

### Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, [133]) wurde genutzt, um einzelne Kolonien einer Klonierung auf Präsenz eines Plasmid mit gewünschter Gengröße zu überprüfen. Der zu überprüfende Bereich wird dabei von zwei Primern mit bekannter DNA-Sequenz begrenzt. Wenige Zellen einzelner zufällig ausgewählter Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher, von einer Agarplatte in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und anschließend wurde folgender PCR-Ansatz (12.5 µl) zugegeben:

- 1 Kolonie
- 1x Polymerasepuffer
- 0,8 µM TalBepPCR 5'
- 0,8 µM TalBepPCR 3'
- 96 µM dNTP Gemisch
- 0,5 U Taq-Polymerase

### Sättigungsmutagenese und Einzelaustausch von Aminosäuren

Für die Sättigungsmutagenese wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit oder PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase von Stratagene verwendet. Als Grundlage für diese PCR diente doppelsträngige dam-methylierte DNA. Die eingesetzten Primerpaare sind

zueinander komplementär, mindestens 32 bp lang und tragen in der Mitte, an der zu mutierenden Stelle, ein Triplet mit dem Basenmotiv NNS (N = G, A, T, C; S = G, C). Dieses randomisierte Codonmotiv ermöglicht den Einbau aller 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren an einer bestimmten Position im Protein. Mit der PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase wurde das vollständige Plasmid amplifiziert. Die PCR wurde wie von Stratagene beschrieben durchgeführt.

Nach der PCR wurden die Plasmide, die als Matrize gedient haben, mit DpnI, das nur dam-methylierte DNA schneidet, verdaut. Die Ansätze wurden in chemisch kompetente XL1-Blue Zellen von Stratagene transformiert. Zur Überprüfung der Mutageneserate und damit der Qualität der Banken wurde von einzelnen Banken mindestens 10 Klonen zufällig gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert (siehe II.6.2.) und kommerziell sequenziert (siehe II.6.5.).

Zur Stammhaltung wurden ~ 350 *E. coli* Kolonien von den Agarplatten mit LB-Medium abgeschwemmt. Mit dem Plasmidisolationskit von Macherey + Nagel (siehe II.1.) wurden die Plasmide als Plasmidpool isoliert und bei -20°C gelagert. Somit stehen diese Sättigungsmutagenesebanken dauerhaft zum Screening auf neue Enzymeigenschaften zur Verfügung.

#### Fehlerhafte Polymerase-Kettenreaktion

Bei der fehlerhaften PCR (error-prone polymerase chain reaction, epPCR) werden ungerichtet Nukleotide in dem DNA-Bereich substituiert, der von dem Primerpaar flankiert ist. Zur Einführung von ungerichteten Basensubstitutionen wurde das GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet [134]. Die in diesem Kit enthaltene Polymerase Mutazym II ist ein Gemisch aus zwei verschiedenen Polymerasen (Mutazym I DNA Polymerase, *Taq* DNA Polymerase Mutante), das die vier Nukleotide (G, A, T, C) in einem ausgewogenen Verhältnis gegeneinander austauschen. Die Mutationsrate wurde durch die Menge an eingesetzte Matrize (~175 ng) und der Zyklenzahl der PCR (30 Zyklen) reguliert. Als Ausgangs-DNA für die epPCR, dienten das *talB*-Gen und das *talBF178Y*-Gen, in dem Vektor pJF119EH [129]. Die PCR-Produkte wurden aus einem 1% (w/v) igen Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (siehe II.1.) extrahiert. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurde mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *XhoI* geschnitten und mit T4-Ligase in den Vektor pJF119kan ligiert (siehe II.6.2., Abb. II.1). Der Vorteil dieses Plasmids war, dass durch die Kan-Resistenz ein weiterer Selektionsmarker vorhanden war. Die fehlerhaften PCR-Banken wurden in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Zur Überprüfung der Mutageneserate der Bank wurden 30 Klone zufällig gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert (siehe II.6.2.) und kommerziell sequenziert (siehe II.6.5.).

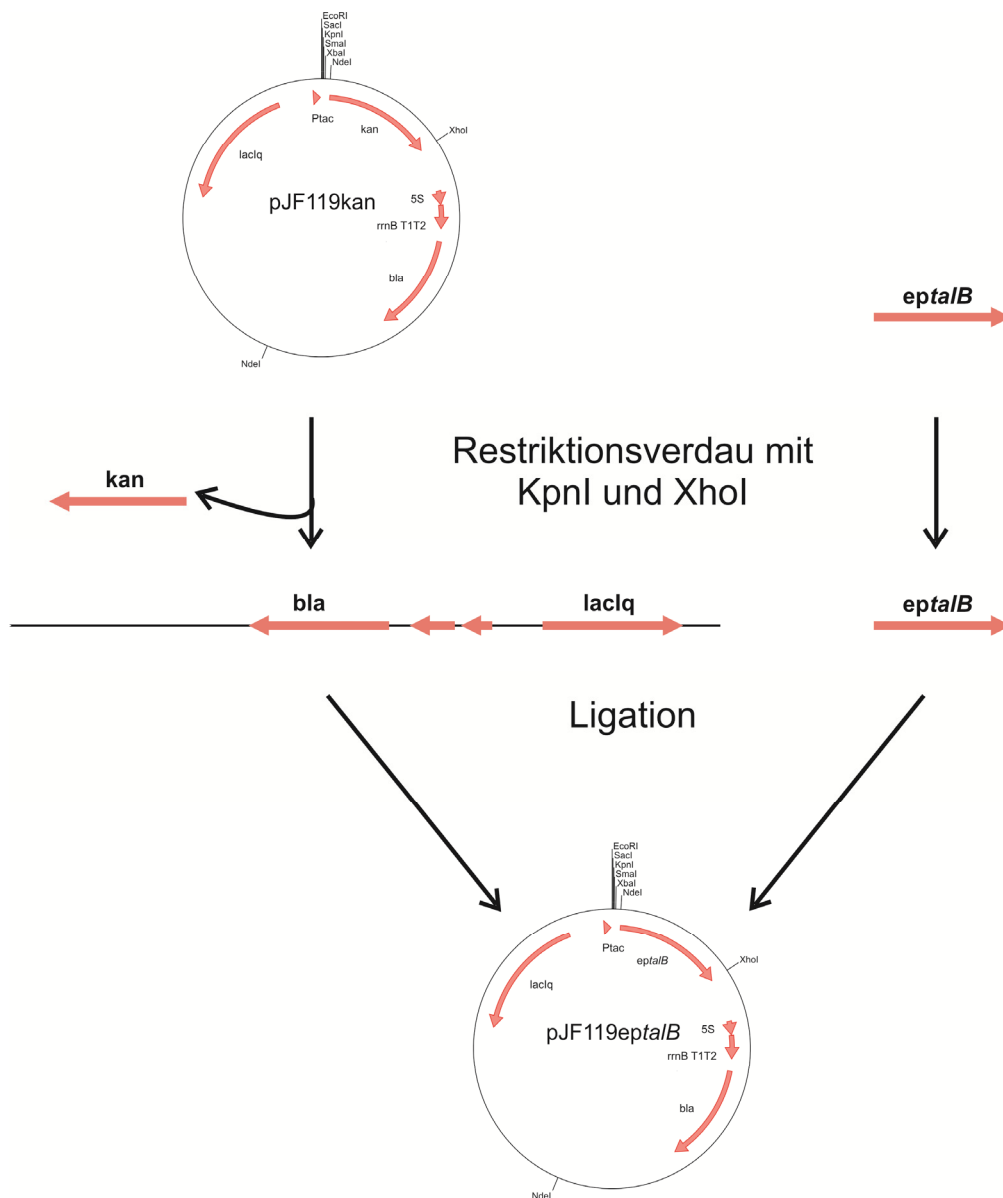


Abb. II.1: Die ungerichtete Mutagenesebank epTalB wird in den Vektor pJF119kan kloniert. Nach dem gleichen Klonierungsprinzip wird auch die Mutagenesebank epTalBF178Y in den Vektor pJF119kan kloniert.

### 6.5. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von den Firmen Eurofins MWG Operon (Martinsried) oder GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die Primer TalBseq 3' und TalBepPCR 5' (siehe Tab. II.3; pJF119-Konstrukte) oder die Primer T7 und pET-RP von GATC (siehe Tab. II.3; pET-Konstrukte) verwendet.

7. Proteinbiochemische Methoden

7.1. Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Stämmen zur Expression von Proteinen

Für die Expression von Proteinen wurden die *E. coli* Hauptkulturen mit einer Vorkultur 1:50 angeimpft. Die Expression erfolgte in 20, 400 oder 600 ml 2YT-Medium unter Verwendung von 0,1, 2 oder 3 l Erlenmeyerkolben bei 37°C unter Schütteln (145 rpm) angezogen, bei einer OD<sub>600</sub> ~ 0.6 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen für 4 h bei 37°C unter Schütteln (145 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (Sigma: 5500 rpm / 10 min / 4°C; Beckman, JA-10-Rotor: 6000 rpm / 10 min / 4°C) und anschließend bei -20°C gelagert.

7.2. Zellaufschluss und Herstellung von zellfreien Rohextrakten

*E. coli*-Stämme, die das Plasmid pLysS tragen

Zu den tiefgefrorenen Zellen wurde 0,5 - 3 ml Puffer A (siehe Tab. II.5) mit 0,1 mg/ml DNase I zugegeben und im Wasserbad bei 30°C für 20 min aufgetaut. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Zellwand lysiert. Für den vollständigen Aufschluss und Abbau der DNA wurde die Suspension mittels Ultraschall (siehe II.2., bis zu 4mal bei 30 % Duty Cycle, 15 – 30 s) behandelt. Die Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (> 1,5 ml Zellysate: Rotor-TFT 70.38 / 65.38; 8000 g / 1 h / 4°C; < 1,5 ml Zellysate: Hettich MIKRO 22R: 14000 rpm / 30 min / 4°C), der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Tab. II.5: Die Aufreinigungsmethoden von den verwendeten Enzymen und die zum Aufschluß verwendeten Puffer.

Enzym	Reinigung	Puffer A	
TalBwt und Varianten, GatD, GldA	Ni-Affinitätschromatographie	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
		NaCl	300 mM
		Imidazol	10 mM
hTal und Varianten	GST-Affinitätschromatographie	NaCl pH 7.4	150 mM
		KCl	3 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
FSA	Anionenaustauschchromatographie	Glycylglycin pH 8.0	50 mM
		DTT	1 mM
Frk	Anionenaustauschchromatographie	Tris-HCl pH 7.5	20 mM
		DTT	1 mM

### *E. coli*-Stämme ohne pLysS

Die gefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in 0,5 - 3 ml Puffer A (siehe Tab. II.5.) mit 1 mg/ml Lysozym und 0,1 mg/ml DNase I resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Ultraschall (siehe II.2., bis zu 4mal bei 30 % Duty Cycle, 15 – 30 s) wurden die Zellen vollständig aufgeschlossen. Die Zellysate wurden anschließend zentrifugiert (> 1,5 ml Zellysat: Rotor-TFT 70.38 / 65.38; 8000 g / 1 h / 4°C; < 1.5 ml Zellysat: Hettich MIKRO 22R: 14000 rpm / 30 min / 4°C) und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 7.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Die Proteinkonzentration der Lösungen wurde nach der Methode von Bradford [135] bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit 2,5 – 25 µg BSA / ml.

### 7.4. SDS-Polyacrylamidgel Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgel Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis, SDS-PAGE) wurde zur Bestimmung der Proteinmolekülgröße und der Reinheit der denaturierten Proteine durchgeführt [136]. Die Proteine wurden mit Probenpuffer (siehe II.2.) gemischt und anschließend 5 min im Wasserbad aufgeköcht. Das SDS-Gel bestand aus zwei Phasen, dem Trenngel (12 % Acrylamid, siehe Tab. II.6) und dem Sammelgel (3,9 % Acrylamid, siehe Tab. II.6). Es wurde 1-15 µg Protein pro Spur aufgetragen. Zuvor wurden die Proteine mittels SDS negativ geladen. Nach dem Lauf wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau R-250 (siehe II.5.) gefärbt.

Tab. II.6: Trenn- und Sammelgel für SDS-Gele [136]

Lösungen	Trenngel 12 % (v/v)	Sammelgel 3,9 % (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	5 ml	3 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Acrylamid-Bisacrylamid 30 (37,5:1)	6 ml	650 µl
SDS 10 % (w/v)	150 µl	100 µl
APS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 l



## 7.5. Westernblot Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAGE wurden diese in einer Transferapparatur, Mini Trans-Blot Cell, der Firma Biorad auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung erfolgte 1 h bei 70 V und ~ 250 mM im Kühlraum (6°C). Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran nach dem Blotting mit Blockpuffer (siehe II.5.) 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend mit 3 x 5 min mit Waschpuffer (siehe II.5.) gewaschen. Der Antikörper gegen TalB aus Meerschweinchen (Antikörper von Schürmann, M. und Schörken, U. am Forschungszentrum in Jülich) wurde 1:1000 in Waschpuffer verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung ungebundener, überschüssiger Antikörper wurde die Membran 2 x 5 min bei Raumtemperatur unter Schütteln mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit Anti-Meerschweinchen IgG-AP (1:30000) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit Waschpuffer folgte der spezifische Nachweis Antikörpermarkierter Proteine mit NBT (330 µg / ml) und BCIP (165 µg / mg) in AP-Puffer (siehe II.5.). Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran mehrfach mit Wasser gewaschen.

## 7.6. Reinigung rekombinanter Proteine

Reinigung der Transaldolase B von *E. coli* und Transaldolase B Muteinen

Transaldolase B und dessen Transaldolase B Muteine wurden im rekombinanten *E. coli* Stamm XL1Blue pJF119*talB* / *talBF178Y* / *talBF178Y/R181A/D/E/G/N/P/S/T* exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie durch Gravitation gereinigt. Dazu wurden die zellfreien Extrakte (siehe II.7.2.) zu 1,5 ml Ni-NTA-Säulenmaterial zugegeben und mit einem aufsteigenden Stufengradienten wie folgt aufgereinigt (Puffer siehe II.5.; Abb. II.2):

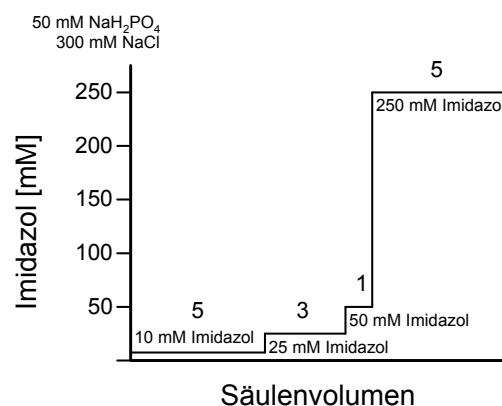


Abb. II.2: Reinigung von TalB und Varianten mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie durch Gravitation und einem Imidazolstufengradienten.

Einzelne Fraktionen der Reinigung (jeweils 10 µl) wurde auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen anschließend wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung angefärbt [136]. Die Fraktionen, die TalB enthalten wurden gepoolt und der Puffer wurde gegen Tal-Puffer (siehe II.5.) mittels Zentrifugationskonzentrationseinheiten ausgetauscht und aufkonzentriert. Die Reinheit der Proteine wurde durch erneute SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung überprüft.

TalBF178Y und TalBF178YR181E wurden zur Kristallisation am ÄKTA Purifier und Ni-NTA-Affinitätssäule (20/10) aufgereinigt. Die Proteine wurden jeweils auf eine mit Puffer A (siehe II.5.) äquilibrierte Ni-NTA-Affinitätssäule (20/10) mit einer 10 ml Probenschleife aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml / min. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem aufsteigenden Imidazolgradienten bis zu maximal 250 mM Imidazol (50 % Puffer B, siehe II.5.) über 10 Säulenvolumen. TalBF178Y und TalBF178YR181E konnte mit 320 mM Imidazol eluiert werden (entspricht 32 % Puffer B). Wie zuvor beschrieben wurden die TalBF178Y und TalBF178YR181E enthaltenden Fraktionen überprüft, umgepuffert und die Reinheit der gereinigten Enzyme überprüft.

Reinigung von TalB und Varianten von 20 ml Expressionskulturen erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit einer Abwandlung der Methode ‚Ni-NTA Spin Kit‘ (Qiagen) aufgereinigt (siehe II.7.6.). Mit Zentrifugationskonzentratoren (siehe II.1.) wurden die gereinigten Proteine umgepuffert (Tal-Puffer, siehe II.5.) und aufkonzentriert. Mit der Methode nach Bradford (siehe II.7.4. [135]) wurde der Proteingehalt bestimmt und die Reinheit mittels SDS-PAGE (siehe II.7.5.) mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

### Reinigung der humanen Transaldolase

Die humane Transaldolase GST-hTal und das humane Transaldolase Mutein GST-hTalF189Y wurden in dem rekombinanten *E. coli* LJ110 (DE3) talA<sup>-</sup>, talB<sup>-</sup> pLysSRARE2 (LJ110 (DE3) talA<sup>-</sup>, talB<sup>-</sup> pLysSRARE2-pGEXTN\*htal, LJ110 (DE3) talA<sup>-</sup>, talB<sup>-</sup> pLysSRARE2-pGEXTN\*htalF189Y) exprimiert. Die beiden GST-Fusionsproteine wurden aus den Rohextrakten (siehe II.7.2.1.) mittels GST-Affinitätschromatographie [137] aufgereinigt. Dazu wurde 2 ml Glutathion-Sepharose 4B (siehe II.1.) viermal mit 2 ml PBS-Puffer (siehe II.5.) gewaschen und equilibriert. Zwischen den Waschschritten wurde das Säulenmaterial zentrifugiert (Sigma: 2000 rpm / 1 min / 4°C) und der Überstand dekantiert. Die jeweiligen Rohextrakte wurden mit der äquilibrierten Glutathionsepaharose 4B gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Rohextrakt-Glutathionsepaharose-Gemische abzentrifugiert (2000 rpm / 1 min / 4°C). und mit PBS-Puffer gewaschen (12 Säulenvolumen). Anschließend wurde der GST-Tag auf der Säule mittels TEV-Protease [138] abgespalten. Dazu wurde zu den Rohextrakt-Säulenmaterial Gemischen

TEV-Protease (1:50, w/w), sowie EDTA pH 8.0 (Endkonzentration: 5 mM) und DTT (Endkonzentration: 1 mM) zugegeben. Die GST-Abspaltung erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Durch Waschen mit PBS-Puffer (12 Säulenvolumen) wurde hTal und hTalF189Y von den Säulen gewaschen. Zur Elution der abgespaltenen GST-Tags von den Säulen wurden diese mit 12 Säulenvolumen Elutionspuffer (siehe II.5.) gewaschen. Einzelne Fraktionen der Reinigung wurde auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen anschließend wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung angefärbt [136]. Die Fraktionen, die TalB enthalten wurden gepoolt und der Puffer wurde gegen Tal-Puffer (siehe II.5.) mittels Zentrifugationskonzentrationseinheiten ausgetauscht und aufkonzentriert. Die Reinheit der Proteine wurde durch erneute SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung überprüft.

#### Reinigung der Fructose-6-Phosphat-Aldolase

Fructose-6-Phosphat-Aldolase (FSA) wurde im rekombinanten *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS pET16bfsa exprimiert. Der Zellaufschluss erfolgt wie unter II.7.2. beschrieben. Durch Hitzefällung (siehe II.7.3.) mit anschließender Anionenaustauschchromatographie mit dem ÄKTA Purifier (siehe II.2.) wurde das Protein aufgereinigt. Bei der Hitzefällung wurden die Rohextrakte bei 75°C für ~ 20 min inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden ultrazentrifugiert (8000 g / 40 min / 4°C), als Überstand verblieben die nicht denaturierten Proteine, wie FSA.

Der Überstand der hitzegefällten Proteine wurden jeweils auf eine mit Puffer A (siehe II.5.) äquilibrierte Q-Sepharose HP 16/10 –Säule mit einer 10 ml Probenschleife aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml / min. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem aufsteigenden Salzgradienten bis zu maximal 500 mM NaCl (50 % Puffer B, siehe II.5.) über 10 Säulenvolumen. FSA konnte mit 320 mM NaCl eluiert werden (entspricht 32 % Puffer B). Fraktionen, die FSA Aktivität (siehe II.7.8.) enthalten, wurden gepoolt und mittels Zentrifugationskonzentrationseinheiten wurde der Puffer gegen Tal-Puffer (siehe II.5.) ausgetauscht und aufkonzentriert. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE nach Laemmli [136] mit einem 12 % SDS-Gel und einer Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung überprüft.

#### Reinigung der Fructokinase

Die Expression der Fructokinase (FRK) erfolgte im rekombinanten *E. coli*-Stamm XL1Blue mit pJF119frk unter den beschriebenen Expressionsbedingungen (siehe II.7.1.). Das Gen, das für die Fructokinase codiert wurde von Natalie Trachtmann aus pBM20frk mit den

Restriktionsenzymen *BamHI/KpnI* ausgeschnitten und in den pJF119EH-Vektor ligiert. Eine Reinigung erfolgt mit dem ÄKTA Purifier (siehe II.2.) und einer Anionenaustauschchromatographiesäule (Q-Speharose HP (16/10)). Die Rohextrakte wurden mit einer 10 ml Probenschleife auf eine mit Puffer A (siehe II.5.) äquilibrierte Q-Speharose HP (16/10) mit einer Flussrate von 1 ml / min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Eine Elution erfolgte mit einem aufsteigenden NaCl-Gradienten bis zu maximal 500 mM NaCl (50 % Puffer B, siehe II.5.) über 10 Säulenvolumen. Die Elution von FRK erfolgt bei 230 mM NaCl, dies entspricht 23 % Puffer B. FRK Aktivität (siehe II.7.8.) enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt. Durch Zentrifugationskonzentrationseinheiten wurde der Puffer gegen Tal-Puffer ausgetauscht und das Protein aufkonzentriert. Mittels SDS-PAGE und einem 12 % SDS-Gel und anschließender Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung wurde die Reinheit von FRK überprüft.

### Reinigung der Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase

Das Gen, das für die Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (GatD) codiert wurde von Dr. Anne K. Samland in den Vektor pET28a mit den Restriktionsenzymen *NdeI/EcoRI* kloniert. Die Reinigung von GatD erfolgte aus Rohextrakten des rekombinanten *E. coli*-Stammes Rosetta (DE3) pLysSRARE 2 pET28gatD. Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 7.2. beschrieben. Die Reinigung wurde mittels Affinitätschromatographie, wie für TalB beschrieben (siehe II.7.6.), durchgeführt. Durch Zentrifugationskonzentrationseinheiten wurde der Puffer gegen 50 mM HEPES-Puffer (siehe II.5.), ausgetauscht und das Protein aufkonzentriert. Mittels SDS-PAGE mit einem 12 % SDS-Gel und anschließender Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung wurde die Reinheit von GatD überprüft.

### Reinigung der Glycerin-Dehydrogenase

Das Gen, das für die Glycerin-Dehydrogenase (GldA) wurde von K. Ullrich aus dem *E. coli* Stamm LJ110 (DE3) in pJF119(EH) kloniert. Anschließend mit den Restriktionsenzymen *NdeI/BamHI* aus dem Vektor pJF119(EH) ausgeschnitten und in den Vektor pET28b kloniert. GldA wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Star exprimiert (siehe II.7.1.) und durch Affinitätschromatographie wie unter 7.6.1. beschrieben gereinigt. Die GldA enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und der Puffer wurde gegen Tal-Puffer (siehe II.5.) ausgetauscht und die Reinheit durch SDS-PAGE überprüft (Reinheit: ~ 90 %).

### 7.7. Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde mit der Superdex 200pg-Säule (10/20) (siehe II.1.), mit einer konstanten Flussrate von 0.5 ml / min entweder am ÄKTA Purifier oder am FPLC System von Amersham Pharmacia durchgeführt. Die Säule wurde mit Puffer (siehe II.5.) equilibriert. Die Kalibrierproteine (Blue Dextran: Totvolumen, Ribonuklease A; 13.7 kDa, Chymotrypsinogen A: 25 kDa, Ovalbumin: 43 kDa, Albumin: 67 kDa, Aldolase: 158 kDa, Katalase: 232 kDa, Ferritin: 440 kDa, siehe II.1.) wurden wie vom Hersteller angegeben über entweder eine 100 µl oder 200 µl Probenschleife aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde diese ebenfalls über entweder eine 100 µl oder 200 µl Probenschleifen aufgetragen.

### 7.8. Photometrische Bestimmungen

Die Aktivitäten von allen Transaldolasen, der Fruktose-6-Phosphat-Aldolase, Fruktokinase und Glycerin-Dehydrogenase wurden im Tal-Puffer (siehe II.5.) bei 30°C gemessen. Die Aktivität der Galaktitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase wurde in 50 mM HEPES-Puffer (siehe II.5.) ebenfalls bei 30°C bestimmt. Mit einem Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotometer (Varian, Darmstadt, Deutschland) wurden die Enzymaktivitäten bei 340 nm für 10 min verfolgt. Die Aktivität wurde anhand der Anfangssteigung im linearen Bereich der Messung bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme wurde mit Microsoft Excel 2007 (Unterschleißheim) bestimmt.

#### Transaldolase-Aktivität

Im Transaldolase-Nachweis wurde D-Fruktose-6-Phosphat (10 mM) und D-Erythrose-4-Phosphat (2 mM, Reinheit: 61%) als Substrate verwendet. Detektiert wurde die Bildung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat durch die Oxidation von NADH (0,5 mM) zu NAD<sup>+</sup> mit den koppelnden Enzyme Triosephosphatisomerase (1,6 U) und Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (4 U), wie bereits beschrieben [13, 15]. Zur Bestimmung des K<sub>m</sub>-Werts für D-Fruktose-6-Phosphat wurde die Konzentration an D-Erythrose-4-Phosphat konstant bei 2 mM gehalten. Der K<sub>m</sub>-Wert für D-Fruktose-6-Phosphat von TalBwt ist 90 µM, folglich war die eingesetzte Konzentration sättigend [15]. Die Konzentration an D-Fruktose-6-Phosphat variierte von 1 - 50 mM (TalBwt), 1 – 150 mM (TalBF178Y) und 0,5 – 60 mM (hTal, hTalF189Y). Durch Auftragung der spezifischen Aktivitäten gegen die D-Fruktose-6-Phosphat-Konzentrationen als Michaelis-Menten-Darstellung wurden die K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Werte mit SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkrath) bestimmt. D-Erythrose-4-Phosphat lag mit einer

Reinheit von 61% als Pulver vor, dieses wurde in Wasser entsprechend der Reinheit mit einer Endkonzentration von 0,2 M gelöst.

### Fructose-6-Phosphat-Aldolase Aktivität

Die Bildung von Fructose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (TalB und Varianten: 150 mM, FSA: 300 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) wurde wie bereits beschrieben mit den koppelnden Enzymen Phosphoglucoseisomerase (0,5 U) und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (0,5 U) durchgeführt [66]. Der  $K_m$ -Wert für Dihydroxyaceton wurde mit 10 – 300 mM (FSAwt), 10 – 350 mM (TalBF178Y) oder 10 – 600 mM (hTalBF189Y) bestimmt. Die Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde konstant bei 2,8 mM gehalten. Die eingesetzte D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat war sättigend, da der  $K_m$ -Wert für TalB 38  $\mu$ M ist [15]. Zur Bestimmung des  $K_m$ -Werts für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde die Konzentration von Dihydroxyaceton konstant bei 150 mM (TalBF178Y) oder bei 300 mM (FSA) gehalten, die Konzentration von D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat variierte bei TalBF178Y von 0,28 bis 11,2 mM und bei FSA von 0,14 bis 5,6 mM. Die Aktivitäten wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration entweder an Dihydroxyaceton oder D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Michaelis-Menten-Darstellung aufgetragen. Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für Dihydroxyaceton wurden mit der direkten Darstellung und mit SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkrath) bestimmt. Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurden mit der Darstellung nach Hanes und SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Erkrath) bestimmt.

### Fructose-6-Phosphat-Spaltung

Die Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat (10 mM) in Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde wie bereits beschrieben, über die Entstehung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat durch die Bildung von  $NAD^+$  aus  $NADH$  (0,5 mM) mit den koppelnden Enzymen Triosephosphatisomerase (1,6 U) und Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (4 U), verfolgt [66]. Der  $K_m$ -Wert für Fructose-6-Phosphat wurde mit 1 – 50 mM (FSAwt), 1 – 20 mM (TalBF178Y) oder 0,25 – 60 mM (hTalF189Y) bestimmt.

### Fructose-Bildung

Die Bildung von Fructose aus Dihydroxyaceton (150 mM) und D,L-Glycerinaldehyd bzw. D-Glycerinaldehyd wurde über die Bildung von  $NADPH$  aus  $NADP^+$  (0,5 mM) mit den koppelnden Enzymen Fructokinase (0,5 U, aus *Zymomonas mobilis* [8]),

Phosphoglucoseisomerase (0,5 U) und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (0,5 U) verfolgt. Das koppelnde Enzym Fructokinase benötigt zur Phosphorylierung von D-Fructose, ATP (1,2 mM) und MgCl (10 mM). Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd wurde die Konzentration von Dihydroxyaceton konstant bei sättigenden 150 mM gehalten, die Konzentration von D,L-Glycerinaldehyd variierte zwischen 2 und 140 mM (TalBF178Y) und zwischen 2 und 60 mM (TalBF178YR181E), bei D-Glycerinaldehyd von 2 bis 140 mM (TalBF178Y) und zwischen 2 und 100 mM (TalBF178YR181E). Die Aktivitäten wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an D-Glycerinaldehyd aufgetragen. Die spezifischen Aktivitäten wurden gegen die Konzentrationen D,L-Glycerinaldehyd bzw. D-Glycerinaldehyd als Michaelis-Menten-Darstellung und nach Hanes aufgetragen. Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte mit der Darstellung nach Hanes und SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Erkrath) bestimmt.

#### Fructose- und Tagatose-Spaltung

Die Spaltung von Fructose (1 M) und Tagatose (1 M) in Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd wurde durch die Bildung von  $NAD^+$  aus NADH (0,5 mM) mit dem koppelnden Enzym Glycerin-Dehydrogenase (0,2 U) aus *E. coli* verfolgt. Glycerin-Dehydrogenase reduziert Dihydroxyaceton zu Glycerin.

#### Tagatose-6-Phosphat-Bildung

Die Bildung von Tagatose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (150 mM) und D, L-Glycerinaldehyd (2,8 mM) wurde über die Entstehung von  $NAD^+$  aus NADH (0,4 mM) mit dem koppelnden Enzym Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (2,6 U) verfolgt.

#### Fructokinase-Aktivität

Die Aktivität der Fructokinase wurde mit D-Fructose (10 mM) zu Fructose-6-Phosphat über die Reduktion von  $NADP^+$  (0,5 mM) zu NADPH mit den koppelnden Enzymen Phosphoglucoseisomerase (0,5 U), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,5 U) und Fructokinase gemessen. Zur Phosphorylierung wurde zusätzlich ATP (1,2 mM) und MgCl (10 mM) benötigt. Von dem zugegebenen ATP wurde eine aktivierte Phosphatgruppe auf D-Fructose übertragen, dabei entsteht ADP und D-Fructose-6-Phosphat.

### Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase-Aktivität

Die Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase-Aktivität wurde mit Tagatose-6-Phosphat (2 mM) gemessen. Tagatose-6-Phosphat wurde zu Galactitol-1-Phosphat umgewandelt, dabei wird NADH aus NAD<sup>+</sup> (0,4 mM) gebildet [139],[140].

Zur Bestimmung der Tagatose-6-Phosphat-Konzentration mit Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (1 U) wurde die Absorption von NADH (0,4 mM) bei 340 nm und 30°C mit GatD in HEPES-Puffer (siehe II.5.) bestimmt. Anschließend wurde Tagatose-6-Phosphat zugegeben und erneut die Absorption bei 340 nm gemessen. Aus der Differenz der beiden Messungen wurde die Extinktionsänderung bestimmt, so dass mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration an Tagatose-6-Phosphat berechnet werden konnte.

### Glycerin-Dehydrogenase-Aktivität

Die Aktivität der Glycerin-Dehydrogenase wurde über die Oxidation von NADH (0,4 mM) zu NAD<sup>+</sup> mit 5 mM Dihydroxyaceton in Tal-Puffer (siehe II.5.) gemessen.

### 7.9. Auftrennung der Reaktionsumsätze mittels HPLC

Die HPLC-Untersuchungen wurden mit einer Rezex RHM-Säule (Phenominex, Aschaffenburg) durchgeführt. Die Entstehung von neuen Produkten und der Verbrauch der Substrate wurden anhand von Kalibrierungsmessungen mit Referenzzuckern bestimmt. Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Multi-Wellenlängen UV-Detektor (Waters, Eschborn) bei 190 nm. Als Laufmittel wurde 5 mM Schwefelsäure verwendet. Die Steuerung der Anlage und die Integration der Peakflächen wurde mit der Software Millennium<sup>32®</sup> Chromatography der Firma Waters, ausgeführt.

Als Donor für die Umsätze wurde Dihydroxyaceton verwendet (200 mM), Glycolaldehyd (100 mM) D-Glycerinaldehyd und D,L-Glycerinaldehyd (100 mM) wurden als Akzeptoren eingesetzt. Die Enzymreaktionen wurden bei 30°C mit 1,2 / 2,4 / 0,6 µg / µl Enzym (TalBF178Y / TalBwt / TalBF178YR181E) pro Reaktionsansatz mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd bzw. Glycolaldehyd als Substrate in Tal-Puffer inkubiert. Proben wurden zwischen 0 – 8 h entnommen und durch Einfrieren in Flüssigstickstoff abgestoppt. Bis zur HPLC-Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.



### 7.10. Reduktion des Schiff'sche Base Intermediats von TalBF178Y

Die Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates wurde mit einer Abwandlung der Methode nach Schörken [16] und Horecker et al. [141] durchgeführt. Für die Synthese eines Enzym-Substrat-Komplexes wurden jeweils 1 mg gereinigtes TalBwt bzw. TalBF178Y wurden jeweils in 5 ml 20 mM Glycylglycin-Puffer, pH 8,0, 1h bei 30°C mit einem 200-fachen molaren Überschuss an D-Fructose-6-Phosphat, einem 40-fachen Überschuss NADH und 40 µl Triosephosphatisomerase / Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (0.32 U / µl und 0.9 U / µl) inkubiert. Danach wurde 5 ml kalter 50 mM Triethanolamin-Puffer, pH 5.8 zugegeben. Die Lösung wurde auf Eis gekühlt und der pH-Wert auf pH 6.0 mit 5 M Essigsäure eingestellt. Unter stetiger Kühlung und Rühren wurde eine 3 M NaBH<sub>4</sub> Lösung zugegeben, der pH-Wert wurde jeweils auf pH 6.0 mit 5 M Essigsäure eingestellt. Nach Zugabe von insgesamt 5 ml NaBH<sub>4</sub> wurde die Lösung mit einem Zentrifugationskonzentrator (siehe II.1.) eingengt und der Puffer gegen Tal-Puffer (siehe II.5.) ausgetauscht.

Die Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates wurde mit einer zweiten Abwandlung der Methode nach Schörken [16] und Horecker et al. [141] durchgeführt. Jeweils 1 mg gereinigtes TalBF178Y wurde in 5 ml 20 mM Glycylglycin-Puffer, pH 8,0 mit einem 200-fachen molaren Überschuss an D-Fructose-6-Phosphat auf Eis gemischt. Danach wurde 50 mM Triethanolamin-Puffer, pH 5,8, zugegeben. Die Reduktion wurde durchgeführt, wie unter 2.7.11.1. beschrieben. Der Puffer des Reduktionsansatzes wurde durch Dialyse gegen 20 mM Glycylglycin-Puffer, pH 8,5 über Nacht im Kühlraum (6°C) ausgetauscht. Anschließend wurde das Dialysat mit einem Zentrifugationskonzentrator (siehe II.1.) aufkonzentriert.

Die Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates wurde mit einer dritten Abwandlung der Methode nach Schörken [16] und Horecker et al. [141] durchgeführt. Jeweils 1 mg gereinigtes TalB bzw. TalBF178Y wurde in 5 ml 20 mM HEPES, pH 7,5 mit einem 440-fachen Überschuss an D-Fructose-6-Phosphat 10 min bei 30°C, inkubiert. Anschließend wurde 5 ml 50 mM kalter MES-Puffer, pH 5.8 zugegeben. Auf Eis wurde unter Rühren 3 M NaBH<sub>4</sub>-Lösung zugegeben, mit 5 M Essigsäure wurde der pH-Wert auf 6 eingestellt. Nach Zugabe von insgesamt 5 ml NaBH<sub>4</sub> wurde der Ansatz gegen 20 mM Glycylglycin, pH 8.5, über Nacht durch Dialyse im Kühlraum (6°C) ausgetauscht und danach mit Zentrifugationskonzentrator (siehe. II.1.) eingengt.

### 7.11. Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat

Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat, Überprüfung der Aktivität mit D-Fructose-6-Phosphat als Substrat

Bei der Untersuchung der Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat wurde das Enzym (1.7 µg / µl) ohne Tagatose-6-Phosphat und mit Tagatose-6-Phosphat (äquimolar, mit 2-fachem und 10-fachem Überschuss Tagatose-6-Phosphat) bei 30°C bis zu 24 h in Tal-Puffer inkubiert. Proben wurden zwischen 0 - 24 h entnommen und die Aktivität für die Spaltung von Fructose-6-Phosphat (siehe II.7.8.) gemessen. Die über 24 h inkubierten Ansätze wurde 1:50 verdünnt und für weitere 24 h bei 30°C inkubiert. Nach 0, 1, 4, 24 h wurde die verbleibende Aktivität von TalBF178Y für die Fructose-6-Phosphat Spaltung in Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd (siehe II.7.8.) gemessen.

Inhibition von TalBF178Y durch Tagatose-6-Phosphat, Überprüfung der Aktivität mit D-Fructose-6-Phosphat als Donor und D-Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor

TalBwt und TalBF178Y (jeweils 1.7 µg / µl gereinigtes Enzym) wurde ohne Tagatose-6-Phosphat und mit Tagatose-6-Phosphat (äquimolar und mit 10-fachem Überschuss Tagatose-6-Phosphat) bei 30°C bis zu 48 h in Tal-Puffer inkubiert. Zwischen 0 und 48 h (TalBwt) oder 0 und 24 h (TalBF178Y) wurden Proben entnommen und die verbleibende Aktivität der Enzyme im Transaldolase-Nachweis bestimmt (siehe II.7.8.). Die Ansätze mit TalBF178Y wurden nach 24 h jeweils 1:400 verdünnt und bis zu 24 h bei 30°C inkubiert. Die TalBwt-Ansätze wurden nach 48 h 1:1000 verdünnt und bis zu 24 h bei 30 °C inkubiert. TalBwt und TalBF178Y wurden aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten verschieden verdünnt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 2, 4, 24 h) wurden die Aktivitäten im Transaldolase-Nachweis der Enzyme bestimmt (siehe II.7.8.).

### 7.12. Einfluss von D-Glycerinaldehyd auf die Aktivität von FSA mit Dihydroxyaceton und D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat

Untersuchung des inhibitorischen Einflusses von D-Glycerinaldehyd auf FSA

FSA (2,5 µg / µl) wurde mit D-Glycerinaldehyd gemischt (äquimolar, mit 10-fachem oder 50-fachem Überschuss D-Glycerinaldehyd gegenüber der eingesetzten FSA-Menge) und bei 30°C in Tal-Puffer (siehe II.5.) inkubiert. Proben wurden zwischen 0 und 24 h entnommen und die Aktivität zur Bildung von D-Fructose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (300 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) gemessen (siehe II.7.8.). Nach 24 h Inkubation wurde der Ansatz 1:50 verdünnt und zwischen 0 und 24 h die Aktivität gemessen.

### K<sub>i</sub>-Wert-Bestimmung von FSA für D-Glycerinaldehyd

Zur Bestimmung des K<sub>i</sub>-Werts für D-Glycerinaldehyd wurde die Konzentration von Dihydroxyaceton konstant bei 300 mM gehalten, die Konzentration von D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat variierte von 0,07 bis 5,6 mM. Mit 4 unterschiedlichen Konzentrationen D-Glycerinaldehyd (0 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM) wurde die FSA-Aktivität gemessen. Die Aktivitäten wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat doppelt-reziprok nach Lineweaver-Burk aufgetragen. Durch die Messwerte wurde jeweils eine lineare Funktion gelegt und mit SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) ausgewertet. Durch Auftragung der Inhibitorkonzentration in Abhängigkeit der Steigung der Geradenscharen und der Ordinatenschnittpunkte wurde K<sub>ic</sub> und K<sub>iu</sub> bestimmt.

### 7.13. Zellanzucht und Screening im Deepwellplatten- bzw. Mikrotiterplatten-Maßstab

#### Zellanzucht in Deepwellplatten von rekombinanten *E. coli* XL1Blue-Zellen

Die Kultivierung der einzelnen Klone erfolgte in Deepwellplatten. Deepwellplatten ermöglichen die Kultivierung von 96 verschiedenen Bakterienkulturen in 1 ml-Maßstab. Damit lassen sich viele verschiedenen Kulturen unter gleichen Bedingungen mit wenig Aufwand kultivieren. Einzelkolonien der transformierten Sättigungsmutagenesebanken in XL1Blue wurden zufällig ausgewählt und in jeweils ein Well einer 96-Deepwellplatte (siehe II.1.) überführt. Jedes Well beinhaltete 1 ml 2YT-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin. Die Platten wurden mit einem Gas-durchlässigen adhäsiven Film verschlossen und bei 37°C unter Schütteln (145 rpm) über Nacht inkubiert. Diese Kulturen dienten dazu die Expressionskulturen 1:20 anzuimpfen. Die Expressionskulturen waren zusammengesetzt aus 1 ml 2YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 mM IPTG. Diese Expressionskulturen wurden über Nacht bei 37°C und 145 rpm inkubiert. Diese Kulturen wurden durch Zentrifugation (Sigma: 1600 g / 8°C / 10 min) bei einer OD<sub>600</sub> von ~ 0.3 geerntet, der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -70°C gelagert.

#### Zellanzucht in Deepwellplatten von rekombinanten *E. coli* XL1Blue-Zellen

Die gerichteten Sättigungsmutagenesebanken wurden in kompetente XL1Blue transformiert. Die Klone der Sättigungsmutagenesebanken wurden mit LB-Medium von LB-Agarplatten mit 100 µg / ml Ampicillin (siehe II.4.) abgeschwemmt. Die Plasmide dieser Zellsuspension wurden mit dem NucleoSpin Kit II von Macherey + Nagel (siehe II.1.) isoliert. Der Plasmid-Pool wurde in LJ110 (DE3) talA<sup>-</sup>, talB<sup>-</sup>-Zellen transformiert. Einzelne Kolonien wurden zufällig gepickt und in 96-Deepwellplatten wie unter 7.13.1.1. beschrieben angezogen.

### Stammhaltung der Sättigungsmutagenesebanken

Zur Stammhaltung der einzelnen Klone wurde mit den unter 2.7.13.1. erhaltenen Übernachtskulturen (1:20) 200  $\mu$ l 2YT-Medium mit 10 % Glycerin und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (siehe II.4.) in 96-Well Mikrotiterplatten angeimpft. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln (145 rpm) inkubiert und anschließend bei -70°C eingefroren.

### Zellaufschluss im Mikrotitermaßstab

Die tiefgefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in 100  $\mu$ l 50 mM Glycylglycinpuffer (pH 8,5) mit 1 mg/ml Lysozym und 0,1 mg/ml DNaseI resuspendiert und mindestens eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (1600 g / 8°C / 10 min) entfernt. Die Rohextrakte wurden in eine neue 96-Well Mikrotiterplatte überführt.

### Bestimmung der Proteinkonzentration im Mikrotitermaßstab

Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde nach der Methode von Bradford [135] bestimmt. Die Kalibrierung wurde mit Proben von 1 – 10  $\mu$ g BSA / 200  $\mu$ l aufgenommen. Zur Messung der Proteingehalte in den Rohextrakten wurde zu 190  $\mu$ l Bradford-Reagenz 10  $\mu$ l der Rohextrakte zugegeben.

### Screening auf Synthese von Fructose-6-Phosphat

Der unter 7.8.3. beschriebene Nachweis für die Bildung von Fructose-6-Phosphat wurde für ein Screening im Mikrotiterplattenmaßstab angepasst [128]. Die Synthese von Fructose-6-Phosphat wurde an die Reduktion von NADP<sup>+</sup> mit den Enzymen Phosphoglucoseisomerase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gekoppelt. NADPH wurde durch die Bildung des lila Formazankomplexes sichtbar gemacht (siehe Abb. III.3). Für die quantitative Analyse aktiver Muteine wurde eine Zunahme der lila Farbe bei 540 nm bei 25°C, mit Hilfe eines Multiwell-Photometers verfolgt. Der Nachweis wurde mit Dihydroxyacetone (50 mM), D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM), NADP<sup>+</sup> (0,5 mM) Phosphoglucoseisomerase (0,1 U), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,1 U), NBT (0,5 mM), Diaphorase (0,3 mU) und in 50 mM Glycylglycin (pH 8,0). Die Reaktion wurde durch Zugabe der zellfreien Extrakte ( $\leq$  5  $\mu$ g Protein) gestartet. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford [135] im Mikrotitermaßstab bestimmt (siehe II.7.13.). Die Aktivitäten wurden durch einen Anstieg der Absorption bei 540 nm pro Minute verfolgt und durch Division mit der

Proteinkonzentration standardisiert. Zellfreie Extrakte mit FSA und TalBwt wurden als Positiv- und Negativkontrolle verwendet.

#### Screening auf Synthese von D-Fructose

Die Bildung von D-Fructose aus Dihydroxyaceton (50 mM) und D, L-Glycerinaldehyd (10 mM) wurde gekoppelt an die Reduktion von  $\text{NADP}^+$  (0,5 mM) mit den Enzymen Fructokinase (0,1 U), Phosphoglucoseisomerase (0,1 U) und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (0,1 U) in 200  $\mu\text{l}$  50 mM Glycylglycin-Puffer (pH 8,5; siehe Abb. III.3). Das gebildete NADPH wurde durch Diaphorase (0,3 mU) oxidiert, gleichzeitig wurde Nitrotetrazolium-Blauchlorid (0,5 mM) zu dem lila farbigen Formazankomplexes reduziert. Dies konnte sowohl visuell als auch photometrisch bei 540 nm für 20 min bei 25°C, mit einem Multiwell-Photometer (siehe II.2.) verfolgt werden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ~ 20  $\mu\text{g}$  zellfreien Extrakten gestartet. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (siehe II.7.13. [135]) bestimmt. Die Aktivitäten wurden durch eine Zunahme der Absorption bei 540 nm pro min erfasst und durch Division mit der Proteinkonzentration standardisiert. Als Ober- und Untergrenze wurde die Aktivität mit zellfreien Extrakten von TalBF178Y mit 100 mM und 10 mM D, L-Glycerinaldehyd gemessen. Klone, die eine zweimal höhere Aktivität als die Untergrenze aufwiesen, wurden zur Überprüfung in 20 ml 2YT-Medium angezogen und erneut auf Aktivität zur Synthese von Fructose überprüft (siehe II.7.8.).

ATP (1,2 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM),

#### Screening auf Synthese von Tagatose-6-Phosphat

##### a) Kalibrierung von Tagatose-6-Phosphat unter den Screening-Bedingungen

Die Entstehung von Tagatose-6-Phosphat wurde an die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  mit Hilfe des koppelnden Enzyms Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase bei 340 nm verfolgt. Unterschiedliche Konzentrationen Tagatose-6-Phosphat (0 - 60  $\mu\text{M}$  in 200  $\mu\text{l}$  Endvolumen pro Well) wurden mit 150 mM Dihydroxyaceton, 1,4 mM D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1,4 mM Fructose-6-Phosphat und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zellfreiem Extrakt von LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> pJF119*talB* Zellen gemischt, 5 min bei 100°C aufgekocht und zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417C: 14000 rpm / RT / 30 sec). 40  $\mu\text{l}$  des Gemischs wurden in Mikrotiterplatten mit NADH (Endkonzentration: 0,4 mM) in HEPES-Puffer (siehe II.5.; Endvolumen: 190  $\mu\text{l}$ ) gemischt. Die Absorption wurde über 10 min bei 30°C und 340 nm verfolgt. Dann wurden 10  $\mu\text{l}$  GatD zugegeben (1.9 mU pro Well; Endvolumen: 200  $\mu\text{l}$ ) und damit die Reaktion gestartet. Die Absorption wurde über 40 min bei 30°C und 340 nm verfolgt. Nach der Messung wurde die Differenz aus der Absorption vor der Zugabe von GatD und nach der Zugabe von GatD

gebildet. Die Differenzen der Absorptionen wurde gegen die Konzentration an Tagatose-6-Phosphat pro Well aufgetragen und als Kalibrierung für das Screening der Sättigungsmutagenesebanken verwendet.

### b) Screening auf die Synthese von Tagatose-6-Phosphat

Die Bildung von Tagatose-6-Phosphat (T6P) aus Dihydroxyaceton und D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde durch die Bildung von  $\text{NAD}^+$  bei 340 nm mit dem koppelnden Enzym Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (GatD) verfolgt. Die Entstehung von Tagatose-6-Phosphat wurde in einer diskontinuierlichen Messung bestimmt. Dazu wurde Dihydroxyaceton (150 mM) und D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) mit zellfreien Extrakten (~20  $\mu\text{g}$  pro Well) in Tal-Puffer (siehe II.5.; Endvolumen: 200  $\mu\text{l}$ ), gemischt und anschließend unter leichtem Schütteln (200 rpm / min) bei 30°C inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford (siehe II.7.13. [135]) bestimmt. Zu den Zeitpunkten 0 und 2 wurden jeweils 60  $\mu\text{l}$  Probe entnommen und aufgeköcht (5 min / 100°C). Nach einer Zentrifugation (Sigma: 4000 rpm / 8°C / 5 min) wurden jeweils 40  $\mu\text{l}$  zu 150  $\mu\text{l}$  HEPES-Puffer (siehe II.5.) mit NADH (0,4 mM) gegeben und die Absorption bei 340 nm bei 30°C über 10 min verfolgt. Anschließend wurde GatD zugegeben (1,9 mU in 10  $\mu\text{l}$  pro Well), es wurde erneut die Absorption bei 340 nm bei 30°C über 40 min verfolgt. Das Screening der auffälligen Klone wurde mehrfach wiederholt (siehe Abb. II.7.3).

Anhand der Differenzen der Absorption ohne und mit GatD wurde die Konzentration an oxidiertem NADH bestimmt und durch die eingesetzte Proteinmenge normiert. Als Kontrolle dienten zellfreie Extrakte mit TalBwt (TalBF178X und TalBS226X) oder TalBF178Y (TalBF178YS226X), denen vor dem Aufkochen entweder Puffer (Negativkontrolle) oder Tagatose-6-Phosphat (Positivkontrolle; Endkonzentration 20  $\mu\text{M}$  / Well) zugegeben wurde. Die bestimmten Konzentrationen Tagatose-6-Phosphat der Positivkontrolle wurde mit der Tagatose-6-Phosphat-Kalibrierung (siehe II.7.13.) verglichen. Bei einer Abweichung der beiden Messungen wurde gegebenenfalls die Messuntergrenze (Endkonzentration; 10  $\mu\text{M}$  pro Well) nach unten bzw. nach oben verschoben. Klone, die eine höhere Extinktion als die Untergrenze wurden erneut in 20 ml 2YT-Medium angezogen und auf eine Tagatose-6-Phosphat-Synthese überprüft. Klone, die nach einem wiederholten Umsatz mit Dihydroxyaceton und D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zwischen 0 und 4 h, eine Synthese von Tagatose-6-Phosphat zeigten wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit einer Abwandlung der Methode ‚Ni-NTA Spin Kit‘ (Qiagen) aufgereinigt (siehe II.7.6.). Die gereinigten Enzyme (20  $\mu\text{g}$  pro 200  $\mu\text{l}$  Ansatz) wurden erneut auf Tagatose-6-Phosphat-Bildung aus Dihydroxyaceton (150 mM) und D, L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) überprüft.

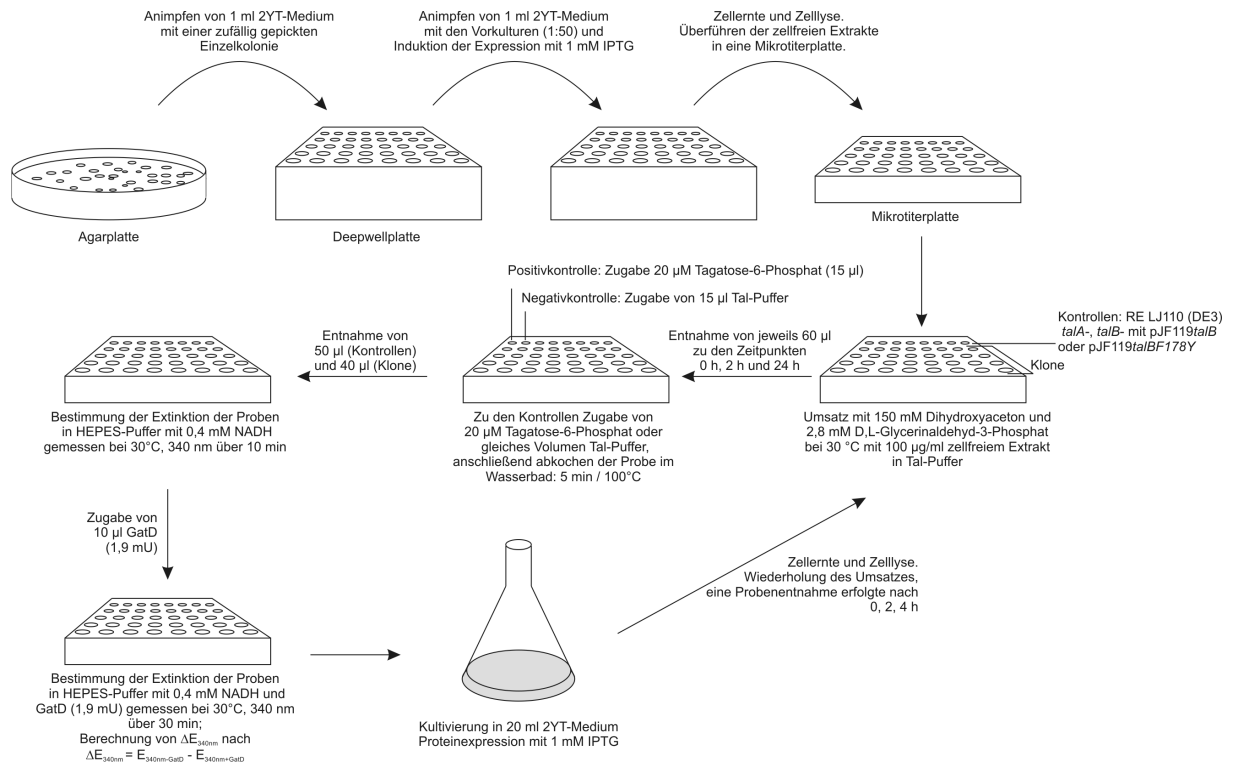


Abb. II.3: Screeningverfahren auf die Bildung von D-Tagatose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (150 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) als Substrate. Jeweils 84 zufällig gepickte Klone wurden von jeder Sättigungsmutagenesebank mit dem diskontinuierlichen Nachweis auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat überprüft. Positive Klone wurden in 20 ml 2YT-Medium rekultiviert. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschossen. Die Aktivitäten der zellfreien Extrakte wurden erneut diskontinuierlich gemessen.

### III. Ergebnisse

#### 1. Sättigungsmutagenese von *talB* zur Generierung von Enzymen zur Synthese von D-Fructose-6-Phosphat

TalB (EC 2.2.1.2) gehört zu den Transferasen und FSA zu den Lyasen (EC 4.1.2.X), beide sind Enzyme von *E. coli*. TalB überträgt eine DHA-Einheit von einem Donor auf einen Akzeptor [15]. FSA katalysiert die Kondensation von DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (D-GAP) zu D-Fructose-6-Phosphat (D-F6P) [66]. Bislang konnten die Aminosäuren, die für die unterschiedlichen Aktivitäten verantwortlich sind, nicht identifiziert werden. Einzelne Aminosäuren beider Enzyme wurden ausgetauscht und charakterisiert, aber keiner führte zur gewünschten Änderung in das jeweilig andere Enzym und teilweise waren die Muteine inaktiv [72-73]. Durch Mutagenesen soll eines der beiden Enzyme verändert werden, so dass Enzym-Varianten mit neuen und höheren Stereospezifitäten entstehen. Zusätzlich sollte das Enzym schnell und einfach aufzureinigen sein. Bei FSA führten ein N- und ein C-terminaler His-Tag zu einer verminderten Aktivität. Eine Hitzefällung ist zwar beim Wildtyp möglich, führte aber bei den Muteinen FSA Q59E, FSA Y131F, FSA Y131A zu einer Denaturierung der Enzyme. Zunächst wurde ausgetestet, ob TalB mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag als aktives Enzym aufgereinigt werden kann. Das Gen für *talB* wurde über den Vektor pET28a in den Vektor pJF119(EH) kloniert, damit die Expression von *talB* mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag möglich war. Der Vektor pJF119(EH) wurde aufgrund von günstigeren Eigenschaften ausgewählt. Bei erfolgter aktiver Aufreinigung von His<sub>6</sub>-TalB, sollte das *his<sub>6</sub>-talB*-Gen als Ausgangspunkt für Mutagenesen verwendet werden, um ein Enzym zu erhalten, das mit DHA und D,L-GAP, D-Fructose-6-Phosphat bildet.

##### 1.1. Überexpression des *talB*-Gens in *E. coli* und affinitätschromatographische Reinigung des korrespondierenden Proteins

Für die Expression des *talB*-Gens wurde das Konstrukt pJF119*talB*, das von S. Lakner angefertigt wurde, verwendet. Dieses wurde in den *E. coli* Stamm XL1Blue transformiert. Nach einer Expression des Gens wurde das Protein aus dem zellfreien Extrakt mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurde das aufgereinigte His<sub>6</sub>-TalB durch Zentrifugationskonzentratoren und mehrmaligem Pufferwechsel entsalzt. Durch SDS-PAGE-Analyse wurden Proben der zellfreien Extrakte und von gereinigtem Enzym analysiert (siehe Abb. III.1). His<sub>6</sub>-TalB konnte mit einer Reinheit von 97% aufgereinigt werden. Aus 1 g Nassgewicht konnte 10 mg aufgereinigtes Protein mit einer Aktivität von 65 U/mg gewonnen werden (siehe Tab. III.1). TalB ohne Tag besitzt einen  $V_{max}$ -Wert für D-Fructose-6-Phosphat von 60 U/mg mit D-Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor. Damit besitzt der N-terminale His<sub>6</sub>-



Tag keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms und die Grundvoraussetzung zur Mutagenese des *his<sub>6</sub>-talB*-Gens war gegeben.

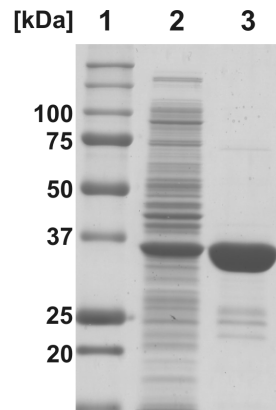


Abb. III.1: SDS-PAGE von den zellfreien Extrakten und dem angereicherten TalB. Vor und nach den jeweiligen Reinigungen wurden Proben (jeweils 10 µg Protein pro Spur) entnommen, diese wurden mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung angefärbt und deren molekulare Masse (His<sub>6</sub>-TalB: 37 kDa; die molekulare Masse wurde ermittelt mit ExPASy) wurde mit einem Proteinstandard der Firma Biorad (siehe II.1.) überprüft.

- Spur 1: Proteinstandard (Biorad, siehe II.1.),
- Spur 2: zellfreier Extrakt mit His<sub>6</sub>-TalB
- Spur 3: angereichertes His<sub>6</sub>-TalB

## 1.2. Mutagenese des *talB*-Gens

Zunächst wurde TalB und FSA mittels eines strukturbasierten Sequenzvergleichs miteinander verglichen [68]. Insgesamt wurden elf verschiedene Aminosäurereste von TalB ausgewählt, in denen sich die beiden Enzyme unterscheiden und die im aktiven Zentrum von TalB lokalisiert sind [128]. Die ausgewählten Aminosäuren sind entweder an der Katalyse beteiligt oder befinden sich in der Nähe von katalytisch aktiven Aminosäuren [17-18] (siehe Abb. III.2, Tab. III.1).

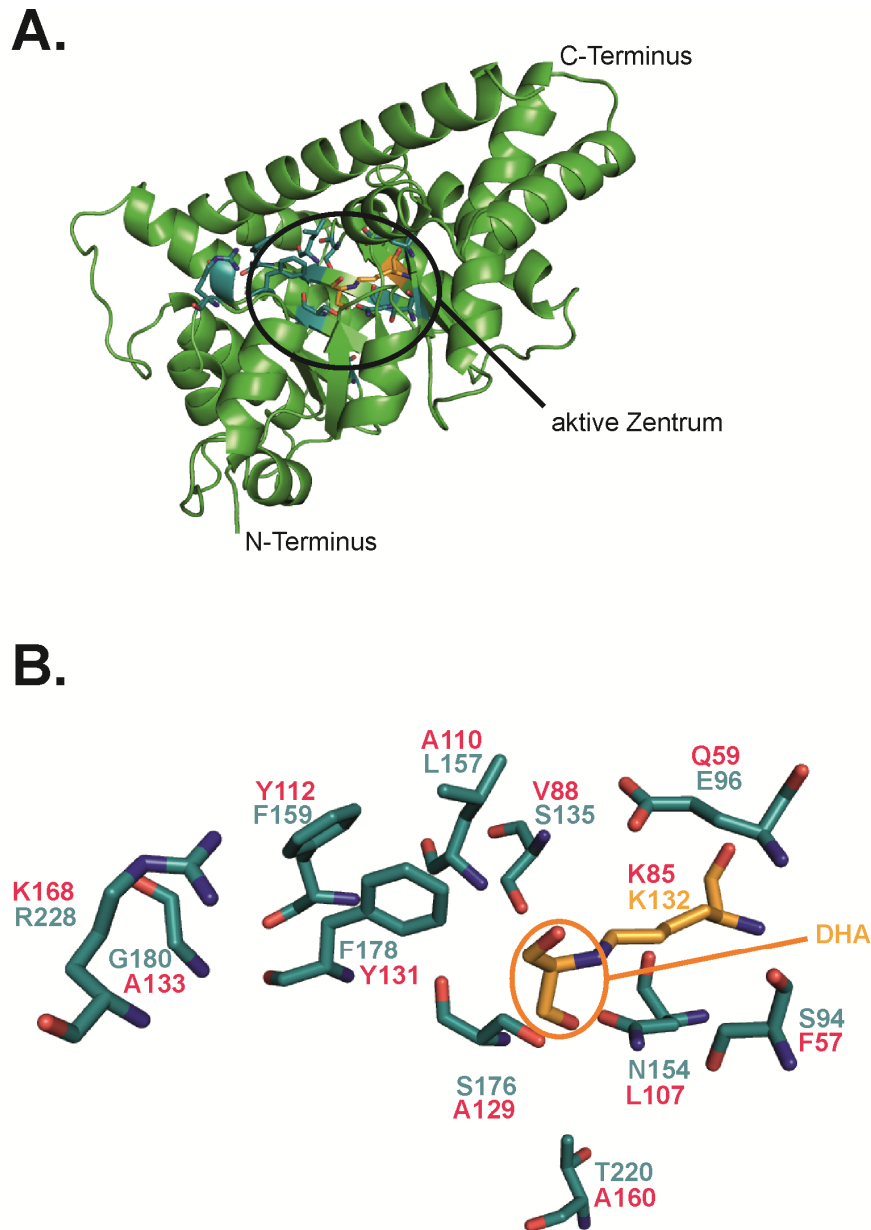


Abb. III.2: TalB versus FSA. Die Abbildungen wurden dargestellt mit PyMOL. A. Röntgenstruktur von TalB mit Blick auf das aktive Zentrum (pdb-Nr. 1UCW verändert nach [17],[18]). B. Elf verschiedene Aminosäurereste, die im aktiven Zentrum von TalB (grün) lokalisiert sind und die durch gerichtete Sättigungsmutagenese ausgetauscht werden sollten. In oranger Farbe ist Lys132 zu sehen das mit DHA das Schiff'sche Base Intermediat bildet. Die Aminosäurereste von FSA stehen in Rot bei den entsprechenden Aminosäureresten aus TalB.

Tab. III.1: Vergleich der elf Aminosäurereste von TalB und FSA, sowie deren Funktion in TalB und FSA [18].

TalB	FSA	Funktion
S94	F57	nicht bekannt, Lokalisation: aktives Zentrum, in der Nähe von katalytisch wichtigen Aminosäuren
E96	Q59	ist am Protonentransfer beteiligt, bildet eine Wasserstoffbrücke mit einem katalytisch aktiven Wassermolekül und stabilisiert so gemeinsam mit Thr156 (TalB) das Carbinolaminintermediat.
S135	V88	nicht bekannt, Lokalisation: aktives Zentrum, in der Nähe von katalytisch wichtigen Aminosäuren
N154	L107	Bildet eine Wasserstoffbrücke C1-OH-Gruppe. Ist bei FSA nicht möglich da hier eine hydrophobe Seitengruppe ist.
L157	A110	nicht bekannt, Lokalisation: aktives Zentrum, in der Nähe von katalytisch wichtigen Aminosäuren
F159	Y112	nicht bekannt, Lokalisation: aktives Zentrum, in der Nähe von katalytisch wichtigen Aminosäuren
S176	A129	Bildet eine Wasserstoffbrücke mit der C1-OH-Gruppe. Dies ist bei FSA nicht möglich, da hier eine polare Seitenkette lokalisiert ist.
F178	Y131	Bei TalB nicht bekannt. In FSA bildet der Rest eine Wasserstoffbrücke mit einem katalytisch aktiven Wassermolekül, gemeinsam mit Gln59, Thr109 (FSA) und stabilisiert damit wahrscheinlich das Carbinolaminintermediat.
G180	A133	nicht bekannt, Lokalisation: aktives Zentrum, in der Nähe von katalytisch wichtigen Aminosäuren
T220	A160	nicht bekannt, Lokalisation: aktives Zentrum, in der Nähe von katalytisch wichtigen Aminosäuren
R228	K168	Wahrscheinlich an der Bindung der Phosphatgruppe der Substrate beteiligt.

Durch Sättigungsmutagenese des *his<sub>6</sub>-talB*-Gens wurden die Aminosäurereste an den elf ausgewählten Positionen, absichtlich gegen die 19 anderen Aminosäurereste ausgetauscht (siehe II.6.4.). Dies erfolgte durch elf Polymerasekettenreaktion mit jeweils einem Primerpaar, die das degenerierte Primermotiv NNS enthielten. Zur Kontrolle der Qualität der Banken wurden stichprobenartig von einer Bank (TalBF178X) zufällig 30 Klone gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert und anschließend kommerziell sequenziert (siehe II.6.5.; Tab. 1.2.2).

Keines der 30 sequenzierten Plasmide besaß das wildtypische Basentriplett TTT, das für Phenylalanin codiert. Das Triplett TTT ist mit dem degenerierten Primermotiv NNS nicht möglich. Vier der 30 Klone besaßen eine Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes und vier Klone eine zusätzliche Mutation. Von den 32 möglichen Triplets kamen 16 verschiedene Triplets vor. Drei der 16 Triplets waren überrepräsentiert, nämlich TAC (Phe) mit 13 %, AAC (Asn) mit 10 % und AGC (Ser) mit 10 %. Die Triplets ACC (Thr), CGC (Arg) und GTG (Val)

kamen mit einer Häufigkeit von 7 % vor, die restlichen zehn Triplets kamen mit einer Häufigkeit von 3 % vor.

Tab. III.2: Dreißig isolierte Plasmide von zufällig gepickten Klonen der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178X wurden extern sequenziert (siehe II.6.5.). Im wildtypischen Enzym befindet sich an der Aminosäureposition 178 ein Phe mit dem Triplett TTT.

Triplett	Aminosäure	Anzahl
TTT (wt)	Phe (wt)	0
CGC	Arg	2
AAC	Asn	3
TGC	Cys	1
CAG	Gln	1
GAG	Glu	1
GGC	Gly	1
GGG	Gly	1
CTC	Leu	1
CCC	Pro	1
CCG	Pro	1
ACC	Thr	2
TAC	Tyr	4
AGC	Ser	3
UCG	Ser	1
GTG	Val	2
TAG	Stopp	1
Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes		4

### 1.3. Etablierung eines Farbnachweises von D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd im Mikrotitermaßstab

Für die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde der gekoppelte Enzymnachweis für die Kondensation von DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat auf den Mikrotitermaßstab übertragen und an einen Farbnachweis gekoppelt (siehe Abb. III.3). Für den Farbnachweis wurde Diaphorase von *Clostridium kluyveri* und NBT in 70% Dimethylformamid zugegeben. Die optimalen Konzentrationen an Diaphorase und NBT waren von Dr. A. K. Samland ausgetestet worden.

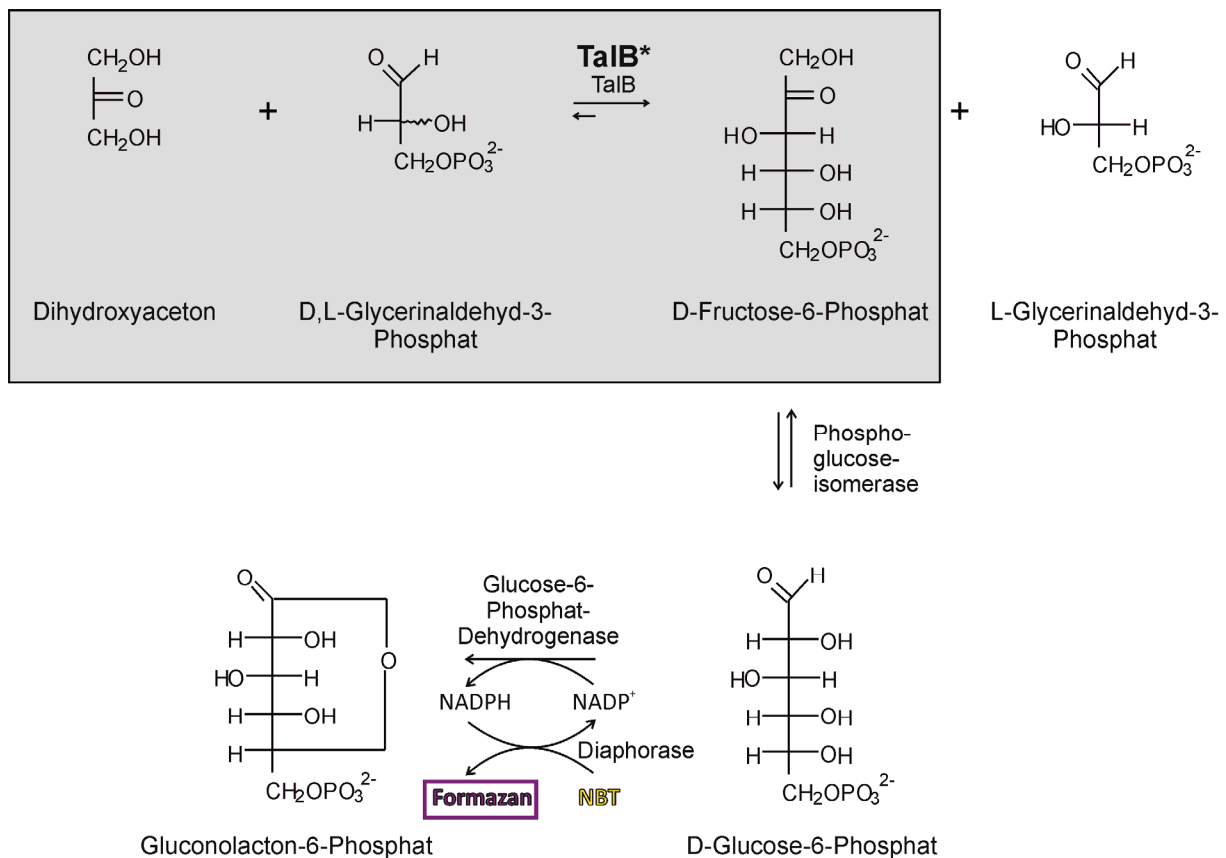


Abb. III.3: Prinzip des Farbnachweises der Synthese von D-Fructose-6-Phosphat. Durch eine neu gewonnene Enzymaktivität der Muteine entsteht aus Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat D-Fructose-6-Phosphat. Die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat wurde über die Bildung des lilafarbenen Formazans aus dem gelben NBT verfolgt.

Die Farbreaktion wurde bei 25°C durchgeführt, da bei höheren Temperaturen die Farbreaktion zu schnell erfolgt und dadurch unlösliches Formazan ausfällt. Bei 540 nm wurde die Zunahme des lilafarbenen Formazan verfolgt. Die Auswertung der Aktivitäten erfolgte im linearen Bereich der Reaktion, durch die Bildung an lilafarbenen Formazan (siehe Abb. III.4). Zunächst wurden aufsteigende Konzentration an zellfreiem Extrakt rekombinanter

*E. coli* XL1Blue der Positiv- (FSA) und Negativkontrolle (TalB) ausgetestet. Bei einer Auftragung der aufsteigenden Konzentration an aktivem Enzym (zellfreier Extrakt mit FSA) in Abhängigkeit der Steigungen, nimmt die Kurve in Abhängigkeit von aktivem Enzym so lange zu bis die Substrate die Reaktion limitieren (siehe Abb. III.5). Bis dahin ist das eingesetzte Enzym limitierend und die Entstehung des Produkts nimmt linear mit aufsteigender Konzentration an aktivem Enzym zu.

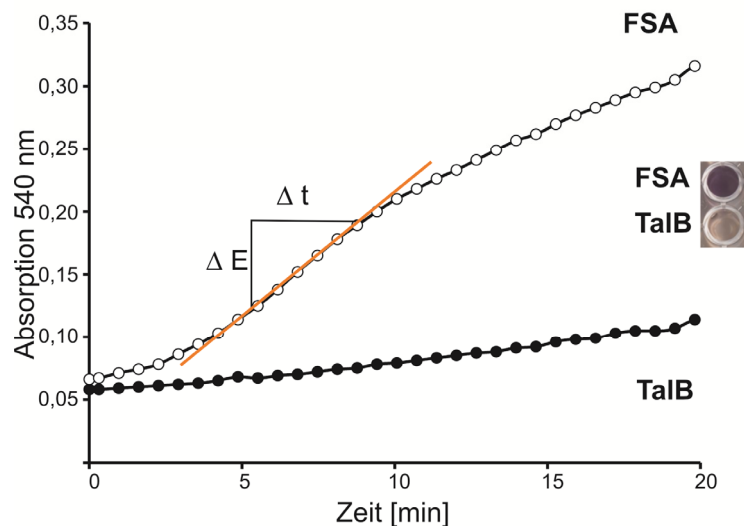


Abb. III.4: Kinetik zellfreier Extrakte von rekombinanten *E. coli* XL1Blue Zellen mit FSA (○ Positivkontrolle, lila) und TalB (● Negativkontrolle, gelb). Steigung der Kinetik wurde im linearen Bereich der Positivkontrolle bestimmt (orangefarbene Gerade).

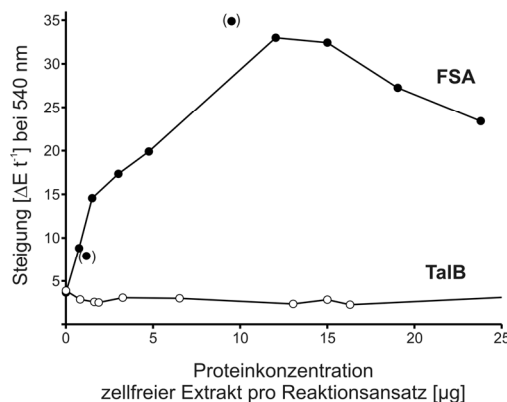


Abb. III.5: Steigungen ( $\Delta E \text{ t}^{-1}$ ) der zellfreien Extrakten von rekombinanten *E. coli* XL1Blue-Stämmen mit FSA (●Positivkontrolle) und TalB (○Negativkontrolle). Auftragung der Steigungen ( $\Delta E \text{ t}^{-1}$ ) in Abhängigkeit der Proteinkonzentrationen der zellfreien Extrakten pro Reaktionsansatz (Endvolumen: 200  $\mu\text{l}$ ).

Bei zellfreien Extrakten der Positivkontrolle bis zu  $\sim 10 \mu\text{g}$  Protein pro Reaktionsansatz (Endvolumen:  $200 \mu\text{l}$ ) nehmen die Steigungen linear zu. Wird mehr als  $10 \mu\text{g}$  zellfreier Extrakt der Positivkontrolle eingesetzt sind die Konzentrationen der Substrate DHA ( $50 \text{ mM}$ ) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat ( $2,8 \text{ mM}$ ) limitierend, die Steigung nimmt ab. Die Steigung der Negativkontrolle bleibt mit Steigungen von  $\Delta E \text{ t}^{-1}$ :  $\sim 3,5$  konstant und steigt bei höheren Konzentrationen ( $>38 \mu\text{g}$  pro Reaktionsansatz) an zellfreiem Extrakt nicht an. Zur Aktivitätsmessung der Klone von den elf Sättigungsmutagenesebanken wurde deswegen  $\sim 5 \mu\text{g}$  zellfreier Extrakt eingesetzt.

Die Kultivierung der einzelnen Klone und die Expression der Proteine erfolgte in Deepwellplatten mit  $1 \text{ ml}$  2YT-Medium. Vor der Zellernte und dem Zellaufschluss wurde die Zelldichte der Kulturen bei  $600 \text{ nm}$  bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Methode von Bradford [135] auf den Mikrotitermaßstab herunter skaliert. Dazu erfolgte eine Kalibrierung des Bradford-Reagenz mit Rinderserumalbumin mit Konzentrationen zwischen  $0 \mu\text{g}$  und  $10 \mu\text{g}$  pro Ansatz (Endvolumen:  $200 \mu\text{l}$ , siehe Abb. III.6). Die Bestimmung und Auswertung der Proteinkonzentration erfolgte im linearen Bereich der Messung zwischen  $0$  und  $6 \mu\text{g}$  Protein. Zur Normierung der Aktivitäten wurden die Steigungen der Reaktionen durch die eingesetzten Proteinmengen dividiert.

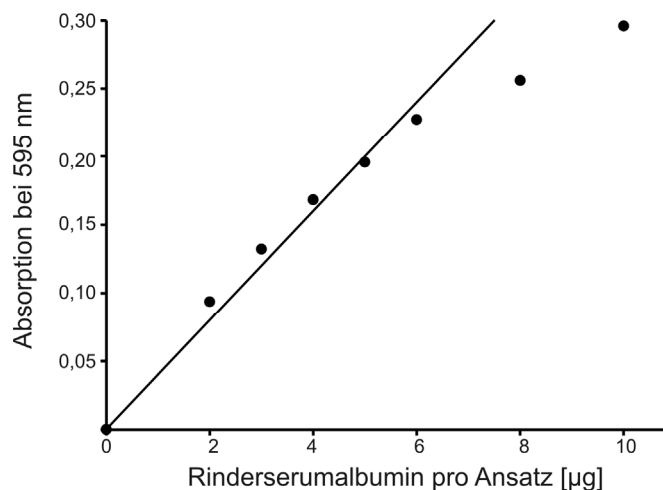


Abb. III.6: Kalibrierung der Bradford-Lösung mit Rinderserumalbumin in der Mikrotiterplatte. Es wurde zwischen  $0$  bis  $10 \mu\text{g}$  Rinderserumalbumin pro Ansatz ( $200 \mu\text{l}$ ) eingesetzt. Die Absorption wurde bei  $595 \text{ nm}$  gemessen.

1.4. Screeningverfahren auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat

Zunächst wurde jeweils eine Mikrotiterplatte mit jeweils 84 Klonen von jeder der elf Sättigungsmutagenesebanken auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat mit dem Farbnachweis überprüft (siehe II.7.13.; Abb. III.7). Nach der Polymerasekettenreaktion wurden die Sättigungsmutagenesebanken in den *E. coli*-Stamm XL1Blue transformiert. Für die Durchmusterung der der Banken wurde der gleiche *E. coli*-Stamm verwendet.

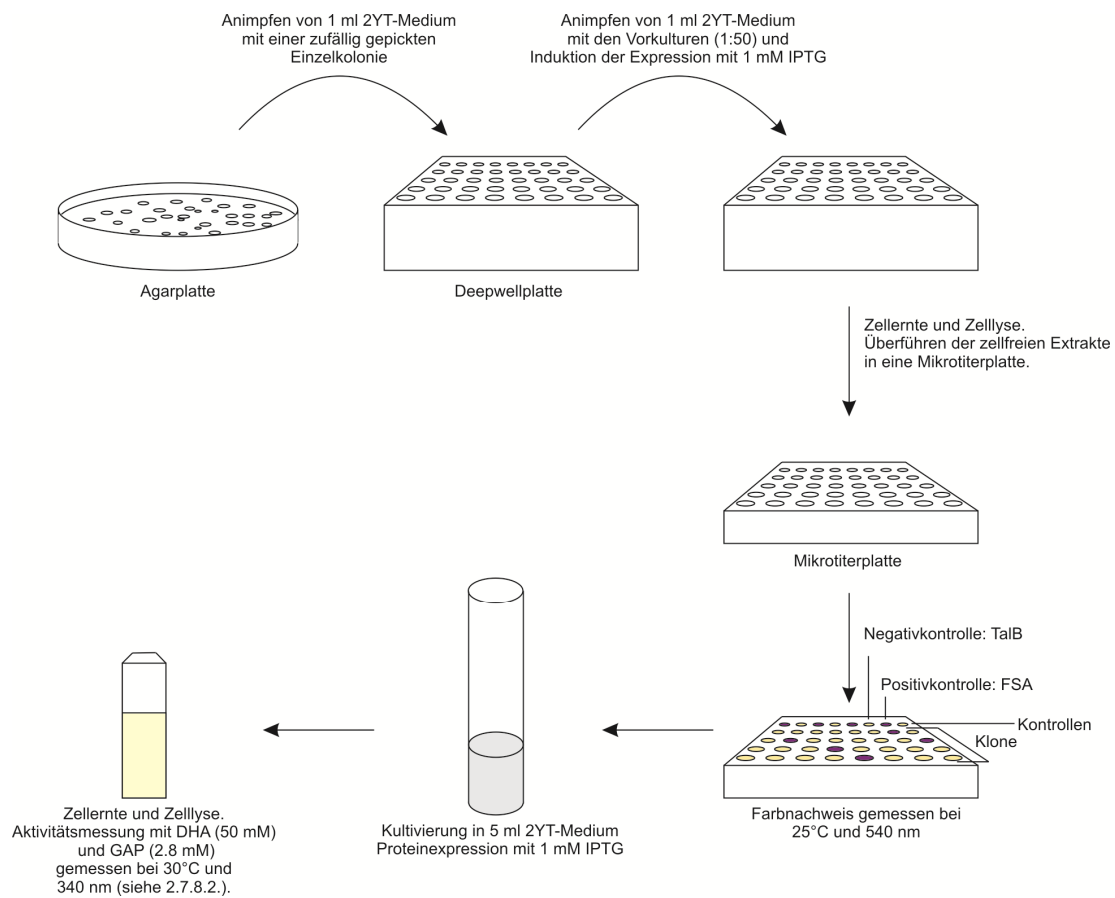


Abb. III.7: Screeningverfahren auf Aktivität mit Dihydroxyaceton (50 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) als Substrate. Jeweils 84 zufällig gepickte Klone wurden von jeder Sättigungsmutagenesebank mit dem Farbnachweis auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat (siehe II.7.13.) überprüft. Positive Klone wurden in 5 ml 2YT-Medium erneut angezogen. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen. Die Aktivitäten der zellfreien Rohextrakte wurden bei 340 nm in der Küvette bei 30°C überprüft (siehe II.7.8.).

Nur in der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178X wurden aktive Klone gefunden (siehe Abb. III.8). Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass alle möglichen 19 Aminosäureaustausche abgedeckt waren wurden von dieser Bank insgesamt 336 Klone untersucht. Klone, die eine zweimal höhere Aktivität als die Negativkontrolle zeigten, wurden erneut in 5 ml 2YT-Medium kultiviert und auf eine FSA-Aktivität in der Küvette überprüft.



Von den 336 überprüften Klonen bildeten 19 aus Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat D-Fructose-6-Phosphat. Von diesen 19 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und diese anschließend sequenziert. Alle 19 Klone besaßen an der Aminosäureposition 178 ein Tyrosin (TAC) anstatt des wildtypischen Phenylalanins (TTT). Alle sequenzierten Plasmide besaßen keine weiteren Nukleotidaustausche.

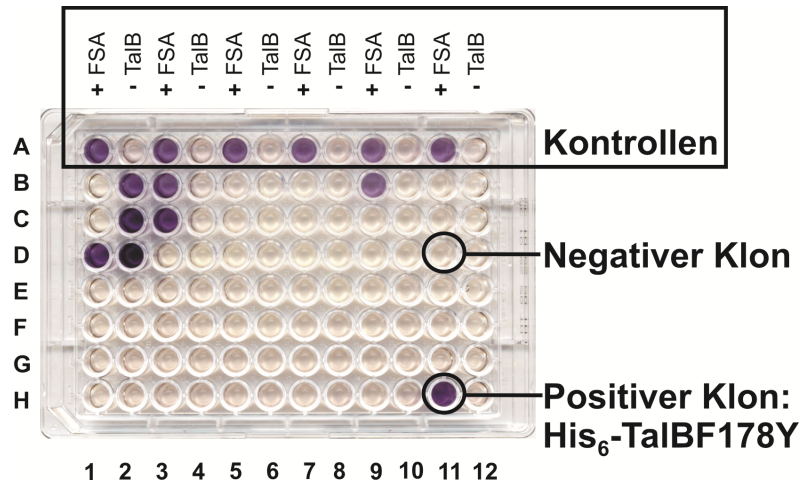


Abb. III.8: 84 zufällig gepickte Klone der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178X (Platte 3), die auf eine DHA-abhängige Aldolbildung mit dem Farbnachweis auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat überprüft wurden (verändert nach [128]). Die Synthese von D-F6P aus DHA und D-GAP wurde durch einen Enzym gekoppelten Farbnachweis visualisiert. In der Reihe A befinden sich die Kontrollen (Positivkontrolle: zellfreie Extrakte des rekombinanten *E. coli*-Stammes pJF119*fsa*; Negativkontrolle: zellfreie Extrakte des rekombinanten *E. coli*-Stammes pJF119*talB*), in den Reihen B bis H die zellfreien Extrakte, der zufällig gepickten Klone.

Die positiven Klone zeigen eine lila Farbe (Abb. 1.4.2: D1, B-D2, B/D3, B9, H11), alle negativen Klone zeigen eine zartgelbe Farbe. Alle positiven Muteine besitzen den gleichen Aminosäure Austausch von Phe nach Tyr an der Position 178. In den anderen zehn Banken der Positionen Ser94, Glu96, Ser135, Asn154, Leu157, Phe159, Ser176, Gly180, Thr220 und Arg228 konnten keine positiven Klone gefunden werden. Folglich führt nur ein Aminosäureaustausch an der Position Phe178 zu einer Erhöhung der FSA Aktivität.

### 1.5. Reinigung von TalB, TalBF178Y und FSA

Bei dem Screening von elf Sättigungsmutagenesebanken der TalB auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat wurden in der Banken TalBF178Y 19 Klone gefunden, die alle den gleichen Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr besaßen und eine deutlich höhere Aktivität als die Negativkontrolle zeigte. Für eine genauere Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der neuen TalB-Variante, TalBF178Y, wurde His<sub>6</sub>-TalB (TalB), His<sub>6</sub>-TalBF178Y (TalBY) und FSA aufgereinigt.

Zur Charakterisierung von TalBY wurde das Mutein und der Wildtyp mit einer Reinheit von ~ 97 % mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (II.7.6, siehe Abb. III.9; Tab. III.3 A. + B.). Aus 1 g Nassgewicht rekombinanter *E. coli* Zellen wurden ungefähr 10 mg TalB bzw. 9 mg TalBY angereichert. Neben TalB wurde FSA als Referenzprotein mit einer Reinheit von ~ 98 % durch Hitzefällung und Anionenaustauschchromatographie angereichert (siehe Abb. III.3 Tab. III.4 C.).

Zur Kristallisation und Analyse der Röntgenstruktur des Muteins TalBY wurde das Protein am ÄKTA Purifier (siehe II.2.) mit einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Säule (20/10) und einem linearen Imidazolgradienten von 0 – 500 mM Imidazol (siehe II.7.6.), mit einer Reinheit von 99 % aufgereinigt (siehe Abb. III.9, Tab. III.2). Der Unterschied zur Reinigung zuvor bestand darin, dass TalBY mit einem linearen Gradienten am ÄKTA Purifier und nicht mit einem Stufengradienten, sowie mit einem größeren Säulenvolumen an Ni-NTA-Agarose. Für eine größere Proteinausbeute und Reinheit wurde TalBY am ÄKTA Purifier aufgereinigt. Nach der Reinigung wurde TalBY an T. Sandalova vom Karolinska Institutet in Stockholm, Schweden zur Klärung der Röntgenstruktur bereitgestellt (siehe Abb. III.9). Die jeweiligen Reinigungsprotokolle erwiesen sich als reproduzierbar.

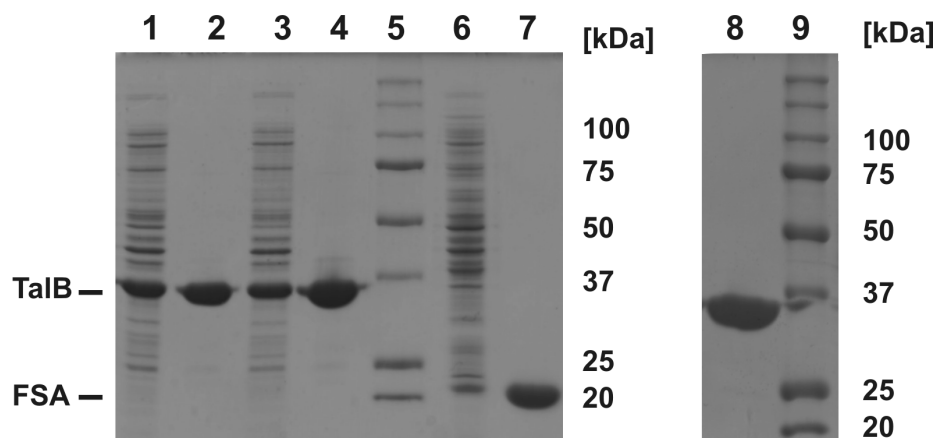


Abb. III.9: SDS-PAGE von den zellfreien Extrakten und den angereicherten Enzymen TalB, TalBY und FSA (verändert nach [128]). Vor und nach den jeweiligen Reinigungen wurden Proben (jeweils 10 µg Protein pro Spur) entnommen, diese wurden mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung angefärbt und deren molekulare Masse (TalB und TalBY: 37 kDa; FSA: 24 kDa; die molekulare Masse wurde ermittelt mit ExPASy) wurde mit einem Proteinstandard der Firma Biorad (siehe II.1.) überprüft.

Spur 1: zellfreier Extrakt mit TalB

Spur 2: angereichertes TalB

Spur 3: zellfreier Extrakt mit TalBY

Spur 4: angereichertes TalBY

Spur 5 + 9: Proteinstandard (Biorad, siehe II.1.)

Spur 6: zellfreier Extrakt mit FSA

Spur 7: angereicherte FSA

Spur 8: angereichertes TalBY (für eine Kristallisation)

Tab. III.3: Reinigungsschema für TalB (A.) und TalBY (B.) aus rekombinanten *E. coli* XL1Blue pJF119talB bzw. pJF119talBF178Y, FSA (C.) aus rekombinanten *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pET16fsa-Zellen für jeweils einer repräsentativen Reinigung. Bei A., wurde die Tal-Aktivität von TalB (siehe II.7.8.) gemessen, bei B. und C., wurde die FSA-Aktivität von TalBY und FSA (siehe II.7.8.) bestimmt.

Protein	Gesamtaktivität [U]	Proteinmenge [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
A. His <sub>6</sub> -TalBwt					
Nachweisreaktion			Tal		
Rohextrakt	2708	113	24	1	100
Ni-NTA-Reinigung	1629	25	65	2,7	22
B. His <sub>6</sub> -TalBF178Y					
Nachweisreaktion			FSA		
Rohextrakt	256	170	1,5	1	100
Ni-NTA-Reinigung	68	11	6,5	4,3	27
C. FSA					
Nachweisreaktion			FSA		
Rohextrakt	171	104	1,7	1	100
Hitzefällung	86	17	5,2	3,1	50
Q-Sepharose HP	58	7,5	7,8	4,6	34

Tab. III.4: Reinigungsschema für TalBY aus rekombinanten *E. coli* XL1Blue pJF119talBF178Y zur Kristallisation. Die FSA-Aktivität von TalBF178Y (siehe II.7.8.2.) bestimmt.

Protein	Gesamtaktivität [U]	Proteinmenge [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
His <sub>6</sub> -TalBF178Y					
Nachweisreaktion			FSA		
Rohextrakt	184	163	1,1	1	100
Ni-NTA-Reinigung (ÄKTA Purifier)	180	20	9	8	12

1.6. Charakterisierung von TalBY

Gerichteter Austausch der Aminosäure Phe 189 der humanen Transaldolase und Aufreinigung der humanen Transaldolasen hTal und hTalF189Y

Die Transaldolasen von *E. coli* und des Menschen (TALDO1, hTal) gehören beide zu der Unterfamilie 1 und besitzen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit [5]. Zur Überprüfung, ob der Aminosäureaustausch von Phe zu Tyr wie bei TalB auch bei anderen Transaldolasen zu einer Veränderung der Enzymaktivität führt, wurde die cDNA der humanen Transaldolase (hTal) von Dr. A. K. Samland in pGEXTN\* kloniert. Durch gerichtete Mutagenese wurde die Aminosäure Phe in Tyr ausgetauscht. Das wildtypische Enzym GST-hTal (hTal) und das Mutein GST-hTalF189Y (hTalY) wurde mittels GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der GST-Tag wurde durch Proteaseverdau entfernt. Beide Enzyme konnten mit einer Reinheit von ~ 97 % angereichert werden (siehe Abb. III.10, Tab. III.5). Aus je 1 g Nassgewicht rekombinanten *E. coli*-LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> Stämmen wurde 0,5 mg hTal bzw. 0,9 mg hTalF189Y angereichert (siehe Abb. III.10, Tab. III.5).

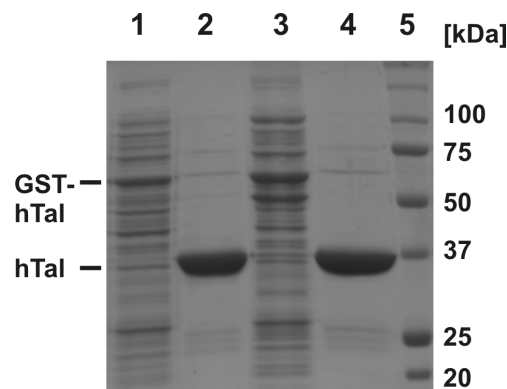


Abb. III.10: SDS-PAGE von den zellfreien Extrakten und den angereicherten Enzymen hTal und hTalY (verändert nach [128]). Vor und nach den jeweiligen Reinigungen wurden Proben (jeweils 10 µg Protein pro Spur) entnommen, diese wurden mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung angefärbt und deren molekulare Masse (GST-hTal und GST-hTalY: 65 kDa; hTal und hTalY: 37,5 kDa; ermittelt mit ExPASy) wurde mit einem Proteinstandard der Firma Biorad (siehe II.1.) überprüft.

Spur 1: zellfreier Extrakt mit hTal,  
 Spur 2: angereicherte hTal,  
 Spur 3: zellfreier Extrakt mit hTalY

Spur 4: angereichertes hTalY  
 Spur 5: Proteinstandard (Biorad, siehe 2.1.)

Tab. III.5: Reinigungsschema für hTal (A.) und hTalY (B.) aus rekombinanten *E. coli* LJ110 *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> pGEXTN\**htal* bzw. pGEXTN\**htalF189Y*-Zellen von jeweils einer repräsentativen Reinigung. Bei A., wurde die Tal-Aktivität von hTal (siehe II.7.8.) gemessen und bei B., die FSA-Aktivität von hTalY (siehe II.7.8.).

Protein	Gesamt- aktivität [U]	Protein- menge [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
A. hTal					
Nachweisreaktion			Tal		
Rohextrakt	356	168	2,1	1	100
Glutathionsepharose 4B	197	9	21	10	5
B. hTalF189Y					
Nachweisreaktion			FSA		
Rohextrakt	58	233	0,3	1	100
Glutathionsepharose 4B	20	8	2,5	8,3	3

Immundetektion von TalB, TalBY, hTal und hTalY

TalB von *E. coli* und hTal des Menschen haben eine hohe strukturelle Ähnlichkeit miteinander. Je nachdem wie ähnlich sich die Strukturen der beiden Enzyme sind, könnte ein polyklonaler Antikörper, der gegen eines der beiden Enzyme gerichtet ist, das jeweilig andere erkennen. Dies ist vor allem interessant, weil ein Zusammenhang der humanen Transaldolase mit Multiple Sklerose diskutiert wird [5]. Bei MS-Patienten können im Blutserum und im *Liquor cerebrospinalis* Antikörper gegen hTal gefunden werden, die rekombinante hTal inaktivieren können [28-30]. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob polyklonale Antikörper aus Meerschweinchen, die gegen die bakterielle TalB gerichtet sind auch hTal, hTalY und TalBY erkennt (siehe II.7.5.; siehe Abb. III.11).

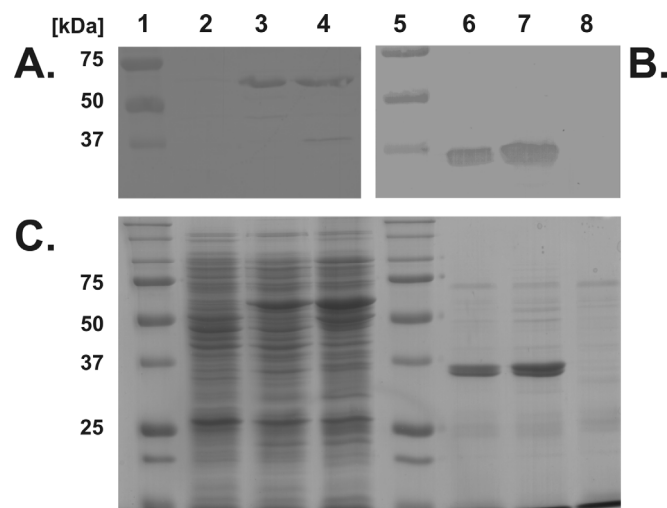


Abb. III.11: Immundetektion (A. + B.) und SDS-PAGE (C.) von zellfreien Extrakten der rekombinanten *E. coli* LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> mit TalB, TalBY, hTal und hTalY (verändert nach [128]). Proben von den zellfreien Extrakten (5 µg pro TalB-Variante, 15 µg pro GST-hTal-Variante) wurden durch ein 12 %-SDS-Gel voneinander getrennt. Die Proteine wurden entweder durch Coomassie-Färbung angefärbt (C.) oder auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Antikörper gegen TalB detektiert (A. + B.). Deren molekulare Masse (GST-hTal, GST-hTalY: 65 kDa; TalB, TalBY: 37 kDa; ermittelt mit ExPASy) wurde mit einem Proteinstandard der Firma Biorad (siehe II.1) verglichen.

- Spur 1 + 5: Proteinstandard (Biorad, siehe 2.1.)
- Spur 2: zellfreier Extrakt + Leervektor (pGEXTN\*)
- Spur 3: zellfreier Extrakt + GST-hTal
- Spur 4: zellfreier Extrakt + GST-hTalY
- Spur 6: zellfreier Extrakt + Leervektor (pJF119EH)
- Spur 7: zellfreier Extrakt + TalB
- Spur 8: zellfreier Extrakt + TalBY

Mittels Westernblot und Immundetektion konnten in den zellfreien Extrakten rekombinanter *E. coli* LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup>, sowohl die bakteriellen TalB Varianten wie auch die humanen Transaldolasevarianten nachgewiesen werden. Somit erkannte der gegen die *E. coli* TalB gerichtete polyklonale Antikörper neben TalBY, auch GST-hTal und GST-hTalY.

Mit den gereinigten Enzymen wurde deren native Masse durch Größenausschlusschromatographie (siehe II.7.7.) bestimmt. TalBY zeigte ein ähnliches

Laufverhalten auf einer Superdex 200 pg - Säule wie das wildtypische Enzym und liegt damit auch als Dimer vor. hTal und hTalY zeigten auf der gleichen Säule ebenfalls ein ähnliches Laufverhalten wie TalB. Die bestimmte native Masse der beiden hTals beträgt  $77 \pm 10$  kDa, bei einer mit ExPASy ermittelten Größe der Monomere von hTal mit 37,5 kDa entspricht dies einem Dimer.

Bestimmung der kinetischen Konstanten von TalBY, hTal und hTalY

Durch den Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr bei TalB wurde eine verbesserte FSA-Aktivität gewonnen. Die Auswirkungen dieses Aminosäureaustausches sollte durch die Bestimmung der kinetischen Konstanten von TalB, TalBY und FSA näher untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob der Aminosäureaustausch, Phe nach Tyr, in der humanen Transaldolase (Position 189), auch zu einer verbesserten FSA-Aktivität führt. Die Kinetiken für die FSA- und die Tal-Reaktion wurde mit den gereinigten Enzymen, wie im Material und Methodenteil beschrieben durchgeführt (siehe II.7.8.; Abb. III.12-14; Tab. III.6 + 7).

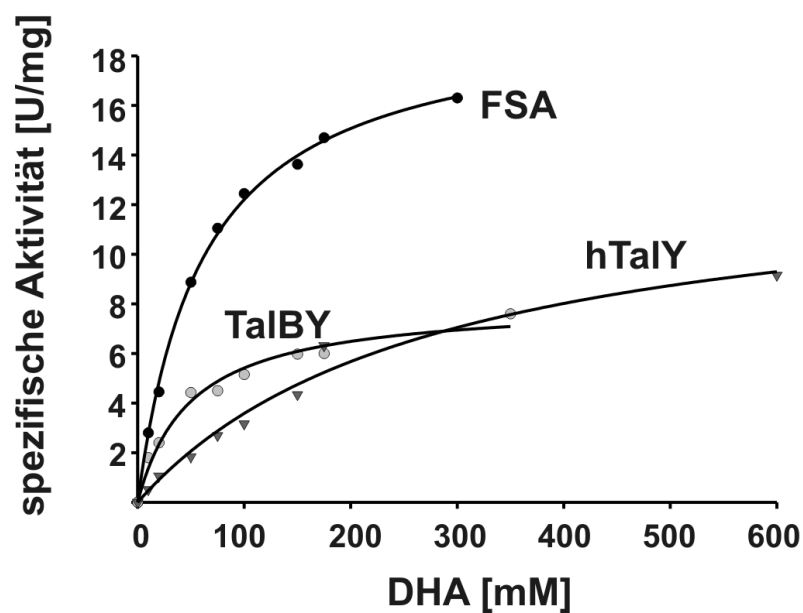


Abb. III.12: Direkte Auftragung der Messwerte für die Bildung von D-Fructose-6-Phosphat der Enzyme FSA (●), TalBY (○) und hTalY (▼) als Michaelis-Menten-Funktion (verändert nach [128]). Die Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat wurde konstant bei 2,8 mM gehalten und die Konzentration an Dihydroxyaceton variierte von 10 mM bis 350 mM (FSA, TalBY) und 10 mM bis 600 mM (hTalY). Pro Molekül D-Fructose-6-Phosphat wurde ein Molekül NADPH ( $\text{NADP}^+$  0,5 mM) gebildet (siehe II.7.8).

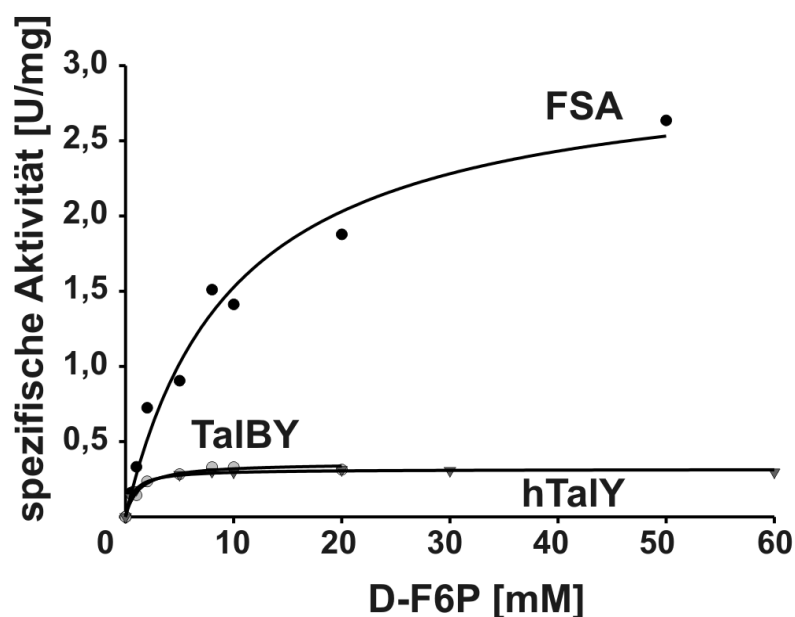


Abb. III.13: Direkte Auftragung der Messwerte für die Spaltung von D-F6P der Enzyme FSA (●), TalBY (○) und hTalY (▼) als Michaelis-Menten-Funktion (verändert nach [128]). Die D-Fructose-6-Phosphat Konzentration variierte von 1 mM bis 50 mM (FSA), 1 mM bis 20 mM (TalBY) und 0,25 mM bis 60 mM (hTalY). Pro gespaltenem Molekül D-Fructose-6-Phosphat entsteht ein Molekül D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und daraus ein Molekül NAD<sup>+</sup> (NADH 0,5 mM; siehe II.7.8).

Tab. III.6: Kinetische Konstanten für TalBY von *E. coli* und hTalY von *H. sapiens sapiens*, sowie für FSA von *E. coli* für die Bildung und Spaltung von D-F6P (verändert nach [128]).

Protein		TalB	TalBY	FSA	hTal	hTalY
Reaktion:						
1. D-F6P Bildung aus DHA und D,L- GAP	$V_{\max}$ [U/mg]	n. b. <sup>d</sup>	$7 \pm 1^c$	$20 \pm 1^c$	n. d. <sup>e</sup>	$14^a$
	$k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]	n. b. <sup>d</sup>	$4,3 \pm 0,7$	$7,6 \pm 0,5$	n. d. <sup>e</sup>	8,9
	$K_m$ (DHA) [mM]	n. b. <sup>d</sup>	$30 \pm 4$	$62 \pm 7^c$	n. d. <sup>e</sup>	$340^a$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	n. b. <sup>d</sup>	$150 \pm 30^c$	$130 \pm 8$	n. d. <sup>e</sup>	26
2. D-F6P-Spaltung in DHA und D-GAP	$V_{\max}$ [U/mg]	n. d. <sup>e</sup>	$0,36 \pm 0,05^c$	$3,4 \pm 0,7^c$	n. d. <sup>e</sup>	$0,32 \pm 0,04^b$
	$k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]	n. d. <sup>e</sup>	$0,22 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,3$	n. d. <sup>e</sup>	$0,21 \pm 0,02$
	$K_m$ (F6P) [mM]	n. d. <sup>e</sup>	$1,5 \pm 0,2^c$	$12 \pm 3^c$	n. d. <sup>e</sup>	$0,76 \pm 0,11^b$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	n. d. <sup>e</sup>	$150 \pm 26$	$130 \pm 35$	n. d. <sup>e</sup>	$270 \pm 11$

<sup>a</sup> Durchschnitt von 2 unabhängigen Messungen (Abweichung  $\leq 14\%$ )

<sup>b</sup> Durchschnitt von 3 unabhängigen Messungen

<sup>c</sup> Durchschnitt von 4 unabhängigen Messungen

<sup>d</sup> n. b., nicht bestimmt; Aktivität  $\leq 0,1$  U/mg mit 50 mM DHA und 2,8 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat

<sup>e</sup> n. d., nicht detektierbar; Aktivität  $< 0,1$  U/mg

<sup>f</sup> wurde bestimmt als Wechselzahl pro aktives Zentrum, d. h. pro monomerer Untereinheit

TalBY wurde in dem Screening auf die Kondensation von DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat gefunden. In dieser Reaktion besitzt das Enzym, TalBY einen  $V_{\max}$ -Wert für DHA, der um ein 70faches größer ist als die spezifische Aktivität von TalB ( $\leq 0,1$  U/mg) mit DHA (50 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM). Damit konnte eine bestehende sehr niedrige Aktivität von TalB durch nur einen Aminosäureaustausch deutlich erhöht werden. FSA besitzt unter den gemessenen



Bedingungen eine 2,5mal höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit als TalBY. Damit ist die katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) bei TalBY niedriger als bei FSA. Die katalytische Konstante berechnet sich aus der maximalen Umsatzgeschwindigkeit, die dividiert wird durch die eingesetzte Enzymkonzentration. Aus der katalytischen Konstante dividiert durch die Anzahl an katalytischen Zentren lässt sich dann die Wechselzahl bestimmen. Die Wechselzahl gibt Aufschluss über die gebildeten Mole Produkt pro aktives Zentrum und pro Zeiteinheit. Je höher die Wechselzahl ist, desto mehr Produkt wird pro aktives Zentrum und pro Zeiteinheit gebildet. FSA besitzt einen zweimal höheren  $K_m$  ( $62 \pm 7$  mM) als TalBY ( $30 \pm 4$  mM). Demzufolge ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit von TalBY zwar niedriger als die von FSA, gleichzeitig ist die Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) von TalBY niedriger als die von FSA. Daraus ergibt sich, dass die katalytische Effizienz beider Enzyme ähnlich ist. Die katalytische Effizienz berechnet sich aus der katalytischen Konstante dividiert durch den  $K_m$ -Wert. Die katalytische Effizienz ist ein Indikator für die Substratspezifität eines Enzyms. Je höher die katalytische Effizienz desto höher ist die Substratspezifität eines Enzyms. Damit besitzt TalBY und FSA eine ähnliche Substratspezifität. Mit hTal wurde keine Aktivität mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat gemessen ( $< 0,1$  U/mg). Das Mutein hTalY besitzt eine zweimal höhere Umsatzgeschwindigkeit als TalBY. Aber hTalY besitzt mit 340 mM einen deutlich höheren  $K_m$ -Wert für DHA als TalBY. Aus diesem Grund sind die katalytische Effizienz und damit die Substratspezifität von hTalY, ungefähr fünfmal niedriger als bei FSA und TalBY. Neben der Synthese von D-Fruktose-6-Phosphat besteht die Möglichkeit, dass Stereoisomere von D-Fruktose-6-Phosphat gebildet wurden. Mögliche Stereoisomere wie D-Psicose-6-Phosphat, D-Tagatose-6-Phosphat und D-Sorbose-6-Phosphat konnten durch diesen enzymatischen Nachweis nicht detektiert werden.

In der Rückreaktion, der Spaltung von D-Fruktose-6-Phosphat in DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zeigt TalBY und hTalY eine niedrigere maximale Umsatzgeschwindigkeit als FSA ( $3,4 \pm 0,7$  U/mg). TalB und hTal zeigen ohne Akzeptor keine Aktivität mit D-Fruktose-6-Phosphat ( $< 0,1$  U/mg). Der  $K_m$ -Wert von FSA für D-F6P ohne Akzeptor ist mit  $12 \pm 3$  mM deutlich höher als bei beiden Muteinen (TalBY:  $1,5 \pm 0,2$  mM; hTalY:  $0,76 \pm 0,11$  mM). Die katalytische Effizienz von TalBY und FSA sind ähnlich, wohingegen die katalytische Effizienz von hTalY beinahe doppelt so hoch ist. Demzufolge ist die Substratspezifität für D-Fruktose-6-Phosphat in der Spaltungsreaktion von hTalY höher als von TalBY und FSA.

Aus diesen kinetischen Konstanten wurde deutlich, dass der Aminosäureaustausch, Phe nach Tyr, in TalB und hTal zu einer höheren FSA-Aktivität führte als in den beiden wildtypischen Enzymen. Es sollte überprüft werden, ob und wie sich die Tal-Aktivität durch den Aminosäureaustausch verändert hat.

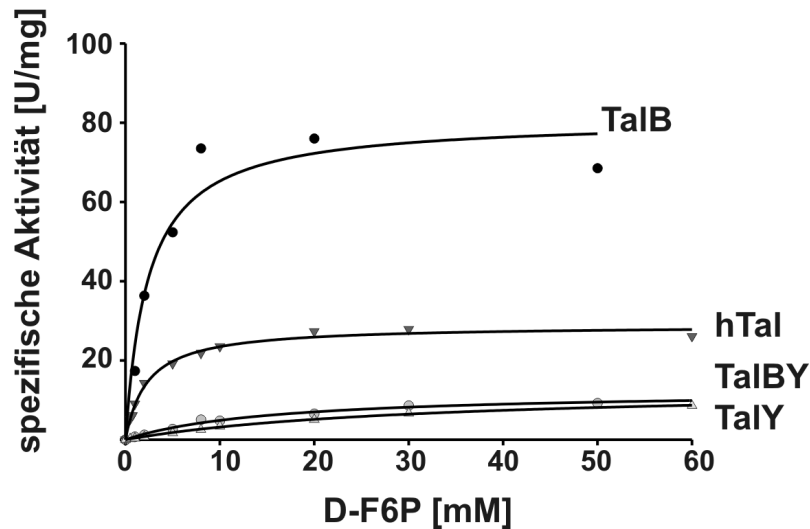


Abb. III.14: Direkte Auftragung der Messwerte für D-Fruktose-6-Phosphat in der Transaldolase-Reaktion für die Enzyme TalB (●), TalBY (○), hTal (▼) und hTalY (△) als Michaelis-Menten-Funktion (verändert nach [128]). D-Fruktose-6-Phosphat wurde als Donor verwendet und D-E4P als Akzeptor (siehe II.7.8). Die Konzentration an D-Fruktose-6-Phosphat variierte von 1 mM bis 50 mM (TalB), 1 mM bis 150 mM (TalBY) und von 0,5 mM bis 60 mM (hTal, hTalY). Die Konzentration an D-Erythrose-4-Phosphat wurde konstant bei 2 mM gehalten. D-Erythrose-4-Phosphat lag sättigend vor, weil der  $K_m$ -Wert von TalB 90  $\mu\text{M}$  beträgt [15]. Pro Molekül D-Fruktose-6-Phosphat wird eine DHA-Einheit auf D-Erythrose-4-Phosphat übertragen, dabei entsteht pro übertragener Dihydroxyaceton-Einheit ein Molekül D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und daraus ein Molekül  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$  0,5 mM).

Tab. III.7: Kinetische Konstanten für TalB und TalBY von *E. coli* und hTal und hTalY von *H. sapiens sapiens* für D-F6P in der Transaldolase-Reaktion (verändert nach [128]).

Protein		TalB	TalBY	FSA	hTal	hTalY
Reaktion:						
1. S7P und D-GAP	$V_{\max}$ [U/mg]	$85 \pm 9^b$	$14 \pm 1^c$	n. b. <sup>d</sup>	$29^a$	$12 \pm 2^b$
Bildung aus D-F6P	$k_{\text{cat}}^e$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$53 \pm 6$	$8,8 \pm 0,5$	n. b. <sup>d</sup>	18	$7,4 \pm 1,1$
und D-E4P	$K_m$ (F6P) [mM]	$3,0 \pm 0,2^b$	$22 \pm 5^c$	n. b. <sup>d</sup>	$2,3^a$	$27 \pm 4^b$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$(18 \pm 3) \cdot 10^3$	$(0,53 \pm 0,13) \cdot 10^3$	n. b. <sup>d</sup>	$8,0 \cdot 10^3$	$(0,28 \pm 0,03) \cdot 10^3$

<sup>a</sup> Durchschnitt von 2 unabhängigen Messungen (Abweichung  $\leq 15\%$ )

<sup>b</sup> Durchschnitt von 3 unabhängigen Messungen

<sup>c</sup> Durchschnitt von 5 unabhängigen Messungen

<sup>d</sup> n. b., nicht bestimmt; Aktivität  $< 0,1$  U/mg, keine Zunahme der Aktivität bei Zugabe von D-Erythrose-4-Phosphat (2 mM) zu D-Fruktose-6-Phosphat (10 mM)

<sup>e</sup> wurde bestimmt als Wechselzahl pro aktives Zentrum, d. h. pro monomerer Untereinheit

Für TalBY und hTalY wurden die kinetischen Konstanten in der Transaldolase-Reaktion für D-Fruktose-6-Phosphat mit D-Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor bestimmt. Bei dieser Reaktion entsteht D-Sedoheptulose-7-Phosphat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. In einem gekoppelten Enzym-Nachweis wurde die Bildung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat indirekt über die Oxidation von  $\text{NAD}^+$  gemessen. TalBY besitzt eine sechsmal niedrigere maximale Umsatzgeschwindigkeit als das wildtypische Enzym und einen höheren  $K_m$ -Wert von  $22 \pm 5$  mM. Dementsprechend ist in dieser Reaktion die katalytische Effizienz, d. h. die

Substratspezifität von TalBY gegenüber TalB, um mehr als ein Vierzigfaches vermindert. Die wildtypische humane Transaldolase besitzt einen dreimal niedrigeren  $V_{\max}$ -Wert für D-Fructose-6-Phosphat als die Transaldolase von *E. coli*. Der Aminosäureaustausch in der humanen Transaldolase führte ebenfalls zu einem verminderten  $V_{\max}$ -Wert von  $12 \pm 2$  U/mg. Die  $K_m$ -Werte der wildtypischen humanen Transaldolase und hTalY für D-Fructose-6-Phosphat in der Transferreaktion sind vergleichbar mit den jeweiligen  $K_m$ -Werten der beiden bakteriellen Transaldolasen. Die Substratspezifität von hTal und hTalY sind niedriger als die von TalB und TalBY. Bei FSA konnte keine Tal-Aktivität gemessen werden. Damit haben TalBY und hTalY neben einer neuen FSA-Aktivität eine verbleibende Tal-Aktivität.

#### Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates

Die wildtypische Transaldolase B wurde bereits erfolgreich als Transaldolase-Glyceril-Komplex kristallisiert [18], [16] (siehe Abb. III.15). Somit kann man eine Aussage darüber machen wie die Glyceryleinheit in dem Enzym orientiert ist und welche Aminosäurereste an dessen Bindung und eventuell an der Enzymreaktion beteiligt sind. Das Mutein TalBY katalysiert wie das wildtypische Enzym den Transfer einer Dihydroxyacetoneinheit von einem Donor (D-Fructose-6-Phosphat) auf einen Akzeptor (D-Erythrose-4-Phosphat). Außerdem zeigt TalBY mit den Substraten Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat in der Kondensationsreaktion eine deutlich höhere Aktivität als der Wildtyp. Ebenfalls ist es in der Lage D-Fructose-6-Phosphat in Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu spalten. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika von TalB und TalBY wäre eine Röntgenstruktur des reduzierten Schiff'sche Base Intermediates von TalBY von großem Interesse. Anhand des Vergleichs mit der Röntgenstruktur des wildtypischen Enzyms ließe sich eine Aussage darüber treffen, was sich an der Struktur oder an dem postulierten Reaktionsmechanismus, durch den Aminosäureaustausch an der Position Phe178 im aktiven Zentrum des Enzyms geändert hat.

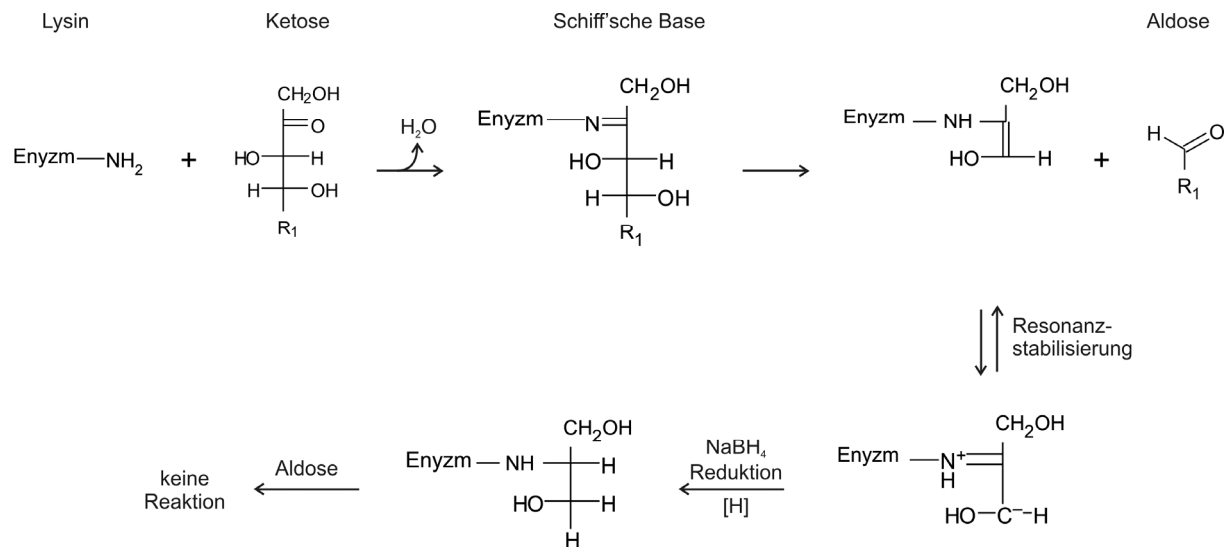


Abb. III.15: Schematische Darstellung der Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates (verändert nach [16]).

Zur Reduktion des Intermediates wurde zunächst das Protokoll, wie von U. Schörken für TalB beschrieben, durchgeführt [16]. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Reduktion wurde das wildtypische Enzym TalBwt reduziert. TalB und TalBY wurden jeweils einmal mit und einmal ohne Substrat (D-Fruktose-6-Phosphat) inkubiert und durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert. Das überschüssige Natriumborhydrid wurde nicht mit einer entsprechenden Säure abreagiert, um das Enzym zu schonen, sondern durch einen Zentrifugationskonzentrator und zweimaligen Pufferwechsel entfernt. Im Gegensatz zum Wildtyp (vor der Reduktion 23 U/mg; ohne Fructose-6-Phosphat: 2,6 U/mg; mit Fructose-6-Phosphat: 0,1 U/mg) konnte die Aktivität von TalBY nicht vermindert werden (vor der Reduktion: 1,7 U/mg; ohne D-Fruktose-6-Phosphat: 0,7 U/mg; mit D-Fruktose-6-Phosphat: 1 U/mg). Sowohl bei TalB, wie auch bei TalBY war die Aktivität deutlich vermindert. Dies lag an einer unvollständigen Entfernung des Natriumborhydrids, das bei der photometrischen Bestimmung der Aktivitäten von TalB und TalBY, die koppelnden Enzyme inhibierte. Es wurde überprüft, ob Spuren von Natriumborhydrid den Enzymassay inhibieren. Bei Zugabe von 3 mM Natriumborhydrid vermindert sich die gemessene spezifische Aktivität von TalB um 33%, bei Zugabe von 30 mM um 52%. Deswegen wurden die Reduktionsansätze im Folgenden gegen 500 ml 20 mM Glycylglycin, pH 8,5 über Nacht bei 6°C dialysiert.

In einem weiteren Reduktionsansatz wurde auf eine Vorinkubation von TalBY mit D-Fruktose-6-Phosphat verzichtet, da das Enzym das Substrat auch ohne Anwesenheit eines Akzeptors spaltet und dabei die beiden Produkte frei setzt. Auch in diesem Ansatz konnte die Enzymaktivität von TalBY nicht vermindert werden.

Unter Berücksichtigung der pK<sub>a</sub>-Werte der Puffer und der Puffereigenschaften wurde das Puffersystem umgestellt. Anstatt des Glycylglycin-Puffers wurde nun ein 20 mM HEPES-

Puffer, pH 7,5 verwendet und anstatt des Triethanolamin-Puffers wurde ein 50 mM MES-Puffer, pH 6 eingesetzt. Außerdem wurden die Ansätze bei 30°C für 10 min anstatt 1 h, mit einem 440-fachen molaren Überschuss an D-Fructose-6-Phosphat ohne die koppelnden Enzyme Triosephosphatisomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und NADH inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von Natriumborhydrid und ein Pufferwechsel, wie bereits beschrieben. Im Gegensatz zum Wildtyp (vor der Reduktion 68 U/mg; ohne D-Fructose-6-Phosphat: 64 U/mg; mit D-Fructose-6-Phosphat: 1 U/mg) konnte auch mit diesem Protokoll TalBY nicht reduziert werden (vor der Reduktion: 1,3 U/mg; ohne D-Fructose-6-Phosphat: 1,0 U/mg; mit D-Fructose-6-Phosphat: 1,7 U/mg). Bei dieser Reduktion ist anzumerken, dass die Aktivität von TalBY vor der Reduktion relativ niedrig war. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Aktivität von TalBY mit D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat bestimmt wurde und die verwendete D-Fructose-6-Phosphat Konzentration von 10 mM nicht im sättigenden Bereich des Enzyms liegt (siehe II.7.8.).

#### Inhibition von TalBY durch Tagatose-6-Phosphat

TalBY kann D-Fructose-6-Phosphat zu DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat spalten. Ein Stereoisomer von D-Fructose-6-Phosphat ist D-Tagatose-6-Phosphat mit einer 3S, 4S-Stereokonfiguration. D-Tagatose-6-Phosphat ist weder ein Substrat von TalBY noch von TalB. Es sollte überprüft werden, ob D-Tagatose-6-Phosphat ein Inhibitor von TalBY ist. Zur Inhibition von TalBY durch Tagatose-6-Phosphat wurde das Enzym ohne Tagatose-6-Phosphat (0  $\mu$ M D-Tagatose-6-Phosphat), äquimolar (46  $\mu$ M D-Tagatose-6-Phosphat), 5fachem (230  $\mu$ M D-Tagatose-6-Phosphat) und in 10fachem Überschuss (460  $\mu$ M D-Tagatose-6-Phosphat) D-Tagatose-6-Phosphat bei 30°C für 24 h in Tal-Puffer inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h) wurden Proben entnommen und die Aktivität von jeweils 34  $\mu$ g TalBY mit D-Fructose-6-Phosphat in der Spaltungsreaktion gemessen (siehe II.7.8.).

Die Aktivität von TalBY war zu Beginn der Messung höher als die bestimmte maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $0,36 \pm 0,05$  U/mg). Dies lag wahrscheinlich daran, dass die Inhibition mit TalBY durchgeführt wurde, dass am ÄKTA Purifier mit einer höheren Reinheit (99%) gereinigt wurde. Die Inhibition wurde mit diesem Enzym durchgeführt, weil TalBY mit D-Tagatose-6-Phosphat kristallisiert werden soll. Die Inhibition von TalBY mit D-Tagatose-6-Phosphat wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie vor einer Kristallisation des Enzyms mit Inhibitor. Bei dem Ansatz mit 10fachem Überschuss nahm die Aktivität von 0,57 U/mg (100 % Aktivität) auf 0,08 U/mg (15 % Restaktivität) ab, wohingegen die Aktivität der Kontrolle ohne Tagatose-6-Phosphat bei  $\sim 0,53$  U/mg blieb. Die Aktivität von TalBY nahm im Ansatz mit äquimolarer Konzentration Tagatose-6-Phosphat nicht messbar ab (siehe Abb. III.16 A.). Mit 5fachem Tagatose-6-Phosphat Überschuss gegenüber der

Konzentration an TalBY betrug die Enzymaktivität 0,19 U/mg (35 % Restaktivität). Nach 24 h wurden die Ansätze 1:50 verdünnt und erneut wurde deren Aktivität über den Verlauf von 24 h gemessen. Durch die Verdünnung der Enzym-Inhibitor-Gemische mit Tal-Puffer wurde überprüft, ob es sich um eine reversible oder irreversible Inhibition handelt (siehe Abb. III.16 B.). Bei einer reversiblen Inhibition lässt sich durch die Verdünnung die Aktivität des Enzyms zurückgewinnen. Bei einer irreversiblen Inhibition nicht. Bei allen verdünnten Ansätzen blieb die Aktivität, die zum Zeitpunkt 0h gemessen wurde gleich niedrig und konnte nicht zurückgewonnen werden (siehe Abb. III.16 B.). Deswegen handelt es sich hierbei um eine irreversible Inhibition.

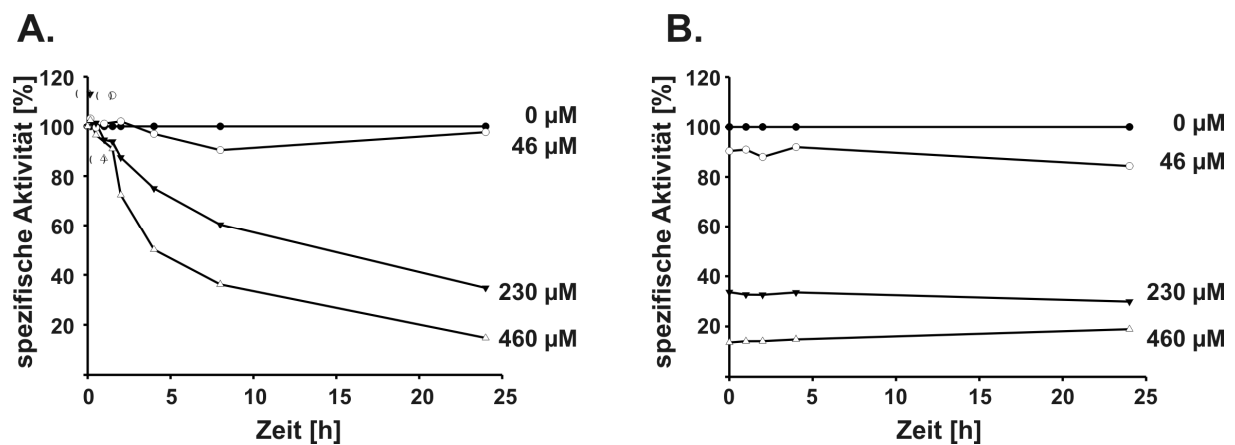


Abb. III.16: Inhibition von TalBY durch Tagatose-6-Phosphat. A. TalBY wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Tagatose-6-Phosphat (0, 46, 230 und 460 μM Tagatose-6-Phosphat) bei 30°C bis zu 24 h inkubiert. Die Aktivität wurde mit jeweils 34 μg TalBY zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h) mit D-Fructose-6-Phosphat als Substrat in der Spaltungsreaktion bestimmt (siehe II.7.8.). B. Die TalBY-Tagatose-6-Phosphat-Gemische (mit 0, 46, 230 und 460 μM Tagatose-6-Phosphat) wurden mit Tal-Puffer verdünnt (1:50) und erneute bei 30°C für 24 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4, 24 h wurde die Aktivität mit jeweils 34 μg TalBY für die D-Fructose-6-Phosphat-Spaltung von TalBY bestimmt (siehe II.7.8.).

Da TalB keine Aktivität mit D-Tagatose-6-Phosphat zeigte wurde die Inhibition von TalB und TalBY erneut überprüft. Für eine weitere Überprüfung der Inhibition von TalBY und TalB wurden die beiden Enzyme erneut mit D-Tagatose-6-Phosphat (0 mM D-Tagatose-6-Phosphat, äquimolar: 46 μM D-Tagatose-6-Phosphat, 10fachem Überschuss: 460 μM D-Tagatose-6-Phosphat) in Tal-Puffer bei 30°C für 24h (TalBY) bzw. 48h (TalB) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Aktivitäten der Enzyme mit D-Fructose-6-Phosphat als Donor und D-Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor bestimmt (siehe II.7.8.).

Die Anfangsaktivitäten von TalB und TalBY betragen 80 U/mg bzw. 5 U/mg und wurde mit jeweils 1,7 μg bzw. 4 μg Enzyme pro Reaktionsansatz durchgeführt. Die Aktivität von TalB liegt im Bereich der bestimmten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (85 ± 9 U/mg). Bei TalBY liegt die gemessene Aktivität unterhalb der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (14 U/mg) was damit zusammenhängen könnte, dass D-Fructose-6-Phosphat mit einer

Konzentration von 10 mM unterhalb des  $K_m$ -Werts von 22 mM eingesetzt wurde. TalBY wird mit 10fachem Überschuss und 24 h Inkubation von  $\sim 5$  U/mg (100 % Aktivität) auf 0,9 U/mg (10-facher Überschuss; 21 % Restaktivität) inhibiert (siehe Abb. III.17 A.). Eine messbare Inhibition kann auch bei dem Ansatz mit äquimolarer Menge T6P von  $\sim 5$  U/mg (100 % Aktivität) auf 3 U/mg (68 % Restaktivität) detektiert werden. Nach 24 h Inkubation wurden die TalBY-Tagatose-6-Phosphat-Gemische verdünnt und die Aktivität von TalBY mit D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat gemessen (siehe III. 17 B.). In dieser Meßreihe wurde das Gemisch höher verdünnt als zuvor, um eine Aktivität im linearen Bereich der Aktivitätsmessung bestimmen zu können. Mit beiden Konzentrationen lässt sich durch eine Verdünnung (1:400) und erneuter Inkubation bei 30°C die TalBY Aktivität nicht zurückgewinnen. Somit konnte die irreversible Inhibition von TalBY über die Aktivität in der Tal-Reaktion und in der D-Fructose-6-Phosphat-Spaltungsreaktion bestimmt werden. Die Aktivität von TalB wird unter den gleichen Bedingungen wie bei TalBY, auch nach 48 h Inkubation bei 30°C in Tal-Puffer durch Tagatose-6-Phosphat nicht messbar inhibiert.

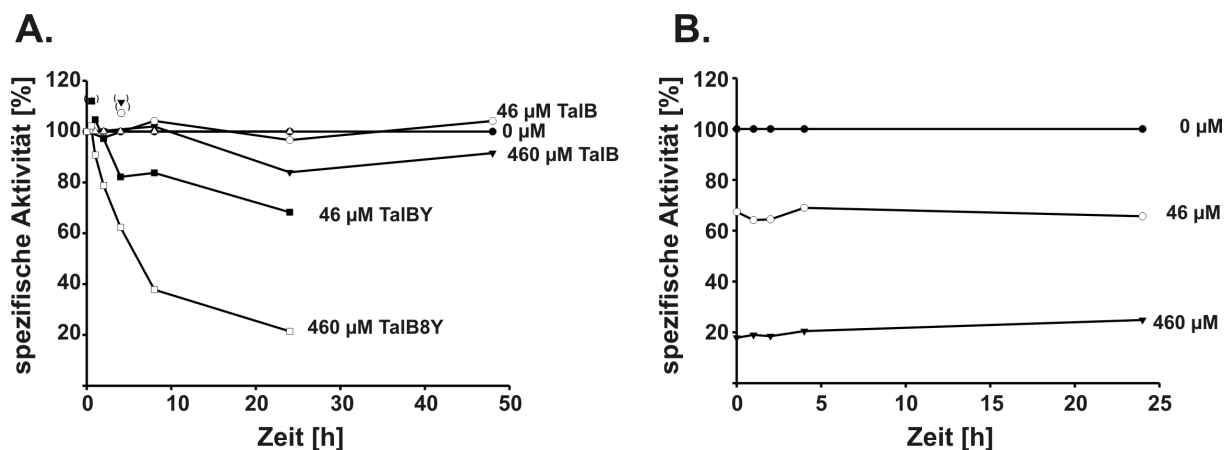


Abb. III.17: A. Inhibition von TalBY und TalB durch Inkubation mit Tagatose-6-Phosphat (0, 46 und 460  $\mu$ M Tagatose-6-Phosphat) bei 30°C für 24 h in Tal-Puffer. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität von TalB und TalBY mit jeweils 1,7  $\mu$ g bzw. 4  $\mu$ g Enzym, D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat gemessen (siehe II.7.8.1.). B. Die TalBY-Tagatose-6-Phosphat-Gemische (mit 0, 46, und 460  $\mu$ M Tagatose-6-Phosphat) wurden mit Tal-Puffer verdünnt (1:400) und erneut bei 30°C für 24 h inkubiert. Die Aktivität von TalBY wurde mit jeweils 4  $\mu$ g Enzym, D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat bestimmt (siehe II.7.8.1.)

Daraus folgt, dass unter den beschriebenen Bedingungen TalBY durch D-Tagatose-6-Phosphat inhibiert werden kann, wohingegen das wildtypische Enzym nicht inhibiert wurde. Demzufolge hängt die beobachtete Inhibition von TalBY wahrscheinlich mit dem Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr ab. Unsere Kooperationsgruppe in Schweden (Prof. G. Schneider und T. Sandalova, Stockholm) ist gerade dabei die Röntgenstruktur von TalBY mit gebundenem D-Tagatose-6-Phosphat zu klären. Eine gelöste Struktur liegt jedoch noch nicht vor (persönliche Mitteilung von T. Sandalova).

### Röntgenstruktur von TalBY

TalBY stellt aufgrund seiner neuen FSA-Aktivität und einer verbleibenden Tal-Aktivität eine interessante Transaldolase-Variante dar, die aufgrund der Lyase- und Transferase-Eigenschaften ein Übergangsenzym darstellen könnte. Eine Röntgenstruktur von TalBY wäre aus diesem Grund von großem Interesse.

TalBY konnte von T. Sandalova (Stockholm, Schweden) kristallisiert werden, so dass die Röntgenstruktur dieser TalB-Variante mit einer Auflösung von 1,4 Å von ihr aufgeklärt werden konnte (siehe Abb. III.18 A.) [128]. Die Röntgenstrukturen von TalB und TalBY sind sich sehr ähnlich. Die Untereinheiten der beiden Enzyme ergeben r.m.s.d Werte von 0,38 Å für 315 äquivalente C $\alpha$ -Atome. Außer dem Aminosäureaustausch an der Position 178 (Phe nach Tyr) sind keine strukturellen Unterschiede zu erkennen (siehe Abb. III.18 B.). Interessanterweise befindet sich ein Wassermolekül im aktiven Zentrum von TalBY an der Stelle, an der im reduzierten Schiff Base Intermediat von TalB das Carbinolamin lokalisiert ist. Aufgrund dessen befindet sich das katalytisch aktive Wassermolekül in TalB und TalBY an verschiedenen Positionen. Bei TalB wird das katalytisch aktive Wassermolekül von den Aminosäureresten Glu 96 und Thr156 über Wasserstoffbrücken gebunden [18]. Bei TalBY ist eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen dem Wassermolekül und Tyr178 möglich. Außerdem befindet sich im TalBY Kristall ein Sulfation des Puffers im aktiven Zentrum, in der Nähe von den Aminosäureresten Arg181, Ser226 und Arg228 (siehe Abb. III.18 C.). Wahrscheinlich befindet sich während der Katalyse der Phosphatrest der Substrate und/oder später des Produktes an dieser Position.



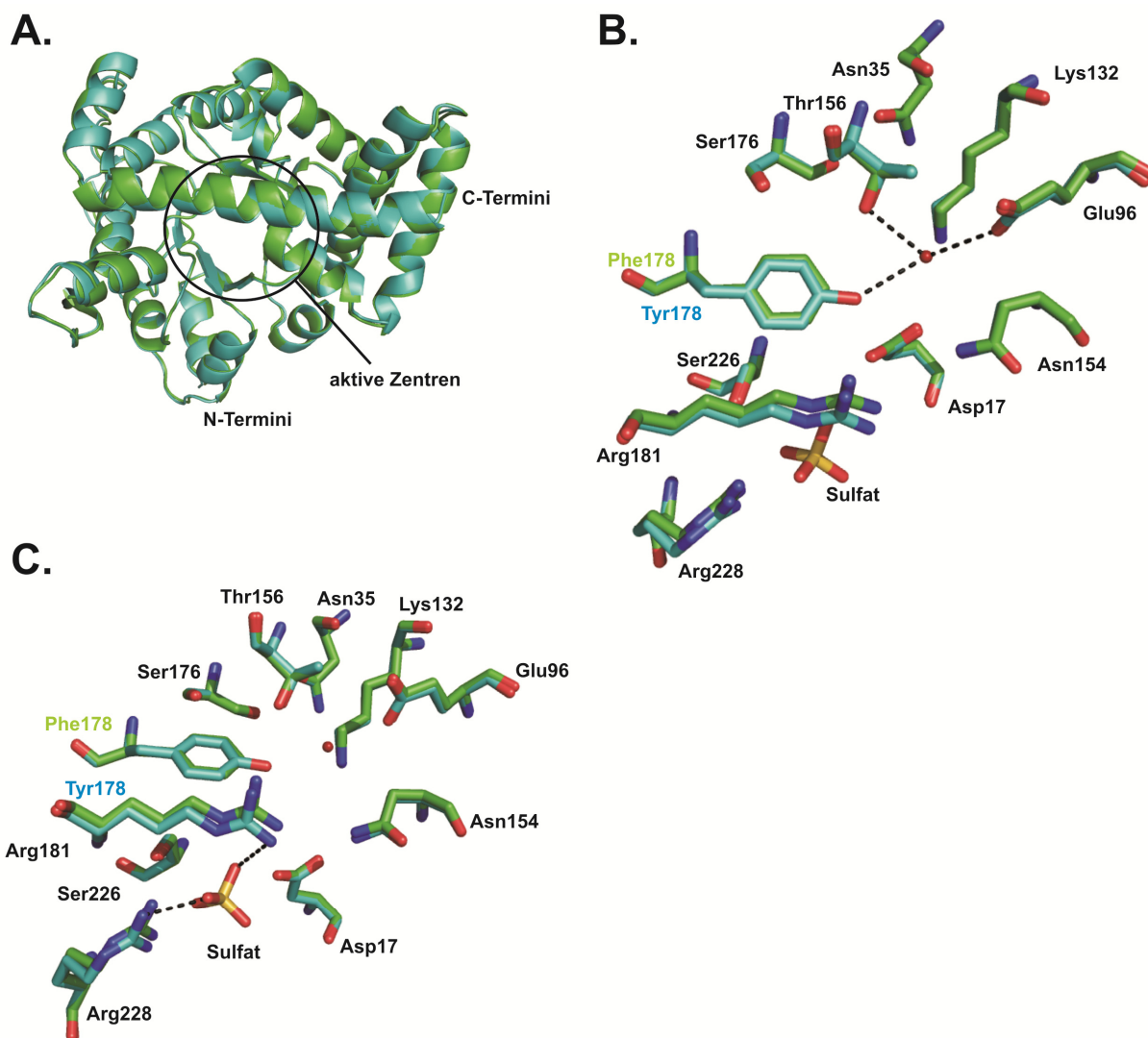


Abb. III.18: Die Röntgenstrukturen von TalB (grün) und TalBY (hellblau) im Vergleich (verändert nach [17, 128]). A. Sicht auf das aktive Zentrum der beiden übereinander gelagerten monomeren Untereinheiten von TalB (grün) und TalBY (hellblau). B. Aktives Zentrum von TalB (grün) und TalBY (hellblau). Ein katalytisches Wassermolekül (rot) wird in TalB von den Resten Glu96 und Thr156 über zwei Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. In TalBY ist eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit Tyr178 möglich. C. Ein Sulfation des Puffers befindet sich in der Nähe der Reste Arg181, Ser226 und Arg228. Vermutlich befindet sich an dieser Position die Phosphatgruppe der Substrate. Dargestellt wurden die Strukturen mit PyMOL (pdb-Nr. TalBY: 3CWN, TalB: 1ONR).

## 2. Sättigungsmutagenese von *talBF178Y* zur Generierung von Enzymen mit einem verbesserten $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd

In einer ersten Runde der gerichteten Sättigungsmutagenese waren elf verschiedene TalB-Banken bereitgestellt worden, die auf die Bildung von D-Fructose-6-Phosphat (D-F6P) mit einem neu entwickelten Farbnachweis im Mikrotitermaßstab überprüft wurden. In einer dieser Banken (F178X-Bank) wurde ein Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr gefunden, TalBY, der D-Fructose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (DHA) und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (D-GAP) mit einer höheren Aktivität als der Wildtyp bildet (siehe III.1. [128]). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Schneider, Stockholm, wurde TalBY kristallisiert und die Röntgenstruktur des Enzyms konnte aufgeklärt werden. Interessanterweise befand sich im Kristall von TalBY ein Sulfation des Puffers im aktiven Zentrum des Kristalls (siehe Abb. III.19). Aufgrund der Ähnlichkeit des Sulfations mit einer Phosphatgruppe wurde vermutet, dass sich an dieser Position im Enzym der Phosphatrest des Substrates befindet. Um die Aminosäureposition zu finden, die an der Bindung der Phosphatgruppe der Substrate beteiligt ist wurden für eine Sättigungsmutagenese die drei Aminosäurereste (Arg181, Ser226, Arg228) in TalBY ausgewählt, da diese sich in der Nähe des Sulfations befinden.

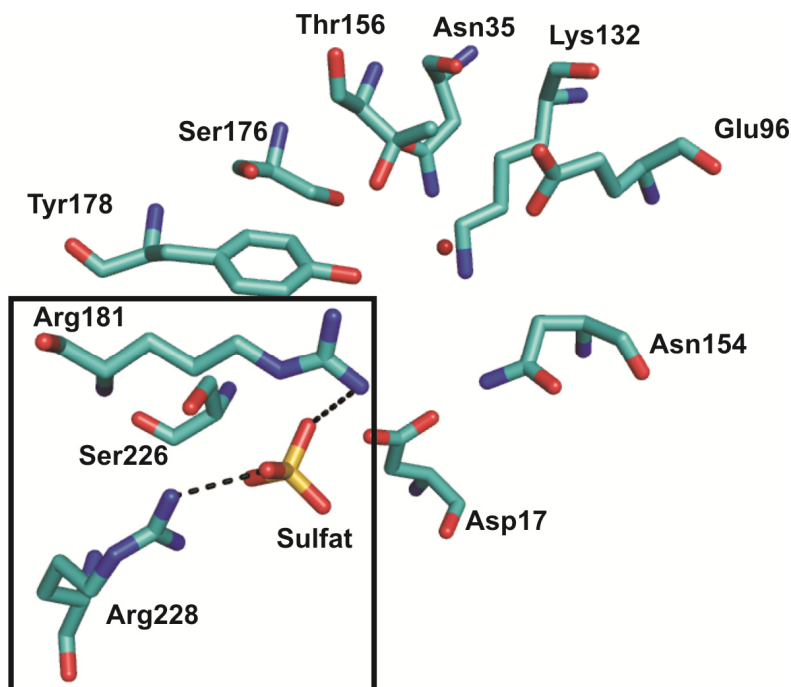


Abb. III.19: Die Röntgenstrukturen des aktiven Zentrums von TalBY (hellblau) (verändert nach [128]). Sicht auf das aktive Zentrum von TalBY. Ein katalytisches Wassermolekül (rot) wird in TalBY von den Resten Glu96, Thr156 und Tyr178 gebunden. Ein Sulfation des Puffers befindet sich in der Nähe der Reste Arg181, Ser226 und Arg228. Vermutlich befindet sich an dieser Position die Phosphatgruppe der Substrate. Dargestellt wurden die Strukturen mit PyMOL (pdb-Nr. 3CWN).

In einer weiteren Mutageneserunde sollte TalBY so verändert werden, dass anstatt dem phosphorylierten D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, die unphosphorylierte Form D-Glycerinaldehyd (D-GA) mit einem niedrigen  $K_m$ -Wert verwendet. Für die Durchmusterung der Banken wurde zunächst der bereits beschriebene Farbnachweis für D-Fructose-6-Phosphat im Mikrotitermaßstab abgewandelt, so dass D-Fructose nachgewiesen werden kann (siehe III. 1.3.).

### 2.1. Mutagenese des *talBY*-Gens

Für ein Screening von neuen TalB-Varianten mit einer hohen Affinität für D-Glycerinaldehyd wurden drei Aminosäurepositionen (Arg181, Ser226, Arg228) im aktiven Zentrum von TalBY ausgewählt. Zur Erstellung der drei Sättigungsmutagenesebanken TalBF178YR181X, TalBF178YS226X und TalBF178YR228X wurde für jede der drei Positionen eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Bei dieser Polymerasekettenreaktion wurden Primer mit einem degenerierten Basenmotiv von NNS verwendet, so dass die wildtypischen Triplets gegen 32 andere Triplets ausgetauscht wurden (siehe II.6.4.). Als Ausgangs-DNA für die Polymerasekettenreaktionen diente das *his<sub>6</sub>-talBF178Y*-Gen. Nach der Transformation der drei PCR-Ansätze in kompetente *E. coli* XL1Blue Zellen wurden zufällig einzelne Klone gepickt, deren Plasmid-DNA wurde isoliert und sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz) und so die Qualität der Banken überprüft. Insgesamt wurden von der Bank TalBF178YR181X-Bank 20 Klone und von den Banken TalBF178YS226X, TalBF178YR228X jeweils 10 Klone zufällig gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert und anschließend extern sequenziert (siehe II.6.5., Tab. III.8. A. – C.).

Tab. III.8: A. Nukleotidaustausche von 20 isolierten Plasmide von zufällig gepickten Klonen der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178YR181X, die sequenziert wurden. In TalBF178Y befindet sich an der Position 181 ein Arg mit dem Triplet CGT. B. Nukleotidaustausche von 10 isolierten und sequenziert Plasmide von zufällig gepickten Klonen der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178YS226X. In TalBF178Y befindet sich an der Position 226 ein Ser mit dem Triplet AGC. C. Nukleotidaustausche von zufällig gepickten Klonen der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178YR228X. Von 10 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. In TalBF178Y befindet sich an der Position 228 ein Arg mit dem Triplet CGT. Alle Plasmide wurden von der Firma GATC Biotech sequenziert (siehe II.6.5).

Triplet	Aminosäure	Anzahl	Triplet	Aminosäure	Anzahl
A.: TalBF178YR181X			C.: TalBF178YR228X		
CGT (wt)	Arg (wt)	1	CGT (wt)	Ser (wt)	0
GCG	Ala	1	AGC	Arg	1
AGG	Arg	1	GAG	Glu	1
TGC	Cys	1	GGG	Gly	1
GAG	Glu	1	ATC	Ile	1
GGC	Gly	1	ATG	Met	1
GGG	Gly	1	TTC	Phe	1
CAC	His	2	CCC	Pro	1
TTG	Leu	1	Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes		3
ATG	Met	2			
CCC	Pro	1			
GTC	Val	2			
Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes		5			
B.: TalBF178YS226X					
AGC (wt)	Ser (wt)	1			
AAC	Asn	1			
GGG	Gly	1			
ATC	Ile	1			
TTG	Leu	3			
TCG	Ser	1			
ACG	Thr	1			
TGG	Trp	1			

Eines der 20 sequenzierten Plasmide der TalBF178YR181X-Bank besaß das wildtypische Basentriplett CGT, eventuell aufgrund eines unvollständigen DpnI-Verdau, da mit dem Basenmotiv NNS, dieses Triplet nicht möglich ist. Insgesamt 25 % der sequenzierten Klone besaß eine Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes. Vermutlich wurde die Elongationszeit zu lange gewählt. Die Elongationszeit, sollte so gewählt werden, dass die einzelsträngige Plasmid-DNA ausgehend vom Primer einmal synthetisiert wird und dann beendet wird, wenn die Polymerase wieder am Primer angelangt ist. Bei einer zu langen Elongationszeit wird die DNA-Synthese nach erfolgter Synthese des Plasmids nicht unterbrochen, sondern läuft so lange weiter bis die Denaturierung einsetzt, dadurch entsteht ein verlängertes Plasmid. Dies wird dadurch bestätigt, dass es sich bei den Insertionen meist um eine Wiederholung des

Primers handelt. Die Basentriplets CAC (His), ATG (Met) und GTC (Val) kommen mit einer Häufigkeit von 10 % vor, alle anderen Triplets kommen nur einmal (5 %) vor. Insgesamt kamen zwölf von den möglichen 32 Triplets vor.

Eines der zehn sequenzierten Plasmide der TalBF178YS226X-Bank besaß das wildtypische Triplet AGC. Dies kann entweder an einem unvollständigen DpnI-Verdau liegen oder daran, dass mit dem degenerierten Primermotiv NNS das wildtypische Basentriplet AGC möglich ist. Außerdem trat das Basentriplet TTC (Leu) mit 30 % überdurchschnittlich häufig vor. Von den möglichen 32 Triplets kamen insgesamt sieben verschiedene Triplets vor.

Bei den zehn sequenzierten Plasmiden der TalBF178YR228X-Bank kam das wildtypische Triplet CGT nicht vor. Alle anderen sequenzierten Triplets kamen jeweils einmal vor (10 %), insgesamt waren sieben unterschiedliche Basentriplets von 32 möglichen. Wie bei der TalBF178YR181X-Bank besaßen auch hier drei Plasmide eine Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes (30 %).

Die Kolonien der drei Banken wurden von den Agarplatten abgeschwemmt und die Plasmid-DNA wurden mit dem Plasmid-Isolationskit von Macherey + Nagel (siehe II.6.2.) isoliert und als Plasmidpool zur Stammhaltung eingefroren. Für ein Screening auf die Synthese von D-Fructose wurden die Plasmide in chemische kompetente LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> Zellen transformiert.

Aufgrund des häufigen Auftretens von Insertionen kurzer DNA-Fragmente und der zusätzlichen Transformation in einen andern *E. coli*-Stamm (LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*) wurden von diesen drei Banken nicht jeweils 84 Klone überprüft, sondern jeweils die doppelte Anzahl an Klonen (168 Klone).

2.2. Etablierung eines Farbnachweises von D-Fructose aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd im Mikrotitermaßstab

Für die Synthese von D-Fructose aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd wurde der Farbnachweis für D-Fructose-6-Phosphat abgewandelt (siehe III.1.1). D-Fructose kann durch die Fructokinase von *Zymomonas mobilis* zu D-Fructose-6-Phosphat phosphoryliert werden (siehe Abb. III.20) [142-143]. Fructokinase kann ATP nur dann binden, wenn Magnesiumionen einen Komplex mit ATP bilden, so dass eine optimale Substratkonfiguration von ATP entsteht.

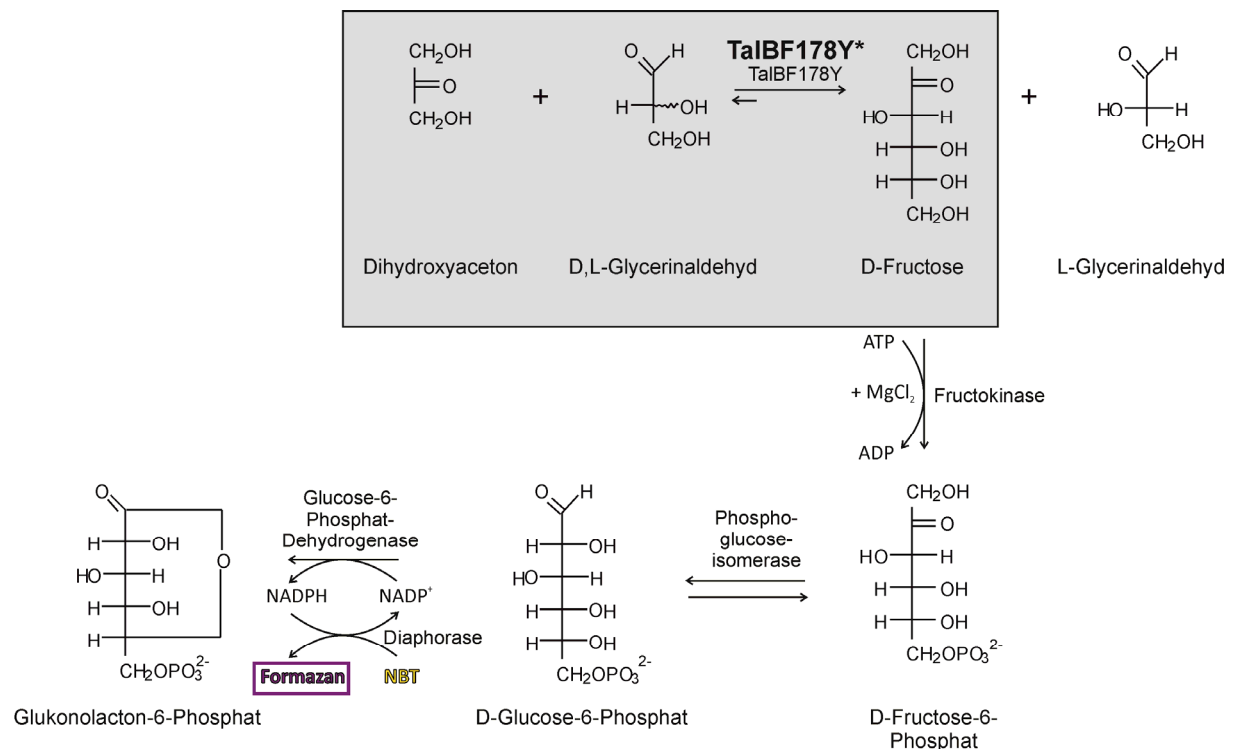


Abb. III.20: Prinzip des Farbnachweises auf die Synthese von D-Fructose. Mit TalBY wird in einer Kondensationsreaktion aus Dihydroxyaceton (50 mM) und D-Glycerinaldehyd (10 mM) D-Fructose gebildet. Die neuen Enzymvarianten sollen einen niedrigeren K<sub>m</sub>-Wert für D-GA besitzen als TalBY. Die Synthese von D-Fructose wurde durch einen gekoppelten Enzymnachweis über die Bildung des lilafarbenen Formazans aus dem gelben NBT bei 540 nm verfolgt.

Wie der Farbnachweis von D-Fructose-6-Phosphat wurde auch dieser bei 25°C durchgeführt. Die Zunahme des lilafarbenen Formazan wurde bei 540 nm verfolgt. Die Auswertung der Aktivitäten erfolgte im linearen Bereich der Farbreaktion über die Bildung an lilafarbenem Formazan (siehe Abb. III.21). Als erstes wurde die Aktivität der angereicherten Fructokinase (Reinheit: 75 %) von 17,5 ± 2,5 U/mg mit D-Fructose bestimmt (siehe II.7.8.).

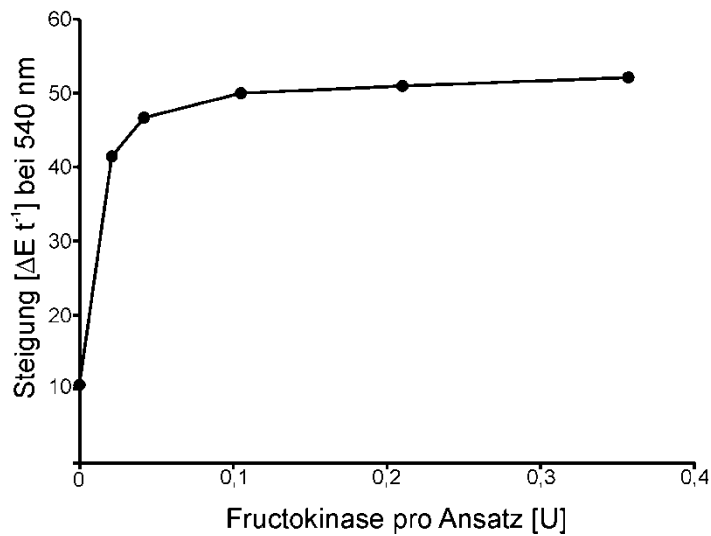


Abb. III.21: Auftragung der Steigung ( $\Delta E t^{-1}$ ) gegen die eingesetzte Gesamtaktivität Fructokinase pro Reaktionsansatz (Endvolumen: 200  $\mu$ l). Gemessen wurde die Steigung bei 25°C und 540 nm mit Diaphorase (0,3 mU), NBT (0,5 mM), ATP (1,2 mM),  $MgCl_2$  (5 mM),  $NADP^+$  (0,5 mM), DHA (50 mM), D,L-Glycerinaldehyd (50 mM), Phosphoglucoseisomerase (0,1 U), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,1 U), zellfreier Extrakt mit TalBY (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) in Glycylglycinpuffer.

Ab 0,1 U Fructokinase pro Ansatz konnte nicht mehr D-Fructose in D-Fructose-6-Phosphat umgewandelt werden, d.h. die maximale Geschwindigkeit der Reaktion war erreicht und deswegen wurde 0,1 U Fructokinase in dem Farbnachweis eingesetzt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen  $MgCl_2$  (0 - 40 mM) unter den gleichen Bedingungen wie die Fructokinase ausgetestet. Bis zu einer Konzentration von 5 mM nimmt die Steigung zu, danach sinkt die Steigung auf 75 % der maximalen Steigung ab. Vermutlich wurde eines der beteiligten Enzyme durch  $MgCl_2$  Konzentrationen > 5 mM inhibiert. Aus diesem Grund wurde eine Konzentration von 5 mM gewählt. Daraus folgt, dass bis einer Konzentration von 5 mM die Magnesiumionen für eine Bildung von  $Mg_2ATP$  limitierend sind, ab einer Konzentration von 5 mM die Magnesiumionen im Überschuss vorliegen und die Fructokinaseaktivität inhibiert wird. Mit den neuen Konzentrationen  $MgCl_2$  und Fructokinase wurde die ATP-Konzentration variiert (0 – 4 mM). Die Steigungen nahmen bis zu einer Konzentration von 1,2 mM ATP zu und blieben dann konstant, so dass 1,2 mM ATP im Farbnachweis eingesetzt wurde. Damit besteht zwischen ATP und  $MgCl_2$  ein Konzentrations-Verhältnis von 1 : 4. Ein Konzentrations-Verhältnis von mindestens 1 : 2 wäre notwendig gewesen, da an ein Molekül ATP zwei Moleküle  $Mg^{2+}$  binden. Zusätzlich hätten die Konzentrationen von ATP und  $MgCl_2$  in dem ermittelten Verhältnis von 1 : 4 sukzessive erhöht werden können, um eventuell den Nachweis an gebildetem Produkt zu erhöhen. Die bei den mit TalBY gemessenen Aktivitäten waren für eine Auswertung ausreichend. Der  $K_m$ -Wert für DHA von TalBY beträgt  $30 \pm 4$  mM, im Screening auf eine Synthese von D-Fructose-6-Phosphat

wurden 50 mM DHA eingesetzt, damit lag DHA nicht sättigend vor und wurde unter diesen Bedingungen 150 mM DHA ausgetestet. Bei einer Messung von aufsteigenden Konzentrationen DHA nur mit NBT in Glycylglycinpuffer wurde eine Zunahme der Steigung beobachtet (siehe Abb. III.22). Deswegen wurde die Konzentration von 50 mM beibehalten und die geringfügige Hintergrundsteigung toleriert. Um auszuschließen, dass mit einem der anderen Bestandteile des Nachweises eine Hintergrundreaktion vorliegt wurden auch diese mit NBT in Puffer inkubiert (siehe Abb. III.23). Eine deutliche Hintergrundreaktion konnte nur mit DHA gemessen werden. Mit 100 mM D,L-Glycerinaldehyd war ein geringfügige aber noch tolerierbare Hintergrundreaktion zu beobachten. Durch die Einstellung der pH-Werte der beiden Substrate auf 8,5 wurde eine ähnliche Hintergrundreaktion gemessen. Damit konnte ein Zusammenhang mit dem pH-Wert und der Hintergrundreaktion ausgeschlossen werden.

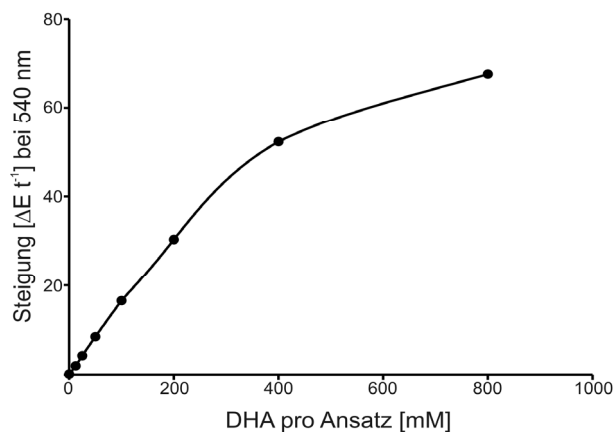


Abb. III.22: Auftragung der Steigung ( $\Delta E t^{-1}$ ) gegen die eingesetzte Konzentration DHA pro Reaktionsansatz (Endvolumen: 200  $\mu$ l). Gemessen wurde die Steigung bei 25°C und 540 nm mit NBT (0,5 mM) in Glycylglycinpuffer.

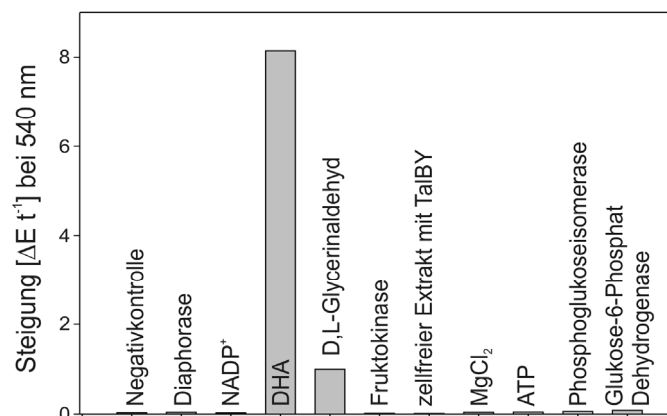


Abb. III.23: Steigung ( $\Delta E t^{-1}$ ) von Diaphorase (0,3 mU), NADP<sup>+</sup> (0,5 mM), DHA (50 mM), D,L-Glycerinaldehyd (50 mM), Fruktokinase (0,1 U), zellfreier Extrakt mit TalBY (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), ATP (1,2 mM), Phosphoglucoseisomerase (0,1 U), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,1 U) mit jeweils NBT (0,5 mM) in Glycylglycinpuffer pro Reaktionsansatz (Endvolumen: 200  $\mu$ l). Gemessen wurde die Steigung bei 25°C und 540 nm.



Bei dem Screening auf die Synthese von D-Fruktose sollten TalBY-Varianten gefunden werden, die einen niedrigeren  $K_m$ -Wert für D,L-Glycerinaldehyd besitzen als TalBY. Aus diesem Grund wurden als Kontrollen zwei verschiedene Konzentrationen D,L-Glycerinaldehyd gewählt, als Untergrenze 10 mM und als Obergrenze 100 mM D,L-Glycerinaldehyd, die mit DHA von zellfreien Extrakten des rekombinanten *E. coli* LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup>-Stammes mit TalBY zu D-Fruktose umgesetzt werden sollten. In diesem Screening wurde der *E. coli* Stamm LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> verwendet, weil in Vorversuchen mit diesem Stamm höhere Zelldichten der Kulturen und damit höhere Proteinausbeuten erzielt werden konnten als mit dem *E. coli* Stamm XL1Blue (Daten nicht gezeigt). Die Aktivitäten der zellfreien Extrakte mit den neuen Enzymvarianten wurden mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd auf eine Aktivität überprüft. Zunächst wurden aufsteigende Konzentration an zellfreiem Extrakt rekombinanter *E. coli* LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> mit TalBY und den beiden D,L-Glycerinaldehyd-Konzentration ausgetestet (siehe Abb. III.24).

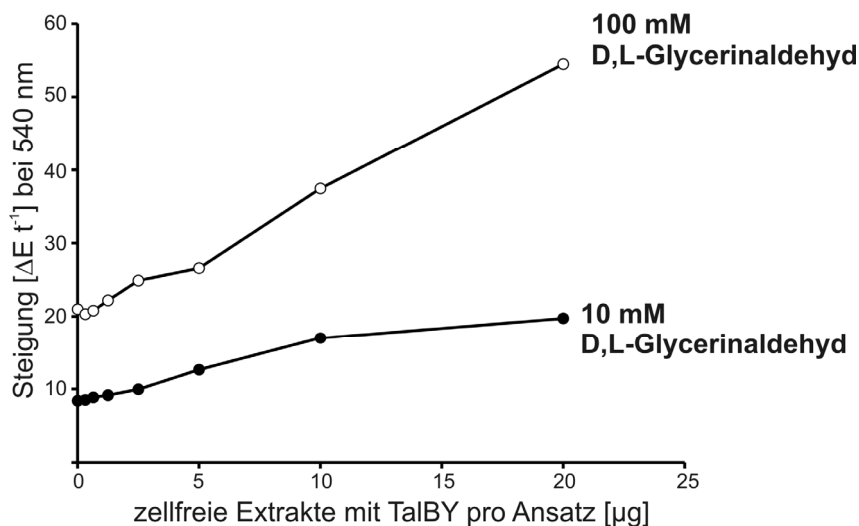


Abb. III.24: Steigungen ( $\Delta E t^{-1}$ ) der zellfreier Extrakte von rekombinanten *E. coli* LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> Zellen mit TalBY mit 100 mM D,L-Glycerinaldehyd (○ Obergrenze, lila) und mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd (● Untergrenze, gelb). Auftragung der Steigungen ( $\Delta E t^{-1}$ ) in Abhängigkeit der Proteinkonzentrationen der zellfreien Extrakten pro Reaktionsansatz (Endvolumen: 200 μl).

Bei einer Auftragung der aufsteigenden Konzentration an zellfreiem Extrakt mit TalBY mit 10 und 100 mM D,L-Glycerinaldehyd, in Abhängigkeit der Steigungen nimmt die Kurve in Abhängigkeit an aktivem Enzym bis 20 μg zu (siehe Abb. III.24). Aufgrund der Proteinausbeute der 1 ml Kulturen konnte nicht mehr als 20 μg zellfreier Extrakt der einzelnen Kulturen eingesetzt werden. Damit stand mit den ermittelten Bedingungen ein Farbnachweis zur Verfügung mit dem neue Enzymvarianten auf eine höhere Affinität für D,L-Glycerinaldehyd untersucht werden konnten. Die neuen Enzymvarianten sollten nach der

Normalisierung über deren Proteinkonzentration, eine zweimal höhere Aktivität zeigen als TalBY mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd (siehe Abb. III.25).

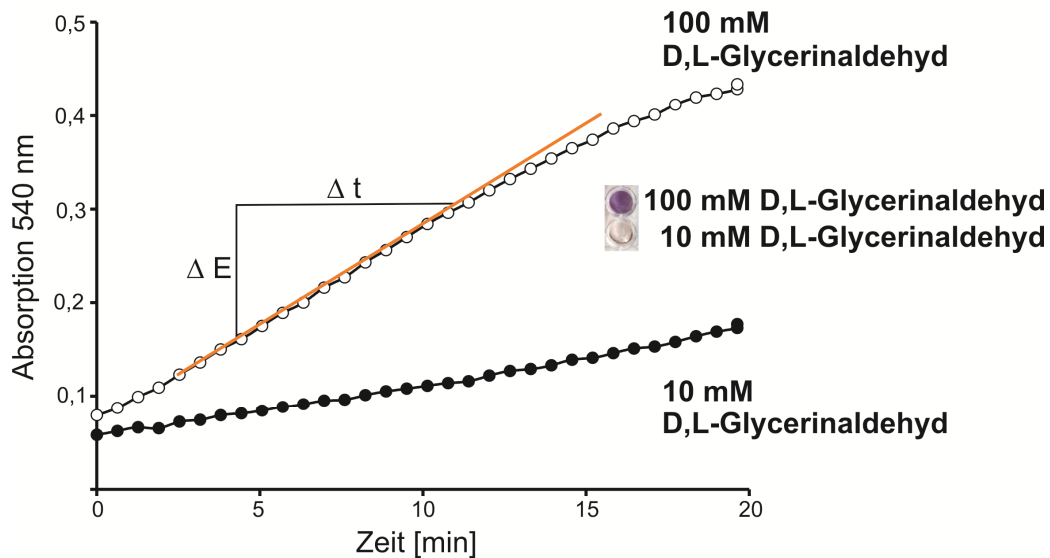


Abb. III.25: Kinetik zellfreier Extrakte von rekombinanten *E. coli* LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> Zellen TalBY mit 100 mM D,L-Glycerinaldehyd (○ Obergrenze, lila) und mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd (● Untergrenze, gelb).. Steigung der Kinetik wurde im linearen Bereich der Positivkontrolle bestimmt (orangefarbene Gerade).

### 2.3. Screening von TalB-Varianten auf einen niedrigen $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd in der Synthese von D-Fructose

In der erst kürzlich gelösten Röntgenstruktur von TalBY befand sich im aktiven Zentrum ein Sulfation des Puffers [128]. Das Sulfation befindet sich in der Nähe von drei Aminosäureresten Arg181, Ser226 und Arg228. Vermutlich befindet sich an dieser Position die Phosphatgruppe der Substrate. Durch Sättigungsmutagenese sollte diese vermeintliche Phosphatbindestelle zerstört werden, so dass von neuen Enzymvarianten nicht-phosphorylierte Substrate, wie D-Glycerinaldehyd, mit einer höheren Affinität gebunden werden als von TalBY. TalBY zeigt in der Kondensationsreaktion von DHA und D,L-Glycerinaldehyd zu D-Fructose eine maximale Geschwindigkeit von 0,87 U/mg und einem relativ hohen  $K_m$ -Wert D,L-Glycerinaldehyd von > 120 mM (siehe III.2.5.).

Zunächst wurden jeweils zwei Deepwellplatten mit insgesamt jeweils 168 Klonen der drei Sättigungsmutagenesebanken kultiviert. Nach Induktion mit IPTG, Expression der Proteine, Zellernte und Zellaufschluss wurden diese auf die Bildung von D-Fructose (D-Fru) mit einem Farbnachweis untersucht (siehe Abb. III.20 + III.26). Es wurde nach Muteinen mit einem niedrigen  $K_m$ -Wert für D,L-Glycerinaldehyd gesucht. Aus diesem Grund dienten als Kontrollen zellfreie Extrakte mit TalBY. Als obere Meßgrenze wurde die Aktivität mit 100 mM

D,L-Glycerinaldehyd gemessen und als untere Meßgrenze wurde die Aktivität mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd gemessen. Die Aktivität der Muteine wurden mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd gemessen und sollte mindestens doppelt so hoch sein wie die untere Meßgrenze.

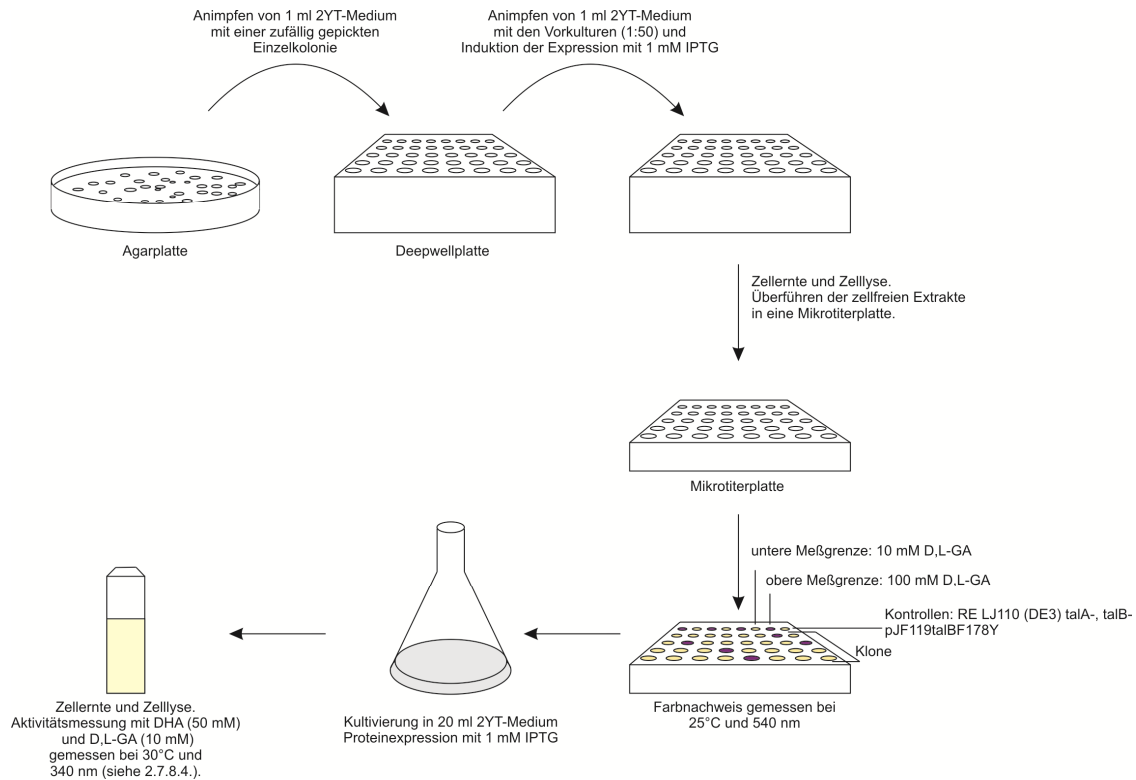


Abb. III.26: Screeningverfahren mit Dihydroxyaceton (50 mM) und D,L-Glycerinaldehyd (10 mM) als Substrate. Jeweils 84 zufällig gepickte Klone wurden von jeder Sättigungsmutagenesebank mit dem Farbnachweis auf Synthese von D-Fructose (siehe II.7.13.) überprüft. Positive Klone wurden in 20 ml 2YT-Medium rekultiviert. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen. Die Aktivitäten der zellfreien Extrakte wurden bei 340 nm in der Küvette bei 30°C überprüft (siehe II.7.8.).

Nur in der TalBF178YR181X-Bank wurden Klone mit einer höheren Aktivität mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd als TalBF178Y gefunden. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass alle 19 möglichen Aminosäureaustausche untersucht wurden, sind von dieser Bank weitere 168 Klone gescreent worden (insgesamt 335).

Positive Klone zeigen eine dunkellila Farbe (Abb. 2.3.2: F1: TalBYE; B9: TalBYP; C9/G11: TalBYG; F10: TalBYQ; Ausnahme: C1 deutliche Lilafärbung, bei einer wiederholten Anzucht zeigt der Klone keine erhöhte Aktivität), wohingegen negative Klone unterschiedliche Färbungen von gelb bis hell lila zeigten. Klone mit einer zweimal höheren Aktivität als die untere Meßgrenze wurden in 20 ml 2YT-Medium angezogen (131 Klone), die Proteine wurden exprimiert, die Zellen geerntet und lysiert. Mit den zellfreien Extrakten wurden die Aktivitäten mit 10 mM D,L-Glycerinaldehyd in der Küvette gemessen (siehe II.7.8.). Von diesen 131 Klonen zeigten 38 erneut eine deutlich höhere Aktivität als die Kontrolle TalBY.

Von diesen 38 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und extern sequenziert (siehe Abb. III.28). Bei den 38 Klonen kamen neun verschiedene Aminosäureaustausche vor. Die isolierten und sequenzierten Plasmide enthielt keine weiteren Mutationen.

Ein Vorteil dieses Screenings war, dass eine bereits bestehende Aktivität von TalBY vorlag, die verbessert werden sollte. Von Vorteil war auch, dass ausschließlich unphosphorylierte Substrate verwendet wurden, die verglichen mit den phosphorylierten Substraten kostengünstiger sind. Ein Nachteil dieses Screenings war, dass relativ viele Klone (93 Klone) ein falsch-positives-Signal gaben und deshalb relativ viele Klone überprüft werden mussten.

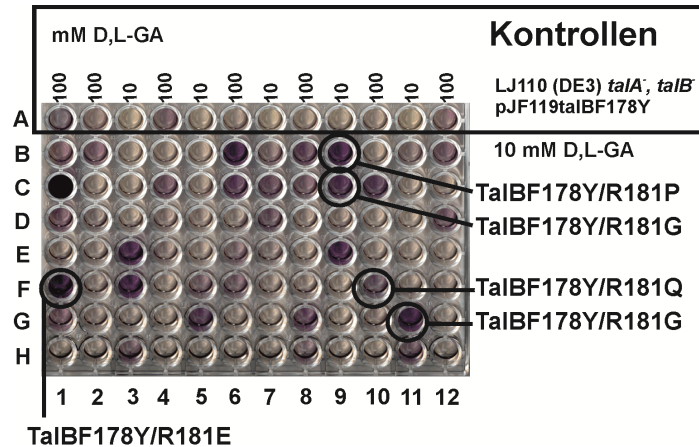


Abb. III.27: Farbnachweis von 84 zufällig gepickten Klonen der gerichteten Sättigungsmutagenesebank TalBF178YR181X (Platte 3) (Veröffentlichung in Bearbeitung). Die Synthese von D-Fruktose aus Dihydroxyaceton (50 mM) und D-Glycerinaldehyd (10 mM) wurde durch einen gekoppelten enzymatischen Farbnachweis visualisiert (siehe Abb. II.7.13.1). In der Reihe A befinden sich die Kontrollen, in den Reihen B bis H die zufällig gepickten Klone. Als Kontrollen dienen zellfreie Extrakte des rekombinanten *E. coli* Stammes LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> pJF119*talBF178Y* mit zwei verschiedenen Konzentrationen D,L-Glycerinaldehyd (untere Meßgrenze: 10 mM; obere Meßgrenze: 100 mM). Positive Klone zeigten eine dunkel lila Farbe, wohingegen negative Klone unterschiedliche Färbungen von gelb bis hell lila zeigten.

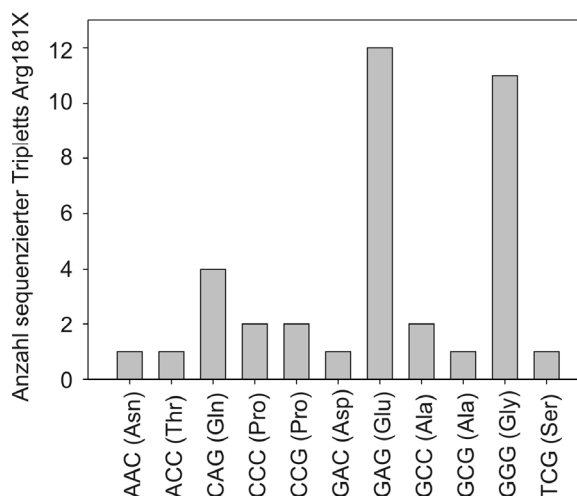


Abb. III.28: Häufigkeit der Triplets der 38 positiven Muteine der Sättigungsmutagenesebank TalBF178YR181X. Die isolierten Plasmide wurden extern sequenziert.

## 2.4. Untersuchung der TalBY-Varianten

In dem Screening auf einen verbesserten  $K_m$ -Wert für D,L-Glycerinaldehyd in der Synthese von D-Fructose als TalBY wurden neun verschiedenen TalBY-Varianten gefunden, die wiederholt eine höhere Aktivität mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd zeigten als TalBY. Von den neun gereinigten Muteinen sollten die spezifischen Aktivitäten in der Transaldolase Reaktion, FSA Reaktion und in der Synthese von D-Fructose bestimmt werden, um diese miteinander vergleichen zu können. Außerdem sollte eine Auswahl getroffen werden, welches der Enzyme die größte Verbesserung mit D-Glycerinaldehyd zeigt. Dazu wurden die Plasmide der Muteine in *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert und die exprimierten Proteine wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe II.7.6.). Aus 1 g Nassgewicht wurden je nach Mutein zwischen 5 und 14 mg Protein mit einer Reinheit von  $\geq 92\%$  aufgereinigt (Abb. 2.4.1).

Die Aktivitäten der angereicherten Enzyme wurden bestimmt (siehe II.7.8.; Tab. III.9 A. + B.; Abb. III.30 + 31).

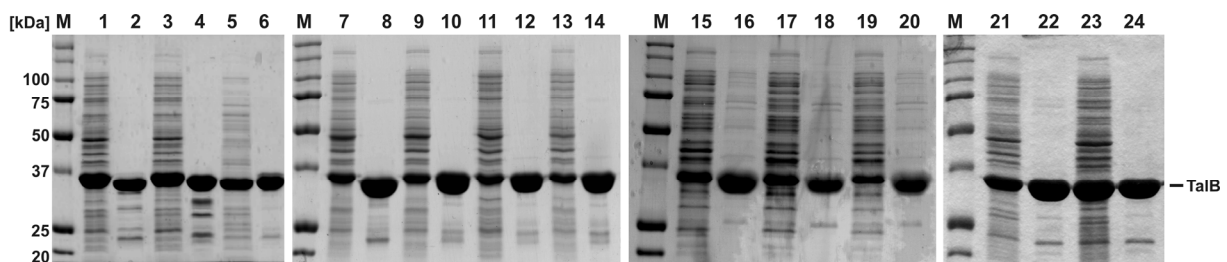


Abb. III.29: SDS-PAGE von den zellfreien Extrakten und den angereicherten TalB-Varianten (Veröffentlichung in Bearbeitung). Vor und nach den jeweiligen Reinigungen wurden Proben (jeweils 10  $\mu\text{g}$  Protein pro Spur) entnommen, die mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt wurden. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung angefärbt und deren molekulare Masse (TalB-Varianten: 37 kDa; die molekulare Masse wurde ermittelt mit ExPASy) wurde mit einem Proteinstandard der Firma Biorad (siehe II.1.) überprüft.

1 = zellfreier Extrakt + TalB      9 = zellfreier Extrakt mit TalBYA17 = zellfreier Extrakt + TalBYP  
 2 = angereichertes TalB      10 = angereichertes TalBYA      18 = angereichertes TalBYP  
 3 = zellfreier Extrakt + TalBY      11: zellfreier Extrakt + TalBYD      19 = zellfreier Extrakt + TalBYQ  
 4 = angereichertes TalBY      12: angereichertes TalBYD      20 = angereichertes TalBYQ  
 5 = zellfreier Extrakt + TalBYE      13: zellfreier Extrakt + TalBYN      21 = zellfreier Extrakt + TalBYS  
 6 = angereichertes TalBYE      14: angereichertes TalBYN      22 = angereichertes TalBYS  
 7 = zellfreier Extrakt mit TalBY      15: zellfreier Extrakt + TalBYG      23 = zellfreier Extrakt + TalBYT  
 8 = angereichertes TalBY      16: angereichertes TalBYG      24 = angereichertes TalBYT  
 M = Proteinstandard (Biorad, siehe II.1.)

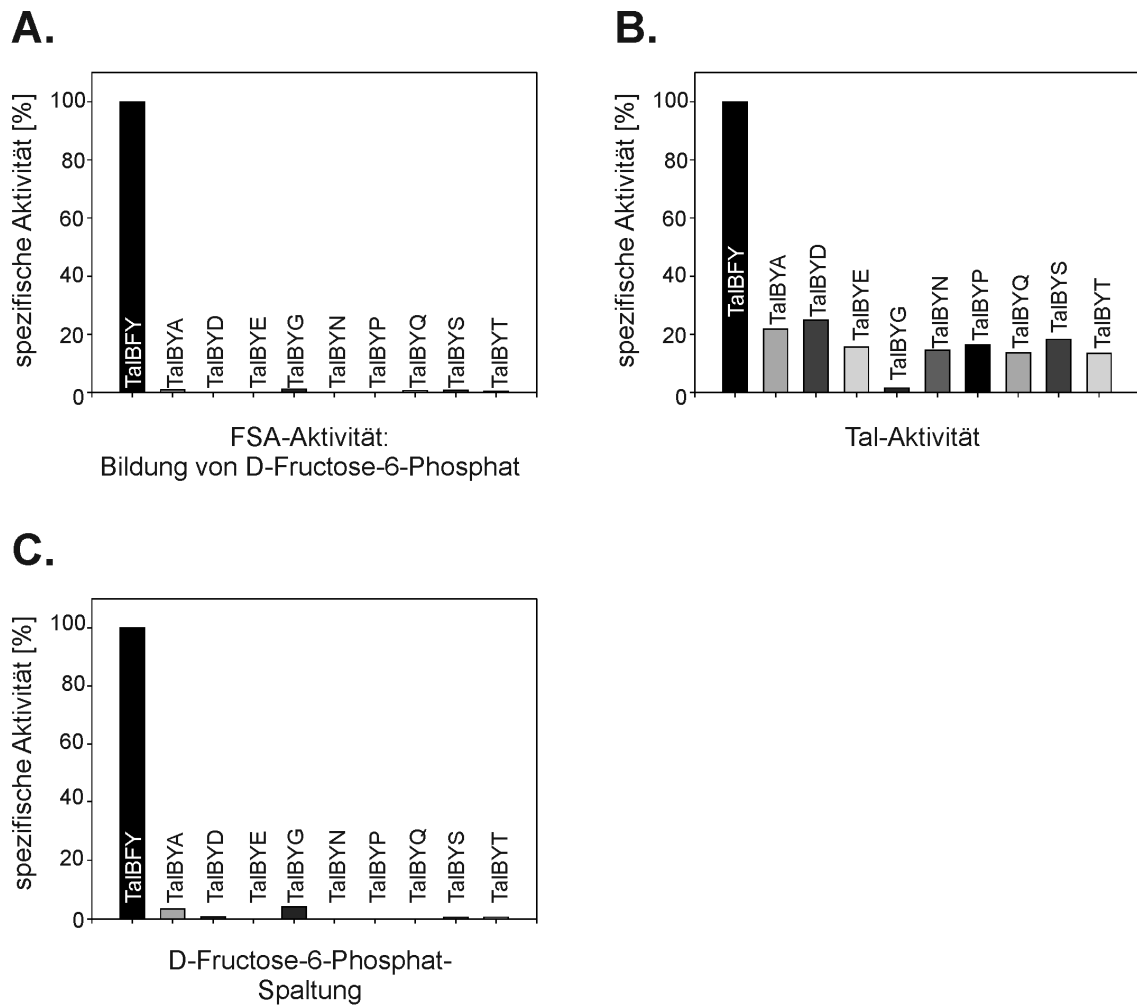


Abb. III.30: Aktivitäten der Muteine in % bezogen auf die Aktivität von TalBY mit den phosphorylierten Substraten. A. FSA-Aktivitäten (siehe II. 7.8.) von TalBY (100 %) und den Muteinen in der Kondensationsreaktion von Dihydroxyaceton (50 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) zu D-Fruktose-6-Phosphat. B. Tal-Aktivitäten (siehe II. 7.8.) von TalBY (100 %) und den Muteinen in der Transferreaktion mit D-Fruktose-6-Phosphat (10 mM) und D-Erythrose-4-Phosphat (2 mM) zu D-Sedoheptulose-7-Phosphat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. C. Die Spaltungsaktivitäten von TalBY (100 %) und den Muteinen mit D-Fruktose-6-Phosphat (10 mM; siehe II. 7.8.).

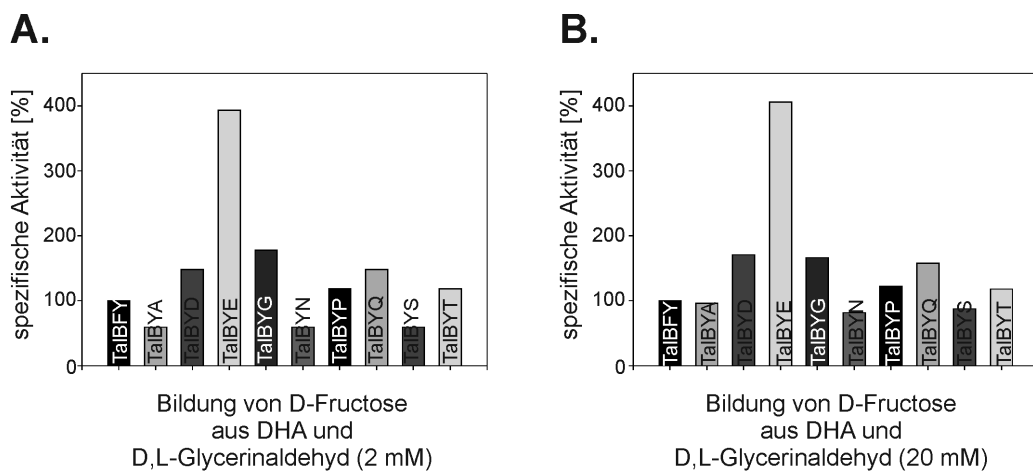


Abb. III.31: Aktivitäten der Muteine in % bezogen auf die Aktivität von TalBY mit den unphosphorylierten Substraten. Spezifische Aktivitäten von TalBY (100 %) und den Muteine in der Kondensationsreaktion von Dihydroxyaceton (150 mM) und D,L-Glycerinaldehyd (siehe II.7.8.). A. 2 mM D,L-Glycerinaldehyd; B. 20 mM D,L-Glycerinaldehyd) zu D-Fruktose.

Tab. III.9: Spezifische Aktivitäten von TalBY und den Muteine von mindestens zwei unabhängigen Messungen (Veröffentlichung in Bearbeitung). Die spezifischen Aktivitäten wurden bestimmt wie im Material und Methodenteil (II.7.8.) beschrieben.

1. FSA-Aktivität, Kondensationsreaktion von DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat.
2. Tal-Aktivität, Transferreaktion von D-Fructose-6-Phosphat auf D-Erythrose-4-Phosphat zu D-Sedoheptulose-7-Phosphat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat.
3. D-Fructose-6-Phosphat Spaltung zu DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat.
4. Kondensationsreaktion mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd (2 mM) zu D-Fructose.
5. Kondensationsreaktion mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd (20 mM) zu D-Fructose.

A.:

Protein	TalBY	TalBYA	TalBYD	TalBYE	TalBYG
Reaktion	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]
1.	9 ± 1 <sup>a</sup>	0,08 <sup>c</sup>	n. d. <sup>d</sup>	n. d. <sup>d</sup>	0,11 <sup>c</sup>
2.	6,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,43 <sup>c</sup>	1,63 <sup>c</sup>	1,03 <sup>c</sup>	0,10 <sup>c</sup>
3.	0,89 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,03 <sup>c</sup>	n. d. <sup>e</sup>	n. d. <sup>e</sup>	0,04 <sup>c</sup>
4.	0,02 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,01 <sup>c</sup>	0,03 <sup>c</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 <sup>c</sup>
5.	0,11 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,11 <sup>c</sup>	0,20 <sup>c</sup>	0,46 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,19 <sup>c</sup>

B.:

Protein	TalBYN	TalBYP	TalBYQ	TalBYS	TalBYT
Reaktion	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]
1.	n. d. <sup>d</sup>	n. d. <sup>d</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,07 <sup>c</sup>	0,04 <sup>c</sup>
2.	0,95 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,08 <sup>c</sup>	0,90 <sup>c</sup>	1,20 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>
3.	n. d. <sup>e</sup>	n. d. <sup>e</sup>	n. d. <sup>e</sup>	n. d. <sup>e</sup>	n. d. <sup>e</sup>
4.	0,01 <sup>c</sup>	0,02 <sup>c</sup>	0,03 <sup>c</sup>	0,01 <sup>c</sup>	0,02 <sup>c</sup>
5.	0,09 <sup>c</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,18 <sup>c</sup>	0,10 <sup>c</sup>	0,14 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Durchschnitt von 4 unabhängigen Messungen

<sup>b</sup> Durchschnitt von 6 unabhängigen Messungen

<sup>c</sup> Durchschnitt von 2 unabhängigen Messungen (Abweichung ≤ 20 %)

<sup>d</sup> n. d., nicht detektierbar; Aktivität < 0,01 U/mg

<sup>e</sup> n. d., nicht detektierbar; Aktivität < 0,03 U/mg

<sup>f</sup> Durchschnitt von 3 unabhängigen Messungen

In einem Screening von TalBY-Varianten auf einen verbesserten  $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd als TalBY wurden neun Klone in der TalBF178YR181X-Bank gefunden (siehe III.2.3.). Zur Überprüfung der Klone wurden die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Enzyme gemessen. Die Aldehyde Glycerinaldehyd und Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurden als Racemate der D- und L-Form angeboten. Ein Nachweis der Aktivitäten erfolgte von der Synthese von entweder D-Fructose oder D-Fructose-6-Phosphat. Mit zwei Konzentrationen D-Glycerinaldehyd (2 / 20 mM) und Dihydroxyaceton zeigte die Variante mit dem Aminosäureaustausch von Arginin nach Glutamat höhere spezifische Aktivitäten als TalBY (siehe Tab. III.9). Die Varianten TalBYD, TalBYG, TalBYP, TalBYQ und TalBYT besitzen höhere spezifische Aktivitäten für die Bildung von D-Fructose als TalBY, aber

niedrigere spezifische Aktivitäten als TalBYE. TalBYA, TalBN und TalBYS. Damit besitzt der Austausch der Variante TalBYE die höchste spezifische Aktivität mit den unphosphorylierten Substraten DHA und D-Glycerinaldehyd.

Mit D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat besitzt TalBYE, wie die meisten anderen Varianten keine messbare Aktivität. In der Rückreaktion, der Spaltung von D-Fruktose-6-Phosphat zeigen außer TalBYA und TalBYG alle TalBY-Varianten keine messbare Aktivität.

Alle Varianten besitzen in der Transferreaktion mit den Substraten D-Fruktose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat eine Restaktivität von mindestens 0,10 U/mg (TalBYG) bis maximal 1,63 U/mg (TalBYD). Somit besitzen alle TalBY Muteine eine verminderte Transaldolase Aktivität. Dies ist vor allem aus dem Grunde erstaunlich, da sowohl die Substrate, wie auch die Produkte phosphoryliert sind. Die meisten Varianten haben jedoch die Fähigkeit D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu binden verloren. Von den TalBY-Varianten zeigt TalBYE die höchsten Aktivitäten mit D-Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton zu D-Fruktose. Aus diesem Grund wurde nur diese Variante näher charakterisiert.

### 2.5. Charakterisierung von TalBY und TalBYE

#### Bestimmung der kinetischen Konstanten von TalBY und TalBYE

Die TalB Doppelmutante TalBYE wurde in einem Screening von Enzymen auf einen verbesserten  $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd gefunden. Aus diesem Grund sollten die kinetischen Konstanten von TalBYE bestimmt werden. Als Vergleich der kinetischen Konstanten mit D-Glycerinaldehyd sollten die kinetischen Konstanten von TalBY und FSA mit D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bestimmt werden. Zur Charakterisierung des Muteins TalBYE wurde das Enzym mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit einer Reinheit von ~ 98 % angereichert (siehe II.7.6.; Abb. III.29). Aus 1 g Nassgewicht konnte ~ 7 mg TalBYE gewonnen werden. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde bestimmt, dass TalBYE wie TalB als Dimer vorliegt.

Zunächst wurden die kinetischen Konstanten für D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat von TalBF178Y und FSA bestimmt. Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde als Racemat der L- und D-Form angeboten, die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte über die Synthese von D-Fruktose-6-Phosphat (siehe II.7.8.; Tab. III.10; Abb. III.32). Die Kinetiken von TalBYE mit D,L-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd wurde wie in den Material und Methoden beschrieben bestimmt (siehe II.7.8.4.; Tab. III.11 / 12; Abb. III.33 + 34). Die Kinetiken wurden in einer direkten Darstellung (siehe Abb. III.32 - 34 A.) und als Hanes-Darstellungen (siehe Abb. III.32 – 34 B.) aufgetragen. Die kinetischen Konstanten wurden aus den Darstellungen nach Hanes bestimmt (siehe Abb. III.32 - 34 B.).



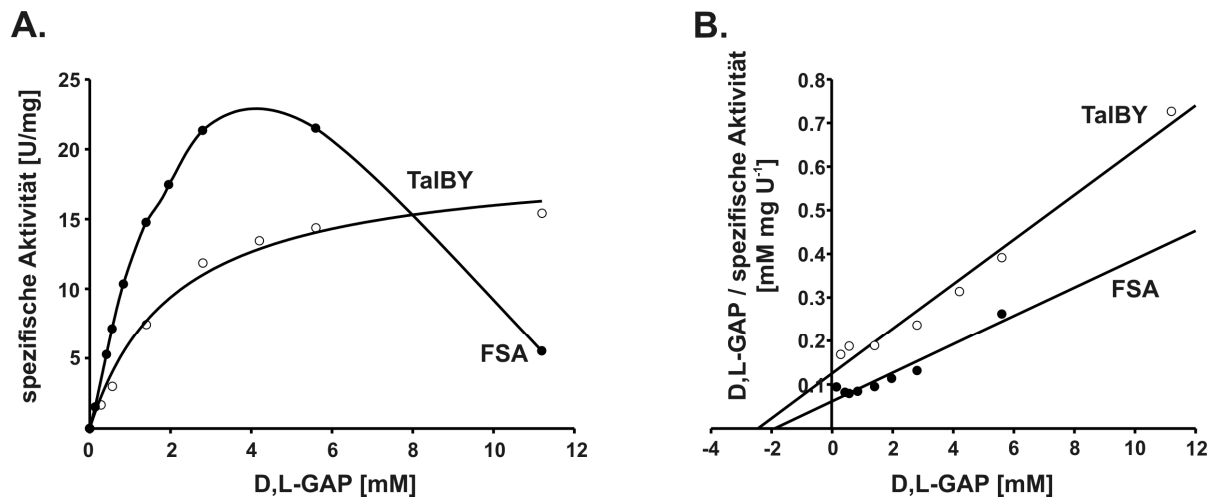


Abb. III.32: A. Direkte Darstellung der Messwerte für die Bildung von D-F6P der Enzyme FSA (●) und TalBY (○) (Veröffentlichung in Bearbeitung). B. Auftragung der Messwerte für die Bildung von D-F6P der Enzyme FSA (●) und TalBY (○) nach Hanes (Veröffentlichung in Bearbeitung). Die Konzentration an Dihydroxyaceton wurde konstant mit 150 mM (TalBY) und 300 mM (FSA) eingesetzt, die Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat variierte von 0,14 mM bis 11,2 mM (FSA) und von 0,28 mM bis 11,2 mM (TalBY). Pro Molekül D-F6P wurde ein Molekül NADPH aus NADP<sup>+</sup> (0,5 mM) gebildet (siehe II.7.8). Die kinetischen Konstanten wurden mit variierenden Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphate von 0,14 mM bis 5,6 mM (FSA) und von 0,28 mM bis 11,2 mM (TalBY) anhand der Darstellung nach Hanes (B.) bestimmt.

Tab. III.10: Kinetische Konstanten für TalBY und FSA von *E. coli* für die Bildung von D-Fruktose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (TalBY: 150 mM; FSA: 300 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bestimmt aus der Darstellung nach Hanes (Veröffentlichung in Bearbeitung).

Protein		TalBY	FSA
Reaktion:			
D-F6P Bildung aus DHA und D,L-GAP	$V_{\max}$ [U/mg]	20 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>
	$k_{\text{cat}}$ <sup>b</sup> [s <sup>-1</sup> ]	12	12
	$K_m$ (D,L-GAP) [mM]	2,4 <sup>a</sup>	1,9 <sup>a</sup>
	$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	4,9 * 10 <sup>3</sup>	6,6 * 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Durchschnitt von 2 unabhängigen Messungen (Abweichung ≤ 10 %)

<sup>b</sup> wurde bestimmt als Wechselzahl pro aktives Zentrum, d. h. pro monomerer Untereinheit

Die kinetischen Konstanten von FSA und TalBY für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurden bestimmt (siehe Tab. III.10, Abb. III.32). Der  $K_m$ -Wert von TalBY war vor allem zum Vergleich mit den  $K_m$ -Werten für Glycerinaldehyd von TalBY und TalBYE von Interesse. Für TalBY und FSA wurden verschiedene Konzentrationen Dihydroxyaceton eingesetzt, so dass DHA für das jeweilige Enzyme sättigend vorlag (FSA,  $K_m$ : 62 ± 7 mM, eingesetzte Konzentration: 300 mM; TalBY,  $K_m$ : 30 ± 4 mM, eingesetzte Konzentration: 150 mM). Die  $V_{\max}$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat von FSA und TalBY sind sich wie die  $K_m$ -Werte von FSA und

TalBY ähnlich. TalBYE zeigte mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat keine Aktivität ( $\leq 0,01$  U/mg). Bei hohen Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat ( $> 4$  mM) zeigt FSA eine deutliche Substratinhibition (siehe Abb. III.32). Da für die Bestimmung der kinetischen Konstanten für Glycerinaldehyd-3-Phosphat ein Racemat der D- und L-Form eingesetzt wurde ist es nicht auszuschließen, dass die beobachtete Inhibition mit der enthaltenen L-Form zusammenhängt. Aufgrund der ähnlichen  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat ist die katalytische Effizienz von TalBY und FSA sich sehr ähnlich.

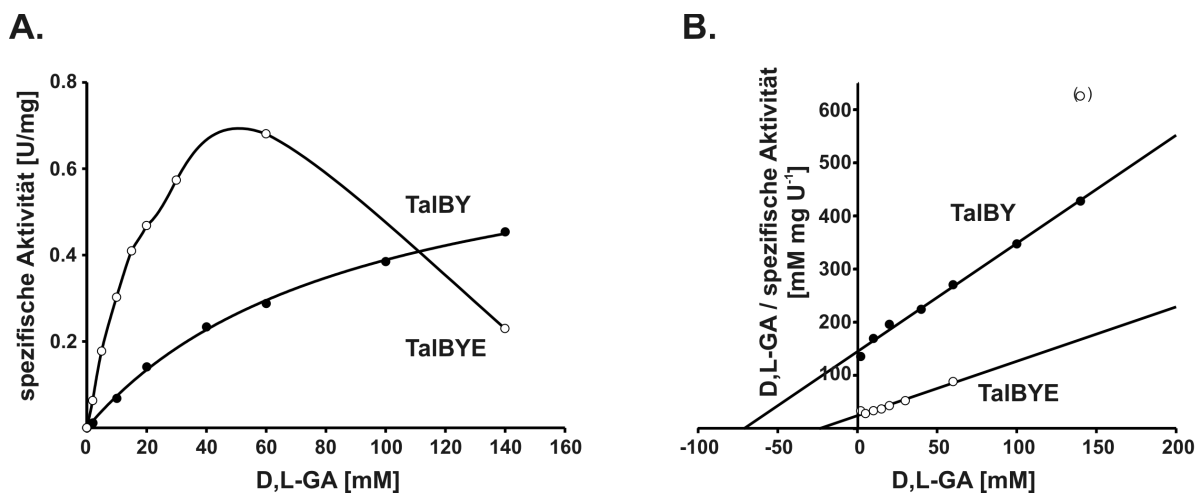


Abb. III.33: A. Direkte Auftragung der Messwerte für die Bildung von D-Fruktose der Enzyme TalBY (●) und TalBYE (○). B. Auftragung der Messwerte für die Bildung von D-Fruktose der Enzyme TalBY (●) und TalBYE (○) nach Hanes. Die Konzentration an Dihydroxyaceton wurde konstant bei 150 mM gehalten, die Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd variierte von 2 mM bis 140 mM. Pro Molekül D-Fru wurde ein Molekül NADPH aus NADP<sup>+</sup> (0,5 mM) gebildet (siehe II.7.8). Die kinetischen Konstanten wurden mit Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd von 2 mM bis 140 mM (TalBY) und von 2 mM bis 60 mM (TalBYE) mit der Darstellung nach Hanes (B.) bestimmt (Veröffentlichung in Bearbeitung).

Tab. III.11: Kinetische Konstanten für TalBY und TalBYE für die Bildung von D-Fruktose aus Dihydroxyaceton (150 mM) und D,L-Glycerinaldehyd bestimmt aus der Darstellung nach Hanes (Veröffentlichung in Bearbeitung).

Protein		TalBY	TalBYE
Reaktion:			
D-Fru Bildung aus DHA und D,L-GA	$V_{max}$ [U/mg]	0,87 <sup>a</sup>	0,98 <sup>a</sup>
	$k_{cat}$ <sup>b</sup> [s <sup>-1</sup> ]	0,54	0,60
	$K_m$ (D,L-GA) [mM]	$> 120^a$	24 <sup>a</sup>
	$k_{cat}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$< 4,3$	26

<sup>a</sup> Durchschnitt von 2 unabhängigen Messungen (Abweichung  $\leq 12$  %)

<sup>b</sup> wurde bestimmt als Wechselzahl pro aktives Zentrum, d. h. pro monomerer Untereinheit

Der  $K_m$ -Wert von TalBY für den unphosphorylierten Zucker D,L-Glycerinaldehyd ist mindestens 50mal höher als der  $K_m$ -Wert für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Für TalBY lag Dihydroxyaceton mit einer Konzentration von 150 mM sättigend vor (TalBY,  $K_m$ :  $30 \pm 4$  mM, siehe III.1.6.). Durch eine Erhöhung der Dihydroxyaceton-Konzentration auf 300 mM konnte die Aktivität von TalBYE nicht erhöht werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass für TalBYE eine Konzentration von 150 mM Dihydroxyaceton im sättigenden Bereich des Enzyms lag.

Der  $K_m$ -Wert von TalBY für D,L-Glycerinaldehyd ist aufgrund dessen Löslichkeit nicht genau bestimmbar. Endkonzentrationen höher als 140 mM konnten nicht erreicht werden und eine Konzentration von 140 mM von D,L-Glycerinaldehyd liegt nicht im sättigenden Bereich von TalBY. Bei TalBYE ist mit D,L-Glycerinaldehyd bei höheren Substratkonzentrationen ( $> 60$  mM) eine Inhibition zu beobachten (siehe Abb. III.33). Aus diesem Grund wurden die kinetischen Konstanten aus der Darstellung nach Hanes bestimmt. Die  $V_{max}$ -Werte von TalBY und TalBYE sind für D,L-Glycerinaldehyd mit  $\sim 0,9$  U/mg sehr ähnlich (siehe Tab. III.11 + 12). TalBYE hat mit D,L-Glycerinaldehyd einen deutlich niedrigeren  $K_m$ -Werte von 24 mM als TalBY ( $> 120$  mM). Dadurch unterscheidet sich die katalytische Effizienz der beiden Enzyme, um mehr als ein fünffaches voneinander. TalB zeigt mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd keine Aktivität ( $< 0,01$  U/mg).

Bei TalBYE wurde bei hohen Substratkonzentrationen eine Inhibition beobachtet, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Inhibition an der L-Form des Racemates, D,L-Glycerinaldehyd, lag wurden die kinetischen Konstanten für D-Glycerinaldehyd der beiden Enzyme TalBY und TalBYE bestimmt.

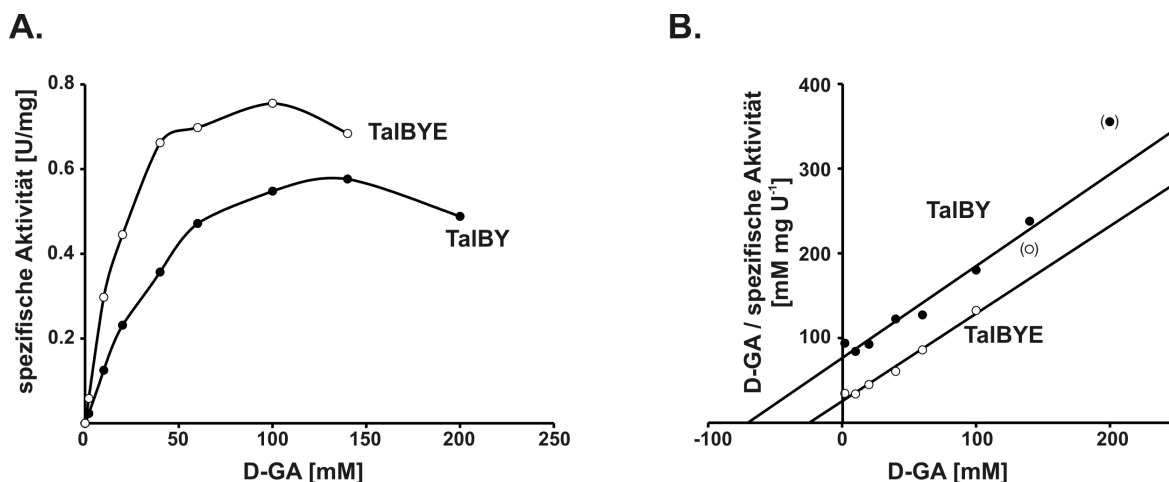


Abb. III.34: A. Direkte Darstellung der Messwerte für die Bildung von D-Fructose der Enzyme TalBY (●) und TalBYE (○). B. Auftragung der Messwerte für die Bildung von D-Fructose der Enzyme TalBY (●) und TalBYE (○) nach Hanes. Die Konzentration an Dihydroxyaceton wurde konstant bei 150 mM gehalten, die Konzentration an D-Glycerinaldehyd variierte von 2 mM bis 200 mM (TalBY) und von 2 mM bis 140 mM (TalBYE). Pro Molekül D-Fructose wurde ein Molekül NADPH aus NADP<sup>+</sup> (0,5 mM) gebildet (siehe II.7.8). Mit variierender Konzentration an D-Glycerinaldehyd von 2 mM bis 140 mM (TalBY) und von 2 mM bis 100 mM (TalBYE) wurden die kinetischen Konstanten mit der Darstellung nach Hanes (B.) bestimmt (Veröffentlichung in Bearbeitung).

Tab. III.12: Kinetische Konstanten für TalBY und TalBYE für die Bildung von D-Fructose aus Dihydroxyaceton (150 mM) und D-Glycerinaldehyd bestimmt aus der Darstellung nach Hanes (Veröffentlichung in Bearbeitung).

Protein		TalBY	TalBYE
Reaktion:			
D-Fru Bildung aus DHA	$V_{\max}$ [U/mg]	$0,94 \pm 0,08^a$	$1,03^b$
und D-GA	$k_{\text{cat}}$ <sup>c</sup> [s <sup>-1</sup> ]	$0,58 \pm 0,05$	$0,64$
	$K_m$ (D-GA) [mM]	$73 \pm 12^a$	$25^b$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$8,2 \pm 0,6$	$25$

<sup>a</sup> Durchschnitt von 3 unabhängigen Messungen

<sup>b</sup> Durchschnitt von 2 unabhängigen Messungen (Abweichung  $\leq 7\%$ )

<sup>c</sup> wurde bestimmt als Wechselzahl pro aktives Zentrum, d. h. pro monomerer Untereinheit

Bei hohen Konzentrationen D-Glycerinaldehyd zeigen TalBY ( $\geq 200$  mM) und TalBYE ( $\geq 140$  mM) eine Substratinhibition (siehe Abb. III.34). D-Glycerinaldehyd wurde mit einer Reinheit von  $\geq 98\%$  eingesetzt, damit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass als Verunreinigung L-Glycerinaldehyd ( $\leq 2\%$ ) enthalten war. Mit D-Glycerinaldehyd als Substrat ist der  $K_m$ -Wert von TalBY um mehr als die Hälfte niedriger als für D,L-Glycerinaldehyd. Wohingegen der  $K_m$ -Wert von TalBYE für D-Glycerinaldehyd ähnlich mit dem  $K_m$ -Wert für D,L-Glycerinaldehyd. Der  $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd von TalBY ist dreimal größer als der  $K_m$ -Wert von TalBYE. Die beiden  $V_{\max}$ -Werte von TalBY und TalBYE sind mit D-Glycerinaldehyd ähnlich. Die katalytische Effizienz der beiden Enzyme unterscheidet sich um das Dreifache voneinander.

TalBY besitzt für D,L-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd eine niedriger Affinität als für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Das Doppelmutein TalBYE besitzt für D,L-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd eine höhere Affinität als TalBY. Eine Inhibition von TalBYE durch L-Glycerinaldehyd konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass das Enzym bei hohen Konzentrationen an D-Glycerinaldehyd ebenfalls eine Inhibition zeigt. D-Glycerinaldehyd lag nicht rein vor und könnte L-Glycerinaldehyd enthalten. Dies aber mit weniger als 2%, da die Abnahme der Aktivitäten bei hohen D-Glycerinaldehyd-Konzentrationen größer als 2% war. In der Spaltungsreaktion von D-Fructose besitzt TalBYE eine doppelt so hohe spezifische Aktivität (0,18 U/mg) als TalBY.

Neben der photometrischen Bestimmung der Aktivität von TalBY und TalBYE können die unphosphorylierten Substrate und Produkte mittels HPLC voneinander getrennt und analysiert werden. Dazu wurde TalB, TalBY und TalBYE in verschiedenen Ansätzen mit dem Donor DHA und den Akzeptoren D,L-Glycerinaldehyd, D-Glycerinaldehyd inkubiert (siehe II.7.9.). Darüber hinaus wurde Glycolaldehyd als Akzeptor mit DHA ausgetestet. Proben

wurden zwischen 0 und 8 h entnommen und mittels HPLC analysiert (siehe Abb. III.35). Die Quantifizierung der Produkte erfolgte über Kalibrierungen der Reinsubstanzen D-Fructose und D-Xylulose. Desweiteren wurden einzelnen Proben die Reinstoffe der Produkte zugegeben. Bei gleichen Retentionszeiten der Produkte der Proben und der Reinsubstanzen kann nachgewiesen werden, dass ein Produkt mit der gleichen Retentionszeit wie D-Fructose und D-Xylulose entstand.

Bei den Proben mit D,L-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd bestand bei der Auswertung der Produkte eine Schwierigkeit. Eines der Stereoisomere von D-Fructose, nämlich D-Psicose, besitzt die gleiche Retentionszeit wie D-Fructose. Gleichzeitig besitzt D-Fructose und D-Psicose bei gleichen Konzentrationen unterschiedliche Absorptionen bei 190 nm. Dadurch kann bei dem neuen Produkt nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Gemisch der beiden Zucker handelt, dass mit Kalibrierungen der beiden Zucker nicht quantifiziert werden kann. Ein weiteres Problem war, dass neben dem Peak von D-Fructose/D-Psicose ein weiterer Peak entstand. Dieser Peak besitzt die gleiche Retentionszeit wie D-Tagatose und D-Sorbose, beides sind ebenfalls Stereoisomere von D-Fructose. Aber auch hier war eine Quantifizierung nicht möglich, da diese beiden Zucker bei gleichen Konzentrationen unterschiedliche Absorptionen besaßen. Bei der Auswertung der analysierten Proben wurde davon ausgegangen, dass es sich um D-Fructose handelt. Es wurde aber davon abgesehen die Produktbildung quantitativ zu bestimmen und so wurde die Produktbildung nur qualitativ bestimmt.

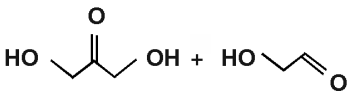

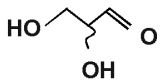
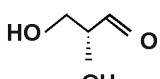
	<b>TalBwt</b>	<b>TalBY</b>	<b>TalBYE</b>
 Dihydroxy- acetone	-	+	++
 Glycolaldehyd			
 D,L-Glycerinaldehyd	-	+	+++
 D-Glycerinaldehyd	-	+	++

Abb. III.35: Die angereicherten Enzyme TalB, TalBY und TalBYE wurden mit DHA (200 mM) als Donor und verschiedenen Akzeptoren (100 mM, D,L-Glycerinaldehyd, D-Glycerinaldehyd, Glykolaldehyd) bei 30°C in Tal-Puffer inkubiert (siehe II.7.9). Zwischen 0 und 8 h wurden Proben entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Produktbildung wurde bei 190 nm gemessen und wurde mit Kalibrierungen der Reinsubstanzen D-Fructose und D-Xylulose verglichen. Bei den Messungen handelt es sich um mindestens 2 unabhängige Messungen.

- keine Produktbildung messbar; + neues Produkt gemessen; ++ neues Produkt gemessen, mit einer größeren Ausbeute als +.

Mit keinem der Edukte wurde mit dem wildtypischen TalB eine Produktbildung über die Entstehung eines neuen Peaks beobachtet. Mit TalBY und TalBYE wurde mit Glycolaldehyd und DHA ein neues Produkt gemessen, das die gleiche Retentionszeit wie D-Xylulose besitzt. Mit jedem der Akzeptoren wurde mit TalBYE deutlich mehr Produkt gemessen als mit TalBY. Demzufolge besitzt die Doppelmutante TalBYE eine deutlich höhere Synthese mit den unphosphorylierten Substraten DHA und D,L-Glycerinaldehyd, D-Glycerinaldehyd, Glycolaldehyd. Für eine Nähere Charakterisierung der Umsätze von TalB, TalBY und TalBYE wurden die hier genannten Umsätze von unserer Kooperationsgruppe in Barcelona um P. Clapés (Spanien), wiederholt und mit den dortigen Analysemethoden (*in situ* NMR, NMR, HPLC) untersucht.

### Strukturaufklärung von TalBYE

Die neue TalB-Variante TalBYE stellt ein interessantes Enzym dar, das mit den beiden unphosphorylierten Substraten DHA und D-Glycerinaldehyd, D-Fructose bilden kann. Die Position Arg181 wurde für eine Mutagenese ausgewählt, weil in der Kristallstruktur von TalBY ein Sulfation des Puffers in der Nähe dieser Aminosäure und den beiden Aminosäureresten Ser226 und Arg228 lokalisiert ist [128]. Es stellte sich nun die Frage, ob sich die Variante TalBYE, von TalB und TalBY unterscheidet.

Für die Kristallisation und die Analyse der Röntgenstruktur von TalBYE wurde das Protein am ÄKTA Purifier (siehe II.2.) mittels einer Ni-NTA-Affinitätschromatografie und einem aufsteigenden Imidazolgradienten (siehe II.7.6.1.), mit einer Reinheit von 99% aufgereinigt und T. Sandalova vom Karolinska Institutet in Stockholm Schweden bereitgestellt (siehe Abb. III.36).

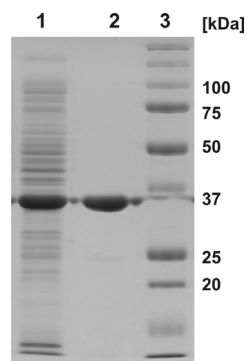


Abb. III.36: SDS-PAGE vom zellfreien Extrakt mit TalBYE und dem angereicherten TalBYE. Vor und nach der jeweiligen Reinigung am ÄKTA Purifier wurden Proben (jeweils 10 µg Protein pro Spur) entnommen, die mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt wurden. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung angefärbt und deren molekulare Masse (TalBEY: 37 kDa; die molekulare Masse wurde ermittelt mit ExPASy) wurde mit einem Proteinstandard der Firma Biorad (siehe II.1.) überprüft.

1 = zellfreier Extrakt + TalBYE,

2 = angereichertes TalBYE,

3 = Proteinstandard von Biorad (siehe II.1.)

Von T. Sandalova konnte die Röntgenstruktur von TalBYE mit einer Auflösung von 1,9 Å gelöst werden (siehe Abb. III.37). Wie bei der Einfachmutante wurde die Kristallisation in einem Sulfatpuffer durchgeführt. Bei einem Vergleich der Röntgenstrukturen von TalB mit TalBYE sind sich die beiden Strukturen mit den überlagerten C-Atomen mit r.m.s.d. von 0.3 Å sich sehr ähnlich. Der Hauptunterschied der beiden Strukturen ist an der Position 181 an der die Aminosäure Arginin gegen Glutamat und der Position 178 von Phenylalanin nach Tyrosin ausgetauscht ist. Es konnte ebenfalls ein Sulfation im aktiven Zentrum gefunden werden. In der Abbildung 2.5.6 ist dieses Sulfation nicht dargestellt, da es sich hier um die Aufnahme eines frühen Kristall handelt, der noch kein Sulfation enthält. Dieses Sulfation besitzt allerdings eine geringere Bindung als das Sulfation in TalBY [128]. Das Sulfation bildet Wasserstoffbrücken mit den Aminosäureresten Arg228 und Glu181. Dies deutet daraufhin, dass entweder das Glutamat ungeladen ist oder dass das Sulfat als Hydrogensulfat vorliegt.

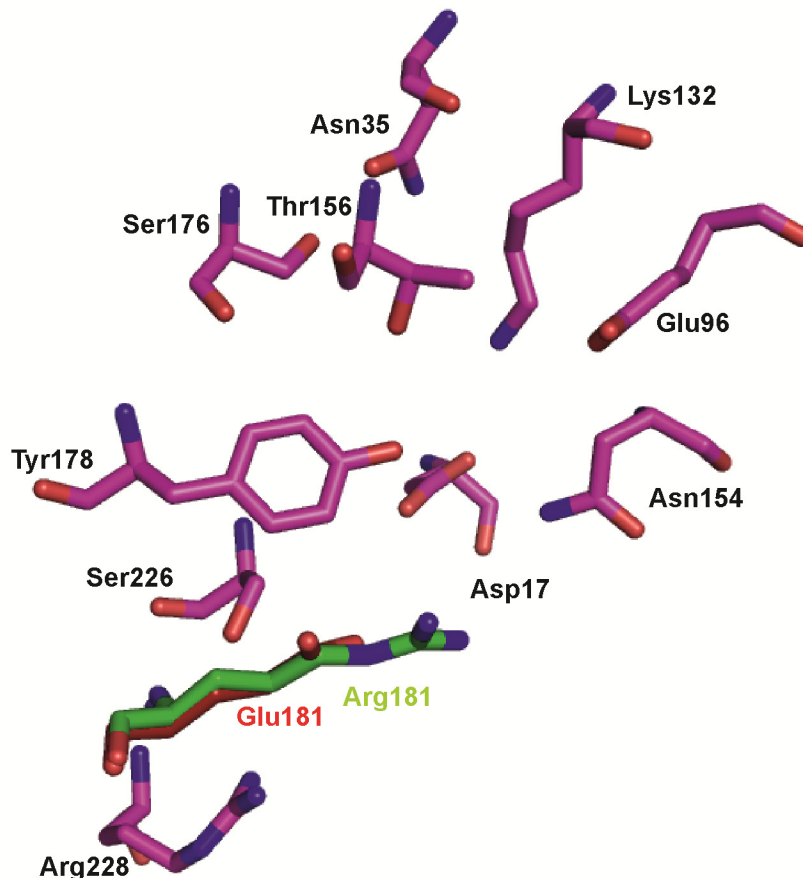


Abb. III.37: Die Röntgenstrukturen von TalBY (grün) und TalBYE (magenta) im Vergleich (verändert nach [17, 128]). Aktives Zentrum von TalBEY hier ohne das Sulfation dargestellt. An der Position 181 befindet sich in TalBY ein Arg (grün) und in TalBYE ein Glu (rot). Dargestellt wurden die Strukturen mit PyMOL (pdb-Nr. TalBYE: wurde noch nicht vergeben; Strukturdaten wurden von T. Sandalova, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden zur Verfügung gestellt, Veröffentlichung befindet sich in Bearbeitung, TalBY: 3CWN).

### 3. Einfluss von D-Glycerinaldehyd auf die Aktivität von FSA mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat

Erst vor wenigen Jahren wurde von Schürmann und Sprenger 2001 [66] eine Aldolase von *E. coli* entdeckt, die wie TalBY aus Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat D-Fructose-6-Phosphat bildet. FSA und TalBY binden beide ein an der Katalyse beteiligtes Wassermolekül, in der Nähe des Schiff'sche Base formenden Lysin-Rests. Das Substratspektrum von FSA wurde von Schürmann et al. 2002 [71] erstmalig untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass FSA mit den Donoren Dihydroxyaceton, Hydroxyaceton und dem Akzeptor D-Glycerinaldehyd D-Fructose bzw. 1-Deoxyfructose mit Aktivitäten von 0,01 U/mg bzw. 1,0 U/mg bildet. Mit Dihydroxyaceton als Donor und D-Glycerinaldehyd als Akzeptor ist D-Glycerinaldehyd ein deutlich schlechteres Substrat als mit Hydroxyaceton. Wohingegen D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat mit Dihydroxyaceton (45 U/mg) ein besseres Substrat ist als mit Hydroxyaceton (1 U/mg). Eine Möglichkeit wäre, dass D-Glycerinaldehyd mit Dihydroxyaceton als Inhibitor reagiert. Für TalBY konnte gezeigt werden, dass aus D-Glycerinaldehyd und DHA D-Fructose gebildet wird, aber bei hohen D-Glycerinaldehyd-Konzentration TalBY inhibiert wird. Der Einfluss von D-Glycerinaldehyd sollte auf die Aktivität von FSA mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat untersucht werden. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob D-Glycerinaldehyd als Inhibitor für FSA in der Kondensationsreaktion von DHA mit D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat reagiert.

Dazu wurde FSA zunächst mit drei verschiedenen Konzentrationen D-Glycerinaldehyd (äquimolar: 5,2  $\mu$ M, 10fachem Überschuss: 52  $\mu$ M, 50fachem Überschuss: 260  $\mu$ M) bei 30°C in Tal-Puffer inkubiert. Zwischen 0 und 24 h wurden Proben entnommen und mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde die Aktivität von FSA gemessen (siehe II.7.8.2.; Abb. III.38). D-Glycerinaldehyd lag mit einer Reinheit von  $\geq 98\%$  eingesetzt. Damit liegen Verunreinigungen, wie möglicherweise L-Glycerinaldehyd mit  $\leq 2\%$  vor.



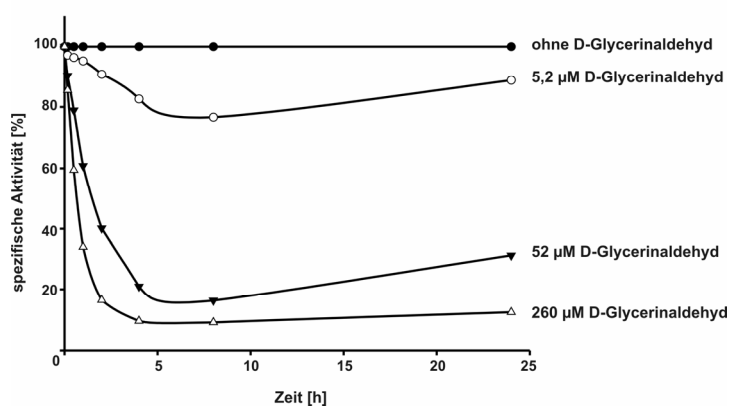


Abb. III.38: Inkubation von FSA ohne und mit drei verschiedenen Konzentrationen D-Glycerinaldehyd (5,2  $\mu\text{M}$ , 52  $\mu\text{M}$ , 260  $\mu\text{M}$ ) bei 30°C in Tal-Puffer (siehe II.7.12). Die Aktivität von FSA wurde jeweils einmal bestimmt und mit zwei verschiedenen FSA-Präparationen wiederholt. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte aus den beiden Messungen. Zwischen 0 und 24 h wurden Proben entnommen und die verbleibende Aktivität von FSA mit Dihydroxyaceton (300 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) über die Bildung von D-Fruktose-6-Phosphat bestimmt.

Bereits mit äquimolarer Konzentration von D-Glycerinaldehyd zu FSA ist nach 24 h eine Verminderung der Aktivität auf 89% der Ausgangsaktivität (100%: 25 U/mg) zu beobachten. Mit einem 50fachen Überschuss an D-Glycerinaldehyd nahm die Aktivität von FSA nach 24 h auf 12 % ab. Mit einem 10fachen Überschuss an D-Glycerinaldehyd konnte nach 24 h noch 31% der Anfangsaktivität gemessen werden. Bei einer Verunreinigung von D-Glycerinaldehyd mit L-Glycerinaldehyd von  $\leq 2\%$  und einer möglichen Inhibition von FSA durch L-Glycerinaldehyd würde eine Abnahme der Aktivität von FSA um  $\leq 2\%$  zu beobachten sein. Die hier gemessenen Aktivitäten nahmen bei allen Ansätzen mit D-Glycerinaldehyd um mehr als 2% ab. Eine Inhibition von L-Glycerinaldehyd kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch wird die Aktivität von FSA hauptsächlich von D-Glycerinaldehyd beeinflusst.

Alle vier Ansätze wurden nach 24 h Inkubation 1:50 verdünnt und erneut bis zu 24 h inkubiert. In allen Ansätzen konnte durch die Verdünnung, die FSA-Aktivität fast vollständig zurückgewonnen werden (ohne D-Glycerinaldehyd: 100%: 32 U/mg; 5,2  $\mu\text{M}$ : 100%, 52  $\mu\text{M}$ : 91%, 260  $\mu\text{M}$ : 78%). Damit konnte gezeigt werden, dass D-Glycerinaldehyd einen negativen Einfluss auf die Aktivität von FSA ausübt. Durch Verdünnung der FSA-D-Glycerinaldehyd-Gemische konnte die FSA-Aktivität fast vollständig zurückgewonnen werden. Deswegen handelt es sich hier um eine reversible Inhibition.

Die kinetischen Konstanten von FSA wurden für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat mit Dihydroxyaceton gemessen. Zur Bestimmung der Inhibition wurden mehrere Meßreihen mit FSA durchgeführt. In einer Meßreihe wurde die FSA Aktivität mit variierenden Konzentrationen D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bestimmt. In weiteren Meßreihen wurde die Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat erneut variiert, gleichzeitig wurde FSA

mit drei verschiedenen Konzentrationen an D-Glycerinaldehyd (1 mM, 1,5 mM und 2 mM) gemischt (siehe II.7.8.2., Abb. III.39, Tab. III.13).

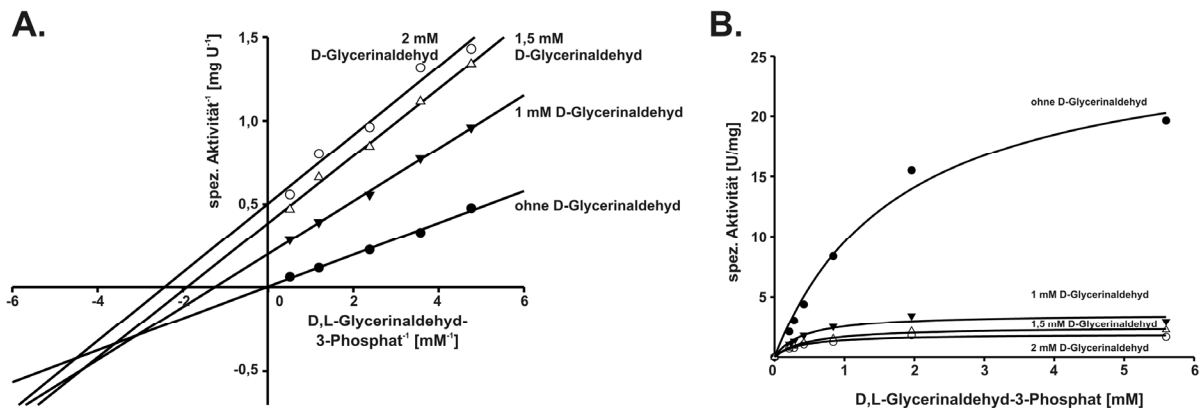


Abb. III.39: A. Doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk der Messwerte von FSA für die Bildung von D-Fruktose-6-Phosphat ohne (●) und mit D-Glycerinaldehyd (1 mM ▼, 1,5 mM Δ, 2 mM ○; siehe II.7.12). Die Konzentration an Dihydroxyaceton wurde konstant bei 300 mM gehalten, die Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat variierte von 0,28 mM bis 5,6 mM. Pro Molekül D-Fruktose-6-Phosphat wurde ein Molekül NADPH (aus NADP<sup>+</sup> 0,5 mM) gebildet (siehe II.7.8). B. Direkte Darstellung für die Bildung von D-Fruktose-6-Phosphat von FSA ohne (●) und mit D-Glycerinaldehyd (1 mM ▼, 1,5 mM Δ, 2 mM ○).

Tab. III.13: Kinetische Konstanten von FSA von *E. coli* für die Bildung von D-Fruktose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton (300 mM) und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat ohne und mit D-Glycerinaldehyd bestimmt aus der direkten Darstellung. Die kinetischen Konstanten sind Mittelwerte einer doppelten Bestimmung.

D-Glycerinaldehyd [mM]		0	1	1,5	2
Reaktion:					
D-F6P Bildung aus DHA	$V_{max}$ [U/mg]	31	3,62	2,50	1,90
und D,L-GAP	$K_m$ (D,L-GAP) [mM]	1,90	0,37	0,49	0,37

Anhand der direkten Darstellung ist deutlich zu sehen, dass die Zugabe von D-Glycerinaldehyd zu FSA sowohl die  $V_{max}$ -Werte von 31 U/mg auf 1,90 U/mg (2 mM D-Glycerinaldehyd) vermindert, wie auch die  $K_m$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat beeinflusst. Bei der Darstellung nach Lineweaver-Burke schneiden sich die Geradenscharen im 3. Quadranten. Bei einer Auswertung nach Bisswanger [144] entspricht dies einer nicht-kompetitiven Inhibition. Bei einer nicht-kompetitiven Inhibition konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat nicht um die gleiche Bindungsstelle. Demnach bindet D-Glycerinaldehyd an eine andere Stelle als D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Es wurde bereits diskutiert, dass D-Glycerinaldehyd mit Lys85 ein Carbinolamin bilden kann [68]. Bei diesen Messungen wurde die Aktivität über die Bildung von D-Fruktose-6-Phosphat bestimmt. Deswegen kann nicht

ausgeschlossen werden, dass D-Glycerinaldehyd als Donor und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Akzeptor zu einem neuen Produkt reagiert. Der  $K_i$ -Wert wurde nicht bestimmt, da mit der niedrigsten D-Glycerinaldehyd-Konzentration (1 mM) bereits mehr als 88 % der Enzymaktivität gehemmt ist.

Bei einer nicht-kompetitiven Inhibition kann man die Art der Inhibition näher charakterisieren, in dem man die Steigungen und die Ordinatenschnittpunkte in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration (D-Glycerinaldehyd) aufträgt (siehe Abb. III.40). Anhand dieser Darstellungen lassen sich die Dissoziationskonstanten  $K_{ic}$  und  $K_{iu}$  für den Hemmstoff berechnen. Der  $K_{ic}$  berechnet sich aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes und dem Zerfall des Komplexes. Der  $K_{iu}$  berechnet sich aus der Bildung und dem Zerfall eines Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes.

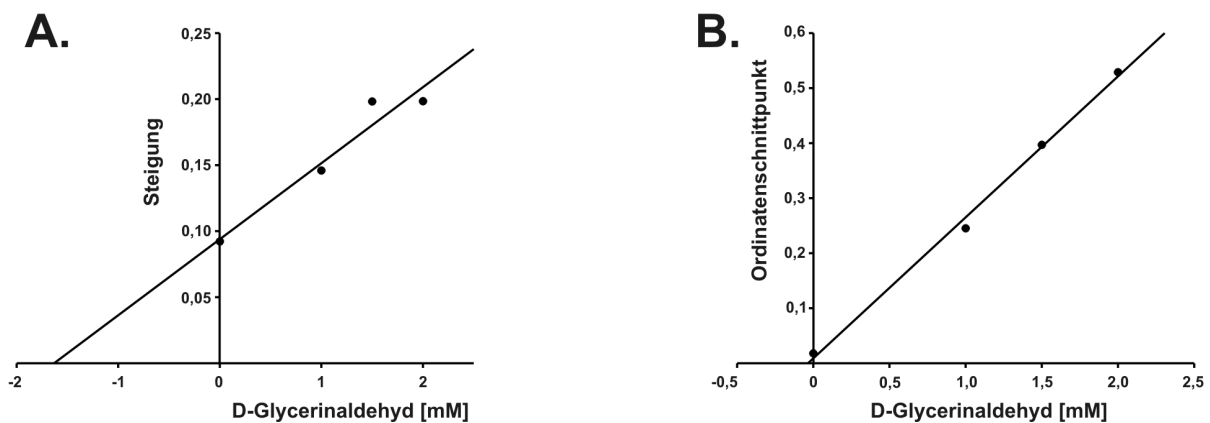


Abb. III.40: A. Auftragung der Steigungen gegen die eingesetzten D-Glycerinaldehydkonzentrationen zur Berechnung der Inhibitorkonstante  $K_{ic}$ . B. Auftragung der Ordinatenschnittpunkte gegen die eingesetzten D-Glycerinaldehydkonzentrationen zur Berechnung der Inhibitorkonstante  $K_{iu}$ .

Anhand der Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse lassen sich die Inhibitorkonstanten  $K_{ic}$  (1,63 mM) und  $K_{iu}$  (35  $\mu$ M) bestimmen. Demnach wäre  $K_{ic}$  größer als  $K_{iu}$ . Bei einer Inhibition würde dies dem Sonderfall entsprechen, dass der Inhibitor (D-Glycerinaldehyd) die Bindung des Substrates (D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat) begünstigt.

Anhand dieser Messungen konnte gezeigt werden, dass D-Glycerinaldehyd FSA in der Kondensationsreaktion mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat nicht-kompetitiv inhibiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung von D-Glycerinaldehyd die Bindung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat begünstigt, damit sinkt der  $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat von 1,9 mM auf 0,37 mM. Dies würde erklären, warum mit zunehmender Konzentration an D-Glycerinaldehyd neben dem  $V_{max}$ -Wert auch der  $K_m$ -Wert sinkt.

#### 4. Screening auf Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat aus Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat

In der ersten Runde der Sättigungsmutagenese von TalB und anschließendem Screening der Klone auf Synthese von D-Fructose-6-Phosphat wurde eine Enzymvariante (TalBY) gefunden, die die gewünschte verbesserte Aktivität besitzt. Die Überlegung war nun, ob TalB so verändert werden kann, dass es ein Stereoisomer von D-Fructose-6-Phosphat bildet. D-Tagatose-6-Phosphat ist ein Stereoisomer von D-Fructose-6-Phosphat (3*S*, 4*R*) mit einer 3*S*, 4*S*-Konfiguration. In einem neu entwickelten Screening sollte eine Enzymvariante gefunden werden, die aus den Substraten Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat D-Tagatose-6-Phosphat bildet. Damit würde das Enzym eine neue Stereospezifität für die Synthese von Produkten besitzen. Anhand der neuen Stereospezifität von TalB könnte eine Aussage darüber getroffen werden, welche Aminosäureaustausche an welcher Position, die Stereospezifität ändern. Damit könnte TalB so verändert werden, dass neue nicht natürliche Produktkonfigurationen gebildet werden könnten. D-Tagatose-6-Phosphat ist neben D-Sorbose-6-Phosphat und D-Psicose-6-Phosphat eines von mehreren möglichen Stereoisomeren von D-Fructose-6-Phosphat, die sich an der Stellung der OH-Gruppe am C3- und C4-Atom unterscheiden (siehe Abb. III.41

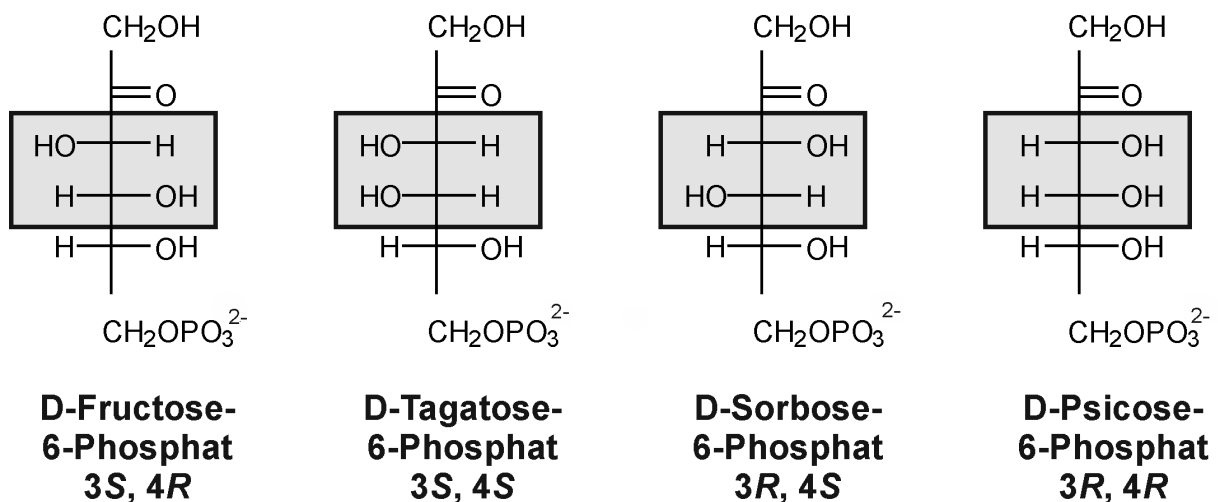


Abb. III.41: D-Fructose-6-Phosphat, D-Tagatose-6-Phosphat, D-Sorbose-6-Phosphat und D-Psicose-6-Phosphat.

##### 4.1. Auswahl der Sättigungsmutagenesebanken für eine Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat

Von T. Sandalova (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) wurde D-Fructose-6-Phosphat ins aktive Zentrum der Kristallstruktur von TalB modelliert (siehe Abb. III.42). D-Tagatose-6-Phosphat und D-Fructose-6-Phosphat unterscheiden sich an der Position der Hydroxyl-Gruppe am 4. C-Atom des Zuckers. Anhand des TalB-Fructose-6-Phosphat-

Modells wurden Aminosäurereste ausgewählt, die sich in der Nähe der Hydroxyl-Gruppe am C4-Atom befinden. Für ein erstes Screening auf die Bildung von D-Tagatose-6-Phosphat wurden zwei Aminosäurereste, Phe178 und Ser226, ausgewählt. Durch eine Änderung der Aminosäurereste soll beim Knüpfen der neuen C-C-Bindung die Position der Hydroxyl-Gruppe geändert werden, so dass anstatt einer 3*S*, 4*R* Konfiguration eine 3*S*, 4*S*-Konfiguration entsteht. Im bereits beschriebenen Screening auf eine Synthese von D-Fructose-6-Phosphat wurde die gerichtete Sättigungsmutagenesebank TalBF178X generiert. Eine TalBS226X-Sättigungsmutagenesebank wurde von Dr. Anne K. Samland für ein Screening auf den Verlust der Transaldolase-Aktivität hergestellt. Eine dritte Sättigungsmutagenesebank TalBF178YS226X wurde bereits für das Screening auf eine hohe Affinität für D,L-Glycerinaldehyd gebildet.

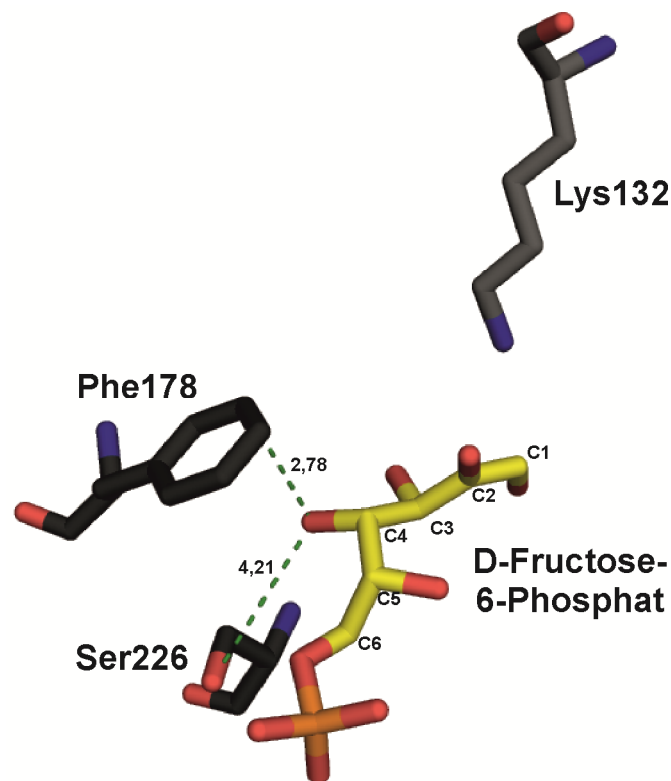


Abb. III.42: Röntgenstruktur von TalB (1ONR) mit einem von T. Sandalova (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) in das aktive Zentrum modellierten D-Fructose-6-Phosphat-Molekül (gelb). Dargestellt ist der Lysinrest 132, der die Schiff'sche Base bildet. Phe178 und Ser226 befinden sich in der Nähe der Hydroxylgruppe am C4-Atom des D-Fructose-6-Phosphat-Moleküls. In grün dargestellt sind die Abstände zu dem Sauerstoffatom am C4 von D-Fructose-6-Phosphat. Dargestellt wurde die Abbildung mit PyMOL.

#### 4.2. Etablierung des Screening auf eine Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat

Die neuen Muteinen der Sättigungsmutagenesebanken sollten aus DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat D-Tagatose-6-Phosphat bilden. Sowohl mit TalB wie auch mit

TalBY konnte mit DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat über eine koppelnde Enzymreaktion keine D-Tagatose-6-Phosphat nachgewiesen werden (siehe II.7.8). Damit sollte nicht wie bisher, eine bereits bestehende Aktivität verbessert werden, sondern es sollte eine neue Aktivität gewonnen werden. Deswegen wurde davon ausgegangen, dass eine neue TalB-Variante eine sehr niedrige Aktivität für die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat besitzt.

Der Nachweis von D-Tagatose-6-Phosphat durch das koppelnde Enzym Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (GatD) [145] erfolgte über die Abnahme an NADH, das bei 340 nm verfolgt werden kann (siehe Abb. III.43. Zur Verfolgung der Abnahme an NADH standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder die direkte Bestimmung der Produktbildung, wie bei den vorherigen Screenings oder durch diskontinuierliche Messungen. Bei der diskontinuierlichen Messung werden die zellfreien Extrakte, die die TalB-Varianten enthalten mit den Substraten gemischt und inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten werden Proben entnommen und das gebildete Produkt wird dann über die Abnahme an NADH bestimmt. Bei dieser Variante ist von Vorteil, dass die Enzyme sehr lange mit den Substrate, je nach deren Stabilität, inkubiert werden können, so dass auch bei niedrigen Aktivitäten ein Produkt bestimmbar sein sollte. Nachteil der diskontinuierlichen Messung ist, dass sich bei der Inkubation ein Reaktionsgleichgewicht einstellt, bei dem das Produkt (D-Tagatose-6-Phosphat) nicht aus dem Gleichgewicht entzogen wird. Die direkte Verfolgung der Produktbildung kann nur dann photometrisch erfolgen, wenn unter den gegebenen Limitierungen (u. a. geringen Proteinausbeuten, Substratkonzentrationen) so viel Produkt gebildet wird, dass dies durch eine sichtbare Abnahme an NADH bei 340 nm zeitgleich beobachtet werden kann. Da bei den neuen TalB-Varianten von einer sehr niedrigen Aktivität ausgegangen werden musste, wurde die diskontinuierliche Variante gewählt.

### Kalibrierung von D-Tagatose-6-Phosphat unter den Screening-Bedingungen

Zunächst wurde eine D-Tagatose-6-Phosphat-Kalibrierung erstellt (siehe Abb. III.44). D-Tagatose-6-Phosphat (Reinheit  $\geq 95\%$  mit NMR von der AG Fessner, Universität Darmstadt, bestimmt) ist nicht käuflich zu erwerben und wurde von unserer Kooperationsgruppe (Prof. Fessner, Darmstadt) aus D-Tagatose durch die Fruktokinase von *Zymomonas mobilis* synthetisiert. Dafür wurden variierende Konzentration an D-Tagatose-6-Phosphat (0 - 60  $\mu\text{M}$ ) mit 150 mM Dihydroxyaceton, 1,4 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1,4 mM D-Fruktose-6-Phosphat und 100  $\mu\text{g/ml}$  zellfreien Extrakt gemischt, aufgeköcht und zentrifugiert. Die für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationen Dihydroxyaceton, D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, D-Fruktose-6-Phosphat und zellfreier Extrakt entsprechen den Bedingungen eines vollständigen Umsatzes an D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Da neben D-Tagatose-6-Phosphat mit Sicherheit auch D-Fruktose-6-Phosphat gebildet wird, wurde dieses ebenfalls

zugesetzt. Die Absorption der Ansätze wurde mit NADH (0,4 mM) in HEPES-Puffer bei 340 nm gemessen. Anschließend wurde das koppelnde Enzym Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (GatD) zugegeben (siehe Abb. III.43). D-Tagatose-6-Phosphat wurde durch GatD in Galactitol-1-Phosphat umgewandelt. Bei dieser Reaktion wird NADH zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, durch die Differenz an NADH bei 340 nm kann die Konzentration an D-Tagatose-6-Phosphat bestimmt werden. Unter den beschriebenen Bedingungen kann D-Tagatose-6-Phosphat von  $< 10 \mu\text{M}$  pro Well nicht mehr zuverlässig gemessen werden.

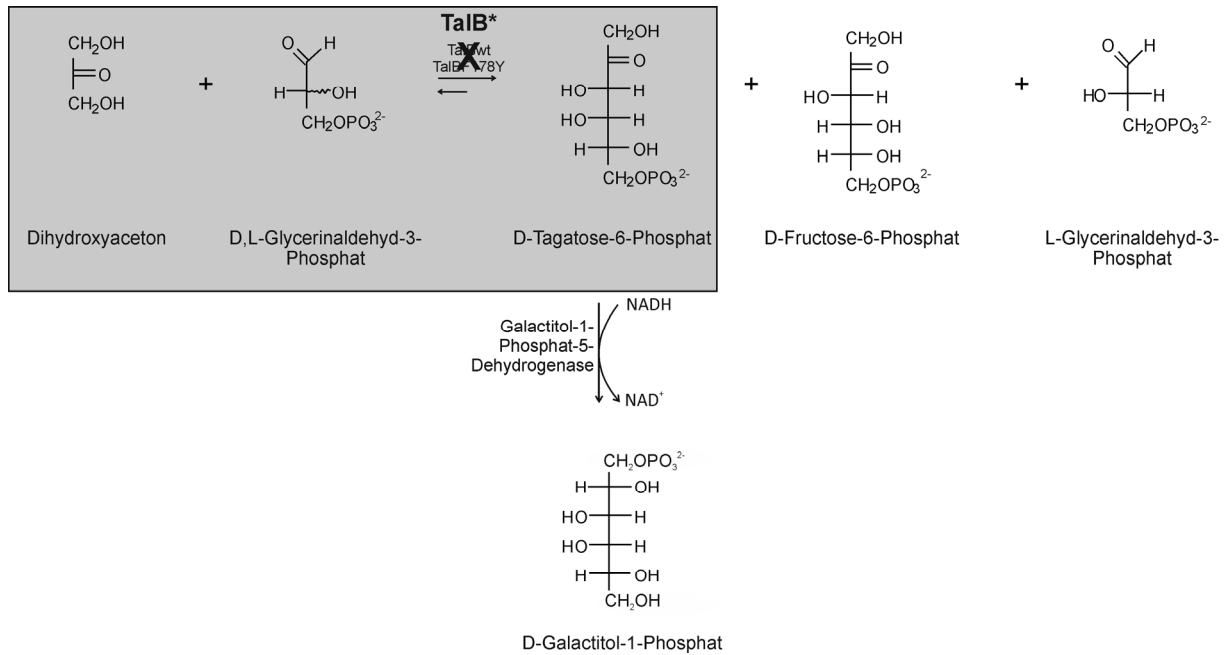


Abb. III.43: Nachweis von gebildetem D-Tagatose-6-Phosphat. Durch eine neu gewonnene Enzymaktivität soll aus Dihydroxyacetone und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, D-Tagatose-6-Phosphat gebildet werden. Die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat wird über die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  bei 340 nm durch Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase verfolgt.

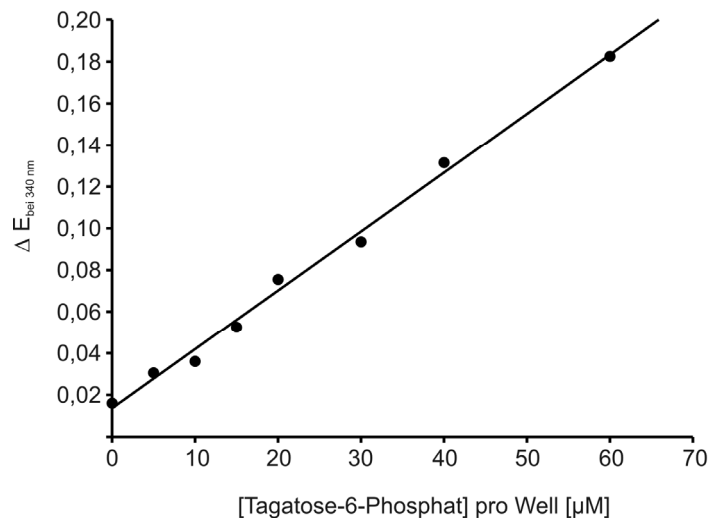


Abb. III.44: D-Tagatose-6-Phosphat Kalibrierung, die angegebenen D-Tagatose-6-Phosphat-Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentrationen pro Well (200  $\mu\text{l}$ ). Verschiedene D-Tagatose-6-Phosphat-Konzentrationen (0 - 60  $\mu\text{M}$ ) wurden mit einem Gemisch bestehend aus 150 mM Dihydroxyaceton, 1,4 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1,4 mM D-Fruktose-6-Phosphat und 100  $\mu\text{g/ml}$  zellfreiem Extrakt gemischt. Die Absorption von 40  $\mu\text{l}$  der Gemische mit 0,4 mM NADH wurden erst ohne GatD und nach Zugabe von 1,9 mU GatD pro Well bei 30  $^{\circ}\text{C}$  und 340 nm bestimmt.



#### 4.3. Screening der Sättigungsmutagenesebanken TalBF178X, TalBS226X und TalBF178YS226X

Die Plasmidpools der drei Sättigungsmutagenesebanken wurden in chemisch kompetente LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> Zellen transformiert. Von jeder der drei Banken wurden jeweils zwei Deepwellplatten mit je 84 (insgesamt 168) zufällig gepickten Klonen kultiviert. Nach erfolgter Expression der Proteine wurden die Zellen geerntet und anschließend mittels Lysozym aufgeschlossen. Die Produktentstehung wurde diskontinuierlich über die Abnahme an NADH in einem gekoppelten Enzymnachweis bestimmt (siehe Abb. III.43).

Die zellfreien Extrakte wurden bis zu 24 h mit den Substraten Dihydroxyaceton (150 mM) und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (2,8 mM) bei 30°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h und 24 h wurden Proben entnommen und für eine Bestimmung der D-Tagatose-6-Phosphat-Konzentration vorbereitet (siehe II.7.13.). Nach der Probenvorbereitung wurden die Extinktionen der abgekochten Umsätze in HEPES-Puffer mit NADH bei 340 nm gemessen. Anschließend wurde jedem Ansatz GatD zugegeben und erneut die Extinktion bestimmt. Aus der Differenz vor und nach der Zugabe von GatD wurde das verbrauchte NADH bestimmt. Als Kontrollen dienten je nach Bank entweder zellfreie Extrakte mit TalB (TalBF178X und TalBS226X) oder TalBF178Y (TalBF178YS226X). Da beide Enzyme kein D-Tagatose-6-Phosphat bilden, wurden den entnommenen Proben entweder Puffer (Negativkontrolle) oder D-Tagatose-6-Phosphat (80 µM D-Tagatose-6-Phosphat im Umsatz; Endkonzentration im Well: 20 µM D-Tagatose-6-Phosphat; Positivkontrolle) vor der Probenvorbereitung zugegeben. Diese Kontrollen dienten dazu die Messungen mit der D-Tagatose-6-Phosphat Kalibrierung (siehe Abb. III.43) vergleichen zu können. In Vorversuchen wurden 10 µM D-Tagatose-6-Phosphat (Endkonzentration; 50 µM D-Tagatose-6-Phosphat im Umsatz) als Detektionsgrenze eine NADH-Abnahme ermittelt. Die Differenz der Extinktion bei 340 nm vor der Zugabe von GatD und nach der Zugabe von GatD wurde bestimmt und durch die eingesetzte Proteinmenge dividiert. Zellfreie Extrakte von Klonen, die nach der Normalisierung scheinbar  $\geq 10$  µM D-Tagatose-6-Phosphat (Endkonzentration von scheinbar  $\geq 10$  µM) enthielten, wurden in 20 ml 2YT-Medium erneut kultiviert, die Proteine wurden exprimiert und geerntet (TalBF178X: 43 Klone; TalBS226X: 127 Klone; TalBF178YS226X: 49 Klone). Zur Überprüfung der Aktivität wurden die Zellen aufgeschlossen, der Proteingehalt bestimmt, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Aktivität erneut im Mikrotitermaßstab bestimmt. Zellfreie Extrakte, die erneut eine scheinbare D-Tagatose-6-Phosphat Bildung zeigten, wurden anschließend mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde isoliert und extern von der GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert (siehe Tab. III.14). Anschließend wurden die Plasmide erneut in chemisch kompetente LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup> Zellen transformiert (TalBF178X: 5 Klone; TalBS226X: 18 Klone; TalBF178YS226X: 3 Klone).

Diese Klone wurden wiederholt wie bereits beschrieben im 20 ml-Maßstab rekultiviert. Die exprimierten Proteine wurden aufgereinigt und erneut auf eine Aktivität für die Bildung von D-Tagatose-6-Phosphat im Mikrotitermaßstab überprüft. Dazu wurden die gereinigten Enzyme mit Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat in Tal-Puffer bei 30°C inkubiert. Nach 0, 2 und 4 h wurden Proben entnommen und die D-Tagatose-6-Phosphat-Konzentration wurde bestimmt. Keiner der Klone bildete bei einer erneuten Überprüfung aus Dihydroxyaceton und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat D-Tagatose-6-Phosphat.

Tab. III.14: Sequenzierungsergebnisse auffälliger Klone

Triplett	Aminosäure	Anzahl
A. TalBF178X		
ATG	Met	2
TTT	Phe	1
TAG	STOPP-Codon	1
Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes		1
B. TalBS226X		
AGG	Arg	4
TGC	Cys	1
GAG	Glu	1
GGC	Gly	1
CAC	His	1
AAG	Lys	2
TTC	Phe	1
ACC	Thr	2
TAC	Tyr	1
TCG	Ser	1
TAG	STOPP-Codon	2
C. TalBF178YS226X		
Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes		2
Deletion einer Base (Rasterschub)		1

Aufgrund von relativ vielen falsch-positiven Klonen, wäre es besser gewesen einzelne Aminosäurereste in TalB auszuwählen und diese gerichtet gegen andere Aminosäuren auszutauschen. Die Charakterisierung einzelner TalB-Varianten auf neue Stereospezifitäten wäre von ähnlichem Aufwand gewesen, wie die Durchmusterung der drei Mutagenesebanken mit jeweils 168 Klonen. Von Nachteil wäre aber wiederum gewesen, dass man vermutlich nicht konsequent alle 19 Austausche pro Position gemacht hätte. Dadurch hätte die Möglichkeit bestanden, dass ein vorteilhafter Aminosäureaustausch nicht durchgeführt worden wäre.

## 5. Zufallsmutagenese des *talB*- und *talBF178Y*-Gens

Für die Erzeugung einer ungerichteten Mutagenesebibliothek wurde ein Gemisch aus fehlerbehafteten Polymerasen in einer Polymerkettenreaktion des *talB*- und *talBF178Y*-Gens eingesetzt (siehe II.1.). Mit diesem Kit werden bei der Amplifikation der Gene durch zwei als Gemisch vorliegende Polymerasen, fehlerhaft Nukleotide zufällig in das Gen eingebaut. Durch Variation der Konzentration an Ausgangs-DNA wird die Mutageneserate eingestellt. Zur Generierung einer Bibliothek mit einer niedrigen Mutageneserate von 0 – 4,5 Mutationen pro Kilobase werden größere Mengen Ausgangs-DNA eingesetzt, als für Banken mit einer hohen Mutageneserate (> 4,5 Mutationen pro kb) [146-148]. Diese Banken sollen für neue Selektions- und Screeningsysteme zur Verfügung stehen.

Zur Erzeugung der ungerichteten Mutagenesebanken epTalB und epTalBF178Y wurde eine niedrige Mutageneserate gewählt und damit eine höhere Zielgen-DNA Menge (0,5 – 1 µg) eingesetzt. Im Folgenden muss zwischen den Begriffen Zielgen-DNA und Ausgangs-DNA unterschieden werden. Ausgangs-DNA bezieht sich auf das gesamte Plasmid (pJF119*talB*, pJF119*talBF178Y*). Mit Zielgen-DNA ist nur das im Vektor befindliche Gen *talB* oder *talBF178Y* gemeint. Wie vom Hersteller angegeben, wurde zunächst eine Zielgen-DNA (*talB*) Menge von 500 ng (Ausgangs-DNA: 3,5 µg) pro Reaktionsansatz (50 µl) eingesetzt. Anschließend wurde sukzessiv die Ausgangs-DNA Menge reduziert. Erst bei einer Zielgen-DNA-Menge von 25 ng konnte eine gewünschte Mutageneserate von 2,4 Mutationen pro kb erzielt werden (siehe Tab. III.15). Die Mutationsfrequenz bezogen auf die Primärstruktur beträgt 1,7 Aminosäuren pro Protein. Von dieser Bank wurden 242 Klone gepickt und auf LB-Amp und LB-Kan-Platten ausgestrichen. Wachsen die Klone auf beiden Platten, beinhaltet dessen Plasmid noch die *Kan<sup>R</sup>*-Kassette. Keiner der Klone wuchs auf den LB-Kan-Agarplatten, deswegen enthielt keines der Plasmide die *Kan<sup>R</sup>*-Kassette. Mittels Kolonie-PCR mit Primern, die vor und hinter dem Gen binden, wurden die Insertgrößen von 30 zufällig gepickten Klonen überprüft. Von den 30 überprüften Klonen wurde nur bei 3 Klonen kein PCR-Produkt mit der gewünschte Größe nachgewiesen. Zur Bestimmung der Mutationsfrequenz der Banken wurde von jeweils 10 (Zielgen-DNA: 500 ng, 286 ng, 143 ng, 50 ng) bzw. von 30 (Zielgen-DNA: 25 ng) zufällig gepickten Klonen die Plasmid-DNA isoliert und extern von GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert. Außer dem Ansatz mit 25 ng Zielgen-DNA besaßen alle anderen PCR-Ansätze eine als zu niedrig erachtete Mutationsfrequenz, zwischen 0,68 bis 1,28 Nukleotidaustausche pro kb bzw. zwischen 0,4 bis 0,8 Aminosäureaustauschen pro Protein. Anhand dieser Daten wurde die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion mit 25 ng *talBF178Y* durchgeführt (siehe Tab. III.16). Die neue *talBF178Y*-Bank besitzt eine ähnliche Mutationsfrequenz wie die *talB*-Bank. Unterschiedlich ist jedoch die Anzahl an Klonen, die die *Kan<sup>R</sup>*-Kassette enthalten. Bei der TalBF178Y-Bank

## Ergebnisse

enthält von 265 Klonen 24 die Kan<sup>R</sup>-Kassette, wohingegen kein Plasmid der getesteten Klone der TalB-Bank, die Kan<sup>R</sup>-Kassette enthielt.

Tab. III.15: Insgesamt wurden 5 verschiedene Zielgen-DNA (*talB*) Mengen ausgetestet, um die gewünschte niedrige Mutageneserate zu erhalten. Von den PCR-Ansätzen mit 500 ng, 286 ng, 143 ng und 50 ng Zielgen-DNA wurden zur Bestimmung der Mutationsfrequenz insgesamt von 10 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Von den Banken mit 25 ng Zielgen-DNA wurden von insgesamt 30 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und extern sequenziert.

\* Ein Ausstreichen der Klone erfolgte auf LB-Amp-Platten.

Asugangs-DNA [µg] / PCR-Ansatz (50 µl)	Zielgen [ng] / PCR-Ansatz (50 µl)	Anzahl an ausgestrichenen Klonen*	gewachsene Klone auf		Klone mit Kan <sup>R</sup> -Kassette [%]	Anzahl an Klone, die durch Kolonie-PCR überprüft wurden	Klone mit <i>talB</i> -Gen [%]	Mutationsfrequenz	
			LB-Amp-Platten	LB-Kan-Platten				Nukleotid-austausche / kb	Aminosäure-austausche / Protein
3,5	500	497	497	11	2	40	93	0,68	0,4
2,0	286	100	100	19	19	20	100	0,52	0,3
1,0	143	100	100	7	7	20	90	0,83	0,6
0,35	50	100	100	3	3	20	100	1,28	0,8
0,175	25	242	242	0	0	30	90	2,38	1,7

Tab.. III.16: Auswertung der beiden ungerichteten Mutagenesebanken *talB* und *talBF178Y*.

\* Ein Ausstreichen der Klone erfolgte auf LB-Amp-Platten.

Ausgangs-DNA	Ausgangs-DNA [µg] / PCR-Ansatz (50 µl)	Zielgen [ng] / PCR-Ansatz (50 µl)	Anzahl an ausgestrichenen Klonen*	gewachsene Klone auf		Klone mit Kan <sup>R</sup> -Kassette [%]	Anzahl an Klone, die durch Kolonie-PCR überprüft wurden	Klone mit <i>talB</i> -Gen [%]	Mutationsfrequenz	
				LB-Amp-Platten	LB-Kan-Platten				Nukleotid-austausch / kb	Aminosäure-austausch / Protein
pJF119 <i>talB</i>	0,175	25	242	242	0	0	30	90	2,38	1,7
pJF119 <i>talB</i> <i>F178Y</i>	0,175	25	265	265	24	10	30	87	2,33	1,8

Von insgesamt jeweils 30 sequenzierten Klonen besitzen nur 3 (epTalB-Bank) bzw. 4 Klone (epTalBF178Y-Bank) keinen Nukleotidaustausch. 8 Klone haben 2 (epTalB-/epTalBF178Y-Bank) bzw. 3 (epTalB-Bank) Nukleotidaustausche pro kb (siehe Abb. III.45 A.). In jeder der beiden Banken kommt jeweils ein Klon mit 7 Nukleotidaustauschen pro kb vor. In beiden Banken besitzen die meisten Proteine zwei Aminosäureaustausche (siehe Abb. III.45 B.; 11 Klone: epTalB-Bank; 8 Klone: epTalBF178Y-Bank). Von 7 bzw. 8 Klonen von insgesamt 30 sind die Proteine wildtypisch.

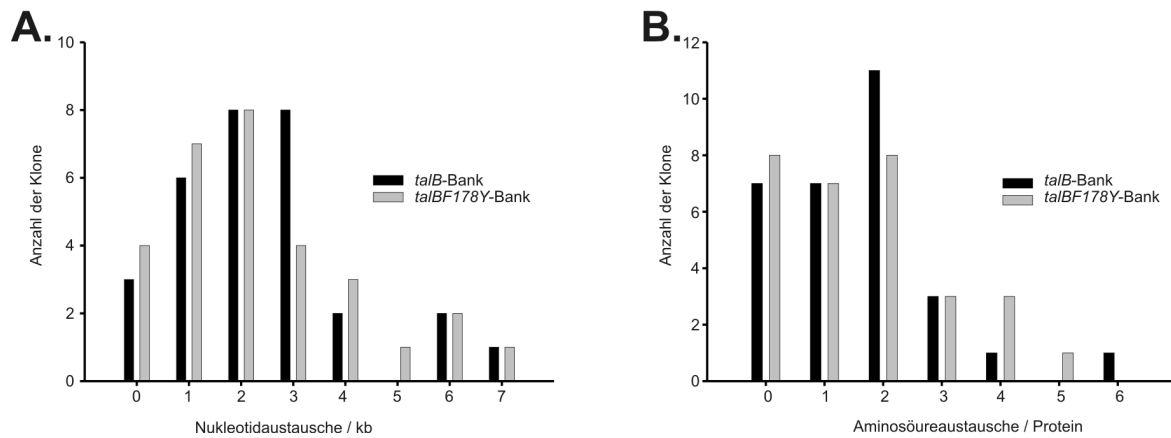


Abb. III.45: A. Anzahl der Nukleotidaustausche pro Kilobase der fehlerhaften Polymerasebanken epTalB und epTalBF178Y. B. Anzahl der Aminosäureaustausche pro Protein der fehlerhaften Polymerasebanken *talB* und *talBF178Y*. Von den jeweiligen Banken wurde jeweils von 30 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und kommerziell sequenziert.

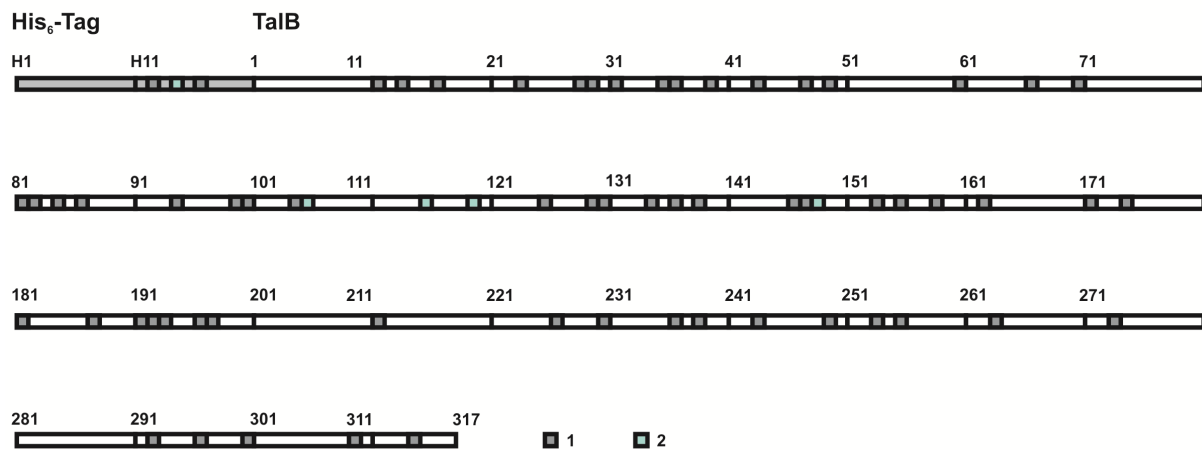
Tab. III.17: Verteilung der Transitionen und Transversionen der Banken epTalB und epTalBF178Y.

	epTalB-Bank		epTalBF178Y-Bank		Mutazyme® II DNA Polymerase [146]
	Anzahl der Nukleotid- austausche	Nukleotid- austausche [%]	Anzahl der Nukleotid- austausche	Nukleotid- austausche [%]	Nukleotid- austausche [%]
Transition					
A → G; T → C	18	25	17	24	17,5
G → A; C → T	22	30	27	38	25,5
Transversion					
A → T; T → A	19	26	12	17	28,5
A → C; T → G	2	3	3	4	4,7
G → C; C → G	0	0	3	4	4,1
G → T; C → A	12	16	9	13	14,1
Deletion	0	0	0	0	0,7
Insertion	0	0	0	0	4,8

Die Verteilung der Nukleotidaustausche sind relativ gleichmäßig über das gesamte Gen und damit auch über das gesamte Protein verteilt (siehe Abb. III.46).

Damit stehen zwei ungerichtete Mutagenesebanken für neue bereits getestete Screening- und Selektionssysteme zur Verfügung. Die beiden fehlerhaften Polymerasebanken wurden für ein Screening auf die Synthese von Tagatose-6-Phosphat angelegt. Das Screening einer ungerichteten Mutagenesebank würde die Durchmusterung von sehr viel mehr Klonen bedeuten als die Durchmusterung der Sättigungsmutagenesebanken. Dies ist mit dem etablierten Screening auf Tagatose-6-Phosphat nicht sinnvoll, da hier eine zu große Anzahl an falsch-positiven Klonen gefunden wurde.

**A.**



**B.**

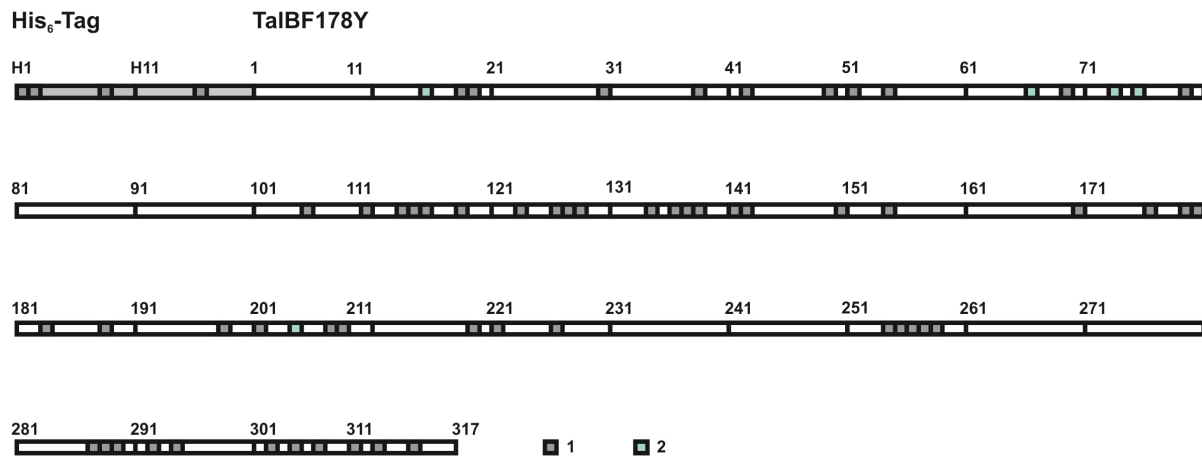


Abb. III.46: Schematische Darstellung der Primärstruktur von TalB (A.) und TalBF178Y (B.) jeweils mit His<sub>6</sub>-Tag (hellgrau unterlegt).

Dargestellt sind Aminosäuren, deren Triplets durch die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion verändert wurden (dunkelgrau: Aminosäuren, die bei einem Klon betroffen war; hellblau: Aminosäuren, die bei zwei Klonen betroffen waren).



## IV. Diskussion

### 1. Auswahl des Enzyms

Zwei C-C-Bindungen-knüpfernde Enzyme von *E. coli*, die entweder mit DHA als Donor reagieren oder eine Dihydroxyacetoneinheit übertragen, sind die Fructose-6-Phosphat Aldolase und die Transaldolase B. FSA verwendet DHA als Donor, gehört zu der Enzymklasse der Lyasen (EC 4.1.2.X) und besitzt ein für Aldolasen untypisches breites Donorspektrum [51, 66, 69-71, 75]. Die Transaldolase B gehört zu den Transferasen (EC 2.2.1.2) und knüpft neue C-C-Bindungen mit einer 3S, 4R-Konfiguration durch die Übertragung einer Dihydroxyacetoneinheit [5, 15-18]. Eines der beiden Enzyme sollte ausgewählt werden, um dessen Substratspektrum und dessen Stereospezifität bei der Knüpfung neuer C-C-Bindungen durch Mutagenesen zu ändern.

Ein Enzym, das durch Mutagenese seines Gens verändert und dessen Varianten auf neue Aktivitäten durchmustert werden sollen, muss bestimmten Anforderungen entsprechen. Das Gen, das für das Enzym codiert sollte überexprimierbar sein. Zur Charakterisierung der Muteine sollten sowohl der Wildtyp, wie auch die Muteine relativ schnell und einfach aufzureinigen sein. Unter diesen Aspekten wurden die gut charakterisierten Enzyme FSA und TalB betrachtet. Durch die Arbeit von T. Inoue ist bekannt, dass die Expressionshöhe der FSA mit einem C- oder N-terminalem His-Tag zu Enzymen mit reduzierter Aktivität führt [73]. Zusätzlich konnte von T. Inoue gezeigt werden, dass zur Anreicherung von FSA eine Hitzefällung möglich ist. Bei den FSA-Varianten, FSA Q59E, FSA Y131A und FSA Y131E, führt die Hitzefällung zu einer Denaturierung der Enzyme und damit zu einer Inaktivierung der Enzyme. Auf der anderen Seite konnte von M. Schürmann [72] gezeigt werden, dass die FSA-Varianten FSA L107N und FSA A129S ohne Hitzefällung als aktive Enzyme gereinigt werden können. Ein Nachteil bei der Reinigung dieser Muteine war, dass mehrere aufwendige Reinigungsschritte über zwei Anionenaustauschsäulen notwendig waren.

TalB des *E. coli* Stammes K-12 wurde bisher durch Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose FF und Fractogel<sup>®</sup> EMD-DEAE-650 Tentakel) gereinigt [15-16]. Wildtypisches TalB liegt als Dimer vor, die Muteine TalBR300A und TalBR300E können je nach pH Wert als Monomer oder Dimer vorliegen [19]. Beide Muteine zeigen als Monomere eine ähnliche maximale Umsatzgeschwindigkeit wie der dimere Wildtyp. Dadurch konnte gezeigt werden, dass bei einer Mutagenese, die zu einem Monomer führen könnte, die Änderung der Aktivität nicht unbedingt mit einer veränderten Quartärstruktur zusammenhängen muss.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die Transaldolase B mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag aktiv exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Dazu wurde die Transaldolase B des *E. coli* K-12 Stammes W3110 mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereichert.



TalB konnte mit einer Reinheit von mindestens 97 % angereichert werden. Es ist anzumerken, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Transaldolase B des *E. coli* K-12 Stammes W3110 an der Aminosäureposition 247 ein Tyrosin, anstatt eines Alanins besitzt, wie die von Sprenger et al. 1997 [15] beschriebene TalB. Die Aminosäureposition 247 ist eine in der Unterfamilie 1 nicht konservierte Region [5]. Die kinetischen Konstanten von His<sub>6</sub>-TalB und TalB wurden unter den gleichen Bedingungen bestimmt [15-16]. Der V<sub>max</sub>-Wert für D-Fructose-6-Phosphat der His<sub>6</sub>-TalB beträgt 85 ± 9 U/mg und ist damit höher als der von TalB (60 U/mg) [15]. Daraus folgt, dass weder der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag, noch der Aminosäureaustausch von Ala247 nach Tyr eine negative Auswirkung auf die Aktivität der TalB haben.

Somit besitzt TalB gegenüber FSA für eine Mutagenese folgende Vorteile:

1. Ein N-terminaler His-Tag führt bei TalB zu keiner Verminderung der Aktivität und eine Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie ist möglich. Ein N- und C-terminaler His-Tag führt zu einer verminderten Aktivität der FSA.
2. Eine schnelle Anreicherung von FSA ist über Hitzefällung möglich, kann aber bei Muteinen zu einer Denaturierung und einer Inaktivierung der Muteine führen und ist daher nicht vorteilhaft.
3. Beide Gene können überexprimiert werden und zeigen eine ähnliche Expression, der jeweiligen Proteine (pJF119*talB* und pJF119*fsa*). Die Expressionshöhe von FSA ist vom Wirts-Stamm abhängig ist [73]. Das *talB*-Gen kann in mehreren *E. coli* Stämmen (XL1Blue, LJ110 (DE3) *talA*<sup>-</sup>, *talB*<sup>-</sup>) überexprimiert werden.

Aus diesen aufgeführten Gründen wurde für Mutagenesen die zu einer höheren Substratspezifität führen, TalB und nicht FSA ausgewählt. Zunächst sollte das *his<sub>6</sub>-talB*-Gen durch Mutagenese so verändert werden, dass Enzymvarianten entstehen, die DHA als Donor und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Akzeptor zu D-Fructose-6-Phosphat mit einer hohen spezifischen Aktivität umsetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Mutagenesen entweder das *his<sub>6</sub>-talB*-Gen (*talB*) oder *his<sub>6</sub>-talBY*-Gen (*talBF178Y*) verwendet.

## 2. Mutagenese des *talB*-Gens zur Generierung von D-Fructose-6-Phosphat

Zunächst sollte das *talB*-Gen durch Mutagenese so verändert werden, dass das gebildete Mutein DHA als Donorsubstrat verwendet. Dazu wurde TalB in einem strukturbasierten Sequenzvergleich mit FSA verglichen und elf Aminosäuren wurden in TalB ausgewählt, die in beiden Enzymen unterschiedlich sind und die in den aktiven Zentren lokalisiert sind [68]. Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuren könnten die Austausch der ausgewählten Aminosäuren zu einer gewünschten höheren spezifischen Aktivität mit DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat führen. Von einem gezielten Aminosäureaustausch der Reste in TalB, gegen die von FSA wurde abgesehen, da dadurch andere Austausch, die zu der gewünschten verbesserten Aktivität führen könnten nicht in Betracht gezogen würden. Für FSA konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Aminosäureaustausche in die von TalB an den Positionen Gln59 (TalB: Glu96), Leu107 (Asn154), Ala129 (Ser176) und auch der Doppelaustausch Leu107/Ala129 (Asn154/Ser176) nicht zu einer Transaldolase-Aktivität führen [72-73].

### 2.1. Sättigungsmutagenese des *talB*-Gens

Die Mutagenese des *talB*-Gens wurde durch Sättigungsmutagenese mit dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) an elf verschiedenen Aminosäurepositionen durchgeführt [103, 149-152]. Die Qualität der Banken wurde durch Sequenzierung von 30 isolierten Plasmiden zufällig gepickter Klone der Sättigungsmutagenesebank TalBF178X bestimmt. Keines der 30 Plasmide enthielt das wildtypische Triplet TTT. Insgesamt kamen 17 verschiedene Triplets vor. Vier (~ 13%) der 30 Plasmide enthielten eine Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes. Diese Insertionen entstanden vermutlich während der Polymerasekettenreaktion. Die Elongation wird durch die Denaturierung der Doppelstränge unterbrochen. Die Elongationszeit sollte so gewählt sein, dass das Plasmid neu synthetisiert wird. An der Stelle an der das neue Plasmid endet und der Primer beginnt bleibt das Plasmid offen und kann erst durch den *E. coli* Stamm XL1Blue geschlossen werden. Ist die Elongationszeit zu lang, findet die Verlängerung der neu gebildeten DNA über den Synthesestart statt, bis die Denaturierung einsetzt. Dadurch entsteht eine verlängerte Form des Plasmids, die je nach Elongationszeit Wiederholungen der Primer und Plasmidbereiche enthalten können. Bei zwei der Plasmide kamen im *talB*-Gen jeweils zwei zusätzliche Mutationen vor. Bei beiden Mutationen handelt es sich um eine Transition von G nach A, an verschiedenen Stellen des Gens. Einer der Austausch führte zu einer stillen Mutation. Bei der anderen Mutation erfolgte ein Austausch von Ala274 zu Thr. Mit dem Primermotiv NNS sollte bei 30 sequenzierten Plasmiden und einer gleichmäßigen Verteilung der Triplets jedes Triplet mit einer Wahrscheinlichkeit von ~ 3% auftreten. Das Triplet TAC ist mit ~ 13%

überrepräsentiert, ebenso wie die Triplets AAC und AGC, die mit jeweils ~ 9% vorkommen. Warum diese Klone überrepräsentiert sind, ist unklar, da die Klone zufällig gepickt wurden, unabhängig von deren Aktivität. Eventuell könnte diese ungleichmäßige Verteilung mit der Basenpaarung zusammenhängen. Manche Primer haben je nach NNS-Motiv eine höheren Hybridisierungseffizienz und lagern sich besser an die Matrizen-DNA als andere [84]. Bei 72 überprüften Klonen und dem Primermotiv NNS sind nach Georgescu et al. [85] alle möglichen Triplets zu 90% abgedeckt. Bei 95 überprüften Klonen und dem Primermotiv NNS sind alle möglichen Triplets zu 95% abgedeckt. Von jeder der elf Sättigungsmutagenesebanken wurden zunächst jeweils 84 Klone auf eine Aktivität mit DHA überprüft, damit müssten die mit dem Primermotiv NNS möglichen Triplets bis zu ~ 92% abgedeckt sein. Von der Sättigungsmutagenesebank TalBF178X wurden insgesamt 336 Klone überprüft, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen alle möglichen Aminosäureaustausche durchmustert zu haben.

## 2.2. Etablierung eines Screenings zum Nachweis von D-Fructose-6-Phosphat

Zum Nachweis der Synthese von D-Fructose-6-Phosphat, aus DHA und D,L-Glyceraldehyd-3-Phosphat, durch zellfreie Extrakte mit neuen TalB-Varianten wurde zunächst ein Farbnachweis im Mikrotitermaßstab entwickelt. Bei diesem Nachweis wird durch die gekoppelten Enzyme Phosphoglucoseisomerase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, D-Fructose-6-Phosphat zu D-Glucose-6-Phosphat isomerisiert und zu Gluconolacton-6-Phosphat oxidiert. Bei dem letzten Schritt wird pro gebildetem Molekül D-Fructose-6-Phosphat ein Molekül  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert. Über die Bildung von NADPH war es möglich die Reaktion an einen Farbnachweis zu koppeln. Durch die Zugabe von Diaphorase wird NADPH oxidiert und der gelbe Farbstoff Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) kann zu lilafarbenem Formazan reduziert werden [153-155]. Bei diesem Screening im Mikrotitermaßstab handelt es sich um einen herunterskalierten FSA-Aktivitätstest mit gekoppeltem Farbnachweis, der gemeinsam mit Dr. A. K. Samland entwickelt wurde.

Die Verfolgung der Farbreaktion besitzt gegenüber der Verfolgung der Zunahme von NADPH Vorteile. Die Entstehung des Farbstoffs ist irreversibel und Hintergrundreaktionen durch eingesetzte Zellysate können umgangen werden [121]. Über den gebildeten Farbstoff, der im sichtbaren Bereich absorbiert lässt sich die Reaktion visuell verfolgen. Bei der Etablierung des Nachweissystems stellte sich das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) im Puffer der zellfreien Extrakte, als problematisch dar. Das DTT im verwendeten Tal-Puffer reagierte auch in Abwesenheit von Enzymen mit dem NBT zu Formazan. Aus diesem Grund wurde auf DTT im Puffer verzichtet. Als Negativkontrolle wurden zellfreie Extrakte von rekombinanten *E. coli* XL1Blue-Zellen mit His<sub>6</sub>-TalBwt und als Positivkontrolle zellfreie

Extrakte von rekombinanten *E. coli* XL1Blue-Zellen mit FSA verwendet. Eine Normalisierung der Zunahme des lilafarbenen Formazans erfolgte über die im Mikrotitermaßstab bestimmten Proteinkonzentrationen der zellfreien Extrakte. Die Normalisierung über die Proteinkonzentration hat gegenüber der Normalisierung über die Zelldichte der Kulturen [88] den Vorteil, dass bei ungleichmäßigem Zellaufschluss, die Zelldichte nicht mit der tatsächlichen Proteinkonzentration korreliert.

### 2.3. Überprüfung der elf Sättigungsmutagenesebanken auf Synthese von D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat

Jeweils 84 Klone der elf Sättigungsmutagenesebanken wurden mit einem Farbnachweis auf die Synthese von D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat überprüft. Positive Klone wurden nur in einer Bank, der TalBF178X-Bank, gefunden. Aus diesem Grund und um möglichst alle 19 Aminosäureaustausche an dieser Position abzudecken, wurden von dieser Bank weitere 252 zufällig gepickte Klone überprüft. Insgesamt 19 Klone wurden mit einer höheren Aktivität als die Negativkontrolle (zellfreie Extrakte des rekombinanten *E. coli* Stammes XL1Blue mit TalB) gefunden. Alle zeigten den gleichen Aminosäureaustausch an der Position 178 von Phe zu Tyr.

Von den anderen zehn Aminosäureresten ist von TalB bereits bekannt, dass z. B. Glu96 am Protonentransfer von einem Wassermolekül auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys132 beteiligt ist [18]. Bei einem Austausch der Aminosäure Glu96 in Ala oder Gln hatten die Muteine eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität von 2% bzw. 3% der wildtypischen Aktivität (60 U/mg) gezeigt [21]. In FSA befindet sich an dieser Position ein Glutaminrest (Gln59) der wahrscheinlich die gleiche Funktion erfüllt wie der Glutamatrest in TalB [68]. Ein Austausch von Gln59 in Glu führte in den zellfreien Extrakten mit FSA E59N, zu keinem deutlichen Aktivitätsverlust [73]. Asn154 bildet vermutlich eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe am C1-Atom von gebundenem DHA [18], dies ist bei FSA nicht möglich, da sich an der Position 107 ein apolarer Leucinrest befindet. Bei einem Austausch dieser Aminosäure (Leu107) in ein Asn blieb die Aktivität der FSA erhalten und keine neue Transaldolase Aktivität konnte gewonnen werden [16]. Der Aminosäurerest Ser176 von TalB bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe am C1-Atom. Bei einem Aminosäureaustausch in TalB von Ser176 nach Ala führt der Austausch zu einer deutlich Verminderung des  $V_{\max}$ -Werts und einer Erniedrigung des  $K_m$ -Werts, was eine Erhöhung der Affinität des Muteins zu D-Fructose-6-Phosphat bedeutet [21]. Bei der Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase entspricht dieser Aminosäurerest Ser300. Ser300 erleichtert den nukleophilen Angriff der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Schiff'sche Base Intermediat bildenden Lysinrests [156]. In der Röntgenstruktur von TalB liegt Ser176 mehr als 5 Å von der  $\epsilon$ -

Aminogruppe des Lysinrests entfernt [21]. Dies macht einen nukleophilen Angriff von Ser176 auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins unwahrscheinlich. Bei FSA befindet sich an der Stelle ein Ala129. In FSA führt der Austausch von Ala129 (TalB: Ser176) in Serin zum Erhalt der bestehenden FSA-Aktivität, mit einer deutlich höheren Affinität für DHA und D-Fructose-6-Phosphat [72]. Der Austausch von Ala129 in Ser führt jedoch zu einer 230%igen Steigerung der D-Fructose-6-Phosphat Syntheseleistung bei FSA [72]. Der Austausch führt aber nicht zu einer neu gewonnenen Transaldolase Aktivität. Der Aminosäurerest Arg228 von TalB ist vermutlich an der Bindung der Phosphatgruppe der Substrate beteiligt [18]. An der Position in FSA befindet sich ein Lysinrest (Lys168), der vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Phosphatbindung spielen könnte. Die anderen sechs Aminosäurereste nehmen nicht direkt am postulierten Reaktionsmechanismus teil, befinden sich aber in der Nähe von Resten die an der Katalyse beteiligt sind.

#### 2.4. Charakterisierung von TalBY

Durch nur einen Aminosäureaustausch konnte die spezifische Aktivität von TalB in der Kondensationsreaktion von DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat, um das 70fache von 0,1 U/mg auf einen  $V_{\max}$ -Wert von 7 U/mg für DHA (bei nicht sättigender Konzentration an D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat) erhöht werden [128]. Gleichzeitig besitzt TalBY einen  $K_m$ -Wert für DHA von 30 mM, der von FSA ist mit 62 mM doppelt so hoch wie der von TalBY. Die  $K_m$ -Werte für DHA der FSA-Varianten FSA L107N und FSA D129S sind niedriger als der vom Wildtyp und vermutlich auch niedriger als der von TalBY [72]. Außerdem besitzt TalBY eine ähnliche katalytische Effizienz wie FSA von  $\sim 130 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Die  $K_m$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat von FSA und TalBY sind mit 1,9 mM und 2,4 mM sehr ähnlich. Damit liegt die im FSA-Nachweis und bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten für DHA eingesetzte Konzentration von 2,8 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat für beide Enzyme unterhalb einer Sättigung. Bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde DHA so eingesetzt, dass es für beide Enzyme sättigend vorliegt (FSA: 300 mM; TalBY: 150 mM). Aus diesem Grund sind die  $V_{\max}$ -Werte beider Enzyme für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat höher (FSA: 31 U/mg, TalBY: 20 U/mg) als bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten für DHA. Ab einer Konzentration von  $> 4 \text{ mM}$  D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat ist bei FSA eine Substratinhibition zu beobachten. Die Ähnlichkeit der katalytischen Effizienz von FSA und TalBY konnte erneut bestätigt werden.

Zusätzlich zeigt TalBY im Gegensatz zu TalBwt eine Aktivität für die Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat, die aber niedriger ist als die Aktivität der Kondensationsreaktion von DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Dies könnte damit zusammenhängen, dass in

wässrigen Lösungen nur ein kleiner Anteil an D-Fructose-6-Phosphat offenkettig vorliegt. Der größere Anteil bildet Pyranose- oder Furanoseringe. Aufgrund des Aufbaus des aktiven Zentrums von TalB und der Röntgenstruktur eines Muteins der Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase die zwar Fructose-1,6-Bisphosphat binden aber nicht spalten kann [157] wird angenommen, dass von TalB und TalBY nur die offenkettige Form als Substrat verwendet werden. Der  $K_m$ -Wert für D-Fructose-6-Phosphat ist von der Reaktion abhängig. In der Spaltungsrichtung (1,5 mM) ist der  $K_m$ -Wert für D-Fructose-6-Phosphat von TalBY um ein 15faches niedriger als in der Transferreaktion (22 mM). Bei der Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat werden zwei Produkte gebildet, DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Nach der Einstellung des Gleichgewichts der Reaktion liegt D-Fructose-6-Phosphat, DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat in einem bestimmten Verhältnis zu einander vor. Bei der Transferreaktion werden die Substrate D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat zu D-Sedoheptulose-7-Phosphat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgesetzt. Es besteht nun auch die Möglichkeit, dass die gebildeten Produkte und die eingesetzten Substrate von TalBY gleichermaßen als Edukte verwendet werden. Der  $K_m$ -Wert für D-Sedoheptulose-7-Phosphat als Donor von TalB ist sehr viel niedriger als der  $K_m$ -Wert für D-Fructose-6-Phosphat von TalB [16]. Damit besteht die Möglichkeit, dass auch der  $K_m$ -Wert von TalBY für D-Sedoheptulose-7-Phosphat deutlich niedriger ist als der für D-Fructose-6-Phosphat. Dadurch könnte D-Sedoheptulose-7-Phosphat mit D-Fructose-6-Phosphat kompetitiv um die Bindung im aktiven Zentrum von TalBY konkurrieren und dadurch die Affinität für D-Fructose-6-Phosphat vermindern.

Eine Erklärung der verschiedenen  $K_m$ -Werte soll im Folgenden gegeben werden. Die Michaelis-Konstante,  $K_m$ , ist die Substratkonzentration, bei der die Halbsättigung einer Reaktion und damit die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit erreicht ist. Bei dem Michaelis-Menten-Modell und einer Ein-Substrat-Reaktion (Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat) wird davon ausgegangen, dass  $k_2$  kleiner als  $k_{-1}$  ist und daher zu vernachlässigen ist (siehe Abb. IV.1). Der  $K_m$ -Wert berechnet sich aus dem Quotienten von  $k_1$  und  $k_{-1}$ . Bei der Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat spielt  $k_2$  wahrscheinlich eine Rolle. Je nachdem wie schnell die Freisetzung der Produkte D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und DHA erfolgt, kann DHA mit einem Akzeptor reagieren. In dem Modell von Briggs und Haldane [158] wird beschrieben, dass der  $K_m$ -Wert aus allen Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion, also auch aus  $k_2$ , bestehen. Anhand des Modells von Briggs und Haldane wird die von TalBY beschriebene Reaktion genauer beschrieben als nach dem Michaelis-Menten-Modell.

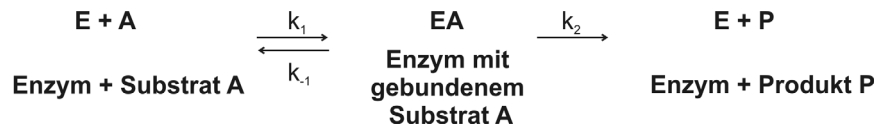


Abb. IV.1: Enzymreaktion einer Ein-Substrat-Reaktion (E = Enzym; A = Substrat A; EA = Übergangszustand des Enzyms mit gebundenem A; P = Produkt; k = Geschwindigkeitskonstante der Teilreaktionen; verändert nach [144]).

Desweiteren ist der  $K_m$ -Wert davon abhängig, ob es sich um eine Zwei-Substratreaktion (D-F6P mit D-E4P) oder Ein-Substratreaktion (D-F6P) handelt. Für die Transaldolase B von *E. coli* wurde für die Transferreaktion ein Ping-Pong Mechanismus vorgeschlagen [16]. Es stellt sich die Frage, ob durch den Aminosäureaustausch der TalB die Art des Mechanismus geändert wurde. Bei einem Ping-Pong Mechanismus bindet ein Substrat AX an das Enzym und bildet einen binären Komplex (siehe Abb. IV.2 A.). Die AX-Bindung wird gespalten, A wird frei und X verbleibt am Enzym. Durch das Ablösen von A kann nun ein zweites Substrat B binden. Die Bindung BX wird gebildet und die Bindung EX wird gelöst, so dass BX frei wird [144]. Bei einem ternären Komplex, wie bei FSA, binden beide Substrate nacheinander an das Enzym bevor ein Produkt frei wird [144, 159] (siehe Abb. IV.2 B.). TalBY katalysiert auf der einen Seite die Transferreaktion, auf der anderen Seite die Kondensationsreaktion von DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat, es ist denkbar, dass das neue Enzym nun beide Mechanismen vereint oder einen Übergangszustand darstellt.

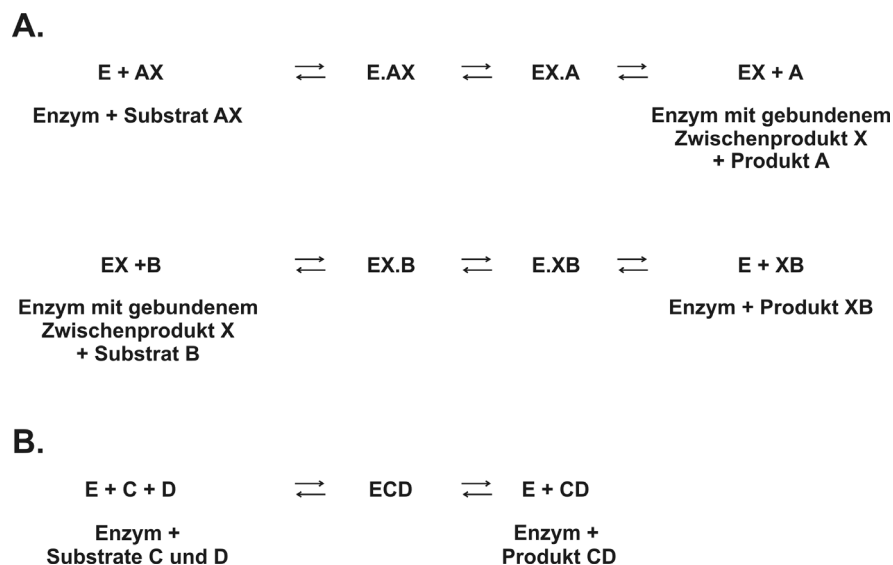


Abb. IV.2: Reaktionsschemata für einen Ping-Pong Mechanismus und einen ternären Komplex (E = Enzym; AX, B, C, D = Substrate AX; E.AX, EX.A, EX, EX.B, E.XB, ECD = Übergangszustände des Enzyms; A, XB, CD = Produkte; verändert nach [144]).

Neben den kinetischen Konstanten für die Substrate DHA, D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und D-Fructose-6-Phosphat (Transfer- und Spaltungsreaktion) wurde D-Tagatose-6-

Phosphat als möglicher Inhibitor untersucht. D-Tagatose-6-Phosphat ist ein Stereoisomer von D-Fructose-6-Phosphat mit einer 3S, 4S-Konfiguration. TalB und TalBY wurden äquimolar bzw. mit zehnfachem Überschuss mit D-Tagatose-6-Phosphat inkubiert. Die verbleibenden Transaldolase-Aktivitäten wurden mit D-Fructose-6-Phosphat und D-Erythrose-4-Phosphat (Transferreaktion) gemessen. Nach 24 h wurde die TalBY-Aktivität durch einen zehnfachen Überschuss an D-Tagatose-6-Phosphat auf 21% der Ausgangsaktivität ( $\sim 5$  U/mg) vermindert. TalB konnte auch nach 48 h Inkubation nicht signifikant inhibiert werden. Die Inhibition von TalBY konnte durch Verdünnung der Ansätze mit Tal-Puffer und erneuter Inkubation nicht aufgehoben werden, so dass offenbar eine irreversible Inhibierung vorliegt [144]. Zuerst wurde die verbleibende Aktivität von TalBY mit dem Tal-Nachweis überprüft, nun sollte die verbleibende Aktivität in der Spaltungsreaktion gemessen werden. Deswegen wurde die Inkubation unter den gleichen Bedingungen wiederholt und die TalBY Aktivität wurde in der Spaltungsreaktion von D-Fructose-6-Phosphat bestimmt. Wie mit dem Tal-Nachweis konnte erneut eine Inhibition von TalBY durch Tagatose-6-Phosphat gemessen werden. Dabei wurde die Aktivität von TalBY mit einem zehnfachen Überschuss an D-Tagatose-6-Phosphat auf 15% der Ausgangsaktivität (0,57 U/mg) herabgesetzt. Auch in diesem Ansatz konnte die Aktivität von TalBY durch Verdünnung und Inkubation nicht zurückgewonnen werden. Von der Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase des Kaninchens und der Ratte ist eine irreversible Inhibierung durch das Substratanalogon N-Bromacetylethanolaminphosphat bekannt. Die Inhibition führt nach 3 Tagen zu einem 99%igen Verlust der Aktivität [160]. Vermutlich bindet das Substratanalogon an die Bindestelle der beiden Substrate DHAP und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bindet. Normalerweise erfolgt eine irreversible Inhibierung durch die kovalente Bindung des Inhibitors, wie bei Suizid-Substraten oder durch extrem starke nicht-kovalente Bindungen (Bindungskonstanten  $>10^{-10}$  M) wie bei Übergangsanalogon eines aktivierten Intermediates [144]. Bei der Inhibition von TalBY ist es vorstellbar, dass D-Tagatose-6-Phosphat langsam an das Enzym bindet und dann am Enzym eine irreversible Bindung erfolgt, die eventuell durch eine kovalente Bindung verstärkt wird. Für eine nähere Charakterisierung der Inhibition wird derzeit TalBY mit Tagatose-6-Phosphat von T. Sandalova (Stockholm, Schweden) für eine Analyse der Röntgenstruktur kristallisiert (Daten liegen nicht vor). TalB wurde durch D-Tagatose-6-Phosphat nicht inhibiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Inhibition durch D-Tagatose-6-Phosphat mit dem Aminosäureaustausch zusammenhängt. Eine Inhibition von TalB konnte für die beiden kompetitiven Inhibitoren Arabinose-5-Phosphat und L-Glycerinaldehyd gezeigt [16]. Eine kovalente Bindung von TalBY mit Tagatose-6-Phosphat könnte durch Trypsin Verdau mit anschließender Massenspektrometrie und dem Vergleich des Trypsin-Verdaus von TalBY



ohne Tagatose-6-Phosphat unabhängig von einer Röntgenstruktur nachgewiesen werden [161].

## 2.5. Vergleich von TalB, TalBY mit hTal, hTalY

Die Transaldolasen von repräsentativen Vertretern aller Reiche lassen sich in fünf Unterfamilien einteilen [5]. Die Transaldolase B von *E. coli* und die humane Transaldolase (TALDO1, hTal) [31] gehören zur Subfamilie 1 [5]. TalB und hTal besitzen eine hohe Sequenzidentität der Primärstruktur von 56,3% und hohe Sequenzähnlichkeit der Primärstruktur von 71,6%. An der Aminosäureposition Phe178 in TalB befindet sich an der entsprechenden Position 189 in der humanen Transaldolase ebenfalls ein Phe. Ein Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr an dieser Position bewirkt in der humanen Transaldolase den Gewinn einer FSA-Aktivität, bei einer verbleibenden Tal-Aktivität. Wie TalBY besitzt auch hTalY neben einer verbleibenden Transferaktivität ( $V_{\max}$ -Wert für D-Fructose-6-Phosphat: 12 U/mg) auch eine neu gewonnene Aldolase-Aktivität mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat ( $V_{\max}$ -Wert für DHA: 14 U/mg). Mit einem doppelt so hohen  $V_{\max}$ -Wert für DHA wie TalBY, aber einem 10mal höheren  $K_m$ -Wert für DHA als TalBY. In der Spaltungsrichtung sind die  $V_{\max}$ -Werte für D-Fructose-6-Phosphat von TalBY und hTal9Y ähnlich. In der Transferreaktion besitzen beide Enzyme ähnliche  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte für D-Fructose-6-Phosphat, dementsprechend haben beide Enzyme in dieser Reaktion eine ähnlich katalytische Effizienz von  $530 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $280 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Die homozygote Defizienz der humanen Transaldolase durch die Deletion von Ser171 oder den Aminosäureaustauschen von Arg192 in His oder Cys führt zu schwerwiegenden Symptomen der Patienten [34, 36, 39-44]. Symptome von Transaldolase defizienten Patienten sind u. a. Leberdysfunktionen, vergrößerte Milz, Blutarmut und Herzprobleme. Außerdem sind die Konzentrationen an Erythritol, Arabitol, Ribitol, Sedoheptulose und Sedoheptulose-7-Phosphat in Urin und Blut bei diesen Patienten erhöht [34, 36, 39-44]. Wegen des hohen Verwandtschaftsgrades der Eltern ist nicht auszuschließen, dass die Transaldolase defizienten Patienten neben den homozygoten Defekten des *taldo1*-Gens weitere genetische Defekte besitzen, die das Krankheitsbild verstärken oder ändern könnten. Außerdem könnte ein Zusammenhang zwischen der Expressionsrate von *taldo1* (*htal*) und Multipler Sklerose bestehen und wird kontrovers diskutiert [29-32]. Bei Multiple Sklerose Patienten sind die Oligodendrozyten zerstört. In diesem Zelltyp ist im gesunden Patienten die Expressionsrate von *taldo1* relativ hoch. Dies könnte mit einem erhöhten Bedarf an Metaboliten des Pentose-Phosphat-Weges, die zur Synthese der Myelinscheide benötigt werden, zusammenhängen. Des Weiteren konnten Antikörper im Blutplasma von MS-Patienten gefunden werden, die rekombinante TALDO1 (hTal) inaktivieren können. Dabei

könnte es sich um eine Kreuzreaktion von Antikörpern handeln, die gegen retrovirale Kernproteine gebildet wurden. Kurze Bereiche dieser Proteine zeigen eine hohe Ähnlichkeit mit Oberflächenbereichen von TALDO1 [28-29, 162]. Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Antikörper gegen TALDO1 ursprünglich gegen retrovirale Proteine gebildet wurden und nun eine Kreuzreaktion mit TALDO1 zeigen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein gegen TalB von *E. coli* gerichtete polyklonale Antikörper auch die humane Transaldolase erkennen kann. Deswegen könnte bei MS-Patienten auch eine Kreuzreaktion von Antikörpern, die gegen Mikroorganismen gebildet wurden, auftreten.

### 2.6. Struktur von TalBY und Bedeutung von Phe178

Die Röntgenstrukturen von FSA [68] und TalB [17-18] sind gelöst. Hervorzuheben ist, dass FSA an der vergleichbaren Position wie TalBY ein Tyrosin (Tyr131) besitzt. Tyr131 bildet gemeinsam mit Gln59 (TalB: Glu96) und Thr109 (TalB: Thr156) eine Wasserstoffbrücke mit einem katalytisch aktiven Wassermolekül in der Nähe des Sauerstoffatoms des C3 des Carbinolamin [68]. Dieses Wassermolekül ist wahrscheinlich am Protonentransfer während der Bildung des Schiff'sche Base Intermediates beteiligt. Bei FSA wurde ein Aminosäureaustausch an der Position 131 von Tyr nach Phe bzw. Ala durchgeführt. Die veränderten Enzyme zeigen eine dekamere Struktur wie der Wildtyp, denaturieren aber bei einer Hitzefällung (75°C / 40 min) [73]. Die FSA Muteine mit den Austauschen Tyr131Phe und Tyr131Ala konnten nicht als aktive Enzyme aufgereinigt werden und sind bisher noch nicht kristallisiert worden. Die Röntgenstruktur von TalBY konnte gemeinsam mit T. Sandalova (Karolinska Institutet in Stockholm, Schweden) gelöst werden [128]. Bei einem Vergleich der Röntgenstruktur von TalB mit der von TalBY sind außer dem Aminosäureaustausch, Phe178 zu Tyr, keine strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum zu beobachten. Phe178 in TalB kann keine Wasserstoffbrücke bilden. Das katalytisch wichtige Wassermolekül wird nur von Glu96 und Thr156 gebunden. TalBY besitzt eine zusätzliche polare Gruppe und kann möglicherweise eine weitere Wasserstoffbrücke bilden. Diese beeinflusst wahrscheinlich die Nukleophilie des Wassers und damit die Stabilität des Schiff'sche Base Intermediates. Dies wird dadurch gestützt, dass bei TalB das Schiff'sche Base Intermediat so lange stabil ist, bis ein Akzeptor bindet. Bei FSA und TalBY kann DHA leichter dissoziieren, was gleichzeitig eine Transferreaktion vermindert. Zusätzlich gestützt wird diese Erklärung durch die Beobachtung, dass das Schiff'sche Base Intermediat von TalBY nicht wie bei TalB [16, 18] durch Natriumborhydrid reduziert werden kann. Deswegen scheint das Wassermolekül eine ähnliche destabilisierende Wirkung auf das Schiff'sche Base Intermediat zu zeigen, wie dies für FSA postuliert wurde [68].

In der Sättigungsmutagenesebank TalBF178X wurde neben dem Austausch nach Tyr auch Austausche in andere polare Aminosäuren, wie Ser und Thr, gefunden. Zellfreie Extrakte dieser Klone zeigten keine Aktivität mit DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, aber eine deutlich verminderte Transferaktivität. Wahrscheinlich sind die Seitenketten dieser Aminosäuren zu kurz um eine Wasserstoffbrücke mit dem katalytischen Wassermolekül zu bilden (siehe Abb. IV.3).

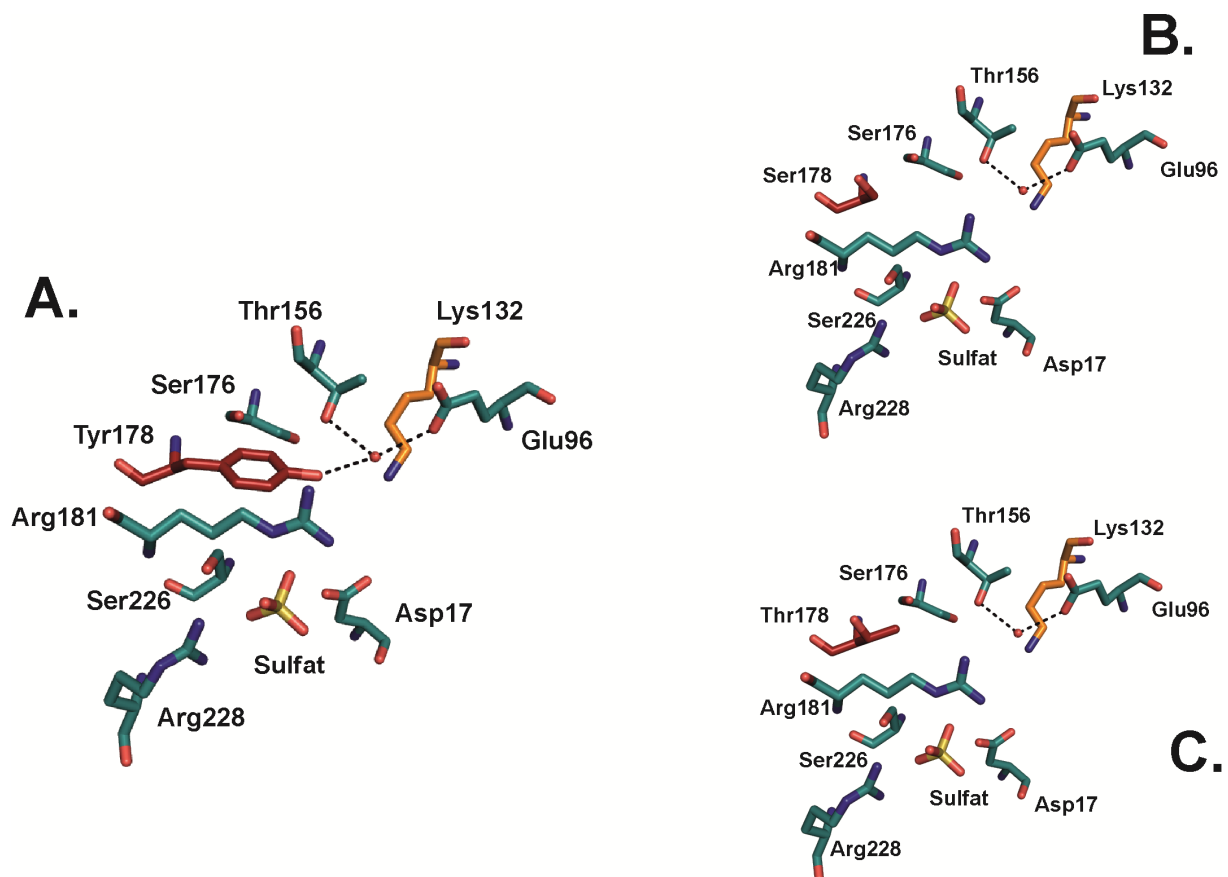


Abb. IV.3: A. Röntgenstruktur von TalBY (pdb-Nr: 3CWN, verändert nach [128]) dargestellt mit PyMOL. Das katalytisch wirksame Wassermolekül bildet mit Glu96, Thr156 und Tyr178 Wasserstoffbrücken. B. Modell von TalBF178S dargestellt mit pyMOL. C. Modell von TalBF178T dargestellt mit PyMOL.

### 3. Mutagenese des *talBY*-Gens zur Generierung von Enzymen mit niedrigem $K_m$ -Wert für D-Glycerinaldehyd

In einer ersten Mutageneserunde wurde TalB von *E. coli* so verändert, dass TalBY DHA mit einer ähnlichen katalytischen Effizienz verwendet wie FSA [128]. In der Röntgenstruktur von TalBY befindet sich in der Nähe der Aminosäurereste Arg181, Ser226 und Arg228 ein Sulfation des Puffers. Aufgrund der Ähnlichkeit des Sulfations mit der Phosphatgruppe der Substrate wird vermutet, dass das Phosphat der Substrate von diesen drei

Aminosäureresten gebunden wird. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits vermutet, dass diese Aminosäuren an der Bindung der Phosphatgruppe von Substraten beteiligt sind [16-18, 21]. In einer zweiten Mutageneserunde und durch die gewählten Screeningbedingungen sollte TalBY so verändert werden, dass es D-Glycerinaldehyd mit einer höheren Affinität bindet als TalBY und mit DHA als Substrat zu D-Fructose umsetzt. Aldolasen, die phosphorylierte Zucker als Substrate benötigen, wie 2-Deoxyribose-5-Phosphat Aldolase (DERA) und D-2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) Aldolase, konnten bereits durch Mutagenese so verändert werden, dass sie auch unphosphorylierte Zucker verwenden können [112, 163-164]. Bei beiden Enzymen führten unterschiedliche Strategien zum Ziel. DERA wurde durch rationales Design und gezielte Mutagenese, basierend auf der Röntgenstruktur des Carbinolamins dahingehend verändert, dass D-2-Deoxyribose, gespalten wurde [112]. Für die industrielle Anwendung wurde DERA durch gerichtete Evolution so verändert, dass es bei der Produktion von Statinintermediaten durch hohe Substratkonzentrationen nicht mehr inhibiert wird [123, 165]. Die KDPG Aldolase wurde durch gerichtete Evolution mittels fehlerhafter Polymerase und DNA-Shuffling so verändert, dass es nicht nur D-2-Keto-3-Deoxygluconat spaltet, sondern sowohl D-Glycerinaldehyd wie auch L-Glycerinaldehyd als Substrat verwendet [163-164]. Basierend auf der Röntgenstruktur von TalBY sollten Muteine gefunden werden, die einen niedrigen  $K_m$  für D-Glycerinaldehyd besitzen.

### 3.1. Sättigungsmutagenese des *talBF178Y*-Gens

Die Mutagenese des *talBF178Y*-Gens wurde durch Sättigungsmutagenese mit dem QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) an drei verschiedenen Aminosäurepositionen (Arg181, Ser226, Arg228) durchgeführt [103, 149-152]. Zur Überprüfung der Qualität der Banken wurde von 20 zufällig gepickten Klonen der Sättigungsmutagenesebank TalBF178YR181X, die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Zusätzlich wurden jeweils von 10 zufällig gepickten Klonen der Sättigungsmutagenesebanken TalBF178YS226X und TalBF178YR228X, die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Bei 20 sequenzierten Plasmiden und einer gleichmäßigen Verteilung der Triplets würde jedes Triplet einmal, mit einer Wahrscheinlichkeit von 5%, vorkommen. Bei der TalBF178YR181X-Bank besitzt ein Klon das wildtypische Triplet, CGT. Dieses Triplet ist mit dem Primermotiv NNS nicht möglich, das Auftreten dieses Triplets hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die Matrizen-DNA nicht vollständig durch DpnI verdaut wurde. Insgesamt 12 verschiedene Triplets kommen bei dieser Bank vor. Nur drei Triplets kommen zweimal vor und sind mit 10% überrepräsentiert. Warum diese Klone überrepräsentiert sind, ist unklar, da die Klone zufällig gepickt wurden. Eventuell könnte

diese ungleichmäßige Verteilung mit der Basenpaarung zusammenhängen, da manche Primer je nach NNS-Motiv eine höheren Hybridisierungseffizienz haben und sich besser an die Matrizen-DNA lagern als andere [84]. Bei fünf Klonen trägt das Plasmid eine Insertion eines kurzen DNA-Fragments (25%). Die Anzahl der Insertionen ist fast doppelt so hoch wie bei der TalBF178X-Bank und könnte auch hier mit einer zu langen Elongationszeit zusammenhängen (siehe II.2.1.). Mit dem Unterschied, dass der Heizblock und der Heizdeckel des verwendeten Thermocyclers nach der ersten Mutageneserunde ausgetauscht wurden. Dadurch haben sich vermutlich die Heizphasen verkürzt, so dass bei gleicher Elongationszeit die Zieltemperatur des Gerätes schneller erreicht wurde als zuvor und damit die Elongationszeit verlängert wurde.

Bei einem der zehn sequenzierten Plasmide der TalBF178YS226X-Bank kam das wildtypische Triplet AGC vor. Dieses Triplet ist mit dem Primermotiv NNS möglich. Bei einer gleichmäßigen Verteilung der 32 Triplets dürfte jedes Triplet einmal mit einer Wahrscheinlichkeit von 10% vertreten sein. Nur das Triplet ATG ist mit 30% überrepräsentiert. Eine Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes kam bei den zehn Plasmiden nicht vor.

Bei der TalBF178YR228X-Bank tritt die Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes gleich dreimal auf. Dafür besitzt keines der Plasmide das wildtypische Triplet CGT und alle anderen sieben Triplets sind jeweils einmal vertreten (10%). Von Nachteil ist, dass bei zwei der drei Banken eine Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes relativ häufig auftritt.

Bei 95 überprüften Klonen und dem Primermotiv NNS sind alle möglichen Triplets zu 95% abgedeckt [85]. Aufgrund der Qualität der Banken wurden von jeder der drei Sättigungsmutagenesebanken zunächst jeweils 168 Klone, anstatt 95 Klone, auf eine Aktivität mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd überprüft, damit müssten die mit dem Primermotiv NNS möglichen Triplets abgedeckt sein.

### 3.2. Etablierung eines Screenings zum Nachweis von D-Fructose

Als Grundlage des Screenings zum Nachweis von D-Fructose aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd (GA) diente der bereits erwähnte Screeningnachweis von D-Fructose-6-Phosphat. Hier wurde als zusätzliches koppelndes Enzym die Fructokinase von *Zymomonas mobilis* eingesetzt [8]. Für die Phosphorylierung von D-Fructose benötigt die Fructokinase Magnesium-ATP. Die Fructokinase phosphoryliert D-Fructose zu D-Fructose-6-Phosphat, das durch den Farbnachweis über die koppelnden Enzyme Phosphoglucoseisomerase, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und Diaphorase nachgewiesen werden kann.

Zur Optimierung des Screens wurden pro Well (200 µl) verschiedene Konzentrationen Fructokinase [166], Magnesiumchlorid und ATP ausgetestet [167] (siehe III.2.1.). Aufgrund

des gemessenen  $K_m$ -Werts von TalBY für DHA (30 mM) sollte DHA sättigend (150 mM) eingesetzt werden. Bei einer Inkubation von hohen DHA Konzentrationen (12,5 mM bis 800 mM) mit NBT in Glycylglycin-Puffer konnte eine Hintergrundreaktion durch eine Zunahme der Steigung beobachtet werden. Deswegen wurde wie im vorangegangenen Screening auf eine Synthese von D-Fructose-6-Phosphat, 50 mM DHA eingesetzt. Alle anderen Konzentrationen der Komponenten, die für den Farbnachweis von D-Fructose benötigt werden, wurden von dem Screening auf eine Synthese von D-Fructose-6-Phosphat beibehalten.

Eine Besonderheit dieses Screenings war, dass ausgehend von der bestehenden Aktivität von 0,87 U/mg von TalBY mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd nach einer Enzymvariante gesucht wurde, die einen niedrigeren  $K_m$ -Wert für D,L-Glycerinaldehyd besitzt als TalBY mit > 120 mM.

### 3.3. Überprüfung der drei Sättigungsmutagenesebanken auf die Synthese von D-Fructose

Nur in der Sättigungsmutagenesebank TalBF178YR181X wurden Klone gefunden, die eine höhere Aktivität mit 10 mM D-Glycerinaldehyd (eingesetzt wurde D,L-Glycerinaldehyd) zeigten als die Untergrenze. Insgesamt zeigten 38 Klone wiederholt eine höhere Aktivität als die untere Messgrenze. Zwölf der 38 Klone besaßen einen Austausch von Arg nach Glu. Außerdem waren die Austausche nach Ala (3x), Asn (1x), Asp (1x), Gln (4x), Gly (11x), Pro (4x), Ser (1x) und Thr (1x) vertreten. Von M. Schürmann [72] wurde in TalB der Austausch von Ser226 nach Gly vorgenommen. Der Austausch führte zu einer Erhöhung des  $K_m$ -Werts für D-Erythrose-4-Phosphat. Es wurde vermutet, dass Ser226 nicht nur für die Bindung der Phosphatgruppe zuständig ist, sondern auch für die Bindung von der C4- oder C5-Gruppe des Substrats.

### 3.4. Charakterisierung der Muteine

Der Austausch von Arg nach Glu an der Position 181 zeigt den größten Effekt auf die Aktivität mit den unphosphorylierten Substraten DHA und D,L-Glycerinaldehyd zu D-Fructose. TalBYE zeigt keine messbare Aktivität mit D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und DHA. TalBYE besitzt eine verbleibende Aktivität in der Transferreaktion von 1 U/mg. Demnach bewirken weder die Austausche in eine Aminogruppe (Gln, Asn), noch eine polare (Ser, Thr) oder kurze Seitenketten wie Ala und Gly, eine so hohe Aktivitätsänderung von TalBY mit DHA und D,L-Glycerinaldehyd, wie Glu. Auch ein Austausch von Arg nach Pro führt nicht zu einer höheren Aktivität von TalBY mit den unphosphorylierten Substraten. Eine negativ geladene Seitenkette wie Glu besitzt auch die Aminosäure Asp, aber auch dieser

Austausch führte zu einer niedrigeren Aktivität von TalBY mit den unphosphorylierten Substraten als der Austausch nach Glu. Daher muss die Aminosäure nicht nur negativ geladen, sondern auch eine gewisse Länge besitzen. Bei der durch Mutagenese veränderten DERA hatte der Austausch von Ser238 in Asp den größten Effekt auf die Aktivität und die katalytische Effizienz mit den unphosphorylierten Substraten gezeigt [163-164]. Ser238 ist bei DERA an der Bindung der Phosphatgruppe beteiligt. Zu einem niedrigeren  $K_m$ -Wert führt der Aminosäureaustausch an der Position 207 von Arg nach Glu. Arg207 ist weder an der Bindung der Phosphatgruppe des Zuckers noch an der Katalyse beteiligt.

### 3.5. Charakterisierung von TalBYE

Durch nur einen weiteren Austausch in TalBY von der positiv geladenen Aminosäure Arg181 in die negativ geladene Aminosäure Glu wurde die Affinität des Enzyms für D,L-Glycerinaldehyd um mehr als ein fünffaches gegenüber TalBY verbessert. Der  $V_{max}$ -Werte für D,L-Glycerinaldehyd von TalBY und TalBYE ist ähnlich. Da das Screening auf eine höhere Affinität für D,L-Glycerinaldehyd angelegt war, trifft damit die Regel ‚you get what you screen for‘ [78] auf dieses Ergebnis zu. Gleichzeitig hat die TalB-Variante die Aktivität mit dem phosphorylierten Aldehyd D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat verloren ( $< 0,01$  U/mg). Für TalBY konnte gezeigt werden, dass die Affinität für D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat um fast ein 50faches höher ist als für die unphosphorylierte Form, D,L-Glycerinaldehyd ( $> 120$  mM). Folglich konnte nur durch die negative Ladung von Glu181 die Bindung zu D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat vermindert werden und die Affinität zu D-Glycerinaldehyd erhöht werden. Bei TalBY ist bei hohen Konzentrationen an D,L-Glycerinaldehyd eine Substratinhibition zu beobachten. Generell gilt für Enzyme, dass bei hohen Konzentrationen eines Substrats zwei Substratmoleküle an das Enzym binden können. Eines der beiden Moleküle kann an der Katalyse teilnehmen, das zweite Molekül reagiert als unkompetitiver Inhibitor [144]. Möglich wäre auch, dass TalBYE durch die L-Form des Racemats inhibiert wird, um dies zu überprüfen wurden die kinetischen Konstanten für D-Glycerinaldehyd von TalBYE und TalBY bestimmt. TalBYE und TalBY zeigen eine Substratinhibition bei hohen Konzentrationen an D-Glycerinaldehyd. Das eingesetzte D-Glycerinaldehyd lag mit einer Reinheit von  $\geq 98\%$  vor, mit  $\leq 2\%$  könnte L-Glycerinaldehyd enthalten sein. Da die Substratinhibition bei hohen Konzentrationen D-Glycerinaldehyd um mehr als 2% vermindert war, ist die Verunreinigung nicht ausschließlich für die verminderte Aktivität verantwortlich. Die Affinität von TalBYE für D-Glycerinaldehyd ist ähnlich zu der Affinität für D,L-Glycerinaldehyd und auch der  $V_{max}$ -Wert für D-Glycerinaldehyd ist ähnlich. Nur die Einfachmutante zeigt einen um mehr als die Hälfte verminderten  $K_m$ -Wert für D-

Glycerinaldehyd gegenüber dem für D,L-Glycerinaldehyd. Demnach hat die L-Form des Glycerinaldehyd-Racemtas keinen negativen Einfluss auf die  $K_m$ -Werte.

Wie TalBY hat auch die Doppelmutante eine verbleibende Transferaktivität von 1 U/mg (~ 1% der Wildtypaktivität). Außerdem zeigt TalBYE in der Spaltungsreaktion von D-Fructose eine doppelt so hohe Aktivität von 0,18 U/mg als TalBY (0,08 U/mg). Der Wildtyp zeigt sowohl in der Kondensationsreaktion wie in der Spaltungsreaktion von D-Fructose keine Aktivität. Die Transaldolase der Hefe katalysiert die Spaltung von D-Fructose und Bildung von D-Fructose-6-Phosphat, wenn D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Akzeptor für DHA angeboten wird [13, 168]. Auch TalB kann D-Fructose als Donor mit einer sehr niedrigen Affinität ( $K_m$ -Wert > 2 M), verwenden [5, 16]. Der niedrige  $K_m$ -Wert und die niedrigen Aktivitäten in der Spaltungsrichtung hängen damit zusammen, dass D-Fructose in wässriger Lösung nur zu einem geringen Anteil als offenkettige D-Fructose vorliegt (< 1 %) und zu einem größeren Anteil als Ringform. TalB kann aber vermutlich nur die offenkettige Form umsetzen u.a. deswegen ist der  $K_m$ -Wert für D-Fructose von TalB so hoch.

In Zusammenarbeit mit M. Gutiérrez und P. Clapés (Instituto de Quimica Avanzada de Cataluna-CSIC, Barcelona, Spanien) wurde durch HPLC und NMR-Spektroskopie gemessen, dass die L-Form von Glycerinaldehyd von TalBYE zu 98% in 48 h in L-Sorbose umgewandelt wird und von TalBY immerhin zu 90% in 48 h (unveröffentlichte Daten). Die Reaktionen wurden durchgeführt mit 68,7  $\mu$ mol/ 700  $\mu$ l Akzeptor (Glycolaldehyd, D- und L-Glycerinaldehyd) und 70  $\mu$ mol/ 700  $\mu$ l Donor (DHA) mit jeweils 3 mg Protein (TalB, TalBY, TalBYE). Da bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten in der vorliegenden Arbeit nur die Bildung an D-Fructose gemessen wird, ist es anzunehmen, dass bei D,L-Glycerinaldehyd neben D-Fructose auch L-Sorbose gebildet wird. Das wildtypische Enzym TalB wird durch L-Glycerinaldehyd kompetitiv inhibiert [16]. Demzufolge bindet L-Glycerinaldehyd an alle drei Transaldolase Varianten (TalB, TalBY und TalBYE). Da die beiden Enzyme TalBY und TalBYE L-Glycerinaldehyd mit DHA zu L-Sorbose umsetzen (M. Gutiérrez und P. Clapés, unveröffentlicht), ist es anzunehmen, dass die Aminosäure an der Position 178 für die Synthese verantwortlich ist. Für die Transaldolase der Hefe war ebenfalls eine Synthese von L-Sorbose aus DHA und L-Glycerinaldehyd gezeigt worden [169]. Desweiteren konnte in Zusammenarbeit mit M. Gutiérrez gezeigt werden, dass TalBYE DHA und D-Glycerinaldehyd nach 24 h zu > 99% zu D-Fructose umsetzen kann (unveröffentlichte Daten). Außerdem konnte gezeigt werden, dass von TalBYE DHA und Glycolaldehyd nach 24 h bis zu 90% zu D-Xylulose umgesetzt wurde. Mit TalBY war eine deutlich geringere Umsatzrate von 15% in 24 h, mit DHA und Glycolaldehyd zu D-Xylulose und 10% in 24 h, mit DHA und D-Glycerinaldehyd zu D-Fructose möglich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Glycolaldehyd sowohl als Akzeptor wie auch als Donor verwendet wird und durch die beiden Enzyme TalBY und TalBYE zu D-Threose umgewandelt wird. Erst kürzlich konnte diese



Reaktion für FSA beschrieben werden [51]. Die mit FSA und Glycolaldehyd gemessene Bildung von D-Threose erfolgt mit einer deutlich höheren Maximalgeschwindigkeit von 0,22 U/mg als mit TalBY (0,01 U/mg) und TalBYE (0,02 U/mg). Damit steht nun FSA zur Synthese von D-Threose zur Verfügung und TalBY bzw. TalBYE zur Synthese von D-Xylulose. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass obwohl FSA und TalBY D-Fructose-6-Phosphat aus DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bilden und spalten können einige Unterschiede bestehen. So wird von TalBY D-Glycerinaldehyd bei niedrigen Konzentrationen als Substrat verwendet und erst bei hohen Konzentrationen inhibiert, wohingegen FSA von D-Glycerinaldehyd bereits bei niedrigen Konzentrationen inhibiert wird. Vermutlich hängt dies damit zusammen, dass FSA bei niedrigen D-Glycerinaldehyd mit Lys85 ein Carbinolamin bilden kann, wohingegen dies bei TalBY vermutlich erst bei hohen Konzentrationen möglich ist. Es bleibt herauszufinden, ob die TalB-Varianten TalBY und TalBYE eine ähnliche Anwendbarkeit für die Synthese von zum Beispiel D-Fagomin besitzen wie FSA [67].

### 3.6. Struktur und Bedeutung von Arg181

In Zusammenarbeit mit T. Sandalova (Karolinska Institutet in Stockholm, Schweden) konnte die Röntgenstruktur der Doppelmutante TalBYE gelöst werden (unveröffentlichte Daten). Im Kristall von TalBYE wurde ebenfalls ein Sulfation des Puffers gefunden. Dieses wird aber mit einer geringeren Belegung gebunden als im TalBY Mutein. Demzufolge wurde die Sulfatbindung durch den Austausch Arg181 nach Glu nicht vollständig zerstört. Dies könnte entweder damit zusammenhängen, dass der Glutamatrest nicht geladen ist oder an Hydrogensulfat bindet. Ein Austausch von Arg nach Glu reicht aus um die Bindung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu schwächen und die zu D-Glycerinaldehyd zu verbessern. Ein Aminosäureaustausch von Arg nach Asp zeigt keine so hohe Aktivität für D-Glycerinaldehyd in der Synthese von D-Fructose. Durch die kürzere Seitenkette des Aspartatrests kann die negative Ladung nicht so weit in das aktive Zentrum ragen. Bei der Transferreaktion kann der längerkettige Zucker D-Fructose-6-Phosphat gebunden werden, weil er neben der Phosphatgruppe mehr Bindungen mit dem Enzym eingehen kann als D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. TalBYE zeigt keine Aktivität mit D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

Weitere Mutagenesen an den Position Ser226 und Arg228 könnten die bestehenden schlechten Interaktion mit dem Sulfation und damit mit den phosphorylierten Substraten zerstören. Es könnten von Interesse sein, ob durch Mutagenese an den beiden Positionen Ser226 und Arg228, die Bindung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat vollständig unterbunden werden kann und ob diese Mutagenesen eine noch größere Auswirkung auf die Transaldolase-Aktivität ausüben.

#### 4. Einfluss von D-Glycerinaldehyd auf FSA

FSA besitzt ein sehr breites Donorspektrum und kann DHA, Glycolaldehyd, Hydroxyaceton und 1-Hydroxy-2-Butanon als Donoren verwenden, wenn D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat der Akzeptor ist [66, 69]. Die phosphorylierte Form von DHA, Dihydroxyacetonphosphat wird von FSA nicht als Donor verwendet [66, 69]. Von Schürmann et al. 2002 [71] wurde gezeigt, dass FSA mit DHA und D-Glycerinaldehyd eine Aktivität von 0,01 U/mg, mit Hydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd eine zehnmal höhere Aktivität von 0,1 U/mg zeigt. Es wurde vermutet, dass je nach Donor D-Glycerinaldehyd als Inhibitor oder Substrat reagieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde D-Glycerinaldehyd als Inhibitor von FSA getestet. Zunächst erfolgte eine Inkubation von FSA mit D-Glycerinaldehyd und der anschließenden Bestimmung der Aktivität. Dabei wurde die Aktivität von FSA mit DHA und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu D-Fruktose-6-Phosphat, bei den Ansätzen mit D-Glycerinaldehyd inhibiert. Durch Verdünnung der Ansätze konnte die FSA-Aktivität fast vollständig zurückgewonnen werden. Aus diesem Grund handelt es sich um eine reversible Inhibition [144]. Anschließend wurde die kinetischen Konstanten von FSA für D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat in An- und Abwesenheit von D-Glycerinaldehyd bestimmt. Bei einer Auswertung nach Bisswanger [144] würde es sich um eine nicht-kompetitive Inhibition handeln.

Bei einer nicht-kompetitiven Inhibition könnte man die Art der Inhibition näher charakterisieren, in dem man die Steigungen und die Ordinatenschnittpunkte in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration (D-Glycerinaldehyd) aufträgt. Anhand dieser Darstellungen lassen sich die Dissoziationskonstanten  $K_{ic}$  und  $K_{iu}$  für den Hemmstoff berechnen. Der  $K_{ic}$  berechnet sich aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes und dem Zerfall des Komplexes (siehe Abb. IV.4). Der  $K_{iu}$  berechnet sich aus der Bildung und dem Zerfall eines Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes (siehe Abb. III.40).

Anhand der Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse lassen sich die Inhibitorkonstanten  $K_{ic}$  (1,63 mM) und  $K_{iu}$  (35  $\mu$ M) bestimmen. Demnach wäre  $K_{ic}$  größer als  $K_{iu}$ . Bei einer Inhibition würde dies dem Sonderfall entsprechen, dass der Inhibitor (D-Glycerinaldehyd)  $K_A$  die Bindung des Substrates (D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat) begünstigt.

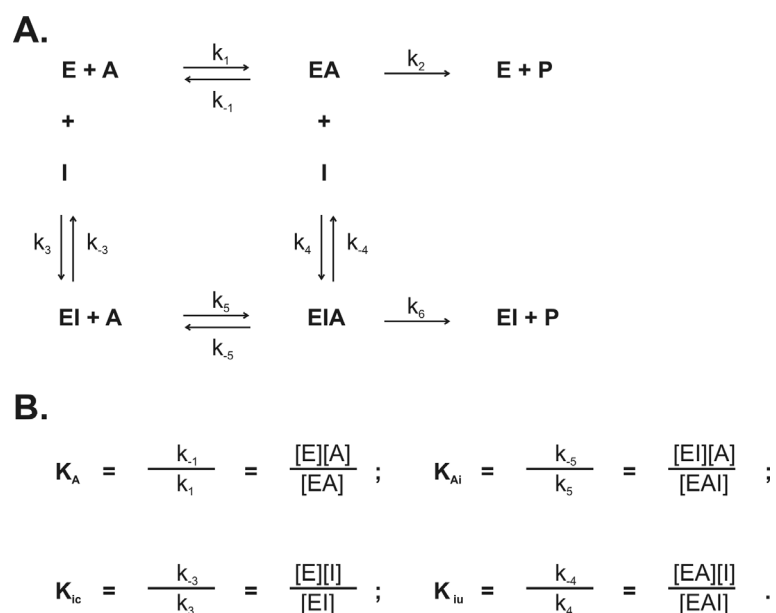


Abb. IV.4: A. Schema des Reaktionsmechanismus eines Enzyms (E) mit einem reversiblen Inhibitor (I) und einem Substrat (A) verändert nach [144]. B. Anhand dieses Reaktionsmechanismus lassen sich jeweils zwei Dissoziationskonstanten für das Substrat A und den Inhibitor I bestimmen [144].

Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass bei der Inhibition und auch bei den Messungen der Aktivität von einem unabhängigen aktiven Zentrum pro monomerer Untereinheit ausgegangen wird. FSA bildet in seiner aktiven Form ein Homodecamer. Bisher ist nicht bekannt wie viele dieser zehn Untereinheiten gleichzeitig katalytisch aktiv sind. Daher besteht die Möglichkeit, dass bei der Bindung von D-Glycerinaldehyd an eines oder mehrere aktive Zentren es zu einer Beeinflussung der Bindungseigenschaften eines oder mehrerer aktiver Zentren des gleichen Multimers kommt. Wie genau diese Änderung der Bindungseigenschaften aussieht ist noch unklar. Vorstellbar wäre eine Veränderung der strukturellen Konformation in einem oder mehreren aktiven Zentren, das kein D-Glycerinaldehyd gebunden hat, so dass die Bindung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat begünstigt wird. Es könnte auch sein, dass D-Glycerinaldehyd nicht an die gleiche Bindestelle wie D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bindet, sondern an Lys85 [72]. Damit wird nicht die Bindung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat gestört sondern vom Donor DHA.

## 5. Sättigungsmutagenese des *talB*- / *talBF178Y*-Gens und Screening auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat

Von der Arbeitsgruppe um A. Berry (Leeds, UK) konnte die Stereospezifität der Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase durch gerichtete Evolution geändert werden, so dass von dem veränderten Enzym Fructose-1,6-Bisphosphat und Tagatose-6-Phosphat in einem Verhältnis von 4:1 gebildet wird [88]. Dafür waren drei Runden DNA-Shuffling mit der Klasse II Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase notwendig. Ein Mutein mit den Aminosäureaustauschen H26Y, D104G, V121A und P256L zeigte eine 80fache Verbesserung von  $k_{cat}/K_m$  für das nicht-natürliche Substrat D-Fructose-1,6-Bisphosphat. Anhand der Röntgenstruktur von Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase [55] wurde vermutet, dass die Austausche zu einer Neuorientierung der Phosphatgruppe des Intermediates während der Katalyse führen. Bei diesem Beispiel darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die verwendete Aldolase zu den Klasse II Aldolasen gehört und damit kein Schiff'sche Base Intermediate mit einem Lysinrest bildet wie TalB.

Anhand von Mutagenesen der TalB sollte die Struktur des Enzyms so geändert werden, dass es das Stereoisomer D-Tagatose-6-Phosphat mit der Stereokonfiguration 3S, 4S aus DHA und D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bildet.

Für die Änderung der Stereokonfiguration der Produkte von TalB und damit der Stereospezifität von TalB wurden die Sättigungsmutagenesebanken TalBF178X, TalBF178YS226X und TalBS226X für ein Screening auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat durchmustert. Zur Bestimmung von gebildetem D-Tagatose-6-Phosphat wurde ein neues Screeningsystem im Mikrotitermaßstab etabliert. Der Nachweis von D-Tagatose-6-Phosphat sollte über das koppelnde Enzym Galactitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (GatD) erfolgen [145]. Die Abnahme an NADH bei 340 nm sollte als Maß der Bildung von D-Tagatose-6-Phosphat dienen.

In keiner der drei Sättigungsmutagenesebanken wurde ein positiver Klon unter den beschriebenen Bedingungen (III. 4.) gefunden. An der Vorgehensweise war nicht optimal, dass die Muteine nach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie über zwei Wochen in einem Phosphat-Puffer gelagert wurden. Für TalB konnte gezeigt werden, dass Phosphat die Aktivität inhibiert [16]. Aus diesem Grund wurden die Klone, die wiederholt eine vermeintliche Synthese von Tagatose-6-Phosphat zeigten von Dr. A. K. Samland erneut kultiviert. Die His-Tag Proteine wurden erneut angereichert und auf eine Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat unmittelbar nach einem Pufferwechsel überprüft. Vier der wiederholt überprüften Muteine der TalBS226X-Bank gaben einen Hinweis auf eine Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat (unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse konnten nicht verifiziert werden. Für eine Verbesserung der Aktivität zur Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat dieser Muteine sind wahrscheinlich zusätzliche Mutationen notwendig. Bei der Mutagenese von Tagatose-

1,6-Bisphosphat Aldolase waren insgesamt vier Aminosäureaustausche notwendig um die Stereospezifität des Enzyms zu verändern [88]. Wahrscheinlich ist zur Erlangung eines Enzyms, das neben D-Fructose-6-Phosphat D-Tagatose-6-Phosphat bildet, eine ungerichteten Mutagenese von *talB* oder *talBF178Y* notwendig. Bei einer ungerichteten Mutagenese ist aber von Nachteil, dass sehr viele Muteine untersucht werden müssen [170].

## 6. Zufallsmutagenese von *talB* und *talBF178Y*

Durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion wurden mit *talB* und *talBF178Y* als Ausgangs-DNA zwei Mutagenesebanken, epTalB und epTalBF178Y, gebildet [96]. Der Mutagenese unterlag auch die für den His-Tag kodierende Region, die dadurch ebenfalls verändert wurde. Von beiden Banken wurden von jeweils 30 zufällig gepickten Klonen die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Beide Banken zeigen eine niedrige Mutageneserate von 2,38 und 2,33 Nukleotidaustauschen pro kb. Bei beiden Banken sind die Nukleotidaustausche gleichmäßig über das gesamte Gen verteilt.

Die Angaben zum Mutationsspektrum der Mutazyme® II DNA Polymerase von Stratagene weichen deutlich von den Werten der epTalB- und epTalBF178Y-Bank ab. Bei den 30 sequenzierten Plasmiden kommen keine Deletionen und Insertionen vor (siehe Tab. III.17). Transitionen von AT nach GC kommen mit einer ähnlichen Häufigkeit in beiden Banken vor. Wohingegen Transition von GC nach AT bei der epTalBF178Y-Bank häufiger vorkommen als in der epTalB-Bank. Alle Transversionen außer denen von AT nach TA und GC nach CG kommen in beiden Banken ähnlich häufig vor. Die Transversionen von GC nach CG kommen bei der epTalB-Bank nicht vor. Bei der epTalB-Bank kommen Transversionen von AT nach TA häufiger vor als in der epTalBF178Y-Bank.

Die beiden Banken waren eigentlich für ein Screening auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat gedacht. Da hier die Hintergrundreaktion und damit die Anzahl an falsch-positiven Klone sehr hoch war, wurde davon abgesehen eine fehlerhafte Mutagenesebank auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat zu screenen. Die Anzahl an zu untersuchenden Klonen von ungerichteten Mutagenesebanken, mit einer Mutageneserate von eins und einer Proteingröße von 336 Aminosäuren der TalB mit His<sub>6</sub>-Tag beträgt mindestens 6000 Klone [170].

Diese beiden Banken könnten dazu verwendet werden, einzelne Klone durch ein Screening auf die Spaltung der Stereoisomere D-Tagatose-6-Phosphat, D-Sorbose-6-Phosphat oder D-Psicose-6-Phosphat mit einem wie von Williams et al. 2003 [88] beschriebenen Farbnachweis, über die Entstehung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu überprüfen. Eine Anwendung auf die Spaltung von D-Fructose-6-Phosphat wurde bereits ausgetestet, muss aber noch optimiert werden, da die Spaltungsaktivität von TalBY in Rohextrakten sehr niedrig

ist. Außerdem werden bei einem Screening auf die Spaltung der genannten Stereoisomere große Mengen von den meist teuren Substraten benötigt.

Ein ähnliches Selektionssystem, wie es für die L-Rhamnulose-1-Phosphat Aldolasen beschrieben wurde ist auch für TalB-Varianten möglich [54], aber nicht so leicht übertragbar. Der Arbeitsgruppe von Prof. Sprenger liegen bereits einige *E. coli* Deletionsstämme vor. Von Dr. N. Trachtmann wurden die beiden *E. coli* Deletionsstämme LJ110  $\Delta rhaBD::rhaK$ -Kan und LJ110  $\Delta fucKU::Kan$  bereitgestellt. Bei dem Deletionsstamm LJ110  $\Delta rhaBD::rhaK$ -Kan sind die Gene für die L-Rhamnulosekinase und die Rhamnulose-1-Phosphat Aldolase ausgeschaltet. Durch eine TalB-Variante könnte L-Rhamnulose in DHA und L-Laktaldehyd gespalten werden, das dann zu einem Wachstum der Klone führt. Bei dem Deletionsstamm LJ110  $\Delta fucKU::Kan$  sind die Gene für die L-Fuculokinase und die L-Fucosemutarotase ausgeschaltet, so dass sich L-Fucose anreichert und durch eine neue TalB-Variante in DHA und L-Lactaldehyd gespalten werden kann. Beide Stämme zeigen auf Minimalmedium-Agarplatten mit IPTG, dem entsprechenden Antibiotika und der jeweiligen C-Quelle (L-Rhamnose, L-Fucose) nach einigen Tagen der Inkubation bei 37°C ein Wachstum. Dadurch wird ein großer Nachteil von Selektionssystemen deutlich, nämlich der von falsch-positiven Klonen, die aufgrund von alternativen Stoffwechselstrategien ein Wachstum zeigen.

Ein mögliches Screeningsysteme für die beiden Banken wurde von González-García et al. [120] beschrieben. Dabei wurden drei verschiedene fluorogenierte Donoren, u. a. 6-O-Coumarinyl-D-Fructose, beschrieben. Bei einem Transfer einer Dihydroxyacetoneinheit von den fluorogenierten Donoren auf einen Akzeptor wurde das fluoreszierende Umbelliferon frei. Es konnte für TalB gezeigt werden, dass TalB 6-O-Coumarinyl-D-Fructose als Donor und D-Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor verwendet. Bei den anderen beiden fluorogenierten Donoren handelt es sich um Stereoisomere von 6-O-Coumarinyl-D-Fructose. Die als Donoren für ein Screening von TalB-Varianten mit neuer Stereospezifität verwendet werden könnten. Eine andere Möglichkeit wäre 6-O-Coumarinyl-D-Fructose mit Stereoisomeren, der bisher von TalB verwendeten Akzeptoren, für ein Screening zu verwenden. Mit diesen fluorogenierten Donoren wäre es möglich TalB-Varianten auf neue Stereospezifität für Donoren und Akzeptoren zu durchmustern. Ein Nachteil dieser fluorogenierten Donoren ist, dass sie nicht käuflich zu erwerben sind und die Synthese schwierig ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von TalB durch nur einen Aminosäureaustausch von Phe nach Tyr an der Position 178, zu einer verbesserten Aktivität mit DHA und D-L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat führte. Außerdem blieb die Transaldolase Aktivität erhalten. Durch einen weiteren Aminosäureaustausch konnte die Affinität für den unphosphorylierten Akzeptor D-Glycerinaldehyd deutlich erhöht werden.

Außerdem wurde in Zusammenarbeit mit M. Gutiérrez und P. Clapés (Instituto de Química Avanzada de Cataluña-CSIC, Barcelona, Spanien) von den beiden Enzymen TalBY und TalBYE, D-Xylulose und L-Sorbose, aus DHA und Glycolaldehyd bzw. L-Glycerinaldehyd gebildet (unveröffentlichte Daten). Eine Anwendung der Muteine zur Synthese von Aldolase-Produkten, wie Fagomin oder anderen Imminocyclitolen oder (-)-Syringoliden, Azazuckern, Desoxyzuckern könnte ausgetestet werden.

Für die Änderung der Stereospezifität von TalB durch ein Screening auf die Synthese von D-Tagatose-6-Phosphat mit einer 3S, 4S-Konfiguration war aufgrund der niedrigen Aktivitäten der Muteine schwierig. Eine bestehende neue Aktivität konnte erst in einer wiederholten Anzucht und Anreicherung der Muteine gemessen werden. Diese niedrigen Aktivitäten könnten nun in einer weiteren Mutageneserunden verbessert werden.

Eine neue Stereospezifität von TalB wäre von Interesse, weil sie zum Verständnis der strukturellen Beziehung zwischen der Stereospezifität eines Enzyms und der gebildeten Stereokonfiguration der Produkte beitragen könnte. Anhand dieser Ergebnisse könnte TalB oder strukturell ähnliche Enzyme vorhersagbar so verändert werden, dass sie Produkte mit einer gewünschten Stereokonfiguration, wie 3S, 4S bilden.

## Literaturverzeichnis

1. Wood, T., *The Pentose Phosphate Pathway*. 1985, Orlando, Florida: Academic Press, Inc.
2. Wood, T., *Physiological functions of the pentose phosphate pathway*. Cell biochemistry and function, 1986. **4**: p. 241-247.
3. Wood, T., *Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms*. Cell biochemistry and function, 1986. **4**: p. 235-240.
4. Horecker, B.L., *The pentose phosphate pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: p. 47965-47971.
5. Samland, A.K., Sprenger, G. A., *Transaldolase: from biochemistry to human disease*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2009. **41**: p. 1482-1494.
6. Sprenger, G.A., *Genetics of pentose-phosphate enzymes of Escherichia coli K-12*. Archives of microbiology, 1995. **164**: p. 324-330.
7. Fraenkel, D.G., *Glycolysis. Escherichia coli and Salmonella*, ed. F.C. Neidhardt, Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schlächter, M., Umberger, H. E. Vol. 1. 1999, Washington, DC: American Society for Microbiology.
8. Weisser, P., Krämer, R., Sahm, H., Sprenger, G. A. , *Functional expression of the glucose transporter of Zymomonas mobilis leads to restoration of glucose and fructose uptake in Escherichia coli mutants and provides evidence for its facilitator action*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**: p. 3351-3354.
9. Lim, R., Cohen, S. S., *D-Phosphoarabinoisomerase and D-Ribulokinase in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1966. **241**: p. 4304-4315.
10. Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H.W., Röthlisberger, U., Bacher, A., *Biosynthesis of Riboflavin: Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Coding for 3,4-Dihydroxy-2-Butanone 4-Phosphate Synthase of Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 1992. **174**: p. 4050-4056.
11. Wamelink, M.M.C., Struys, E. A., Jakobs, C., *The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2008. **31**: p. 703-717.
12. Banki, K., Hutter, E., Emanuela Colombo, E., Gonchoroff, N. J., Perl, A., *Glutathione Levels and Sensitivity to Apoptosis Are Regulated by Changes in Transaldolase Expression*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**: p. 32994-33001.
13. Tsolas, O., Horecker, B. L., ed. *Transaldolase*. In: *The enzymes*. 3 ed. Vol. 7. 1972, Academic press: New York. 259-280.
14. Soderberg, T., Alver, R. C., *Transaldolase of Methanocaldococcus jannaschii*. . ARCHAEA-HERON PUBLISHING, 2005. **1**: p. 255-265.
15. Sprenger, G.A., Schörken, U., Sprenger, G., Sahm, H., *Transaldolase B of Escherichia coli K-12: Cloning of ist gene, talB, and characterization of the enzyme from recombinant strains*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**: p. 5930-5936.
16. Schörken, U., *Untersuchung zu Struktur und Funktion von Transketolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus Escherichia coli. Dissertation*. 1997, Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
17. Jia, J., Huang, W., Schörken, U., Sahm, H., Sprenger, G. A., Lindqvist, Y., Schneider, G., *Crystal structure of transaldolase B from Escherichia coli suggests a circular permutation of the alpha/beta barrel within the class I aldolase family*. Structure, 1996. **4**: p. 715-724.
18. Jia, J., Schörken, U., Lindqvist, Y., Sprenger, G. A., Schneider, G., *Crystal structure of the reduced Schiff-base intermediate complex of transaldolase B from Escherichia coli: Mechanistic implications for class I aldolases*. Protein Science, 1997. **6**: p. 119-124.
19. Schörken, U., Jia, J., Sahm, H., Sprenger, G. A., Schneider, G., *Disruption of Escherichia coli transaldolase into catalytically active monomers: evidence against half-of-the-sites mechanism*. FEBS Letters, 1998. **441**: p. 247-250.



20. Miosga, T., Schaaff-Gerstenschläger, I., Franken, E., Zimmermann, F. K., *Lysine144 is essential for the catalytic activity of Saccharomyces cerevisiae transaldolase*. Yeast, 1993. **9**: p. 1241-1249.
21. Schörken, U., Thorell, S., Schürmann, Me., Jia, J., Sprenger, G. A., Schneider, G., *Identification of catalytically important residues in the active site of Escherichia coli transaldolase*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**: p. 2408-2415.
22. Higgins D., T.J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research 1994. **22**: p. 4673-4680.
23. Larkin M.A., B.G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. \*, Valentin F. \*, Wallace I.M., Wilm A., Lopez R. \*, Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G., *ClustalW and ClustalX version 2*. Bioinformatics, 2007. **23**: p. 2947-2948.
24. Thorell, S., Gergely, P., Banki, K., Perl, A., Schneider, G., *The three-dimensional structure of human transaldolase*. FEBS Letters, 2000. **475**: p. 205-208.
25. Huang, H., Rong, H., Li, X., Tong, S., Zhu, Z., Niu, L., Teng, M., *The crystal structure and identification of NQM1/YGR043C, a transaldolase from Saccharomyces cerevisiae*. Proteins, 2008. **73**: p. 1076-1081.
26. Kopp, J., Schwede, T., *The SWISS-MODEL Repository: new features and functionalities*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**, **Database issue**.
27. Kopp, J., Schwede, T., *The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**, **Database issue**.
28. Esposito, M., Venkatesh, V., Otvos, L., Weng, Z., Vajda, S., Banki, K., Perl, A., *Human Transaldolase and Cross-Reactive Viral Epitopes Identified by Autoantibodies of Multiple Sclerosis Patients*. The Journal of Immunology, 1999. **163**: p. 4027-4032.
29. Banki, K., Colombo, E., Sia, F., Halladay, D., Mattson, D. H., Tatum; A. H., Massa, P. T., Phillips, P. E., Perl, A., *Oligodendrocyte-specific Expression and Autoantigenicity of Transaldolase in Multiple Sclerosis*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**: p. 1649-1663.
30. Colombo, E., Banki, K., Tatum, A. H., Daucher, J., Ferrante, P., Murray, R. S., *Comparative Analysis of Antibody and Cell-mediated Autoimmunity to Transaldolase and Myelin Basic Protein in Patients with Multiple Sclerosis*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **99**: p. 1238-1250.
31. Banki, K., Halladay, D., Perl, A., *Cloning and expression of the human gene for transaldolase. A novel highly repetitive element constitutes an integral part of the coding sequence*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**: p. 2847-2851.
32. Niland, B., Banki, K., Biddison, W. E., Perl, A., *CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated HLA-A 0201-Restricted Cytotoxicity to Transaldolase Peptide 168–176 in Patients with Multiple Sclerosis*. The Journal of Immunology, 2005. **175**: p. 8365-8378.
33. Basta, P., Bensen, J., Tse, C., Perou, C., Sullivan, P., Olshan, A., *Genetic variation in Transaldolase 1 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Detection and Prevention, 2008. **32**: p. 200-208.
34. Verhoeven, N., Huck, J., Roos, B., Struys, E., Salomons, G., Douwes, A., van der Knaap, M., Jakobs, C., *Transaldolase Deficiency: Liver Cirrhosis Associated with a New Inborn Error in the Pentose Phosphate Pathway*. The American Journal of Human Genetics, 2001. **68**: p. 1086-1092.
35. Verhoeven, N.M., Wallot, M., Huck, J. H. J., Dirsch, O., Ballauf, A., Neudorf, U., Salomons, G. S., van der Knaap, M. S., Voit, T., Jakobs, C., *A newborn with severe liver failure, cardiomyopathy and transaldolase deficiency*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2005. **28**: p. 169-179.
36. Valayannopoulos, V., Verhoeven, N. M., Mention, K., Salomons, G. S., Sommelet, D., Gonzales, M., Touati, G., de Lonlay, P., Jakobs, C., Saudubray, J. M., *Transaldolase deficiency: A new cause of hydrops fetalis and neonatal multi-organ disease*. The Journal of pediatrics, 2006. **149**: p. 713-717.

37. Fung, C.W., Siu, S., Mak, C., Poon, G., Wong, K. Y., Cheung, P. T., Low, L., Tam, S., Wong, V., *A rare cause of hepatosplenomegaly-Transaldolase deficiency*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2007. **30 (supplementary 1)**: p. 62.
38. Wamelink, M.M., Struys, E. A., Salomons, G. S., Fowler, D., Jakobsa, C., Clayton, P. T., *Transaldolase deficiency in a two-year-old boy with cirrhosis*. Molecular Genetics and Metabolism, 2008. **94**: p. 255-258.
39. Tyłki-Szymańska, A., Stradomskab, T. J., Wamelinkc, M. M. C., Salomonsc, G. S., Tayberta, J., Pawłowskad, J., Jakobs, C., *Transaldolase deficiency in two new patients with a relative mild phenotype*. Molecular Genetics and Metabolism, 2009. **97**: p. 15-17.
40. Wamelink, M.M.C., Smith, D. E. C., Jakobs, C., Verhoeven, N. M., *Analysis of polyols in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A useful tool for recognition of inborn errors affecting polyol metabolism*. Journal of inherited metabolic disease, 2005. **28**: p. 951-963.
41. Wamelink, M.M., Smith, D. E., Jansen, E. E., Verhoeven, N. M., Struys, E. A., Jakobs, C., *Detection of transaldolase deficiency by quantification of novel seven-carbon chain carbohydrate biomarkers in urine*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2007. **30**: p. 735-742.
42. Huck, J.H.J., Struys, E. A., Verhoeven, N. M., Jakobs, C., van der Knaap, M. S., *Profiling of Pentose Phosphate Pathway Intermediates in Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry: Application to Transaldolase Deficiency* Clinical Chemistry, 2003. **49**: p. 1375-1380.
43. Huck, J.H.J., Verhoeven, N. M., van Hagen, J. M., Jakobs, C., van der Knaap, M. S., *Clinical presentations of patients with polyol abnormalities*. Neuropediatrics, 2004. **35**: p. 167-173.
44. Wamelink, M.M.C., Struys, E. A., Huck, J. H. J., Roos, B., van der Knaap, M. S., Jakobs, C., Verhoeven, N. M. , *Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC–MS/MS: application to two new inherited defects of metabolism*. Journal of Chromatography B, 2005. **823**: p. 18-25.
45. Schaaff, I., Hohmann, S., Zimmermann, F. K., *Molecular analysis of the structural gene for yeast transaldolase*. European Journal of Biochemistry, 1990. **188**: p. 597-603.
46. Ishii, N., Nakahigashi, K., Tomoya Baba, T., Martin Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Ho, P. Y., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H., Tomita, M., *Multiple High-Throughput Analyses Monitor the Response of E. coli to Perturbations*. Science, 2007. **316**: p. 593-597.
47. Samland, A.K., Sprenger, G. A., *Microbial aldolases as C-C bonding enzymes - unknown treasures and new developments*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **71**: p. 253-264.
48. Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., Stürmer, R., Zelinski, T., *Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**: p. 788-824.
49. Machajewski, T.D., Wong, C. H., *Die katalysierte asymmetrische Aldolreaktion*. Angewandte Chemie-German Edition, 2000. **112**: p. 1406-1430.
50. Sukumaran, J., Hanefeld, U., *Enantioselective C–C bond synthesis catalysed by enzymes*. Chemical Society Reviews, 2005. **34**: p. 530-542.
51. Garrabou, X., Castillo, J. A., Guérard-Hélaine, C., Parella, T., Joglar, J., Lemaire, M., Clapés, P., *Biocatalytic Asymmetric Self- and Cross-Aldol Reaction of Glycolaldehyde. A New Activity of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase*. Angewandte Chemie, 2009. **121**: p. 5629-5633.
52. Thomson, G.J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. W., Berry, A., *The dhna gene of Escherichia coli encodes a Class I fructose bisphosphate aldolase*. Biochemical Journal, 1998. **331**: p. 437-445.

53. Ozaki, A., Toone, E. J., von der Osten, C. H., Sinskey, A. J., Whitesides, G. M., *Overproduction and substrate specificity of a bacterial fuculose-1-phosphate aldolase: a new enzymic catalyst for stereocontrolled aldol condensation*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**: p. 4970-4971.
54. Sugiyama, M., Hong, Z., Greenberg, W. A., Wong, C. H., *In vivo selection for the directed evolution of l-rhamnulose aldolase from l-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD)*. Bioorganic & medicinal chemistry 2007. **15**: p. 5905-5911.
55. Hall, R., Bond, C. S., Leonard, G. A., Watt, C. I., Berry, A., Hunter, W. N., *Structure of Tagatose-1,6-bisphosphate Aldolase*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: p. 22018-22024.
56. Bednarski, M.D., Waldmann, H. J., Whitesides, G. M., *Aldolase-Catalyzed Synthesis of Complex C<sub>8</sub> and C<sub>9</sub> Monosaccharides*. Tetrahedron Letters, 1986. **27**: p. 5807-5810.
57. Chenevert, R., Dasser, M., *Chemoenzymatic Synthesis of the Microbial Elicitor (-)-Syringolide via a Fructose 1,6-Diphosphate Aldolase-Catalyzed Condensation Reaction*. journal of Organic Chemistry, 2000. **65**: p. 4529-4531.
58. Phung, A.N., Zannetti, M. T., Whited, G., Fessner, W. D., *Stereospecific Biocatalytic Synthesis of Pancreatistatin Analogues*. Angewandte Chemie, 2003. **42**: p. 4821-4824.
59. Pederson, R.L., Kim, M. J., Wong, C. H., *A combined chemical and enzymatic procedure for the synthesis of 1-Deoxynojirimycin and 1-Deoxymannojirimycin*. Tetrahedron Letters, 1988. **29**: p. 4645-4648.
60. Ziegler, T., Straub, A., Effenberger, F., *Enzym-katalysierte Synthese von 1-Desoxymannojirimycin, 1-Desoxynojirimycin und 1,4-Didesoxy-1,4-imino-D-arabinitol*. Angewandte Chemie, 1988. **100**: p. 737-738.
61. Fessner, W.D., Badia, J., Eyrisch, O., Schneider, A., Sinerius, G., *Enzymatic synthesis of rare ketose 1-phosphates*. Tetrahedron Letters, 1992. **33**: p. 5231-5234.
62. Bednarski, M.D., Simon, E. S., Bischofberger, N., Fessner, W. D., Kim, M. J., Lees, W., Saito, T., Waldmann, H., Whitesides, G. M., *Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**: p. 627-635.
63. Sánchez-Moreno, I., García-García, J. F., Bastida, A., García-Junceda, E., *Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone*. Chemical communications, 2004: p. 1634-1635.
64. Alajarin, R., Garcia-Junceda, E., Wong, C. H., *A Short Enzymatic Synthesis of L-Glucose from Dihydroxyacetone Phosphate and L-Glyceraldehyde* Journal of Organic Chemistry, 1995. **60**: p. 4294-4295.
65. Sugiyama, M., Zhangyong Hong, Z., Whalen, L. J., Greenberg, W. A., Wong, C. H., *Borate as a Phosphate Ester Mimic in Aldolase-Catalyzed Reactions: Practical Synthesis of L-Fructose and L-Iminocyclitols*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2006. **348**: p. 2555-2559.
66. Schürmann, M., Sprenger, G. A., *Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from Escherichia coli and is related to a novel group of bacterial transaldolases*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 11055-11061.
67. Castillo, J.A., Jordi Calveras, J., Josefina Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G. A., Joglar, J., Clapés, P., *Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of d-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays*. Organic Letters, 2006. **8**: p. 6067-6070.
68. Thorell, S., Schürmann, M., Sprenger, G. A., Schneider, G., *Crystal Structure of Decameric Fructose-6-Phosphate Aldolase from Escherichia coli Reveals Inter-subunit Helix Swapping as a Structural Basis for Assembly Differences in the Transaldolase Family*. Journal of Molecular Biology, 2002. **319**: p. 161-171.
69. Sugiyama, M., Hong, Z., Liang, P. H., Dean, S. M., Whalen, L. J., Greenberg, W. A., Wong, C. H., *D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**: p. 14811-14817.

70. Concia, A.L., Lozano, C., Castillo, J. A., Parella, T., Joglar, J., Clapés, P., *D-Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds*. Chemistry-A European Journal, 2009. **15**: p. 3808-3816.
71. Schürmann, M., Schürmann, Me., Sprenger, G.A., *Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from Escherichia coli as tools in enzymatic synthesis of 1-desoxysugars*. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 2002. **19-20**: p. 247-252.
72. Schürmann, M., *Biochemische Charakterisierung und Struktur - Funktionsbeziehungen bakterieller Transaldolasen und Fruktose-6-Phosphat Aldolasen*. Dissertation. 2001, Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
73. Inoue, T., *Microbial aldolases as C-C bonding enzymes: Investigation of structural-functional characteristics and application for stereoselective reactions*. Dissertation. 2006, Institut für Mikrobiologie, University of Stuttgart: Stuttgart.
74. Xavier, K.B., Kossmann, M., Santos, H., Boos, W., *Kinetic analysis by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of internal P<sub>i</sub> during the uptake of sn-glycerol-3-phosphate by the pho regulon-dependent Ugp system and the glp regulon-dependent GlpT system*. Journal of bacteriology, 1995. **177**: p. 699-704.
75. Clapés Saborit, P., Joglar Tamargo, J., Castillo Expósito, J. A., Lozano Péres, C., *Chemoenzymatic process for the preparation of iminocyclitols*, WO/2008/025826. 2008.
76. Enders, D., Voith, M., Lenzen, A., *Die Dihydroxyaceton-Einheit – ein nützlicher C3-Baustein in der Organischen Synthese*. Angewandte Chemie, 2005. **117**: p. 1130-1351.
77. Zocher, F., Trauthwein, H., Riermeier, T. H., Dingerdissen, U., *Neue Wege in der Biokatalyse*. Chemie in unserer Zeit, 2001. **35**: p. 238-249.
78. Arnold, F.H., *Directed evolution: creating biocatalysts for the future*. Chemical Engineering Science, 1996. **51**: p. 5091-5102.
79. Arnold, F.H., *Design by Directed Evolution*. Accounts of Chemical Research, 1998. **31**: p. 125-131.
80. Murakami, H., Hohsaka, T., Sisido, M., *Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs*. Nature Biotechnology, 2002. **20**: p. 76-81.
81. Funke, S.A., Eipper, A., Reetz, M. T., Otte, N., Thiel, W., Pouderoyen van, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K. E., Eggert, T., *Directed evolution of an enantioselective Bacillus subtilis lipase*. Biocatalysis and Biotransformation, 2003. **21**: p. 67-73.
82. Miyazaki, K., Arnold, F. H., *Exploring Nonnatural Evolutionary Pathways by Saturation Mutagenesis: Rapid Improvement of Protein Function*. Journal of Molecular Evolution, 1999. **49**: p. 716-720.
83. Stratagene, 'QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit' Instruction Manual. 2007.
84. Airaksinen, A., Hovi, T., *Modified base compositions at degenerate positions of a mutagenic oligonucleotide enhance randomness in site-saturation mutagenesis*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(2): p. 576-581.
85. Georgescu, R., Bandara, G., and Sun, L., ed. *Saturation mutagenesis. Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*. ed. H.P. Inc. 2003: Totowa, NJ.
86. Reetz, M.T., Carballeira, J. D., *Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes*. Nature Protocols, 2007. **2**: p. 891-903.
87. Bornscheuer, U.T., Pohl, M., *Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **5**: p. 137-143.
88. Williams, G.J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A., *Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**: p. 3143-3148.
89. DeSantis, G., Wong, K., Farwell, B., Chatman, K., Zhu, Z., Tomlinson, G., Huang, H., Zan, X., Bibbs, L., Chen, P., Kretz, K., Burk, M. J., *Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis*. JOURNAL-AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 2003. **125**: p. 11476-11477.

90. Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., Meyer, H. H., *Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones*. Biotechnology and bioengineering, 1998. **58**: p. 554-559.
91. You, L., Arnold, F. H., *Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide*. Protein Engineering, 1996. **9**: p. 77-83.
92. Cadwell, R.C., Joyce, G. F., *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. Genome Research, 1992. **2**: p. 28-33.
93. Zacco, M., Williams, D. M., Brown, D. M., Gherardi, E., *An Approach to Random Mutagenesis of DNA Using Mixtures of Triphosphate Derivatives of Nucleoside Analogues* Journal of Molecular Biology, 1996. **255**: p. 589-603.
94. Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., Reetz, M. T., *Directed evolution and creation of enantioselective biocatalysts*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **55**: p. 519-530.
95. Williams, G.J., Nelson, A. S., Berry, A., *Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004. **61**: p. 3034-3046.
96. Rowe, L.A., Geddie, M. L., Alexander, O. B., Matsumura, I., *A Comparison of Directed Evolution Approaches Using the b-Glucuronidase Model System*. Journal of Molecular Biology, 2003. **332**: p. 851-860.
97. Wong, T.S., Tee, K. L., Hauer, B., Schwaneberg, U., *Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**: p. e26.
98. Wong, T.S., Tee, K. L., Hauer, B. and Schwaneberg, U., *Sequence Saturation Mutagenesis with tunable mutation frequencies*. Analytical Biochemistry, 2005. **341**: p. 187-189.
99. Stemmer, W.P.C., *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**: p. 10747-10751.
100. Neylon, C., *Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**: p. 1448-1459.
101. Parikh, M.R., Matsumura, I., *Site-saturation Mutagenesis is more Efficient than DNA Shuffling for the Directed Evolution of  $\beta$ -Fucosidase from  $\beta$ -Galactosidase*. Journal of Molecular Biology, 2005. **23**: p. 621-628.
102. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A., Arnold, F. H., *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. Nature biotechnology, 1998. **16**: p. 258-261.
103. Williams, G.J., Woodhall, T., Nelson, A., Berry, A., *Structure-guided saturation mutagenesis of N-acetylneuraminic acid lyase for the synthesis of sialic acid mimetics*. Protein Engineering Design and Selection, 2005. **18**: p. 239-246.
104. Barbosa, J.A.R.G., Smith, B. J., DeGori, R., Ooi, H. C., Marcuccio, S. M., Campi, E. M., Jackson, W. R., Brossmer, R., Sommer, M., Lawrence, M. C., *Active site modulation in the N-acetylneuraminic acid lyase sub-family as revealed by the structure of the inhibitor-complexed Haemophilus influenzae enzyme*. Journal of Molecular Biology, 2000. **303**: p. 405-421.
105. Jaeger, K.E., Eggert, T., *Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution*. Current Opinion in Biotechnology, 2004. **15**: p. 305-331.
106. Wong, T.S., Arnold, F. H., Schwaneberg, U., *Laboratory evolution of cytochrome P450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **85**: p. 351-358.
107. Lentz, O., Li, Q.-S., Schwaneberg, U., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schmid, R.D., *Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450BM-3 from Bacillus megaterium by directed evolution: a validated assay*. Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic, 2001. **15**: p. 123-133.
108. Geddie, M.L., Matsumura, I., *Rapid evolution of  $\beta$ -glucuronidase specificity by saturation mutagenesis of an active site loop*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**: p. 26462-26468.

109. Reetz, M.T., Torre, C., Eipper, A., Lohmer, R., Hermes, M., Brunner, B., Maichele, A., Archelas, A., Furstoss, R., *Enhancing the Enantioselectivity of an Epoxide Hydrolase by Directed Evolution*. *Organic Letters*, 2004. **6**: p. 177-180.
110. Kotzia, G.A., Labrou, N. E., *Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution*. *FEBS Journal*, 2009. **276**: p. 1750-1761.
111. Hao, J., Berry, A., *A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents*. *Protein Engineering Design and Selection*, 2004. **12**: p. 689-697.
112. Fong, S., Machajewski, T. D., Mak, C. C., Wong, D. H., *Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars*. *Chemistry & Biology*, 2000. **7**: p. 873-883.
113. Wada, M., Hsua, C. C., Frankea, D., Mitchella, M., Heineb, A., Wilsonb, I., Wong, C. H., *Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003. **11**: p. 2091-2098.
114. Joerger, A.C., Mayer, S., Fersht, A. R., *Mimicking natural evolution in vitro: An N-acetylneuraminic acid lyase mutant with an increased dihydrodipicolinate synthase activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**: p. 5694-5699.
115. Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., Sterner, R., *Directed evolution of a ( $\beta\alpha$ ) 8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**: p. 9925-9930.
116. Taylor, S.V., Kast, P., Hilvert, D., *Genetische Selektion - eine Strategie zur Untersuchung und Herstellung von Enzymen*. *Angewandte Chemie*, 2001. **113**: p. 3408-3436.
117. Brakmann, S., Johnsson, K., ed. *Directed Molecular Evolution of Proteins*. 2002, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim.
118. Gates, C.M., Stemmer, W. P. C., Kaptein, R., Schatz, P. J., *Affinity Selective Isolation of Ligands from Peptide Libraries Through Display on *lac* Repressor "Headpiece Dimer"*. *Journal of Molecular Biology*, 1996. **255**: p. 373-386.
119. Reymond, J.L., Babiak, P., *Screening Systems*. *Advanced Biochem Engin/Biotechnol*, 2006. **105**: p. 31-58.
120. González-García, E., Helaine, V., Klein, G., Schuermann, M., Sprenger, G. A., Fessner, W. D., Reymond, J. L., *Fluorogenic Stereochemical Probes for Transaldolases*. *Chemistry - A European Journal*, 2003. **9**: p. 893-899.
121. Reymond, J.L., ed. *Enzyme Assays*. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim.
122. Mayer, K.M., Arnold, F. H., *A Colorimetric Assay to Quantify Dehydrogenase Activity in Crude Cell Lysates*. *Journal of Biomolecular Screening*, 2002. **7**: p. 135-140.
123. Dean, S.M., Greenberg, W. A., Wong, C. H., *Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007. **249**: p. 1308-1320.
124. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *Journal of molecular biology*, 1983. **166**: p. 557-580.
125. Bachmann, B.J., *Pedigree of some mutant strains of Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*, 1972. **36**: p. 525-557.
126. Datsenko, K.A., Wanner, B. L., *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**: p. 6640-6645.
127. Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., Mierendorf, R., *Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression*. *inNovations*, 2001. **12**.
128. Schneider, S., Sandalova, T., Schneider, G., Sprenger, G. A., Samland, A. K., *Replacement of a Phenylalanine by a Tyrosine in the Active Site Confers Fructose 6-phosphate Aldolase Activity to the Transaldolase of Escherichia coli and Human Origin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**: p. 30064-30072.
129. Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., Lanka, E., *Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector*. *Gene*, 1986. **48**: p. 119-131.

130. Künzler, M., Gerstberger, T., Stutz, F., Bischoff, F. R., Hurt, E., *Yeast Ran-Binding Protein 1 (Yrb1) Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm and Is Exported from the Nucleus via a CRM1 (XPO1)-Dependent Pathway*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **30**: p. 4295-4308.
131. Sambrook, C., Fritsch, E. F., Maniatis, T., ed. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York.
132. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., ed. *Current protocols in molecular biology*. Vol. 1-4. 2001, John Wiley & Sons: New York.
133. Mullis, K.B., Faloona, F. A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods in enzymology*, 1987. **155**: p. 335-350.
134. Cline, J., Hogrefe, H., *Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit*. *Stratagies*, 1996. **13**: p. 157-161.
135. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**: p. 248-254.
136. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**: p. 680-685.
137. Smith, D.B., Johnson, K. S., *Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase*. *Gene*, 1988. **67**: p. 31-40.
138. Parks, T.D., Howard, E. D., Wolpert, T. J., Arp, D. J., Dougherty, W. G., *Expression and Purification of a Recombinant Tobacco Etch Virus NIa Proteinase: Biochemical Analyses of the Full-Length and a Naturally Occurring Truncated Proteinase Form*. *Virology*, 1995. **210**: p. 194-201.
139. Nobelmann, B., Lengeler, J. W., *Molecular analysis of the gat genes from Escherichia coli and of their roles in galactitol transport and metabolism*. *Journal of Bacteriology*, 1996. **178**: p. 6790-6795.
140. Shakeri-Garakani, A., Brinkkötter, A., Schmid, K., Turgut, S., Lengeler, J. W., *The genes and enzymes for the catabolism of galactitol, D-tagatose, and related carbohydrates in Klebsiella oxytoca M5a1 and other enteric bacteria display convergent evolution*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004. **271**: p. 1022-8.
141. Horecker, B.L., Pontremoli, S., Ricci, C., Cheng, T., *On the nature of the transaldolase dihydroxyacetone complex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1961. **47**: p. 1949-1955.
142. Weisser, P., Krämer, R Sprenger, G. A., *Expression of the Escherichia coli pmi gene, encoding phosphomannose-isomerase in Zymomonas mobilis, leads to utilization of Mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**: p. 4155-4161.
143. Zembruski, B., Chilco, P., Liu, X. L., Liu, J., Conway, T., Scopes, R., *Cloning, sequencing, and expression of the Zymomonas mobilis fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases*. *Journal of Bacteriology*, 1992. **174**: p. 3455-3460.
144. Bisswanger, H., *Enzymkinetik*. 2. ed. 1994, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
145. Lengeler, J., *Analysis of Mutations Affecting the Dissimilation of Galactitol (Dulcitol) in Escherichia coli K 12*. *Molecular & general genetics*, 1977. **152**: p. 83-91.
146. Stratagene, *GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit*. 2003.
147. Ang, E.L., Obbard, J. P., Zhao, H., *Directed evolution of aniline dioxygenase for enhanced bioremediation of aromatic amines*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009. **81**: p. 1063-1070.
148. Lutz, S., Patrick, W. M., *Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity*. *Current opinion in biotechnology*, 2004. **15**: p. 291-297.
149. Amiss, T.J., Sherman, D. B., Nycz, C. M., Andaluz, S. A., Pitner, J. B., *Engineering and rapid selection of a low-affinity glucose/galactose-binding protein for a glucose biosensor*. *Protein Science*, 2007. **16**: p. 2350-2359.

150. Ang, A.L., Obbard, J. B., Zhao, H., *Probing the molecular determinants of aniline dioxygenase substrate specificity by saturation mutagenesis*. FEBS Journal, 2007. **274**: p. 928-939.
151. Jager, S.A.W., Shapovalova, I. V., Jekel, P. A., Alkema, W. B. L., Švedas, V. K., Janssen, D. B., *Saturation mutagenesis reveals the importance of residues  $\alpha$ R145 and  $\alpha$ F146 of penicillin acylase in the synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics*. Journal of Biotechnology, 2008. **133**: p. 18-26.
152. Fujii, K., Minagawa, H., Terada, Y., Takaha, T., Kuriki, T., Shimada, J., Kaneko, H., *Use of Random and Saturation Mutageneses To Improve the Properties of Thermus aquaticus Amylomaltase for Efficient Production of Cycloamyloses*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **71**: p. 5823-5827.
153. Demirjian, D.C., Shah, P. S., Moris-Varas, F., *Screening for Novel Enzymes*. Topics in Current Chemistry, 1999. **200**: p. 1-29.
154. Hope, B.T., Michael, G. J., Knigge, K. M., Vincent, S. R., *Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**: p. 2811-2814.
155. Chakraborty, S., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K., *Cloning and Expression of a Clostridium kluyveri Gene Responsible for Diaphorase Activity*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2008. **72**: p. 735-741.
156. Blom, N., Sygusch, J., *Product binding and role of the C-terminal region in Class I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase*. Nature Structural Biology, 1997. **4**: p. 36-39.
157. Choi, K.H., Mazurkie, A. S., Morris, A., Utheza, D., Tolán, D. R. Allen, K. N., *Structure of a Fructose-1,6-bis(phosphate) Aldolase Liganded to Its Natural Substrate in a Cleavage-Defective Mutant at 2.3 Å*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 12655-12664.
158. Briggs, G.E., Haldane, J. B. S., *A note on the kinetics of enzyme action*. Biochemical journal, 1925. **19**: p. 338-339.
159. Kuhn, E., Brand, K., *Computer Analysis of the Two-Substrate Reaction Catalyzed by Yeast and Bovine Transaldolase*. Biochemistry, 1973. **12**: p. 5217-5223.
160. Hartman, F.C., Suh, B., Welch, M. H., Barker, R., *Inactivation of Class I Fructose Diphosphate Aldolases by the Substrate Analog N-Bromoacetyethanolamine Phosphate*. Journal of Biological Chemistry, 1973. **23**: p. 8233-8239.
161. Link, D.N., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M., Yates, J. R., *Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry*. Nature Biotechnology, 1999. **17**: p. 676-682.
162. Schmidt, S., *Candidate autoantigens in multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis, 1999. **5**: p. 147-160.
163. DeSantis, G., Liua, J., Clarkb, D. P., Heinec, A., Wilsonc, I. A., Wong, C. H., *Structure-Based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of Image -2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase* Bioorganic & medicinal chemistry, 2003. **11**: p. 43-52.
164. Liu, J., Hsu, C. C., Wong, C. H., *Sequential aldol condensation catalyzed by DERA mutant Ser238Asp and a formal total synthesis of atorvastatin*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**: p. 2439-2441.
165. Jennewein, S., Schürmann, M., Wolberg, M., Hilker, I., Luiten, R., Wubbolts, M., Mink, D., *Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase*. Biotechnology Journal, 2006. **1**: p. 537-548.
166. Saha, B.C., *Effect of salt nutrients on mannitol production by Lactobacillus intermedius NRRL B-3693*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006. **33**: p. 887-890.
167. Doelle, H.W., *Kinetic Characteristics and Regulatory Mechanisms of Glucokinase and Fructokinase from Zymomonas mobilis*. European Journal of Applied Biotechnology, 1982. **14**: p. 241-246.
168. Bonsignore, A., Pontremoli, S., Grazi, E., Mangiarotti, M., *The formation and cleavage of fructose catalyzed by transaldolase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1959. **1**: p. 79-83.



169. Horecker, B.L., *Carbohydrate Metabolism*. Annual Review of Biochemistry, 1954. **24**: p. 207-274.
170. Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., Reetz, M. T., *Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts*. Appl Environ Microbiol, 2001. **55**: p. 519-530.



## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. G. A. Sprenger bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die vielen Denkanstöße und für die finanzielle Unterstützung, die mir neben der Laborarbeit auch die Teilnahmen an interessanten Tagungen ermöglichte.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei PD Dr. V. Urlacher bedanken. Mein herzlicher Dank gilt Dr. A. K. Samland für die engagierte und geduldige Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Promotionsarbeit, sowie für die Hilfe bei vielen größeren und kleineren wissenschaftlichen Problemen.

Ich danke Prof. Dr. W. D. Fessner, des Instituts für Organische Chemie und Biochemie, der Technische Universität Darmstadt, der im gemeinsamen DFG-Projekts (Deutsche Forschungsgemeinschaft unter SPP1170) Directed evolution of transaldolases for novel specificities (Gelenkte Evolution von Transaldolasen zum Erwerb neuer Spezifitäten) das Substrat D-Tagatose-6-Phosphat bereitgestellt hat.

I thank Prof. G. Schneider and T. Sandalova at Karolinska Institutet Stockholm, for the solving of the structures of the two TalB muteins and for their help with 3-dimensional structure files.

I thank Prof. Dr. P. Clapés and M. L. Gutierrez at CSIC Barcelona for the NMR spectroscopy and HPLC measurements. I would like to say thanks to Marianitah for her friendship, her big heart and smile.

Bei S.Lakner und K. Ullrich möchte ich mich für die Bereitstellung von Plasmidkonstrukten und *E. coli*-Stämmen bedanken. Bei Dr. R. Braaz möchte ich mich ganz herzlich für die Einführung in die FPLC bedanken. Dr. T. Inoue danke ich für die Hilfe bei der Einführung in die HPLC und in viele andere Methoden.

Ein großes Dankeschön geht an mein Klonierungs-Meister-Sonnenlicht Dr. K. Förster-Fromme.

Danken möchte ich auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Forschungsschwerpunkt SPP 1170 (Sp503/3-2), und dem Marie Curie EU ReIntegration Grant (MERG-CT-2004-006317) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie, besonders bei den frühen Mensa-Essens-Gehern und natürlich bei meinen Lieblingslaborkollegen Dr. C. Albermann und S. Ghanegaonkar.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben und mir gezeigt haben wie wichtig die richtige Holzsetztechnik ist. Vergessen möchte ich aber auch nicht meine Geschwister, ihre Familien und meine Freunde, die immer ein offenes Ohr und freie Telefonleitung für mich hatten.



# Lebenslauf

Sarah Schneider  
geboren am 25. Dezember 1978  
in Horb am Neckar

## Schulausbildung:

1985 - 1989      Grundschule in Glatten  
1989 - 1995      Realschule in Dornstetten: Realschulabschluss  
1995 - 1998      Berufliches Gymnasium der Luise-Büchner-Schule, Freudenstadt:  
Abitur

## Universität:

1998 - 2000      Grundstudium Biologie an der Universität Hohenheim

10/2000 – 04/2004    Hauptstudium Biologie an der Universität Hohenheim  
Hauptfach:    Mikrobiologie  
1. Nebenfach: Genetik  
2. Nebenfach: Biochemie  
3. Nebenfach: Virologie  
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie:  
Expression des Außenmembranproteins PorB von *Neisseria gonorrhoeae* in *Escherichia coli* und Untersuchungen zum mitochondrialen Import des PorB *in vivo* und *in vitro*

11/2004 – 12/2008    Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Arbeit  
bei Prof. G. A. Sprenger am Institut für Mikrobiologie der  
Universität Stuttgart

