

# **Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Sättigungsmutagenese und DNA-Shuffling**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Frau Dipl.-Nat. Karin Büttner**  
geboren am 09.08.1983 in Sebnitz

Halle (Saale) 2011

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Prof. Dr. Michael Schlömann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.11.2011

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Karin Büttner, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Personen, Unterlagen bzw. Literaturstellen - selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 19.07.2011

Karin Büttner

---

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Viele Menschen haben mich während dieser Zeit unterstützt und dazu beigetragen, dass ich mich sowohl wissenschaftlich als auch zwischenmenschlich sehr wohl gefühlt habe. Diesen Personen möchte ich im Folgenden danken.

An erste Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Pietzsch für das Ermöglichen dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, für das stetige Interesse am Voranschreiten der Arbeit, für die Diskussionsbereitschaft und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Dr. Thomas Hertel danke ich für die Unterstützung bei biochemischen Problemstellungen sowie für die wichtigen oder anregenden Hinweise und Diskussionen. Außerdem danke ich Ihm für die nette Atmosphäre im Büro.

Frau Martina Schreiber danke ich für ihre zuverlässigen Handgriffe und Zuarbeiten im Labor, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzlicher Dank geht an Uwe Hildebrandt, der im Rahmen seine Diplomarbeit das DNA-Shuffling durchgeführt hat, sowie an meinen Diplomanden Christian Kohl für das Screening ausgewählter Klonbibliotheken.

Ich bedanke mich bei der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR) für die finanzielle Unterstützung während der Promotion.

Dr. Christian Ihling (AG Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie) danke ich für die Durchführung der LC-ESI-MS-Untersuchungen und für die Hilfe bei der Versuchsauswertung. Danken möchte ich auch Dr. Christian Schmelzer und Michael Jung (AG Biopharmazie, Institut für Pharmazie) für die Durchführung der MALDI-Untersuchungen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre, sowie für die vielen schönen Unternehmungen und die sportlichen Gruppenaktivitäten. Ein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden und Freunden Kristin Riedel, Andreas Migge, Martin Wolfram, Christian Sommer, Matthias Jacob, Katja Patzsch und Anna Schildbach.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie für deren ständige Unterstützung, Verständnis und Geduld bedanken. Von ganzem Herzen bedanke ich mich auch bei meinen lieben Freunden für die Aufmunterung und Ablenkung während dieser Zeit.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>2</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Protein Design durch gerichtete Evolution .....	10
1.1.1 Random Mutagenese .....	15
1.1.2 Sättigungsmutagenese .....	16
1.1.3 DNA-Shuffling.....	18
1.2 Stabilität von Enzymen gegenüber Oxidationsmitteln und Formaldehyd.....	22
1.3 Transglutaminase.....	27
1.3.1 Mikrobielle Transglutaminase .....	28
1.3.2 Anwendungen der mikrobiellen Transglutaminase.....	32
1.4 Zielsetzung .....	34
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.1 Chemikalien.....	36
2.2 Geräte .....	37
2.3 Puffer.....	38
2.4 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze .....	39
2.5 Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien.....	40
2.6 Primer.....	41
2.7 Zelllinien und Vektoren .....	43
2.8 Polymerase-Kettenreaktion .....	44
2.8.1 PCR-Amplifikation der Pro-MTG-Sequenz.....	44
2.8.2 Kolonie-PCR.....	44
2.9 Sättigungsmutagenese .....	45
2.10 Site-directed Mutagenese.....	45
2.11 DNA-Shuffling.....	46
2.11.1 Fragmentierung der Template-Sequenzen.....	46
2.11.2 Reassemblierung der parentalen Sequenzen .....	47
2.11.3 PCR-Amplifikation der reassemblierten Pro-MTG-Sequenzen.....	47
2.12 Plasmidpräparation.....	48
2.13 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	48
2.14 Bestimmung von DNA-Konzentrationen .....	48
2.15 Agarose-Gelextraktion .....	48
2.16 Restriktionsverdau.....	48

---

2.17	Ligation.....	49
2.18	Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen.....	49
2.19	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	49
2.20	Transformation durch Elektroporation.....	49
2.20.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	49
2.20.2	Elektroporation .....	50
2.21	Zellkultivierung .....	50
2.21.1	Zellkultivierung und Expression im Schüttelkolben.....	50
2.21.2	Anzucht von Klonbibliotheken.....	50
2.22	Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität.....	52
2.22.1	Durchführung Hydroxamat-Test im Screening von Klonbibliotheken.....	53
2.22.2	Durchführung Hydroxamat-Test im MTP-Format .....	54
2.23	Screening von Klonbibliotheken.....	54
2.24	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption.....	56
2.25	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test .....	56
2.26	Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator .....	56
2.27	Aktivierung der Pro-MTG mit Proteinase K.....	56
2.28	Chromatographie.....	57
2.28.1	Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie .....	57
2.28.2	Gel-Permeations-Chromatographie .....	57
2.29	Charakterisierung ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten.....	58
2.29.1	Ermittlung des Temperaturoptimums der MTG .....	58
2.29.2	Ermittlung des Inaktivierungsverhaltens der MTG.....	58
2.30	Untersuchungen zur Stabilität der MTG gegenüber chemischen Einflüssen.....	59
2.30.1	Einfluss von Formaldehyd.....	59
2.30.2	Oxidation der MTG .....	60
2.31	Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE.....	61
2.32	Färbung/ Entfärbung von SDS-PAGE-Gelen .....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.1	Sättigungsmutagenese an sieben Positionen der MTG .....	63
3.1.1	Mutagenese und Anlage der Klonbibliotheken .....	63
3.1.2	Screening der Klonbibliotheken auf verbesserte Thermostabilität.....	64
3.1.3	Site-directed Mutagenese an Position 2.....	66
3.1.4	Charakterisierung ausgewählter thermostabiler Varianten .....	68
3.2	DNA- Shuffling.....	73
3.2.1	Auswahl der Mutanten für das DNA-Shuffling .....	73
3.2.2	MTG-Doppelmutante UHS23V-Y24N.....	73

---

3.2.3	In-vitro-Rekombination von Hot Spots.....	74
3.2.4	Screening der Klonbibliothek auf verbesserte Thermostabilität.....	76
3.2.5	Charakterisierung ausgewählter thermostabiler Varianten.....	79
3.3	Stabilitätsuntersuchungen der MTG.....	83
3.3.1	Einfluss von Formaldehyd.....	83
3.3.2	Oxidation der MTG.....	90
3.3.3	Cys64Ser-Mutante.....	98
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>99</b>
4.1	Sättigungsmutagenese.....	99
4.2	DNA-Shuffling.....	102
4.3	Stabilitätsuntersuchungen der MTG.....	110
4.3.1	Stabilität gegenüber Formaldehyd.....	110
4.3.2	Stabilität gegenüber Oxidationsmitteln.....	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>130</b>
8.1	Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz pDJ1-3.....	130
8.2	Einfluss von Formaldehyd auf die MTG - Sequenzabdeckung LC-ESI-MS.....	131
8.3	Oxidation der MTG-S2P mit Natriumhypochlorit - Sequenzabdeckung LC-ESI-MS.....	132
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>134</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>135</b>

## Abkürzungen

Amp	Ampicillin
A <sub>I</sub>	Initialaktivität
A <sub>R</sub>	Restaktivität
Bp	Basenpaare
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Bovine serum albumin
CV	Säulenvolumen (Column volumne)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ep-PCR	fehleranfällige PCR (error-prone PCR)
kDa	Kilodalton
KBE	Kolonien bildende Einheiten
kBp	Kilobasen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LC-ESI-MS	Flüssigchromatographie mit Elektrosprayionisation und Massenspektrometrie-Kopplung (Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry)
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) mit Flugzeitanalyse (TOF, time of flight)
MTG	mikrobielle Transglutaminase
MTP	Mikrotiterplatte
n. b.	nicht bestimmt
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T <sub>Opt</sub>	Temperaturoptimum
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehung pro Minute
WT	Wildtyp

Die Abkürzungen (Drei- bzw. Einbuchstabencodes) der Aminosäuren bzw. Nukleotide entsprechen der IUPAC-Nomenklatur:

## Aminosäuren

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

## Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
R	Purin (A oder G)
Y	Pyrimidin (C, T oder U)
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C, G oder T
D	A, G oder T
H	A, C oder T
V	A, C oder G
N	A, T, C oder G

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Biokatalyse erlaubt die milde und selektive Bildung von Produkten unter Verwendung von isolierten Enzymen oder ganzen Zellen. Dabei ist die exzellente Chemo-, Regio- und speziell die Stereoselektivität verglichen mit chemischen Methoden von besonderem Interesse. Biotechnische Prozesse können aufgrund von Prozessvereinfachungen, Einsparung von Rohstoffen, Vereinfachung der Produktaufarbeitung und -reinigung und damit Reduktion von Neben- und Abfallprodukten zu einer deutlichen Senkung der Produktionskosten beitragen. Die Chiralität der Biokatalysatoren und die daraus resultierende Stereoselektivität von Enzymen sind dabei besonders für die Produktion von optisch aktiven Substanzen von Bedeutung. Eine beträchtliche Anzahl von Prozessen wurde für den industriellen Maßstab entwickelt [Liese et al., 2000; Schmid et al., 2001].

Die wichtigsten Anwendungen der Biokatalyse sind in verschiedenen Bereichen der Industrie zu finden (Lebensmittel, Feinchemie, Papier, Pharmazie und Medizin). In der Lebensmittelindustrie werden Enzyme z.B. für die Umsetzung von Stärke bei der Herstellung von High Fructose Corn Syrup (HFCS), in der Herstellung von Käse sowie bei der Hydrolyse von Lactose zu Glucose und Galactose bei der Milchverarbeitung verwendet. Enzyme sind in der Textilindustrie an verschiedenen Schritten der Baumwoll-Verarbeitung wie u.a. dem Bleichen beteiligt. Weitere Beispiele für Verfahren sind die Verwendung der Penicillin-Amidase für die Synthese von halbsynthetischen Penicillinen oder der Nitrilhydrolase bei der Umwandlung von Acrylnitril zu Acrylamid [Grunwald, 2009].

Die Vorteile von Enzymen sind sehr vielfältig [Buchholz et al., 2005; Grunwald, 2009; Illanes, 2008]. Dazu gehören, dass Biokatalysatoren sehr effektive Katalysatoren für viele bekannte chemische Reaktionen sind, über eine hohe Regio- und Stereoselektivität verfügen und bei milden Reaktionsbedingungen arbeiten. Diese tragen damit zu einem geringeren Energieverbrauch bei, wobei zusätzlich die Menge an Nebenprodukten gering ist. Eine Produktion von Biokatalysatoren im großen Maßstab ist z.B. durch eine Fermentation rekombinanter Organismen möglich. Biokatalysatoren sind biologisch abbaubar und ungiftig, wenn diese richtig angewendet werden. Außerdem bieten Enzyme den Vorteil der Wiederverwendbarkeit durch beispielsweise Immobilisierung. Eine Optimierung des Biokatalysators durch das Design von Enzymen ist in gewissem Umfang möglich.

Nachteilig können sich die hohe molekulare Komplexität von Enzymen, die relativ hohen Produktionskosten und die teilweise unzureichende Stabilität auswirken [Illanes, 2008]. Außerdem kann es durch hohe Temperaturen, extreme pH-Werte, hohe Salzkonzentrationen und (polare) organische Lösungsmittel zur Inaktivierung von Biokatalysatoren kommen. Es besteht auch die Möglichkeit der Inaktivierung aufgrund von Inhibierung durch das Substrat, das Produkt, Metallionen oder anderen Inhibitoren. Weitere Nachteile sind, dass viele Enzyme Cofaktor-abhängig sind und allergische Reaktionen hervorrufen können.

In der industriellen Biokatalyse kommen meist „unnatürliche“ Substrate in den Reaktionen zum Einsatz [Bornscheuer, 2005]. Die verwendeten Reaktionsbedingungen wie z.B. das Lösungsmittel, die Konzentration des Puffers, der pH-Wert oder die Reaktionstemperatur können von den normalerweise vorherrschenden Umweltbedingungen abweichen [Bornscheuer, 2005]. Für den Einsatz in der industriellen Biokatalyse ist es deshalb oftmals notwendig ein Enzym hinsichtlich der Aktivität, Stabilität, Substratspezifität oder Enantioselektivität zu verbessern. Es wird angenommen, dass nicht weniger als 50 % der heutzutage eingesetzten Enzyme aus genetisch veränderten Organismen stammen oder durch „Protein Engineering“-Techniken erzeugt wurden [Illanes, 2008].

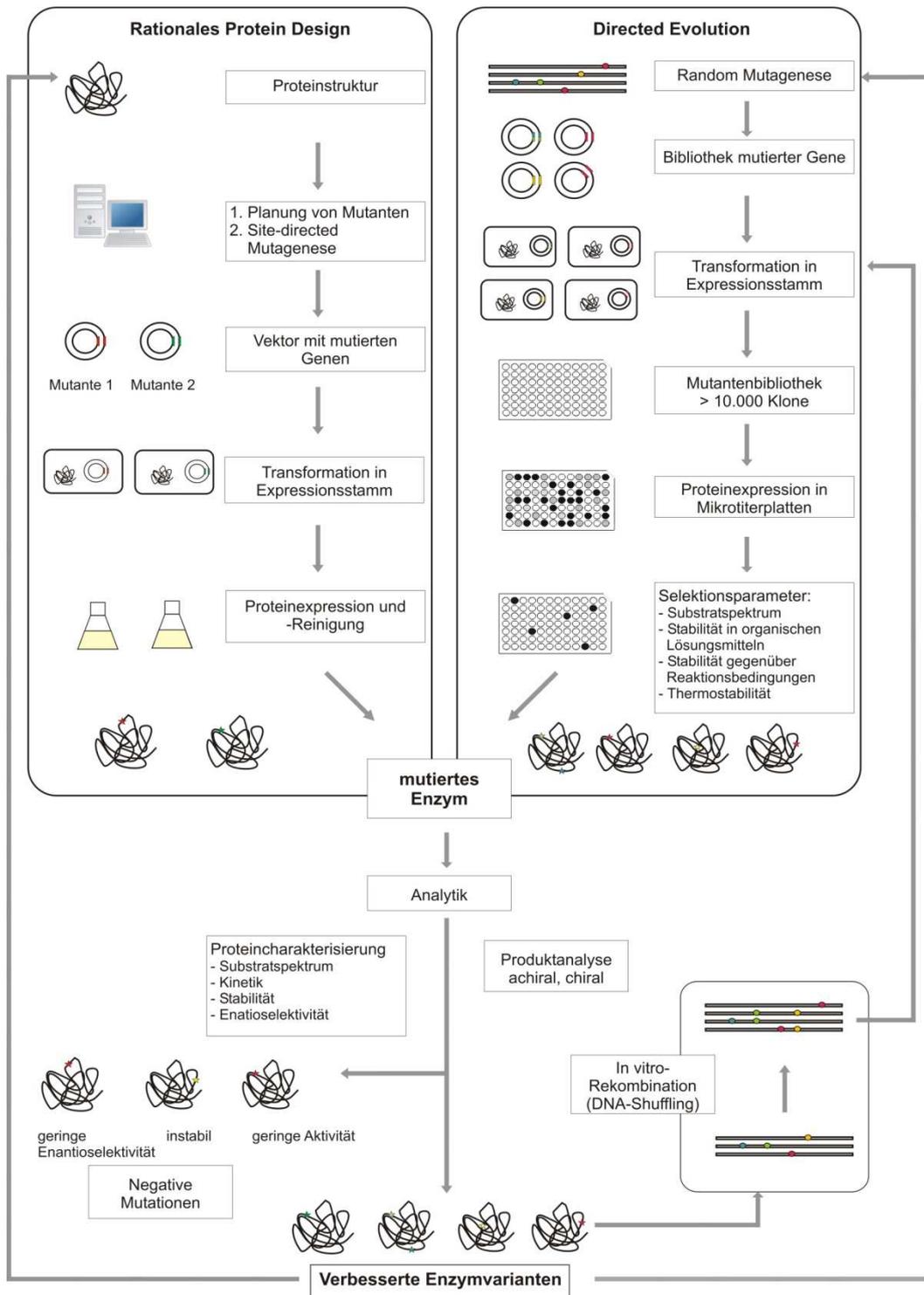
Zur Verbesserung der Stabilität von Biokatalysatoren gibt es verschiedene Ansätze. Dazu gehören die Immobilisierung, die chemische Modifikation der molekularen Proteinstruktur, der Zusatz von stabilisierenden Komponenten, die Suche nach Mikroorganismen, die unter extremen Bedingungen leben und Isolierung von Enzymen daraus, sowie die genetische Manipulation und „Protein Engineering“ [Gianfreda und Scarfi, 1991; O'Fagain, 2003].

## 1.1 Protein Design durch gerichtete Evolution

In biotechnologischen Verfahren in denen Biokatalysatoren eingesetzt werden, ist es sinnvoll diese zu verbessern. Dabei ist neben der Enantioselektivität [Jaeger et al., 2001] auch die Thermostabilität der Enzyme von großer Bedeutung [Kuchner und Arnold, 1997]. Es werden in industriellen Prozessen im Vergleich zu Umweltbedingungen oftmals höhere Temperaturen verwendet, da diese zu einer verbesserten Substratlöslichkeit, einer geringeren Viskosität des Mediums sowie zu einem geringeren Risiko mikrobiellen Bewuchses führen [Kuchner und Arnold, 1997].

Für die Optimierung von Biokatalysatoren stehen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung: Rationales Protein Design und gerichtete Evolution („Directed Evolution“) [Bornscheuer und Pohl, 2001]. Bei der Methode des rationalen Protein Designs werden gezielt Aminosäure-Austausche über eine site-directed Mutagenese eingeführt. Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode ist eine genaue Kenntnis über die Struktur-Funktions-Beziehung des Enzyms [Bornscheuer und Pohl, 2001; Yuan et al., 2005].

In Abbildung 1-1 sind beide Methoden schematisch gegenübergestellt. Bei dem rationalen Protein Design werden Mutanten basierend auf der 3-dimensionalen Proteinstruktur meist durch computergestützte Modellierungen entworfen und anschließend mittels site-directed Mutagenese erzeugt. Nach der Expression und Reinigung der Enzymvariante kann diese auf die gewünschte Eigenschaft untersucht werden.



**Abbildung 1-1: Vergleich Rationales Protein Design vs. gerichtete Evolution (nach [Bornscheuer und Pohl, 2001]).**

Bei der gerichteten Evolution hingegen wird zunächst eine Genbibliothek mit verschiedenen Mutanten angelegt. Die Bibliotheken der Enzymvarianten können anschließend in einem Mikrotiterplatten-basierenden Screening-Verfahren auf verschieden ausgewählte Parameter untersucht werden. Durch die Proteincharakterisierung und/ oder die Produktanalyse können

essentielle oder negative Mutationen identifiziert werden. Beide Ansätze können wiederholt oder kombiniert werden bis ein Biokatalysator mit der gewünschten Eigenschaft generiert wurde.

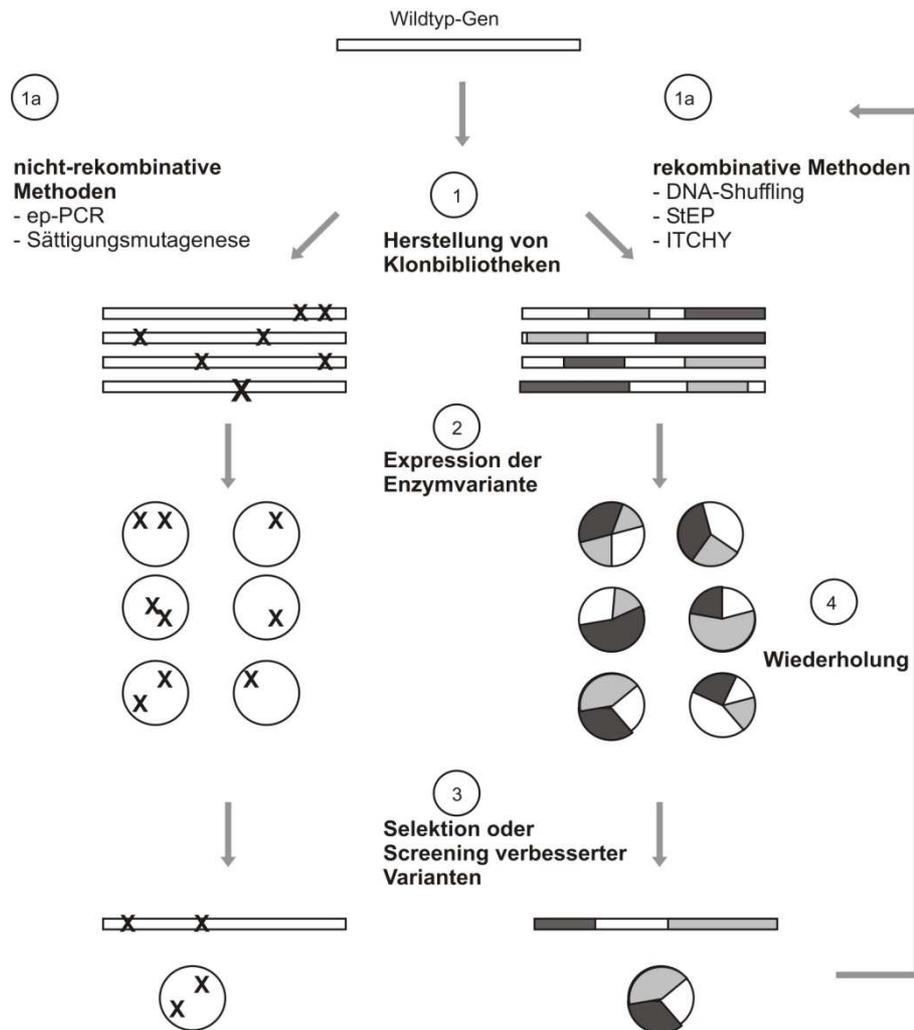
Die gerichtete Evolution ist in den letzten Jahren als Alternative zum rationalen Protein Design angewendet worden für die Verbesserung der Substratspezifität oder struktureller und funktioneller Eigenschaften. Hierzu zählen beispielsweise die Stabilität oder Effizienz des Biokatalysators unter verschiedenen Bedingungen (hohe Temperaturen, veränderter pH-Wert, Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln) [Sen et al., 2007; Tao und Cornish, 2002]. Durch Methoden der gerichteten Evolution ist es möglich, eine Anpassung von Enzymfunktionen vorzunehmen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es möglich ist verschiedene Eigenschaften zu kombinieren, die nicht in natürlich vorkommenden Enzymen gemeinsam vorhanden sind [Schmidt-Dannert und Arnold, 1999]. Die hohe Thermostabilität von Enzymen aus thermophilen Organismen könnte beispielsweise mit der Aktivität mesophiler Enzyme bei niedrigen Temperaturen verbunden werden. Die Stabilität eines mesophilen Subtilisins konnte bei hohen Temperaturen deutlich gesteigert werden, wobei bei allen Temperaturen die katalytische Aktivität erhöht war [Miyazaki et al., 2000].

Die gerichtete Evolution wird zunehmend auch für Untersuchungen der Entwicklung und Beziehung von Proteinstrukturen und -funktionen sowie für die Interpretation der evolutionären Relevanz von einzelnen biomolekularen Systemen angewendet [Yuan et al., 2005].

Von der natürlichen Evolution („Darwinistische Evolution“) unterscheidet sich die gerichtete Evolution in zwei Punkten. Zum einen unterliegt die natürliche Evolution einer Vielzahl zufälliger Selektionsdrücke, die gerichtete Evolution hingegen unterliegt definierten Selektionsbedingungen, um die gewünschten Funktionen zu generieren. Zum anderen können durch die Wahl eines geeigneten Selektionsdrucks „unnatürliche“ Funktionen innerhalb der gerichteten Evolution entstehen. Bei der natürlichen Evolution hingegen werden nur Proteinfunktionen weiterentwickelt, die zum Überleben des Organismus dienen [Eijsink et al., 2005; Schmidt-Dannert und Arnold, 1999; Sen et al., 2007].

Das Verfahren der gerichteten Evolution ist ein zyklischer Prozess aus Erzeugung genetischer Diversität und Auswahl verbesserter Varianten (Abbildung 1-2). Es werden innerhalb der gerichteten Evolution zwei verschiedene Hauptmethoden unterschieden [Jaeger et al., 2001]:

- (1) Erzeugen einer Enzym-Diversität durch nicht-rekombinative Methoden:  
Einbringen von undefinierten Punktmutationen.
- (2) Erzeugen einer Enzym-Diversität durch rekombinative Methoden:  
Kombination verschiedener DNA-Templates.



**Abbildung 1-2: Experimentelle Strategien für gerichtete Evolution bei Biokatalysatoren.** (1) Herstellen von Mutantenbibliotheken durch Mutagenesen mittels (1a) nicht-rekombinativen oder (1b) rekombinativen Methoden. (2) Die mutierten Gene werden in einem geeigneten Wirtstamm exprimiert und (3) die Enzymvarianten durch Selektion oder Screening nach verbesserten Eigenschaften untersucht. Gewünschte Enzymvarianten werden als Template für die weitere gerichtete Evolution genutzt (4) (ep-PCR error-prone PCR, StEP staggered extension process, ITCHY incremental truncation for the creation of hybrid enzymes) (nach [Jaeger et al., 2001]).

Die Hauptvoraussetzungen für eine erfolgreiche gerichtete Evolution sind 1. die funktionelle Expression der Enzyme in einem geeigneten (mikrobiellen) Wirtorganismus, 2. die Verfügbarkeit eines Screening- oder Selektionsverfahren, welches sensitiv bezüglich der gewünschten Eigenschaft ist und 3. die Identifizierung/Entwicklung einer geeigneten evolutionären Strategie [Kuchner und Arnold, 1997].

Die goldene Regel der gerichteten Evolution lautet „*You get what you screen for*“ [You und Arnold, 1996], daher sollten die Auswahl des Screening- oder Selektionssystems und deren Rahmenbedingungen auf die gewünschten Eigenschaften des Enzyms angepasst sein. In einem Screening werden alle entstanden Enzymvarianten einzeln auf die relevante

Eigenschaft hin untersucht, im Gegensatz dazu werden bei einem Selektionsverfahren inaktive Varianten systematisch ausgeschlossen und aktive akkumuliert [Aharoni et al., 2005]. Die Voraussetzung für ein Selektionssystem ist, dass das Zielprotein nicht mit dem zellulären Metabolismus interagiert und sich von dem Hintergrund der anderen Zellreaktionen entsprechend abhebt [Arnold und Volkov, 1999]. Der Vorteil von Selektionssystemen ist, dass es einen viel höheren Durchsatz im Vergleich zum Screening erlaubt. In Screening-Verfahren werden meist Methoden basierend auf photometrischen und fluoreszierenden Enzymtests eingesetzt, die relativ leicht zugänglich sind [Bornscheuer, 2005]. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Screening-Verfahren im Mikrotiterplatten-Maßstab entwickelt, die durch die ständig weiter entwickelte Automatisierungstechnik für Klonbibliotheken von  $10^4$  bis  $10^7$  Mutanten geeignet sind [Cohen et al., 2001].

Es gibt verschiedene Beispiele für eine erfolgreiche gerichtete Evolution zur Verbesserung der Thermostabilität, der pH-Stabilität, der Stabilität in Lösungsmitteln, der Enantioselektivität und der Substratspezifität [Bornscheuer, 2005; May et al., 2002]. Ein Beispiel für die Verbesserung der Thermostabilität ist das psychrophile Enzym Subtilisin S41 aus *Antarctic bacterium* TA4 [Miyazaki und Arnold, 1999; Miyazaki et al., 2000]. Durch eine Sättigungsmutagenese an durch Random Mutagenese identifizierten Hot Spots konnte eine 3-fach höhere Halbwertszeit bei 60 °C ermittelt werden [Miyazaki und Arnold, 1999]. Eine weitere Steigerung der Halbwertszeit um das 500-fache konnte durch die Rekombination von verbesserten Mutanten der ersten Generation und einer weiteren Random Mutagenese erzielt werden [Miyazaki et al., 2000].

Nach fünf Generationen aus Random Mutagenese/Rekombination und Screening konnte für Subtilisin E eine Mutante mit acht Aminosäure-Substitutionen identifiziert werden, die eine 200-fach höhere Halbwertszeit bei 60 °C besaß [Zhao und Arnold, 1999].

Reetz et al. verbesserten die Enantioselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* von nicht-enantioselektiv (2 % ee  $E = 1,1$ ) in eine Variante mit einer deutlich besseren Selektivität ( $E > 51$ ,  $\geq 95$  % ee) [Reetz et al., 2001]. Im ersten Schritt wurde das Wildtyp-Enzym durch mehrere Runden einer Random Mutagenese in der Enantioselektivität gesteigert, welche durch eine anschließende Sättigungsmutagenese noch weiter erhöht werden konnte. Die Kombination aus DNA-Shuffling, kombinatorischer multipler Kassetten-Mutagenese und Sättigungsmutagenese führte zur Rekombination von sechs verschiedenen Aminosäure-Austauschen in der besten Mutante [Reetz et al., 2001].

Liang et al. verbesserten die Aktivität einer Endoglucanase aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 bei niedrigeren Temperaturen, deren Temperaturoptimum zwischen 75 °C und 80 °C liegt [Liang et al., 2011]. Nach drei sich wiederholenden ep-PCR-Schritten

und anschließendem Screening wurden Mutanten identifiziert, die eine signifikant höhere spezifische Aktivität bei 45 °C und 50 °C hatten verglichen mit dem Wildtyp-Enzym.

Ansätze der gerichteten Evolution wurden ebenfalls zur Verbesserung der katalytischen Aktivität sowie der alkalischen Stabilität einer Xylanase A aus *Thermobifida fusca* genutzt [Wang und Xia, 2008]. Nach zwei Runden DNA-Shuffling und Screening wurde eine Mutante identifiziert, die eine deutlich höhere pH-Stabilität als das Wildtyp-Enzym aufwies.

### 1.1.1 Random Mutagenese

Die einfachste und sehr oft angewendete Methode eine Klonbibliothek zu erzeugen, ist die Random Mutagenese (Zufallsmutagenese). Dabei werden zufällig Punktmutationen in die Gensequenz des Wildtyps, durch beispielsweise eine fehleranfällige PCR (ep-PCR), eingeführt [Cadwell und Joyce, 1992]. In einer solchen ep-PCR kommen DNA-Polymerasen, wie die *Taq*-DNA-Polymerase, zum Einsatz. Diese besitzen keine „proof-reading“-Funktion und korrigieren so Fehlpaarungen nicht. Die Fehleranfälligkeit der *Taq*-DNA-Polymerase kann beispielsweise durch die Zugabe von  $MnCl_2$  sowie durch die Erhöhung der  $MgCl_2$ -Konzentration und der Menge an Pyriminbasen gesteigert werden [Cadwell und Joyce, 1994]. Es sind bereits auch für diese Anwendung besser geeignete Mutagenese-Kits kommerziell erhältlich, wie z.B. das *GeneMorph-Kit* (Stratagene) mit der Enzymmischung Mutazyme II. Durch eine Mischung verschiedener Polymerasen wird ein besser verteiltes Mutationsspektrum erzielt (A- und T-Austausche gleichverteilt gegenüber G- und C-Austausche) als bei der *Taq*-Polymerase, die bevorzugt G/C-Austausche produziert.

Für die gerichtete Evolution wird gewöhnlich eine Mutationsrate von 1 - 4 Aminosäuren pro Enzym verwendet [Moore und Arnold, 1996; Williams et al., 2004].

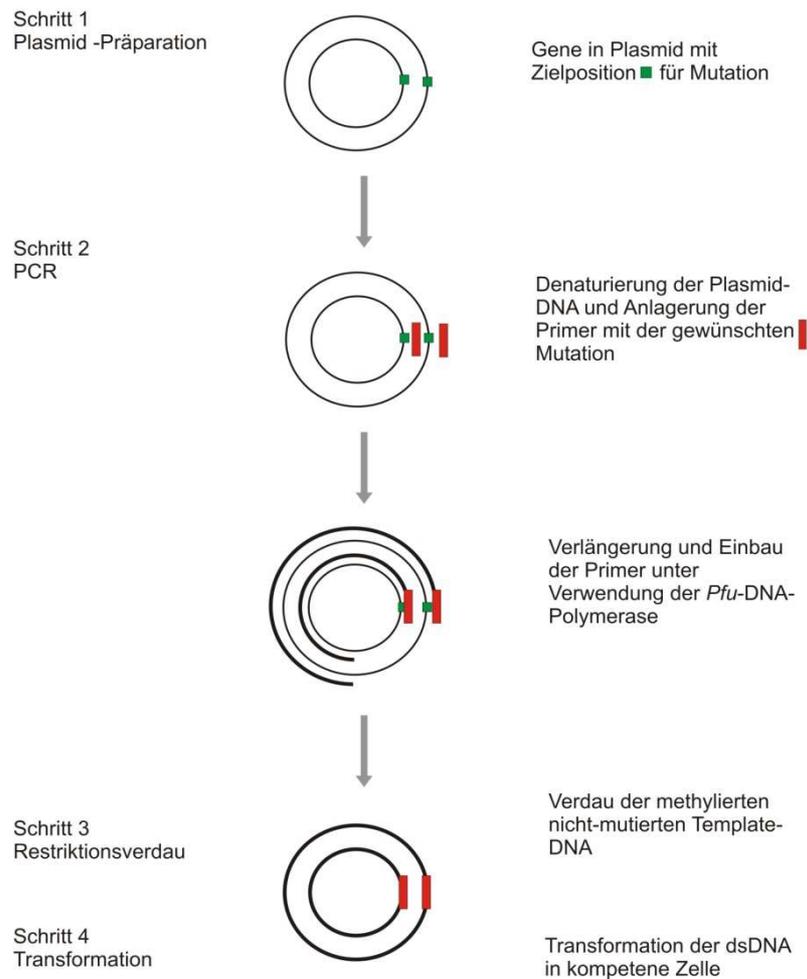
Ein Nachteil der Random Mutagenese ist, dass die möglichen Basen-Austausche mit unterschiedlicher Häufigkeit stattfinden. Es gibt eine starke Neigung zur Transition (A→G oder T→C) verglichen mit der selteneren Transversion (C→G oder A→T) [May et al., 2002; Petruska et al., 1988], was das Erzielen aller Aminosäuren-Austausche limitiert. Ein weiterer Grund ist die Redundanz des genetischen Codes. Einige Aminosäuren werden durch mehr Codons repräsentiert als andere und treten daher bei einer Mutagenese statistisch häufiger auf. Es werden nur 2 von 20 Aminosäuren (Tryptophan und Methionin) durch ein Codon kodiert, hingegen werden die Aminosäuren Leucin, Serin und Arginin durch sechs verschiedene Codons kodiert. Eine Konsequenz daraus ist, dass etwa ein Drittel aller durch ep-PCR eingeführten Basen-Austausche nicht in einem Aminosäure-Austausch resultieren [Jaeger et al., 2001]. Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder drei Basen-Substitutionen innerhalb eines Codons vorkommen sehr gering. Mit einem einzelnen Basen-Austausch können im Durchschnitt nur 5,7 Aminosäure-Substitutionen an einer bestimmten Stelle erzielt werden [Bloom et al., 2006; Miyazaki und Arnold, 1999].

### 1.1.2 Sättigungsmutagenese

In einer ersten Runde aus Random Mutagenese, Screening und Analyse der DNA-Sequenz werden Positionen identifiziert, die für die Verbesserung einer bestimmten Eigenschaft entscheidend sind. Eine an solchen Hot Spots angewendete Sättigungsmutagenese stellt sicher, dass die optimale Aminosäure an dieser Stelle eingeführt wurde. In der Random Mutagenese können, wie bereits erwähnt, nicht alle Aminosäuren eines Proteins mit der gleichen Wahrscheinlichkeit ausgetauscht werden. Um dieses Problem zu umgehen, wendet man eine site-directed Sättigungsmutagenese an. So können alle möglichen Aminosäuren an einer identifizierten Position in einem Gen generiert werden. Die Sättigungsmutagenese wurde bereits erfolgreich für die Verbesserung der Thermostabilität verschiedener Enzyme angewendet [McLachlan et al., 2008; Miyazaki und Arnold, 1999]. Während der Optimierung einer Phosphit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* wurden 12 verschiedene Positionen identifiziert. Durch die Anwendung der Sättigungsmutagenese konnten an 4 der 12 Positionen Aminosäuren ermittelt werden, die zu einer erhöhten Thermostabilität des Enzyms führten [McLachlan et al., 2008].

Verschiedene Methoden für die Sättigungsmutagenese sind bisher veröffentlicht worden [Arnold und Georgiou, 2003; Kirsch und Joly, 1998; Zheng et al., 2004]. Die einfachste und häufig verwendete Methode ist die vollständige, mutagene Amplifizierung des Plasmids mit der Gensequenz des Wildtyps. Auf diesem Prinzip beruht das von Stratagene entwickelte „QuikChange site-directed Mutagenesis Kit“ [Stratagene, 2007; Weiner et al., 1994]. Mit dieser Methode werden die Mutationen in einem einzelnen PCR-Schritt in das entsprechende Gen unter Verwendung eines komplementären Primerpaars, welches die gewünschte Mutation enthält, eingeführt [Hogrefe et al., 2002]. Die Primer werden so entworfen, dass sie die Mutation durch die Degenerierung NNK (N = G, A, T oder C; K = G oder T) darstellen. Der Umfang der zu untersuchenden Bibliothek wird minimiert, da durch dieses Primerdesign nur noch 32 mögliche Codons anstatt 64 Codons, wie bei NNN-Primer, vorhanden sind [Hogrefe et al., 2002].

Als Template für die PCR wird der gesamte Vektor mit dem entsprechenden Gen verwendet. Während der PCR lagern sich die Primer, die beide komplementär zu entgegen gerichteten Strängen des Vektors sind, nach der Denaturierung an einen Einzelstrang und werden durch die verwendete Polymerase verlängert (Abbildung 1-3). So wird der gesamte Vektor mit versetzten Einzelstrangbrüchen amplifiziert. Die methylierte parentale Template-DNA wird anschließend durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* aus dem Mutagenese-Ansatz entfernt. Nach der Transformation in einen Expressionsstamm, z.B. *E. coli* werden durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen die Einzelstrangbrüche behoben.



**Abbildung 1-3: Sättigungsmutagenese durch mutagene Plasmidamplifikation** (nach Stratagene QuikChange site-directed Mutagenesis Kit [Stratagene, 2007]).

Die Methodik der Sättigungsmutagenese wurde in verschiedenen Arbeiten weiter optimiert. Eine Weiterentwicklung der Mutagenese wurde von Kirsch und Joly veröffentlicht [Kirsch und Joly, 1998]. Bei dieser Methode werden nicht-überlappende Primer verwendet. Dadurch kann an zwei Positionen simultan mutiert werden. Für die Sättigungsmutagenese von schwer amplifizierbaren Genen entwickelten Sanchis et al. eine Zwei-Schritt-Methode [Sanchis et al., 2008]. In einem ersten PCR-Schritt werden zwei mutagene Primer oder ein mutagener und eine nicht-mutagener Primer für wenige Zyklen benutzt um einen Megaprimer zu erzeugen. Dieser Megaprimer wird anschließend in einem zweiten PCR-Schritt verwendet. Um die Bindung der Oligonukleotidprimer zu unterbinden wird die Annealing-Temperatur erhöht. In weiteren 20 Zyklen wird das gesamte mutierte Plasmid analog zu der bereits beschriebenen Methode amplifiziert.

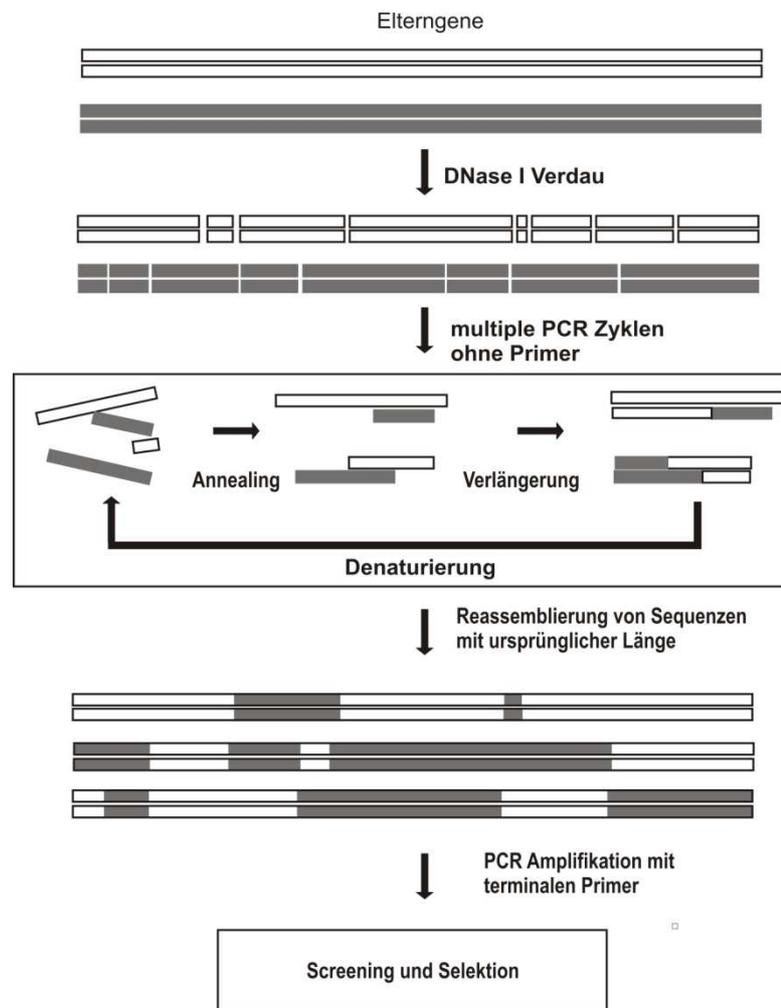
Reetz et al. untersuchten den Einfluss von zwei verschiedenen Codons (NNK und NDT) auf die Qualität der Bibliothek [Reetz et al., 2008]. Bei bisherigen Methoden war die Anzahl der zu untersuchenden Klone zu groß, um mit statistischer Sicherheit die Qualität der Bibliothek

zu gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass die NDT-Bibliothek eine höhere Qualität besaß bezogen auf das deutlich häufigere Auftreten von positiven Varianten und das Ausmaß der Verbesserung des Enzyms (Aktivität und Enantioselektivität) [Reetz et al., 2008]. Als Grund dafür wird die reduzierte Komplexität der Bibliothek sowie die bessere Auswahl der Degenerierung für das Codon an der zu mutierenden Position diskutiert. Durch die NDT-Degenerierung wurde das Codon für die Wildtyp-Aminosäure an der entsprechenden Position ausgeschlossen, was zu einem häufigeren Auftreten von positiven Varianten beitragen kann. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass durch das Codon NDT zwar alle Eigenschaften der Aminosäuren (polar/unpolar, aliphatisch/aromatisch, negativ/positiv geladen) repräsentiert, insgesamt aber nur 12 von 20 Aminosäuren codiert werden.

### 1.1.3 DNA-Shuffling

Neben der wichtigen und wachsenden Anwendung von nicht-rekombinativen Methoden für die Herstellung einer Variantenbibliothek kann durch rekombinative Methoden eine signifikante Änderung in einer Enzymfunktion erzeugt werden. In frühen Versuchen der gerichteten Evolution konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mutationen in einem Protein, die demselben Selektionsdruck unterliegen, additiv oder kooperierend sein können [Lowman und Wells, 1993; Stemmer, 1994b]. Die Kombination von verschiedenen Punktmutationen kann sich demnach auf die weitere Verbesserung einer gewünschten Proteineigenschaft auswirken.

Eine Methode zur In-vitro-Rekombination homologer Gensequenzen stellt das DNA-Shuffling dar, welches 1994 von Stemmer publiziert wurde [Stemmer, 1994a]. Bei dieser Methode werden im ersten Schritt die Elterngene mit verschiedenen Punktmutationen in viele kleine, zufällige Fragmente mittels der Restriktionsendonuklease DNase I geschnitten (Abbildung 1-4). Diese kleinen DNA-Fragmente werden anschließend in einem PCR-ähnlichen Prozess ohne zusätzliche Primer eingesetzt (Reassemblierungs-PCR). Durch wiederholende Anlagerungszyklen hybridisieren homologe Fragmente miteinander und werden an den überstehenden 3'-Enden durch eine Polymerase zum Doppelstrang verlängert. Durch mehrere Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Verlängerung werden die kurzen DNA-Fragmente zu Gensequenzen mit unterschiedlichen Längen amplifiziert. Eine Rekombination der verschiedenen Punktmutationen entsteht, wenn sich Fragmente einer Kopie eines Gens mit Fragmenten einer anderen Genkopie paaren („Template Switch“). In einem letzten Schritt wird in einer weiteren PCR durch terminale Primer die vollständige Sequenz des Gens amplifiziert [Stemmer, 1994a].



**Abbildung 1-4: In-vitro-Rekombination verschiedener parentaler Gene mittels DNA-Shuffling.** Parentale Gene werden durch DNase I zu einem Gemisch aus Fragmenten zerschnitten und in einer PCR ohne Primer reassembliert. Es kommt zur Rekombination durch die Bildung von Heteroduplexstrukturen zwischen unterschiedlichen Elternsträngen. Nach der Reassemblierung folgt eine PCR-Amplifikation mit terminalen Primer, um nach ursprünglich langen Sequenzen zu selektieren [Joern, 2003].

Seit der Entwicklung des DNA-Shufflings durch Stemmer gab es verschiedene Optimierungsansätze dieser Methodik. Die Fragmentierung der dsDNA durch die DNase I erfolgte in dem Protokoll nach Stemmer in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen, was zu versetzten Einzelstrangbrüchen führt [Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b]. Für eine optimale Rekombinationseffizienz während des DNA-Shuffling werden nur Fragmente zwischen  $> 10$  Bp und  $< 50$  Bp verwendet [Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b]. Durch den Restriktionsverdau in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen entstehen sehr viele kleine Fragmente. Diese Fragmente können nach der Denaturierung jedoch nicht als Primer in der Reassemblierungsreaktion dienen, da sie zu kurz sind [Lorimer und Pastan, 1995]. Um dies zu umgehen, führten Lorimer und Pastan den DNase I Verdau in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$ -Ionen anstelle von  $Mg^{2+}$ -Ionen durch [Lorimer und Pastan, 1995]. Bei diesem

Restriktionsverdau entstehen zufällige Doppelstrangbrücke in der DNA, welche in < 50 Bp großen Fragmenten mit glatten Enden resultieren. Diese Fragmente sind als Primer für die Reassemblierungs-PCR besser geeignet [Lorimer und Pastan, 1995]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass keine verlustreiche Extraktion der DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel durchgeführt werden muss.

Ausgehend von den publizierten Methoden von Stemmer [Stemmer, 1994a] sowie Lorimer und Pastan [Lorimer und Pastan, 1995] entwickelten Zhao und Arnold ein DNA-Shufflingverfahren für eine verbesserte Rekombination [Zhao und Arnold, 1997b]. Dabei stand vor allem eine niedrige Mutationsrate während der Prozedur des DNA-Shufflings im Vordergrund. In der Methode von Stemmer traten Mutationsraten von 0,7 % auf. Relativ hohe Mutationsraten können jedoch die Beziehung zwischen entwickeltem Phänotyp und kombinierten parentalen Mutationen verdecken. Es kann bei zu vielen unerwünschten Punktmutationen keine Aussage über den Einfluss der kombinierten Ausgangsmutationen getroffen werden. Für Untersuchungen von Struktur-Funktions-Beziehungen eines Enzyms werden deshalb niedrige Punktmutationsraten verwendet [Zhao und Arnold, 1997a]. Zhao und Arnold veröffentlichten Bedingungen für ein DNA-Shuffling mit einer Punktmutationsrate von 0,05 %. Dabei werden im Fragmentierungsschritt der parentalen Sequenzen  $Mn^{2+}$ -Ionen eingesetzt und es kommen verschiedene DNA-Polymerasen in den Amplifikationsschritten, wie *Taq*- und/oder *Pfu*-Polymerase, zum Einsatz [Zhao und Arnold, 1997a].

In der Literatur ist eine Vielzahl weiterer Rekombinationstechniken beschrieben. Zhao et al. Mitarbeiter entwickelten im Jahre 1998 eine effiziente In-vitro-Rekombinationsmethode, genannt „Staggered extension process“ (StEP) [Zhao et al., 1998]. Im Unterschied zum DNA-Shuffling werden bei der StEP-Methode homologe Gene mit der vollständigen Länge verwendet. Die Methode basiert auf einer PCR-ähnlichen Reaktion mit extrem kurzen Extensionszeiten. Sie setzt sich zusammen aus der Bindung des Templates, gefolgt von sich wiederholenden Zyklen aus Denaturierung und sehr kurzen Annealing/Verlängerungsschritten. Die Kombination der parentalen Sequenzen wird dadurch erreicht, dass die wachsenden Fragmente zwischen den Zyklen zu jeweils anderen Templat-Genen wechseln können [Zhao et al., 1998].

Die Vor- und Nachteile ausgewählter Methoden für eine In-vitro-Rekombination sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

**Tabelle 1-1: Vorteile und Nachteile ausgewählter Methoden zur In-vitro-Rekombination bei der gerichteten Evolution** [Kurtzman et al., 2001; Neylon, 2004; Sen et al., 2007].

Methoden	Vorteil	Nachteil
<b>DNA-Shuffling</b> [Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b]		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• einfache Durchführung</li> <li>• mehrere parentale Gene verwendbar</li> <li>• chimäre Sequenzen möglich</li> <li>• Kombination gewünschter Mutationen</li> <li>• Sequenzen &gt; 1 kBp</li> <li>• keine Kenntnis der Gensequenz notwendig</li> <li>• Entfernung von nicht-essentiellen Mutationen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sequenzhomologie notwendig</li> <li>• Tendenz zu Crossover in sehr homologen Regionen</li> </ul>
<b>StEP</b> (Staggered extension process) [Zhao et al., 1998]		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ähnlich zu DNA-Shuffling</li> <li>• vergleichbare Diversität zu anderen Methoden</li> <li>• einfache Methode, ohne Fragmentreinigung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sequenzhomologie notwendig</li> <li>• benötigt streng kontrollierte PCR-Bedingungen</li> <li>• schwierig bei naheliegenden Mutationen</li> </ul>
<b>RACHITT</b> (Random chimeragenesis on transient templates) [Coco, 2003]		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hohe Rate an Rekombinationen</li> <li>• Kombination von Genen mit geringer Sequenzhomologie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• komplex</li> <li>• benötigt Synthese und Fragmentierung von komplementärer Einzelstrang-DNA</li> </ul>
<b>ITCHY</b> (Incremental truncation of creation of hybrid enzymes) [Ostermeier et al., 1999]		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hybrid-Bibliothek von zwei nicht-verwandten Genen</li> <li>• keine Sequenzhomologie notwendig</li> <li>• keine strukturellen Kenntnisse notwendig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• komplex</li> <li>• auf zwei Elternstränge mit gleicher Länge begrenzt</li> <li>• geringe Diversität der Bibliothek</li> </ul>
<b>SCRATCHY</b> [Lutz et al., 2001]		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• eliminiert Rekombinationstendenzen</li> <li>• keine strukturellen Kenntnisse notwendig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• komplex</li> <li>• auf zwei Elternstränge mit gleicher Länge begrenzt</li> <li>• geringe Diversität der Bibliothek</li> </ul>

Eine Alternative zu den Sequenzhomologie-abhängigen Rekombinationsverfahren bietet beispielsweise die von Ostermeier et al. entwickelte Methode „Incremental Truncation for the creation of Hybrid Enzymes“ (ITCHY) [Ostermeier et al., 1999]. Dabei werden die parentalen Gene mittels Exonuklease III jeweils von ihrem 5'- und 3'-Ende her so verkürzt, dass Fragmente (Gen-„Enden“, Truncations) unterschiedlicher Länge entstehen. Die komplementären Enden werden anschließend miteinander rekombiniert, so dass eine Bank aus künstlichen Einfach-Crossover-Varianten entsteht.

## 1.2 Stabilität von Enzymen gegenüber Oxidationsmitteln und Formaldehyd

Die Stabilität von Enzymen wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu gehören Temperatur, pH-Wert, oxidativer Stress, Lösungsmittel, Bindung von Metallionen oder Co-Faktoren, sowie grenzflächenaktive Stoffe [Sternner und Liebl, 2001; Vieille und Zeikus, 2001].

Die Entfaltung und Deaktivierung eines Proteins kann z.B. durch das Lumry-Eyring-Model



beschrieben werden (N = native, aktive Form; U = entfaltete Form; D = irreversibel inaktive Form) [Lumry und Eyring, 1954]. Der Prozess, der für die irreversible Inaktivierung verantwortlich ist, kann in zwei Kategorien eingeteilt werden: 1. konformelle (nicht-kovalente) Änderungen und 2. kovalente Änderungen (chemische Modifikationen). Zu den kovalenten Änderungen eines Enzymes gehören Reduktion von Disulfidbrücken, Oxidation, Deaminierung von Asparagin- und Glutamin-Seitenketten, Proteolyse und andere Reaktionen [Bommarius und Riebel, 2003]. Nicht nur das teilweise denaturierte, entfaltete Protein (D) ist anfällig für diese chemischen Modifikationen, sondern auch das native Enzym (N). Diese Reaktionen sind jedoch auf die Aminosäure-Reste an der Oberfläche beschränkt [Misset, 1993]. Zu den konformellen Änderungen gehören: irreversible Umfaltungen des Enzyms oder falsche Strukturbildung wie z.B. Disulfidbrücken zwischen falschen Seitenketten, Aggregation (intermolekular) oder Präzipitation [Bommarius und Riebel, 2003].

Die Struktur von nativen Enzymen wird bestimmt durch ein „störungsanfälliges“ Gleichgewicht aus nicht-kovalenten Kräften, wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen und hydrophoben sowie Van-der-Waals Wechselwirkungen [Klibanov, 1983]. Bei höheren Temperaturen verringert sich die Wirkung dieser Kräfte und das Protein entfaltet sich, z.B. zu einer weniger geordneten Konformation. Das aktive Zentrum eines Enzyms besteht aus mehreren Aminosäure-Resten, die nur in der nativen Form nah beieinander lokalisiert sind. Die Entfaltung resultiert in der Disassemblierung des aktiven Zentrums und somit in der Inaktivierung des Enzyms.

Nicht-kovalente Veränderungen, wie Entfaltungsreaktionen, können z.B. mittels UV-Absorptions-, Fluoreszenz- und Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) bestimmt werden und stellen wichtige Methoden zur Untersuchung von Faltungsvorgängen dar [Pace und Scholtz, 1997]. Die Voraussetzungen für diese Untersuchungen sind, dass die Entfaltungsreaktion reversibel ist und vor der Messung ein Gleichgewicht erreicht hat [Pace und Scholtz, 1997].

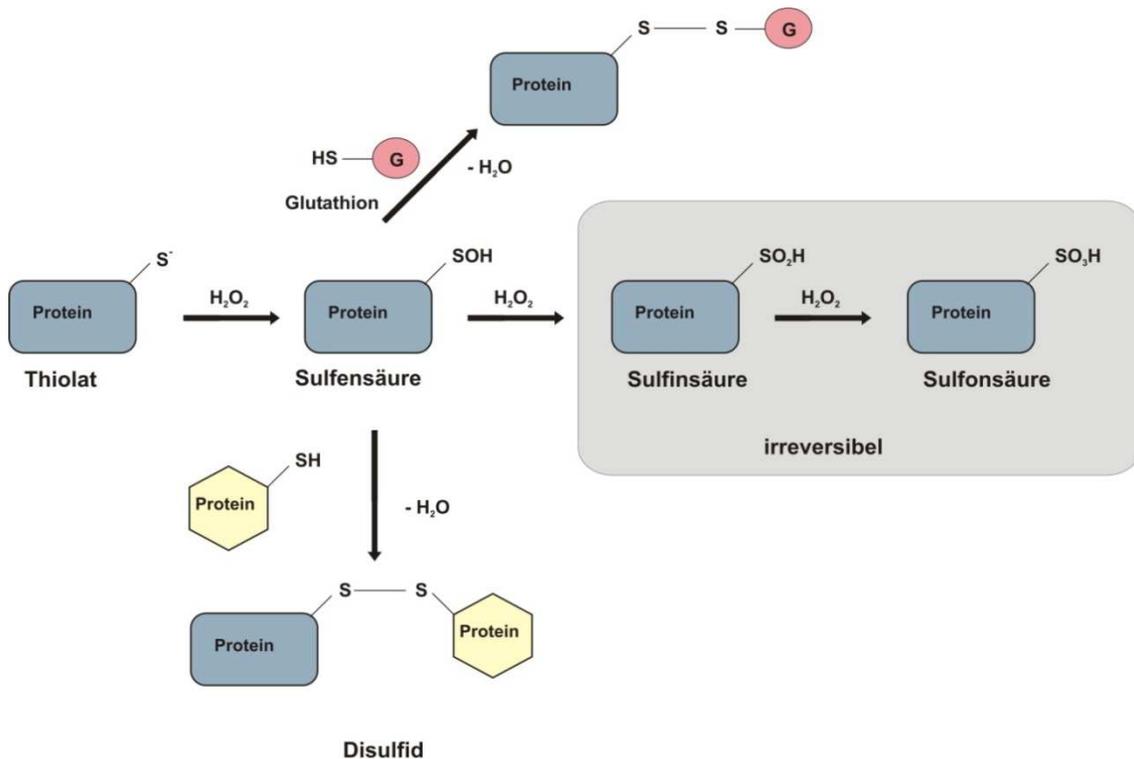
Es können auch irreversible Abbau-Reaktionen zu einer Inaktivierung des Enzyms führen. Die Deaminierung von Amid-Seitenketten von Asparagin- und Glutamin-Resten, die Succimid-Bildung an Glutamat- und Aspartat-Resten sowie die Oxidation von verschiedenen Aminosäuren gehören zu den einfachsten und häufigsten chemischen Modifikationen von Aminosäuren [Daniel et al., 1996]. Diese Mechanismen des Proteinabbaus werden bei höheren Temperaturen beschleunigt und können deshalb eine wichtige Rolle in der thermischen Inaktivierung von Enzymen spielen.

Die Oxidation von Aminosäure-Seitenketten eines Enzyms kann zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führen. Potentielle Oxidationsstellen wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben. Dazu gehören Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Methionin und Cystein [Davies, 2005; Hawkins et al., 2003]. Die Oxidationsrate wird dabei durch intrinsische und extrinsische Faktoren beeinflusst [Manning et al., 2010]. Zu den intrinsischen Faktoren gehören die Flexibilität des Peptid-Rückgrats und die Gesamtstruktur des Proteins. Zusätzlich haben extrinsische Faktoren wie der pH-Wert und das Puffersystem einen Einfluss auf die Oxidationsrate [Manning et al., 2010].

Im Vergleich zu den anderen Aminosäuren ist die Thiolgruppe des Cysteins am sensitivsten gegenüber Oxidation. Diese kann schrittweise über die Sulfensäure und Sulfinensäure bis hin zur Sulfonsäure oxidiert werden [Reddie und Carroll, 2008] (Abbildung 1-5).

Die Stabilität der Sulfensäure wird zum Teil beeinflusst durch die Anwesenheit von benachbarten Cystein-Resten und die Verfügbarkeit von Modifikationsstellen niedermolekularer Thiole (z.B. GSH) [Reddie und Carroll, 2008]. Bei dieser Reaktion kommt es zur Bildung einer Disulfidbrücke (Abbildung 1-5). Diese Disulfidprodukte können wieder zur Thiolgruppe des Cysteins reduziert werden. Sind keine benachbarten Cystein-Reste vorhanden, kann die Sulfensäure ebenfalls durch Reduktionsmittel zur Thiolgruppe reduziert werden [Claiborne et al., 1999; Poole et al., 2004].

Die Thiolgruppe des Cysteins wird nicht nur in Anwesenheit von starken Oxidationsmitteln, wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Natriumhypochlorit oxidiert, sondern auch durch molekularen Sauerstoff [Manning et al., 1989]. Dabei findet die Reaktion in relevanten Raten in Anwesenheit von katalytischen Mengen einiger Metall-Ionen, wie Kupfer, statt.



**Abbildung 1-5: Oxidative Modifikation von Cystein-Resten in Proteinen (nach [Paulsen und Carroll, 2009]).**

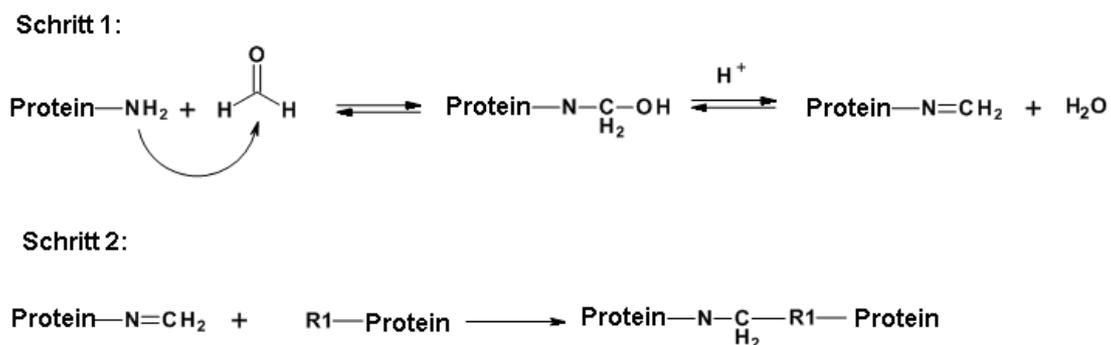
Für eine Alkoholdehydrogenase aus Hefe konnte gezeigt werden, dass es durch eine Vielzahl biologisch relevanter Oxidationsmittel wie beispielsweise Hypochlorit zur Inaktivierung des Enzyms kommt [Crow et al., 1995]. Die Alkoholdehydrogenase besitzt neun Cysteine. Zwei Reste davon sind an das katalytische Zink gekoppelt. Zur Inaktivierung des Enzyms kommt es, indem das Oxidationsmittel das Zink-Thiolat-Zentrum angreift und dieses herauslöst [Crow et al., 1995].

Ein Zusammenhang zwischen Oxidation und physikalischer Stabilität wurde für eine Fumarase aus Schwein beschrieben [Barteri et al., 2007; Barteri et al., 2004]. Im nativen Zustand verfügt die Fumarase über drei Cystein-Reste, die nicht an Disulfidbrücken beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Oxidation dieser Cysteine durch Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikale in der Inaktivierung des Enzyms resultiert. Dabei wurde außerdem eine Proteinaggregation aufgrund der Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken festgestellt [Barteri et al., 2007].

Die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit einer Urease resultierte in einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms [Krajewska, 2011]. Es konnte gezeigt werden, dass von 36 verfügbaren Thiolgruppen unter nicht-denaturierenden Bedingungen, 30 reaktive Thiolgruppen durch eine schnelle Oxidation für den Verlust von 50 % der Aktivität verantwortlich sind. Die langsamere Oxidation der restlichen sechs Thiolgruppen trägt zu den

anderen 50 % des Aktivitätsverlusts bei [Krajewska, 2011]. Die Urease konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit 21,1 mM Wasserstoffperoxid und DTT vor Inaktivierung durch Oxidation geschützt werden, dabei waren Konzentrationen über 25 mM DTT notwendig. Durch eine nachträgliche DTT-Behandlung konnte jedoch die Aktivität nicht wiederhergestellt werden, vermutlich aufgrund der Oxidation der Thiolgruppe zur Sulfin- und Sulfonsäure [Krajewska, 2011].

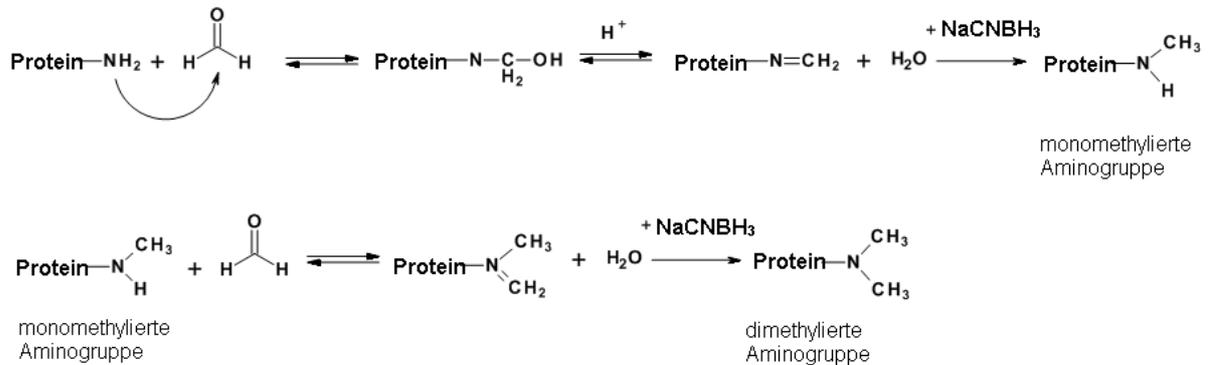
Die Stabilität von Enzymen kann während der Reaktion neben der Oxidation auch durch verschiedene Zusätze im Reaktionsansatz beeinflusst werden. Es kann zu verschiedenen Modifikationen des Enzyms kommen, die sich stabilisierend oder destabilisierend auswirken [Means und Feeney, 1998]. Formaldehyd ist ein bekanntes Quervernetzungsreagenz, welches Proteine inaktivieren, stabilisieren oder immobilisieren kann. Im ersten Schritt reagiert Formaldehyd mit der Aminogruppe des N-Terminus oder der Seitenkette von Lysin unter Bildung einer Schiffsbasis (Imin). In einem zweiten Reaktionsschritt kommt es zu einem Angriff des Imins durch weitere nukleophile Gruppen im Protein. Die Reaktion resultiert in der Bildung einer methylverbrückten Quervernetzung (intra- und intermolekularen) (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6: Zwei-Schritt-Reaktion proteinogener Aminogruppen mit Formaldehyd** ( $R_1 = \text{SH, S-Met, NH}_2, \text{OH, ..}$ ). Im ersten Schritt kommt es durch die Reaktion von Formaldehyd mit der Aminogruppe des Lysins zur Bildung einer Schiffsbasis. Diese kann in einem weiteren Schritt nukleophile Gruppen im Protein angreifen und es kommt zu einer methylverbrückten Quervernetzung.

Die Bildung der Schiffsbasis durch die Reaktion der Aminogruppe des Lysins mit Formaldehyd ist eine reversible Reaktion. Schiffsbasen können durch Reduktionsmittel, wie z.B. Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) oder Natriumcyanoborhydrid ( $\text{NaCNBH}_3$ ) zu stabilen Aminen reduziert werden [Borch et al., 1971; Jentoft und Dearborn, 1979].  $\text{NaCNBH}_3$  ist ein schwächeres Reduktionsmittel und hat den Vorteil, dass bei neutralen pH-Werten Aldehyde und Ketone nicht reduziert werden [Borch et al., 1971]. Die reduktive Methylierung mit Formaldehyd in Anwesenheit von  $\text{NaCNBH}_3$  wandelt die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin-Resten in

Proteinen in mono- und dimethylierten Derivate um (Abbildung 1-7), welche mittels verschiedener massenspektrometrischer Methoden analysiert werden können [Metz et al., 2006; Metz et al., 2004].



**Abbildung 1-7: Reduktive Methylierung von proteingebundenen Aminogruppen.** Die entstehende Schiffsche Base an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysin-Restes oder des N-Terminus wird durch Natriumcyanoborhydrid zu einer monomethylierten Aminogruppe reduziert. In Anwesenheit von ausreichend Formaldehyd erfolgt eine weitere Reaktion zum dimethylierten Produkt.

Es gibt verschiedene Beispiele für die Inaktivierung, Stabilisierung oder Immobilisierung von Enzymen durch Formaldehyd bzw. die reduktive Methylierung. Hopwood verglich die Quervernetzungsfähigkeiten von BSA und Casein mit Formaldehyd und Glutaraldehyd [Hopwood, 1969]. Unter den verwendeten Bedingungen konnten nur für Glutaraldehyd Polymere aus BSA nachgewiesen werden. Es konnte keine Quervernetzung von BSA durch Formaldehyd unter den experimentellen Bedingungen detektiert werden. Hingegen konnte nach 6-stündiger Inkubation von Lysozym mit Formaldehyd bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 9 Monomere, Dimere und Trimere sowie Spuren von höher molekularen Polymeren identifiziert werden [Galembeck et al., 1977]. Die Monomere zeigten dabei noch vollständige Aktivität. Durch die reduktive Methylierung von Lysozym mit  $\text{NaBH}_4$  waren keine Nebenreaktionen wie die Bildung von Polymeren nachweisbar, die in Abwesenheit des Reduktionsmittels aufgetreten sind [Galembeck et al., 1977].

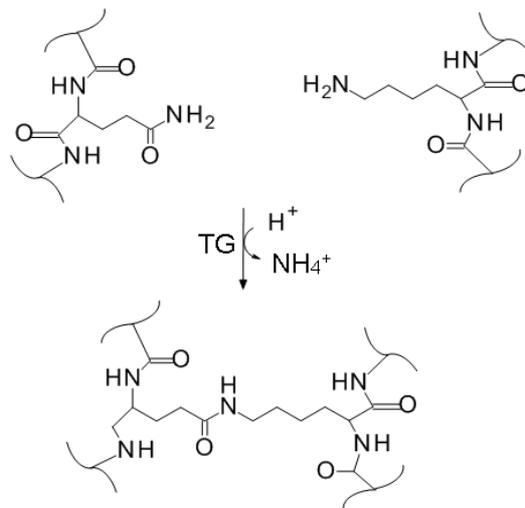
Für eine immobilisierte Penicillin-G-Acylase (PGA) konnte gezeigt werden, dass durch die reduktive Methylierung mit Natriumborhydrid die Stabilität deutlich gesteigert wird [Fernandez-Lafuente et al., 1992]. Außerdem wurde gezeigt, dass Formaldehyd die PGA unterschiedlich inaktiviert. Die freie PGA zeigte nach der Formaldehyd-Behandlung 40 % Aktivitätsverlust, hingegen besaß die immobilisierte PGA noch 90 % der Anfangsaktivität [Fernandez-Lafuente et al., 1992].

Der Einfluss der reduktiven Methylierung auf die katalytische Aktivität von Enzymen kann sehr unterschiedlich sein. So zeigte Rice et al., dass es zu keinem Aktivitätsverlust von

Trypsin durch die reduktive Methylierung kommt und die Stabilität gegen die Autoproteolyse des Enzyms erhöht werden konnte [Rice et al., 1977]. Hingegen zeigten Jentoft und Dearborn, dass es bei einer Hexokinase P aus Hefen und einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu einer relativ schnellen Inaktivierung der Enzyme kommt [Jentoft und Dearborn, 1979]. Im Gegensatz dazu konnte für andere Enzyme, wie eine alkalische Phosphatase, Trypsin,  $\beta$ -Galactosidase und Lactat-Dehydrogenase nach der reduktiven Methylierung noch 50 - 80 % der Anfangsaktivität bestimmt werden [Jentoft und Dearborn, 1979].

### 1.3 Transglutaminase

Transglutaminasen (TGs) sind Enzyme, die eine Acyl-Transfer-Reaktion zwischen der  $\gamma$ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutamins und primären Aminen katalysieren. Ist das primäre Amin die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines proteingebundenen Lysins, wird eine  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptidbindung gebildet (Abbildung 1-8).



**Abbildung 1-8: Transglutaminasen katalysieren die Verknüpfungsreaktion der Seitenketten von proteingebundenem Glutamin und Lysin.** Es kommt zur Bildung einer  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptidbindung zwischen einer  $\gamma$ -Carboxyamid-Gruppe eines Glutamin-Rests und einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysin-Rests.

Transglutaminasen sind weit verbreitet und kommen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten vor. Die bekanntesten tierischen Transglutaminasen sind der Faktor XIIIa und verschiedene Tissue TGs [Chung, 1972; Greenberg et al., 1991]. Der Faktor XIII wird als inaktives Zymogen synthetisiert und durch die Serinprotease Thrombin zu Faktor XIIIa aktiviert, welcher eine wichtige Rolle in der Blutgerinnungskaskade spielt. Eukaryotische TGs

sind in der Regel Calcium-abhängig, wie beispielsweise die TG aus der Meerschweinchenleber [Folk und Cole, 1966a]. Einige der eukaryotischen TGs sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut [Griffin et al., 2002]. Die post-translationale Modifikation von Proteinen durch Polyamine soll in Pflanzen durch Transglutaminasen katalysiert werden [Serafini-Fracassini und Del Duca, 2008; Serafini-Fracassini et al., 1995].

Die humanen Transglutaminasen werden mit verschiedenen Krankheiten, wie Morbus Alzheimer und Chorea Huntington, in Verbindung gebracht. Bei diesen neurodegenerativen Krankheiten sollen TGs an der Bildung von zytotoxischen Proteinaggregaten beteiligt sein. Auch bei Autoimmunkrankheiten wie Zölliakie soll die TG eine Rolle bei der Entstehung von Autoantikörpern spielen [Kim et al., 2002].

Die erste mikrobielle Transglutaminase (MTG) wurde 1989 nach einem Enzymscreening in *Streptoverticillium* S-8112 entdeckt (nach heutiger Nomenklatur: *Streptomyces mobaraensis*) [Ando et al., 1989]. Die Funktion prokaryotischer Transglutaminasen ist weitgehend unbekannt. Die prokaryotische Transglutaminase soll eine Rolle in der Sporulation bei *Bacillus subtilis* spielen [Kobayashi et al., 1996]. Diese Hypothese wird gestützt durch den Fund eines Proteins in Sporen von *Bacillus subtilis*, das durch eine Transglutaminase quervernetzt wird [Ragkousi und Setlow, 2004].

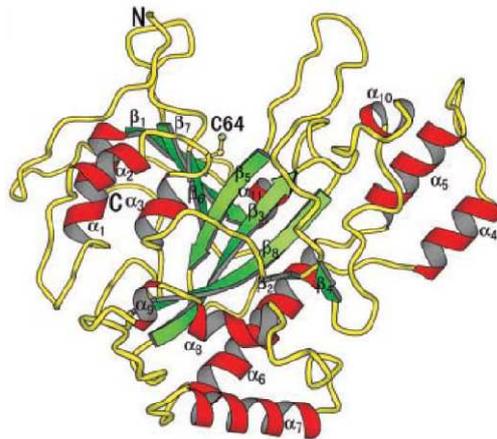
### 1.3.1 Mikrobielle Transglutaminase

Die reife MTG aus *Streptomyces mobaraensis* besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa. Das Enzym hat einen isoelektrischen Punkt von 8,9 und ist im Gegensatz zu den eukaryotischen TGs Calcium-unabhängig [Ando et al., 1989]. Im Wildtypstamm wird die MTG als Prä-Pro-Enzym exprimiert und in das umgebende Medium sekretiert. Die N-terminale Prä-Sequenz, die aus 31 überwiegend hydrophoben Aminosäuren besteht, dient dem Transport des Enzyms zum Sekretionsapparat in der Cytoplasma-Membran. Durch eine Signalpeptidase wird die Prä-Sequenz abgespalten und das verbleibende Pro-Enzym wird aus der Zelle geschleust. Die Pro-Sequenz der MTG dient der Inaktivierung des Enzyms sowie zur Stabilisierung der Pro-Form. Pasternack et al. konnten zeigen, dass die Pro-MTG gegenüber dem aktiven Enzym eine erhöhte Thermostabilität besitzt [Pasternack et al., 1998].

In *S. mobaraensis* werden zwei Proteasen sekretiert, die nacheinander die Pro-MTG aktivieren. Eine Metalloprotease (TAMEP) schneidet die Pro-Sequenz bis auf vier Aminosäuren ab [Zotzel et al., 2003a], welche in einem zweiten Schritt durch die Tripeptidyl-Amino-peptidase (SM-TAP) entfernt werden [Zotzel et al., 2003b]. Die MTG zeigt bereits nach dem ersten Aktivierungsschritt die vollständige Aktivität [Zotzel et al., 2003a].

Kashiwagi et al. veröffentlichten 2002 die dreidimensionale Struktur der mikrobiellen Transglutaminase [Kashiwagi et al., 2002]. Das Enzym besteht aus einer kompakten,

scheibenartigen Struktur. Cys<sup>64</sup>, der für die katalytische Aktivität essentielle Aminosäure-Rest, befindet sich am Boden der tiefen Substrattasche (Abbildung 1-9).



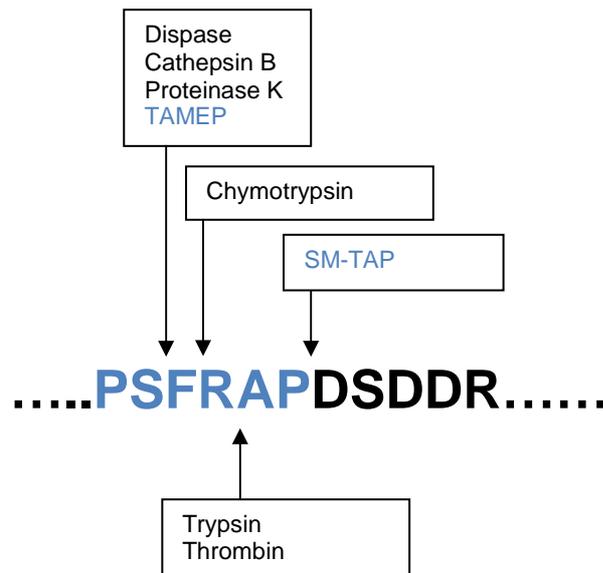
**Abbildung 1-9: Dreidimensionale Struktur der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis*.** Die MTG besitzt eine scheibenartige Form mit einer zentralen  $\beta$ -Faltblattstruktur, die an drei Seiten von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Im Zentrum der Substrattasche befindet sich das für die katalytische Aktivität verantwortliche Cys<sup>64</sup> [Kashiwagi et al., 2002].

Die Struktur der MTG besteht aus 11  $\alpha$ -Helices und 8  $\beta$ -Faltblättern. Das zentrale  $\beta$ -Faltblatt bildet eine siebensträngige anti-parallele Struktur, mit starken Verdrehungen zwischen  $\beta_5$  und  $\beta_6$ . Die Hauptverbindung zwischen diesen Faltblättern bildet die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Trp<sup>258</sup> und Thr<sup>273</sup>. In der Substrattasche befinden sich viele saure Aminosäuren, unter anderem Asp<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Asp<sup>4</sup>, Glu<sup>249</sup>, Asp<sup>255</sup> und Glu<sup>300</sup>. Auf der Oberfläche um die Tasche herum liegen viele aromatische Reste, wie Trp<sup>59</sup>, Tyr<sup>62</sup>, Trp<sup>69</sup>, Tyr<sup>75</sup>, Tyr<sup>278</sup>, Tyr<sup>291</sup>, Tyr<sup>302</sup>. Der N-terminale Loop (Asp<sup>1</sup> bis Ala<sup>10</sup>) und der Loop zwischen den Faltblättern  $\beta_6$  und  $\beta_7$  bilden die linke Seite der Substrattasche.

Die MTG ist unter dem Handelsnamen Activa™ (Firma Ajinomoto) kommerziell erhältlich. Das Enzym wird dabei als extrazelluläres Protein durch Fermentation von *S. mobaraensis* produziert. Ein Nachteil der kommerziell erhältlichen Enzympräparation ist, dass co-sekretierte Proteasen enthalten sind. Diese können die Substratproteine, die quervernetzt wurden, wieder hydrolysieren. Die ersten Versuche einer löslichen Expression der MTG in *E. coli* führten zur Bildung von unlöslichen Inclusion Bodies [Kawai et al., 1997; Yokoyama et al., 2000]. Durch die aufwendige Rückfaltung konnten nur 20 % der Aktivität erzielt werden. 2007 konnte die Pro-MTG erstmals löslich in *E. coli* exprimiert werden [Marx et al., 2007]. Durch eine Temperaturabsenkung zum Induktionszeitpunkt konnten über 90 % des Enzyms in löslicher Form exprimiert werden. Neben der erfolgreichen Expression der MTG in *E. coli* gibt es ein Expressionssystem basierend auf *Corynebacterium glutamicum* [Kikuchi et al.,

2003]. In diesem System wird die Pro-MTG in das Medium sekretiert und durch eine co-sekretierte Protease aktiviert.

Für eine industrielle Anwendung der MTG stellt die Aktivierung des Pro-Enzyms einen kritischen Schritt dar. Es wurden bereits verschiedene potentielle Proteasen untersucht, da die aus *S. mobaraensis* stammende Protease TAMEP nicht kommerziell erhältlich ist [Marx et al., 2008a].

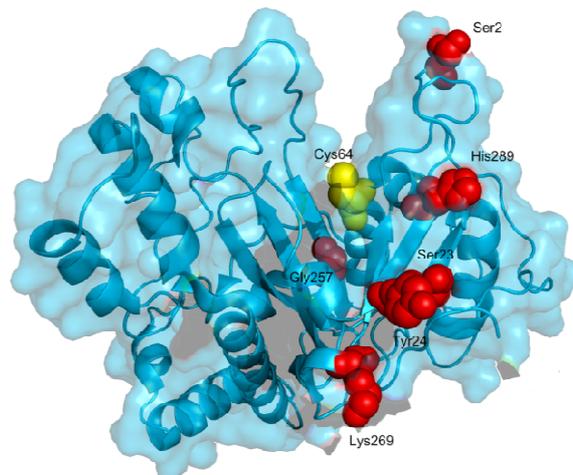


**Abbildung 1-10: Spaltstellen verschiedener Proteasen innerhalb der Pro-MTG-Sequenz.** Das Ende der Pro-Sequenz ist blau, der Anfang der MTG-Sequenz in schwarz dargestellt. Angegeben sind die Spaltstellen der *Streptomyces*-eigenen Proteasen TAMEP und SM-TAP, sowie die Spaltstellen kommerziell erhältlicher Proteasen [Marx et al., 2008a; Sommer et al., 2011a].

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteasen für eine Aktivierung der MTG geeignet sind (Abbildung 1-10). Es stellte sich jedoch dabei raus, dass einige der Proteasen die Pro-MTG aktivieren aber auch weiter abbauen (Trypsin und Chymotrypsin). Trypsin ist nicht spezifisch genug für die Abspaltung der Pro-Sequenz. Dieses Problem konnte durch die Immobilisierung der Pro-MTG an eine Ni-NTA-Säule und eine „On-Column“-Aktivierung durch Trypsin umgangen werden [Yang et al., 2009]. Weitere für die Aktivierung der Pro-MTG geeignete Proteasen sind Cathepsin B, Thrombin, Proteinase K und Dispase I [Marx et al., 2008a]. Aufgrund ihrer geringen Aktivität ist der Einsatz von Cathepsin B und Thrombin im größeren Maßstab jedoch nicht wirtschaftlich. Sommer et al. zeigten, dass durch den proteolytischen Verdau mit Dispase I neben der Pro-Sequenz auch ein Teil des C-terminalen His-Tags abgespalten wird [Sommer et al., 2011a]. Dadurch ist eine Reinigung der aktivierten MTG über eine Affinitätschromatographie nicht mehr möglich. Für eine Aktivierung der Pro-MTG beispielsweise in einem Screening in Mikrotiterplattenformat, kann die Dispase I eingesetzt werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass für die

Reinigung größerer Mengen an Pro-MTG die Proteinase K für die Aktivierung geeignet ist. Dabei ist für die Analyse mittels SDS-PAGE die Inhibierung der Proteinase K zwingend erforderlich [Sommer et al., 2011a].

Die lösliche Expression und die Identifizierung einer geeigneten Protease zur Aktivierung der Pro-MTG waren die Voraussetzung für eine Optimierung des Enzyms mittels Random Mutagenese. In einer fehleranfälligen PCR wurden zufällig Punktmutationen in das Gen der MTG aus *S. mobaraensis* eingebracht [Marx et al., 2008b]. In einem Mikrotiterplatten-basierenden Hochdurchsatz-Screeningverfahren wurde nach thermostabilen und hitzeempfindlichen Varianten gesucht. Unter 5500 Klonen wurden sechs thermostabile Mutanten mit einem Aminosäure-Austausch und eine Mutante mit zwei Aminosäure-Substitutionen identifiziert (Abbildung 1-11). Diese Enzymvarianten wurden bezüglich ihrer Thermostabilität und spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur charakterisiert. Die beste thermostabile Variante besitzt eine einzige Mutation (S2P) und weist eine um 2,7-fach erhöhte Halbwertszeit bei 60 °C auf. Außerdem zeigte die Mutante bei allen Temperaturen eine doppelt so hohe spezifische Aktivität wie das rekombinante Wildtyp-Enzym [Marx et al., 2008b].



**Abbildung 1-11: Kristallstruktur der MTG aus *Streptomyces mobaraensis* (PDB 1iu4) mit identifizierten Hot Spots für eine Erhöhung der Thermostabilität [Marx et al., 2008b].** Aminosäuren, die in den veränderten Varianten ausgetauscht wurden, sind raumfüllend dargestellt (rot). Ebenfalls raumfüllend ist das Cys<sup>64</sup> im aktiven Zentrum dargestellt (gelb).

Yokoyama versuchte unter Verwendung von zwei verschiedenen Enzym-Engineering-Ansätzen die Aktivität der MTG zu verbessern [Yokoyama et al., 2010]. Durch die rationale Mutagenese-Methode WASH-ROM (water-accessible surface hot-space region-oriented mutagenesis) konnten 32 Mutanten identifiziert werden, die eine höhere spezifische Aktivität als das Wildtyp-Enzym besaßen. Mittels einer Random Mutagenese und einem Screening-Verfahren mit einem Corynebakterium-Expressionssystem konnten weitere zehn MTG-

Varianten identifiziert werden, die eine höhere spezifische Aktivität aufwiesen [Yokoyama et al., 2010]. Es konnte eine Mutante mit einer 1,7-fach höheren spezifischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym identifiziert werden. Diese Mutante besaß neben der Ser199Ala-Substitution zusätzlich ein N-terminales Tetrapeptid (FRAP) [Yokoyama et al., 2010].

### 1.3.2 Anwendungen der mikrobiellen Transglutaminase

Die durch TG-vermittelte Quervernetzung von Proteinen hat einen großen Einfluss auf deren physikalische und chemische Eigenschaften. Daher wird dieser Biokatalysator in unterschiedlichen industriellen Bereichen angewendet.

In der Lebensmittelindustrie wird die MTG in verschiedenen Bereichen eingesetzt [Mariniello und Porta, 2005; Yokoyama et al., 2004]. Durch die Quervernetzung von Proteinen in verschiedenen Lebensmitteln können Eigenschaften wie die Gelierung, Löslichkeit und Emulgierfähigkeit der Produkte verbessert werden [Motoki et al., 1984; Nio et al., 1986]. Seit längerer Zeit wird die MTG in der Restrukturierung von Fleisch eingesetzt [Yokoyama et al., 2004]. Die Quervernetzung der Proteine in Wurst und Fleisch führt zu einer Verbesserung der physikalischen Eigenschaften wie Elastizität und Festigkeit. Dadurch kann die Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen und Einfrieren erhöht werden [Kuraishi et al., 2001]. Bei Milchprodukten wie Jogurt kann durch die Quervernetzung von Casein die Festigkeit und die Viskosität erhöht sowie die Trennung von flüssiger und fester Phase verringert werden [Lorenzen, 2000].

Die Anwendung der TG in kosmetischen Produkten beruht auf der Eigenschaft primäre Amine an Keratinocyten-Proteine zu binden. Auf diese Weise kann man eine Reihe von Verbindungen einbringen, beispielsweise Sonnenschutzmittel, Haut- oder Haarpflegemittel, entzündungshemmende Stoffe, Farbstoffe, Parfüm oder Insektenabwehrmittel. Mikropartikel mit Gruppen, die als TG-Substrat dienen, könnten ebenfalls auf die Hautoberfläche aufgebracht und verknüpft werden [Mariniello und Porta, 2005].

Die Immobilisierung von Enzymen durch MTG konnte bereits erfolgreich sowohl für ein Ein-Enzym-Senor-System (Glucose-Oxidase und Lactat-Oxidase) als auch für komplexere Systeme angewendet werden [Josten et al., 1998]. Der Vorteil der MTG-basierenden Quervernetzung der Enzyme liegt in den milden Reaktionsbedingungen, die sich für die Immobilisierung von labilen Enzymen gut eignen. Außerdem wurde die MTG für die Immobilisierung von Enzymen auf verschiedenen Trägermaterialien eingesetzt. Es wurden beispielsweise Trypsin und  $\alpha$ -Amylase auf Ionenaustauschern [Kamata et al., 1992] und  $\beta$ -Glucosidase auf einer Silica-Gel-Matrix [Synowiecki und Wolosowska, 2006] immobilisiert.

Des Weiteren wurde die MTG für eine ortsspezifische Modifikation zur Verbesserung der Enzymstabilität verwendet [Villalonga et al., 2003]. Durch die kovalente Verknüpfung von

Cyclodextrin-Derivaten an Trypsin konnte die Beständigkeit des Enzyms gegenüber Autoproteolyse bei basischen pH-Werten sowie die Thermostabilität erhöht werden.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten liegen in der Medizin. Hier wird durch Bildung von Polyethylenglykol-Pharmaka-Konjugaten mittels MTG die Stabilität von therapeutischen Proteinen gegenüber Proteasen erhöht [Fontana et al., 2008]. Ein Glutamin-Rest des nativen humanen Interleukin 2 war für eine PEGylierung mittels MTG zugänglich [Sato, 2002]. An einem therapeutisch relevanten Protein (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) konnte gezeigt werden, dass von 17 möglichen PEGylierungsstellen eine ortsspezifische Modifikation mittels MTG möglich ist [Maullu et al., 2009].

Neuere Technologien beschäftigen sich mit der Anwendung der MTG im biomedizinischen Bereich. Die MTG ist in der Lage durch die Quervernetzung von Collagen oder Gelatine Scaffolds zu bilden [Chau et al., 2005; Yung et al., 2007]. Scaffolds spielen eine wichtige Rolle im Tissue Engineering, da sie eine Struktur oder Matrix bilden, die die Ausbildung eines dreidimensionalen Gewebes ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass Scaffolds aus MTG-behandeltem Collagen eine größere Resistenz gegenüber zellulärem Protease-Abbau im Vergleich zu unbehandeltem Collagen besitzen [Chau et al., 2005].

Ein weiterer möglicher Einsatz der mikrobiellen Transglutaminase ist die Herstellung bioabbaubarer Polymere, wie beispielsweise Filme und Folien aus Proteinen wie Casein oder Zein [Patzsch et al., 2010]. Die enzymatische Quervernetzung mittels MTG konnte bereits für verschiedene Proteine gezeigt werden, u.a. für Caseinat [Bruno et al., 2008; Chambi und Grosso, 2006; Oh et al., 2004], Gelatine [Chambi und Grosso, 2006; Taylor et al., 2002], isoliertes Sojaprotein [Yildirim und Hettiarachchy, 1998] und Erbsenprotein [Marco et al., 2007]. Durch die MTG können die Eigenschaften der Polymere verändert werden, zum Beispiel lässt sich die Wasserlöslichkeit verringern oder die Elongation erhöhen [Chambi und Grosso, 2006; Oh et al., 2004].

## 1.4 Zielsetzung

Die mikrobielle Transglutaminase wird in vielen Anwendungen als Biokatalysator eingesetzt. Die proteinverknüpfende Aktivität kann dabei in vielen Prozessen für eine Verbesserung der Produkteigenschaften genutzt werden. Für manche Anwendungen wäre es jedoch vorteilhaft, die Verknüpfungsreaktion bei höheren Temperaturen durchführen zu können. Dies wäre beispielsweise ein Vorteil bei der Herstellung von Biopolymeren mittels Extrusion. Eine generelle Steigerung der spezifischen Aktivität ist in der Regel immer von Vorteil, da sich so mit der gleichen Enzymmenge die Reaktion in kürzerer Zeit durchführen lässt bzw. die einzusetzende Enzymmenge reduziert werden kann.

Kürzlich wurde eine MTG aus *Streptomyces mobaraensis* kloniert und erstmals in löslicher Form in *E. coli* exprimiert [Marx et al., 2007]. Dies war die Voraussetzung um das Enzym mittels Mutagenese zu optimieren. Es wurde eine Bibliothek veränderter MTG-Gene mittels Random Mutagenese erzeugt. In einem Screeningverfahren wurde unter 5500 Varianten nach erhöhter Thermostabilität gesucht. Es wurden sechs thermostabile Varianten mit einer Aminosäure-Substitution und eine Varianten mit einer zwei-fach Substitution identifiziert. Diese Enzymvarianten wurden bezüglich ihrer Thermostabilität und spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur charakterisiert. Die beste thermostabile Variante besitzt eine 2,7-fach erhöhte Halbwertszeit bei 60 °C und hat außerdem bei allen Temperaturen eine doppelt so hohe spezifische Aktivität verglichen mit dem rekombinanten Wildtyp-Enzym.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Optimierung der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* bezüglich der Thermostabilität. Es sollten zunächst an den sieben durch Random Mutagenese identifizierten Hot Spots alle 20 proteinogenen Aminosäuren mittels Sättigungsmutagenese eingeführt und auf eine erhöhte Thermostabilität der MTG untersucht werden. Identifizierte MTG-Varianten, die eine verbesserte Thermostabilität als das Wildtyp-Enzym und die Mutanten aus der Random Mutagenese besitzen, sollten detaillierter charakterisiert werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die MTG-Varianten mit der höchsten Thermostabilität für eine weitere Optimierung des Enzyms mittels DNA-Shuffling kombiniert werden. Es sollten die Bedingungen für die In-vitro-Rekombination so gewählt werden, dass die Punktmutationsrate möglichst niedrig ist. Eine ausreichend große Klonbibliothek sollte angelegt werden, um alle möglichen Rekombinationen zu erhalten. In einem Mikrotiterplatten-basierenden Screening sollten alle Varianten hinsichtlich erhöhter Thermostabilität untersucht werden.

MTG-Varianten mit einer deutlichen Steigerung der Thermostabilität und nur die gewünschten Aminosäure-Austausche aufweisend sollten hinsichtlich der Halbwertszeit bei

50 °C und 60 °C sowie der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur untersucht werden.

Für einen industriellen Einsatz der MTG als Biokatalysator sind Kenntnisse über die Stabilität des Enzyms gegenüber Oxidation oder verschiedener Chemikalien im Reaktionsansatz notwendig. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Eignung von Proteinen als Bindemittel für Sand (Formstoffe für die Gießerei) und als Bindemittel für Holz (Spanplatten) unter Verwendung der Quervernetzungsreaktion der MTG [Jacob, 2011]. Für solche Anwendungen ist eine genaue Kenntnis über die Stabilität des Enzyms notwendig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Stabilität des rekombinanten Wildtyp-Enzyms und einer thermostabilen MTG-Variante (S2P) aus der Random Mutagenese gegenüber Formaldehyd und verschiedenen Oxidationsmitteln untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Identifikation der Modifikationsstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in der Tabelle 2-1 zusammengestellt.

**Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.**

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Acrylamid (30 %)	AppliChem GmbH (Darmstadt)	A0947, 1000	≥ 99,9 %
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5210.2	-
Agarose	peqLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)	35-1020	-
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9592.3	≥ 98 %
Aceton	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9372.6	≥ 99,5 %
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A512.1	
BSA	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8076.1	≥ 98 %
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A119.1	≥ 94 %
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5239.1	≥ 99 %
CBZ-Glutaminyl-Glycin (Z- Gln-Gly)	Bachem AG (Bubendorf; Schweiz)	C-1655	-
Coomassie-Brillantblau G 250	Merck KGaA (Darmstadt)	9598.1	-
di-Natriumhydrogen- phosphat-2-hydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4984.3	99,5 % p.a
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6908.1	≥ 99 %
Eisen(III)-chlorid- hexahydrat	Merck KGaA (Darmstadt)	1.03943.0250	≥ 99 %
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3738.5	≥ 99,8 %
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5054.6	95 %
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4979.1	-
Glucose-Monohydrat	Merck KGaA (Darmstadt)	1.08342.2	-
Glutathion (reduziert, GSH)	Merck KGaA (Darmstadt)	1.04090.0005	98 %
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3783.2	≥ 99,5 %
Glycin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3908.2	≥ 99 %
Hefeextrakt	AppliChem GmbH (Darmstadt)	A1552,1000	-
Hydroxylammoniumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)	1.04616.0250	≥ 99 %
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	X998.4	≥ 99 %
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6781.2	≥ 99 %
Kaliumdihydrogen- phosphat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3904.1	≥ 99 %
Lactose	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8921.2	-
Magnesiumchlorid- hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2189.2	≥ 99 %
Magnesiumsulfat-7-Hydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P027.1	≥ 99 %
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4227.2	-

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	K305.1	99 %
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3957.2	≥ 99,5 %
Natriumcyanoborhydrid	Sigma-Aldrich	15.615-9	-
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat	Riedel-de Haën (Seelze)	4269 / 23220	-
Natriumdodecylsulfat (SDS, Rotistock 20%)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	1057.1	-
Pepton	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8952.4	-
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T910.2	≥ 99,7 %
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6366.2	85 %
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4625.2	37 %
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	-	-
Trichloressigsäure (analytical grade)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8789.1	≥ 99 %
Tris	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4855.3	≥ 99 %
Trypton	Merck KGaA (Darmstadt)	1.07213,1000	-
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8070.1	30 %

## 2.2 Geräte

Sämtliche verwendete Geräte sind in der Tabelle 2-2 zusammengestellt.

**Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Geräte.**

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Chromatographieanlage	Äkta Explorer (P-900, UV 900, pH/C-900, Box 900)	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Chromatographiesäule	XK 16 XK 5	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Chromatographiesäulenmaterial	Streamline <sup>TM</sup> Chelating	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Electroporator	2510	Eppendorf AG (Hamburg)
Fluorimeter	Fluostar Galaxy	BMG LABTECH GmbH (Offenburg)
Hochdruckhomogenisator	Emulsiflex C5	Avestin Inc. (Ottawa, Kanada)
Magnetrührer	HI 190 M	Hanna Instruments (Singapur)
pH-Meter	inoLab pH Level 2 inoLab pH 730	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim)
Photometer	Genesys 6	ThermoSpectronic (Rochester, New York, USA)
Schüttelinkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
SDS-PAGE Anlage und	Multitron II Hoefler Mighty Small	Infors HT AG (Bottingen, Schweiz) Amersham Biosciences (Uppsala,

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Zubehör		Schweden)
Sterilbank	Biological Safety Cabinet	Nuaire (Plymouth, MN, USA)
Thermoblock mit Aufsätzen für MTPs, 1,5 mL und 2,0 mL Reaktionsgefäße	Thermostat plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermocycler (PCR)	TProfessional Basic Gradient	Biometra GmbH (Göttingen)
	TPersonal	Biometra GmbH (Göttingen)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Ultra-Turax	Micra R-T D-1	ART moderne Labortechnik (Mühlheim)
UV-Detektor-Kamera	Syngene Gene Genius Bio Imaging System	VWR International GmbH (Darmstadt)
Vakuumzentrifuge	SpeedVac	Eppendorf AG (Hamburg)
Vortexer	labDancer S40	VWR International GmbH (Darmstadt)
Waage	Sartorius BP221S Sartorius BL310 Sartorius CP3202 P	Sartorius AG (Göttingen)
	APX-100	Denver Instrument (Göttingen)
Wipptisch	Rocky 1000	Fröbel Labortechnik (Lindau)
Zentrifuge	Zentrifuge 5810 R Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg)
	Avanti™ J-30I	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Zentrifugenrotor	JA-10 JA-30.50	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)

## 2.3 Puffer

Sämtliche verwendete Puffer sind in der Tabelle 2-3 zusammengestellt.

**Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Puffer.**

Bezeichnung	Molarität [mol/L]	pH	Einwaage für 1 L [g]	Bemerkungen zur Herstellung
Tris-Puffer	0,05 Tris	8,0	6,057	pH-Wert wurde mit 3 M HCl eingestellt
Aufschlusspuffer	0,05 Tris 0,30 NaCl	8,0	6,057 17,532	pH-Wert wurde mit 3 M HCl eingestellt
IMAC Binding-Puffer	0,05 Tris 0,30 NaCl 0,02 Imidazol	8,0	6,055 17,532 1,3616	pH-Wert wurde mit 3 M HCl eingestellt

Bezeichnung	Molarität [mol/L]	pH	Einwaage für 1 L [g]	Bemerkungen zur Herstellung
IMAC Elutions-Puffer	0,05 Tris	8,0	6,057	pH-Wert wurde mit 3 M HCl eingestellt
	0,30 Natriumchlorid		17,532	
	0,50 Imidazol		34,030	
Kathodenpuffer	siehe Abschnitt 2.31			
Natriumphosphat-Puffer	0,05 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8,0	7,80	Jeweilige Salzmenge wurde separat in 800 mL dH <sub>2</sub> O gelöst und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt. Mit Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung wurde der pH-Wert der NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung eingestellt.
	0,05 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		8,90	
SDS-Probenpuffer	siehe Abschnitt 2.31			
TAE-Puffer (10x)	0,40 Tris	8,5	48,44	
	0,01 EDTA		3,7242	
	0,20 Essigsäure		12,01	
Trenngelpuffer	siehe Abschnitt 2.31			
Sammelgelpuffer	siehe Abschnitt 2.31			

## 2.4 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze

Flüssigkulturen von *Escherichia coli* wurden in LB-Medium bei 37 °C in Schikanekolben unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Alle Medien wurden für mindestens 20 min bei 121 °C hitzesterilisiert.

**Tabelle 2-4: Bestandteile des LB-Mediums für die Anzucht von Zellen.** Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Substanz	Konzentration [g/L]
Pepton	10
NaCl	10
Hefeextrakt	5

Für die Herstellung von festem Nährmedium wurden dem LB-Medium (Tabelle 2-4) zusätzlich 15 g/L Agar-Agar zugesetzt. Plasmid-tragende Zellen wurden durch Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) zum entsprechenden Medium unter Selektionsdruck gehalten (LB<sub>Amp</sub>-Medium).

**Tabelle 2-5: Bestandteile des SOB-Mediums.** Mit NaOH wurde auf pH 7,5 eingestellt.

Substanz	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt	5
Trypton	20
NaCl	0,6
KCl	0,2

**Tabelle 2-6: Bestandteile des SOC-Mediums für die Elektroporation.**

Komponente	Ausgangs- konzentration	End- konzentration	Menge [ $\mu$ L]
SOB-Medium	-	-	1000
MgCl <sub>2</sub>	2 M	10 mM	5
Glucose	1 M	20 mM	20

Die Expression der rekombinanten MTG erfolgte in einem Autoinduktionsmedium mit Modifikationen nach Studier [Studier, 2005]. Das LB-Medium enthielt zusätzlich Glucose, Glycerin und Lactose, sowie ein Phosphatpuffer und MgSO<sub>4</sub>. Die Zellen wachsen zunächst auf Glucose. Ist diese verbraucht, stellen die Zellen ihren Stoffwechsel auf Lactose um, in der Zwischenzeit wird Glycerin als C-Quelle verwendet. Die Lactose wird durch die  $\beta$ -Galactosidase zu Allolactose umgewandelt, welche an den Lac-Repressor bindet und somit die Proteinexpression induziert.

Das Autoinduktionsmedium besteht aus LB-Medium mit 0,5 g/L Glucose, 5 g/L Glycerin, 2 g/L Lactose, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2 mM MgSO<sub>4</sub>. Die Bestandteile der verschiedenen Autoinduktionsmedium-Lösungen sind in Tabelle 2-7 dargestellt.

**Tabelle 2-7: Bestandteile der einzelnen Autoinduktionsmedium -Komponenten.**

	Substanz	Konzentration [mol/L]	Einwaage für 100 mL [g]
<b>Lösung 1</b>	Glucose·H <sub>2</sub> O	0,14	2,74
	Glycerin	2,71	25
	Lactose·H <sub>2</sub> O	0,29	10,53
<b>Lösung 2</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	6,8
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,50	8,9
	Substanz	Konzentration [mol/L]	Einwaage für 20 mL [g]
<b>Lösung 3</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,40	9,86

## 2.5 Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien

Sämtliche verwendete Restriktionsenzyme, molekularbiologische Enzyme und Reagenzien sowie Kits sind in der Tabelle 2-8 zusammengestellt.

**Tabelle 2-8: Übersicht über verwendete molekularbiologische Reagenzien.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Best.-Nr.</b>	<b>Bemerkung</b>
Benzonase	Merck KGaA (Darmstadt)	1.01695.0001	250 U/mL
Centri Sep Column	Applied Biosystems (Darmstadt)	CS-900	-
Dispase I	BD Biosciences (Heidelberg)	354235	50 U/mL
DNase I	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	EN0525	1 U/ $\mu$ L
<i>DpnI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	ER1701	10 U/ $\mu$ L
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2218.1	1 mg/mL
GeneJet™ Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	K0691	-
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	K0502	-
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8259.2	~20000 U/mg
MassRuler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	SM0403	-
6x Massruler Loading Dye	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	R0621	-
MSB® Spin PCRapace Kit	Initek GmbH (Berlin)	1020220300	-
<i>NdeI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	ER0581	10 U/ $\mu$ L
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	EP6571	2,5 U/ $\mu$ L
Phosphatase Fast AP	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	EF0654	1 U/ $\mu$ L
Proteinase K	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	EO0491	900 U/mL
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	SM0431	-
QuikChange site- directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)	200519-5	-
T4DNA-Ligase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	EL0016	1 Weiss U/ $\mu$ L
<i>Taq</i> PCR Master Mix Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)	201443	5 U/mL
<i>XhoI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	ER0691	10 U/ $\mu$ L

## 2.6 Primer

Alle Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Zur Verwendung wurden die Primer in dH<sub>2</sub>O gelöst (Konzentration: 100 pmol/ $\mu$ L), die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst.

Tabelle 2-9: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Referenz
PCR-Primer zur Amplifikation der Pro-MTG		
fw-MTG-NdeI	5'-GGAA TTC CAT ATG GAC AAT GGC GCG GGG GAA G-3'	[Marx et al., 2007]
rev-MTG-XhoI	5'-CCG CTC GAG CGG CCA GCC CTG CTT TAC CTT GTC-3'	[Marx et al., 2007]
PCR-Primer für site-directed Mutagenese		
fw-S2Thr	5'-GGGCC CCCGA CACGG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Thr	5'-CT GTCGT CCGTG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Glu	5'-GGGCC CCCGA CGAGG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Glu	5'-CT GTCGT CCTCG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Asp	5'-GGGCC CCCGA CGACG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Asp	5'-CT GTCGT CGTCG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Arg	5'-GGGCC CCCGA CCGGG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Arg	5'-CT GTCGT CCCGG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Ala	5'-GGGCC CCCGA CGCAG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Ala	5'-CT GTCGT CTGCG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Asn	5'-GGGCC CCCGA CAATG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Asn	5'-CT GTCGT CCTGG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Gly	5'-GGGCC CCCGA CGGAG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Gly	5'-CT GTCGT CTCCG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2His	5'-GGGCC CCCGA CCATG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2His	5'-CT GTCGT CATGG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S2Met	5'-GGGCC CCCGA CATGG ACGAC AGGGT CACCC CTCC-3'	diese Arbeit
rev-S2Met	5'-CT GTCGT CCATG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S23V-Y24N	5'-CGT CCC GTG AAC GGC AGG GCC GAG ACG GTC G-3'	diese Arbeit
rev-S23V-Y24N	5'-C CCT GCC GTT CAC GGG ACG GTA CGG GTC GG-3'	diese Arbeit
fw-C64Ser	5'-GTC CTACGGCAGTGTCTGGTGTACCTGGGTC-3'	diese Arbeit
rev-C64Ser	5'-TGACACCGACACTGCCGTAGGACAGCCACTCC-3'	diese Arbeit
PCR-Primer für Sättigungsmutagenese		
fw-S2P	5'-GGGCC CCCGA CNNKG ACGAC AGGGT CACCC CTCCC-3'	diese Arbeit
rev-S2P	5'-CT GTCGT CMNNG TCGGG GGCCC GGAAC GAC GG-3'	diese Arbeit
fw-S23L	5'-GTA CCG TCC CNN KTA CGG CAG GGC CGA GAC GG-3'	diese Arbeit
rev-S23L	5'-CCC TGC CGT AMN NGG GAC GGT ACG GGT CGGG-3'	diese Arbeit
fw-Y24N	5'-CCG TCC CTC GNN KGG CAG GGC CGA GAC GGT CGT C-3'	diese Arbeit
rev-Y24N	5'-CGG CCC TGC CMN NCG AGG GAC GGT ACG GGT CGG-3'	diese Arbeit
fw-G257S	5'-AATTTCTGACT ACNNK TGGTT CGGCG CCCAG ACGGAA G-3'	diese Arbeit
rev-G257S	5'-CGCCG AACCA MNNGT AGTCG AAATT GACGA ATCCC TCACC-3'	diese Arbeit
fw-K269E	5'-GGACGCCGACNNKACCGTCTGGACCCACGG-3'	diese Arbeit
rev-K269E	5'-GA CGG TMN NGT CGG CGT CCG CTT CCG TCT GG-3'	diese Arbeit
fw-H289Y	5'-GGGTGCCATGNNKGTCTACGAGAGCAAGTTCCG-3'	diese Arbeit
rev-H289Y	5'-TCT CGT AGA CMN NCA TGG CAC CCA GGC TGC C-3'	diese Arbeit
fw-K294M	5'-CTA CGA GAG CNN KTT CCG CAA CTG GTC CGA GGG-3'	diese Arbeit
rev-K294M	5'-CAG TTG CGG AAM NNG CTC TCG TAG ACA TGC ATG G-3'	diese Arbeit
PCR-Primer für Kolonie-PCR		
T7-Primer	5-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	[Novagen, 2005]
T7-Term-Primer	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG T-3'	[Novagen, 2005]

## 2.7 Zelllinien und Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm *Escherichia coli* BL21 Gold(DE3) verwendet (Stratagene: Amsterdam, Niederlande). In Tabelle 2-10 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide angegeben.

**Tabelle 2-10: Übersicht über die verwendeten Plasmide.**

Plasmid	genetische Marken	Referenz
pET20(+)	Expressionsvektor mit C-terminalen His-Tag, T7 Promoter, <i>peIB</i> , Amp <sup>R</sup>	[Novagen, 2005]
pDJ1-3	pET20b(+) mit 1,1 kBp <i>NdeI/XhoI</i> -Pro-MTG-Gen aus <i>Streptomyces mobaraensis</i> (DSM 40847)	[Marx et al., 2007]
pCM201	pDJ1-3 Punktmutante Y24N	[Marx et al., 2008b]
pCM203	pDJ1-3 Punktmutante S2P	[Marx et al., 2008b]
pCM205	pDJ1-3 Punktmutante S23L	[Marx et al., 2008b]
pCM211	pDJ1-3 Punktmutante G257	[Marx et al., 2008b]
pCM213	pDJ1-3 Punktmutante K269E	[Marx et al., 2008b]
pCM224	pDJ1-3 Punktmutante H289Y	[Marx et al., 2008b]
pCM227	pDJ1-3 Punktmutante N184S, K294M	[Marx et al., 2008b]
pKB2Y	pDJ1-3 Punktmutante S2Y	diese Arbeit
pKB2M	pDJ1-3 Punktmutante S2M	diese Arbeit
pKB23I	pDJ1-3 Punktmutante S23I	diese Arbeit
pKB23V	pDJ1-3 Punktmutante S23V	diese Arbeit
pKB23Y	pDJ1-3 Punktmutante S23Y	diese Arbeit
pKB64S	pDJ1-3 Punktmutante C64S	diese Arbeit
pKB269D	pDJ1-3 Punktmutante K269D	diese Arbeit
pKB269S	pDJ1-3 Punktmutante K269S	diese Arbeit
pKB294I	pDJ1-3 Punktmutante K294I	diese Arbeit
pKB294L	pDJ1-3 Punktmutante K294L	diese Arbeit
pKB294V	pDJ1-3 Punktmutante K294V	diese Arbeit
pUHS23V-Y24N	pDJ1-3 Punktmutante S23V, Y24N	diese Arbeit
pUH301	pDJ1-3 Mutante S23V, Y24N, H289Y	diese Arbeit
pUH302	pDJ1-3 Mutante S23V, Y24N, K269S, H289Y	diese Arbeit
pUH303	pDJ1-3 Mutante S2Y, H289Y, K294L	diese Arbeit
pUH304	pDJ1-3 Mutante S23V, Y24N, K269S	diese Arbeit
pUH306	pDJ1-3 Mutante S2Y, S23Y, H289Y	diese Arbeit
pUH307	pDJ1-3 Mutante S23V, Y24N, G257S, H289Y	diese Arbeit
pUH308-B	pDJ1-3 Mutante S23V, Y24N, K294L	diese Arbeit
pUH309	pDJ1-3 Mutante S2Y, S23Y, K294L	diese Arbeit

## 2.8 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.8.1 PCR-Amplifikation der Pro-MTG-Sequenz

Die Pro-MTG-Gene aller zu rekombinierenden MTG-Varianten wurden aus den entsprechenden Plasmiden mittels PCR amplifiziert. Der PCR-Ansatz setzte sich wie in Tabelle 2-11 dargestellt zusammen.

**Tabelle 2-11: Ansatz der PCR für die Amplifikation der Pro-MTG** (Gesamtvolumen 25  $\mu\text{L}$ , verwendete Primer Tabelle 2-9).

Komponente	Ausgangs-konzentration	End-konzentration	Volumen
<i>Pfu</i> Puffer + $\text{MgSO}_4$	10x	1x	2,5 $\mu\text{L}$
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	2,5 $\mu\text{L}$
Primer fw-MTG-NdeI	25 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$
Primer rev-MTG-XhoI	25 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$
Template-DNA	-	-	1 $\mu\text{L}$
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	2,5 U/ $\mu\text{L}$	0,625 U	0,25 $\mu\text{L}$
nukleasefreies Wasser	-	-	14,75 $\mu\text{L}$

Die PCR wurde in einem TPersonal Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

	Denaturierung:	96 $^{\circ}\text{C}$	2 min
	Zugabe der <i>Pfu</i> DNA-Polymerase		
10x	Denaturierung	94 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	Annealing	71 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	Verlängerung	72 $^{\circ}\text{C}$	45 s
14x	Denaturierung	94 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	Annealing	71 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	Verlängerung	72 $^{\circ}\text{C}$	45 s + 20 s/Zyklus
1x	Verlängerung	72 $^{\circ}\text{C}$	7 min

### 2.8.2 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde nach der Ligation des DNA-Shuffling-Ansatz in pET20b(+) und der folgenden Elektrotransformation durchgeführt, um die Klone auf den Einbau des entsprechenden Inserts zu überprüfen. Gepickte Klone wurden in 20  $\mu\text{L}$  sterilfiltriertem Wasser resuspendiert und bei 99  $^{\circ}\text{C}$  für 10 min inkubiert, anschließend wurden davon 0,5  $\mu\text{L}$  als Template-DNA in den PCR-Ansatz eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Kolonie-PCR ist in Tabelle 2-12 dargestellt.

**Tabelle 2-12: Ansatz für eine Kolonie-PCR** (Gesamtvolumen 10 µL).

Komponente	Ausgangs- konzentration	End- konzentration	Volumen
Taq-fertig-Mix	-	1x	5 µL
T7-Primer	25 µM	0,5 µM	0,2 µL
T7-Term-Primer	25 µM	0,5 µM	0,2 µL
Template-DNA	-	-	0,5 µL
nukleasefreies Wasser	-	-	4,1 µL

Die PCR wurde in einem TPersonal Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

	Denaturierung	96 °C	2 min
10x	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	50 °C	30 s
	Verlängerung	72 °C	1,2 min
14x	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	50 °C	30 s
	Verlängerung	72 °C	45 s + 20 s/Zyklus
1x	Verlängerung	2 °C	7 min

## 2.9 Sättigungsmutagenese

Eine Sättigungsmutagenese wurde durchgeführt, um an einer bestimmten Position die Wildtyp-Aminosäure gegen alle anderen natürlichen Aminosäuren an dieser Position in das Zielprotein einzubauen. Die sättigende Mutagenese erfolgte mit dem „QuikChange site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) entsprechend den Herstellerangaben [Stratagene, 2007]. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst. Die Primer wurden nach der Methode von Zheng mit einer Degenerierung von 5'-NNG/T in dem kodierenden und 5'-A/CNN im nicht-kodierenden Strang konstruiert [Zheng et al., 2004].

Im Anschluss an die Reaktion wurde die Template-DNA durch 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* fragmentiert. Nach der Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden weitere 10 U *DpnI* zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach der Reinigung der Ansätze wie in Abschnitt 2.18 beschrieben, erfolgte die Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) mittels Elektrotransformation (Abschnitt 2.20).

## 2.10 Site-directed Mutagenese

Um Aminosäuren in einem Protein zielgerichtet zu ändern, wurde die Methode der site-directed Mutagenese angewendet. Die Mutageneseprimer wurden so gewählt, dass sie dieselbe Mutation kodierten, aber zueinander komplementär waren und so je an der homologen Position am kodierenden und nicht-kodierenden Strang der Matrizen-DNA

banden. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle 2-9 und die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes in Tabelle 2-13 aufgeführt.

**Tabelle 2-13: Site-directed Mutagenese-PCR** (Gesamtvolumen 50  $\mu\text{L}$ ).

Komponente	Ausgangs- konzentration	End- konzentration	Volumen
<i>Pfu</i> Puffer mit $\text{MgSO}_4$	10x	1x	5 $\mu\text{L}$
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	5 $\mu\text{L}$
fw-Primer	25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$
rev-Primer	25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$
pDJ1-3 (1:10 verdünnt)	-	-	0,5 $\mu\text{L}$
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	2,5 U/ $\mu\text{L}$	1,25 U	0,5 $\mu\text{L}$
nukleasefreies Wasser	-	-	35 $\mu\text{L}$

Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (10 min 95  $^{\circ}\text{C}$ ) und Zugabe der *Pfu* DNA-Polymerase in 15 Zyklen (Denaturierung: 30 s 95  $^{\circ}\text{C}$ , Annealing: 30 s 60  $^{\circ}\text{C}$  - 65  $^{\circ}\text{C}$ , Verlängerung: 13 min 68  $^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend wurden jedem Ansatz 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* zugegeben, welche methylierte DNA fragmentiert und so das parentale Plasmid aus dem Ansatz abbaut. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$ , danach wurden weitere 10 U *DpnI* zugegeben und für eine weitere Stunde bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Nach der Reinigung der Ansätze (Abschnitt 2.18), erfolgte die Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) mittels Elektrottransformation (Abschnitt 2.20).

## 2.11 DNA-Shuffling

Verschiedene Positionen, die zu einer erhöhten Thermostabilität der MTG führen, sollten mittels In-vitro-Rekombination kombiniert werden. Es wurde die von Stemmer publizierte Methode des DNA-Shufflings [Stemmer, 1994a] mit Modifikationen in der Fragmentierung nach Lorimer und Pastan [Lorimer und Pastan, 1995] verwendet. Weitere Modifikationen wurden in der Präparation der Elterngene nach Zhao und Arnold [Zhao und Arnold, 1997b] durchgeführt.

Die Präparation der zu rekombinierenden Gene erfolgte mittels PCR wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben. Die PCR-Ansätze wurden über das „MSB<sup>®</sup> PCRapace Kit“ wie in Abschnitt 2.18 beschrieben gereinigt.

### 2.11.1 Fragmentierung der Template-Sequenzen

Der DNase I-Verdau dient der Fragmentierung der dsDNA und ist ein essentieller Bestandteil der DNA-Shuffling-Methode (Abschnitt 1.1.3). Lorimer und Pastan beschrieben ein Shuffling-Verfahren, indem anstelle von Magnesium-Ionen während des DNase I-Verdaus Mangan-

Ionen eingesetzt werden [Lorimer und Pastan, 1995]. Es wurden ca. 2,7 µg Template-DNA mit 0,3 U DNase I in Anwesenheit von 10 mM MnCl<sub>2</sub> fragmentiert. Die Inkubation erfolgte für 2 min bei 15 °C, anschließend wurde die Reaktion bei 90 °C über 10 min abgestoppt.

Für die Reinigung sehr kleiner DNA-Fragmente (50 Bp) wurden Säulen verwendet, die zur Entfernung von DNA-Fragmenten < 16 Bp, Salzen und anderer niedermolekularer Substanzen dienen. Es wurden die Säulen „Centri-Sep Column“ von Princeton Separation (Applied Biosystems) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

### 2.11.2 Reassemblierung der parentalen Sequenzen

Innerhalb des DNA-Shufflings wird die Reassemblierungs-PCR dazu verwendet, kurze homologe DNA-Abschnitte von unterschiedlichen parentalen Templates zu kombinieren. Dafür wurden 10 µL aus dem gereinigten DNase I-Verdau mit 10 µL 2x PCR-Mastermix vermischt.

**Tabelle 2-14: Zusammensetzung 2x PCR-Mastermix für die Reassemblierung** (Gesamtvolumen 10 µL).

Komponente	Ausgangs-konzentration	End-konzentration	Volumen
<i>Pfu</i> Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	10x	5x	2 µL
dNTP Mix	2 mM	0,4 mM	2,5 µL
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	2,5 U/µL	1,25 U	0,5 µL
Wasser	-	-	5 µL

Die Reassemblierungs-PCR wurde in einem Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

	Denaturierung	96 °C	3 min
40x	Denaturierung	94 °C	60 s
	Annealing	55 °C	60 s
	Verlängerung	72 °C	60 s + 5 s/Zyklus
1x	Verlängerung	72 °C	7 min

### 2.11.3 PCR-Amplifikation der reassemblierten Pro-MTG-Sequenzen

Die PCR-Amplifikation der vollständig reassemblierten MTG-Sequenzen wurde mit flankierenden Primer für die Pro-MTG durchgeführt. Die PCR wurde analog zur Amplifikation der Elterngene für das DNA-Shuffling durchgeführt (Abschnitt 2.8.1).

## 2.12 Plasmidpräparation

Zur Extraktion von Plasmid-DNA wurde das GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Nach Reinigung über eine Silica-Säule wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL sterilfiltriertem Wasser eluiert. Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde mittels analytischer Gelelektrophorese (Abschnitt 2.13 und Abschnitt 2.14) bestimmt.

## 2.13 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA und der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1 % bis 2 % Agarosegelen bei 80 V in TAE-Puffer (Tabelle 2-3). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid (1 µg/mL) angefärbt. Als Größenstandard wurde, soweit nicht anders vermerkt, der „Massruler DNA-Ladder-Mix“ (Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese-Ergebnisse wurden mittels der Gel-Dokumentation GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK) und Gene-Tool Software dokumentiert.

## 2.14 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese. Die Konzentration wurde über die Intensität der DNA-Banden im Vergleich zu den Markerbanden („Massruler DNA-Ladder-Mix“ von Fermentas) bestimmt. Für die Auswertung wurde die Gel-Dokumentation GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK) und das Programm Gene-Tool verwendet. Es wurden 5 µL linearisierte DNA und 5 µL Marker aufgetragen.

## 2.15 Agarose-Gelextraktion

Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen wurde das „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Fermentas) verwendet. Es wurde analog der Herstellerangaben verfahren. Die Elution der DNA erfolgte mit sterilfiltriertem Wasser (50 °C).

## 2.16 Restriktionsverdau

Die Linearisierung von Plasmid-DNA erfolgte mit 1 U *Xho*I und 2 µL DNA in einem 10 µL-Ansatz für 2 h bei 37 °C. Für die Klonierung der neu-konstruierten MTG-Gene aus dem DNA-Shuffling in den Expressionsvektor pET20b(+) wurden die MTG-Gene und der Vektor über

einen Doppelverdau mit *XhoI* und *NdeI* geschnitten. Der Restriktionsverdau enthielt 1-fach „Orange“-Puffer (Fermentas), 2 U *XhoI* und 0,67 U *NdeI*. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 4 h.

## 2.17 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in den Expressionsvektor erfolgte durch Inkubation beider DNA-Stücke entsprechend den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen. Der Vektor wurde mittels Alkalischer Phosphatase (FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase, Fermentas) nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

Für die Ligation von Insert und Vektor wurde folgendes Verhältnis für einen 50 µL-Ansatz verwendet: 25 µL kombinierte MTG-Sequenzen, 5 µL pET20b(+), 5 µL 10x T4-DNA Ligase-Puffer, 5 µL T4-DNA-Ligase (1 U/µL) und 10 µL nukleasefreies Wasser. Die Inkubation erfolgte über 16 h bei 16 °C und wurde anschließend mittels „MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace Kit“ (Abschnitt 2.18) gereinigt.

## 2.18 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen

Die Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen wurde mithilfe des „MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace Kit“ von Invitex durchgeführt. Es können DNA-Fragmente im Bereich 80 Bp bis 30 kBp von Nukleotiden, Primer, Puffern und Salzen getrennt werden. Nach der DNA-Bindung an das Säulenmaterial mit nachfolgendem Waschschrift wurde mit je 10 µL sterilem Wasser eluiert [Invitex, 2008].

## 2.19 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Anzinger Straße 7a; D-85560 Ebersberg). Circa 10 ng Plasmid-DNA wurden für eine Sequenzierung versendet.

## 2.20 Transformation durch Elektroporation

### 2.20.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

In einem Schüttelkolben wurden 100 mL LB-Medium mit 3 mL einer Vorkultur von *E. coli* BL21 Gold(DE3) beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 bei 37 °C und 80 Upm (Infors Schüttelinkubator) inkubiert.

Nach 15-minütiger Kühlung auf Eis wurden die Zellen bei 4 °C und 3222 g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit eiskaltem, sterilem Wasser (50 mL) und anschließend mit 8 mL kaltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Die Zellsuspension wurde in 200 µL 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Aliquote von 40 µL wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.20.2 Elektroporation

40 µL kompetente *E. coli* BL21 Gold(DE3)-Zellen wurden mit 2 - 5 µL Ligationsansatz oder gereinigtem PCR-Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eppendorf, 1 mm Spaltbreite) überführt. Mittels Stromstoßes (1800 V, 10 µF, 5 ms) im Elektroporator (Electroporator 2510, Eppendorf) wurden die Zellen transformiert. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 mL SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C unter Schütteln (100 Upm Thermomixer Eppendorf) inkubiert. 50 - 100 µL der Kultur wurden auf Selektiv-Agar-Platten (LB<sub>Amp</sub>) ausplattiert.

## 2.21 Zellkultivierung

### 2.21.1 Zellkultivierung und Expression im Schüttelkolben

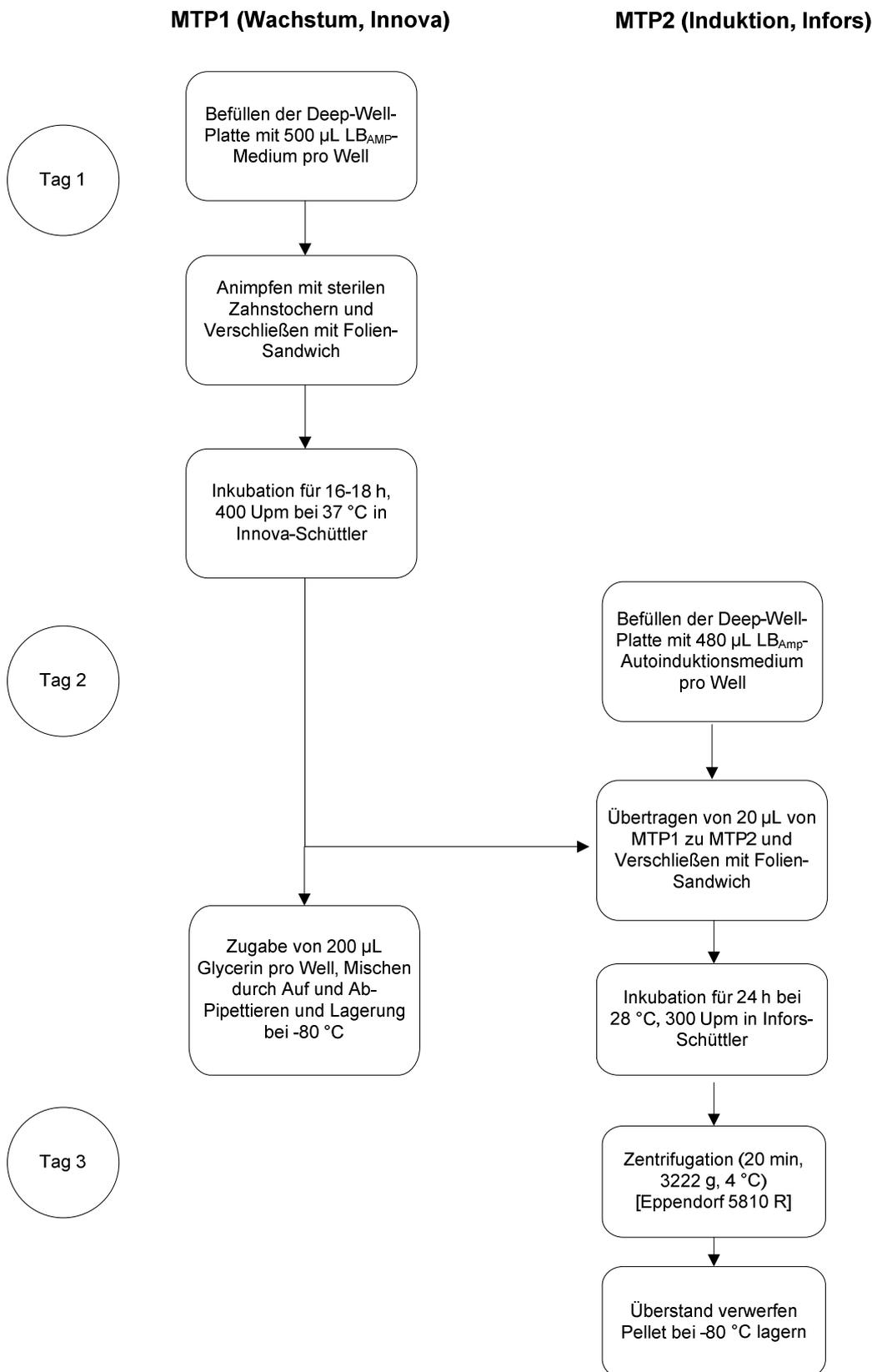
Die Expression verschiedener MTG-Varianten erfolgte mittels Autoinduktionsmedium [Marx et al., 2007]. Dazu wurden 100 mL LB<sub>Amp</sub>-Autoinduktionsmedium (Abschnitt 2.4 und Tabelle 2-7) im Schüttelkolben mit 2 mL einer Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C und 80 Upm für 22 h (Infors Schüttelinkubator). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch 20-minütige Zentrifugation bei 3222 g und 4 °C geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -25 °C gelagert.

### 2.21.2 Anzucht von Klonbibliotheken

Die Klonbibliotheken aus der Sättigungsmutagenese und dem DNA-Shuffling wurden in 96-Deep-Well-Platten nach der von Marx et al. publizierten Methode angelegt [Marx et al., 2008b]. Für die Klonbibliotheken der Sättigungsmutagenese wurde neben den Mutanten auch das rekombinante Wildtyp-Enzym [Marx et al., 2007] sowie die MTG-Variante aus der Random Mutagenese [Marx et al., 2008b] mit in der Bibliothek angelegt. Die Bibliotheken des DNA-Shufflings enthielten neben dem rekombinanten Wildtyp-Enzym die Doppelmutante S23V-Y24N. Pro Deep-Well-Platte wurden 84 verschiedene Klone angezogen.

Die Expression der MTG-Varianten in Deep-Well-Platten erfolgte in zwei Stufen (Abbildung 2-1). Im ersten Schritt wurden die Zellen auf LB<sub>Amp</sub>-Medium bei 37 °C angezogen. Anschließend erfolgte die Enzymexpression in einer weiteren Deep-Well-Platte mit LB<sub>Amp</sub>-Autoinduktionsmedium (Abschnitt 2.4 und Tabelle 2-7). Die Zellen (MTP2) wurden mittels

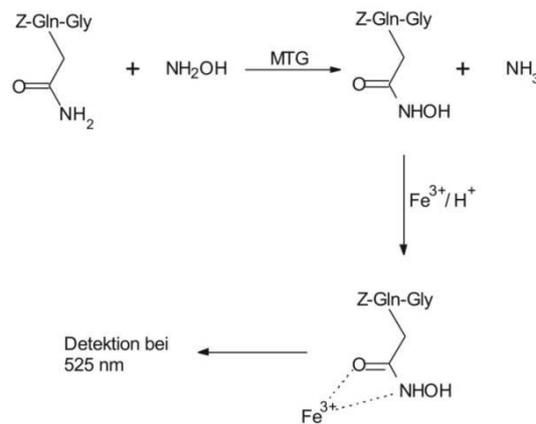
Zentrifugation für 20 min bei 3222 g und 4 °C geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.



**Abbildung 2-1: Kultivierung von Klonbibliotheken und Expression der Enzymvarianten in Deep-Well-Platten.** Die Schüttelradien betragen 2,5 cm (Innova-Schüttler) bzw. 5 cm (Infors-Schüttler) [Marx, 2008].

## 2.22 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität

Ein schneller und zuverlässiger Test zur Bestimmung der MTG-Aktivität ist der colorimetrische Hydroxamat-Test [Folk und Cole, 1966b]. Z-Gln-Gly dient hierbei als Glutamin-Substrat, das von der MTG mit Hydroxylamin zu Z- $\gamma$ -Glutaminyl-Hydroxamat-Gly umgesetzt wird. Mit Eisen bildet sich ein Farbkomplex, der bei 525 nm photometrisch detektiert werden kann (Abbildung 2-2). Für die Bestimmung der Enzymaktivität war die Aktivierung der Pro-MTG mittels Dispase I oder Proteinase K notwendig.



**Abbildung 2-2: Prinzip des Hydroxamat-Tests zur Bestimmung der MTG-Aktivität.**

Für den Test wurden die Substrat- und Stopplösung mit den wie in Tabelle 2-16, Tabelle 2-15 und Tabelle 2-17 beschriebenen Konzentrationen hergestellt. Für die Substratlösung wurden 5 g dH<sub>2</sub>O vorgelegt. Nach Tris-Zugabe wurden 400  $\mu$ L 1 M Essigsäure zugesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren Bestandteile, die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M Essigsäure auf 6 und das Auffüllen mit dH<sub>2</sub>O auf 10 g.

**Tabelle 2-15: Zusammensetzung der Substratlösung für den Hydroxamat-Test im Screening.**

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage für 10 g [g]
0,20 M Tris-Acetat	121,14	0,3769
0,10 M Hydroxylamin	69,50	0,1081
0,01 M reduziertem Glutathion	307,33	0,0478
0,03 M Z-Gln-Gly	337,30	0,1574

**Tabelle 2-16: Zusammensetzung der Substratlösung für den Hydroxamat-Test im MTP-Format.**

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage für 10 g [g]
0,20 M Tris-Acetat	121,14	0,3028
0,10 M Hydroxylamin	69,50	0,0869
0,01 M reduziertes Glutathion	307,33	0,0384
0,03 M Z-Gln-Gly	337,30	0,1265

Der fertigen Substratlösung wurde für den Hydroxamat-Test im MTP-Format (Tabelle 2-16) nochmal 833  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  zugefügt.

**Tabelle 2-17: Zusammensetzung der Stopplösung für den Hydroxamat-Test.** Die drei Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt.

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]
12 % Trichloressigsäure	163,46
5 % $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (in 0,1 M HCl)	270,32
3 M HCl	36,46

Die MTG-Aktivität lässt sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnen (Formel 1). Dabei ist eine Unit definiert als Bildung von 1  $\mu\text{mol}$   $\gamma$ -Glutaminyl-Hydroxamat pro Minute bei 37  $^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 6.

$$\text{MTG-Aktivität} \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{(E \cdot V_{\text{test}})}{(\varepsilon \cdot t_{\text{reakt}} \cdot d \cdot V_{\text{MTG}})} \quad (1)$$

mit	E	Extinktion [-]
	$V_{\text{test}}$	Gesamtvolumen [mL]
	$V_{\text{MTG}}$	Enzymvolumen [mL]
	$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ]
	$t_{\text{reakt}}$	Reaktionszeit [min]
	d	Schichtdicke der durchstrahlten Flüssigkeit in der Küvette [cm]

Für die Messung der MTG-Aktivität in Mikrotiterplatten wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichem  $\gamma$ -Glutaminyl-Hydroxamat (0-15 mM) bei einer Wellenlänge von 525 nm und einem Volumen von 200  $\mu\text{L}$  ein molarer Extinktionskoeffizient von 0,1368  $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$  ermittelt.

### 2.22.1 Durchführung Hydroxamat-Test im Screening von Klonbibliotheken

Im Screening von Klonbibliotheken auf veränderte Eigenschaften der MTG wurden 50  $\mu\text{L}$  des aktivierten Rohenzymextraktes (Abschnitt 2.23) für 2 min bei 37  $^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 90  $\mu\text{L}$  Substratlösung (Tabelle 2-15) gestartet. Nach

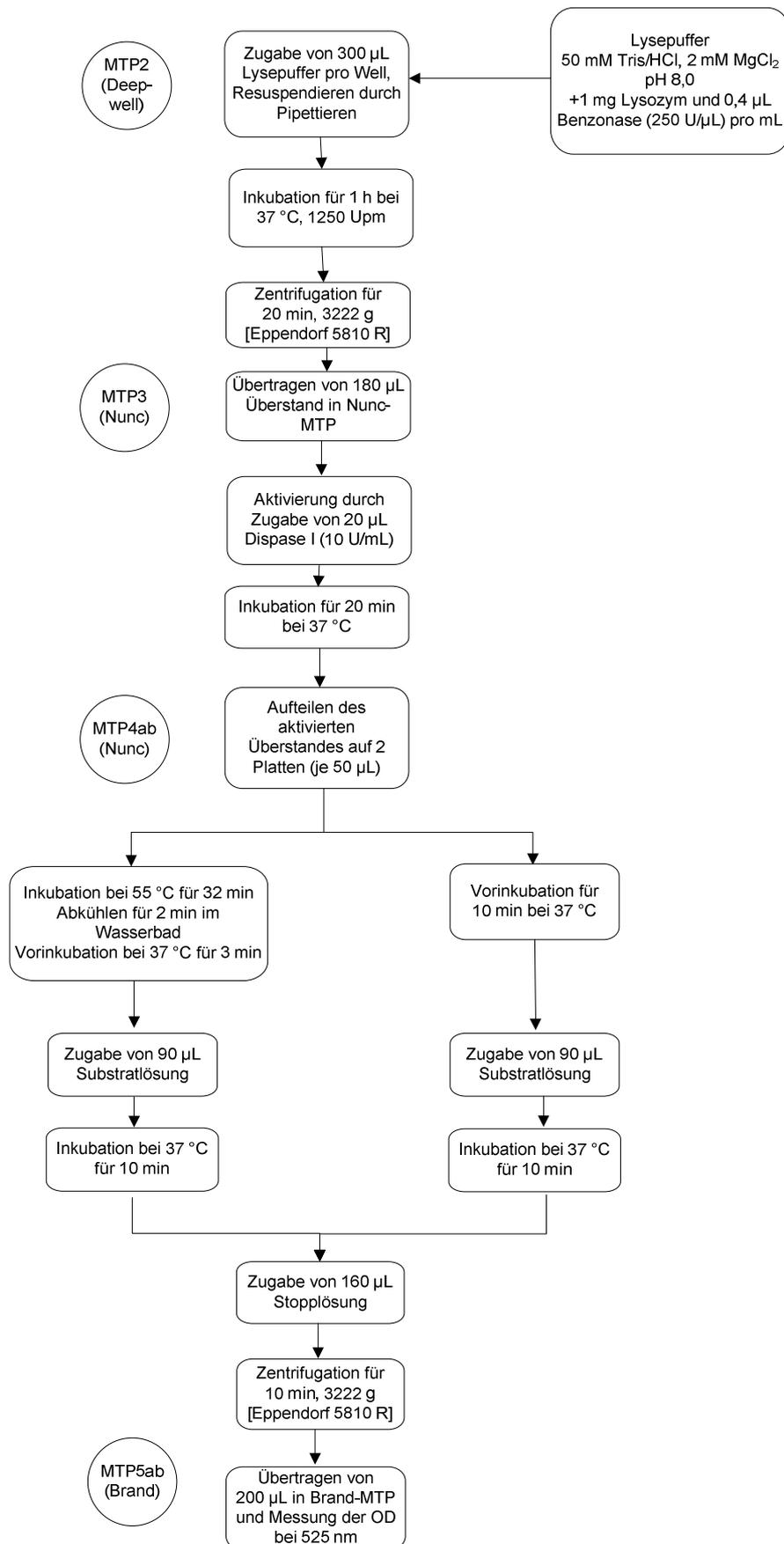
10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 160 µL Stopplösung beendet und im Anschluss zentrifugiert (10 min, 3222 g, Eppendorf 5810 R). 200 µL des Überstandes wurde in eine transparente MTP übertragen und die Extinktion bei 525 nm in einem Fluorimeter bestimmt (Fluostar Galaxy, BMG Labtech GmbH).

### **2.22.2 Durchführung Hydroxamat-Test im MTP-Format**

Die Bestimmung der MTG-Aktivität für die Charakterisierung verschiedener Mutanten sowie für Stabilitätsuntersuchungen wurde im MTP-Format durchgeführt. 140 µL Substratlösung (Tabelle 2-16) wurden je Well pipettiert und 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Das Enzymvolumen betrug 10 µL. Die Reaktion wurde nach 10 min bei 37 °C mit 150 µL Stopplösung beendet. 200 µL des Reaktionsansatzes wurde in eine transparente MTP übertragen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 525 nm in einem Fluorimeter (Fluostar Galaxy, BMG Labtech GmbH). Als Blindwert diente ein Reaktionsansatz mit 10 µL des jeweiligen Puffers ohne Enzym.

## **2.23 Screening von Klonbibliotheken**

Das Screening der Klonbibliotheken aus der Sättigungsmutagenese und dem DNA-Shuffling auf erhöhte Thermostabilität der MTG-Varianten erfolgte nach der Methode von Marx et al. [Marx et al., 2008b]. Es wurden die bei -80 °C gelagerten Zellpellets der Bibliotheken (MTP2, Abschnitt 2.21.2) enzymatisch mit Lysozym aufgeschlossen (Abbildung 2-3). Für die Bestimmung der Thermostabilität der MTG-Varianten wurde der erhaltene Rohenzymextrakt auf zwei MTPs aufgeteilt (MTP von Nunc, Bestellnummer: 267245; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden). Eine Platte wurde bei 37 °C für 10 min vorinkubiert und anschließend der Hydroxamat-Test durchgeführt. Die zweite Platte wurde für 32 min bei 55 °C inkubiert und anschließend die Restaktivität mittels Hydroxamat-Test bei 37 °C bestimmt (Abbildung 2-3). Es wurde ein Aliquot von 200 µL in eine transparente MTG (MTP Brand, Bestellnummer: 701304, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) überführt und die Extinktion bei 525 nm im Fluorimeter (Fluostar Galaxy, BMG Labtech GmbH) gemessen.



**Abbildung 2-3: Ablaufschema Screening auf erhöhte Thermostabilität: Zellyse, Aktivierung der Pro-MTG-His<sub>6</sub>-Varianten und Hydroxamat-Test unter verschiedenen Bedingungen [Marx, 2008].**

## 2.24 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption

Die Bestimmung der Proteinkonzentration ausgewählter gereinigter thermostabiler MTG-Varianten erfolgte über die UV-Absorption bei 280 nm [Pace und Schmid, 1997]. Die Proteinkonzentration wurde über den molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 1,836 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) für das rekombinante Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) berechnet. Um die ermittelten Proteinkonzentrationen mit den Werten aus der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test vergleichen zu können, mussten die Werte mit 1,4 multipliziert werden. Dieser Faktor wurde durch den Vergleich zwischen der Proteinkonzentration einer Probe bestimmt mittels Bradford-Test und UV-Absorption ermittelt.

## 2.25 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Für das Farbreagens wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95%igem Ethanol gelöst, 100 mL 85%ige Phosphorsäure zugesetzt und mit deionisiertem Wasser auf 600 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin zugesetzt und mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 h konnte das Reagens verwendet werden. Für den Test wurden 50  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 2 mL Farbreagens versetzt, gut gemischt und bei 595 nm die Extinktion gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA eingesetzt. Der lineare Bereich für den Test nach BRADFORD liegt zwischen 5  $\mu\text{g}$  und 500  $\mu\text{g}$  Protein/mL [Bradford, 1976].

## 2.26 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Für den Zellaufschluss wurde der Hochdruckhomogenisator (HDH) EmulsiFlex-C5 der Firma Avestin verwendet. Dafür wurde ca. 1 g Biofeuchtmasse (BFM) in 50 mL Aufschlusspuffer (Tabelle 2-3) resuspendiert und anschließend mit einem Rührstab (Ultra-Turrax) feinstverteilt. Der Aufschluss der Zellen erfolgt in drei Passagen bei einem Druck von 1000 bar. Der so erhaltene Rohenzymextrakt wurde direkt für die Aktivierung der Pro-MTG verwendet.

## 2.27 Aktivierung der Pro-MTG mit Proteinase K

Die mikrobielle Transglutaminase wird als Pro-Enzym in *E. coli* exprimiert und kann durch den Verdau mit Proteinase K aktiviert werden [Marx et al., 2008a; Sommer et al., 2011a]. Der aus dem Zellaufschluss erhaltene Rohenzymextrakt wurde direkt für den Verdau mit Proteinase K eingesetzt. Die Aktivierung der Pro-MTG erfolgte bei 37 °C über 1 h. Es wurde eine Konzentration von 5 U Proteinase K pro g eingesetzter Biofeuchtmasse verwendet.

Nach dem Verdau wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 3222 g und 4 °C die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen des Rohenzymextraktes getrennt.

## 2.28 Chromatographie

### 2.28.1 Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Alle Affinitätschromatographieläufe wurden mit dem System Äkta Explorer von Amersham Bioscience (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Datenaufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Unicorn 4.1 der Firma Amersham Bioscience. Alle bei der Chromatographie verwendeten Puffer und Lösungen wurden filtriert und entgast. Die Zusammensetzungen der verwendeten Binding- und Elutionspuffer sind in Tabelle 2-3 erläutert.

Als Säulenmaterial kam Streamline™ Chelating NTA zum Einsatz. Bei Nichtbenutzung wurde die gepackte und mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene Säule in 20 % Ethanol gelagert. Vor der Verwendung der Säule wurde diese zur Entfernung des Ethanol mit mindestens 3 Säulenvolumen (CV) dH<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit 5 CV Binding-Puffer äquilibriert. Den Proben für die Chromatographie wurden unmittelbar vor Auftragen auf die Säule Elutionspuffer im Verhältnis 1:25 zugesetzt, um die Imidazolkonzentration des Bindingpuffers von 20 mM zu erreichen. Die Auftragung der Proben erfolgte über einen 50 mL-Probenapplikator (Superloop™). Alle Parameter der Chromatographieläufe sind in Tabelle 2-18 zusammengefasst. Es wurde von allen Fraktionen, welche Protein enthielten (UV-Absorption bei 280 nm), die MTG-Aktivität mittels Hydroxamat-Test im Mikrotiterplatten-Maßstab bestimmt (Abschnitt 2.22.2).

**Tabelle 2-18: Parameter der Affinitätschromatographie zur Reinigung der unveränderten, rekombinanten MTG und deren Enzymvarianten.**

	XK16 Streamline™ Chelating
Säulenvolumen (CV)	5,6 mL
Fließgeschwindigkeit	3 mL/min
Äquilibrieren	5 CV
Waschen	3,5 CV
Gradient	Stufengradient zu 100 % Elutionspuffer
Fraktionsvolumen Durchlauf	2 mL
Fraktionsvolumen Elution	0,5 mL

### 2.28.2 Gel-Permeations-Chromatographie

Die Charakterisierung der verschiedenen Mutanten erfolgte in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0. Deswegen war es notwendig einen Pufferwechsel der vereinigten Fraktionen mit der höchsten TG-Aktivität aus der Affinitätschromatographie mittels Gelfiltration durchzuführen.

Es wurde eine PD-10 Säule mit Sephadex G-25M als Säulenmaterial verwendet (Amersham Bioscience). Zunächst wurde das Ethanol mit 20 mL dH<sub>2</sub>O entfernt und anschließend die Säule mit 20 mL 50 mM Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert. Es erfolgte die Beladung von 1,1 mL Enzymlösung auf die Säule und die Fraktionierung mit je 1,1 mL 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 in Reaktionsgefäße. Zuletzt wurde die Säule mit je 20 mL dH<sub>2</sub>O und 20 % Ethanol gespült und anschließend in 20 % Ethanol gelagert.

## **2.29 Charakterisierung ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten**

Die Charakterisierung wurde nach zwei verschiedenen Prinzipien durchgeführt. Für die Beurteilung der Lagerstabilität verschiedener Enzymvarianten wurden diese über eine definierte Zeit bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Restaktivität. Durch die Ermittlung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur wurde die Reaktionsstabilität der verschiedenen MTG-Varianten bestimmt.

### **2.29.1 Ermittlung des Temperaturoptimums der MTG**

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten wurde die Enzymlösung auf 5 U/mL mit 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 verdünnt. Es wurden jeweils 35 µL Enzymlösung bei der entsprechenden Temperatur (10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 °C) für 2 min in einem Thermocycler vorinkubiert. Anschließend wurde die Aktivität über den Hydroxamat-Test bei der entsprechenden Reaktionstemperatur bestimmt [Marx et al., 2008b] (Abschnitt 2.22.2). Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte über die UV-Absorption bei 280 nm (Abschnitt 2.24).

### **2.29.2 Ermittlung des Inaktivierungsverhaltens der MTG**

Zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens verschiedener MTG-Varianten wurde die Enzymlösung über eine definierte Zeit bei 50 °C und 60 °C vorinkubiert. Für die Inaktivierungsversuche wurde die Enzymlösung auf 15 U/mL mit 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 verdünnt. Die Inkubation bei 50 °C und 60 °C erfolgte in einem Thermocycler. Es wurden jeweils 35 µL Enzymlösung über eine definierte Zeit inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt [Marx et al., 2008b]. Die verbleibende Restaktivität wurde mittels Hydroxamat-Test bei 37 °C (Abschnitt 2.22.2) über 10 min (bei der Inaktivierung bei 50 °C) und über 20 min (bei der Inaktivierung bei 60 °C) bestimmt. Die Berechnung der Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) erfolgte über eine exponentielle bzw. lineare Anpassung der Messwerte.

## 2.30 Untersuchungen zur Stabilität der MTG gegenüber chemischen Einflüssen

Für die Untersuchungen zur Stabilität der MTG wurden das rekombinante Wildtyp-Enzym [Marx et al., 2007] und die Variante MTG-S2P [Marx et al., 2008b] verwendet. Die Präparation der Enzyme erfolgt nach Sommer et al. [Sommer et al., 2011a].

### 2.30.1 Einfluss von Formaldehyd

Für die Untersuchungen der Stabilität der MTG in Gegenwart von Formaldehyd wurde das Enzym bis zu 20 h bei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Lageransätze setzten sich wie in Tabelle 2-19 dargestellt zusammen. Es wurde eine mit Proteinase K aktivierte FRAP-MTG-His<sub>6</sub> in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 verwendet. Die Inkubation erfolgte für 5 min, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h bei Raumtemperatur (22 °C). Aus den Lageransätzen wurde jeweils pro Probenahme-Zeitpunkt 50 µL entnommen. Die Bestimmung der MTG-Aktivität wurde wie in Abschnitt 2.22.1 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 2-19: Pipettierschema zur Untersuchung der Stabilität von MTG in Gegenwart von Formaldehyd.** Puffer: 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0, 5 % (v/v)-Stammlösung CH<sub>2</sub>O.

Volumen (5% CH <sub>2</sub> O-Lsg.) [µL]	Volumen (Puffer) [µL]		Konzentration (CH <sub>2</sub> O) im Testansatz [mM]
0	400	Zugabe von 100 µL MTG in 50 mM Natrium- phosphatpuffer pH 8,0	0
5	395		17
10	390		33
20	380		67
50	350		166
100	300		333
200	200		666
400	0		1330

Zur Untersuchung der Modifikationen der MTG durch Formaldehyd wurde eine MALDI-Analyse durchgeführt. Die MALDI-Analyse wurde in der Arbeitsgruppe Biopharmazie (Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) in Zusammenarbeit mit Herr Dr. Christian Schmelzer und Herr Michael Jung durchgeführt (MALDI-TOF Massenspektrometer Voyager DE-Pro von Firma Applied Biosystems, Darmstadt). Zum Entfernen des Formaldehyds und störender Salze wurde der Puffer gegen Wasser wie in Abschnitt 2.28.2 beschrieben gewechselt.

Die weitere Untersuchung bezüglich der Modifikationen der MTG durch Formaldehyd erfolgte mittels LC-MS-ESI-Analyse. Für diese Untersuchungen wurde eine thermostabile MTG (MTG-S2P) verwendet. Es wurden 6 mg/mL MTG-S2P in 50 mM Natriumphosphatpuffer

pH 8,0 mit Formaldehyd (Endkonzentration 300 mM) und Natriumcyanoborhydrid (Endkonzentrationen 17 mg/mL; 34 mg/mL, 51 mg/mL) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 22 °C über 2 h. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 50 % Aceton gefällt. Bei der separaten NaCNBH<sub>3</sub>-Behandlung wurde zunächst das Enzym MTG-S2P in Anwesenheit von 300 mM Formaldehyd bei 22 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid (Endkonzentrationen 17 mg/mL; 34 mg/mL, 51 mg/mL) über weitere 2 h bei 22 °C. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz ebenfalls mit 50 % Aceton gefällt.

Es wurden 1,9 mg Aceton-gefällte MTG-S2P in 300 µL dH<sub>2</sub>O gelöst. Für den Pepsin-Verdau wurde die Enzymlösung 1:10 mit 50 mM NaCl pH 1,3 verdünnt, 3 µg Pepsin zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µL Pepstatin-Lösung abgestoppt. Für den Trypsin-Verdau wurden 10 µL MTG-S2P-Lösung eingedampft und anschließend in 100 µL 0,4 M Ammoniumbicarbonat und 8 M Harnstoff gelöst. Der Verdau erfolgte mit 1 µg Trypsin über 3 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 %iger TFA-Lösung abgestoppt. Die Durchführung der LC-ESI-MS-Methode übernahm Herr Dr. Christian Ihling (AG Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Das LC-ESI-MS-System bestand aus einer Nano-HPLC-Anlage (Ultimate nano-HPLC, Dionex) gekoppelt mit einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo-Fisher-Scientific) mit einer Nano-Elektrosprayquelle (Proxeon).

### 2.30.2 Oxidation der MTG

Die Untersuchungen zur Oxidation der MTG wurden mit verschiedenen Oxidationsmitteln wie Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit durchgeführt. Es wurden verschiedene Konzentrationen (0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM und 0,5 mM) beider Substanzen in den Testansätzen verwendet. Die Enzymlösung (MTG-S2P 20 U/mL in 50 mM Tris/HCl pH 8,0) wurde bei 25 °C über 10 min mit den Oxidationsmitteln behandelt. Danach wurde die MTG-Aktivität mittels Hydroxamat-Test, wie unter Abschnitt 2.22.2 beschrieben, bestimmt. Für die Untersuchung, ob die Oxidation der MTG reversibel ist, wurden die Testansätze nach der Inkubation mit den Oxidationsmitteln mit DTT (Endkonzentration 3 mM) beziehungsweise GSH (Endkonzentration 3 mM) für 10 min behandelt. Anschließend wurde die Aktivität, wie in Abschnitt 2.22.2 beschrieben, bestimmt.

Es wurden mittels LC-MS-ESI-Analyse die Aminosäuren der MTG identifiziert, die oxidiert wurden. Für die Untersuchung, welche Aminosäuren modifiziert werden, wurde die MTG-S2P-Lösung mit 0,5 mM Natriumhypochlorit für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die DTT-Behandlung wie bereits beschrieben. Die behandelten Proben wurden anschließend mit 50 % Aceton gefällt. Das gefällte Enzym wurde in 8 M Harnstoff, 0,4 M

Ammoniumbicarbonat gelöst und mit 1 µg Trypsin über 3 h bei 37 °C verdaut. Die Durchführung der LC-ESI-MS-Methode übernahm Herr Dr. Christian Ihling (AG Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) (Abschnitt 2.30.1).

### 2.31 Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE

Die Gele für die SDS-PAGE bestanden aus je einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2-20 dargestellt. Die zu trennenden Proben wurden, falls nicht anders angegeben, 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Es wurden 10 µL Probe und 5 µL Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in zwei Stufen durchgeführt (1. Stufe: 300 V, 80 mA, 6 min; 2. Stufe: 300 V, 60 mA, 40 min).

**Tabelle 2-20: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (1 mm Dicke).**

	<b>2 Trenngele</b> <b>12,5 % T</b>	<b>2 Sammelgele</b> <b>4,5 % T</b>
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
dH <sub>2</sub> O	3,3 mL	3,00 mL
TEMED	10 µL	10 µL
gesättigtes APS	20 µL	8 µL

**Tabelle 2-21: Reagenzien zur Durchführung der SDS-PAGE.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bemerkung zur Herstellung</b>
Trenngelpuffer	181,8 g Tris, 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung, 1 mL 10 % (w/v) NaN <sub>3</sub> -Lösung, pH 8,8	Substanzen in 800 mL dH <sub>2</sub> O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt.
Sammelgelpuffer	60,6 g Tris, 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung, 1 mL 10 % (w/v) NaN <sub>3</sub> -Lösung, pH 6,8	Substanzen in 700 mL dH <sub>2</sub> O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt.
Acryl/Bisacrylamid-Lösung (30 %ig)	291 g Acrylamid, 9 g Bisacrylamid	Substanzen in 800 mL dH <sub>2</sub> O gelöst und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt.
APS-Lösung (gesättigt)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	In einem Reaktionsgefäß dH <sub>2</sub> O vorgelegt und eine entsprechende Menge APS hinzugefügt bis sich keine Kristalle mehr lösten.

Kathodenpuffer (10x konzentriert)	30,28 g Tris, 144 g Glycin, 50 mL 20 % (w/v) SDS- Lösung, 1 mL 10 % (w/v) NaN <sub>3</sub> - Lösung	Substanzen in 800 mL dH <sub>2</sub> O gelöst und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt.
SDS-Probenpuffer	27,2 g Tris, 30 mL HCl (3 M), 250 mL 20 % (w/v) SDS- Lösung, 500 mg Bromphenolblau, 500 g Glycerin, pH 6,8	Substanzen in etwas dH <sub>2</sub> O gelöst, pH mit 3 M HCl eingestellt und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung wurden 10 µL Mercaptoethanol pro mL SDS- Probenpuffer zugesetzt.

### 2.32 Färbung/ Entfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Die SDS-PAGE-Gele wurden über Nacht in Färbelösung auf dem Wipptisch geschüttelt. Nach der Färbung wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt (Wechsel der Lösung nach 30 min). Nach 5 min Spülen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Gele für 30 min in Geltrocknerlösung inkubiert. Die Gele wurden luftblasenfrei zwischen zwei benetzte Cellophanfolien eingespannt und für zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-22 zusammengefasst.

**Tabelle 2-22: Reagenzien zur Durchführung der Coomassie-Färbung.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Färbelösung	1 g Coomassie Brillant Blau G250, 20 % (v/v) 2-Propanol, 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassie Brillant Blau in 700 mL dH <sub>2</sub> O unter Rühren gelöst, danach Zugabe der Lösungen.
Entfärbelösung	20 % (v/v) 2-Propanol, 10 % (v/v) Essigsäure	Lösungen gemischt und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt.
Geltrocknerlösung	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Glycerin	Substanzen in 500 mL dH <sub>2</sub> O gemischt und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Sättigungsmutagenese an sieben Positionen der MTG

#### 3.1.1 Mutagenese und Anlage der Klonbibliotheken

Für die weitere Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase erfolgte zunächst eine Sättigungsmutagenese an Positionen, die mittels Random Mutagenese erzeugt und in einem Screening auf erhöhte Thermostabilität identifiziert worden waren [Marx et al., 2008b]. Bei einer Random Mutagenese können nicht alle Aminosäuren eines Proteins mit der gleichen Wahrscheinlichkeit ausgetauscht werden, da einige Aminosäuren durch mehr Codons repräsentiert werden als andere Aminosäuren. Um an bereits identifizierten Positionen alle möglichen Aminosäuren zu generieren wurde eine Sättigungsmutagenese durchgeführt.

An sieben verschiedenen Positionen (2, 23, 24, 257, 269, 289 und 294), die zu einer erhöhten Thermostabilität der MTG führten [Marx et al., 2008b], wurde durch eine Sättigungsmutagenese die Aminosäure des Wildtyp-Enzyms gegen alle anderen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht. Im Screening auf erhöhte Thermostabilität nach der Random Mutagenese war neben sechs Einzelmutanten (CM201, CM203, CM205, CM211, CM213 und CM224) auch eine Doppelmutante (CM227) mit den Austauschen N184S und K294M identifiziert worden. Es wurde vermutet, dass Aminosäure-Austausche, die zu einer erhöhten Thermostabilität führen, in der N-terminalen Domäne der MTG liegen [Marx et al., 2008b]. Auf Grund dieser Vermutung wurde nur an Position 294 eine sättigende Mutagenese durchgeführt.

Für jede Position wurden nach der Methode von Zheng zwei komplementäre Primer mit einer Degenerierung an der zu mutierenden Position konstruiert [Zheng et al., 2004]. Damit alle Aminosäuren codiert werden und die Größe der Bibliothek eingegrenzt wird, wurde bei dem Design der Primer die Kombination NNK (N = G, A, T oder C; K = G oder T) für die Degeneration verwendet. Dadurch ist die minimale Anzahl der Klone, die alle möglichen Einzelmutanten enthalten, festgelegt durch die Häufigkeit der am wenigsten repräsentierten Mutanten, d.h. durch die Aminosäuren, die nur durch ein Codon codiert werden (Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, His, Ile, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr). Wird das NNK-Codon eingesetzt, beträgt die Häufigkeit der am geringsten repräsentierten Mutante  $(f) \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{32}$ . Das bedeutet, dass bei einer 100%igen Mutationseffizienz, ca. 100 Klone untersucht werden müssen, um mit 95%iger Wahrscheinlichkeit alle möglichen Mutanten zu erhalten ( $[0,95 = 1-(1-f)^n]$ ; n = Anzahl der untersuchten Klone) [Hogrefe et al., 2002].

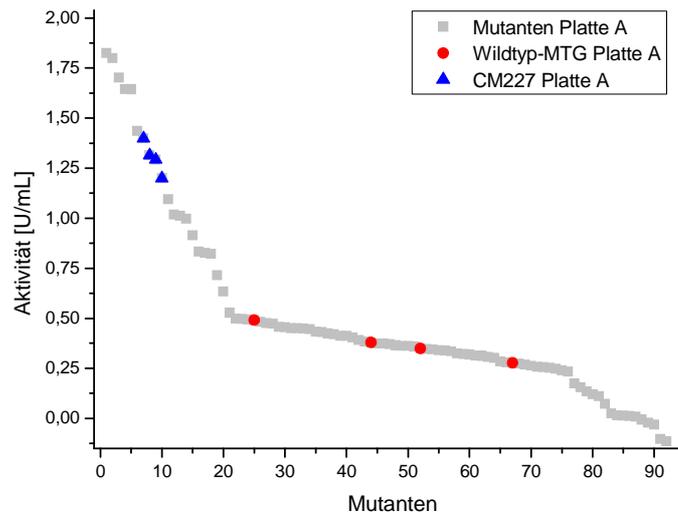
Die Mutagenese wurde mittels des kommerziell erhältlichen „QuikChange site-directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene durchgeführt (Abschnitt 2.9). Das nicht mutierte Template-Plasmid wurde durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut. Nach der Transformation des Mutationsansatzes in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Gold(DE3)

(Abschnitt 2.20.2) wurden jeweils fünf bis sechs zufällig ausgewählte Klone auf einen Basen- bzw. Aminosäure-Austausch an der entsprechenden Stelle untersucht. Dabei konnte eine Mutationseffizienz zwischen 60 % bis 100 % für die verschiedenen Positionen ermittelt werden. Um sicherzustellen dass alle möglichen Varianten theoretisch enthalten sind, wurde anschließend für jede Position eine Klonbibliothek mit jeweils ~ 180 bis 350 Klonen in Deep-Well-Platten angelegt (Abschnitt 2.21.2).

### **3.1.2 Screening der Klonbibliotheken auf verbesserte Thermostabilität**

Die Klonbibliotheken für Position 2, 23, 24, 257, 269, 284 und 294 aus der Sättigungsmutagenese wurden in einem Screening auf verbesserte Stabilität bei höheren Temperaturen untersucht. Die Ergebnisse für die Klonbibliothek von Position 2 werden in Abschnitt 3.1.3 separat dargestellt. Das Screening der Bibliotheken basierte auf der von Marx et al. publizierten Methode hinsichtlich erhöhter Thermostabilität [Marx et al., 2008b]. Dazu wurden die Platten zunächst in einem zweistufigen Prozess kultiviert. Der erste Wachstumsschritt in LB<sub>Amp</sub>-Medium bei 37 °C bis zum Erreichen der stationären Phase sorgt dafür, dass die Zellen in den einzelnen Wells möglichst ähnliche optische Dichten erreichen. Im zweiten Schritt wurde ein Aliquot auf eine zweite Deep-Well-Platte mit Autoinduktionsmedium nach Studier [Studier, 2005] übertragen (Abschnitt 2.21.2). Durch die im Medium enthaltene Glucose und Lactose werden die Zellen in den verschiedenen Wells in der gleichen Wachstumsphase induziert.

Das Screening der Klonbibliotheken erfolgte wie in Abschnitt 2.23 beschrieben. Die Untersuchung der Mutanten wurde sowohl hinsichtlich der Aktivität bei 37 °C als auch der Temperaturstabilität nach einer Vorinkubation bei 55 °C für 32 min durchgeführt. Für eine Bewertung der Stabilität der Mutanten wurde in allen Bibliotheken als Referenz das rekombinante Wildtyp-Enzym [Marx et al., 2007] sowie die jeweilige aus der Random Mutagenese stammende Mutante [Marx et al., 2008b] mit angelegt. Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch die Restaktivität einer Platte der Bibliothek für Position 294 nach Vorinkubation bei 55 °C für 32 min. Es konnten einige Mutanten identifiziert werden, die im Vergleich mit dem rekombinanten Wildtyp-Enzym eine deutlich höhere Restaktivität aufwiesen.



**Abbildung 3-1: Aktivitätsprofil aus Screening der Klonbibliothek von Position 294 für Platte A nach Vorinkubation bei 55 °C.** Die Anzucht der Bibliothek erfolgte in  $LB_{Amp}$ -Medium für 18 h bei 37 °C mit anschließender Expression der Pro-MTG im Autoinduktionsmedium über eine Dauer von 24 h bei 28 °C. Nach dem Zellaufschluss mit Lysozym erfolgte die Aktivierung der Pro-TG mit Dispase I (1 U/mL). Die Aktivität der Mutanten wurde nach Vorinkubation bei 55 °C mittels Hydroxamat-Test bei 37 °C ermittelt (Abschnitt 2.22.1). Die Messung der Extinktion erfolgte in der MTP im Fluorimeter (FLUOStar Galaxy) bei 525 nm. Es wurde die Aktivität der Mutanten in absteigender Reihenfolge aufgetragen. Als Referenz wurde die rekombinante Wildtyp-MTG [Marx et al., 2007] und die aus der Random Mutagenese stammende Mutante CM227 (N184S-K294M) [Marx et al., 2008b] mit in der Bibliothek angelegt.

Insgesamt zeigte sich bei den Untersuchungen auf erhöhte Thermostabilität, dass in allen Klonbibliotheken für die entsprechenden Positionen mehrere Varianten existieren, die eine höhere Restaktivität und damit eine höhere Stabilität als das rekombinante Wildtyp-Enzym besitzen (Abbildung 3-1, rote Kreise). Außerdem konnten Varianten identifiziert werden, die eine vergleichbare Restaktivität wie die thermostabilen MTG-Mutanten aus der Random Mutagenese zeigten (Abbildung 3-1, blaue Dreiecke). In den Bibliotheken von Position 24, 257 und 289 konnten keine Klone identifiziert werden, die eine höhere Thermostabilität als die Ausgangsvariante aus der Random Mutagenese besaßen. Jedoch konnten in den Bibliotheken für die Positionen 23, 269 und 294 mehrere Klone nachgewiesen werden, die eine deutlich höhere Restaktivität nach der Inkubation bei 55 °C besaßen als die jeweilige MTG-Variante aus der Zufallsmutagenese. Diese Klone wurden hinsichtlich der Basen-Austausche bzw. der Aminosäure-Substitution mittels Sequenzierung untersucht (Abschnitt 2.19). In Tabelle 3-1 sind die identifizierten Basen- und Aminosäure-Austausche für ausgewählte Klone für Position 23, 269 und 294 zusammengefasst.

**Tabelle 3-1: Basen- und Aminosäure-Austausche in FRAP-MTG-His<sub>6</sub>-Mutanten.** Die Mutanten wurden in einem Screening auf erhöhte Thermostabilität identifiziert.

Position	Mutanten ID	Mutation	Aminosäure-Substitution
23	KB23Y	TCG → TAT	Ser → Tyr
	KB23I	TCG → ATT	Ser → Ile
	KB23V	TCG → GTG	Ser → Val
269	KB269S	AAG → TCG	Lys → Ser
	KB269D	AAG → GAT	Lys → Asp
294	KB294L	AAG → TTG	Lys → Leu
	KB294I	AAG → ATT	Lys → Ile
	KB924V	AAG → GTT	Lys → Val

Für die Positionen 23 und 294 konnten drei Aminosäure-Austausche und für Position 269 zwei Aminosäure-Austausche identifiziert werden, die zu einer erhöhten Stabilität der MTG-Varianten führten. Diese thermostabilen MTG-Varianten wurden für eine Charakterisierung ausgewählt.

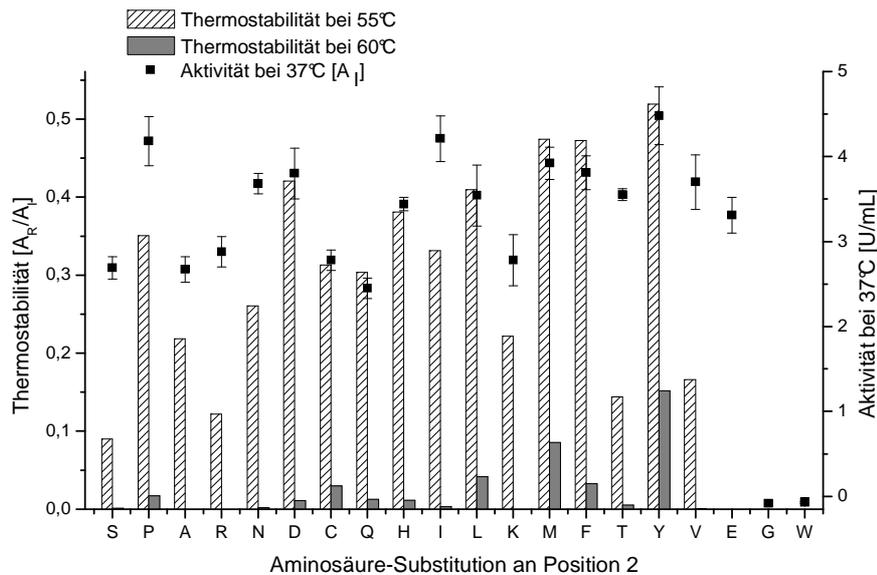
### 3.1.3 Site-directed Mutagenese an Position 2

Eine Sättigungsmutagenese wurde ebenfalls für die Position 2 wie in Abschnitt 2.9 beschrieben durchgeführt. Dabei konnte eine Mutationseffizienz von maximal 40 % erreicht werden. Auch die Veränderung der Annealing-Temperatur während der PCR führte zu keiner Steigerung der Mutationseffizienz. In allen Mutagenese-Ansätzen wurden überwiegend Klone identifiziert, die keinen Aminosäure-Austausch an Position 2 aufwiesen. Da die DNA-Region für Position 2 sehr GC-reich ist, wird vermutet, dass überwiegend Primer mit dem Codon TCC aus dem degenerierten Primergemisch an die Template-DNA binden und somit die Mutationseffizienz stark reduziert wird. In einem weiteren Mutagenese-Ansatz wurden Primer eingesetzt, die das Wildtyp-Codon an Position 2 (TCC) ausschlossen. Auch dieser Mutagenese-Ansatz lieferte eine nicht ausreichende Mutationseffizienz von 40 %. Mit den verschiedenen Mutationsansätzen konnten nur insgesamt neun von 20 möglichen Aminosäuren identifiziert werden.

Um diese schlechte Mutationseffizienz zu umgehen, wurden die fehlenden Aminosäuren für Position 2 mittels site-directed Mutagenese in das MTG-Gen eingeführt (Abschnitt 2.10). Für alle fehlenden Aminosäure-Austausche wurden entsprechend Primer nach der Methode von Zheng konstruiert [Zheng et al., 2004]. In einer PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase wurden die verschiedenen Substitutionen generiert. Nach erfolgreicher Sequenzierung der Klone wurde eine Klonbibliothek mit jeweils vier Klonen pro Aminosäure-Austausch in einer Deep-Well-Platte angelegt.

Die Anzucht der Platten und das Screening auf erhöhte Thermostabilität wurde, wie in Abschnitt 2.21.2 und Abschnitt 2.23 beschrieben, durchgeführt.

In den Untersuchungen auf erhöhte Thermostabilität konnten verschiedene Mutanten identifiziert werden, die eine deutlich höhere Thermostabilität als das rekombinante Wildtyp-Enzym sowie die Mutante MTG-S2P aus der Random Mutagenese aufwiesen. In Abbildung 3-2 ist die ermittelte Thermostabilität für alle Aminosäure-Substitutionen an Position 2 sowie die Aktivität bei 37 °C dargestellt. Für die Ermittlung der Thermostabilität wurde der Quotient aus Restaktivität nach Vorinkubation der Enzymlösung bei 55 °C und Initialaktivität bei Vorinkubation bei 37 °C errechnet.



**Abbildung 3-2: Thermostabilität bei 55 °C und 60 °C sowie Aktivität bei 37 °C der Mutanten für Position 2.** Die Anzucht der Bibliothek erfolgte in LB<sub>Amp</sub>-Medium für 18 h bei 37 °C mit anschließender Expression der Pro-MTG in Autoinduktionsmedium über eine Dauer von 24 h bei 28 °C. Nach dem Zellaufschluss mit Lysozym erfolgte die Aktivierung der Pro-MTG mit Dispase I (1 U/mL). Die Aktivität der Mutanten wurde nach Vorinkubation bei 55 °C für 32 min bzw. bei 60 °C für 5 min mittels Hydroxamat-Test bei 37 °C ermittelt (Abschnitt 2.22.1). Die Messung der Extinktion erfolgte in der MTP im FLUOStar Galaxy bei 525 nm. Es wurde die Thermostabilität für die Mutanten durch die Bildung des Quotienten aus Restaktivität [A<sub>R</sub>] und Initialaktivität [A<sub>I</sub>] bestimmt. Als Referenz wurde der rekombinante Wildtyp (Serin an Position 2) [Marx et al., 2007] und die aus der Random Mutagenese stammende Mutante CM203 (MTG-S2P, Prolin an Position 2) [Marx et al., 2008b] mit in der Bibliothek angelegt. Die Klonbibliothek enthielt jeweils vier einzelne Klone pro Aminosäure-Substitution. Für die Mutanten mit den Austauschen von Serin an Position 2 gegen Glycin und Tryptophan konnte keine Aktivität bei 37 °C bestimmt werden, diese waren vollständig inaktiv.

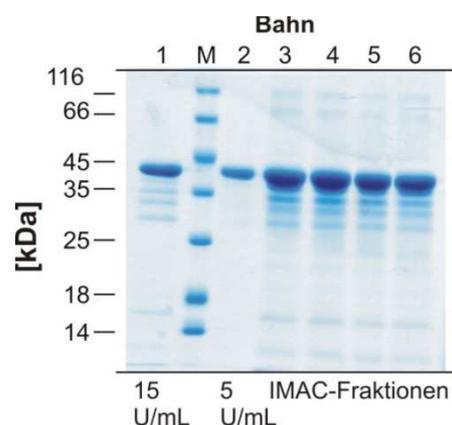
Es zeigte sich, dass der Austausch von Serin an Position 2 gegen Glycin und Tryptophan zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms führte (Abbildung 3-2). Für diese MTG-Varianten konnte keine Aktivität bei 37 °C bestimmt werden. Der Austausch zu Glutamat führte zu keiner Verbesserung der Thermostabilität. Es konnte für diese Mutante keine Restaktivität nach Inkubation bei 55 °C bestimmt werden. Neun Aminosäure-Substitutionen wurden identifiziert, die eine vergleichbare bzw. höhere Thermostabilität wie die aus der Random Mutagenese stammende MTG-Variante mit Prolin an Position 2 besaßen. Auf

Grund der hohen Thermostabilität dieser Mutanten wurde in einem weiteren Screening auch die Stabilität der MTG-Varianten bei 60 °C untersucht. Das Screening wurde ebenfalls wie in Abschnitt 2.23 beschrieben durchgeführt. Nach 5-minütiger Inkubation der Enzymlösungen bei 60 °C wurde die Restaktivität mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Die ermittelte Thermostabilität für alle Aminosäure-Substitutionen an Position 2 ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

Im Screening auf erhöhte Thermostabilität bei 60 °C wurden zwei Aminosäure-Austausche (S2Y und S2M) identifiziert, die eine deutlich höhere Stabilität im Vergleich zu der thermostabilen Variante MTG-S2P aus der Random Mutagenese besitzen. Eine vergleichbare Thermostabilität wie die MTG-S2P besitzen die MTG-Varianten mit Cystein, Leucin und Phenylalanin an Position 2. Die Mutanten KB2M (Mutation: TCC → ATG; Aminosäure-Substitution: Ser → Met) und KB2Y (Mutation: TCC → TAT; Aminosäure-Substitution: Ser → Tyr) wurden für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

### 3.1.4 Charakterisierung ausgewählter thermostabiler Varianten

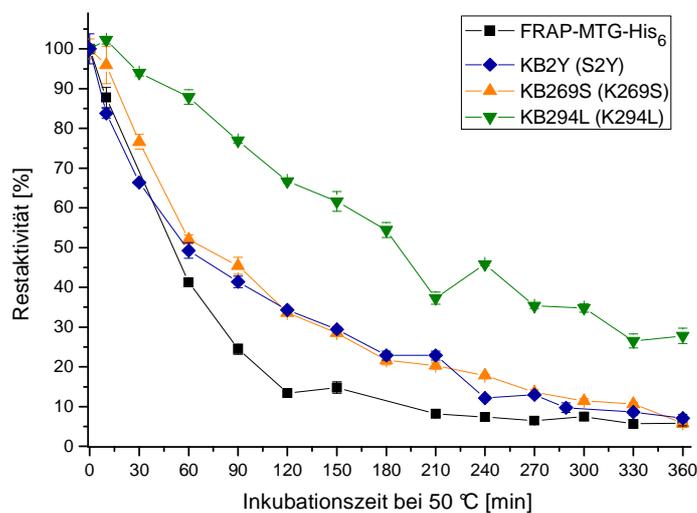
Einige ausgewählte thermostabile MTG-Mutanten wurden für eine nähere Charakterisierung im 100 mL-Maßstab im Schüttelkolben produziert (Abschnitt 2.21.1), mit der Protease Proteinase K aktiviert (Abschnitt 2.27) und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 2.28.1). Die Enzymvarianten wurden bezüglich der Halbwertszeit bei 50 °C und 60 °C sowie der spezifischen Aktivität bei verschiedenen Temperaturen charakterisiert. Abbildung 3-3 zeigt exemplarisch die Reinheit der Enzympräparation für die MTG-Variante KB269D.



**Abbildung 3-3: Reinheit der Enzympräparation der Mutante KB269D für die Charakterisierung.** SDS-PAGE-Gel mit den für die Charakterisierung verwendeten Verdünnungen der Enzympräparation nach der Gel-Permeations-Chromatographie (Bahn 1: 15 U/mL Bestimmung der Halbwertszeit bei 50 °C und 60 °C, Bahn 2: 5 U/mL Bestimmung der spezifischen Aktivität) sowie der Fraktionen nach der Affinitätschromatographie, die für den Pufferwechsel vereinigt wurden (Bahnen 3 - 6). Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 µL Probe und 5 µL Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. M: Molekulargewichtsmarker.

Die Reinheit der Enzympräparationen thermostabiler Varianten wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Die untersuchten Enzympräparationen wiesen jeweils eine Reinheit von mehr als 95 % auf.

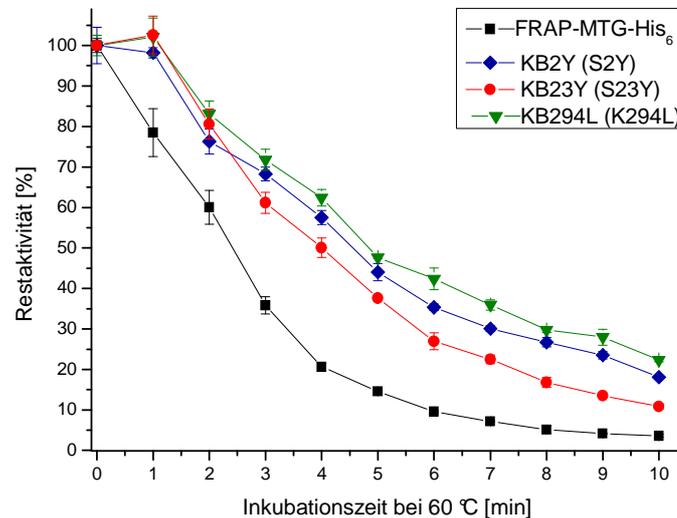
Die Bestimmung der Halbwertszeit bei 50 °C für die verschiedenen Mutanten zeigte, dass für nahezu alle Mutanten aus der Sättigungsmutagenese eine Steigerung der Halbwertszeit erreicht werden konnte (Tabelle 3-2). Das Inaktivierungsverhalten dreier ausgewählter MTG-Varianten ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Im Vergleich zur unveränderten, rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> zeigten die Mutanten eine deutlich verlangsamte Inaktivierung. Die MTG-Variante mit der Aminosäure-Substitution K294L besitzt eine 4,5-fach höhere Halbwertszeit bei 50 °C. Die Halbwertszeit konnte von 41,8 min auf 189 min gesteigert werden.



**Abbildung 3-4: Inaktivierungsverhalten ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten bei 50 °C.** Dargestellt sind das rekombinante, unveränderte Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) sowie die MTG-Varianten (KB2Y, KB269S und KB294L) aus der Sättigungsmutagenese mit der höchsten Thermostabilität bei 50 °C. Die Inkubation bei 50 °C erfolgte im Thermocycler. Es wurden 35 µL Enzymlösung (15 U/mL) in einem PCR-Gefäß für die entsprechenden Zeiten inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und der Hydroxamat-Test für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt und die Restaktivität auf 100 % der Nullprobe bezogen.

Alle ausgewählten Mutanten zeigten jeweils eine erhöhte Restaktivität nach 10-minütiger Inkubation bei 60 °C und eine höhere Halbwertszeit im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym (Tabelle 3-2). Drei der durch Sättigungsmutagenese erhaltenen Mutanten (S2Y, S23Y und K294L) zeigten eine deutlich langsamere Inaktivierung bei 60 °C (Abbildung 3-5) im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) und den bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannten thermostabilen Mutanten aus der Random Mutagenese mit den Hot Spots S2P, S23L und K294M-N184S (Tabelle 3-2). Für die MTG-Variante mit der Aminosäure-Substitution S23Y wurde eine Halbwertszeit  $t_{1/2}(60\text{ °C})$  von 3,3 min bestimmt. Dies entspricht einer Steigerung von  $t_{1/2}(60\text{ °C})$  um das 1,7-fache. Der Aminosäure-

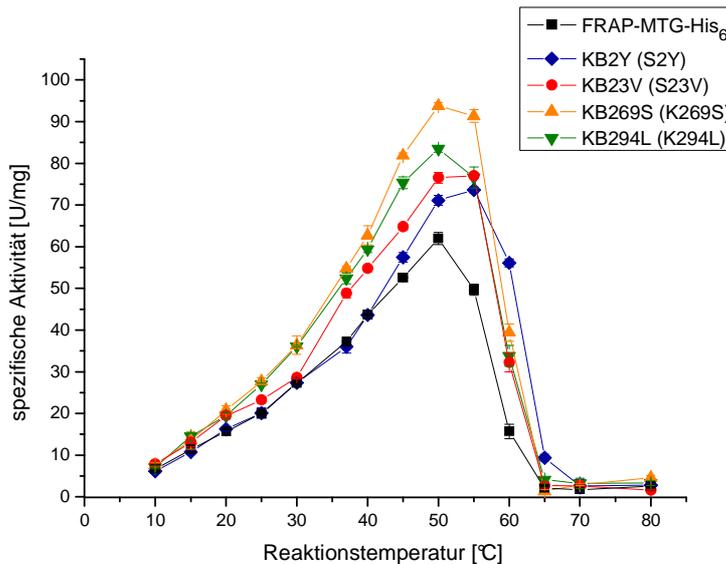
Austausch von Ser<sup>2</sup> zu einem Tyrosin führte zu einer doppelt so hohen Halbwertszeit bei 60 °C wie für das Wildtyp-Enzym. Der Austausch von Lys<sup>294</sup> zu Leucin steigerte die Halbwertszeit bei 60 °C gegenüber der unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> von 2,0 min auf 4,6 min.



**Abbildung 3-5: Inaktivierungsverhalten von ausgewählten thermostabilen MTG-Varianten bei 60 °C.** Es sind das rekombinante, unveränderte Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) sowie die MTG-Varianten (KB2Y, KB23Y und KB294L) aus der Sättigungsmutagenese mit der höchsten Thermostabilität bei 60 °C dargestellt. Die Inkubation bei 60 °C erfolgte im Thermocycler. Es wurden 35 µL Enzymlösung (15 U/mL) in einem PCR-Gefäß für die entsprechenden Zeiten inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und der Hydroxamat-Test für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt und die Restaktivität auf 100 % der Nullprobe bezogen.

Neben der Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens der thermostabilen Mutanten wurden außerdem die spezifische Aktivität bei verschiedenen Temperaturen und das Temperaturoptimum bestimmt. In Abbildung 3-6 ist die spezifische Aktivität einiger ausgewählter Varianten in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

Die Variante S2Y zeigt bei 37 °C eine mit dem rekombinanten Wildtyp-Enzym vergleichbare spezifische Aktivität (26 U/mg). Bei 60 °C ist ein deutlich größerer Unterschied zu erkennen, allerdings wird dieser vermutlich durch die thermische Inaktivierung der FRAP-MTG-His<sub>6</sub> hervorgerufen. Die Mutante KB2Y besitzt außerdem ein um ca. 5 °C erhöhtes Temperaturoptimum. Eine Erhöhung des Temperaturoptimums konnte für weitere Aminosäure-Substitutionen (S2M, S23I und K294V) ermittelt werden (Tabelle 3-2).



**Abbildung 3-6: Spezifische Aktivität ausgewählter MTG-Varianten.** Die spezifische Aktivität der unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> sowie von vier thermostabilen MTG-Varianten (KB2Y, KB23V, KB269S und KB294L) wurde in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die Substratlösung wurde für 2 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert und anschließend der Hydroxamat-Test für 10 min durchgeführt.

Außerdem konnte für die Mutanten K294I, K269S und K269D eine Steigerung der spezifischen Aktivität im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym beobachtet werden (Tabelle 3-2). Die Mutanten K269D und K294I besitzen eine spezifische Aktivität von 44 U/mg bzw. 42 U/mg. Diese Werte sind vergleichbar mit der Mutante MTG-S2P aus der Random Mutagenese, die eine spezifische Aktivität von 46 U/mg besitzt.

Insgesamt konnten an vier von sieben Hot Spots für erhöhte Thermostabilität der MTG verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die zu einer weiteren Erhöhung der Thermostabilität des Enzymes führen.

**Tabelle 3-2: Vergleich biochemischer Eigenschaften der unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> und thermostabiler Varianten aus der Sättigungsmutagenese.** Das rekombinante Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, [Marx et al., 2007]) und die Mutanten aus der Random Mutagenese (CM203, CM205, CM213 und CM227, [Marx et al., 2008b]) wurden wie in Abschnitt 2.29 beschrieben charakterisiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels UV-Absorption bei 280 nm bestimmt.  $t_{1/2}$  ist die Zeit, nach der 50 % Restaktivität nach einer Inkubation für 10 min bei 60 °C bzw. 360 min bei 50 °C vorhanden ist.

MTG-Typ	Mutation	T <sub>opt</sub> [°C]	spez. Aktivität	t <sub>1/2</sub> (60 °C)	Relative Zunahme	t <sub>1/2</sub> (50 °C)	Relative Zunahme
			bei 37 °C [U/mg]	[min]	t <sub>1/2</sub> (60 °C) [-fach]	[min]	t <sub>1/2</sub> (50 °C) [-fach]
FRAP-MTG-His <sub>6</sub>		50	26	2,0	-	41,8	-
CM203	S2P	55	46	2,9	1,4	65,3	1,6
KB2M	S2M	55	28	3,1	1,6	93,8	2,2
KB2Y	S2Y	55	26	4,1	2,0	79,7	1,9
CM205	S23L	50	34	2,8	1,4	62,7	1,5
KB23I	S23I	55	33	3,0	1,5	54,2	1,3
KB23V	S23V	50-55	35	2,8	1,4	80,4	1,9
KB23Y	S23Y	50	32	3,3	1,7	74,8	1,8
CM213	K269E	50	24	2,8	1,4	75,4	1,8
KB269D	K269D	50	44	2,2	1,1	60,2	1,4
KB269S	K269S	50	39	2,8	1,4	80,1	1,9
CM227	N184S, K294M	50	35	3,4	1,7	105,3	2,5
KB294I	K294I	50	42	3,2	1,6	108,7	2,6
KB294L	K294L	50	37	4,5	2,3	188,9	4,5
KB294V	K294V	50-55	34	3,3	1,6	70,0	1,7

## 3.2 DNA- Shuffling

Um die Thermostabilität der mikrobiellen Transglutaminase weiter zu erhöhen, wurde versucht einzelne Mutanten aus der Random Mutagenese und der Sättigungsmutagenese zu kombinieren. Dafür wurde die Methode des DNA-Shufflings gewählt.

### 3.2.1 Auswahl der Mutanten für das DNA-Shuffling

Für die In-vitro-Rekombination unterschiedlicher thermostabiler MTG-Varianten wurden verschiedene Aminosäure-Substitutionen aus der Random Mutagenese und der Sättigungsmutagenese ausgewählt, um die Anzahl an möglichen Kombinationen und damit die Anzahl der zu untersuchenden Klone einzugrenzen.

Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben konnten mittels Sättigungsmutagenese keine Aminosäure-Substitutionen für Positionen 24, 257 und 289 identifiziert werden, die zu einer weiteren Verbesserung der Thermostabilität geführt hätten. Daher wurden für die Rekombination die Mutanten aus der Random Mutagenese CM201 (Y24N), CM211 (G257S) und CM224 (H289Y) als Template-DNA eingesetzt.

Für die Positionen 2, 23, 269 und 294 waren verschiedene Aminosäure-Substitutionen identifiziert worden, die zu einer weiteren Steigerung der Thermostabilität der MTG führten. An Aminosäure-Position 2 zeigte der Austausch zu Tyrosin die höchste Thermostabilität bei 60 °C. Für Position 23 konnten verschiedene Aminosäure-Substitutionen identifiziert werden, die zu vergleichbaren Thermostabilitäten führten. Da ein Austausch von Ser<sup>23</sup> zu Valin zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität führte, wurde die Mutante KB23V für die Rekombination ausgewählt. Auch die MTG-Variante KB269S besitzt eine höhere spezifische Aktivität sowie eine erhöhte Thermostabilität im Vergleich zur Mutante CM213 (K269E) aus der Random Mutagenese. Für Position 294 konnten ebenfalls verschiedene Aminosäure-Austausche identifiziert werden, die zu einer Erhöhung der Thermostabilität bei 50 °C und 60 °C führten. Die Substitution Lys<sup>294</sup> zu Leucin resultierte in der höchsten Steigerung der Halbwertszeit, daher sollte diese Aminosäure mit anderen Hot Spots kombiniert werden.

### 3.2.2 MTG-Doppelmutante UHS23V-Y24N

Nach Analyse der Abstände zwischen den zu kombinierenden Aminosäuren und einer Literaturrecherche zu Methoden des DNA-Shufflings wurde entschieden, zunächst eine Doppelmutante mit Position 23 und 24 zu generieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass die DNase I genau zwischen Position 23 und 24 schneidet, war sehr gering. Dadurch wären Kombinationen der Hot Spots mit diesen Positionen in einer Mutante nicht aufgetreten. Zuvor sollte allerdings untersucht werden, ob sich die Kombination beider Positionen positiv auf die Thermostabilität auswirkt. Falls eine weitere Steigerung der Thermostabilität durch den

Austausch beider Aminosäuren erzielt werden würde, sollte die Doppelmutante als Template-DNA für Position 23 und 24 im DNA-Shuffling eingesetzt werden.

Die Doppelmutante wurde mittels site-directed Mutagenese, wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, erzeugt. Der Klon wurde in gleicher Weise wie die thermostabilen MTG-Varianten aus der Sättigungsmutagenese angezogen (Abschnitt 2.21.1). Nach dem Zellaufschluss (Abschnitt 2.26), der Aktivierung der Pro-MTG mit Proteinase K (Abschnitt 2.27) und der Reinigung mittels Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.28.1) wurde die MTG-Variante hinsichtlich der Thermostabilität bei 50 °C und 60 °C sowie des Temperaturoptimums untersucht (Abschnitt 2.29).

Für die Doppelmutante UHS23V-Y24N konnte eine Halbwertszeit von 8,7 min bei 60 °C bestimmt werden. Dies entspricht einer relativen Steigerung der Halbwertszeit um das 4,4-fache im Vergleich zur unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (Tabelle 3-4, Seite 82). Die Halbwertszeit bei 50 °C konnte sogar um den Faktor 7 gesteigert werden. Für diese Mutante wurde ebenfalls die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die MTG-Variante UHS23V-Y24N ein um 5 °C verschobenes Temperaturoptimum (55 °C) besitzt. Außerdem wurde eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität auf 38 U/mg bei 37 °C durch die Kombination der Aminosäure-Substitutionen S23V und Y24N beobachtet (Tabelle 3-4).

### 3.2.3 In-vitro-Rekombination von Hot Spots

Für die In-vitro-Rekombination mussten die sechs ausgewählten MTG-Gene präpariert werden. Nach Zhao und Arnold [Zhao und Arnold, 1997b] sollte die beste Rekombinationsrate für aktive Klone durch die Isolation der zu kombinierenden Gene aus Plasmidpräparationen mit anschließendem Doppelrestriktionsverdau erzielt werden. Für den folgenden Schritt der DNase I-Restriktion sollte eine DNA-Menge von mindestens 2 µg eingestellt werden, wobei die einzelnen Gene in gleichverteilten Mengen vorliegen [Zhao und Arnold, 1997b]. Zunächst wurde versucht, die MTG-Gene aus den entsprechenden Plasmidpräparationen zu isolieren. Nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Nde*I und *Xho*I wurden die Ansätze über ein 0,8 %iges Agarosegel nach der Größe getrennt. Die Banden bei ca. 1100 Bp wurden ausgeschnitten und die DNA mittels „Gene Jet Gel Extraction Kit“ isoliert (Abschnitt 2.15). Danach wurde die DNA-Konzentration der isolierten Pro-MTG-Sequenzen bestimmt (Abschnitt 2.14). Für die benötigte Konzentration im DNase-I Verdau von mindestens 2 - 4,5 µg [Lorimer und Pastan, 1995; Zhao und Arnold, 1997b], sollte bei sechs Pro-MTG-Sequenzen eine DNA-Menge von mindestens 333 - 750 ng pro Gen vorliegen. Auch nach mehrmaligen Versuchen der Präparation der MTG-Varianten-Gene, waren die Konzentrationen nach Restriktionsverdau und Gelelution zu gering. Daher wurde dazu übergegangen, die nötige DNA-Menge der Gene über PCR-

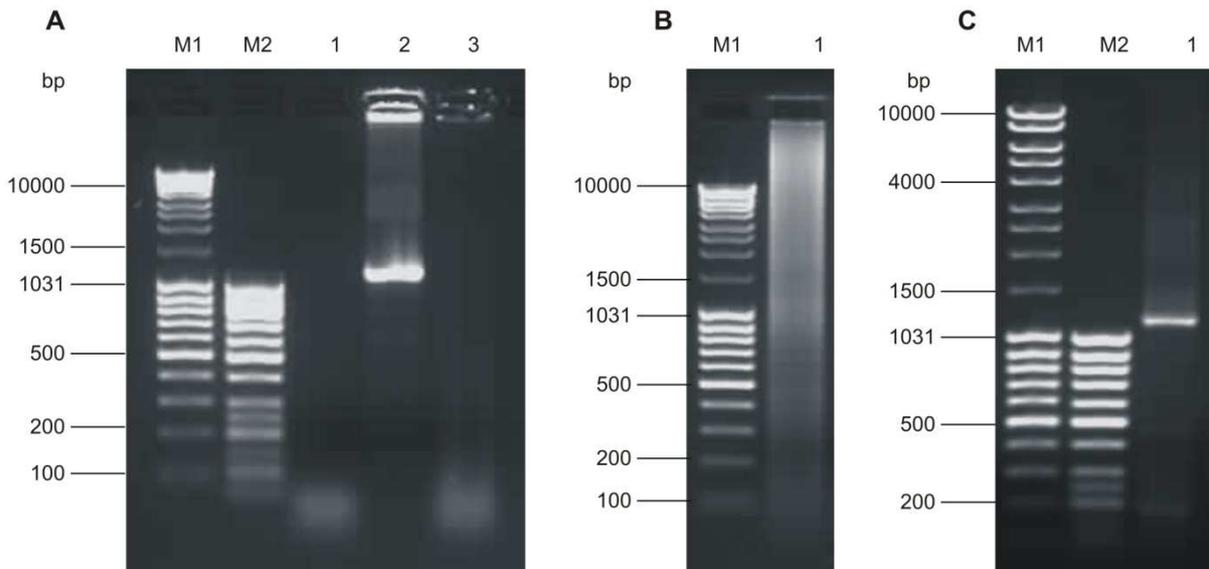
Amplifikation zu gewinnen. Auch diese Methode war bereits durch Zhao und Arnold beschrieben worden [Zhao und Arnold, 1997b].

Die Pro-MTG-Sequenzen wurden, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, amplifiziert. Nach erfolgreicher Amplifikation wurde mittels *Dpn* I-Verdau das Template-Plasmid, wie in Abschnitt 2.9 beschrieben, fragmentiert. Alle Ansätze wurden über das MSB<sup>®</sup> PCRapace Kit gereinigt (Abschnitt 2.18) und anschließend die DNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 2.14). Für drei der zu kombinierenden Gene wurde eine zufriedenstellende DNA-Konzentration erhalten. Bei den anderen drei Ansätzen (KB269S, KB294L und UHS23V-Y24N) wurde die Menge mit entsprechender DNA aus durch Plasmidpräparation und Restriktionsverdau isolierten Genen aufgefüllt. Pro Gen wurde eine DNA-Konzentration von 450 ng eingestellt. Alle sechs Pro-MTG-Sequenzen wurden vereinigt und die Flüssigkeit mittels Vakuumzentrifuge (SpeedVac) verdampft. Die vorliegende DNA-Menge der vereinten MTG-Gene betrug insgesamt 2,7 µg im Reaktionsgefäß.

Für eine gute Reassemblierungsrate sollte die Fragmentgröße zwischen 10 Bp und 50 Bp liegen [Lorimer und Pastan, 1995]. Dafür wurde die DNase I-Endonuklease verwendet, die in Gegenwart von Mangan doppelsträngige DNA schneidet und glatte Enden erzeugt. Die vereinigten Pro-MTG-Gene wurden, wie in Abschnitt 2.11.1 beschrieben, fragmentiert. Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In Abbildung 3-7 ist der Fragmentierungsansatz vor und nach DNase I-Behandlung dargestellt. Die ca. 1,1 kBp großen MTG-Sequenzen wurden durch die DNase I in die gewünschten Fragmente, die kleiner als 50 Bp sind, zerlegt (Abbildung 3-7 A, Bahn 3).

Vor der Reassemblierung der parentalen Sequenzfragmente wurde zunächst der komplette Ansatz über eine Säule („Centri Sep Column“, Abschnitt 2.11.1) gereinigt. Die Verwendung dieser Säulen wurde sowohl von Lorimer und Pastan, als auch von Zhao und Arnold beschrieben [Lorimer und Pastan, 1995; Zhao und Arnold, 1997b]. Sie dienen dem Entfernen von dsDNA-Fragmenten <16 Bp und anderen störenden Ionen oder Kleinstfragmenten, welche die DNA-Polymerase beeinflussen können. Die Reassemblierungs-PCR wurde, wie in Abschnitt 2.11.2 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 3-7 B ist das Produkt der Reassemblierung dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass wie in der Literatur beschrieben, ein „Schmier“ durch das Zusammenlagern der DNA-Fragmente zu unterschiedlich langen Sequenzen entstanden ist.

Um die kombinierten Pro-MTG-Sequenzen mit der ursprünglichen Länge zu isolieren, wurde 1 µL des Reassemblierungs-Ansatzes in einer PCR zur Amplifikation der Pro-MTG eingesetzt (Abschnitt 2.11.3). Es konnte gezeigt werden, dass ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1100 Bp entstanden ist (Abbildung 3-7 C).



**Abbildung 3-7: Auswertung der Agarose-Gelelektrophoresen aus DNase I-Verdau, Reassemblierungs-PCR und Amplifikation der Pro-MTG-Sequenzen.** M1: Massrunder DNA Ladder Mix (Fermentas) [5  $\mu$ L]; M2: GeneRuler 50 Bp DNA Ladder (Fermentas) [5  $\mu$ L]. **(A) Fragmentierung durch DNase I** (2,0 % Agarosegel); Bahn 1: Positivkontrolle (Primer rev-S2P 1:3 verdünnt, 32 Bp) [2  $\mu$ L]; Bahn 2: Fragmentierungsansatz vor DNase I-Behandlung [10  $\mu$ L]; Bahn 3: Fragmentierungsansatz nach DNase I-Behandlung [10  $\mu$ L]. **(B) Reassemblierungs-PCR** (1,8 % Agarosegel); Bahn 1: PCR-Produkt aus Reassemblierung [5  $\mu$ L] **(C) Amplifikations-PCR** (1 % Agarosegel); Bahn 1: Amplifikation Pro-MTG-Sequenz mit den Primer fw-MTG-NdeI und rev-MTG-XhoI [5  $\mu$ L].

Die kombinierten Pro-MTG-Sequenzen wurden anschließend in den Vektor pET20b(+) kloniert (Abschnitt 2.16 und Abschnitt 2.17). Nach der Elektrotransformation der Ligationsansätze in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Gold(DE3) wurden zufällig ausgewählte Klone mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein der Pro-MTG-Sequenz untersucht (Abschnitt 2.8.2). Es konnte für sechs von sieben Klonen ein 1100 Bp großes Insert nachgewiesen werden. Diese Klone wurden anschließend hinsichtlich eines Rekombinationsereignisses untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass drei Klone zusätzliche Punktmutationen besaßen. Insgesamt konnte durch die Sequenzierung verschiedener Ligationsansätze nachgewiesen werden, dass es durch die verwendete Methode des DNA-Shuffling zu ausreichenden Rekombinationsereignissen gekommen ist. Das bedeutet, dass rekombinierte MTG-Sequenzen im gesamten Ansatz vorhanden waren.

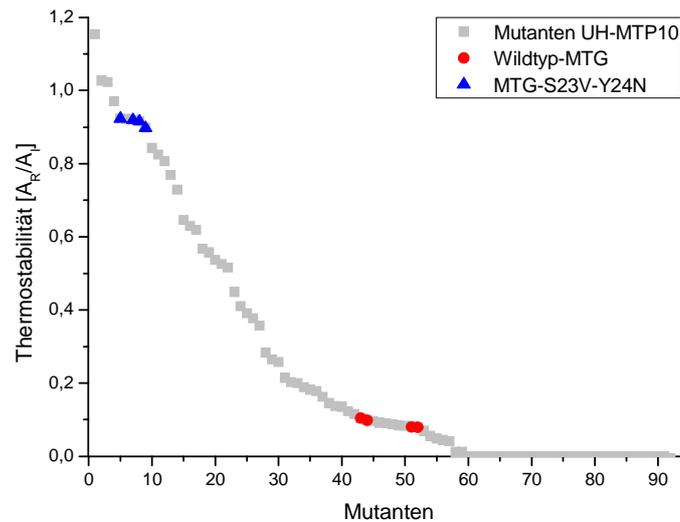
Die Klonbibliothek für das DNA-Shuffling wurde in 18 Deep-Well-Platten mit insgesamt 1512 verschiedenen Klonen angelegt. Die Anzucht erfolgte wie in Abschnitt 2.21.2 beschrieben.

### 3.2.4 Screening der Klonbibliothek auf verbesserte Thermostabilität

Die Klonbibliothek des DNA-Shufflings wurde hinsichtlich erhöhter Thermostabilität, wie in Abschnitt 2.23 beschrieben, untersucht. Von insgesamt 1512 Klonen waren 791 bei 37 °C aktiv. Die Wahl der aktiven Klone wurde nach Zhao und Arnold vorgenommen. Dabei werden

alle Klone, die eine Enzymaktivität über 10 % des Wildtyp-Enzyms besitzen, als aktiv bezeichnet [Zhao und Arnold, 1997b]. Danach ergibt sich in der vorliegenden Arbeit für die verwendete Methode des DNA-Shufflings eine Häufigkeit an aktiven Klonen von 52 %.

Für die Ermittlung der Thermostabilität wurde der Quotient aus Restaktivität nach Vorinkubation der Enzymlösung bei 55 °C und Initialaktivität bei Vorinkubation bei 37 °C errechnet. In Abbildung 3-8 ist exemplarisch die Thermostabilität aller Klone von Platte UH-MTP10 dargestellt.



**Abbildung 3-8: Thermostabilität aller Klone von Platte UH-MTP10 bei 55 °C.** Die Thermostabilität wurde über den Quotient aus Restaktivität nach Vorinkubation der Enzymlösung bei 55 °C [A<sub>R</sub>] und Initialaktivität bei Vorinkubation bei 37 °C [A<sub>I</sub>] errechnet. Als Referenz wurde die rekombinante Wildtyp-MTG [Marx et al., 2007] und die mittels site-directed Mutagenese generierte Doppelmutante MTG-S23V-Y24N in der Bibliothek angelegt. Die Anzucht der Bibliothek erfolgte in LB<sub>Amp</sub>-Medium für 18 h bei 37 °C und anschließender Expression der Pro-MTG im Autoinduktionsmedium über eine Dauer von 24 h bei 28 °C. Nach dem Zellaufschluss mit Lysozym erfolgte die Aktivierung der Pro-MTG mit Dispase I (1 U/mL). Die Aktivität der Mutanten wurde nach Vorinkubation bei der entsprechenden Temperatur mittels Hydroxamat-Test bei 37 °C ermittelt (Abschnitt 2.22.1). Die Messung der Extinktion erfolgte in der MTP im FLUOStar Galaxy bei 525 nm. Es wurde die Thermostabilität der Klone in absteigender Reihenfolge aufgetragen.

Am Beispiel von Platte UH-MTP10 ist deutlich zu erkennen, dass das rekombinante Wildtyp-Enzym nach Vorinkubation der Enzymlösung bei 55 °C für 32 min die Aktivität fast vollständig verloren hatte. Auch viele MTG-Varianten, die eine vergleichbare Initialaktivität wie das Wildtyp-Enzym hatten, waren nach der Vorinkubation bei 55 °C fast vollständig inaktiv. Bei Platte UH-MTP10 besaßen ca. 30 Klone eine Thermostabilität zwischen dem Wildtyp-Enzym und der Doppelmutante S23V-Y24N. Für vier Klone konnte nach der Inkubation bei 55 °C eine Restaktivität bestimmt werden, die vergleichbar mit der Initialaktivität war. Somit wurde eine Thermostabilität von über eins für diese Mutanten ermittelt (Abbildung 3-8).

Unter den insgesamt 1512 Klonen zeigten 116 Mutanten eine deutlich höhere Restaktivität nach der Vorinkubation bei 55 °C als das rekombinante Wildtyp-Enzym. Für die Sequenzierung wurden 35 Klone ausgewählt, deren Thermostabilität höher als das Verhältnis zwischen Restaktivität zu Initialaktivität der Mutante MTG-S23V-Y24N war. Von den sequenzierten Klonen besaßen nur 13 Klone gewünschte Rekombinationsereignisse ohne zusätzliche Punktmutationen. In Tabelle 3-3 sind die identifizierten Rekombinationsereignisse zusammengefasst. Es konnten insgesamt sechs Klone mit verschiedenen Aminosäure-Substitutionen identifiziert werden.

**Tabelle 3-3: Basen- und Aminosäure-Substitutionen ausgewählter FRAP-MTG-His<sub>6</sub>-Mutanten aus dem DNA-Shuffling.** Die Mutanten wurden in einem Screening auf erhöhte Thermostabilität identifiziert.

Mutant ID	Position	Mutation	Aminosäure-Substitution
UH301	23	TCG → GTG	Ser → Val
	24	TAC → AAC	Tyr → Asn
	289	CAT → TAT	His → Tyr
UH302	23	TCG → GTG	Ser → Val
	24	TAC → AAC	Tyr → Asn
	269	AAG → TCG	Lys → Ser
	289	CAT → TAT	His → Tyr
UH303	2	TCC → TAT	Ser → Tyr
	289	CAT → TAT	His → Tyr
	294	AAG → CTT	Lys → Leu
UH304	23	TCG → GTG	Ser → Val
	24	TAC → AAC	Tyr → Asn
	269	AAG → TCG	Lys → Ser
UH306	2	TCC → TAT	Ser → Tyr
	23	TCG → TAT	Ser → Tyr
	289	CAT → TAT	His → Tyr
UH307	23	TCG → GTG	Ser → Val
	24	TAC → AAC	Tyr → Asn
	257	GGC → AGC	Gly → Ser
	289	CAT → TAT	His → Tyr
UH308-B	23	TCG → GTG	Ser → Val
	24	TAC → AAC	Tyr → Asn
	294	AAG → CTT	Lys → Leu
UH309	2	TCG → TAT	Ser → Tyr
	23	TCG → TAT	Ser → Tyr
	294	AAG → CTT	Lys → Leu

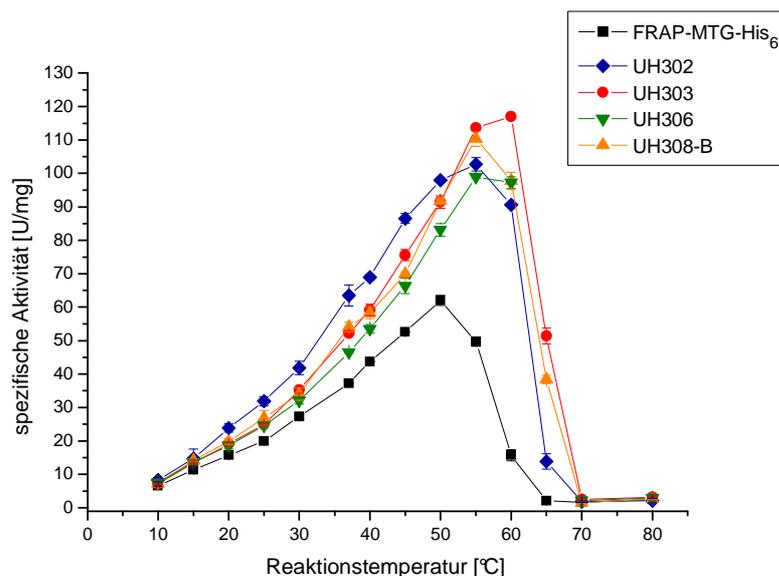
Interessanterweise zeigten zwei MTG-Varianten (UH306 und UH309) eine Punktmutation an Position 23 von Serin zu Tyrosin. Dieser Aminosäure-Austausch muss durch die Amplifikation der Elterngene mittels PCR entstanden sein. Während der Charakterisierung ausgewählter MTG-Varianten aus der Sättigungsmutagenese konnte gezeigt werden, dass

dieser Aminosäure-Austausch ebenfalls zu einer erhöhten Thermostabilität der MTG geführt hatte (Abschnitt 3.1.4). Alle acht thermostabilen MTG-Varianten wurden für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

### 3.2.5 Charakterisierung ausgewählter thermostabiler Varianten

Für eine nähere Charakterisierung wurden die acht thermostabilen MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling im 100 mL-Maßstab exprimiert, mit der Protease Proteinase K aktiviert und über eine Affinitätschromatographie gereinigt. Die Charakterisierung erfolgt wie in Abschnitt 2.29 beschrieben.

In Abbildung 3-9 ist die spezifische Aktivität ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Das Temperaturoptimum des Wildtyp-Enzyms liegt bei 50 °C. Die MTG-Variante UH303 (S2Y-H289Y- K294L) zeigt ein um 10 °C erhöhtes Temperaturoptimum im Vergleich zu der unveränderten, rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub>. Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ist die spezifische Aktivität für MTG-UH303 auf 37 U/mg bei 37 °C erhöht (Tabelle 3-4).

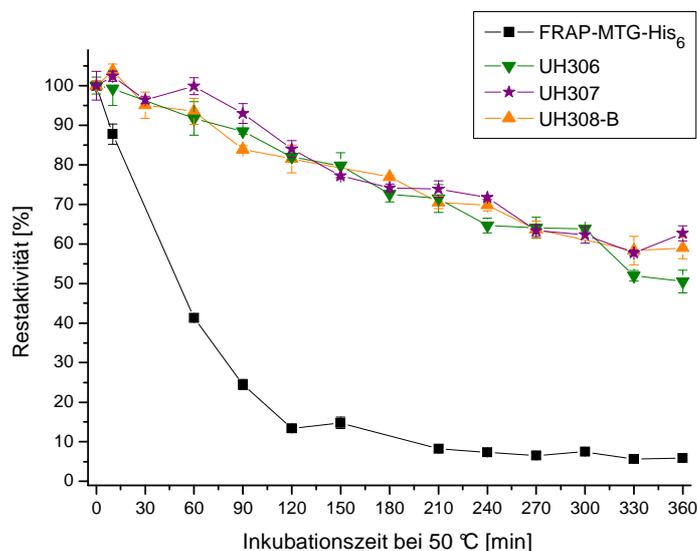


**Abbildung 3-9: Spezifische Aktivität ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten.** Die spezifische Aktivität der unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> sowie von vier thermostabilen MTG-Varianten (UH302, UH303, UH306 und UH308-B) wurde in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die Substratlösung wurde für 2 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert und anschließend der Hydroxamat-Test über 10 min durchgeführt.

Eine Steigerung des Temperaturoptimum um ca. 5 °C konnte für die MTG-Varianten UH302, UH306 und UH308-B ermittelt werden (Abbildung 3-9, Tabelle 3-4). Für die ausgewählten Mutanten konnte eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität zwischen 50 °C und 60 °C im Vergleich zur unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> bestimmt werden (Abbildung 3-9).

Die spezifische Aktivität der Mutante UH302 mit vier Aminosäure-Substitutionen (S23V-Y24N-K269S-H289Y) ist fast doppelt so hoch wie die spezifische Aktivität des rekombinanten Wildtyp-Enzyms und vergleichbar mit der spezifischen Aktivität der Mutante MTG-S2P (Tabelle 3-4).

Die Untersuchungen zur Stabilität der ausgewählten Mutanten bei 50 °C zeigten, dass alle Mutanten ein deutlich langsames Inaktivierungsverhalten haben als die FRAP-MTG-His<sub>6</sub>. Es konnte für die Mutanten aus dem DNA-Shuffling eine Restaktivität zwischen 40 % und 60 % nach der Vorinkubation bei 50 °C über 6 h ermittelt werden. Die Inaktivierungskurven für die MTG-Varianten UH306, UH307 und UH308-B sind in Abbildung 3-10 dargestellt.



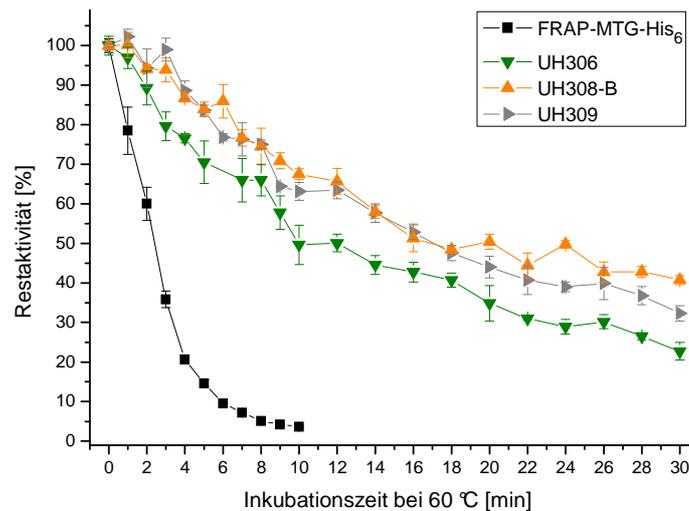
**Abbildung 3-10: Inaktivierungsverhalten ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten bei 50 °C.** Es sind das rekombinante, unveränderte Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) sowie die MTG-Varianten (UH306, UH307 und UH308-B) aus dem DNA-Shuffling mit der höchsten Thermostabilität bei 50 °C dargestellt. Die Inkubation bei 50 °C erfolgte im Thermocycler. Es wurden 35 µL Enzymlösung (15 U/mL) in einem PCR-Gefäß für die entsprechenden Zeiten inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und der Hydroxamat-Test über 10 min bei 37 °C durchgeführt. Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt und die Restaktivität auf 100 % der Nullprobe bezogen.

Für die MTG-Variante UH307, welche drei kombinierte Positionen besitzt, wurde eine 9-fach höhere Halbwertszeit ( $t_{1/2}$  (50 °C) = 391 min) als für das unveränderte Wildtyp-Enzym bestimmt. Die Mutante UH308-B besitzt sogar eine 10-fach höhere Halbwertszeit (409 min) verglichen mit dem Wildtyp-Enzym (Tabelle 3-4).

Die ermittelte Thermostabilität der Doppelmutante S23V-Y24N wurde im Screening der Klonbibliotheken auf erhöhte Thermostabilität als Kriterium für die Auswahl einzelner zu charakterisierenden Klone mit herangezogen. Da für die Doppelmutante S23V-Y24N eine Halbwertszeit bei 60 °C von 8,7 min bestimmt wurde (Abschnitt 3.2.2), wurde für die

Charakterisierung der ausgewählten MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling die Inkubationszeit für die Bestimmung der Halbwertszeit bei 60 °C auf 30 min verlängert.

Alle untersuchten Mutanten zeigten ein deutlich langsames Inaktivierungsverhalten bei 60 °C als das Wildtyp-Enzym. Es wurde für die MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling eine erhöhte Restaktivität nach der Vorinkubation bei 60 °C sowie eine gesteigerte Halbwertszeit ( $t_{1/2}(60\text{ °C})$ ) bestimmt. Abbildung 3-11 zeigt das Inaktivierungsverhalten von drei ausgewählten MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling.



**Abbildung 3-11: Inaktivierungsverhalten ausgewählter thermostabiler MTG-Varianten bei 60 °C.** Es sind das rekombinante, unveränderte Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) sowie die MTG-Varianten (UH306, UH308-B und UH309) aus dem DNA-Shuffling mit der höchsten Thermostabilität bei 60 °C dargestellt. Die Inkubation bei 60 °C erfolgte im Thermocycler. Es wurden 35 µl Enzymlösung (15 U/mL) in einem PCR-Gefäß für die entsprechenden Zeiten inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und der Hydroxamat-Test über 20 min bei 37 °C durchgeführt. Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt und die Restaktivität auf 100 % der Nullprobe bezogen.

Die Halbwertszeit bei 60 °C der MTG-Variante UH306 mit den Austauschen S2Y-S23Y-H289Y konnte um den Faktor 7 auf 14 min gesteigert werden. Die Kombination der Aminosäure-Austausche S2Y, S23Y und K294L führte zu einer Steigerung der Halbwertszeit bei 60 °C von 2 min um das 9,6-fache des rekombinanten Wildtyp-Enzyms auf 19,2 min. Für die Mutante UH308-B mit den Aminosäure-Substitutionen an den Positionen 23, 24 und 294 wurde eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}(60\text{ °C})$ ) von 24 min bestimmt (Tabelle 3-4). Dies entspricht einer 12-fach höheren  $t_{1/2}(60\text{ °C})$  verglichen mit der Halbwertszeit von FRAP-MTG-His<sub>6</sub>.

**Tabelle 3-4: Vergleich biochemischer Eigenschaften der unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> und thermostabiler Varianten aus dem DNA-Shuffling.** Das rekombinante Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, [Marx et al., 2007]) wurde wie in Abschnitt 2.29 beschrieben charakterisiert. Die Proteinkonzentration wurde durch die Messung der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt.  $t_{1/2}$  ist die Zeit, nach der 50 % Restaktivität nach einer Inkubation für 30 min bei 60 °C bzw. 360 min bei 50 °C 50 % vorhanden ist.

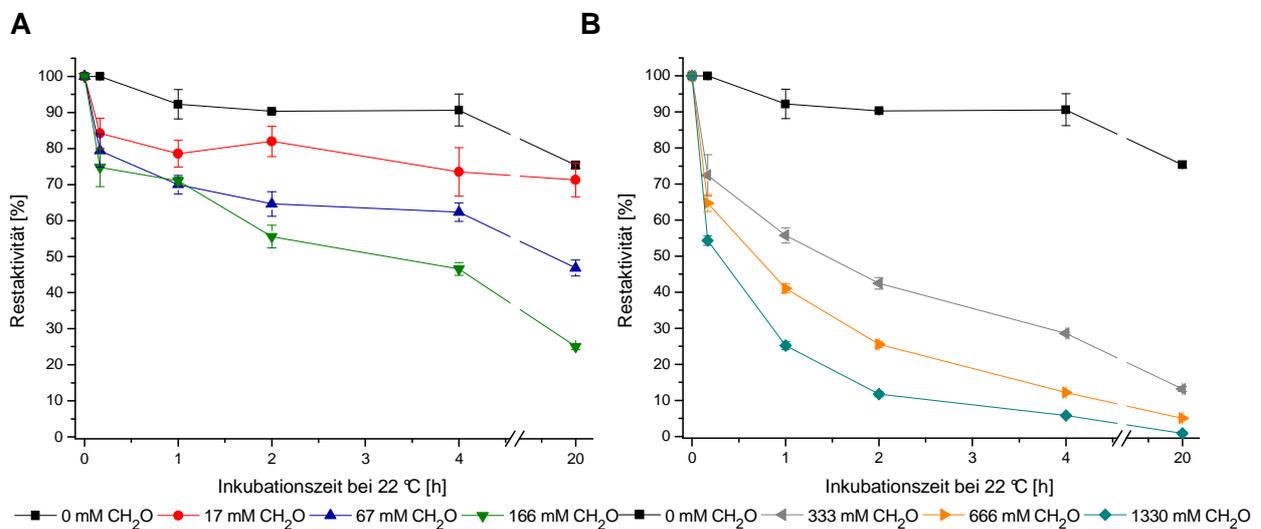
Art MTG	Mutation	T <sub>Opt</sub> [°C]	spez. Aktivität bei 37 °C [U/mg]	t <sub>1/2</sub> (60 °C) [min]	Relative Zunahme t <sub>1/2</sub> (60 °C) [-fach]	t <sub>1/2</sub> (50 °C) [min]	Relative Zunahme t <sub>1/2</sub> (50 °C) [-fach]
FRAP-MTG-His <sub>6</sub>		50	26	2,0	-	41,8	-
UHS23V-Y24N	S23V, Y24N	55	38	8,7	4,4	297,0	7,1
UH301	S23V, Y24N, H289Y	55	25	12,0	6,0	318,0	7,6
UH302	S23V, Y24N, K269S, H289Y	55	45	10,0	5,0	311,0	7,4
UH303	S2Y, H289Y, K294L	60	37	12,5	6,3	382,7	9,1
UH304	S23V, Y24N, K269S	55	28	7,7	3,9	105,8	2,5
UH306	S2Y, S23Y, H289Y	55	33	14,0	7,0	383,0	9,1
UH307	S23V, Y24N, G257S, H289Y	50	23	9,7	4,9	390,8	9,3
UH308-B	S23V, Y24N, K294L	55	39	24,3	12,2	409,0	9,8
UH309	S2Y, S23Y, K294L	50-60	31	19,2	9,6	336,9	8,0

### 3.3 Stabilitätsuntersuchungen der MTG

#### 3.3.1 Einfluss von Formaldehyd

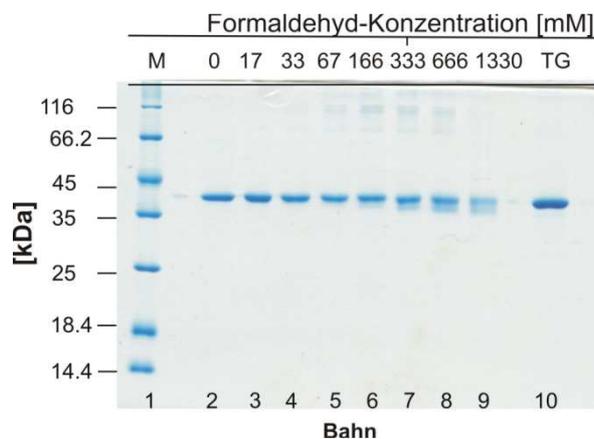
Für die Verwendung von durch die MTG quervernetztem Protein als Bindemittel für Holz, beispielsweise bei der Herstellung von Spanplatten, ist die Kenntnis über die Stabilität des Enzyms notwendig. In Holz und Spanplatten ist jedoch in geringen Mengen Formaldehyd enthalten. Der Einfluss von Formaldehyd auf die MTG-Aktivität wurde, wie in Abschnitt 2.30.1 beschrieben, untersucht. Für die Versuche wurde die unveränderte, rekombinante FRAP-MTG-His<sub>6</sub> in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 verwendet. Das Formaldehyd wurde in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 so verdünnt, dass die Lageransätze Konzentrationen von 0 mM bis 1330 mM Formaldehyd aufwiesen. Die MTG-Aktivität wurde mittels Hydroxamat-Test nach verschiedenen Probenahme-Zeitpunkten, wie in Abschnitt 2.22.1 erläutert, bestimmt.

Die MTG-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei verschiedenen Formaldehyd-Konzentrationen ist in Abbildung 3-12 (A: 17 mM bis 166 mM Formaldehyd und B: 333 mM bis 1330 mM Formaldehyd) dargestellt. Die Restaktivität wurde auf 100 % MTG-Aktivität der Probe zum Zeitpunkt 0 min und 0 mM Formaldehyd bezogen.



**Abbildung 3-12: MTG-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei verschiedenen Formaldehyd-Konzentrationen** (Formaldehyd (CH<sub>2</sub>O) in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0; Proteinkonzentration FRAP-MTG-His<sub>6</sub>: 1 mg/mL, Lagerungstemperatur: 22 °C) **A:** 0 - 161 mM CH<sub>2</sub>O im Inkubationsansatz **B:** 333 - 1330 mM CH<sub>2</sub>O im Inkubationsansatz. Es wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit 50 µL Probe entnommen und 1:10 mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 verdünnt. Die Aktivität wurde mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt. Die Restaktivität wurde auf 100 % der Probe zum Zeitpunkt 0 min und ohne Formaldehyd bezogen.

Während der Inkubation über 20 h bei 22 °C kommt es mit steigender Formaldehyd-Konzentration zu einem deutlichen Aktivitätsverlust der MTG. Der Einfluss von Formaldehyd auf die Stabilität der FRAP-MTG-His<sub>6</sub> ist bei den Konzentrationen 17 mM und 67 mM vergleichsweise gering (Abbildung 3-12 A). Die FRAP-MTG-His<sub>6</sub> zeigt nach 2-stündiger Inkubation über den Konzentrationsbereich von 17 mM bis 167 mM noch mindestens 50 % der Ausgangsaktivität. Nach 20 Stunden Inkubation bei 22 °C ohne Formaldehyd konnte eine Restaktivität von 75 % für die FRAP-MTG-His<sub>6</sub> bestimmt werden. Interessanterweise konnte für die FRAP-MTG-His<sub>6</sub> in Anwesenheit von 17 mM Formaldehyd über 20 h eine Restaktivität von 70 % bestimmt werden (Abbildung 3-12 A). Die Untersuchungen verdeutlichten, dass Formaldehyd-Konzentrationen über 333 mM zu einer deutlich schnelleren Inaktivierung der MTG führten (Abbildung 3-12 B). Bereits nach 5-minütiger Inkubation in Anwesenheit von 333 mM Formaldehyd konnten nur noch 70 % der Ausgangsaktivität bestimmt werden. Mittels SDS-PAGE wurde analysiert, ob der Aktivitätsverlust der MTG mit steigender Formaldehyd-Konzentration im Zusammenhang mit einer Quervernetzung des Enzyms steht. Dazu wurden Proben aus den Ansätzen (Inkubationszeit: 2 h) auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.



**Abbildung 3-13: Einfluss der Formaldehyd-Konzentration auf die FRAP-MTG-His<sub>6</sub>.** SDS-PAGE-Gel zur Analyse einer Quervernetzung der FRAP-MTG-His<sub>6</sub> durch verschiedene Formaldehyd-Konzentrationen nach 2 h Inkubation bei 22 °C. 50 µL wurden den Inkubationsansätzen entnommen und 1:10 mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 verdünnt. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 µL Probe und 5 µL Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. M: Molekulargewichtsmarker, TG: FRAP-MTG-His<sub>6</sub> mit Proteinase K aktiviert in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0.

Anhand des SDS-PAGE-Gels (Abbildung 3-13) zeigte sich, dass es mit steigender Formaldehyd-Konzentration zu einer Abnahme der Bandenintensität der MTG (39 kDa) kam. Interessanterweise konnte die Zunahme einer weiteren Bande mit etwas niedrigerem Molekulargewicht an Hand des SDS-PAGE-Gels nachgewiesen werden. Desweiteren konnte die Zunahme von hochmolekularen Banden bei Formaldehyd-Konzentrationen zwischen 66 mM und 1330 mM beobachtet werden, was auf eine Quervernetzung hindeutet.

Die Massenzunahme der MTG in Gegenwart von 17 mM und 133 mM Formaldehyd sollte mittels einer MALDI-TOF-Analyse nachgewiesen werden. Um hierfür eine ausreichende Proteinmenge bereitzustellen, wurde die Proteinkonzentration im Inkubationsansatz auf 4 mg/mL erhöht. Die Inkubation der FRAP-MTG-His<sub>6</sub> erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen für 24 h bei 22 °C. Vor der MALDI-TOF-Analyse wurde das überschüssige Formaldehyd sowie störende Salze durch eine Gelfiltration, wie in Abschnitt 2.28.2 beschrieben, entfernt. In Tabelle 3-5 sind die Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchung zusammengefasst.

**Tabelle 3-5: Molekulargewichtszunahme der FRAP-MTG-His<sub>6</sub> durch den Einfluss verschiedener Formaldehyd-Konzentrationen bestimmt mittels MALDI-TOF.**

Vergleich der Massenzunahme für die Inkubationsprobe FRAP-MTG-His<sub>6</sub> ohne Formaldehyd und FRAP-MTG-His<sub>6</sub> mit 17 mM bzw. 133 mM Formaldehyd; FRAP-MTG-SA sind Matrixaddukte der FRAP-MTG mit Sinapin-Säure (224 Da).

Molekulargewicht (FRAP-MTG-His <sub>6</sub> ohne Formaldehyd) [Da]	Molekulargewicht (FRAP-MTG-His <sub>6</sub> mit Formaldehyd) [Da]	Zuordnung ( <sup>x</sup> - 1-fach geladen <sup>xx</sup> - 2-fach geladen)	Massen- zunahme [Da]
<b>17 mM Formaldehyd</b>			
19675	19715	FRAP-MTG ( <sup>xx</sup> )	40
19786	19829	FRAP-MTG-SA ( <sup>xx</sup> )	43
39389	39433	FRAP-MTG ( <sup>x</sup> )	44
39591	39643	FRAP-MTG-SA ( <sup>x</sup> )	52
79242	79224	Dimer MTG	-
119266	119011	Trimer MTG	-
<b>133 mM Formaldehyd</b>			
19839	19819	FRAP-MTG ( <sup>xx</sup> )	-
39464	39748	FRAP-MTG, ( <sup>x</sup> )	284
39692	39839	FRAP-MTG-SA ( <sup>x</sup> )	147
79269	79575	Dimer MTG	-
119145	119544	Trimer MTG	-

Es konnte in allen Spektren eindeutig ein Peak für die FRAP-MTG-His<sub>6</sub> bei ca. 39 kDa identifiziert werden (für beide Inkubationsansätze mit und ohne Formaldehyd). Außerdem wurden Peaks für Dimere und Trimere der MTG detektiert. Bei niedrigen Formaldehyd-Konzentrationen wurde eine Molekulargewichtszunahme für die FRAP-MTG-His<sub>6</sub> von ca. 40 Da identifiziert. Aus der ermittelten Massenzunahme lässt sich schlussfolgern, dass in Gegenwart von 17 mM Formaldehyd drei bis vier Aminosäuren der FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, vermutlich Lysine, unter Bildung einer Schiffschen Base modifiziert werden. Im Vergleich dazu wurde eine deutlich höhere Zunahme des Molekulargewichts bei höheren Formaldehyd-Konzentrationen festgestellt.

Für die weiteren Untersuchungen zur Modifikation der MTG durch Formaldehyd wurde die MTG-S2P verwendet, da diese thermostabiler ist und so beispielsweise für eine spätere

Anwendung als Katalysator in der Spanplattenproduktion besser geeignet wäre. Die Enzympräparation erfolgte nach Sommer et al. [Sommer et al., 2011a]. Für die Analyse der Modifikationsstellen wurde die MTG-S2P mit 300 mM Formaldehyd bei 22 °C inkubiert. Die Reduktion der entstehenden Schiffischen Base erfolgte mit Natriumcyanoborhydrid ( $\text{NaCNBH}_3$ ) um eine potentielle Hydrolyse der Schiffischen Base zu vermeiden [Jentoft und Dearborn, 1979]. Es wurden zwei verschiedene Ansätze durchgeführt und mittels LC-ESI-MS analysiert, um die Methylierung einzelner Lysin-Reste bzw. Peptide zuordnen zu können. Zum einen wurde  $\text{NaCNBH}_3$  direkt in den Inkubationsansatz mit Formaldehyd gegeben. Zum anderen wurde die MTG-S2P zunächst mit Formaldehyd für 2 Stunden bei 22 °C inkubiert, anschließend erfolgte die  $\text{NaCNBH}_3$ -Behandlung. Die gleichzeitige Inkubation des Enzyms mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid soll die Möglichkeit der Bildung von inter- und intramolekularer Quervernetzungen minimieren [Jentoft und Dearborn, 1979]. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen an Natriumcyanoborhydrid (17, 34 und 51 mg/mL) in den Versuchen eingesetzt, um den Einfluss auf die Effizienz der Modifikation zu untersuchen. Nach der Inkubation der MTG-S2P mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid wurde die Restaktivität des Enzyms mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Es zeigte sich, dass das Enzym MTG-S2P nach der Inkubation vollständig inaktiv war. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der gleichzeitigen und der anschließenden Natriumcyanoborhydrid-Behandlung hinsichtlich der MTG-Aktivität festgestellt werden.

In Tabelle 3-6 sind die Ergebnisse der LC-ESI-MS-Analyse für die erste Methode (Inkubation MTG-S2P mit Formaldehyd und gleichzeitige Natriumcyanoborhydrid-Behandlung) zusammengefasst. Da sich für die verschiedenen Natriumcyanoborhydrid-Konzentrationen nur die Sequenzabdeckung (17 mg/mL  $\text{NaCNBH}_3$ : 64,4 %; 34 mg/mL  $\text{NaCNBH}_3$ : 80,8 %; 51 mg/mL  $\text{NaCNBH}_3$ : 44,6 %, Abschnitt 8.2), nicht aber die Modifikationen der Aminosäuren unterscheidet, wurden in Tabelle 3-6 die Ergebnisse aller  $\text{NaCNBH}_3$ -Konzentrationen zusammengefasst.

Zur Illustration der Sequenzabdeckung sowie der durch den Pepsin-Verdau entstandenen Peptide und der identifizierten modifizierten Lysin-Reste wurde in Abbildung 3-14 die Ergebnisse der LC-ESI-MS-Analyse für die Natriumcyanoborhydrid-Konzentration 34 mg/mL dargestellt.





In Tabelle 3-7 sind alle identifizierten Aminosäuren, die durch Formaldehyd modifiziert wurden, dargestellt. Da sich bei den verschiedenen NaCNBH<sub>3</sub>-Konzentrationen und den zwei verschiedenen Proteasen nur die Sequenzabdeckung der MTG-S2P unterschied, wurden alle nachgewiesenen Aminosäuren in Tabelle 3-7 zusammengefasst. Für die Modifikation mit Formaldehyd und gleichzeitiger Reduktion durch NaCNBH<sub>3</sub> konnte eine etwas bessere Sequenzabdeckung erzielt werden (68 % bis 86 %, Abschnitt 8.2).

**Tabelle 3-7: Modifizierte Aminosäuren der MTG-S2P nach Inkubation mit 300 mM Formaldehyd und anschließender Natriumcyanoborhydrid-Behandlung.** Die Proben wurden für die LC-ESI-MS-Analyse mit Pepsin bzw. Trypsin verdaut. Es sind für die jeweiligen Aminosäuren alle möglichen Modifikationen, die ermittelt wurden, angegeben.

Aminosäure	Modifikation
K37	Methylierung
K49	Methylierung, Dimethylierung
K91	Dimethylierung
K91/ K95	Dimethylierung/Methylierung
	Dimethylierung/Dimethylierung
K114	Dimethylierung
K114/ K121	Dimethylierung/Dimethylierung
	weitere Möglichkeiten
K121	Methylierung, Dimethylierung
K151/ K152	viele Möglichkeiten
K181	Methylierung, Dimethylierung
K181/ K194	Dimethylierung/Dimethylierung
K194	Methylierung
K194/ K200	Dimethylierung/Dimethylierung
	Dimethylierung/Methylierung
	Methylierung/Methylierung
K200	Methylierung, Dimethylierung, Trimethylierung
K216/ R236	Dimethylierung/Oxidation
K216	Methylierung, Dimethylierung
K269	Dimethylierung
K294	Dimethylierung
K317	Methylierung, Dimethylierung
K317/ K325/ K327	Dimethylierung/Dimethylierung/Dimethylierung
	Dimethylierung/Trimethylierung/Methylierung
	Dimethylierung/Methylierung/Trimethylierung
	Dimethylierung/ Dimethylierung/ Dimethylierung
K325	Dimethylierung
K325/ K327	Methylierung/Methylierung
K327	Dimethylierung

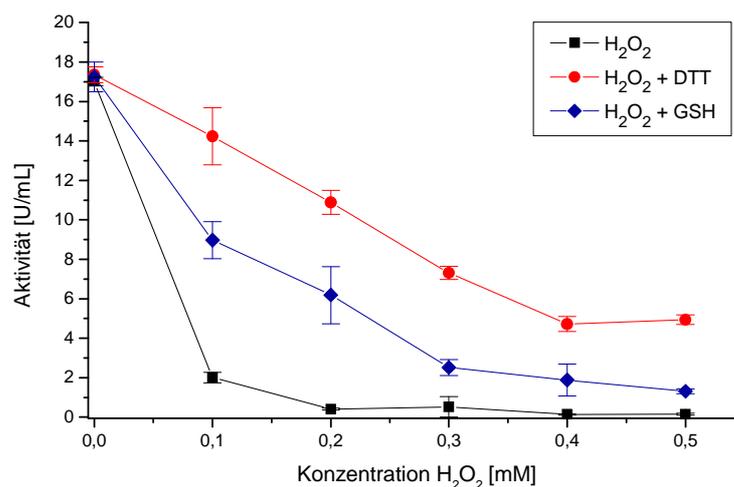
Von insgesamt 18 Lysinen der FRAP-MTG-S2P-His<sub>6</sub> konnten 17 mittels LC-ESI-MS-Analyse für die zweite Methode identifiziert werden. Das Fragment mit Position Lys<sup>214</sup> konnte bei allen drei NaCNBH<sub>3</sub>- Konzentrationen sowie den verschiedenen Proteasen Pepsin und Trypsin

nicht detektiert werden. Im Vergleich zu den Inkubationsansätzen mit gleichzeitiger Natriumcyanoborhydrid-Behandlung wurde bei der anschließenden Behandlung neben den Dimethylierungen auch Monomethylierungen der Lysin-Reste ermittelt. Für die Peptide mit den Positionen K114/K121, K151/K152 sowie K317/K325/K327 konnten verschiedene Möglichkeiten der Modifikation identifiziert werden. Eine eindeutige Zuordnung der Modifikationen zu den einzelnen Lysin-Resten war jedoch nicht möglich, da diese Aminosäuren jeweils innerhalb eines Peptids auftraten.

### 3.3.2 Oxidation der MTG

Für den Einsatz als Biokatalysator in industriellen Anwendungen ist die Kenntnis über die Stabilität des Enzyms gegenüber Oxidation wünschenswert. Die Oxidation von Seitenketten der Aminosäuren eines Enzyms kann zu einer irreversiblen Inaktivierung führen. Das Inaktivierungsverhalten der MTG durch verschiedene Oxidationsmittel wurde in Abhängigkeit von der Konzentration, der Temperatur und der Zeit untersucht. Für die Untersuchungen wurde die thermostabile MTG-Variante S2P aus der Random Mutagenese [Marx et al., 2008b] verwendet. Die Enzympräparation erfolgte nach Sommer et al. [Sommer et al., 2011a]. Die Enzymlösung wurde auf ~ 20 U/mL mit 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 verdünnt. Die Inkubation erfolgte für die unterschiedlichen Oxidationsmittel bei verschiedenen Konzentrationen wie in Abschnitt 2.30.2 beschrieben.

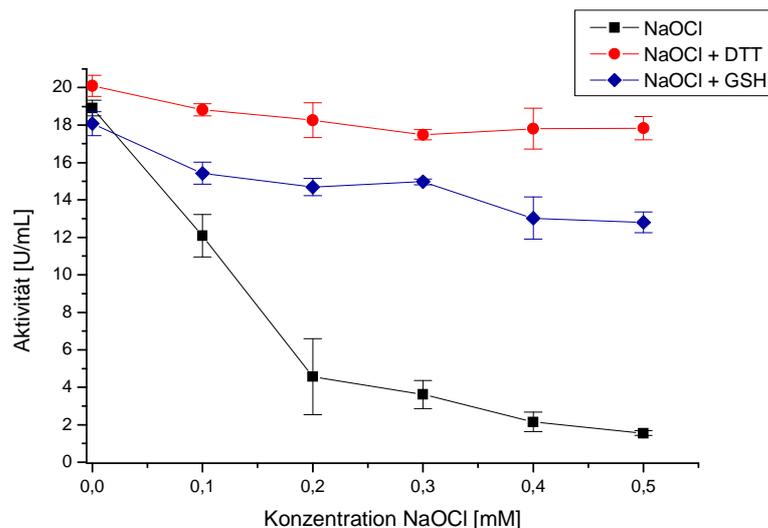
In Abbildung 3-16 ist der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die MTG-Aktivität mit anschließender DTT- bzw. GSH-Behandlung dargestellt.



**Abbildung 3-16: Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die MTG-Aktivität mit anschließender DTT- bzw. GSH-Behandlung (3 mM).** Die Enzymlösung wurde für 10 min bei 25 °C mit Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit DTT oder GSH für 10 min bei 22 °C. Die Endkonzentrationen des Puffers im Inkubationsansatz waren aufgrund von Verdünnungen 40,5 mM Tris/HCl pH 8,0, 18 mM NaCl.

Es konnte gezeigt werden, dass es während der Inkubation über 10 min bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen ab 0,2 mM zur vollständigen Inaktivierung der MTG kommt. Bei einer Konzentration von 0,1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  sinkt die Aktivität der MTG-S2P deutlich. Bereits nach 10-minütiger Inkubation besitzt die MTG-S2P nur noch 10 % der Anfangsaktivität. Die anschließende Behandlung der MTG-S2P mit DTT bzw. GSH zeigte, dass die Inaktivierung durch das Oxidationsmittel  $\text{H}_2\text{O}_2$  teilweise reversibel ist (Abbildung 3-16).

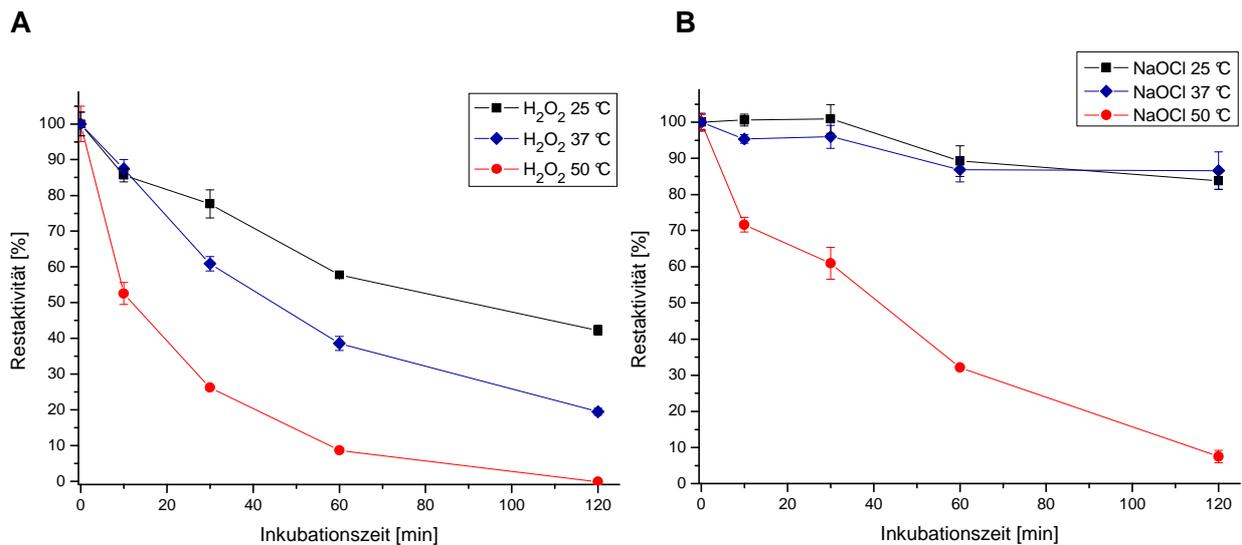
Die Inaktivierung der MTG-S2P durch das Oxidationsmittel Natriumhypochlorit in Abhängigkeit von der Konzentration ist in Abbildung 3-17 dargestellt.



**Abbildung 3-17: Einfluss von Natriumhypochlorit auf die MTG-Aktivität mit anschließender DTT- bzw. GSH-Behandlung (3 mM).** Die Enzymlösung wurde für 10 min bei 25 °C mit Natriumhypochlorit inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit DTT oder GSH für 10 min bei 22 °C. Die Endkonzentrationen des Puffers im Inkubationsansatz waren aufgrund von Verdünnungen 40,5 mM Tris/HCl pH 8,0, 18 mM NaCl.

Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer deutlich langsameren Inaktivierung durch Natriumhypochlorit kommt als durch Wasserstoffperoxid. Für die MTG-S2P wurde nach der Inkubation für 10 min in Anwesenheit von 0,1 mM Natriumhypochlorit noch 60 % Restaktivität ermittelt. Interessanterweise konnte durch die Behandlung der oxidierten MTG-Proben mit 3 mM DTT die Aktivität fast vollständig wiederhergestellt werden (Abbildung 3-17).

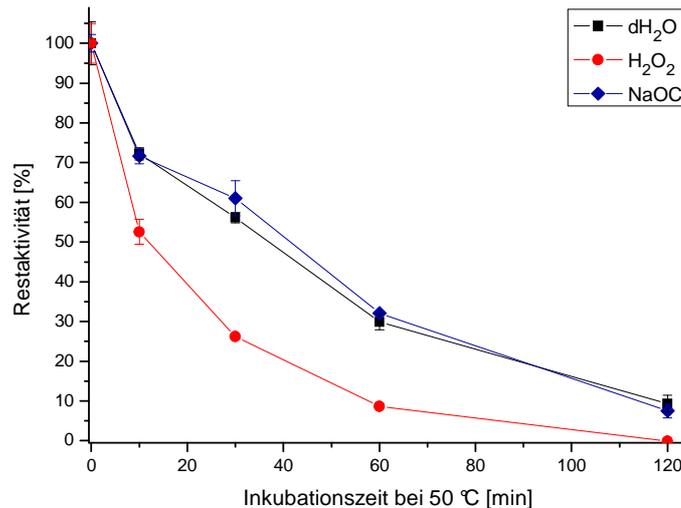
In Abbildung 3-18 ist die Oxidation der MTG-S2P mit Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die Enzymlösung wurde mit 0,02 mM Wasserstoffperoxid bzw. Natriumhypochlorit inkubiert. Es wurde eine niedrige Konzentration des Oxidationsmittels gewählt, um die Inaktivierung der MTG-S2P bei verschiedenen Temperaturen über zwei Stunden ermitteln zu können.



**Abbildung 3-18: Inaktivierung der MTG durch (A) Wasserstoffperoxid (0,02 mM) und (B) Natriumhypochlorit (0,02 mM) in Abhängigkeit von der Temperatur.** Die Enzymlösung wurde mit dem Oxidationsmittel versetzt, bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend sofort die Aktivität mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Die Endkonzentrationen des Puffers im Inkubationsansatz waren aufgrund von Verdünnungen 40,5 mM Tris/HCl pH 8,0, 18 mM NaCl. Die Restaktivität wurde auf 100 % der Nullprobe für entsprechend jede Temperatur bezogen.

Es zeigte sich, dass die Inaktivierung der MTG durch Wasserstoffperoxid temperaturabhängig ist. Nach der Inkubation der Enzymlösung MTG-S2P in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid über zwei Stunden bei 25 °C wurden nur noch 40 % der Aktivität gefunden. Im Vergleich dazu wurde die MTG-S2P während der Inkubation mit Natriumhypochlorit deutlich langsamer inaktiviert. Es konnte nach der Inkubationszeit bei 25 °C und 37 °C eine Restaktivität von 85 % ermittelt werden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Inaktivierung der Enzymlösung MTG-S2P bei 50 °C durch die Oxidation mit Natriumhypochlorit mit der rein thermischen Inaktivierung vergleichbar ist (Abbildung 3-19). Im Vergleich dazu wird das Enzym deutlich schneller bei 50 °C und in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid inaktiviert. Bereits nach 10 min konnte für die MTG eine Restaktivität von nur noch 50 % bestimmt werden.



**Abbildung 3-19: Vergleich der Inaktivierung der MTG durch Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit bei 50 °C.** Die Enzymlösung wurde mit 0,02 mM Wasserstoffperoxid bzw. 0,02 mM Natriumhypochlorit versetzt, bei 50 °C inkubiert und anschließend sofort die Aktivität mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Die Endkonzentrationen des Puffers im Inkubationsansatz waren aufgrund von Verdünnungen 40,5 mM Tris/HCl pH 8,0, 18 mM NaCl. Die Restaktivität wurde auf 100 % der Nullprobe bezogen.

Mittels LC-ESI-MS-Analyse wurden die Aminosäuren identifiziert, die während der Inkubation mit Natriumhypochlorit oxidiert wurden. Außerdem wurde die Auswirkung der DTT-Behandlung auf oxidierte Proben hinsichtlich der Aminosäure-Modifikationen untersucht. Es wurde für die Analyse der Modifikationen 0,5 mM Natriumhypochlorit verwendet, da bei dieser Konzentration in der oxidierten Probe die MTG vollständig inaktiv war und die MTG-Aktivität durch die DTT-Behandlung wieder hergestellt werden konnte. Es wurde für die Probe mit Natriumhypochlorit nach der Inkubationszeit von 10 min bei 22 °C eine Restaktivität von 2,5 % und für die Probe mit Natriumhypochlorit und anschließender DTT-Behandlung eine Restaktivität von 46,6 % bestimmt.

Die oxidierte MTG-S2P wurde mit Trypsin verdaut und anschließend mittels LC-ESI-MS hinsichtlich der Massenzunahme der einzelnen Peptide analysiert. Die Sequenzabdeckung betrug für die MTG-S2P oxidiert mit Natriumhypochlorit 93,6 % und für die MTG-S2P mit Natriumhypochlorit und DTT 91,3 %. Es konnten sowohl in der oxidierten als auch in der „rückreduzierten“ Probe verschiedene Peptide identifiziert werden, in denen aufgrund ihrer Massenzunahme verschiedene Aminosäuren oxidiert sein könnten. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Oxidationen war für die einzelnen Aminosäuren sehr unterschiedlich. Zur Illustration der Sequenzabdeckung sowie der durch den Trypsin-Verdau entstandenen Peptide und der identifizierten oxidierten Aminosäuren wurden in Abbildung 3-20 die Ergebnisse der LC-ESI-MS-Analyse für die Probe ohne DTT-Behandlung und in Abbildung 3-21 für die Probe mit DTT-Behandlung dargestellt.



Insgesamt wurden in der Probe ohne DTT-Behandlung 22 Aminosäuren über die gesamte MTG verteilt identifiziert, die möglicherweise oxidiert sind (Tabelle 3-8). Es kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die entsprechende Aminosäure tatsächlich oxidiert ist, da teilweise in einem Peptid mehrere Aminosäuren oxidiert sein könnten. Für die Probe mit DTT-Behandlung konnten nur 13 Aminosäuren ermittelt werden, die möglicherweise oxidiert sind. Dabei wurden teilweise andere Modifikationen ermittelt als in der oxidierten Probe (Phe<sup>170</sup>, Tyr<sup>171</sup> und Phe<sup>314</sup>). Insgesamt konnten sechs Aminosäuren identifiziert werden, die in der Probe mit Natriumhypochlorit oxidiert und nach der DTT-Behandlung vermutlich wieder rückreduziert waren (Lys<sup>37</sup>, Trp<sup>38</sup>, Tyr<sup>42</sup>, Met<sup>133</sup>, Met<sup>193</sup>, Lys<sup>194</sup>).

**Tabelle 3-8: Zusammenfassung der modifizierten Aminosäuren der MTG nach Oxidation mit Natriumhypochlorit und Rückreduktion mit DTT (Trypsin Verdaut).**

+: Peptid mit Massenzunahme identifiziert, in dem entsprechende Aminosäure oxidiert ist; -: Peptid ohne Massenzunahme identifiziert, n.d.: Peptid mit entsprechender Aminosäure nicht detektiert.

Position	Aminosäure	Modifikationen in der Probe			
		MTG + NaOCl	MTG + NaOCl + DTT		
37	Lys	+	Oxidation	-	-
38	Trp	+	Oxidation	-	-
42	Tyr	+	Oxidation	-	-
52	Met	+	Oxidation	+	Oxidation
133	Met	+	Oxidation	-	-
170	Phe	-	-	+	Dioxidation
171	Tyr	-	-	+	Dioxidation
193	Met	+	Oxidation	-	-
194	Lys	+	Oxidation	-	-
225	Pro	+	Oxidation	+	Oxidation
233	Asp	+	Oxidation	+	Oxidation
234	Met	+	Oxidation	+	Oxidation
236	Arg	+	Oxidation	+	Oxidation
281	Pro	+	Oxidation	n.d.	
282	Asn	+	Oxidation	n.d.	
288	Met	+	Oxidation	n.d.	
289	His	+	Oxidation	n.d.	
291	Tyr	+	Oxidation	n.d.	
294	Lys	+	Oxidation	n.d.	
297	Asn	+	Oxidation in Kombination mit Trp <sup>298</sup>	+	Oxidation in Kombination mit Trp <sup>298</sup>
298	Trp	+	Oxidation in Kombination mit Asn <sup>297</sup> , Dioxidation	+	Oxidation in Kombination mit Asn <sup>297</sup> , Dioxidation
302	Tyr	+	Dioxidation	+	Dioxidation
310	Tyr	+	Dioxidation, Oxidation	+	Dioxidation
314	Phe	-	-	+	Oxidation
319	Trp	+	Dioxidation, Oxidation	+	Oxidation

Das Peptid mit der Aminosäure Cys<sup>64</sup>, die für die Aktivität der MTG essentiell ist, konnte in dem Verdau mit Trypsin nicht identifiziert werden. Daher wurde die oxidierte und rückreduzierte Probe mit Chymotrypsin verdaut und anschließend mittels LC-ESI-MS untersucht. Die Sequenzabdeckung für beide Proben betrug 95,3 % (Abbildung 8-3 und Abbildung 8-4).

Durch den Verdau mit Chymotrypsin wurden die Aminosäuren Asn<sup>282</sup>, Met<sup>288</sup> und His<sup>289</sup> in der Probe mit Natriumhypochlorit als oxidiert und in der Probe mit Natriumhypochlorit und DTT-Behandlung als nicht oxidiert identifiziert (Tabelle 3-9).

**Tabelle 3-9: Zusammenfassung der modifizierten Aminosäuren der MTG nach Oxidation mit Natriumhypochlorit und Rückreduktion mit DTT (Chymotrypsin-verdaut).**

+: Peptid mit Massenzunahme identifiziert, in dem entsprechende Aminosäure oxidiert ist; -: Peptid ohne Massenzunahme identifiziert, n.d.: Peptid mit entsprechender Aminosäure nicht detektiert.

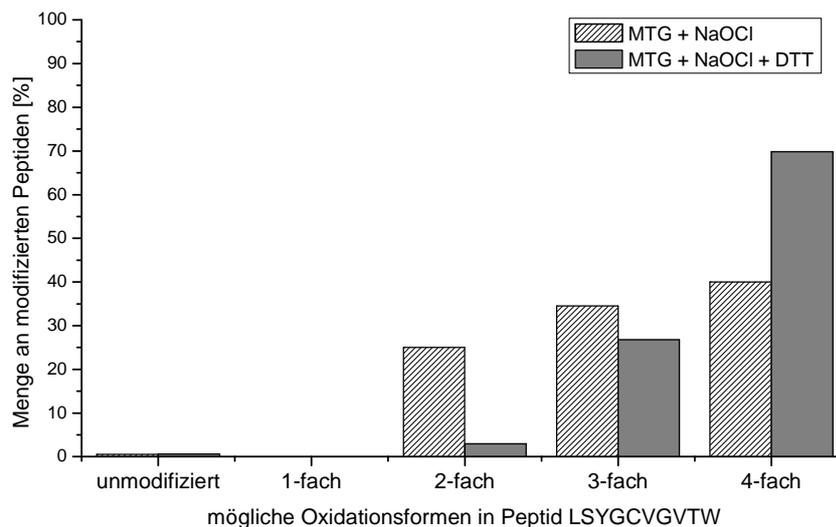
Position	Aminosäure	Modifikationen in der Probe MTG + NaOCl	Modifikation in der Probe MTG + NaOCl + DTT
62	Tyr	+ verschiedene Oxidationsstufen	-
64	Cys	+ verschiedene Oxidationsstufen	+ verschiedene Oxidationsstufen
69	Trp	+ verschiedene Oxidationsstufen	+ verschiedene Oxidationsstufen
133	Met	-	+ Oxidation
282	Asn	+ Oxidation	-
288	Met	+ Oxidation	-
289	His	+ Oxidation	-
319	Trp	+ Oxidation	+ Oxidation

Für das Peptid LSY<sup>62</sup>GC<sup>64</sup>VGVTW<sup>69</sup> mit Cys<sup>64</sup> wurden verschiedene Oxidationsstufen sowohl in der oxidierten als auch in der rückreduzierten Probe identifiziert. Für die Probe mit Natriumhypochlorit und ohne DTT-Behandlung wurden Peptide identifiziert, bei denen die Thiolgruppe des Cysteins zu der entsprechenden Sulfensäure (1-fach oxidiert), Sulfinsäure (2-fach oxidiert) und Sulfonsäure (3-fach oxidiert) oxidiert ist. Außerdem traten auch Massenzunahmen in Kombination mit der Oxidation der Aminosäure Tyr<sup>62</sup> bzw. Trp<sup>69</sup> auf (Tabelle 3-10). Im Gegensatz zu den oxidierten Proben konnten bei der rückreduzierten Probe Peptide identifiziert werden, bei denen das Cystein zur entsprechenden Sulfinsäure oder zur Sulfonsäure in Kombination mit der Oxidation des Trp<sup>69</sup> oxidiert war (Tabelle 3-10).

**Tabelle 3-10: Oxidationsstufen des Peptids LSY<sup>62</sup>GC<sup>64</sup>VGVTW<sup>69</sup> der MTG-S2P mit dem aktiven Zentrum Cys<sup>64</sup>.**

Probe	mögliche Modifikation der Aminosäure	Gesamt-Oxidation des Peptids
MTG + NaOCl	Cys <sup>64</sup> (3-fach oxidiert), Trp <sup>69</sup> (1-fach oxidiert)	4-fach
	Cys <sup>64</sup> (3-fach oxidiert)	3-fach
	Tyr <sup>62</sup> (1-fach oxidiert), Cys <sup>64</sup> (2-fach oxidiert)	3-fach
	Tyr <sup>62</sup> (2-fach oxidiert), Cys <sup>64</sup> (1-fach oxidiert)	3-fach
MTG + NaOCl + DTT	Cys <sup>64</sup> (2-fach oxidiert)	2-fach
	Cys <sup>64</sup> (3-fach oxidiert), Trp <sup>69</sup> (1-fach oxidiert)	4-fach

In Abbildung 3-22 ist die prozentuale Menge der einzelnen Oxidationsformen in dem Peptid LSYGCVGVTW mit Cys<sup>64</sup> vergleichend mit und ohne DTT-Behandlung dargestellt. Es wurden die entsprechenden Peakflächen des Ionenchromatogramms integriert um eine semiquantitative Aussage über die Menge der einzelnen Peptidspezies machen zu können.



**Abbildung 3-22: Prozentuale Menge an oxidierten Formen für das Peptid LSYGCVGVTW.** Es wurden jeweils die unterschiedlichen Spezies des Peptides LSYGCVGVTW gegeneinander quantifiziert.

Es konnten sowohl für die Probe MTG mit Natriumhypochlorit als auch für die Probe MTG mit Natriumhypochlorit und DTT-Behandlung nur 0,5 % bzw. 0,6 % unmodifizierte Peptide ermittelt werden. Die 1-fach oxidierte Form des Peptides konnte für beide Proben nicht identifiziert werden. In diesem Fall wäre die Thiolgruppe des Cysteins zur Sulfensäure oxidiert. Die Sulfensäure ist jedoch ein instabiles Zwischenprodukt und wurde vermutlich weiter zu Sulfinsäure und Sulfonsäure oxidiert.

Bei der Probe, in der die MTG-S2P mit Natriumhypochlorit oxidiert und mit DTT behandelt wurde, ist der Anteil an 2-fach oxidierten Spezies deutlich niedriger als ohne DTT-

Behandlung. Der Großteil der Peptide liegt in der 4-fach oxidierten Form vor, d.h. die Thiolgruppe des Cysteins wurde bis zur Sulfonsäure oxidiert und eine weitere Aminosäure (Tyr<sup>62</sup> bzw. Trp<sup>69</sup>) wurde oxidiert.

### 3.3.3 Cys64Ser-Mutante

Es wurde die MTG-Variante mit dem Aminosäure-Austausch Cys<sup>64</sup> zu Serin generiert, um nachzuweisen, dass das Cys<sup>64</sup> essentiell für die katalytische Aktivität der MTG ist und nicht gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden kann

Die Mutante MTG-C64S wurde mittels site-directed Mutagenese, wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, konstruiert. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde diese Mutante im 100 mL-Maßstab produziert (Abschnitt 2.21.1). Die Enzympräparation erfolgte nach Sommer et al. [Sommer et al., 2011a] mit der Aktivierung der MTG mittels Proteinase K und der anschließenden Reinigung mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Für die Fraktionen der Affinitätschromatographie mit der höchsten Proteinkonzentration wurde die MTG-Aktivität mittels Hydroxamat-Test bestimmt (Abschnitt 2.22.2).

Es konnte keine MTG-Aktivität für die Mutante MTG-C64S bestimmt werden. Dabei wurde sowohl die Inkubationszeit für den Hydroxamat-Test bis auf 30 min verlängert als auch die Temperatur auf 50 °C erhöht. Die Ergebnisse zeigen, dass Cys<sup>64</sup> für die katalytische Aktivität der MTG essentiell ist.

## 4 Diskussion

Die weitere Optimierung der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* war Ziel der vorliegenden Arbeit. Die industriellen Anwendungsmöglichkeiten der MTG sind sehr vielfältig [Mariniello und Porta, 2005]. In der Lebensmittelindustrie werden MTGs zur Quervernetzung von Proteinen in Fleisch, Fisch und Milchprodukten eingesetzt. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Herstellung bioabbaubarer Polymere, wie beispielsweise Filme und Folien aus Proteinen wie Casein [Patzsch et al., 2010].

Zuvor war die MTG aus *Streptomyces mobaraensis* mittels Random Mutagenese erfolgreich hinsichtlich der Thermostabilität optimiert worden [Marx et al., 2008b]. Thermostabile Transglutaminasen wären z.B. bei der Herstellung von Biopolymeren mittels Extrusion von Vorteil, da so die Verknüpfungsreaktion bei höheren Temperaturen durchgeführt werden könnte. Bei höheren Temperaturen ist außerdem die Zugänglichkeit von Proteinen als Substrat für die MTG verbessert. Mit dem Screening von 5500 Klonen auf erhöhte Thermostabilität konnten sechs MTG-Varianten mit einer Aminosäure-Substitution und eine MTG-Variante mit zwei Aminosäure-Substitutionen identifiziert werden. Die thermostabilste MTG-Variante (S2P) besaß eine 2,7-fach höhere Halbwertszeit bei 60 °C und eine doppelt so hohe spezifische Aktivität im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>) [Marx et al., 2008b; Sommer et al., 2011b]. Für die Random Mutagenese waren die Bedingungen in der fehleranfälligen PCR so gewählt worden, dass es zu ein bis zwei Basen-Austauschen pro MTG-Gen kam. Mit einem einzelnen Basen-Austausch können jedoch im Durchschnitt nur 5,7 Aminosäure-Substitutionen an einer bestimmten Stelle erzielt werden [Bloom et al., 2006; Miyazaki und Arnold, 1999]. Um tatsächlich alle Aminosäuren an einer Position zu erzielen, wären bis zu drei Basen-Austausche in einem Codon notwendig. Die Wahrscheinlichkeit ist jedoch sehr gering, dass Mehrfach-Mutationen innerhalb eines Codons auftreten. Deshalb wurde für eine weitere Optimierung der MTG zunächst eine Sättigungsmutagenese an den sieben Hot Spots durchgeführt, die zu einer erhöhten Thermostabilität führten.

### 4.1 Sättigungsmutagenese

Die Sättigungsmutagenese wurde an den Positionen 2, 23, 24, 257, 269, 289 und 294 durchgeführt. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Mutagenese-Kit (QuikChange site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene) verwendet. Die Aminosäure-Substitutionen wurden durch die Verwendung von degenerierten Primer in der PCR erzielt. Bei dem Design der Primer wurde die Kombination NNK für die Degenerierung verwendet, wodurch die Größe der anzulegenden Bibliothek für jede Position minimiert wurde. Entsprechend der ermittelten

Mutationseffizienz (60 % bis 100 %) wurde für jede Position eine Klonbibliothek mit jeweils ~ 180 bis 350 Klonen in Deep-Well-Platten angelegt.

Für die Position 2 konnte keine zufriedenstellende Mutationseffizienz erzielt werden. Es wurden überwiegend Klone identifiziert, die keinen Aminosäure-Austausch an Position 2 aufwiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Primer, deren Sequenz sehr ähnlich zur Wildtyp-Sequenz ist, effektiver an die Template-DNA binden als Primer, die mehr abweichen [Hedstrom et al., 1991; Neylon, 2004]. Daher wird vermutet, dass aus dem degenerierten Primergemisch, die Primer mit dem Wildtyp-Codon TCC an Aminosäure-Position 2 bevorzugt an die Template-DNA binden und dadurch die Mutationseffizienz stark minimiert wird.

Es konnten nach verschiedenen Mutationsansätzen nur insgesamt neun von 20 möglichen Aminosäuren identifiziert werden. Um eine Bibliothek für die Position 2 mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren zu erhalten, wurden die Fehlenden mittels site-directed Mutagenese erzeugt.

Die Bibliotheken aus der Sättigungsmutagenese für Position 23, 24, 257, 269, 289 und 294 sowie aus der site-directed Mutagenese für Position 2 wurden hinsichtlich erhöhter Thermostabilität untersucht. Es wurden verschiedene MTG-Varianten mit erhöhter Thermostabilität im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym identifiziert.

Insgesamt konnten an vier von sieben thermostabilen Hot Spots der MTG verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die zu einer weiteren Erhöhung der Thermostabilität des Enzymes führen (Tabelle 3-1). Aufgrund der gewählten Mutationsrate von 1 - 2 Basenpaaren in der von Marx durchgeführten Random Mutagenese hätten die Aminosäure-Substitutionen S23Y, S23V, K269S, K269D, K294I, K294L und K294V nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit auftreten können. Es wären mindestens zwei Basen-Austausche in einem Codon notwendig gewesen um diese Aminosäure-Substitutionen zu erzielen. Die Wahrscheinlichkeit, dass Mehrfach-Mutationen innerhalb eines Codons auftreten, ist jedoch sehr gering. Für den Austausch von Ser<sup>2</sup> zu Methionin und Ser<sup>23</sup> zu Isoleucin wäre sogar ein Austausch aller drei Basenpaare nötig gewesen. Es zeigte sich, dass der Ansatz der Sättigungsmutagenese für die weitere Verbesserung der MTG erfolgreich war.

Die thermostabilen MTG-Varianten wurden hinsichtlich der Thermostabilität bei 60 °C und der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Zusätzlich wurde das Inaktivierungsverhalten der ausgewählten MTG-Varianten bei 50 °C untersucht, da dies das Temperaturoptimum des Wildtyp-Enzyms ist. Für die Charakterisierung der einzelnen Enzymvarianten wurde die Vorgehensweise von Marx et al. [Marx et al., 2008b] übernommen. Marx et al. verwendeten für die Charakterisierung einen 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM GSH [Marx et al., 2008a; Marx et al., 2008b]. Der Einfluss von verschiedenen Salzen auf die Aktivität und die Thermostabilität der kommerziell erhältlichen MTG (Activa<sup>TM</sup> WM, Ajinomoto) wurde bereits

in der Literatur beschrieben [Kuetemeyer et al., 2005]. Die Untersuchungen von Kuetemeyer et al. ließen darauf schließen, dass einwertige Ionen wie  $K^+$  und  $Na^+$  die Enzymaktivität und die Thermostabilität der MTG erhöhen. Zweiwertige Ionen wie  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  hatten nur einen geringen Einfluss oder reduzierten die Enzymaktivität und die Thermostabilität der MTG [Kuetemeyer et al., 2005]. Um diese Effekte auszuschließen wurde in der vorliegenden Arbeit ein 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) ohne weitere Zusätze verwendet.

Für die Position 2 wurde früher gezeigt, dass die durch Random Mutagenese erhaltene Aminosäure-Substitution von Serin zu Prolin im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym zu einer 1,4-fach höheren Halbwertszeit bei 60 °C führt [Marx et al., 2008b]. Durch den Austausch von  $Ser^2$  zu Tyrosin, der mittels Sättigungsmutagenese erzeugt wurde, konnte die Thermostabilität der MTG bei 60 °C weiter erhöht werden. Es wurde eine 2,1-fach höhere Halbwertszeit für die MTG-Variante S2Y bestimmt. Die Struktur der mikrobiellen Transglutaminase wird durch polare und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der N-terminalen Schleife ( $Asp^1 - Ala^{10}$ ) und einer Schleife zwischen  $Asn^{276}$  und  $Met^{288}$  stabilisiert [Kashiwagi et al., 2002] (Abbildung 1-9). Die Position 2 liegt in dieser N-terminalen Schleife [Kashiwagi et al., 2002] (Abbildung 1-9) und verändert offensichtlich die Interaktionen durch verschiedene Aminosäure-Substitutionen. Scheinbar beeinflusst der Austausch von  $Ser^2$  zu Tyrosin die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den zwei Schleifen positiv, was zu einer erhöhten Stabilität der MTG führt. Shimba et al. führten über site-directed Mutagenese drei verschiedene Substitutionen an  $Ser^2$  ein (S2R, S2D und S2Y) [Shimba et al., 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität dieser MTG-Varianten leicht erhöht war [Shimba et al., 2002]. Die Thermostabilität der Mutanten wurde von Shimba et al. nicht untersucht. Für die MTG-Variante S2P konnte eine Steigerung der spezifischen Aktivität erzielt werden [Marx et al., 2008b; Sommer et al., 2011b]. Die geringe Steigerung der spezifischen Aktivität für S2Y konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Marx et al. zeigten, dass die Mutation G25S zu einer erhöhten Hitzesensitivität der MTG führt [Marx et al., 2008b]. Der Austausch von  $Ser^{23}$  zu Valin, Isoleucin oder Tyrosin, der durch die Sättigungsmutagenese erhalten wurde, steigerte hingegen die Thermostabilität der MTG signifikant. Position 23 liegt benachbart zu der N-terminalen Region des ersten  $\beta$ -Stranges, der sich von Position 26 bis 30 erstreckt [Kashiwagi et al., 2002] (Abbildung 4-1). Offenbar tragen hydrophobe Interaktionen in dieser Region zur Stabilisierung der MTG bei.

10	20	30	40	50	60
DSDDRVT	PPAEPLDRMPDPYRPSY	GRAETV	VNNYIRKWQQV	YSHRDGRKQQMT	EEQREW
		$\beta_1$	$\alpha_1$		$\alpha_2$
70	80	90	100	110	120
SYGCV	GVTWVNSGQYPTNRLAF	ASFDEDRFKNELKN	GRPRSGET	RAEFEGRVAKES	FD
	$\alpha_3$	$\beta_2$	$\alpha_4$	$\alpha_5$	
130	140	150	160	170	180
KGFQRAREVASVMN	RAL	ENAHDE	SAYLDNLK	KELAN	GNDALRNEDARS
	$\alpha_6$		$\alpha_7$		$\alpha_8$
190	200	210	220	230	240
KERNNGNHDPSRM	KAVIYSKHF	WSGQDRSS	ADKRKY	GDPDAFRPAPGTGLV	DMSRDRNI
	$\beta_3$		$\alpha_{10}$		$\beta_4$
250	260	270	280	290	300
PRSPTSPGEGFVN	FDYGF	GAQTEADADKT	VWTHGNHYH	APNGSLGAMH	VYESKFRNWSE
	$\beta_5$		$\beta_6$		$\beta_7$
310	320	330			$\alpha_{11}$
GYSDFDR	GAYVITFIP	KSWNTAPDKVK	QGWPLEHHHHHH		
	$\beta_8$				

**Abbildung 4-1: Aminosäure-Sequenz der reifen MTG aus *Streptomyces mobaraensis* mit Sekundärstrukturelementen (nach [Kashiwagi et al., 2002]).**  $\alpha$ -Helices sind in gelb und  $\beta$ -Faltblätter in grau dargestellt.

Die beste thermostabile MTG-Variante mit einer einzelnen Aminosäure-Substitution besaß eine Mutation an Position 294. Der Austausch von Lysin zu Leucin (K294L) führte zu einer MTG-Variante mit einer 4,5-fach höheren Halbwertszeit bei 50 °C. Eine thermostabile MTG-Variante aus der Random Mutagenese hatte zwei Aminosäure-Austausche (N184S-K294M) [Marx et al., 2008b]. Es wurde vermutet, dass Aminosäure-Substitutionen, die zu einer erhöhten Thermostabilität führen, in der N-terminalen Domäne der MTG lokalisiert sind [Marx et al., 2008b]. Da nur die Position 294 in der N-terminalen Domäne liegt, wurde die Sättigungsmutagenese nur an dieser Position durchgeführt. Die Position 184 wurde nicht mutiert. Durch die Charakterisierung der Mutante KB294L konnte die Vermutung bestätigt werden, dass nur der Austausch von Lys<sup>294</sup> zu Leucin zur erhöhten Thermostabilität der MTG beiträgt.

## 4.2 DNA-Shuffling

Eine weitere Optimierung der Thermostabilität der mikrobiellen Transglutaminase sollte durch die Kombination verschiedener Hot Spots erzielt werden. Es wurden die thermostabilsten MTG-Varianten aus der Random Mutagenese (Y24N, G257S und H289Y) und aus der Sättigungsmutagenese (S2Y, S23V, K269S und K294L) kombiniert.

Bereits in frühen Versuchen der gerichteten Evolution konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mutationen in einem Protein, die demselben Selektionsdruck unterliegen, positiv kooperierend sein können [Lowman und Wells, 1993; Stemmer, 1994b]. Demnach können Punktmutationen kombiniert werden und somit eine weitere Verbesserung der

Proteineigenschaften erzielt werden. Für die In-vitro-Rekombination wurde die Methode des DNA-Shufflings genutzt, die von Stemmer 1994 entwickelt wurde [Stemmer, 1994a]. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass mehrere parentale Gene mit einander kombiniert werden können. Diese müssen jedoch über eine hohe Sequenzhomologie verfügen [Kurtzman et al., 2001; Neylon, 2004]. Da die Hot Spots teilweise nah beieinander lagen, konnte beispielsweise die Methode des „*Staggered Extension Process*“ (StEP) nicht genutzt werden [Zhao et al., 1998]. Bei dieser Methode können keine Mutationen im Abstand von unter 14 Bp kombiniert werden [Zhao et al., 1998]. Zhao und Arnold beschrieben die Rekombination von zwei Mutationen mit einem Abstand von 12 Bp durch die Methode des DNA-Shufflings [Zhao und Arnold, 1997b]. Da es bisher keine Veröffentlichung zur Rekombination von zwei direkt benachbarten Aminosäuren gibt, wurde zunächst die Doppelmutante S23V-Y24N mittels site-directed Mutagenese konstruiert.

Die Charakterisierung dieser Doppelmutante zeigte, dass durch die Kombination der zwei Aminosäure-Substitutionen die Thermostabilität der MTG ohne Verlust der spezifischen Aktivität weiter verbessert werden konnte. Die Halbwertszeit der Doppelmutante S23V-Y24N bei 50 °C wurde um den Faktor 7 gesteigert, verglichen mit dem rekombinanten Wildtyp-Enzym. Im Vergleich dazu besitzt die MTG-Variante mit der Einzelmutation S23V aus der Sättigungsmutagenese nur eine fast doppelt so hohe Halbwertszeit bei 50 °C. Wegen des positiven Effektes den die Kombination der Positionen 23 und 24 besaß, wurde die Doppelmutante als Template-Gen für das DNA-Shuffling eingesetzt.

Als Template für die In-vitro-Rekombination wurden fünf MTG-Gene mit jeweils einer Aminosäure-Substitution und ein MTG-Gen mit zwei Aminosäure-Substitutionen eingesetzt. Zhao und Arnold publizierten verschiedene Bedingungen zur Optimierung des DNA-Shufflings [Zhao und Arnold, 1997b]. Es wurde gezeigt, dass die Präparation der parentalen Gene durch einen Plasmidverdau die Anzahl an aktiven Klonen positiv beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht die MTG-Gene durch einen Restriktionsverdau der entsprechenden Plasmide zu gewinnen (Abschnitt 3.2.3). Es zeigte sich, dass die gewünschte DNA-Konzentration bei keinem Gen erzielt werden konnte. Aus Zeitgründen wurde diese Methode nicht weiter optimiert, sondern als Alternative die parentalen Gene mittels PCR amplifiziert. Zhao und Arnold erhielten für das DNA-Shuffling zwischen 20 % und 46 % aktive Klone, wobei die Elterngene mittels PCR synthetisiert wurden [Zhao und Arnold, 1997b]. Um die Ausbeute an aktiven Klonen zu erhöhen und die Punktmutationsrate während der Amplifikation der Elterngene möglichst niedrig zu halten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine *Pfu* DNA-Polymerase in der PCR eingesetzt. Diese verfügt über eine „*proof-reading*“-Funktion (3'-5'-Exonuklease-Aktivität) und arbeitet wesentlich exakter als die *Taq*-Polymerase [Lundberg et al., 1991]. Nach dem Screening der Klonbibliothek zeigte sich, dass von insgesamt 1512 Klonen 791 bei 37 °C aktiv waren. Nach Zhao und



Es wäre denkbar, dass die mit ca. 1500 Klonen angelegte Bibliothek möglicherweise um das 5-fache zu klein gewesen und somit nicht jede Kombinationsmöglichkeit für die sechs Positionen einmal aufgetreten ist. Giver und Arnold [Giver et al., 1998] zogen eine solche Überlegung zur Berechnung der Bibliotheksgröße ebenfalls nicht heran.

Um die Anzahl der Klone für eine Bibliothek besser bestimmen zu können, wäre ein DNA-Shuffling mit nur zwei Elternngen besser geeignet. Um tatsächlich mit der oben genannten Menge von 1500 Klonen (6!, 50 % Rekombinationsrate) kalkulieren zu können, müsste ein MTG-Genkonstrukt erstellt werden, das alle sieben Mutationen (Aminosäure-Substitutionen) enthält. Dieses Template könnte dann mit der Wildtyp-Sequenz der MTG kombiniert werden. Für einen solchen Shuffling-Ansatz ist es notwendig alle Aminosäure-Substitutionen in einer MTG-Sequenz über site-directed Mutagenese zu generieren. Dies kann sehr zeitaufwendig werden und es ist nicht auszuschließen, dass während der PCR für die Mutagenese zusätzliche Punktmutationen in den MTG-Genen entstehen. Als Alternative könnte das Gen mit den entsprechenden Mutationen synthetisch hergestellt werden, was ca. 420 € kosten würde (0,35 Cent/Bp).

Für die angelegte Bibliothek aus dem DNA-Shuffling wurde eine Rekombinationsrate von 79 % bestimmt. Damit wurde die angenommene Rekombinationsrate von 50 % für die Berechnung der Bibliotheksgröße übertroffen. Für die Kalkulation der Rekombinationsrate wurden alle für den DNA-Shuffling-Ansatz sequenzierten Klone herangezogen. Die DNA-Shuffling-Prozedur wurde einmal durchgeführt und davon verschiedene Klone nach der Ligation in den Vektor, der Transformation in den Expressionsstamm und dem Screening auf erhöhte Thermostabilität sequenziert. Es wurden insgesamt 43 MTG-Gene hinsichtlich Aminosäure-Substitutionen untersucht. Davon zeigten 34 Sequenzen ein Rekombinationsereignis. Die errechnete Rekombinationsrate ist etwas fehlerbehaftet, da nach dem Screening nur Klone sequenziert wurden, die eine signifikant höhere Thermostabilität als das Wildtyp-Enzym aufwiesen. Es wurden jedoch keine Klone hinsichtlich Rekombinationsereignissen untersucht, die eine vergleichbare Thermostabilität wie das rekombinante Wildtyp-Enzym zeigten. Insgesamt ist anzunehmen, dass die Größe der Bibliothek für das Screening ausreichend war. Es konnte gezeigt werden, dass 52 % der Klone bei 37 °C aktiv waren. Dies deutet darauf hin, dass die inaktiven Klone vermutlich Rekombinationsereignisse besitzen, die sich negativ auf die Aktivität der MTG auswirken.

Die Mutationsrate für die DNA-Shuffling-Prozedur wurde anhand der Häufigkeit auftretender unerwünschter Punktmutationen bezogen auf die Gesamtzahl an sequenzierten Basenpaaren bestimmt. Für die Berechnung wurden alle sequenzierten Klone aus dem DNA-Shuffling berücksichtigt. Es wurden 39 zusätzliche Basen-Austausche in insgesamt 44.343 sequenzierten Basenpaaren ermittelt. Dies entspricht einer Mutationsrate von 0,1 %.

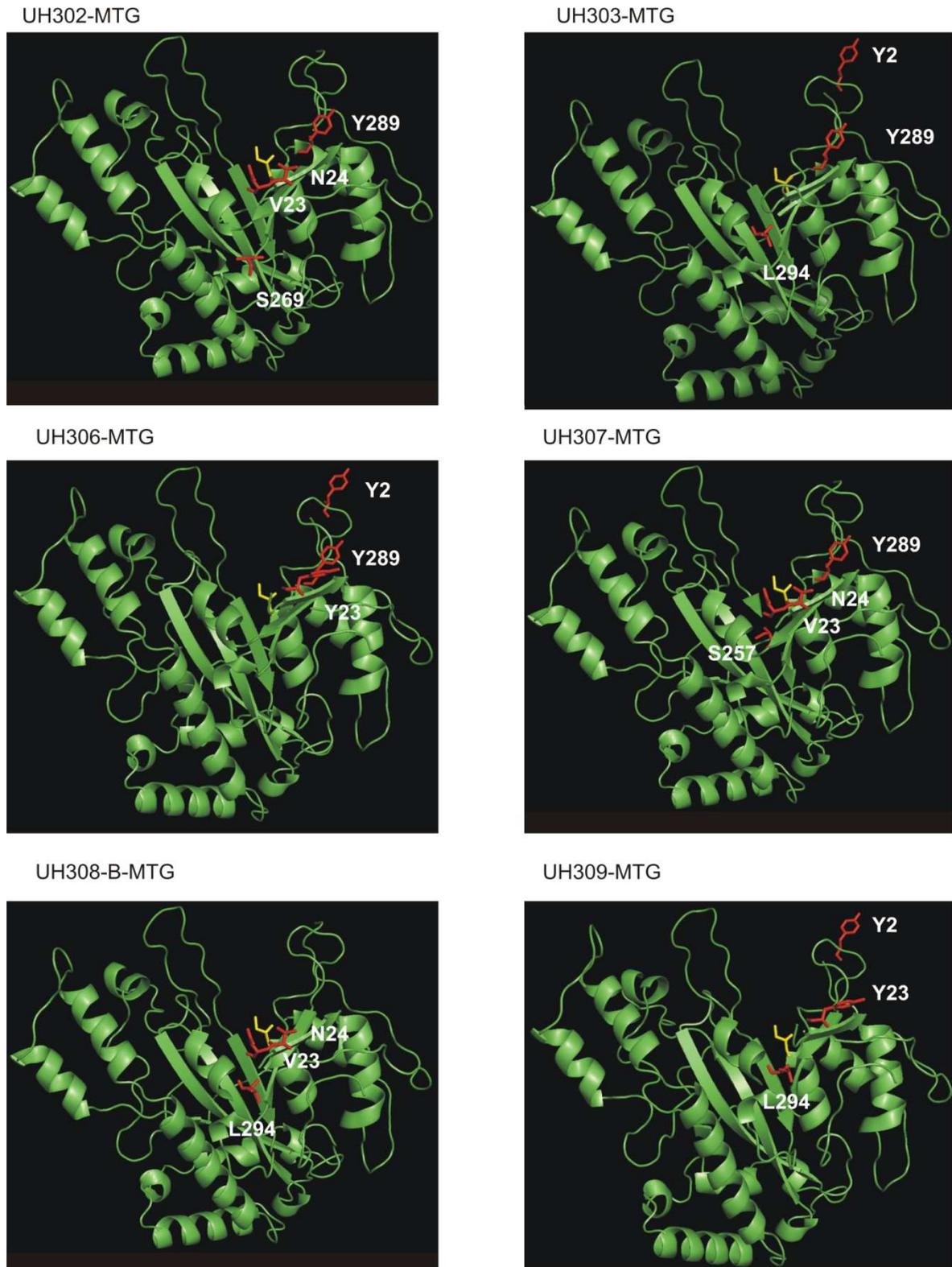
Aufgrund dieser Mutationsrate lassen sich zusätzliche Mutationen wie der Austausch von Ser<sup>23</sup> zu Tyrosin in den Mutanten UH306 und UH309 erklären. Im Vergleich zu den publizierten Methoden von Stemmer, sowie Lorimer und Pastan, ist diese Mutationsrate jedoch vergleichsweise niedrig [Lorimer und Pastan, 1995; Stemmer, 1994a]. Bei der von Stemmer publizierten Methode traten Punktmutationsraten von 0,7 % auf [Stemmer, 1994a]. Lorimer und Pastan arbeiteten mit einer Mutationsrate von 0,2 % [Lorimer und Pastan, 1995]. Zhao und Arnold veröffentlichten ein DNA-Shuffling-Protokoll mit einer Mutationsrate von 0,05 %. Die Mutationsrate kann über einen großen Bereich (0,05 % - 0,7 %) durch die Wahl der DNA-Polymerase, dem Zusatz von Mn<sup>2+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>-Ionen und/oder den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA variiert werden [Zhao und Arnold, 1997b]. Die Wahl der Mutationsrate ist dabei vom Ziel der Rekombination abhängig. Es werden niedrige Mutationsraten für Struktur-Funktion-Studien homologer Gene verwendet [Zhao und Arnold, 1997a]. Durch die Kombination von verschiedenen Aminosäure-Substitutionen bei einer niedrigen Punktmutationsrate können funktionelle Mutationen identifiziert werden [Zhao und Arnold, 1997a]. Ist die Mutationsrate in der Shuffling-Prozedur relativ hoch, können neue Hot Spots auftreten, die zu einer weiteren Verbesserung des Enzyms führen können. Zhao und Arnold zeigten jedoch, dass das Auftreten von aktiven Klonen in der Bibliothek bei höheren Mutationsraten wesentlich geringer war [Zhao und Arnold, 1997b]. Somit können sich die zusätzlichen Mutationen auch negativ auf die Optimierung des Enzyms auswirken.

Die Kombination der thermostabilisierenden Mutationen S2Y, H289Y und K294L resultierte in einer MTG-Variante (UH303) mit einem Temperaturoptimum von 60 °C und einer spezifischen Aktivität von 37 U/mg. Dies ist eine deutliche Steigerung des Temperaturoptimums im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ( $T_{\text{Opt}} = 50 \text{ °C}$ ). Die Mutationen H289Y und K294L sind in dem Faltblatt  $\beta_7$  lokalisiert (Abbildung 4-1 und Abbildung 4-3). Dieses Faltblatt bildet zusammen mit einem Loop (Asn<sup>276</sup> - Met<sup>288</sup>) und dem Faltblatt  $\beta_6$  die linke Seitenwand der Substrattasche [Kashiwagi et al., 2002]. Auf der Oberfläche um die Substrattasche herum befinden sich viele aromatische Aminosäuren, wie Trp<sup>59</sup>, Tyr<sup>62</sup>, Trp<sup>69</sup>, Tyr<sup>75</sup>, Tyr<sup>278</sup>, Tyr<sup>291</sup> und Tyr<sup>302</sup> [Kashiwagi et al., 2002]. Scheinbar erhöhen die Mutationen H289Y und K294L die hydrophoben Wechselwirkungen in dieser Region und stabilisieren damit die 3D-Struktur der MTG bei hohen Temperaturen ohne Verlust der Aktivität. In der Substrattasche befinden sich viele saure Reste (Asp<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Asp<sup>4</sup>, Glu<sup>249</sup>, Asp<sup>255</sup> und Glu<sup>300</sup>). Dieser charakteristische Aufbau der MTG hat nach Kashiwagi et al. Einfluss auf die Substratspezifität [Kashiwagi et al., 2002]. Auch Yokoyama et al. zeigten, dass eine Aminosäure-Substitution in His<sup>289</sup> zu Tyrosin oder Phenylalanin zu einer leichten Steigerung der spezifischen Aktivität führte [Yokoyama et al., 2010]. Daraus lässt sich vermuten, dass diese Region mit hydrophoben Aminosäure-Resten an der Substraterkennung beteiligt ist

und so die Substratspezifität erhöht. Einen weiteren positiven Einfluss auf die Stabilität der MTG kann die Mutation S2Y haben. Diese wurde bereits bei der Sättigungsmutagenese diskutiert (Seite 101).

UH302 (S23V-Y24N-K269S-H289Y) (Abbildung 4-3) ist eine thermostabile MTG-Variante mit einer fast doppelt so hohen spezifischen Aktivität wie das rekombinante Wildtyp-Enzym. Diese Mutante besitzt außerdem ein leicht erhöhtes Temperaturoptimum bei 55 °C. Die Mutation K269S liegt nah zum Faltblatt  $\beta_6$ , welches Teil der Substrattasche ist und so möglicherweise einen positiven Einfluss auf die spezifische Aktivität hat. Dieser Einfluss konnte bereits bei der MTG-Variante mit der Mutation K269S gezeigt werden (spezifische Aktivität 39 U/mg, Tabelle 3-2). Die Positionen 23 und 24 liegen unmittelbar vor dem ersten  $\beta$ -Faltblatt der MTG (Abbildung 4-1). Yokoyama et al. zeigten, dass einige Austausche in den ersten 32 Aminosäuren gegen hydrophile Aminosäuren zu einer leichten Erhöhung der spezifischen Aktivität führten [Yokoyama et al., 2010]. Der Aminosäure-Austausch P<sup>12</sup> zu Serin führte zur Steigerung der spezifischen Aktivität von 27,2 U/mg auf 32,3 U/mg. Für die MTG-Variante M16T wurde eine spezifische Aktivität von 42,5 U/mg veröffentlicht, was einer Steigerung um den Faktor 1,6 entspricht [Yokoyama et al., 2010]. Die Steigerung der spezifischen Aktivität der MTG-Variante UH302 könnte im Zusammenhang mit dem Austausch von Tyr<sup>24</sup> zu Asparagin stehen. Der Einfluss der Aminosäure-Substitution H289Y wurde bereits bei der Mutante UH303 diskutiert.

Die untersuchten Mutanten aus dem DNA-Shuffling zeigten alle eine gesteigerte Halbwertszeit bei 60 °C, dabei besitzen alle Varianten Aminosäure-Austausche in verschiedenen Kombinationen. Die Mutante KB294L aus der Sättigungsmutagenese zeigte eine 2,3-fach höhere Halbwertszeit bei 60 °C. Eine 4,4-fach höhere Halbwertszeit bei 60 °C wurde für die Doppelmutante S23V-Y24N ermittelt, die mittels site-directed Mutagenese erzeugt wurde. UH308-B mit den Substitutionen S23V-Y24N-K294L ist die bisher thermostabilste MTG-Mutante aus dem DNA-Shuffling mit einer 12-fach höheren Halbwertszeit bei 60 °C (24,3 min). Diese Mutante ist ein gutes Beispiel für eine signifikante Steigerung der Thermostabilität durch Kombination verschiedener Aminosäure-Substitutionen ohne Verlust der Aktivität. Es wurde bereits anhand der gerichteten Evolution einer thermostabilen Esterase gezeigt, dass die Erhöhung der Thermostabilität nicht mit einem Verlust der Aktivität einhergehen muss [Giver et al., 1998]. Die Kombination von thermostabilisierenden Mutationen resultierte in einer 100-fach höheren Halbwertszeit bei 60 °C für eine Phosphit-Dehydrogenase [McLachlan et al., 2008].



**Abbildung 4-3: Schematische Darstellung der MTG-Varianten mit verschiedenen Aminosäure-Substitutionen aus dem DNA-Shuffling.** Kristallstruktur der MTG aus *Streptomyces mobaraensis* (PDB 1iu4) [Kashiwagi et al., 2002]. Die Aminosäuren in den Mutanten wurden mit dem Programm swisspdb viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>) [Guex und Peitsch, 1997] ausgetauscht. Die mutierten Aminosäuren sind in rot und als Seitenkette dargestellt. Cys<sup>64</sup> im aktiven Zentrum wurde in gelb dargestellt (nicht mutiert). Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL erstellt [Schrodinger, 2010].

Die Firma Ajinomoto patentierte verschiedene MTG-Varianten, die eine erhöhte Thermostabilität besitzen [Yokoyama et al., 2008]. Die Stabilisierung der MTG wurde durch Disulfidbrücken an verschiedenen Positionen realisiert. Es konnte für zwei Varianten (S2-G283 und D3-G283) eine Restaktivität von ca. 70 % bzw. 98 % nach Inkubation bei 60 °C für 10 min ermittelt werden. Die Position 283 ist zwischen den Faltblättern  $\beta_6$  und  $\beta_7$  lokalisiert [Kashiwagi et al., 2002] (Abbildung 4-1). Scheinbar wird die 3D-Struktur der MTG durch die Disulfidbrücke zwischen der N-terminalen Schleife mit Position 2 bzw. 3 und der Schleife zwischen den Faltblättern  $\beta_6$  und  $\beta_7$  stabilisiert. In der vorliegenden Arbeit hatte die thermostabilste Variante UH308-B nach 10 min Inkubation bei 60 °C noch 68 % der Anfangsaktivität. Yokoyama et al. veröffentlichten jedoch für die Varianten mit Disulfidbrücken keine spezifischen Aktivitäten, was einen direkten Vergleich mit den MTG-Varianten aus der vorliegenden Arbeit nicht ermöglicht.

UH301 (S23V-Y24N-H289Y) und UH307 (S23V-Y24N-G257S-H289Y) zeigten zwar eine erhöhte Thermostabilität bei 50 °C und 60 °C, aber eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität (25 U/mg bzw. 23 U/mg, Tabelle 3-2) verglichen mit der MTG-Variante UH302 (S23V-Y24N-K269S-H289Y, 45 U/mg). Der Vergleich mit den Varianten UH303 (S2Y-H289Y-K294L, 37 U/mg) und UH306 (S2Y-S23Y-H289Y, 34 U/mg) lässt darauf schließen, dass scheinbar die Mutationen S23V-Y24N und H289Y sich hinsichtlich der spezifischen Aktivität negativ beeinflussen. Die Mutante UH302 (S23V-Y24N-K269S-H289Y) steht dazu jedoch im Widerspruch, da sie eine fast doppelt so hohe spezifische Aktivität als UH301, UH307 und das rekombinante Wildtyp-Enzym besitzt. Außerdem wurde der positive Einfluss der Substitution H289Y auf die spezifische Aktivität der MTG bereits von anderen Autoren bestätigt [Yokoyama et al., 2010]. Insgesamt sind Aussagen über den Einfluss bzw. die Kombination von Substitutionen schwierig. Ein Ansatz des rationalen Protein Design mit Modellrechnungen könnten möglicherweise helfen das Zusammenwirkungen zu erklären.

Die Thermostabilität der MTG konnte mittels gerichteter Evolution durch Einführung oder Kombination von Mutationen verbessert werden. Aus der Literatur sind verschiedene Beispiele für die Steigerung der Thermostabilität verschiedener Enzyme nach mehreren Generationen gerichteter Evolution bekannt (Abschnitt 1.1) Diese Beispiele verdeutlichen, dass eine weitere Steigerung der Thermostabilität von Enzymen durch mehrere Runden verschiedener Methoden der gerichteten Evolution möglich ist. Weiterführende Ansätze der gerichteten Evolution für eine Optimierung der mikrobiellen Transglutaminase wären demnach sinnvoll.

Die Stabilität von Proteinen wird durch verschiedene Faktoren wie hydrophobe Wechselwirkungen, zusätzliche oder verbesserte elektrostatische Interaktionen verursacht

durch beispielsweise Salzbrücken, die Packungsdichte des Enzyms und die Aminosäure-Zusammensetzung beeinflusst [Sternner und Liebl, 2001; Vieille und Zeikus, 2001]. Es gibt Vermutungen, dass eine höhere Thermostabilität im Zusammenhang mit einem häufigeren Vorkommen von Prolin und seltenerem Auftreten von Asparagin- und Glutamat-Resten steht [Sriprapundh et al., 2000]. Die Austausch von H289Y und K294L bei verschiedenen Varianten der MTG deuten darauf hin, dass die Stabilität des Enzyms durch verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen erhöht wird.

Kumar et al. verglich Struktur- und Sequenzparameter von thermophilen und mesophilen Proteinen [Kumar et al., 2000]. Dabei zeigte sich, dass ein häufigeres Auftreten von Arginin und Tyrosin, selteneres Vorkommen von Cystein- und Serin-Resten sowie eine erhöhte Anzahl von Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten zu einer erhöhten Protein-Thermostabilität führen [Kumar et al., 2000]. Die 3-fach-Mutante UH306 mit Tyrosin an allen Austauschungen zeigt tatsächlich eine höhere Thermostabilität. Die thermostabilste Variante (UH308-B) hat jedoch Aminosäure-Substitutionen von Serin, Tyrosin und Leucin zu Valin, Asparagin und Leucin.

### 4.3 Stabilitätsuntersuchungen der MTG

Das Anwendungsgebiet der MTG ist wie bereits erwähnt sehr vielfältig. Für verschiedene technische Anwendungen sind Kenntnisse über die Inaktivierung der MTG bzw. der Stabilität in Anwesenheit von verschiedenen Substanzen wünschenswert.

#### 4.3.1 Stabilität gegenüber Formaldehyd

Die Stabilität der MTG gegenüber Formaldehyd ist für eine Anwendung von proteinbasierenden Bindemitteln in der Holzindustrie von Bedeutung [Jacob, 2011]. Natürliches Holz emittiert zu Beginn der Nutzung Formaldehyd [Meyer und Boehme, 1995]. Auch während der industriellen Trocknung des Holzes entsteht Formaldehyd [Tjeerdsma et al., 1998], welches jedoch mit der Zeit ausgast. Für die Verwendung von Bindemitteln in der Holzindustrie, die auf MTG-quervernetzten Proteinen basieren, ist die Kenntnis über die Stabilität der MTG relevant.

Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Stabilität der unveränderten, rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> gegenüber verschiedenen Konzentrationen an Formaldehyd durchgeführt. Es zeigte sich, dass steigende Formaldehyd-Konzentrationen zu einem deutlichen Aktivitätsverlust der MTG während der Inkubation über 20 h bei 22 °C führen (Abbildung 3-12). Bei Konzentrationen über 300 mM Formaldehyd konnte eine deutlich schnellere Inaktivierung des Enzyms ermittelt werden. Geringe Konzentrationen an Formaldehyd

(17 mM und 67 mM) hatten jedoch während der Inkubation über 20 Stunden kaum einen Einfluss auf die Stabilität der MTG.

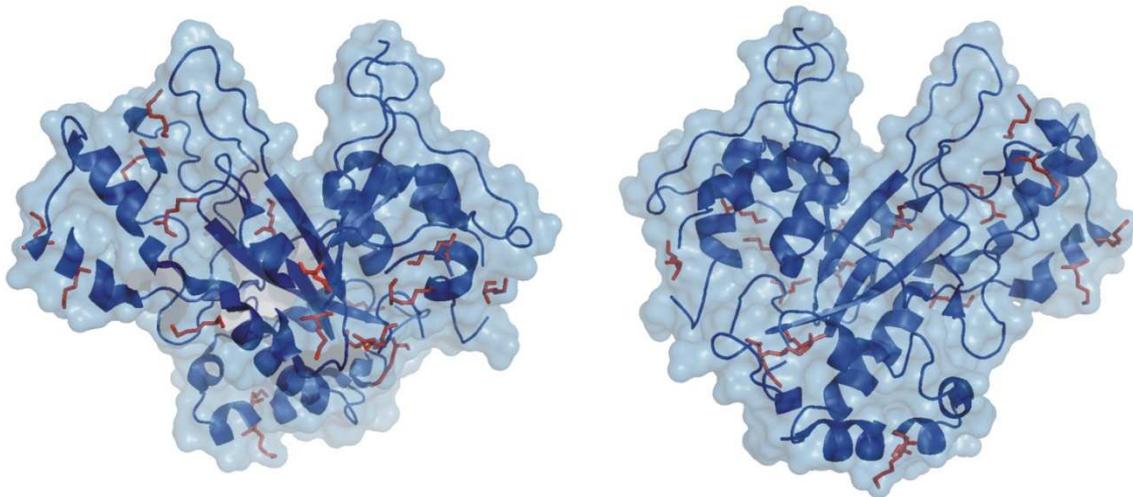
Mittels einer LC-ESI-MS-Analyse konnten die Aminosäure-Reste identifiziert werden, die durch Formaldehyd modifiziert wurden und somit vermutlich zur Inaktivierung des Enzyms beitragen. Für diese Untersuchungen wurde eine thermostabile MTG-S2P verwendet. Die durch die Formaldehyd-Behandlung entstehende Schiff'sche Base wurde mit Natriumcyanoborhydrid reduziert, um eine potentielle Hydrolyse zu vermeiden. Die reduktive Methylierung von Proteinen mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel wurde bereits 1979 von Jentoft und Dearborn beschrieben [Jentoft und Dearborn, 1979]. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem 6-fachen Überschuss von Formaldehyd, 80 % - 90 % der Lysin-Reste zu den entsprechenden Dimethylderivaten umgewandelt wurden [Jentoft und Dearborn, 1979]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem 10-fachen Überschuss an Formaldehyd gearbeitet. Es zeigte sich, dass unabhängig von der Art der Natriumcyanoborhydrid-Behandlung alle identifizierten Lysin-Reste modifiziert waren (Abschnitt 3.3.1).

Die gleichzeitige Inkubation des Enzyms mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid wird als vorteilhaft beschrieben, da so die Möglichkeit der Bildung von inter- und intramolekularer Quervernetzungen minimiert wird [Jentoft und Dearborn, 1979]. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Modifikationseffizienz zwischen der gleichzeitigen und der anschließenden Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid festgestellt werden. Im Vergleich zur Inkubation des Enzyms mit Formaldehyd und gleichzeitiger  $\text{NaCNBH}_3$ -Behandlung wurden bei der anschließenden Reduktion verschiedene Modifikationsmöglichkeiten für die Lysin-Reste identifiziert (Tabelle 3-7).

Um eine bessere Sequenzabdeckung bei den Proben mit anschließender  $\text{NaCNBH}_3$ -Behandlung zu erzielen, wurde die modifizierte MTG-S2P mit zwei verschiedenen Proteasen geschnitten. Die Sequenzabdeckung für den Verdau der MTG-S2P mit Trypsin war bei allen Proben etwas schlechter als bei dem Verdau mit Pepsin. Trypsin schneidet spezifisch nach Lysin- und Arginin-Resten. Gorecki und Shalitin zeigten, dass Trypsin nicht in der Lage ist nach dimethylierten Lysin-Resten zu schneiden [Gorecki und Shalitin, 1967]. Die etwas schlechtere Sequenzabdeckung bei den Trypsin-Verdauen kann damit erklärt werden.

Der Einfluss der reduktiven Alkylierung mit Formaldehyd und Reduktionsmitteln wie  $\text{NaCNBH}_3$  oder  $\text{NaBH}_4$  auf die Aktivität von Enzymen wurde bereits mehrfach beschrieben [Means, 1984]. Die Methylierung der Lysin-Reste eines Proteins erhöht dabei die Größe der Aminogruppe und verringert die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, was einen Einfluss auf die Struktur des Enzyms haben kann. Rice et al. zeigten, dass die reduktive Methylierung von Trypsin keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms hatte [Rice et al., 1977]. Durch die Modifikation konnte das Enzym

sogar vor Autoproteolyse geschützt und damit stabilisiert werden. Andere Autoren zeigten jedoch, dass die Methylierung einer Hexokinase P aus Hefe und einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase [Jentoft und Dearborn, 1979] sowie einer Ribonuklease aus der Bauchspeicheldrüse [Means und Feeney, 1968] zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms führten. Die reduktive Methylierung der MTG-S2P durch Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid führte ebenfalls zur vollständigen Inaktivierung. Die modifizierten Lysin-Reste der MTG liegen, mit Ausnahme von Lys<sup>269</sup>, Lys<sup>317</sup>, Lys<sup>325</sup> und Lys<sup>327</sup>, alle in Sekundärstruktur-Elementen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern (Abbildung 4-1 und Abbildung 4-4). Durch die Methylierung der Aminogruppe mittels Formaldehyd und dem Reduktionsmittel kann es zur Destabilisierung dieser Strukturen kommen und dadurch zum Aktivitätsverlust der MTG.



**Abbildung 4-4: Kristallstruktur der MTG aus *Streptomyces mobaraensis* (PDB 1iu4) [Kashiwagi et al., 2002].** Es wurden alle Lysine der MTG in rot und als Seitenkette dargestellt.

In Abbildung 4-4 ist die Kristallstruktur der MTG dargestellt, in der alle Lysin-Reste markiert sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass einige der Lysine auf der Oberfläche des Enzymes lokalisiert und daher für die Modifikation durch Formaldehyd gut zugänglich sind.

#### 4.3.2 Stabilität gegenüber Oxidationsmitteln

Die Oxidation von verschiedenen Aminosäure-Resten kann zu einer Inaktivierung des Enzyms führen. Es können neben den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin auch aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin oxidiert werden [Pattison und Davies, 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Inaktivierungsverhalten der MTG durch den Einfluss verschiedener Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit untersucht, da die MTG über ein Cystein verfügt. Das Cys<sup>64</sup> bildet zusammen mit His<sup>274</sup> und Asn<sup>255</sup> die

katalytische Triade der MTG. Die Thiolgruppe des Cysteins kann durch Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid oder Natriumhypochlorit zu dem entsprechenden Sulfensäure-Derivat oxidiert werden. Dies ist ein instabiles Zwischenprodukt und kann irreversibel weiter zur Sulfinsäuren bis hin zur Sulfonsäure oxidiert werden [Reddie und Carroll, 2008]. Eine weitere mögliche Reaktion ist die Bildung von Disulfiden, wenn eine weitere Thiolgruppe vorhanden ist [Reddie und Carroll, 2008]. Disulfidbrücken sind stabile Intermediate und oft an der Aufrechterhaltung der Proteinstruktur und der Funktion beteiligt. Die Bildung von Disulfidbrücken ist durch Reduktionsmittel wie Glutathion (GSH) oder Dithiothreitol (DTT) reversibel. Die Bildung von Disulfidbrücken bei der MTG ist allerdings unwahrscheinlich, da es nur ein Cystein (Cys<sup>64</sup>) im Protein gibt.

Ein Maß für die Stärke eines Oxidationsmittels ist das Redoxpotential. Je größer das Redoxpotential eines Stoffes ist, desto stärker ist seine oxidierende Wirkung. Für Wasserstoffperoxid ist ein Standardpotential von 1,78 V angegeben [Holleman et al., 2007]. Für die hypochlorige Säure ist ein Redoxpotential von 0,9 V veröffentlicht [Holleman et al., 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass die MTG durch die Inkubation mit den Oxidationsmitteln Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit inaktiviert wird (Abschnitt 3.3.2). Dabei wurde festgestellt, dass Wasserstoffperoxid ein stärkeres Oxidationsmittel gegenüber der MTG ist als Natriumhypochlorit. Dies zeigte sich auch in der Wiederherstellung der Aktivität durch den Einsatz von GSH bzw. DTT. Bei der Oxidation der MTG konnten bis zu Konzentrationen von 0,5 mM Natriumhypochlorit die Aktivität fast vollständig wiederhergestellt werden (Abbildung 3-17). Im Vergleich dazu konnte bei der Oxidation der MTG mit Wasserstoffperoxid nur bei einer Konzentration von 0,1 mM ca. 80 % der Aktivität durch die DTT-Behandlung wiederhergestellt werden (Abbildung 3-16). Auch Mahadev et al. stellten eine Wiederherstellung der Aktivität einer Protein-Tyrosin-Phosphatase nach der Oxidation mit Wasserstoffperoxid und der anschließend DTT-Behandlung fest [Mahadev et al., 2001].

Für einen möglichen Einsatz thermostabiler MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling, beispielsweise bei der Herstellung von Biopolymeren mittels Extrusion, wurde außerdem die Temperaturabhängigkeit der Oxidation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation der MTG-S2P bei 25 °C, 37 °C und 50 °C in Anwesenheit von 0,02 mM Natriumhypochlorit es im Vergleich zu Wasserstoffperoxid (Abbildung 3-18) zu einer deutlich langsameren Inaktivierung des Enzyms kommt. Aus Abbildung 3-19 ist ersichtlich, dass die Inaktivierung der MTG-S2P durch Natriumhypochlorit vergleichbar ist mit der rein thermischen Inaktivierung des Enzyms bei 50 °C. Es wird vermutet, dass die Konzentration an Natriumhypochlorit zu niedrig gewesen ist und dadurch die Inaktivierung der MTG-S2P bei 50 °C mehr auf dem Temperatureinfluss als auf dem Vorhandensein des Oxidationsmittels basiert. Bereits nach 10-minütiger Inkubation mit 0,02 mM

Wasserstoffperoxid zeigte die MTG nur noch 50 % der Anfangsaktivität (Abbildung 3-19). Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Inaktivierung bei 50 °C durch Oxidation in Anwesenheit von Reduktionsmitteln verlangsamt wird bzw. die MTG direkt vor der Inaktivierung durch Oxidation geschützt werden kann. Mit der Kenntnis darüber könnte man dann durch den Einsatz von DTT oder GSH in Anwendungsprozessen die Stabilität der MTG verbessern. Für eine Urease wurde gezeigt, dass das Enzym bei der Inkubation mit Wasserstoffperoxid und gleichzeitige DTT-Anwesenheit vor Oxidation geschützt werden konnte [Krajewska, 2011].

Oh et al. konnten durch gerichtete Evolution die Stabilität gegen Oxidation und die Thermostabilität simultan für eine N-Carbamyl-D-Aminosäure Amidohydrolase aus *Agrobacterium tumefaciens* verbessern [Oh et al., 2002a; Oh et al., 2002b]. Dabei trugen Aminosäure-Austausche von nicht-oxidierbaren Resten in der besten Mutante deutlich zur Verbesserung der Stabilität gegen Oxidation bei. Im Gegensatz dazu wurde von anderen Autoren berichtet, dass der Austausch von oxidierbaren Aminosäuren zu nicht-oxidierbaren Resten zu einer Verbesserung der Stabilität gegen Oxidation der Enzyme führte [Lin et al., 2003; Slusarczyk et al., 2000]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchungen der Oxidation eine thermostabile MTP-S2P aus der Random Mutagenese verwendet. Es wäre interessant zu untersuchen, welche anderen Aminosäure-Substitutionen der MTG sich positiv auf die Stabilität gegen die Oxidation auswirken.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Verbesserung der Stabilität gegenüber Oxidation ist der gezielte Austausch von Aminosäuren, die bevorzugt oxidiert werden. In dieser Arbeit wurde versucht die Aminosäuren, die durch Natriumhypochlorit oxidiert werden, zu identifizieren. Außerdem sollten die Aminosäure-Reste ermittelt werden, die sich durch die DTT-Behandlung wieder reduzieren lassen. Für die Untersuchungen wurde Natriumhypochlorit als Oxidationsmittel ausgewählt, da hier die Aktivität der MTG durch die DTT-Behandlung fast vollständig wiederhergestellt werden konnte. Die Analyse der Modifikationen der MTG erfolgte nach einem tryptischen Verdau der Proben mittels LC-ESI-MS. Für die durch den Verdau entstandenen Peptide wurde die Massenzunahme bestimmt. Wenn das entstandene Peptid mehr als eine oxidierbare Aminosäure enthält, kann nicht eindeutig bestimmt werden welche Aminosäure oxidiert ist (z.B. Abbildung 3-20). In Tabelle 3-8 wurden alle möglichen oxidierten Aminosäuren angegeben, die auf Grund der Massenzunahme in dem jeweiligen Peptid identifiziert wurden. Es konnten insgesamt 22 Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise oxidiert sind (Tabelle 3-8). Für die Probe mit DTT-Behandlung konnten nur 13 möglicherweise oxidierte Aminosäuren identifiziert werden. Pattison et al. bestimmten die Reihenfolge der Reaktivität von hypochloriger Säure für verschiedene Aminosäure-Reste: Methionin > Cystein >> Cystin ~ Histidin ~  $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren und Peptiden > Tryptophan >> Lysin >> Tyrosin ~ Arginin [Pattison und Davies, 2001]. Anhand dieser

Reihenfolge lässt sich mutmaßen, dass überwiegend Methionin-, Cystein-, Histidin- und Tryptophan-Reste oxidiert sind. Insgesamt konnten sechs Aminosäuren der MTG identifiziert werden, die in der Probe mit Natriumhypochlorit oxidiert, und nach der DTT-Behandlung vermutlich wieder rückreduziert waren (Lys<sup>37</sup>, Trp<sup>38</sup>, Tyr<sup>42</sup>, Met<sup>133</sup>, Met<sup>193</sup>, Lys<sup>194</sup>). Diese könnten für die Reversibilität der Inaktivierung verantwortlich sein.

Die Versuche zur Oxidation der MTG und die anschließende Identifizierung der Modifikationsstellen wurde in einem 40,5 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 durchgeführt (Abschnitt 2.30.2). Die Aminogruppe des Tris kann ebenso wie die Aminogruppe von Lysin-Resten oxidiert werden. Somit wäre es möglich, dass es zu Nebenreaktionen an den Pufferbestandteilen kommt. Die von Pattison und Davies (2001) veröffentlichte Reihenfolge der Reaktivität hypochloriger Säure zeigte jedoch, dass bevorzugt Methionin- und Cystein-Reste oxidiert werden. Daher wird vermutet, dass der Einfluss der Oxidation des Tris relativ gering war und vergleichbare Aussagen über die Oxidation der MTG innerhalb der Versuche der vorliegenden Arbeit gemacht werden können. Für weiterführende Untersuchungen wäre es sinnvoll einen Natriumphosphatpuffer zu verwenden.

Das Peptid mit Cys<sup>64</sup> konnte bei dem Verdau mit Trypsin und der anschließenden LC-ESI-MS-Analyse nicht identifiziert werden. Durch den Verdau des Enzym MTG-S2P mit Chymotrypsin konnte das Peptid mit Cys<sup>64</sup> nachgewiesen werden. Verschiedene Oxidationsstufen für das Cystein konnten sowohl für die oxidierte Probe mit Natriumhypochlorit als auch für die DTT-behandelte Probe ermittelt werden (Tabelle 3-9). Anhand der Peakflächen des Ionenchromatogramm wurde versucht eine Aussage über die prozentuale Menge der einzelnen Fragmente bezogen auf die Gesamtmenge zu machen (Abbildung 3-22). Die mono-oxidierte Form des Peptides konnte für beide Proben nicht identifiziert werden. In diesem Fall wäre die Thiolgruppe des Cysteins zur Sulfensäure oxidiert. Die Sulfensäure ist jedoch ein instabiles Zwischenprodukt und wurde vermutlich weiter zu Sulfinsäure und Sulfonsäure oxidiert [Reddie und Carroll, 2008]. Bei der Probe mit DTT-Behandlung ist der Anteil an 2-fach oxidierten Peptiden (Thiolgruppe zu Sulfinsäure oxidiert) deutlich niedriger als ohne DTT. Dies lässt darauf schließen, dass die Sulfensäure (1-fach oxidiert) nicht weiter zur Sulfinsäure oxidiert wurde, da die Reaktion der Thiolgruppe zur Sulfensäure reversibel ist. Diese Vermutung würde auch die erhöhte Aktivität der MTG mit DTT-Behandlung erklären. Dabei hätte jedoch die prozentuale Menge an unmodifizierten Peptiden in Anwesenheit von DTT wesentlich höher sein müssen. Diese Diskrepanz konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Ein möglicher Ansatzpunkt ist die Aktivitätsmessung der MTG mit dem Hydroxamat-Test. In der Substratlösung für den Aktivitätstest ist 10 mM reduziertes GSH enthalten. Es wird vermutet, dass es durch das GSH zu einer weiteren Reduktion der Sulfensäure kommt und somit die Thiolgruppe des Cysteins wieder für die Katalyse zur Verfügung steht.

Der Großteil der Fragmente des Peptides LSYGCVGVTW liegt in der 4-fach oxidierten Form vor, d.h. die Thiolgruppe des Cysteins ist bis zur Sulfonsäure oxidiert worden ebenso wie eine weitere Aminosäure (Tyr<sup>62</sup> bzw. Trp<sup>69</sup>). Aufgrund der veröffentlichten Reihenfolge der Reaktivitäten von Pattison und Davies wird vermutet, dass die Oxidation von Trp<sup>69</sup> wahrscheinlicher ist [Pattison und Davies, 2001].

Die Reaktion von hypochloriger Säure mit Proteinen kann zur vollständigen Inhibierung der Enzymaktivität als Konsequenz aus der Modifikation von reaktiven Aminosäure-Seitenketten oder Veränderungen nah des aktiven Zentrum sowie durch Proteinfragmentierung und -Aggregation führen [Hawkins et al., 2003]. Albrich et al. zeigten, dass Enzyme wie Papain, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und Alkoholdehydrogenase, welche reaktive Cystein-Reste im aktiven Zentrum besitzen, durch äquimolare Mengen an hypochloriger Säure vollständig inaktiviert werden [Albrich et al., 1981]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die MTG durch die Oxidation u.a. des aktiven Cysteins vollständig inaktiviert wird. Es wäre denkbar dieses Cystein gegen eine andere, weniger oxidationsempfindliche Aminosäure mittels site-directed Mutagenese auszutauschen. Der Austausch von Cys<sup>64</sup> gegen Serin führte jedoch zu einer vollständigen Inaktivierung der MTG (Abschnitt 3.3.3). Dies verdeutlicht, dass Cys<sup>64</sup> essentiell für die MTG-Aktivität ist und andere Möglichkeiten zur Stabilisierung der MTG gegen Oxidation gefunden werden müssen.

## 5 Zusammenfassung

Transglutaminasen (TGs) sind Enzyme, die eine Acyl-Transfer-Reaktion zwischen der  $\gamma$ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutamins und primären Aminen katalysieren. Die mikrobielle TG (MTG) aus *Streptomyces mobaraensis* wird überwiegend in der Lebensmitteltechnologie angewendet, da durch die Vernetzung von Proteinen die Textureigenschaften z. B. von Wurstprodukten verändert werden können. Weiterhin kann die MTG für die Herstellung von Biopolymeren aus verschiedenen Proteinen genutzt werden. Für die Herstellung solcher Biopolymere z.B. mittels Extrusion wäre es vorteilhaft die Verknüpfungsreaktion bei höheren Temperaturen durchführen zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb eine weitere Optimierung der mikrobiellen Transglutaminase ausgehend von Aminosäure-Substitutionen. Diese wurden mittels Random Mutagenese generiert und in einem Screening auf erhöhte Thermostabilität identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Sättigungsmutagenese an sieben thermostabilen Hot Spots durchgeführt. In einem Mikrotiterplatten-basierenden Screening wurden verschiedene Klonbibliotheken auf erhöhte Thermostabilität bei 55 °C untersucht. Für vier Positionen konnten Aminosäure-Substitutionen identifiziert werden, die zu einer weiteren Steigerung der Thermostabilität führten.

Mittels DNA-Shuffling wurden die Mutanten mit der höchsten Thermostabilität aus der Random Mutagenese und der Sättigungsmutagenese kombiniert. Es wurde eine Bibliothek von 1500 Klonen auf verbesserte Thermostabilität untersucht. MTG-Varianten mit dem größten Verhältnis zwischen Restaktivität nach Inkubation bei 55 °C und Anfangsaktivität bei 37 °C wurden ausgewählt. Es wurden 116 Klone mit einer erhöhten Thermostabilität identifiziert, von denen jeweils zwei Klone pro Deep-Well-Platte für eine Sequenzierung ausgewählt wurden (35 MTG-Varianten). Nur sechs MTG-Varianten zeigten die gewünschten Aminosäure-Substitutionen ohne zusätzliche Punktmutation, diese wurden gereinigt und charakterisiert.

Die thermostabilste MTG-Variante (Dreifachmutante S23V-Y24N-K294L) besitzt im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym eine 12-fach höhere Halbwertszeit bei 60 °C und eine 10-fach höhere Halbwertszeit bei 50 °C. Die Halbwertszeit dieser Mutante beträgt 409 min bei 50 °C und 24,3 min bei 60 °C. Eine Mutante mit Aminosäure-Substitutionen an den Positionen 2, 289 und 294 besitzt ein Temperaturoptimum bei 60 °C, welches 10 °C höher als das des Wildtyp-Enzyms ist.

Um die MTG weiter zu optimieren, lassen sich aufbauend auf diesen Ergebnissen weitere Ansätze der gerichteter Evolution anschließen.

Außerdem wurden Untersuchungen zur Stabilität der MTG in Gegenwart von Formaldehyd und Oxidationsmitteln wie Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit durchgeführt. Dazu

wurden die Modifikationsstellen der MTG mittels LC-ESI-MS bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen kleiner 67 mM Formaldehyd einen stabilisierenden Einfluss auf die MTG haben. Hingegen führten Konzentrationen größer als 333 mM Formaldehyd zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Mittels LC-ESI-MS wurde gezeigt, dass alle Lysin-Reste der MTG mono-, di- oder trimethyliert waren. Es lässt sich aber nicht ohne weitere Untersuchungen feststellen, ob gegebenenfalls eine oder nur wenige Lysin-Methylierungen zur Inaktivierung der MTG führen.

Die Untersuchungen zur Oxidation der MTG zeigten, dass die MTG durch Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid inaktiviert wird. Die Aktivität der MTG konnte nach Oxidation mit Wasserstoffperoxid (0,1 mM- 0,2 mM) oder Natriumhypochlorit (0,1 mM- 0,5 mM) durch eine Behandlung mit Reduktionsmitteln wie DTT oder GSH teilweise wiederhergestellt werden. Die Analyse der Modifikationsstellen mittels LC-ESI-MS zeigte, dass verschiedene Aminosäuren durch die Oxidation modifiziert wurden. Unter anderem wurde die Aminosäure Cys<sup>64</sup> oxidiert, die für die katalytische Aktivität der MTG essentiell ist. Die Inaktivierung könnte vorwiegend auf diese Oxidation zurückgeführt werden.

Diese Ergebnisse stellen die Grundlage für weiterführende Untersuchung zur Stabilität der MTG und deren Varianten aus der gerichteten Evolution dar.

## 6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Thermostabilität der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* mittels Sättigungsmutagenese und DNA-Shuffling erhöht werden. Im Verlauf der Arbeiten ergaben sich einige Fragestellungen, die in der Zukunft bearbeitet werden sollten.

Die Charakterisierung der thermostabilen MTG-Varianten zeigte insgesamt, dass scheinbar einige Aminosäure-Positionen stärker zu einer Erhöhung der Thermostabilität beitragen als andere. Als beste Mutante mit einem einzelnen Aminosäure-Austausch wurde die MTG-Variante KB294L identifiziert. Verschiedene MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling (UH303, UH308-B und UH309) mit einer deutlich erhöhten Stabilität besaßen neben anderen Aminosäure-Substitutionen auch den Austausch von Lys<sup>294</sup> zu Leucin. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Position 294 einen signifikanten Einfluss auf die Thermostabilität der MTG bei höheren Temperaturen hat. Eine weitere bedeutende Position für die Stabilität bei höheren Temperaturen ist scheinbar Position 23, da unter allen acht charakterisierten MTG-Varianten nur eine Mutante keinen Austausch an dieser Stelle besaß. Um den Einfluss verschiedener Positionen und deren Kombinationen auf die Thermostabilität der MTG genauer zu untersuchen, könnte man mittels site-directed Mutagenese ausgewählte Hot Spots kombinieren und diese anschließend näher charakterisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur thermostabile MTG-Varianten aus dem DNA-Shuffling charakterisiert, die die gewünschten Aminosäure-Substitutionen besaßen. Neben diesen wurden durch Sequenzierung in der Klonbibliothek weitere thermostabilen MTG-Varianten identifiziert, die zusätzliche Punktmutationen aufwiesen. Eine genauere Charakterisierung dieser MTG-Varianten wäre interessant, um den Einfluss von weiteren Mutationen auf die Thermostabilität der MTG zu untersuchen. Des Weiteren erfolgte die Auswahl der zu sequenzierenden Klone nach dem DNA-Shuffling anhand der Thermostabilität. Im Screening der Klonbibliothek wurden neben den thermostabilen Mutanten auch MTG-Varianten mit einer hohen Aktivität bei 37 °C und 55 °C identifiziert. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Aminosäure-Austausche diese Mutanten (z.B. UH-MTP1 D01, UH-MTP7 D10, UH-MTP9 A06, UH-MTP12 G09, UH-MTP18 A07) besitzen und die proteinbiochemischen Eigenschaften dieser Varianten näher zu charakterisieren.

Es wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zu einer veränderten Substratspezifität verschiedener MTG-Varianten gemacht. Es wäre jedoch interessant zu untersuchen, in wieweit sich die Substratspezifität einzelner thermostabiler Mutanten

verändert hat. Die Aktivität der verschiedenen Mutanten wurde über den Hydroxamat-Test mit CBZ-Gln-Gly als Glutamin-Substrat bestimmt [Folk und Cole, 1966b]. Die vergleichsweise niedrige spezifische Aktivität einzelner MTG-Varianten gegenüber CBZ-Gln-Gly könnte darauf hindeuten, dass sich die Substratspezifität verändert hat. Für den Nachweis dieser Annahme könnte man beispielsweise den Einfluss von flankierenden Aminosäuren auf die Akzeptanz des zentralen Glutamins bzw. Lysins als Substrat der MTG untersuchen [Sommer, 2011]. Die Mutante UH307 mit den Aminosäure-Substitutionen S23V-Y24N-G257S-H289Y ist dabei besonders interessant. Die Position 257 liegt in direkter Nachbarschaft zu Trp<sup>258</sup>. Diese Aminosäure bildet zusammen mit Thr<sup>273</sup> über eine Wasserstoffbrücke die Hauptverbindung der zentralen Faltblätter  $\beta_5$  und  $\beta_6$  [Kashiwagi et al., 2002]. Es ist möglich, dass durch den Austausch zu Serin an Position 257 diese Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wird und damit die Stabilität des Enzyms erhöht wird. Des Weiteren ist Ser<sup>257</sup> in der Nähe von Asp<sup>255</sup>, das Bestandteil der katalytischen Triade ist, lokalisiert. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich der Austausch an Position 257 auf die Substratspezifität auswirkt.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch mehrere Methoden der gerichteten Evolution eine Steigerung der Thermostabilität der MTG ohne Verlust der Aktivität möglich ist. Eine weitere Optimierung des Enzyms durch weiterführende Ansätze der gerichteten Evolution wäre denkbar. Es wäre möglich eine weitere Random Mutagenese mit den thermostabilsten MTG-Varianten durchzuführen und so weitere Punktmutationen mittels fehleranfälligen PCR in das MTG-Gen einzuführen. Eine Alternative wäre eine Kombination aus ep-PCR und DNA-Shuffling. Dabei werden die Template-Gene für die Rekombination mittels fehleranfälliger PCR amplifiziert und so weitere Mutationen erzeugt. Ein weiteres DNA-Shuffling in dem nur zwei Templates rekombiniert werden, könnte zu einer geringeren Größe der Klonbibliothek führen. Dabei wären zum einen die Wildtyp-MTG-Sequenz und zum anderen eine Sequenz mit den Hot Spots für Thermostabilität nötig. Eine weitere Möglichkeit der Optimierung der MTG wäre die Kombination von anderen bisher identifizierten Hot Spots aus der Random Mutagenese [Marx et al., 2008b] und der Sättigungsmutagenese (z.B. KB2M, KB23Y und K294I). Eine interessante Mutante, beispielsweise für eine weitere Steigerung der spezifischen Aktivität, ist dabei die MTG-S2P (CM203) aus der Random Mutagenese, da diese mit einem einzelnen Aminosäure-Austausch eine doppelt so hohe spezifische Aktivität wie das rekombinante Wildtyp-Enzym besitzt.

Die Klonbibliotheken aus der Sättigungsmutagenese und dem DNA-Shuffling wurden nur hinsichtlich erhöhter Thermostabilität der MTG untersucht. Diese Bibliotheken könnten

hinsichtlich weiterer verbesserter Eigenschaften der MTG wie Stabilität bei verschiedenen pH-Werten, gegenüber Lösungsmittel und verschiedenen Chemikalien, untersucht werden. Dazu ist es notwendig ein geeignetes Screening-Verfahren zu etablieren um Mutanten sensitiv genug zu identifizieren.

Die bisherigen Versuche zur Stabilität der MTG gegenüber Formaldehyd und verschiedenen Oxidationsmitteln wurden mit dem rekombinanten Wildtyp-Enzym und einer thermostabilen MTG-Variante durchgeführt. Es wurden innerhalb der Random Mutagenese von Marx und im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mutanten identifiziert, die verschiedene Aminosäure-Austausche besitzen [Marx et al., 2008b]. Eine weitere Untersuchung dieser Mutanten (z.B. CM213, CM227, KB294L) bezüglich Stabilitäten gegenüber Formaldehyd wäre interessant.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die oxidierte MTG-S2P mit Trypsin und Chymotrypsin in entsprechende Peptide für die LC-ESI-MS-Analyse fragmentiert. Dabei konnte teilweise keine eindeutige Aussage über die modifizierte Aminosäure gemacht werden, wenn innerhalb eines Peptids mehrere mögliche oxidierbare Reste vorhanden waren. Es wäre interessant zu analysieren, welche Aminosäuren innerhalb eines Peptids tatsächlich oxidiert sind. Dazu könnte man das Enzym (MTG-S2P) mit einer anderen bzw. weiteren Proteasen schneiden oder die Fragmente im Massenspektrometer weiter fragmentieren ( $MS^n$ ) und die entsprechenden Peptide hinsichtlich der Massenzunahme untersuchen.

Die bisherigen Versuche zur Inaktivierung der MTG durch verschiedene Oxidationsmittel wurden mit einer thermostabilen MTG-S2P durchgeführt. Es wäre interessant zu untersuchen, in wieweit sich das Inaktivierungsverhalten bei thermostabilen MTG-Varianten aus der Sättigungsmutagenese und dem DNA-Shuffling verändert hat. Ein Ansatzpunkt sind dabei Mutanten mit einem Aminosäure-Austausch an Position 289. Diese Position wurde als möglicher Aminosäure-Rest für die Oxidation identifiziert.

## 7 Literatur

- Aharoni, A., Griffiths, A. D. und Tawfik, D. S. (2005). "High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes." *Current Opinion in Chemical Biology*, **9**, 210-216.
- Albrich, J. M., McCarthy, C. A. und Hurst, J. K. (1981). "Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 210-4.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. und Motoki, M. (1989). "Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms." *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613-17.
- Arnold, F. H. und Georgiou, G. (2003). "Directed evolution library creation." Humana Press, Totowa, New Jersey, 231.
- Arnold, F. H. und Volkov, A. A. (1999). "Directed evolution of biocatalysts." *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 54-59.
- Barteri, M., Coluzza, C. und Rotella, S. (2007). "Fractal aggregation of porcine fumarase induced by free radicals." *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*, **1774**, 192-199.
- Barteri, M., Diociaiuti, M., Pala, A. und Rotella, S. (2004). "Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production." *Biophysical chemistry*, **111**, 35-42.
- Bloom, J. D., Labthavikul, S. T., Otey, C. R. und Arnold, F. H. (2006). "Protein stability promotes evolvability." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5869-74.
- Bommarius, A. und Riebel, B. (2003). "Biocatalysis." Wiley, Georgia, 350.
- Borch, R. F., Bernstein, M. D. und Durst, H. D. (1971). "Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent." *Journal of the American Chemical Society*, **93**, 2897-904.
- Bornscheuer, U. T. (2005). "Trends and challenges in enzyme technology." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **100**, 181-203.
- Bornscheuer, U. T. und Pohl, M. (2001). "Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design." *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 137-143.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bruno, M., Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P. und Moresi, M. (2008). "Engineering properties of edible transglutaminase cross-linked caseinate-based films." *Food Bioprocess Technology*, **1**, 393-404.
- Buchholz, K., Kasche, V. und Bornscheuer, U. T. (2005). "Biocatalysts and enzyme technology." Wiley-VCH, Weinheim.
- Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1992). "Randomization of genes by PCR mutagenesis." *PCR Methods Appl*, **2**, 28-33.
- Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1994). "Mutagenic PCR." *PCR Methods Appl*, **3**, S136-40.
- Chambi, H. und Grosso, C. (2006). "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase." *Food Research International*, **39**, 458-466.
- Chau, D. Y., Collighan, R. J., Verderio, E. A., Addy, V. L. und Griffin, M. (2005). "The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen." *Biomaterials*, **26**, 6518-29.
- Chung, S. I. (1972). "Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII." *Ann NY Acad Sci*, **202**, 240-55.
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., III, Charrier, V. und Parsonage, D. (1999). "Protein-Sulfenic Acids: Diverse Roles for an Unlikely Player in Enzyme Catalysis and Redox Regulation." *Biochemistry*, **38**, 15407-15416.
- Coco, W. M. (2003). "RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates." *Methods Mol Biol*, **231**, 111-27.
- Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. und Freeman, A. (2001). "In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million." *Trends Biotechnol*, **19**, 507-10.

- Crow, J. P., Beckman, J. S. und McCord, J. M. (1995). "Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxyxynitrite." *Biochemistry*, **34**, 3544-52.
- Daniel, R. M., Dines, M. und Petach, H. H. (1996). "The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures." *Biochemical Journal*, **317**, 1-11.
- Davies, M. J. (2005). "The oxidative environment and protein damage." *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*, **1703**, 93-109.
- Eijsink, V. G. H., Gaseidnes, S., Borchert, T. V. und van den Burg, B. (2005). "Directed evolution of enzyme stability." *Biomolecular Engineering*, **22**, 21-30.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Alvaro, G. und Guisan, J. M. (1992). "Additional stabilization of penicillin G acylase-agarose derivatives by controlled chemical modification with formaldehyde." *Enzyme Microb Technol*, **14**, 489-95.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966a). "Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity." *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5518-5525.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966b). "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies." *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 244-264.
- Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A. und Veronese, F. M. (2008). "Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase." *Adv Drug Deliv Rev*, **60**, 13-28.
- Galembeck, F., Ryan, D. S., Whitaker, J. R. und Feeney, R. E. (1977). "Reaction of proteins with formaldehyde in the presence and absence of sodium borohydride." *J Agric Food Chem*, **25**, 238-45.
- Gianfreda, L. und Scarfi, M. R. (1991). "Enzyme stabilization: state of the art." *Mol Cell Biochem*, **100**, 97-128.
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.-O. und Arnold, F. H. (1998). "Directed evolution of a thermostable esterase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 12809-12813.
- Gorecki, M. und Shalitin, Y. (1967). "Noncationic substrates of trypsin." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **29**, 189-93.
- Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. und Rice, R. H. (1991). "Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues." *Faseb J*, **5**, 3071-7.
- Griffin, M., Casadio, R. und Bergamini, C. M. (2002). "Transglutaminase: Nature's biological glues." *Biochem. J.*, **368**, 377-396.
- Grunwald, P. (2009). "Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications", Imperial College Press, London.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer. An environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2003). "Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins." *Amino Acids*, **25**, 259-274.
- Hedstrom, L., Graf, L., Stewart, C. B., Rutter, W. J. und Phillips, M. A. (1991). "Modulation of enzyme specificity by site-directed mutagenesis." *Methods in Enzymology*, **202**, 671-87.
- Hogrefe, H. H., Cline, J., Youngblood, G. L. und Allen, R. M. (2002). "Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit." *Biotechniques*, **33**, 1158-60, 1162, 1164-5.
- Holleman, A. F., Wiberg, E., Wiberg, N. und Fischer, G. (2007). "Lehrbuch der Anorganischen Chemie." Walter de Gruyter, 2186.
- Hopwood, D. (1969). "A comparison of the crosslinking abilities of glutaraldehyde, formaldehyde and alpha-hydroxyadipaldehyde with bovine serum albumin and casein." *Histochemie*, **17**, 151-61.
- Illanes, A. (2008). "Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications." Springer, Dordrecht.
- Invitak. (2008). "MSB Spin PCRapace Kit." *Manual*.

- Jacob, M. (2011). "Untersuchungen zum Ersatz von Duroplasten durch enzymatisch quervernetzte Proteine," Dissertation (in Vorbereitung), Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Jaeger, K. E., Eggert, T., Eipper, A. und Reetz, M. T. (2001). "Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 519-530.
- Jentoft, N. und Dearborn, D. G. (1979). "Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride." *J. Biol. Chem.*, **254**, 4359-4365.
- Joern, J. M. (2003). "DNA shuffling." *Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States)*, **231**, 85-89.
- Josten, A., Meusel, M. und Spener, F. (1998). "Microbial transglutaminase-mediated synthesis of hapten-protein conjugates for immunoassays." *Anal Biochem*, **258**, 202-8.
- Kamata, Y., Ishikawa, E. und Motoki, M. (1992). "Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1323-1324.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. und Suzuki, E. (2002). "Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*." *J. Biol. Chem.*, **277**, 44252-60.
- Kawai, M., Takehana, S. und Takagi, H. (1997). "High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 830-5.
- Kikuchi, Y., Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y. und Matsui, H. (2003). "Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: Processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 358-366.
- Kim, S.-Y., Jeitner, T. M. und Steinert, P. M. (2002). "Transglutaminases in disease." *Neurochemistry International*, **40**, 85-103.
- Kirsch, R. D. und Joly, E. (1998). "An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes." *Nucleic acids research*, **26**, 1848-50.
- Klibanov, A. M. (1983). "Stabilization of Enzymes against Thermal inactivation." In: *Advances in Applied Microbiology, Vol. 29* (Laskin, ed.), Academic Press, Inc., New York, 1-24.
- Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K. und Yamanaka, S. (1996). "[epsilon]-([gamma]-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiology Letters*, **144**, 157-160.
- Krajewska, B. (2011). "Hydrogen peroxide-induced inactivation of urease: Mechanism, kinetics and inhibitory potency." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68**, 262-269.
- Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997). "Directed evolution of enzyme catalysts." *Trends in Biotechnology*, **15**, 523-530.
- Kuetemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H. D. und Watkinson, B. M. (2005). "The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase." *Food Control*, **16**, 735-737.
- Kumar, S., Tsai, C.-J. und Nussinov, R. (2000). "Factors enhancing protein thermostability." *Protein Engineering*, **13**, 179-191.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. und Susa, Y. (2001). "Transglutaminase: its utilization in the food industry." *Food Reviews International*, **17**, 221-246.
- Kurtzman, A. L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J. T., Heinrichs, V. und Patten, P. A. (2001). "Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins." *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 361-370.
- Liang, C., Fioroni, M., Rodriguez-Roperro, F., Xue, Y., Schwaneberg, U. und Ma, Y. (2011). "Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile." *J Biotechnol*, **154**, 46-53.
- Liese, A., Seelbach, K. und Wandrey, C. (2000). "Industrial Biotransformations." Wiley-VCH, Weinheim.

- Lin, L.-L., Lo, H.-F., Chiang, W.-Y., Hu, H.-Y., Hsu, W.-H. und Chang, C.-T. (2003). "Replacement of methionine 208 in a truncated *Bacillus* sp. TS-23  $\alpha$ -amylase with oxidation-resistant leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide." *Current Microbiology*, **46**, 211-216.
- Lorenzen, P. C. (2000). "Renneting properties of transglutaminase-treated milk." *Milchwissenschaft*, **55**, 433-437.
- Lorimer, I. A. J. und Pastan, I. (1995). "Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn<sup>2+</sup>." *Nucl. Acids Res.*, **23**, 3067-3068.
- Lowman, H. B. und Wells, J. A. (1993). "Affinity Maturation of Human Growth Hormone by Monovalent Phage Display." *Journal of Molecular Biology*, **234**, 564-578.
- Lumry, R. und Eyring, H. (1954). "Conformation changes of proteins." *Journal of Physical Chemistry*, **58**, 110-20.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. und Mathur, E. J. (1991). "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*." *Gene*, **108**, 1-6.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G. L., Maranas, C. D. und Benkovic, S. J. (2001). "Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11248-53.
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. und Goldstein, B. J. (2001). "Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo and enhances the early insulin action cascade." *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 21938-21942.
- Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W. und Katayama, D. S. (2010). "Stability of protein pharmaceuticals: an update." *Pharm Res*, **27**, 544-75.
- Manning, M. C., Patel, K. und Borchardt, R. T. (1989). "Stability of protein pharmaceuticals." *Pharm Res*, **6**, 903-18.
- Marco, C., Pérez, G., Ribotta, P. und Rosell, C. M. (2007). "Effect of microbial transglutaminase on the protein fractions of rice, pea and their blends." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 2576-2582.
- Mariniello, L. und Porta, R. (2005). "Transglutaminases as biotechnological tools." *Progress in Experimental Tumor Research*, **38**, 174-91.
- Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1543 - 1550.
- Marx, C. K. (2008). "Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Random Mutagenese," Dissertation, Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Haale (Saale).
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008a). "Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E. coli* and characterization of the active enzyme." *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 568-575.
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008b). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162.
- Maullu, C., Raimondo, D., Caboi, F., Giorgetti, A., Sergi, M., Valentini, M., Tonon, G. und Tramontano, A. (2009). "Site-directed enzymatic PEGylation of the human granulocyte colony-stimulating factor." *FEBS Journal*, **276**, 6741-6750.
- May, O., Voigt, C. A. und Arnold, F. H. (2002). "Enzyme engineering by directed evolution.", 2 ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 95-138, 1.
- McLachlan, M. J., Johannes, T. W. und Zhao, H. (2008). "Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis." *Biotechnol Bioeng*, **99**, 268-74.
- Means, G. E. (1984). "Reductive alkylation of proteins." *Journal of Protein Chemistry*, **3**, 121-30.
- Means, G. E. und Feeney, R. E. (1968). "Reductive alkylation of amino groups in proteins." *Biochemistry*, **7**, 2192-201.

- Means, G. E. und Feeney, R. E. (1998). "Chemical modifications of proteins: a review." *Journal of Food Biochemistry*, **22**, 399-425.
- Metz, B., Kersten, G. F., Baart, G. J., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., van Steenberghe, M. J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. und Jiskoot, W. (2006). "Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin." *Bioconjug Chem*, **17**, 815-22.
- Metz, B., Kersten, G. F., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F., Timmermans, H. A., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. und Jiskoot, W. (2004). "Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides." *J Biol Chem*, **279**, 6235-43.
- Meyer, B. und Boehme, C. (1995). "Massivholz und Formaldehyd" *European Journal of Wood and Wood Products*, **53**, 135.
- Misset, O. (1993). "Stability of Industrial Enzymes." In: *Stability and Stabilization of Enzymes: Proceedings of an international symposium held in Maastricht, The Netherlands, 22-22 November 1992* (van den Tweel, W. J. J., Harder, A. und Buitelaar, R. M., eds.), Elsevier, Amsterdam.
- Miyazaki, K. und Arnold, F. H. (1999). "Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function." *J Mol Evol*, **49**, 716-20.
- Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N. und Arnold, F. H. (2000). "Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme." *J Mol Biol*, **297**, 1015-26.
- Moore, J. C. und Arnold, F. H. (1996). "Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents." *Nat Biotechnol*, **14**, 458-67.
- Motoki, M., Nio, N. und Takinami, K. (1984). "Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase." *Agric Biol Chem*, **48**, 1257-1261.
- Neylon, C. (2004). "Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution." *Nucl. Acids Res.*, **32**, 1448-1459.
- Nio, N., Motoki, M. und Takinami, K. (1986). "Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase." *Agric Biol Chem*, **50**, 851-855.
- Novagen. (2005). "pET System Manual 11th Edition."
- O'Fagain, C. (2003). "Enzyme stabilization - recent experimental progress." *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 137-149.
- Oh, J.-H., Wang, B., Field, P. D. und Aglan, H. A. (2004). "Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase." *International Journal of Food Science and Technology*, **39**, 287-294.
- Oh, K.-H., Nam, S.-H. und Kim, H.-S. (2002a). "Directed Evolution of N-Carbamyl-D-amino Acid Amidohydrolase for Simultaneous Improvement of Oxidative and Thermal Stability." *Biotechnology Progress*, **18**, 413-417.
- Oh, K.-H., Nam, S.-H. und Kim, H.-S. (2002b). "Improvement of oxidative and thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by directed evolution." *Protein Engineering*, **15**, 689-695.
- Ostermeier, M., Shim, J. H. und Benkovic, S. J. (1999). "A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology." *Nat Biotechnol*, **17**, 1205-9.
- Pace, C. N. und Schmid, F. X. (1997). "How to determine the molar absorption coefficient of a protein." (Creighton, T. E., ed.), IRL Press, Oxford, 253-259.
- Pace, C. N. und Scholtz, J. M. (1997). "Measuring the conformational stability of a protein." In: *Protein Structure: a practical approach* (Creighton, T. E., ed.), IRL Press, Oxford, 253-259.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S. und Fuchsbauer, H. L. (1998). "Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense* - purification, characterisation and sequence of the zymogen." *Eur. J. Biochem.*, **257**, 570-6.

- Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2001). "Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds." *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 1453-1464.
- Patzsch, K., Riedel, K. und Pietzsch, M. (2010). "Parameter optimization for protein film production using microbial transglutaminase." *Biomacromolecules*, **11**, 896-903.
- Paulsen, C. E. und Carroll, K. S. (2009). "Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches." *ACS chemical biology*, **5**, 47-62.
- Petruska, J., Goodman, M. F., Boosalis, M. S., Sowers, L. C., Cheong, C. und Tinoco, I., Jr. (1988). "Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 6252-6.
- Poole, L. B., Karplus, P. A. und Claiborne, A. (2004). "Protein sulfenic acids in redox signaling." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44**, 325-347.
- Ragkousi, K. und Setlow, P. (2004). "Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores." *J. Bacteriol.*, **186**, 5567-75.
- Reddie, K. G. und Carroll, K. S. (2008). "Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation." *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**, 746-754.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D. und Lohmer, R. (2008). "Addressing the numbers problem in directed evolution." *ChemBiochem*, **9**, 1797-804.
- Reetz, M. T., Wilensek, S., Zha, D. und Jaeger, K. E. (2001). "Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis." *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**, 3589-3591.
- Rice, R. H., Means, G. E. und Brown, W. D. (1977). "Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation." *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure*, **492**, 316-21.
- Sanchis, J., Fernandez, L., Carballeira, J. D., Drone, J., Gumulya, Y., Hoebenreich, H., Kahakeaw, D., Kille, S., Lohmer, R., Peyralans, J. J. P., Podtetenieff, J., Prasad, S., Soni, P., Taglieber, A., Wu, S., Zilly, F. E. und Reetz, M. T. (2008). "Improved PCR method for the creation of saturation mutagenesis libraries in directed evolution: application to difficult-to-amplify templates." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 387-397.
- Sato, H. (2002). "Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins." *Adv Drug Deliv Rev*, **54**, 487-504.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. und Witholt, B. (2001). "Industrial biocatalysis today and tomorrow." *Nature*, **409**, 258-68.
- Schmidt-Dannert, C. und Arnold, F. H. (1999). "Directed evolution of industrial enzymes." *Trends Biotechnol*, **17**, 135-6.
- Schrodinger, LLC. (2010). "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1."
- Sen, S., Venkata Dasu, V. und Mandal, B. (2007). "Developments in Directed Evolution for Improving Enzyme Functions." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **143**, 212-223.
- Serafini-Fracassini, D. und Del Duca, S. (2008). "Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants." *Ann Bot (Lond)*, **102**, 145-52.
- Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S. und Beninati, S. (1995). "Plant transglutaminases." *Phytochemistry*, **40**, 355-65.
- Shimba, N., Shinohara, M., Yokoyama, K., Kashiwagi, T., Ishikawa, K., Ejima, D. und Suzuki, E. (2002). "Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site." *FEBS Letters*, **517**, 175-179.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R. und Pohl, M. (2000). "Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues." *European Journal of Biochemistry*, **267**, 1280-1289.
- Sommer, C. (2011). "Investigations of the production, purification, activation and characterization of novel recombinant highly active Transglutaminases," Dissertation (in Vorbereitung), Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Sommer, C., Hertel, T. C., Schmelzer, C. E. H. und Pietzsch, M. (2011a). "Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: In contrast to

- Proteinase K, Dispase removes the Histidine-tag." *Amino Acids*, accepted for publication.
- Sommer, C., Volk, N. und Pietzsch, M. (2011b). "Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *E. coli*." *Protein Expression and Purification*, **77**, 9–19.
- Sriprapundh, D., Vieille, C. und Zeikus, J. G. (2000). "Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis." *Protein Engineering*, **13**, 259-265.
- Stemmer, W. P. C. (1994a). "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10747-51.
- Stemmer, W. P. C. (1994b). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." *Nature (London, United Kingdom)*, **370**, 389-91.
- Sterner, R. und Liebl, W. (2001). "Thermophilic adaptation of proteins." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **36**, 39-106.
- Stratagene. (2007). "QuikChange site-directed Mutagenesis Kit." *Manufacturer's Manual*.
- Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." *Protein. Expr. Purif.*, **41**, 207-34.
- Synowiecki, J. und Wolosowska, S. (2006). "Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by crosslinking with transglutaminase." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 1417-1422.
- Tao, H. und Cornish, V. W. (2002). "Milestones in directed enzyme evolution." *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 858-64.
- Taylor, M. M., Liu, C. K., Latona, N., Marmer, W. N. und Brown, E. M. (2002). "Enzymatic modification of hydrolysis products from collagen using a microbial transglutaminase. II. Preparation of films." *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **97**, 225-234.
- Tjeerdsmas, B. F., Boonstra, M., Pizzi, A., Tekely, P. und Militz, H. (1998). "Characterisation of thermally modified wood: molecular reasons for wood performance improvement." *European Journal of Wood and Wood Products*, **56**, 149-153.
- Vieille, C. und Zeikus, G. J. (2001). "Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, 1-43.
- Villalonga, R., Fernandez, M., Fragoso, A., Cao, R., Di Pierro, P., Mariniello, L. und Porta, R. (2003). "Transglutaminase-catalyzed synthesis of trypsin-cyclodextrin conjugates: kinetics and stability properties." *Biotechnol Bioeng*, **81**, 732-7.
- Wang, Q. und Xia, T. (2008). "Enhancement of the activity and alkaline pH stability of *Thermobifida fusca* xylanase A by directed evolution." *Biotechnol Lett*, **30**, 937-44.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J. C. (1994). "Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction." *Gene*, **151**, 119-23.
- Williams, G. J., Nelson, A. S. und Berry, A. (2004). "Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences." *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **61**, 3034-46.
- Yang, H.-L., Pan, L. und Lin, Y. (2009). "Purification and on-column activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **73**, 2531-4.
- Yildirim, M. und Hettiarachchy, N. S. (1998). "Properties of films produced by crosslinking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase." *Journal of Food Science*, **63**, 248-252.
- Yokoyama, K., Nio, N. und Kikuchi, Y. (2004). "Properties and applications of microbial transglutaminase." *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 447-454.
- Yokoyama, K., Suzuki, M., Kashiwagi, T., Suzuki, E., Date, M. und Taguchi, S. "Transglutaminase having disulfid bond therein." (20080214), Ajinomoto Co., Inc., Japan, EP.
- Yokoyama, K., Utsumi, H., Nakamura, T., Ogaya, D., Shimba, N., Suzuki, E. und Taguchi, S. (2010). "Screening for improved activity of a transglutaminase from *Streptomyces*

- mobaraensis created by a novel rational mutagenesis and random mutagenesis." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 2087-2096.
- Yokoyama, K. I., Nakamura, N., Seguro, K. und Kubota, K. (2000). "Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, in vitro refolding, and characterization of the refolded form." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1263-70.
- You, L. und Arnold, F. H. (1996). "Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide." *Protein Engineering*, **9**, 719.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J. und Keenan, R. (2005). "Laboratory-directed protein evolution." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**, 373-392.
- Yung, C. W., Wu, L. Q., Tullman, J. A., Payne, G. F., Bentley, W. E. und Barbari, T. A. (2007). "Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold." *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, **83A**, 1039-1046.
- Zhao, H. und Arnold, F. H. (1997a). "Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7997-8000.
- Zhao, H. und Arnold, F. H. (1997b). "Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination." *Nucleic acids research*, **25**, 1307-8.
- Zhao, H. und Arnold, F. H. (1999). "Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase." *Protein Eng.*, **12**, 47-53.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. und Arnold, F. H. (1998). "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." *Nat Biotech*, **16**, 258-261.
- Zheng, L., Baumann, U. und Reymond, J.-L. (2004). "An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol." *Nucleic Acids Res.*, **32**, e115/1-e115/5.
- Zotzel, J., Keller, P. und Fuchsbauer, H. L. (2003a). "Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease." *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3214-22.
- Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M. und Fuchsbauer, H. L. (2003b). "Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step." *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4149-55.

## 8 Anhang

### 8.1 Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz pDJ1-3

pDJ1-3: Pro-MTG-Gen aus *Streptomyces mobaraensis* (DSM 40847) mit C-terminalen His-Tag kloniert über *NdeI/XhoI*-Schnittstellen in Vektor pET20b(+)

```

-46                                     M D N G A G
-138                                   ATGGACAATGGCGCGGGG

-40   E E T K S Y A E T Y R L T A D D V A N I
-120  GAAGAGACGAAGTCCTACGCCGAAACCTACCGCCTCACGGCGGATGACGTCGCGAACATC

-20   N A L N E S A P A A S S A G P S F R A P
-60   AACGCGCTCAACGAAAGCGCTCCGGCCGCTTCGAGCGCCGGCCCCGTCGTTCCGGGCCCCC

   1   D S D D R V T P P A E P L D R M P D P Y
   1   GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCCGAGCCGCTCGACAGGATGCCCGACCCGTAC

  21   R P S Y G R A E T V V N N Y I R K W Q Q
  61   CGTCCCTCGTACGGCAGGGCCGAGACGGTTCGTAACAACACTACATACGCAAGTGGCAGCAG

  41   V Y S H R D G R K Q Q M T E E Q R E W L
 121  GTCTACAGCCACCGCGACGGCAGGAAGCAGCAGATGACCGAGGAGCAGCGGGAGTGGCTG

   61   S Y G C V G V T W V N S G Q Y P T N R L
 181  TCCTACGGCTGCGTCGGTGTACCTGGGTCAATTTCGGGTCAGTACCCGACGAACAGACTG

   81   A F A S F D E D R F K N E L K N G R P R
 241  GCCTTCGCGTCCTTCGACGAGGACAGGTTCAAGAACGAGCTGAAGAACGGCAGGCCCCCG

 101   S G E T R A E F E G R V A K E S F D E E
 301  TCCGGCGAGACGCGGGCGGAGTTCGAGGGCCGCGTCGCGAAGGAGAGCTTCGACGAGGAG

 121   K G F Q R A R E V A S V M N R A L E N A
 361  AAGGGCTTCCAGCGGGCGCGTGAGGTGGCGTCCGTCATGAACAGGGCCCTGGAGAACGCC

 141   H D E S A Y L D N L K K E L A N G N D A
 421  CACGACGAGAGCGCTTACCTCGACAACCTCAAGAAGGAACACTGGCGAACGGCAACGACGCC

 161   L R N E D A R S P F Y S A L R N T P S F
 481  CTGCGCAACGAGGACGCCCCGTTCCCCGTTTACTCGGGCGCTGCGGAACACGCCGTCCTTC

 181   K E R N G G N H D P S R M K A V I Y S K
 541  AAGGAGCGGAACGGAGGCAATCACGACCCGTCAGGATGAAGCCGTCATCTACTCGAAG

 201   H F W S G Q D R S S S A D K R K Y G D P
 601  CACTTCTGGAGCGGCCAGGACCGGTTCGAGTTCGGCCGACAAGAGGAAGTACGGCGACCCG

 221   D A F R P A P G T G L V D M S R D R N I
 661  GACGCCTTCCGCCCCGCCCCGGGACCCGGCCTGGTTCGACATGTCGAGGGACAGGAACATT

 241   P R S P T S P G E G F V N F D Y G W F G
 721  CCGCGCAGCCCCACCAGTCCCGGTGAGGGATTTCGTAATTTGACTACGGCTGGTTCGGC

 261   A Q T E A D A D K T V W T H G N H Y H A
 781  GCCCAGACGGAAGCGGACGCCGACAAGACCGTCTGGACCCACGGAATCACTATCACCGC

 281   P N G S L G A M H V Y E S K F R N W S E

```

841 CCCAATGGCAGCCTGGGTGCCATGCATGTCTACGAGAGCAAGTTCCGCAACTGGTCCGAG  
 301 G Y S D F D R G A Y V I T F I P K S W N  
 901 GGTTACTCGGACTTCGACCGCGGAGCCTATGTGATCACCTTCATCCCCAAGAGCTGGAAC  
 321 T A P D K V K Q G W P L E H H H H H H -  
 961 ACCGCCCCGACAAGGTAAAGCAGGGCTGGCCGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

## 8.2 Einfluss von Formaldehyd auf die MTG - Sequenzabdeckung LC-ESI-MS

### A) 17 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Pepsin-Verdau

FRAPDPDRV TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGCVG VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHDDESAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFYALRN  
 TPSFKERNNG NHDPSRMKAV IYSKHFWSGQ DRSSSADKRK YGDPDAFRPA PGTGLVDMSR  
 DRNIPRSPTS PEGEFVNFYD GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVYESKFR  
 NWSEGYSDFD RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWPLeHHH HHH

### B) 34 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Pepsin-Verdau

FRAPDPDRV TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGCVG VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHDDESAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFYALRN  
 TPSFKERNNG NHDPSRMKAV IYSKHFWSGQ DRSSSADKRK YGDPDAFRPA PGTGLVDMSR  
 DRNIPRSPTS PEGEFVNFYD GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVYESKFR  
 NWSEGYSDFD RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWPLeHHH HHH

### C) 51 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Pepsin-Verdau

FRAPDPDRV TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGCVG VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHDDESAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFYALRN  
 TPSFKERNNG NHDPSRMKAV IYSKHFWSGQ DRSSSADKRK YGDPDAFRPA PGTGLVDMSR  
 DRNIPRSPTS PEGEFVNFYD GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVYESKFR  
 NWSEGYSDFD RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWPLeHHH HHH

**Abbildung 8-1: Sequenzabdeckung der FRAP-MTG-S2P-His<sub>6</sub> entsprechend der LC-ESI-MS-Analyse nach Inkubation mit 300 mM Formaldehyd und gleichzeitiger Natriumcyanoborhydrid-Behandlung (Pepsin-Verdau).** grün: Wahrscheinlichkeit für Zufallstreffer <1 %, gelb: Wahrscheinlichkeit für Zufallstreffer 1-5 %.

### A) 17 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Pepsin-Verdau

FRAPDPDRV TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGCVG VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHDDESAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFYALRN  
 TPSFKERNNG NHDPSRMKAV IYSKHFWSGQ DRSSSADKRK YGDPDAFRPA PGTGLVDMSR  
 DRNIPRSPTS PEGEFVNFYD GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVYESKFR  
 NWSEGYSDFD RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWPLeHHH HHH

### B) 17 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Trypsin-Verdau

FRAPDPDRV TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGCVG VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHDDESAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFYALRN  
 TPSFKERNNG NHDPSRMKAV IYSKHFWSGQ DRSSSADKRK YGDPDAFRPA PGTGLVDMSR  
 DRNIPRSPTS PEGEFVNFYD GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVYESKFR  
 NWSEGYSDFD RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWPLeHHH HHH

C) 34 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Pepsin-Verdau

FRAPDPDDR<sup>V</sup> TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGC<sup>V</sup>G VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHD<sup>E</sup>SAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFY<sup>S</sup>ALRN  
 TPSFKERN<sup>G</sup>G NHDPSRMKAV IYSKHFW<sup>S</sup>GQ DRSSSADK<sup>R</sup>K YGDPDAFRPA PGTGLVDM<sup>S</sup>R  
 DRNIPRSPTS PGE<sup>G</sup>GFVNF<sup>D</sup>Y GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVY<sup>E</sup>SKFR  
 NWSEGYSD<sup>F</sup>D RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWP<sup>L</sup>EH<sup>H</sup>H HHH

D) 34 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Trypsin-Verdau

FRAPDPDDR<sup>V</sup> TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGC<sup>V</sup>G VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHD<sup>E</sup>SAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFY<sup>S</sup>ALRN  
 TPSFKERN<sup>G</sup>G NHDPSRMKAV IYSKHFW<sup>S</sup>GQ DRSSSADK<sup>R</sup>K YGDPDAFRPA PGTGLVDM<sup>S</sup>R  
 DRNIPRSPTS PGE<sup>G</sup>GFVNF<sup>D</sup>Y GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVY<sup>E</sup>SKFR  
 NWSEGYSD<sup>F</sup>D RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWP<sup>L</sup>EH<sup>H</sup>H HHH

E) 51 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Pepsin-Verdau

FRAPDPDDR<sup>V</sup> TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGC<sup>V</sup>G VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHD<sup>E</sup>SAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFY<sup>S</sup>ALRN  
 TPSFKERN<sup>G</sup>G NHDPSRMKAV IYSKHFW<sup>S</sup>GQ DRSSSADK<sup>R</sup>K YGDPDAFRPA PGTGLVDM<sup>S</sup>R  
 DRNIPRSPTS PGE<sup>G</sup>GFVNF<sup>D</sup>Y GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVY<sup>E</sup>SKFR  
 NWSEGYSD<sup>F</sup>D RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWP<sup>L</sup>EH<sup>H</sup>H HHH

F) 51 mg/mL NaCNBH<sub>3</sub>, Trypsin-Verdau

FRAPDPDDR<sup>V</sup> TPPAEPLDRM PDPYRPSYGR AETVVNNYIR KWQQVYSHRD GRKQQMTEEQ  
 REWLSYGC<sup>V</sup>G VTWVNSGQYP TNRLAFASFD EDRFKNELKN GRPRSGETRA EFEGRVAKES  
 FDEEKGFQRA REVASVMNRA LENAHD<sup>E</sup>SAY LDNLKKELAN GNDALRNEDA RSPFY<sup>S</sup>ALRN  
 TPSFKERN<sup>G</sup>G NHDPSRMKAV IYSKHFW<sup>S</sup>GQ DRSSSADK<sup>R</sup>K YGDPDAFRPA PGTGLVDM<sup>S</sup>R  
 DRNIPRSPTS PGE<sup>G</sup>GFVNF<sup>D</sup>Y GWFGAQTEAD ADKTVWTHGN HYHAPNGSLG AMHVY<sup>E</sup>SKFR  
 NWSEGYSD<sup>F</sup>D RGAYVITFIP KSWNTAPDKV KQGWP<sup>L</sup>EH<sup>H</sup>H HHH

**Abbildung 8-2: Sequenzabdeckung der FRAP-MTG-S2P-His<sub>6</sub> entsprechend der LC-ESI-MS-Analyse nach Inkubation mit 300 mM Formaldehyd und anschließender Natriumcyanoborhydrid-Behandlung (Pepsin-Verdau und Trypsin-Verdau).** grün: Wahrscheinlichkeit für Zufallstreffer <1 %, gelb: Wahrscheinlichkeit für Zufallstreffer 1-5 %.

### 8.3 Oxidation der MTG-S2P mit Natriumhypochlorit - Sequenzabdeckung LC-ESI-MS

Zur Illustration der Sequenzabdeckung sowie der durch den Pepsin-Verdau entstandenen Peptide und der identifizierten oxidierten Aminosäuren wurden in Abbildung 8-3 die Ergebnisse der LC-ESI-MS-Analyse für die MTP-S2P oxidiert mit Natriumhypochlorit ohne DTT-Behandlung und in Abbildung 8-4 für die MTP-S2P oxidiert mit Natriumhypochlorit mit DTT-Behandlung dargestellt (Chymotrypsin-Verdau).



## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Karin Büttner  
 Geburtsdatum/-ort: 09.08.1983 in Sebnitz  
 Nationalität: deutsch  
 Familienstand: ledig  
 Akademischer Grad: Diplom-Naturwissenschaftlerin

### Schulischer und Beruflicher Werdegang

- 02/2008-06/2011 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
 Promotion (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte)  
 „Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Sättigungsmutagenese und DNA-Shuffling“
- 10/2002-11/2007 **TU Bergakademie Freiberg**  
 Studium: Angewandte Naturwissenschaft (Vertiefung: Biotechnologie)  
 Diplomarbeit (AG Umweltmikrobiologie)  
 „Eine neue (Chlor-)Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase aus *Rhodococcus opacus* 1CP: Klonierung des Gens, Charakterisierung und Expressionsanalyse“
- 2005 - 01/2008 **TU Bergakademie Freiberg (AG Umweltmikrobiologie)**  
 wissenschaftliche Hilfskraft  
 Betreuung des Praktikums „Methoden der molekularen Genetik“  
 Betreuung des biologischen Grundpraktikums (Enzymologie: Enzymaktivitätsbestimmung bei Urease)  
 Tutor für die Vorlesung Molekularbiologie
- 08/2005 **Mikrobiologisch-analytisches Labor GmbH (MAL) in Stollberg**  
 zweimonatiges Berufspraktikum
- 09/1994 - 07/2002 **Götzinger-Gymnasium Neustadt/ Sachsen**  
 Allgemeine Hochschulreife (2002)

## 10 Publikationsliste

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

Buettner, K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2011). "Increased thermostability of microbial transglutaminase by combining several hot spots evolved by random and saturation mutagenesis". akzeptiert zur Publikation in *Amino Acids*.

Büttner, K., Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2010). "Optimierung einer rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase." *Chemie Ingenieur Technik*, **82**, 43 - 49.

### Konferenzbeiträge

Büttner, K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2010). "Saturation mutagenesis of seven heat stable variants of a transglutaminase evolved by random mutagenesis" Posterpräsentation Gordon Research Conference - Biocatalysis, Boston, USA.

Büttner, K., Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2009). „Optimization of a microbial transglutaminase“ Posterpräsentation Biokatalyse: Neue Verfahren, neue Produkte, Bad Schandau.