

**Untersuchung zur Erzeugung, Herstellung und partiellen
Charakterisierung thermoresistenter mikrobieller Transglutaminase
Varianten**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn M.Sc. Benjamin Böhme (geb. Schrank)

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Pietzsch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karsten Mäder

Drittgutachter: Prof. Dr. Michael Schlömann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.05.2024

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Benjamin Böhme

.....

Halle (Saale),

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Möglichkeit dieses Thema im Rahmen einer Promotion zu bearbeiten bedanken. Es hat Spaß gemacht, dieses Thema/Projekt in der AG Pietzsch zu bearbeiten.

Hierbei gefiel mir nicht nur die Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse bzw. Fragestellungen, sondern die Freiheit zur Bearbeitung eigener Ideen und Projekte.

Bei Herrn Prof. Dr. Mäder und Herrn Prof. Dr. Schlömann möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Moritz und Frau Dr. Seifert, die mir nicht nur zu einem kritischen Blick auf die Begrifflichkeit zur "Thermostabilität", sondern auch auf die Schlussfolgerungen aus den Inaktivierungskinetiken und den Quervernetzungsstudien verhalfen. Auch M. Anwand möchte ich für die Unterstützung und Hilfe zur Durchführung der Fermentationen danken.

Ein weiter Dank gilt Herrn Dr. Hauke Lilie, der mir bei der Auswertung und Interpretation der nanoDSF Versuche half. Herrn Dr. Christian Ihling (AG Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie) danke ich für die Durchführung der LC-ESI-MS-Untersuchungen zur Identifikation der Quervernetzungsstellen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei C. Robbrecht und J. Wendler für die angenehme Zusammenarbeit während der Anfertigung ihrer Studienarbeiten bedanken.

Ich bedanke mich bei der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR) für die finanzielle Unterstützung während der Promotion. Analog hierzu möchte ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung (und auch moralische) während des Studiums bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Frau Monique, ohne die diese Arbeit womöglich nie fertig geworden wäre.

Anmerkung

Für naturwissenschaftliche bzw. biochemische Fachausdrücke wurden die international üblichen Abkürzungen verwendet. Englische Begriffe sind kursiv dargestellt.

Die rekombinanten pro – Transglutaminase Varianten enthielten durchgängig einen C - terminalen His₆ - tag mit einer zwei Aminosäure (LE) langen *linker* – Sequenz. Desweiteren verblieben nach Abspaltung des pro – Peptides mittels Proteinase K zur Aktivierung der Transglutaminase eine N - terminale Extension von vier Aminosäuren (FRAP). Die Benennung der Fusionsproteine erfolgt in dieser Arbeit ohne explizite Erwähnung der C bzw. N - terminalen Extension. So wird beispielhaft die FRAP-TG¹⁶-LE-His₆ im Folgenden als TG¹⁶ bezeichnet. Die aktiven Enzymvarianten werden kurz als mTG bzw. TGⁿ und die zymogene Form als pro-mTG bezeichnet. Bei den in der vorliegenden Arbeit rekombinant generierten Enzymvarianten basiert die Nukleotid - Sequenz auf der nativen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (*Sm* mTG).

Die Versuche 3.1-3,3.1-8, 3.1-9 und 3.2-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau M.Sc. Julia Wendler im Rahmen von zwei Forschungsgruppenpraktika, ihrer Masterarbeit und ihrer Zeit als Hilfwissenschaftlerin in der AG Pietzsch gemeinsam geplant, durchgeführt und ausgewertet. Für Abschnitt 3.2-3 wurden Daten aus gemeinsam geplanten und durchgeführten Experimenten mit ausgewertet (siehe auch Bachelorarbeit von Frau M.Sc. Cindy Robbrecht).

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antikörper-Wirkstoffkonjugate(n)
APS	Ammonium-Peroxodisulfat
A_{spez}	Spezifische Aktivität
atro	absolute Trockenmasse
A_v	volumetrische Aktivität
BFM	Biofeuchtmasse
DAIP	Dispase autolysierenden induzierenden Protein
CD	Circular Dichroismus
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DoE	<i>design of experiment</i>
DTT	Dithiothreitol
EN	Europäische Norm
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEW	<i>hen egg white</i> Lysozym
HMW	hochmolekulare Quervernetzungsprodukte (<i>high molecular weight products</i>)
IA	Iodacetamid
iE_A	Inaktivierungsenergie
IHD	Institut für Holztechnologie in Dresden
k_{inakt}	Geschwindigkeitskonstante des Inaktivierungsprozesses
k_{kat}	Umsatzrate oder auch Wechselzahl
k_{kat}/K_M	katalytische Effizienz
K_M	Michaelis – Menten Konstante, gibt die halbmaximale Geschwindigkeit an
MD	moleküldynamische Simulierung
MDC	Monodansylcadaverin
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure Monohydrat
mTG	mikrobielle Transglutaminase(n)
MTP	Mikrotiterplatte(n)
MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
MWC	<i>Molecular weight cut-off</i>
nDSF	<i>nano differential scanning calorimetry</i>
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
pdb	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol

PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
SD	Standardabweichung
<i>Sm</i> mTG	mikrobielle Transglutaminase aus <i>Streptomyces mobaraensis</i>
SM-TAP	<i>Streptomyces mobaraensis</i> tripeptidyl aminopeptidase
SPI	Streptomyces Papain Inhibitor
SSTI	<i>Streptomyces</i> Subtilisin Transglutaminase aktivierende Metalloprotease Inhibitor
TAMEP	Transglutaminase aktivierende Metalloprotease
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Transglutaminase(n)
T _M	Schmelzpunkt
T _{on}	<i>onset temperature</i> (Beginn der Entfaltung eines Proteins)
T _{Agg}	Beginn der Aggregation
T _{opt}	Temperaturoptimum
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> , entspricht einem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute
u.a.	unter anderem
V _{max}	maximale Geschwindigkeit bei Substratsättigung
vTG	vertebraten Transglutaminase(n)
Wt	Wildtyp
xTG	quervernetzte mTG

Inhalt

1.) Einleitung	1
1.1) Transglutaminasen	2
1.1-1) Ein historischer Abriss bis zur Entdeckung der mikrobiellen Transglutaminasen (mTG)	2
1.1-2) Produktion der mTG aus <i>Streptomyces mobaraensis</i>	3
1.1-3) Eigenschaften der mikrobiellen Transglutaminasen (mTG) aus <i>S. mobaraensis</i>	6
1.1-4) Substratspezifität der mikrobiellen Transglutaminase	8
1.1-5) Druckstabilität und Temperaturreistenz der <i>Sm</i> mTG	11
1.2) Motivation und Zielsetzung	14
2.) Material und Methoden	15
2.1) Material	15
2.1-1) Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.1-2) Chemikalien	16
2.1-3) Puffer, Medien und Lösungen	19
2.1-4) Organismen	20
2.1-5) Vektoren und Konstrukte	20
2.1-6) Enzyme, Marker und Reaktionskits	22
2.1-7) Übersicht über verwendete Oligonukleotide	23
2.2) Molekularbiologische Methoden	23
2.2-1) Polymerase Kettenreaktion (PCR)	23
2.2-2) Präparative und analytische Restriktion	24
2.2-3) Reinigung restringierter Amplifikate und Vektoren	25
2.2-4) Horizontale Gelelektrophorese und DNA-Analyse	25
2.2-5) Ligation	25
2.2-6) Chemische Transformation	25
2.2-7) Plasmidpräparation	26
2.2-8) Sequenzierung	26
2.2-9) Golden Gate shuffling	26

2.2-10) Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.3) Mikrobiologische Methoden	28
2.3-1) Heterologe Produktion der <i>Sm</i> mTG – Varianten in <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) im 0,2 L Maßstab	28
2.3-2) Heterologe Produktion der <i>Sm</i> mTG – Varianten in <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) im 11,5 L Maßstab	29
2.3-3) Bestimmung der Plasmidstabilität	32
2.3-4) Zellaufschluss: enzymatisch und mechanisch	32
2.3-5) Analyse von 1/OD - Proben.....	32
2.3-6) Aktivierung der pro – mTG Varianten mit Proteinase K.....	33
2.3-7) Reinigung der aktivierten mTG – Varianten mittels HisGraviTrap Säulen.....	33
2.3-8) Isolierung der pro-TG ¹⁶ durch Abtrennung von Wirtszellproteinen mittels Hitzefällung	33
2.3-9) Dialyse und Lagerung der aktivierten mTG – Varianten.....	34
2.4) Proteinbiochemische Methoden	34
2.4-1) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [Bradford, 1976]	34
2.4-2) Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV – Absorption bei 280 nm	34
2.4-3) SDS – PAGE und Färbung mittels Coomassie	35
2.4-4) Bestimmung der volumetrischen (A_V) und spezifischen Aktivität (A_{spez}) der mTG – Varianten	37
2.4-5) Aufnahme der Inaktivierungskinetiken, Bestimmung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und Inaktivierungsenergie (iE_A) der mTG - Varianten.....	38
2.4-6) Aufnahme von Temperaturübergangskurven von mTG – Varianten mittels nanoDSF	39
2.4-7) Kopplung von Monodansylcadaverin (MDC) an und mittels mTG	39
2.4-8) Identifizierung von intrinsischen Quervernetzungsstellen mittels LC/MS	40
2.4-9) Bestimmung der pH – Wert Stabilität und chemischen Resistenz der TG ¹⁶ , TG ⁰⁴ (S2P) und der Wt mTG.....	40
2.4-10) Ermittlung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur.....	41
2.4-11) Bestimmung der kinetischen Parameter der TG ¹⁶ , TG ⁰⁴ und der Wt mTG	42

2.4-12) Bestimmung des Umsatzes von β – Casein für die Varianten TG ¹⁶ , TG ⁰⁴ (S2P) und der Wt mTG	43
2.4-13) Moleküldynamische Untersuchungen der TG ¹⁶ und der <i>Sm</i> mTG	43
3.) Resultate	44
3.1) Generierung und Charakterisierung thermoresistenter Varianten der <i>Sm</i> mTG	44
3.1-1) Konstruktion thermoresistenter <i>Sm</i> mTG – Varianten durch gezielte Rekombination	44
3.1-2) Rekombinante Produktion und Reinigung der TG ⁿ - Varianten	45
3.1-3) Charakterisierung der TG ⁿ - Varianten in Bezug zur thermischen Resistenz: Bestimmung der Halbwertszeiten (60 °C) und Aufnahme von Entfaltungskurven zur Bestimmung des Schmelzübergangs und der Aggregationskinetik	47
3.1-4) Untersuchungen zum thermischen Inaktivierungsmechanismus der mTG	54
3.1-5) Identifizierung der (intrinsischen) Quervernetzungsstellen und Generierung von Einzelmutanten zur Inhibition der Selbstquervernetzung	59
3.1-6) Chemische Resistenz und pH – Wert Stabilität der TG ¹⁶	61
3.1-7) Bestimmung der spezifischen Aktivität der TG ⁿ – Varianten und Vergleich mit der WT mTG und der UH308-B	63
3.1-8) Bestimmung der kinetischen Parameter K_M , k_{kat} und k_{kat}/K_M der Varianten TG ¹⁶ , TG ⁰⁴ (S2P) und der Wt mTG	66
3.1-9) Umsatz eines proteinogenen Substrates am Beispiel von β – Casein für die Varianten TG ¹⁶ , TG ⁰⁴ (S2P) und der Wt mTG	67
3.1-10) Strukturelle Analyse der TG – Varianten (Modellierung)	69
3.2 Optimierung der Produktion und Versuche zur Etablierung einer chromatographie-freien Isolierung rekombinant produzierter TG – Varianten	72
3.2-1) Optimierung der rekombinanten Produktion der mTG(S2P) <i>E. coli</i> durch Erhöhung der Plasmidstabilität	72
3.2-2) Erhöhung der Produktion rekombinanter mTG: Steigerung der Translationsrate durch Anpassung der Gensequenz	75
3.2-3) Etablierung einer alternativen Reinigungsmöglichkeit zur Isolierung der pro-mTG	77
4.) Diskussion	82
4.1) Zur Begrifflichkeit der thermodynamischen und kinetischen Stabilität	82

4.2) Einordnung der thermoresistenten TG ¹⁶ in die bestehende Literatur	85
4.3) Mögliche Einsatzgebiete der TG ¹⁶	94
4.4) Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf die thermische Resistenz und Aktivität der mTG	96
4.5) Einfluss der autokatalytischen Quervernetzungsaktivität der mTG auf ihr Inaktivierungsverhalten	99
4.6) Produktion der mTG - Varianten	103
4.7) Reinigung der mTG mittels Hitzebehandlung	107
5.) Zusammenfassung.....	111
6.) Ausblick	113
Referenzen.....	114
Anhang	130
Anhang 1	130
Anhang 2	131
Anhang 3	132
Anhang 4	133
Anhang 5	145
Anhang 6	145
Anhang 7	146
Anhang 8	148
Anhang 9	148
Anhang 10	149
Anhang 11	150
Anhang 12	151
Anhang 13	152
Anhang 14	153
Anhang 15	154
Lebenslauf.....	155
Persönliche Angaben.....	155

Berufliche Laufbahn..... 155

Akademische Laufbahn..... 155

Schulische Ausbildung..... 155

Sonstiges..... 155

Publikationen..... 156

Poster..... 156

1.) Einleitung

Der Begriff „Enzym“ wurde 1976 erstmals vom deutschen Physiologen Wilhelm Friedrich Kühne geprägt [Page, 1979]. Seither erweitert sich unser Wissen über Enzyme stetig weiter und zeigt auf, dass Enzyme in einer Vielzahl biotechnologischer Prozesse involviert sind. Viele dieser biotechnologischen Prozesse sind Jahrhunderte alt, wie z.B. die Bier - und Käseherstellung, die Lederverarbeitende Industrie oder die Herstellung von Brot.

Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurden weitreichende Erkenntnisse zur Struktur und Funktion von Enzymen entdeckt. Methoden, wie die Röntgenkristallographie zur Strukturaufklärung oder dem *protein-engineering*, welches einem u.a. die Modifikation der Aminosäuresequenz erlaubt, führten zu einem immer tiefergehenden Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen innerhalb von Enzymen und deren Weiterentwicklung. Mittels *protein-engineering* ist es möglich, bereits bestehende biotechnologische Prozesse zu verbessern bzw. den Einsatz von Enzymen in andere Anwendungsgebiete auszudehnen. Die Vorteile in der Anwendung von Enzymen liegen in ihrer Selektivität gegenüber dem Substrat und dem daher meist geringen Anteil an Nebenprodukten. Weitere Vorteile liegen in den moderaten Bedingungen bei der die Reaktionen ablaufen können, ihrer ökologischen Unbedenklichkeit und das sie sich als Katalysator nicht verbrauchen und daher, theoretisch, mehrfach und in kleineren Mengen einsetzbar sind. Als Nachteile werden oftmals höhere Kosten aufgeführt, welche u.a. durch die Produktion und Aufarbeitung der Enzyme entstehen. Weiterhin hängt die Effizienz der Biokatalyse stark von den Reaktionsbedingungen ab. Extreme pH-Werte, Drücke, Temperaturen oder hohe Konzentrationen an Salzen, Metallionen etc. limitieren den Einsatz von Enzymen, welche oftmals nur unter physiologischen Bedingungen stabil sind. Um diese und weitere Limitationen für den Einsatz von Enzymen in industriellen Verfahren zu umgehen, werden besonders resistente Enzyme benötigt. Hierfür kann einerseits nach stabilen homologen Enzymen gesucht werden oder die Eigenschaften der Enzyme werden z.B. durch *protein-engineering* angepasst.

Der globale Markt für industriell eingesetzte Enzyme wächst bis heute an und soll laut Schätzungen Ende 2018 die 7,1 Milliarden Marke überschreiten. Allein in der Nahrungsmittelindustrie wird ein Wert von 2,94 Milliarden US\$ bis 2021 prognostiziert [Rigoldi *et al.*, 2018].

Ein in der Nahrungsmittelindustrie breitflächig eingesetztes Enzym ist die mikrobielle Transglutaminase (mTG) [Giordano und Facchiano, 2019; Kieliszek und Misiewicz, 2014]. Beispiele hierfür sind die Herstellung von restrukturierten Fleisch oder die Verarbeitung von Meeresfrüchten [Motoki und Seguro, 1998]. Neben dem breiten Einsatzgebiet in der Nahrungsmittelindustrie werden für die mTG aber auch neue Anwendungsgebiete erforscht. Vielversprechend ist hier der Einsatz des Enzyms zur Herstellung von Antikörper-Wirkstoffkonjugaten (im engl. *antibody drug conjugates*, ADC) [Dennler *et al.*, 2014; Deweid *et al.*, 2019; J. Walsh *et al.*, 2021; Schneider *et al.*, 2020]. Dabei wird das Enzym zur Kopplung von biologisch aktiven Substanzen, wie Toxinen, Inhibitoren etc. über eine *linker* Sequenz an den entsprechenden Antikörper gekoppelt. Auch in der Textil- und Lederverarbeitungsindustrie finden sich

Anwendungsmöglichkeiten. Die mTG kann hier im Prozessschritt des Füllens genutzt werden. Hierbei würden Risse oder andere Beschädigungen durch kommerzielle Proteine (Casein etc.) als Füllmaterial geschlossen [Duarte *et al.*, 2019]. Durch Einsatz der mTG kommt es dann zur Polymerisierung des Füllmaterials und die Homogenität der Oberfläche verbessert sich. Ein weiteres potentielles Anwendungsgebiet der mTG findet sich in der Holz- und Werkstoffindustrie zur Herstellung von Spanplatten [Jacob, 2012]. Hierbei wurde ein auf Urea-Formaldehyd basierendes Bindemittel substituiert mit einem, auf Proteinen basierenden Bindemittel, zu dem alternativ mTG hinzugefügt werden kann.

Obwohl die mTG einige alternative Anwendungsmöglichkeiten [Deweid *et al.*, 2019] zur etablierten Anwendung in der Lebensmittelindustrie bietet und diese auch zu zahlreichen Publikationen und Patenten führten, bleibt der großflächige Einsatz in diesen Gebieten vorerst aus [Miwa, 2020]. Mögliche Gründe hierfür ist die oben beschriebene Problematik der eingeschränkten Stabilität und die erhöhten Kosten zur Produktion und Isolierung [Kieliszek und Misiewicz 2014].

1.1) Transglutaminasen

Transglutaminasen sind ubiquitäre Enzyme die zu der Enzymklasse der Transferasen (EC 2.3.2.13) zählen. Sie kommen in verschiedenen Gewebstypen von Pflanzen, Vertebraten, Fungi und Mikroben vor [Giordano und Facchiano, 2019; Makarova, Aravind, und Koonin, 1999]. Sie katalysieren die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch Deamidierung von Glutaminen oder durch Ausbildung von ϵ -(γ -glutaminyll)Lysin Bindungen (siehe Abb. 1. 1a). Bei der Bildung der Isopeptidbindung dient die γ -Carboxyamid Gruppe eines peptid- oder proteinassoziierten Glutamins als Acyldonor. Als Acylakzeptoren dienen primäre Amine, wie die ϵ -Amino-Gruppe des Lysins (Abb. 1. 1b, S. 3) oder einige biogene Polyamine (Spermin, Spermidin, etc.) [Kieliszek und Misiewicz, 2014]. Die enzymatische Reaktion zwischen einem reaktiven Lysin und Glutamin kann sowohl zur Ausbildung von inter- als auch intramolekularen Isopeptidbindungen führen [Nieuwenhuizen *et al.*, 2003, Nieuwenhuizen *et al.*, 2004]. Steht kein primäres Amin als Acylakzeptor zur Verfügung, sondern Wasser, kommt es zur Deamidierung unter Freisetzung von NH_4 (siehe Abb. 1. 1c).

1.1-1) Ein historischer Abriss bis zur Entdeckung der mikrobiellen Transglutaminasen (mTG)

Die Anfänge der Transglutaminase - Forschung finden sich in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts [Beninati, Bergamini, und Piacentini, 2008]. Sarkar *et al.*, (1957) und Clarke *et al.*, (1959) beschrieben erstmalig ein Enzym, welches fähig ist, Amine in andere Proteine zu inkorporieren [Clarke *et al.*, 1959; Sarkar, Clarke, und Waelsch, 1957]. Seitdem nahm das Interesse an den Transglutaminasen in den folgenden Jahrzehnten sukzessive zu [Beninati, Bergamini, und Piacentini, 2008]. Ein Großteil der Forschung konzentrierte sich dabei auf den Koagulationsfaktor XIII (humane TG XIII) und einer TG aus Meerschweinchenleber (*guinea pig liver* TG, gTG). Die Fokussierung auf die TG aus Meerschweinchenleber basiert auf den relativ hohen Mengen des Enzyms in diesem Organ [Beninati,

Bergamini, und Piacentini, 2008]. Auf der Grundlage dieses Enzyms fand eine nähere biochemische und kinetische Charakterisierung der Struktur und des Katalysemechanismus der TG statt. Die humane TG XIII katalysiert die Bildung von Isopeptidbindungen zwischen Fibrin Einheiten, um die Elastizität und Widerstandfähigkeit von Blutgerinnseln zu erhöhen [Muszbek *et al.*, 2011] und erhielt ihre Aufmerksamkeit auf Grund dieser wichtigen physiologischen Bedeutung. Anfang der 80er Jahre entwickelte sich dann ein zunehmendes Interesse an der Transglutaminase für den Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie [Motoki und Seguro, 1998]. Eine Quervernetzung von Nahrungsmittelproteinen aus verschiedenen Quellen, wie Soja, Milch oder Weizen konnte in Gegenwart der gTG oder TG XIII gezeigt werden [Kurth und Rogers, 1984; Motoki und Nio, 1983; Motoki und Seguro, 1998]. Die Modifikation der Proteine führte u.a. zu verbesserten Eigenschaften hinsichtlich thermischer Resistenz, der Wasserspeicherkapazität oder der Textur. Zur Kommerzialisierung des Enzyms als Additiv in der Nahrungsmittelindustrie kam es jedoch aufgrund der geringen Produktionsmengen und der hohen Kosten nicht. Erschwerend kam hinzu, dass die TG XIII als Zymogen produziert wurde, welches erst durch die Abspaltung der Pro-Sequenz mittels Thrombin aktiviert wird [Yokoyama *et al.*, 2004]. Dies änderte sich mit der Isolierung einer mikrobiellen Transglutaminase (mTG) aus dem Organismus *Streptomyces mobaraensis* (*Sm*) (Ando *et al.*, 1989). Die isolierte *Sm* mTG konnte aus den Fermentationsüberstand aktiv gewonnen werden und eröffnete so die Möglichkeit einer kosteneffizienten Produktion des aktiven Enzyms. In den darauf folgenden Jahren kam es zur Entdeckung von weiteren mTGs, vornehmlich aus Streptomyceten, und deren biochemischer Charakterisierung.

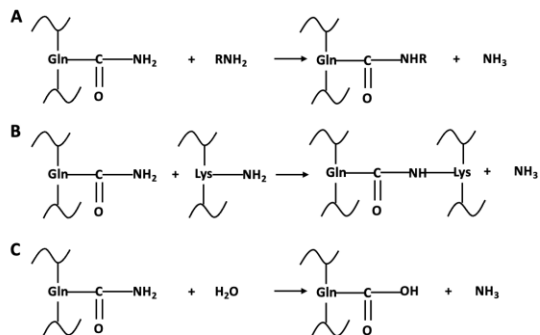


Abb. 1. 1) Mögliche von der Transglutaminase katalysierte Reaktionen.

(A) Acyltransferreaktion bei der eine primäre Aminogruppe an einem beliebigen Acylrest gebunden ist. (B) Die ϵ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette dient als Acylakzeptor und eine Isopeptidbindung wird generiert. (C) Deamidierung, bei der ein Wassermolekül als Acylakzeptor dient. Die Darstellung ist modifiziert nach der Publikation von [Kieliszek und Misiewicz, 2014].

1.1-2) Produktion der mTG aus *Streptomyces mobaraensis*

Die Entdeckung von Transglutaminasen mit mikrobiellem Ursprung ermöglichte eine ökonomische Produktion des Enzyms. Eine aufwendige Extraktion und Isolation des Enzyms aus tierischem Gewebe, beispielsweise aus Meerschweinchenleber, konnte dadurch umgangen werden.

Die heutzutage am weitesten verbreitete Präparation der mTG stammt von der Firma Ajinomoto (Japan) und läuft unter den Markennamen Activa®. Hiervon gibt es unterschiedliche Präparationen, welche je nach Einsatzfeld verwendet werden sollen. So dient die Präparation Activa®WM (WM = Wurstmischung) der Herstellung von Wursterzeugnissen und Activa®YG (YG = Joghurt) der Texturverbesserung von Joghurt. Die für die Activa® Produktion verwendete mTG wird aus der Fermentationsbrühe einer *S. mobaraensis* Kultivierung [L. Wang *et al.*, 2018] gewonnen. Da der Organismus *S. mobaraensis* zu den GRAS (*general regarded as safe*) Stämmen gehört, lässt sich die hieraus isolierte mTG auch im Lebensmittelbereich verwenden. Als vorteilhaft wird oftmals die Sekretion des Enzyms in das umgebende Kulturmedium aufgeführt, da die Konzentration an Wirtszellproteinen verringert ist und so die Isolierung des Enzyms erleichtert [Yokoyama *et al.*, 2004]. Während des Sekretionsprozesses wird das Signalpeptid proteolytisch abgespalten und die zymogene Form in das umgebende Medium freigesetzt [Pasternack *et al.*, 1998]. Dort findet die Prozessierung der zymogenen mTG (pro-mTG) durch die zwei nativen, co-sekretierten Endoproteasen *S. mobaraensis* Tripeptidylaminopeptidase (SM-TAP) und der Transglutaminase aktivierenden Metalloprotease (TAMEP) statt. Im ersten Schritt erfolgt die Aktivierung durch die TAMEP, bei der nach proteolytischer Spaltung an Position -5 eine vier Aminosäure lange N - terminale Extension (FRAP) der maturen mTG verbleibt [Zotzel, Keller, und Fuchsbauer, 2003] (siehe Abb. 1. 2). Trotz verbleibendem FRAP - Rest besitzt die mTG nun bereits ihre vollständige katalytische Aktivität [Zotzel, Keller, und Fuchsbauer, 2003]. Final wird das N-terminale Tetrapeptid durch die SM-TAP abgespalten [Zotzel *et al.*, 2003b].

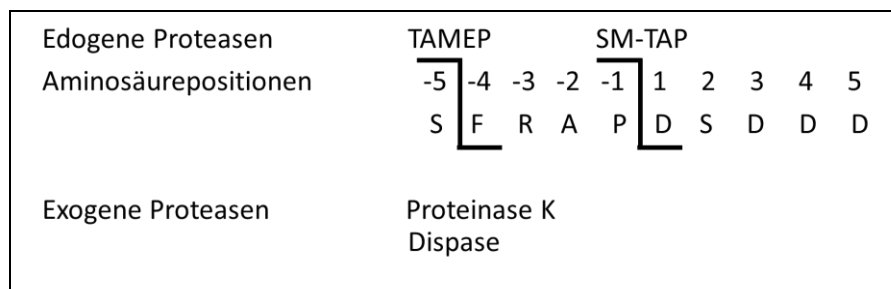


Abb. 1. 2) Schnittstellen der endogenen Proteasen TAMEP und SM-TAP aus *S. mobaraensis* und exogener Proteasen zur Aktivierung der *Sm* mTG (Abbildung basieren auf [Zotzel, Keller, und Fuchsbauer, 2003; Zotzel *et al.*, 2003b]).

Nachteil an der Isolation des Enzyms aus *S. mobaraensis* sind jedoch erhöhte Kosten durch eine Kultivierungszeit im Bereich von Tagen (2 - 4 d) [Zhu *et al.*, 1995] und die im Vergleich zur rekombinanten Produktion in *E. coli* geringere Ausbeute (0,9 - 3,4 U/mL) [Kieliszek und Misiewicz, 2014].

Corynebacterium glutamicum, ein Bakterium welches ebenfalls im Lebensmittelbereich zur Produktion von Glutamat genutzt wird und als GRAS Stamm klassifiziert ist, wurde als alternativer Produktionsorganismus getestet. Neben dem GRAS Status konnten in diesem Organismus bis zu 142 mg/L rekombinanter mTG produziert werden (siehe Tab.1. 1, S. 6) [Kikuchi *et al.*, 2003]. Als besonders vorteilhaft erwies sich, dass wie bei *S. mobaraensis* eine Sekretion des Enzyms in das Medium erreicht werden konnte. Zur Abspaltung

des pro-Peptids der produzierten und sekretierten pro-mTG wurde hierfür gleichzeitig die Protease SAM - P45 co - sekretiert. Die verwendete Protease von *Streptomyces albobogiseolus* (SAM - P45) ist eine Subtilisin - ähnliche Protease, welche nach der Spaltung eine FRAP - Extension am N - Terminus hinterlässt [Kikuchi *et al.*, 2003]. Nachteilig erwies sich, dass es bei längerer Kultivierungszeit nicht nur zur Autolyse der SAM - P45 kam, sondern auch zum weiteren Abbau bereits prozessierter mTG. In einer nachfolgenden Arbeit von Itaya *et al.*, (2008) konnte die Produktion der pro-mTG durch Wechsel des Stammes von *C. glutamicum* auf *C. ammoniagenes* auf 2,5 g/L gesteigert werden. Die pro-mTG wurde hier durch Zugabe gereinigter SAM - P45 zum Kultivierungsüberstand prozessiert [Itaya und Kikuchi, 2008].

Obwohl *Escherichia coli* (*E. coli*) nicht zu den GRAS – Stämmen gehört, wurden in den letzten 20-30 Jahren zahlreiche Publikationen zur Produktion von Proteinen in diesem Organismus veröffentlicht. *E. coli* gehört zu den gramnegativen, fakultativ anaeroben und nicht-sporulierenden Bakterien [Fuchs und Schlegel, 2006]. Es gilt aufgrund zahlreicher optimierter Produktionsstämme und -systeme, des schnellen Wachstums, definierter Mediumsbestandteile und der zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden als aussichtsreicher Produktionsorganismus [Baneux, 1999; Rickert *et al.*, 2016]. Desweiteren ist *E.coli* ein oft genutzter Organismus zur Produktion von pharmazeutisch relevanten Proteinen [Baeshen *et al.*, 2015; Rickert *et al.*, 2016].

Die ersten Versuche zur Produktion aktiver *Sm* mTG in *E. coli* zeigten einen deutlich negativen Effekt auf die Zellviabilität. Aufgrund der quervernetzenden Aktivität kam es innerhalb der ersten Stunde zur Inhibierung des Wachstums und nach drei Stunden zur Lyse der Zellen [Takehana *et al.*, 1994]. Um die Toxizität der mTG zu umgehen, produzierte Yokoyama *et al.*, (2000) die mTG in *inclusion bodies* und etablierte ein Protokoll zur Rückfaltung dieser. Die hier erreichten Mengen an rückgefalteter mTG betragen jedoch nur ~ 15 %, zeigten jedoch keinerlei Verlust an spezifischer Aktivität [Yokoyama *et al.*, 2000].

Erst durch Produktion der zymogenen (inaktiven) Form bei 28 °C, konnte eine lösliche, intrazelluläre Produktion der *Sm* mTG erreicht werden [Marx *et al.*, 2007]. Die Aktivierung der produzierten pro-mTG erfolgte mittels Trypsin und hinterließ eine N-terminale FRAP Extension [Marx *et al.*, 2007]. Durch Optimierung der Produktionsparameter mittels *design of experiment* (DoE) konnten mittels *fed - batch* Verfahren 500 mg/L pro-mTG produziert werden. Auch hier wurde eine Aktivierung durch Zugabe gereinigter Protease, der Dispase I, erreicht [Sommer *et al.*, 2011]. Weiterhin wurde die Variante mTG(S2P) produziert, eine Einzelmutante bei der an Position 2 ein Serin durch ein Prolin substituiert wurde. Die rekombinante mTG(S2P) zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp (Wt) doppelt so hohe spezifische Aktivität (A_{spez}) auf [Marx *et al.*, 2008b].

Für einen Überblick und zum Vergleich sind in Tab.1. 1 (S 6) die Ausbeuten zur Produktion an mTG nochmals dargestellt.

Tab.1. 1) Vergleich der erreichten Ausbeuten an produzierter mTG in verschiedenen Organismen.

Organismus	produzierte mTG	Ausbeute			Bemerkung	Referenz
		U/L	mg/L	U/L/h		
<i>Sm. mobaraensis</i> (S-8112)	Sm mTG	2500	k.A.	31,25 ^b	Erstmalige Identifizierung und Produktion einer mikrobiellen Transglutaminase	[Ando <i>et al.</i> , 1989]
<i>Sm. mobaraensis</i> (CBS20778)	mTG	1200	k.A.	33,3 ^b	Bestimmung von Aminosäuren welche die Produktion der mTG limitieren	[Zhu <i>et al.</i> , 1998]
<i>Sm. mobaraensis</i> (WSH-Z2 ^a)	mTG	3370	k.A.	80,2	<i>temperature shift</i> Strategie: 0-18 h Kultivering bei 32 °C → 18-42 h bei 28 °C	[Zheng <i>et al.</i> , 2001]
<i>Sm. mobaraensis</i> (WSH-Z2 ^a)	mTG	3320	k.A.	83	Anpassung der Sauerstoffversorgung durch Rührgeschwindigkeit (Zwei-Stufen Strategie)	[Yan <i>et al.</i> , 2005]
<i>Sm. lividans</i> (Wildtyp)	AP-mTG	300 ^b	340	0,02 ^b	Aktivierung des sekretierten Enzyms erfolgt über nativ produzierte Subtilisin - ähnliche Proteasen	[Noda <i>et al.</i> , 2013]
<i>E. coli</i> (JA221)	AEF-mTG	1100	5*	366 ^b	Produktion aktiver mTG erweist sich als toxisch für die Zellviabilität	[Takehana <i>et al.</i> , 1994]
<i>E. coli</i> (JM109)	Met-mTG	6000 – 9000 ^b	200-300	k.A.	Unlösliche Produktion der aktiven mTG, ~ 15 % aktives Enzym nach Rückfaltung, <i>codon - usage</i> Optimierung des mTG - Gens	[Yokoyama <i>et al.</i> , 2000]
<i>E. coli</i> (BL21 Gold (DE3))	FRAP-mTG	112,5	4,5	187,5 ^b	Lösliche Produktion durch <i>temperature shift</i> zu 28 °C, Laktose Induktion, Aktivierung mittels Trypsin (14 U/mg)	[Marx <i>et al.</i> , 2007]
<i>E. coli</i> (BL21 Gold (DE3))	FRAP-mTG	23000 ^c	500 ^c	1438 ^c	<i>fed-batch</i> Fermentation, Optimierung durch <i>Design of Experiment</i> (DoE), Aktivierung durch Zugaben von Dispase (46 U/mg)	[Sommer <i>et al.</i> , 2011]
<i>E. coli</i> (BL21 Gold (DE3))	FRAP-mTG(S2P)	1000	120	16,67 ^b	Intrazelluläre, aktive und lösliche Produktion durch Co - Expression des Pro-Peptides	[Javitt <i>et al.</i> , 2017]
<i>C. glutamicum</i> (ATCC 13869)	FRAP-mTG	21996	846	305,5 ^b	Sekretion der pro-mTG über den Tat - <i>pathway</i> , Überexpression von TatABC	[Kikuchi <i>et al.</i> , 2009]
<i>C. ammoniagenes</i> ATCC6872	FRAP-mTG	57500 ^b	2500	810	Sekretion von pro-mTG mit N-terminalem CspB Signalpeptid, gereinigte	[Itaya und Kikuchi, 2008]

k.A.... keine Angaben, ^a mutierter Stamm von *Sm. mobaraensis* CBS20778, ^b kalkulierte Werte, ^c Produktion einer rekombinanten, mTG Variante (genannt S2P) mit erhöhter spezifischer Aktivität (46,1 U/mg); * ... Schätzwert anhand Western-Blot Analyse

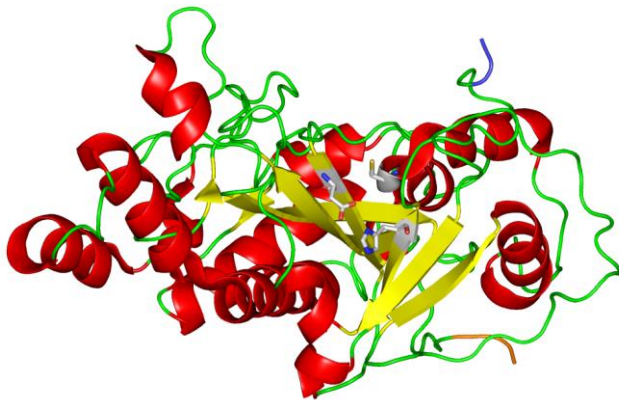
1.1-3) Eigenschaften der mikrobiellen Transglutaminasen (mTG) aus *S. mobaraensis*

Die wohl bekannteste mikrobielle Transglutaminase (mTG) stammt aus dem Organismus *Streptomyces mobaraensis* und wurde im Rahmen eines *screenings* entdeckt. Ihre Isolation und erste enzymatische Charakterisierung wurde 1989 von Ando *et.al* beschrieben [Ando *et al.*, 1989]. Dabei wurden neben der

leichteren Produktion und Reinigung des Enzyms entscheidende Unterschiede zu den TG aus Vertebraten (vTG) festgestellt. Im Vergleich zu diesen zeigte die mTG keine Ca^{2+} -abhängige Aktivität. Dies ist insofern von Bedeutung, da Calcium als divalentes Kation auch als Koagulant fungieren und somit die Anwendbarkeit limitieren kann. Als Beispiel seien hier α - und β -Casein genannt, welche durch Ca^{2+} -Ionen gefällt werden können. Auch die Substratspezifität für Di-, Tri- und Tetrapeptide, detektiert nach dem Standard Assay von Folk und Cole (1966), war verringert [Folk und Cole, 1966]. Durch das erweiterte Substratspektrum ist es möglich ein Großteil der Proteine aus dem Lebensmittelbereich (Casein aus Milch, Glutene aus Weizen, Globuline aus Erbsen, etc.) zu nutzen [Miwa, 2020].

Desweiteren unterscheiden sich mTG von den vTG in ihrer Tertiärstruktur. TG mikrobiellen Ursprungs sind Eindomänen Proteine, während TG aus Vertebraten zumeist tetramere Enzyme sind [Giordano und Facchiano, 2019]. Aufgrund ihres breiten Einsatzgebietes in der Industrie und der zur Verfügung stehenden Informationen, soll hier im speziellen auf die mTG aus *S. mobaraensis* eingegangen werden.

(A) mature (aktive) *Sm* mTG



(B) postulierter Katalyse Mechanismus

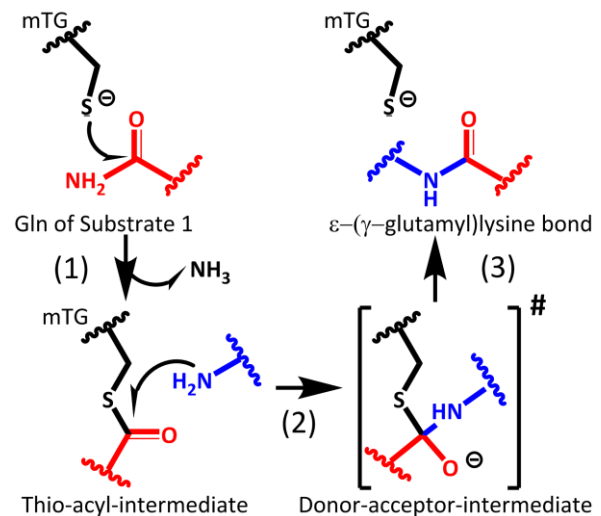


Abb. 1. 3) Die Abbildung wurde auf Basis des pdb Eintrages 1IU4 [Kashiwagi *et al.*, 2002] erstellt.

(A) Gesamtstruktur der *Sm* mTG in der schematischen *cartoon* Darstellung. *Loop* – Strukturen sind in grün dargestellt, α - Helices in rot, β - Faltblätter in gelb, der C - Terminus ist orange und der N - Terminus blau angefärbt. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind als sticks dargestellt.

(B) postulierter Katalyse Mechanismus von [Kashiwagi *et al.*, 2002]. Die deprotonierte Form des Cys64 ist in Schwarz dargestellt, das reaktive Gln des Substrates 1 ist in Rot dargestellt und die reaktive ϵ - Aminogruppe des Lysin von Substrat 2 ist blau gefärbt.

Die mTG aus *S. mobaraensis*, die erste mTG deren Struktur mittels Kristallographie aufgelöst wurde, hat eine scheibenähnliche Struktur und gehört zum Faltungstyp der $\alpha + \beta$ - Klasse (siehe Abb. 1. 3 A) [Kashiwagi *et al.*, 2002]. Den Kern der Domäne bildet die aus sieben antiparallelen bestehende β – Faltblatt Struktur, welche von α - Helices umrahmt wird. Das aktive Zentrum der *Sm* mTG wird von einer katalytischen Triade aus Cys64, Asp255 und His274 gebildet. Kashiwagi und Kollegen (2002) postulierten anhand von Strukturdaten der kristallisierten *Sm* mTG einen Cysteinprotease - ähnlichen Katalysemechanismus (siehe Abb. 1. 3 B). In dem postulierten Mechanismus kommt es im ersten Schritt zu

einer nukleophilen Attacke des Thiolat vom Cys64 auf das γ -Carbonylatom des glutamintragenden Substrates (Substrat 1, Acyldonor) (Abb. 1. 3 B, Schritt 1). Dabei kommt es zur Deaminierung des Gln und es bildet sich ein Thioester - Intermediat bei dem das Gln kovalent am Enzym gebunden ist. In einem zweiten Schritt attackiert die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes (Substrat 2, blau) nukleophil die γ -Carbonylfunktion des Thio-Acyl-Intermediates (Abb. 1. 3 B, Schritt 2). Durch Umlagerung bildet sich die Isopeptidbindung und das Enzym wird freigesetzt (Abb. 1. 3 B, Schritt 3).

1.1-4) Substratspezifität der mikrobiellen Transglutaminase

Die mikrobielle Transglutaminase katalysiert den Acyltransfer zwischen der ϵ -Aminogruppe von Lysin und der γ -Carboxyamidgruppe einer Glutamin-Seitenkette. Bei der Quervernetzung von Proteinen werden sowohl inter- als auch intramolekulare ϵ -(γ -glutaminyll)Lysin Bindungen (Isopeptidbindungen) generiert. Unter der Voraussetzung, dass sowohl Glutamin- als auch Lysin-Seitenketten im Substrat vorhanden sind, gibt es zwei Hauptfaktoren, die für die Reaktivität des Substrates bzw. der Seitenketten verantwortlich sind. Zum einen bestimmt die Zugänglichkeit der Seitenketten (Mikroumgebung) die Reaktionsrate und zum anderen die flankierenden Aminosäuren des Glutamins bzw. Lysins.

Der Einfluss flankierender Aminosäuren auf den Acyldonor (Gln) in der Reaktivität konnte bereits durch Ando und Mitarbeitern (1989) gezeigt werden. Die Spezifitäten gegenüber ausgewählten Peptidsubstraten unterschiedlicher Länge wurden untersucht. So kam es zu keinem Umsatz der Peptide Gly-Gln-Gly, CBZ-Asn-Gly und CBZ-Gln, während bei den Substraten CBZ-Gln-Gly, CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly Aktivität nachgewiesen werden konnte [Ando *et al.*, 1989]. Dies deutete schon damals darauf hin, dass die flankierenden Aminosäuren der reaktiven Seitenketten (hier des Acyldonors) eine Rolle spielen. Eine Tendenz der einzelnen Positionen bezogen auf den Acyldonor, ließ sich jedoch noch nicht erkennen.

In weitergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die mTG keine primären Amine (Acylakzeptor) akzeptiert, bei der sich flankierend eine Verzweigung befindet (tert-Butylamin, Dimethylamin. oder Trimethylamin) [Ohtsuka *et al.*, 2000].

Auch die Kettenlänge bzw. die Hydrophobizität des Amindonors beeinflusst die Reaktivität. So konnte gezeigt werden, dass ein Amindonor (Lysin und Lysin Analoga) mit einer Kettenlänge von vier C – Atomen besser als Substrat akzeptiert wird, als mit Kettenlängen unter vier C – Atomen [Ohtsuka *et al.*, 2000].

Neben dem praktischen Zweck designte Peptide als Konjugationslinker für die Herstellung von Antikörper-Wirkstoffkonjugaten, zur Immobilisierung von Proteinen oder für Protein-Protein Konjugate, sollte die Analyse der bevorzugten Peptidsequenz auch der Suche nach nativen Substraten der mTG dienen, welche bis heute noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Die Identifizierung nativer Substrate gilt als vielversprechendster Ansatz, Rückschlüsse auf die Funktion der mTG ziehen zu können.

Um mehr über den Einfluss der flankierenden Aminosäuren zu erfahren und Substrate mit erhöhter Reaktivität gegenüber der mTG zu identifizieren, wurden verschiedene Studien durchgeführt. Dabei fokussierte man sich auf die Identifizierung von potentiellen Acyldonoren (Glutamindonor), da in der Literatur bereits eine höhere Selektivität gegenüber den Acylakzeptoren (Amindonor) gezeigt werden konnte [Gundersen *et al.*, 2014; de Jong *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2001; Strop, 2014].

In einem Ansatz wurde ein *phage display* genutzt, bei der eine randomisierte Peptid-Bibliothek generiert wurde ($1,5 \times 10^{11}$ bis $1 \times 10^{12-13}$) [Sugimura *et al.*, 2008]. Bei dieser Methode werden rekombinant generierte Peptide, Proteindomänen oder Proteine funktional auf der Phagenoberfläche präsentiert. Anschließend findet eine Selektion anhand der Affinität der exponierten Peptide, Proteindomänen oder Proteine zum entsprechendem Zielmolekül/Zielprotein statt. Nur gebundene Phagen werden selektiert, ungebundene werden durch verschiedene Waschschrte entfernt. Im Fall der mTG wurde eine Peptidbibliothek generiert, welche die flankierende Position um das Glutamin (Gln, Acyldonor) untersuchen. Die Selektion nach Affinität erfolgte durch die katalysierte Konjugation des Peptides zu immobilisierten Biotinylcadaverin (Acyldonor). Eine Übersicht über die identifizierten Eigenschaften der flankierenden Aminosäuren ist Tab.1. 2 (S. 11) in dargestellt.

In einer Analyse mittels *peptide array* wurde eine Peptidbibliothek der Positionen -1 und +1 zum Glutamin des Acyldonors generiert. Im Vergleich zur randomisierten Studie mittels *phage display*, wurde ein gezielter Ansatz gewählt, bei der konsequent alle Aminosäuren an den Positionen -1 und +1 analysiert wurden (siehe Tab.1. 2, S. 11) [Malešević *et al.*, 2015]. Die Resultate deckten sich größtenteils mit dem des *phage display*. So wurde eine generelle Tendenz zu hydrophoben Aminosäuren flankierend zum Glutamin festgestellt, keine negativ geladenen Aminosäuren an Position -1 und kein Prolin an Position +1 und eine hohe Spezifität zum LQR - Motiv.

Die Identifizierung des LQR - Motivs als besonders reaktives Substrat wurde ebenfalls durch die Analyse einer kleinen Peptidbibliothek durch Caporale *et al.*, (2015) gezeigt. Basierend auf der Studie von Sugimura *et al.*, (2008) wurde ausgehend von dem Peptid Z-FGX₁-Q-X₂PY bzw. Z-FGX₁-Q-X₂AY eine Bibliothek erstellt. Dabei wurde erneut eine hohe Präferenz von Leucin an Position -1 zum Glutamin gezeigt und das Tetrapeptid LQSP als effizientes Substrat identifiziert [Caporale *et al.*, 2015].

Neben den genannten Studien konnte ebenfalls eine erhöhte spezifische Aktivität für das LQ - Motiv mittels *mRNA display* gezeigt werden [Lee *et al.*, 2013].

Obwohl das LQ-Motiv in vielen verschiedenen *screenings* identifiziert werden konnte, so kam es jedoch auch zu widersprüchlichen Ergebnissen in Literaturstellen. So führte Malešević *et al.*, (2015) auf, dass ein Prolin an Position +1 kein reaktives Substrat darstellt, während bei Lee *et al.*, (2013) Prolin an Position +1 besonders häufig vorkam. Unter Caporale *et al.*, (2015) zeigte die mTG in Gegenwart des Tetrapeptides LQRP keinerlei Reaktivität, während es bei Sugimura *et al.*, (2008) zur Kernsequenz des reaktivsten

Substrates gehörte. Die abweichenden Ergebnisse ließen sich womöglich durch den unterschiedlichen experimentellen Aufbau erklären.

Die Schwierigkeit bei der Identifizierung von Substratsequenzen wird nochmals deutlich, wenn man sich die Sequenzen in nativen Substraten anschaut.

Die erstmalige Identifizierung solcher Substrate gelang der Gruppe um Fuchsbauer und Mitarbeitern mit der Isolierung des *Streptomyces* Subtilisin Transglutaminase aktivierende Metalloprotease Inhibitor (SSTI) [Schmidt *et al.*, 2008], sowie dem Dispase autolysierenden induzierenden Protein (DAIP) [Sarafeddin *et al.*, 2009] und *Streptomyces* Papain Inhibitor (SPI) [Sarafeddin *et al.*, 2011]. Durch Kristallisation des DAIP und Identifizierung der präferierten Glutamine war es möglich die Substratpräferenz bei intrinsischen Substratproteinen zu analysieren [Fiebig *et al.*, 2016]. Im Vorhinein war schon bekannt, dass eine Modifikation von Proteinen an Strukturelementen mit hoher Flexibilität stattfindet, bei der die reaktive Seitenkette Lösungsmittel zugänglich auf der Proteinoberfläche exponiert ist [Fontana *et al.*, 2008]. Bezüglich der reaktiven Glutamine im DAIP bestätigte sich dies. Die Glutamine mit der höchsten Lösungsmittelzugänglichkeit zeigten auch die höchste Reaktivität. Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch, dass einige Glutamine an flexiblen *loop* - Strukturen und einer guten Lösungsmittelzugänglichkeit keine besonders reaktiven Substrate bildeten. Durch Betrachtung der flankierenden Aminosäuren wurde geschlussfolgert, dass die Reaktivität eine Kombination aus den Effekten der Flexibilität, Zugänglichkeit und der flankierenden Aminosäuren eines Glutamins ist. Eine hydrophobe Umgebung des Glutamins, u.a. wurde wieder das Motiv LQ bei einem der reaktivsten Glutamine identifiziert, scheint dabei eine Voraussetzung für ein gutes Substrat zu sein [Fiebig *et al.*, 2016].

In einer Folgestudie wurde eine *linker* - Sequenz für die Herstellung von ADC anhand eines Strukturelementes der DAIP entworfen. Das generierte Strukturmimetika basiert auf einer *loop* Struktur und spiegelt nicht nur die Aminosäuresequenz, sondern auch die Konformation wider. In einem *proof of concept* Ansatz wurde die Funktionalität des *linkers* an dem Antikörper Cetuximab nachgewiesen. Das entworfene Strukturmimetika ermöglichte eine effiziente und ortsspezifische Konjugation des Antikörpers [Siegmond *et al.*, 2015].

Das die mTG verschiedene Arten der Sekundärelemente modifizieren kann, zeigte die Arbeit von Rachel und Kollegen (2017) [Rachel *et al.*, 2017]. Durch ortsspezifische Mutation in allen Sekundärstrukturelementen der B1 Domäne von Protein G konnte eine Modifikation mit einem Marker an *loop* - Strukturen, β - Faltblättern und α - Helices nachgewiesen werden. Diese Modifikationen zeigten gleichzeitig auf, dass eine gute Lösungsmittelzugänglichkeit der reaktiven Glutamine nicht unbedingt zu reaktiven Glutaminen führt, der Strukturfaktor also nur einen Teil in der Substratspezifität widerspiegelt. Ebenfalls konnte durch gezieltes *engineering* des Zielproteins und des aktiven Zentrums eine Steigerung der Konjugation mit einem Marker um mehr als das 100fache erreicht werden [Rachel *et al.*, 2017].

Das Verständnis der Reaktivität der mTG gegenüber Substraten spielt eine wesentliche Rolle in der Bestimmung der nativen Funktion der mTG und deren Anwendbarkeit in der Industrie. So ergibt sich durch Ermittlung potenter *linker* - Sequenzen, ortsspezifische Mutation im Zielprotein oder in der mTG selbst die Möglichkeit die Reaktivität zu modellieren und deren Anwendbarkeit zu erweitern (z.B. für die ADC Herstellung). Zahlreiche Studien zeigten dabei die Komplexität der Reaktivität und dass diese meist nur durch experimentelle Arbeiten zu bestimmen ist [Strop, 2014].

Tab.1. 2) Übersicht zur Substratspezifität der präferierten Eigenschaften, flankierender Aminosäuren (-3 bis +3) der mTG. Zur besseren Übersicht wird das Glutamin mit der Position „0“ dick gedruckt dargestellt.

Peptid (Acyldonor)	Methode	Identifizierte Substratspezifitäten relativ zur Position des Glutamins						Referenz
		-3	-2	-1	+1	+2	+3	
YELQRPY HSELP	<i>Phage display</i>	aromatische AS	Hydrophobe AS		Arg bei der Hälfte der Klone		aromatische AS	[Sugimura <i>et al.</i> , 2008]
LQR und YQR	<i>Peptide array</i> (auf Zellulosemembran)	k. A.	k. A.	hydrophobe, aliphatische AS und Tyr	hydrophobe AS, Arg	k. A.	k. A.	[Malešević <i>et al.</i> , 2015]
LQSP	Peptid-synthese	k. A.	k. A.	Leu	sterisch nicht anspruchsvolle AS	k. A.	k. A.	[Caporale <i>et al.</i> , 2015]
RLQQP	<i>mRNA display</i>	Arg	Arg, Leu, Ala	Leu, Thr, Arg, Ala	Pro	Thr, Pro	Ser, Val, Thr, Try	[Lee <i>et al.</i> , 2013]

k. A.keine Angaben, AS ... Aminosäuren

1.1-5) Druckstabilität und Temperaturresistenz der *Sm* mTG

Die *Sm* mTG ist monomeres Enzym, bestehend aus 331 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 38 kDa und einem pH-Optimum von 5,5 [Kieliszek und Misiewicz, 2014].

Mit einem Temperaturoptimum (T_{Opt}) von 50 - 55 °C behält die *Sm* mTG unter moderaten Bedingungen von bis zu 40 °C für lange Zeit 100 % Aktivität bei [Kieliszek und Misiewicz, 2014], während es bei höheren Temperaturen zu einer schnellen Inaktivierung kommt. So verliert die *Sm* mTG bereits nach ca. 2 min bei 60 °C 50 % ihrer Aktivität [Marx *et al.*, 2008b].

Es konnte gezeigt werden, dass Polyole wie Glycerol, Polyethylenglykol (PEG) und Zucker stabilisierend auf Transglutaminasen wirken können [Cui *et al.*, 2008; Patzsch *et al.*, 2010].

Um die Lagerstabilität zu erhöhen und eine bessere Abtrennung aktiver *Sm* mTG vom Produkt zu gewährleisten, wurde ebenfalls an der Immobilisierung der *Sm* mTG gearbeitet. So wurde die mTG zum Beispiel auf einer Polypropylen - Membran [Shi *et al.*, 2011] oder auf carboxyliertem poly(N-isopropylacrylamid) (pNIPAM) [Zhou *et al.*, 2016] immobilisiert. In beiden Fällen wurde die Langzeitstabilität erhöht, so konnte z.B. auch nach 3 h Inkubation bei 60 °C noch ~ 45 % Restaktivität

nachgewiesen werden, bei einer Immobilisierung der *Sm* mTG auf pNIPAM. Jedoch fiel die T_{Opt} der immobilisierten *Sm* mTG von 50-55 °C auf 40-45 °C. Die Immobilisierung wirkte sich demnach negativ auf die Aktivität aus [Zhou *et al.*, 2016].

Untersuchungen zur Druckstabilität der *Sm* mTG offenbarten eine ausgeprägte Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch Druck [Lauber *et al.*, 2001]. Mittels Circular Dichroismus - Spektroskopie fand man heraus, dass hauptsächlich die β – Faltblattstruktur für die Druckstabilität verantwortlich ist [Menéndez *et al.*, 2006]. So zeigten Lauber und Mitarbeiter, dass mehr als 100 min bei einem Druck von 600 MPa ($6 \cdot 10^3$ bar, wobei ~ 1 bar dem Normaldruck entspricht) nötig sind um eine Reduktion der enzymatischen Aktivität von 50 % zu erreichen. Aufgrund der hohen Druckstabilität bleibt nicht nur die enzymatische Aktivität gegenüber proteinogenen Substraten erhalten, diese konnte sogar gesteigert werden. So konnte eine höhere Oligomerisierung von Caseinmonomeren bei Drücken von 200 und 400 MPa erreicht werden [Lauber *et al.*, 2001].

Parallel zu den einhergehenden strukturellen Änderungen durch erhöhten Druck kommt es auch bei thermisch induzierten Veränderungen zu Unterschieden in den einzelnen Motiven. Durch Kombination von *in silico* Untersuchungen (Moleküldynamische Modellierungen, MD) und fluoreszenzspektroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der thermisch induzierten, strukturellen Veränderungen in den α – Helices geschieht [Aprodu *et al.*, 2013]. Wie in Abb. 1.3 A (Abschnitt 1.1-3, S. 6) zu sehen, sind die Helices der *Sm* mTG Lösungsmittel exponiert. Auch hier wurde eine hohe Stabilität der antiparallelen β – Faltblattstruktur festgestellt. Die Ergebnisse von Aprodu und Mitarbeitern, welche den thermischen Einfluss untersuchten, decken sich mit den Ergebnissen von Menendez und Mitarbeitern, welche die Kombination aus Druck und Temperatur analysierten. Beide Arbeitsgruppen wiesen eine erstaunlich hohe Stabilität der β – Faltblattstruktur auf, eine komplette Inaktivierung bei 80 °C und eine hohe strukturelle Sensitivität der umgebenden Helices gegenüber erhöhten Druck bzw. erhöhter Temperatur [Aprodu *et al.*, 2013; Menéndez *et al.*, 2006].

Aus den oben genannten Daten lässt sich schließen, dass die *Sm* mTG ein druckstabiles, aber kein temperaturresistentes Enzym ist. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bereits mehrere Versuche zur Optimierung der thermischen Resistenz der *Sm* mTG unternommen wurden.

Nachdem Marx und Mitarbeiter 2007 die lösliche Produktion der *Sm* pro-mTG in *E. coli* erzielten [Marx *et al.*, 2007], entwickelten diese einen auf Mikrotiterplatten basierenden Assay zum effektiven Screening einer durch randomisierte Mutagenese generierten Klonbibliotheken [Marx *et al.*, 2008b]. Dabei wurde eine Bibliothek von 5500 Klonen analysiert und neun Klone aus diesem Screening isoliert. Eine Sequenzierung führte zur Identifikation von acht Einzelmutationen und einer Doppelmutation, die zu einer erhöhten thermischen Resistenz beitragen [Marx *et al.*, 2008b]. Im Speziellen fand man an Position 2 der Aminosäuresequenz einen Austausch von Serin zu Prolin. Die identifizierte Variante, in der vorliegenden

Arbeit im Folgenden als mTG(S2P) bezeichnet, zeigte eine Erhöhung der Halbwertszeit bei 60 °C ($t_{1/2}(60^{\circ}\text{C})$) um den Faktor 2,7 [Marx *et al.*, 2008b]. Die identifizierten Substitutionen von Marx befanden sich, bis auf einer Ausnahme, im N-terminalen Bereich der mTG. Dieser gehört zu dem helicalen Teil, welcher nach den oben geschilderten Untersuchungen, besonders anfällig gegenüber thermischen Einflüssen ist. In einer anschließenden Arbeit wurde an sieben der identifizierten Aminosäuresubstitutionen eine Sättigungsmutagenese durchgeführt [Buettner *et al.*, 2012]. Bei der Sättigungsmutagenese wird an einer definierten Position ein Austausch der Aminosäure gegen die weiteren 19 möglichen Aminosäuren durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich somit um eine gerichtete Evolution. Im Anschluss wurden die identifizierten Positionen mittels *DNA – shuffling* erneut miteinander kombiniert. Dabei wurde eine Bibliothek von 1500 Klonen generiert [Buettner *et al.*, 2012]. Durch die Kombination aus Sättigungsmutagenese und *DNA – shuffling* wurde eine Triplet Variante identifiziert, genannt UH308-B, mit den Aminosäuresubstitutionen S23V, S24N und K294L, welche eine erhöhte $t_{1/2}$ (60°C) um den Faktor 12 und eine Erhöhung der spezifischen Aktivität (A_{spez}) um den Faktor 1,5 aufzeigte.

Basierend auf den identifizierten Aminosäurepositionen von Buettner (2012) und Marx (2008) generierten Mu *et al.*, (2017) drei Penta – Austauschvarianten [Mu *et al.*, 2018]. Die UH308-B ähnliche Variante DM01 mit den Austauschen (S2P, S23V, Y24N, S199A und K294L) zeigte eine resultierende $t_{1/2}$ (60°C) von 24,8 min und damit eine Erhöhung um 0,5 min im Vergleich zur UH308-B. Auch die A_{spez} erhöhte sich auf 55 U/mg detektiert nach dem Standard Assay von [Folk und Cole, 1966].

Tab.1. 3) Übersicht der Literatur zur gezielten Erhöhung der thermischen Resistenz der mTG, im speziellen der Sm mTG.

Organismus	Aminosäure-substitutionen	Methode	$t_{1/2}$ (60°C) [min ⁻¹]	rel. Faktor	A_{spez} [U/mg] ¹	rel. Faktor	Referenz
Sm	wt	-----	1,7	1	27	1	[Marx <i>et al.</i> , 2008; Yokoyama <i>et al.</i> , 2010]
Sm	S2P	Randomisierte Mutagenese	4,6	2,7	n.a.	-	[Marx <i>et al.</i> , 2008b]
Sm	S23V, S24N, K294L	Sättigungsmutagenese, <i>DNA-shuffling</i>	24,3	12	39	1,4	[Buettner <i>et al.</i> , 2012]
Sm	S2P, S23V, S24N, S199A, K294L	gezielte Mutagenese	24,8	9,9	55,7	2,3	[Mu <i>et al.</i> , 2018]
Sm	20, 62, 171 (Einbau von 3-Chloro-L-Tyrosin)	genetischer Code Expandierung	n.a.	5,1	n.a.	n.a.	[Ohtake <i>et al.</i> , 2018]

¹detektiert nach [Folk und Cole, 1966], n.a. ... nicht angegeben, Sm ... *Streptomyces mobaraensis*

Einen neuartigen Ansatz wählte die Gruppe um Ohtake *et al.*, (2018). Durch Einbau nicht kanonischer Aminosäuren, hier 3 - Chloro - L Tyrosin, konnte eine Steigerung der $t_{1/2}$ (60°C) um den Faktor 5,1 im Vergleich zum Wt erreicht werden. Leider gaben die Autoren keine absoluten Zahlen zum Vergleich an [Ohtake *et al.*, 2018]. Die angewendete Methode wird als Expansion des genetischen Codes bezeichnet (siehe Tab.1. 3). Interessanterweise generierten die Autoren ebenfalls eine sich selbst aktivierende mTG

durch Einbau einer N- ϵ -allyloxycarbonyl-L-lysine (AloKOH) Modifikation am N -Terminus. Durch Einbau dieser nicht kanonischen Aminosäure kommt es bei Absenkung des pH-Wertes zur Hydrolyse der Esterbindung und somit zur Aktivierung des Enzyms [Ohtake *et al.*, 2018].

1.2) Motivation und Zielsetzung

Der industrielle Einsatz der mikrobiellen Transglutaminase (mTG) beschränkt sich hauptsächlich auf die Verwendung im Lebensmittelbereich zur Herstellung von Fleisch - oder Joghurtherzeugnissen [Kieliszek und Misiewicz, 2014]. Neben dem Einsatz in der Lebensmittelindustrie gibt es jedoch Bestrebungen das Anwendungsgebiet der mTG zu erweitern, wie z.B. in der verarbeitenden Lederindustrie, Holzwerkstoffindustrie [Jacob, 2012] oder zur Herstellung von Antikörper – Wirkstoffkonjugaten (ADC) [J. Walsh *et al.*, 2021; Schneider *et al.*, 2020]. Je nach Anwendung können die Reaktionsbedingungen, wie z.B. Temperatur, Druck oder pH – Wert, dabei variieren. Somit spielt die Stabilität der mTG und damit einhergehend die Aufrechterhaltung der Aktivität unter verschiedenen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Etablierung und/oder Optimierung von Prozessen und deren Effizienz.

Die geringe Temperaturresistenz des Enzyms stellt jedoch einen möglichen limitierenden Faktor dar und soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Einsatz molekularbiologischer Methoden (gezielte Mutagenese und *Golden Gate* Klonierung) verbessert werden. Eine nähere Charakterisierung der Temperaturresistenz der einzelnen Varianten durch Aufnahme von Inaktivierungskinetiken bei 60 °C und Temperaturübergangskurven steht dabei im Vordergrund. Weitergehende Untersuchungen anhand der temperaturresistentesten Variante sollen Aufschlüsse über die Art der Stabilisierung, dem Inaktivierungsmechanismus und der Substratspezifität geben. Aus den erhaltenen Erkenntnissen können dann u.a. prozesstechnische Parameter wie die Reaktivität des Enzyms gegenüber proteinogenen Substraten, Lagerstabilität, pH-Stabilität, etc. abgeleitet werden. Ebenfalls bietet sich die Option für weitergehende Verbesserungen hinsichtlich der thermischen Resistenz des Enzyms an.

Neben der Generierung und Charakterisierung von temperaturresistenten Varianten bildete die Optimierung der Ausbeute an pro-mTG in *E. coli* BL21 GOLD (DE3) ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit. Desweiteren sollte die Möglichkeit einer alternativen Reinigungsmöglichkeit mittels Hitze untersucht werden, bei der die erhöhte Temperaturresistenz ausgenutzt wird. Hierbei sollte der apparative Reinigungsaufwand möglichst gering und das Verfahren möglichst simpel gestaltet werden. In einem optimalen Fall erweist sich dieses als kostengünstiger im Vergleich zum chromatographischen Reinigungsverfahren. Durch Optimierung der Produktion und Etablierung einer chromatographie - freien Reinigungsmöglichkeit, soll das Spektrum an potentiellen Anwendungsmöglichkeiten der mTG, bzw. der in der vorliegenden Arbeit neugenerierten thermoresistenten Varianten, erweitert werden.

2.) Material und Methoden

2.1) Material

2.1-1) Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 2. 1) aufgeführt.

Tab. 2. 1) Liste der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Aufschlussgerät	One Shot	Constant Systems Ltd., Warwickshire, UK
Dialysemembran	Spectra/Por® 7 Dialysis Membrane, 25 kDa	Spectrum Labs (Breda, Niederlande)
Zentrifuge	LYNX 6000 Sorvall	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)
Thermoblock	Thermostat	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer	Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences (Uppsala Schweden)
	Genesys 6	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)
pH-Meter	Fe20/EL20	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
SDS-PAGE Gelapparatur und Stromversorgung	- EPS 301	Hoefler (Holliston, U.S.A.) Amersham Biosciences (Uppsala Schweden)
Zentrifugen	5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	5424 R	
	5810 R	
Glukosemessgerät	LYNX 6000 Sorvall (Rotor: F9- 6x 1000 LEX)	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)
	Avanti™ J-30I (Rotor JA-10, Rotor JA 30.50)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Glukosemessgerät	YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer	YSI UK Ltd (Hampshire, United Kingdom)
Bioreaktor (20 L)	Biostat® C	Braun Biotech (Kronberg im Taunus, Deutschland)
Laminar-Flow-Box	NU 440-400	Nu AIRE (Plymouth, U.S.A.)
Schüttelinkubator	Multitron II	Infors HT AG (Bottingen, Schweiz)

Hochdruckhomogenisator	APV – 2000	APV Products (Albertslund, Dänemark)
Feinwaage	BP 221S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
Ultra-Turrax	Micra R-T D-1	ART moderne Labortechnik (Mühlheim, Deutschland)
Waage	BP221S BL310	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Platteninkubator	KP 196	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Mikrotiterplatten – Platten Lesegerät	FLUOstar Galaxy	bmg <i>labtech</i> (Ortenberg, Germany)
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatte	Brandplates® REF781602	Hellma Analytics (Müllheim, Deutschland)
Chromatographiesäule und Chromatographiematerial	His GraviTrap™ Ni Sepharose® 6 Fast Flow (1 mL, vorgepackt)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
nanoDSF	Prometheus NT.48	NanoTemper Technologies (München, Deutschland)

2.1-2) Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle Tab. 2. 2) aufgeführt.

Tab. 2. 2) Liste der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3957.2	≥ 99,5 %
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	X998.4	≥ 99 %
Struktol J673	Schill & Seilbacher (Hamburg)	3029673	k.A.
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % Lösung)	Applichem (Darmstadt)	A0947.1000	≥ 99,9
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	5210.2	k.A.
APS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9592.3	≥ 98 %
Coomassie-Brillantblau G-250	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9598.2	k.A.

Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)	A512.1	k.A.
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2218.1	1%ig
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4984.3	≥ 99,5 %
Ampicillin Natrium Salz	Applichem (Darmstadt)	A0839	k.A.
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)	1.06329.0500	≥ 99,7 %
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	K298.2	≥ 99,5 %
<i>N</i> -Benzoyloxycarbonyl-L-Glutaminylglycin (<i>N</i> -CBZ-Gln-Gly-OH)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)	C-1635	k.A.
Dansylcadaverin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	D4008-1g	k.A.
DTT	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6908.1	≥ 99 %
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6887.5	Für Mikrobiologie
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3783.2	≥ 99,5 %
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	1.03943.0250	≥ 99 %
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3788.5	100 %
L-Glutamat - γ - Mono-Hydroxamat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	G2253	k.A.
PMSF	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P7626	>98,5 %
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	X998.4	≥ 99 %
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9065.4	≥ 99,8 %
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	CN08.4	≥ 99 %
β - Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4227.2	k.A.
Natriumcaseinat	Rovita GmbH (Engelsberg, Deutschland)	0222	k.A.
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4855.3	≥ 99,9 %
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2367.3	k.A.
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P027.2	≥ 99 %

reduziertes Glutathion	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6382.2	k.A.
Natriumdodecylsulfat (SDS, w/v = 20 %)	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	1057.1	k.A.
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8952.4	k.A.
Isopropanol	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6752.6	≥ 99,7 %
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6771.1	≥99 %
α-Lactose Monohydrat	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8921.2	k.A.
β-Casein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	C690	≥ 98 %
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2363.2	k.A.
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3904.1	≥ 99 %
Methanol	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	7342.1	≥ 99.9 %
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	CN08.4	≥ 99 %
Iodacetamid	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)	I1149	≥ 99 %
Hydroxylammoniumchlorid	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)	1.04616.0100	≥ 99 %
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	T832.1	≥ 750 I.U./mg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8076.1	≥ 98 %
HEPES	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9105.4	Pufferan ^R , ≥ 95 %, p.a.
MES	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6066.2	Pufferan ^R , ≥ 99,5 %
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3886.1	99,8%, p.a., in Ethanol gelöst
Natriumacetat	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6773.3	≥ 99 %, p.a., wasserfrei

2.1-3) Puffer, Medien und Lösungen

Tab. 2. 3) Liste der verwendeten Puffer, Medien und Lösungen.

Lösung	pH	Komponente (Konzentration)	Bemerkung/Referenz
OnEx – Lösung 1	7	Glukose*H ₂ O (0,05 %)	[Studier, 2014]
OnEx – Lösung 2		α -Lactose*H ₂ O (0,2 %)	
OnEx – Lösung 3		Glycerin (0,5 %)	
LB – Medium	7	KH ₂ HPO ₄ (25 mM) Na ₂ HPO ₄ (25 mM)	[Luria <i>et al.</i> , 1960]
LB-Agar-Medium	7	MgSO ₄ *H ₂ O (2 mM)	supplementiert mit 15 g/L Agar-Agar
50 mM TRIS/HCl	8	Trypton/Pepton (10 g/L) Hefeextrakt (5 g/L) Natriumchlorid (10 g/L)	Die Einstellung des pH - Wertes erfolgte mit 3 M HCl, für 300 mM NaCl (17,53 g/L)
Minimalmedium	k.A.	siehe LB - Medium	
Minimalmedium	k.A.	Na ₂ SO ₄ (2 g/L) (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,68 g/L) NH ₄ Cl (0,5 g/L) K ₂ HPO ₄ (14,6 g/L) Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O (4 g/L) (NH ₄) ₂ -H-Citrat (1 g/L) Spurenelementlösung (3 mL/L)	[Wilms <i>et al.</i> , 2001]
Spurenelementlösung	k.A.	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (0,66 g/L) ZnSO ₄ * 7 H ₂ O (0,18 g/L) MnSO ₄ * H ₂ O (0,1 g/L) Di-Na- EDTA * 2 H ₂ O (11,1 g/L) FeCl ₃ * 6 H ₂ O (13,91 g/L) CuSO ₄ * 5 H ₂ O (0,16 g/L) CoCl ₂ * 6 H ₂ O (0,18 g/L)	[Wilms <i>et al.</i> , 2001]
IPTG	k.A.	IPTG (0,7 mM)	Lösen in dH ₂ O
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	k.A.	0,5 g/L	k.A.
Ampicillin	k.A.	0,1 g/L	Lösen in dH ₂ O, steril filtriert
Kanamycin	k.A.	0,05 µg/mL	Lösen in dH ₂ O, steril filtriert
Chloramphenicol	k.A.	0,025 g/L	Lösen in Ethanol, steril filtriert
Thiamin	k.A.	0,01 g/L	kühl und dunkel lagern
MDC – SL	k.A.	Monodansylcadaverine (gesättigt)	In 0,1 M Essigsäure gelöst, messtäglich hergestellt
Iodacetamid – SL	k.A.	Iodacetamid (0,1 M)	Lösen in dH ₂ O, messtäglich herstellen
PMSF – SL	k.A.	PMSF (0,1 M)	Lösen in Isopropanol, dunkel und bei -20 °C lagern (max. 4 Wochen)

OnEx ... overnight expression, k.A.... keine Angaben

2.1-4) Organismen

Tab. 2. 4) Übersicht über den verwendeten Organismus Stamm.

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> (DE3)	BL21 Gold B F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) dcm+ Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

2.1-5) Vektoren und Konstrukte

Die Generierung der Konstrukte pBS01 und pBS02 ist unter 2.1-7 (S. 23) beschrieben. Hierfür wurde auch das Konstrukt pCM203 benötigt [Marx *et al.*, 2008b]. Die Klonierung der Konstrukte pBS03 – pBS34 erfolgte mittels *Golden Gate shuffling* und ist unter 2.2-9 (S. 26) beschrieben. Als Akzeptorplasmid diente für alle in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte der pET28a(+) - Vektor (siehe Anhang 1). Der pHSG398 – Vektor mit einem kloniertem LacZ α - Gen (siehe Anhang 2) diente als Donorvektor für die einzelnen Fragmente (siehe Anhang 3) im *Golden Gate shuffling*. Die Codon - optimierte Sequenz zur Generierung der Konstrukte pBS03 - pBS034 und deren Derivate basiert auf dem Vektor pET20b_pro-mTG(S2P)_{opt} (optimierte pro-mTG(S2P) – Sequenz, siehe Anhang 7), der zu Beginn dieser Arbeit bereits in der AG Pietzsch zur Verfügung stand.

Alle in der Arbeit verwendeten Konstrukte sind in der Tabelle Tab. 2. 5 aufgeführt.

Tab. 2. 5) Übersicht über die verwendeten Vektoren und generierten Konstrukte.

Bezeichnung	genetische Merkmale und Substitutionen im pro-mTG – Gen	Referenz
pET28a(+)	pBR322, Kan ^R , T7 Promotor und Terminator, C - terminaler His ₆	Novagen
pHSG398	pBR322, Cm ^R , LacZ α	Takara
pDJ1-3	pET20b (pBR322, Amp ^R , T7 Promotor und Terminator), pro-mTG-LE-His ₆	[Marx <i>et al.</i> , 2007]
pCM203	pDJ1-3, Substitution: S2P	[Marx <i>et al.</i> , 2008b]
pUH308-B	pDJ1-3, Substitution: S2P, S23V-Y24N, K294L	[Buettner <i>et al.</i> , 2012]
pET20b_pro-mTG(S2P) _{opt}	pCM203 (codon - optimiert)	AG Pietzsch (Genescript)
pBS01	pET28a(+), pro-mTG(S2P)-LE-His ₆	vorliegende Arbeit
pBS02	pET28a(+), pro-mTG(S2P)-LE-His ₆ , <i>cer</i> - Sequenz	vorliegende Arbeit
pBS03	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS04 (pBS36)	pET28a(+), Substitution: S2P, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
pBS05	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
pBS06	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, K294L, codon – optimiert	vorliegende Arbeit

pBS07	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS08	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS09	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS10	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS11	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, G257S, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS12	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, K269S, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS13	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, K269S, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS14	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, K269S, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS15	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, K269S, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS16	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS17	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS18	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS19	pET28a(+), Substitution: S2P, S23Y-Y24N, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS20	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, K269S, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS21	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, K269S, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS22	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, K269S, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS23	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, K269S, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS24	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS25	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS26	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS27	pET28a(+), Substitution: S2P, G257S, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS28	pET28a(+), Substitution: S2P, K269S, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS29	pET28a(+), Substitution: S2P, K269S, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS30	pET28a(+), Substitution: S2P, K269S, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS31	pET28a(+), Substitution: S2P, K269S, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS32	pET28a(+), Substitution: S2P, H289Y, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS33	pET28a(+), Substitution: S2P, H289Y, codon - optimiert	vorliegende Arbeit

pBS34	pET28a(+), Substitution: S2P, K294L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit
pBS35	pET28a(+), <i>cer</i>	
pBS36	pET28a(+), <i>cer</i> , Substitution: S2P _{opt} (codon – optimiert)	vorliegende Arbeit
pBS16_cer	pBS16, <i>cer</i>	vorliegende Arbeit
pBS16_C64S	pBS16, Substitutionen: C64S, codon - optimiert	N. Zeno-Al-Arake (Promotion in Vorbereitung)
TG ¹⁶ _Q328A	pBS16, Substitution: Q328A, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328E	pBS16, Substitution: Q328E, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328N	pBS16, Substitution: Q328N, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328D	pBS16, Substitution: Q328D, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328I	pBS16, Substitution: Q328I, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328V	pBS16, Substitution: Q328V, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328W	pBS16, Substitution: Q328W, codon – optimiert	vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ _Q328L	pBS16, Substitution: Q328L, codon - optimiert	vorliegende Arbeit

2.1-6) Enzyme, Marker und Reaktionskits

Tab. 2. 6) Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Marker und Reaktionskits.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Sonstiges
Benzonase (Emprove)	Merck KgaA (Darmstad, Deutschland)	70746-3	> 90 % > 1 × 10 ⁶ U/mg protein
Lysozym	Carl Roth GmbH &Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8259.2	~20000 U/mg
Dispase I	BD Biosciences (Heidelberg)	354235	50 U/mL
Proteinase K	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	EO0492	600 U/mL
Alkaline Phosphatase (FAST AP)	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	EF0651	1 U/μL
T4 – DNA Ligase	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	EL0013	5 U/μL
<i>SphI</i> (<i>PaeI</i>)	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	ER0601	10 U/μL
<i>BsaI</i> (<i>Eco31I</i>)	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	ER0292	10 U/μL
<i>NcoI</i>	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	ER0575	10 U/μL
<i>XhoI</i>	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	ER0692	10 U/μL
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	ER1251	10 U/μL

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoScientific (Walham, U.S.A)	K0701	k.A.
MSB® Spin PCRapace Kit	Invitek GmbH (Berlin, Deutschland)	1020220300	k.A.
MassRuler™ DNA ladder Mix	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	SM0403	k.A.
Protein Molecular Weight (MW) Marker	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A.)	SM0431	k.A.

k.A. ... keine Angaben

2.1-7) Übersicht über verwendete Oligonukleotide

Zur Klonierung des pBS01 Konstruktes erfolgte zunächst die Amplifikation der codierenden pro-mTG(S2P) (nicht - optimiert) Sequenz aus dem Konstrukt pCM203 [Marx *et al.*, 2008b]. Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide fwd_pro-mTG als *forward* Primer und T7-Terminator als *reverse* Primer verwendet. Zur Generierung von pBS02 bzw. pBS36 erfolgte die Amplifikation des *cer* - Elementes aus einen bereits in der AG Pietzsch vorhandenen pACYC - Derivat. Als *forward* Primer wurde fwd_cer und als *reverse* Primer rev_cer genutzt (siehe Tab. 2. 7). Die Sequenz ist in Anhang 8 aufgeführt. Alle Oligonucleotide wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) geliefert. Vor Verwendung wurden die Primer in 10 mM Tris/HCl – Puffer (pH = 8,5) aufgenommen und auf eine DNA - Konzentration von 100 pmol/μL eingestellt, bei -20 °C gelagert und für PCR-Ansätze 1:10 mit 10 mM Tris/HCl – Puffer (pH = 8,5) oder dH₂O verdünnt. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 2. 7 zusammengefasst. Die Verifizierung der Sequenzen und die korrekte Insertion der Gene erfolgten über die Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland). Zur Sequenzierung wurden die jeweiligen Klonierungsprimer genutzt.

Tab. 2. 7) Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer).

Bezeichnung	5' → 3' Sequenz	Matrize	Verwendung	Fragment
fwd_pro-mTG	AAAACCATGGACAATGGCGGGGAAG	pCM203	Amplifikation des pro – mTG Gens; Sequenzierung	1247 nt
T7-Terminator	GCTAGTTATGCTCAGCGG			
fwd_cer	AAAAGCATGCCCGAAATACAGGAACGCA	pACYC	Amplifikation der cer – Region; Sequenzierung	304 nt
rev_cer	TTTTCATGCTCGATGGCTACGAGGGCAG			

XYZ...Nukleotid Überhang zur Verbesserung der Restriktionseffizienz, XYZ...Restriktionsschnittstelle, XYZ...codierende Sequenz des entsprechenden Gens

2.2) Molekularbiologische Methoden

2.2-1) Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde in den 80er Jahren von K. Mullis [Mullis *et al.*, 1986] entwickelt und ermöglicht *in vitro* die gezielte Amplifikation von Gensegmenten mittels

speziell designter Oligonukleotide (Primer). Zur Generierung der Konstrukte pBS01 und pBS02 wurden die in Tab. 2. 7 aufgeführten Primer verwendet. Zur Verbesserung der Produktausbeute bzw. Reinheit wurde die jeweilige Hybridisierungstemperatur der Primer im Vorhinein mittels Gradienten PCR ermittelt (Thermocycler T professional Basic Gradient). Zur Polymerisation der Nukleotide wurde die *Pfu* – bzw. *Phusion* Polymerase verwendet. Ein PCR – Ansatz setzte sich aus den in Tab. 2. 8 angegebenen Komponenten zusammen.

Tab. 2. 8) Allgemeine Zusammensetzung eines PCR – Ansatzes.

Reagenzien	C _{final}
Primer <i>fwd</i>	10 pmol/μL
Primer <i>rev</i>	10 pmol/μL
Matrize	20 – 50 ng/μL
dNTP – Mix	2,5 mM
Polymerase	3-5 U/μL
HF – Puffer	1x
dH ₂ O	ad 50 μL

dNTP... äquimolarer Mix aus den Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP; HF - Puffer... kommerzieller *high fidelity* Puffer der Firma ThermoScientific

Die PCR erfolgte entsprechend dem in Tab. 2. 9 angegebenen Schema.

Tab. 2. 9) Standard PCR – Programm.

Schritt	T [°C]	t [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	1	25
Hybridisierung ¹	52-62	1	
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	3	1
Pause	4	∞	1

¹... primerspezifische Hybridisierungstemperatur

2.2-2) Präparative und analytische Restriktion

Die Restriktion des pro-mTG(S2P) Gens und des Akzeptorplasmides (pET28a) erfolgte mit den RE *XhoI* und *NcoI*, die des cer - Fragmentes und des Akzeptors (pBS01) mit *SphI* (*PaeI*). Beide Reaktionen erfolgten für 1 h bei 37 °C und wurden im Anschluss durch eine 20-minütige Inkubation bei 80 °C im Thermocycler beendet. Alle inaktivierten Ansätze wurden entsprechend 2.2-3 gereinigt.

Die analytische Restriktion diente dem *Screening* und der Verifizierung einer positiven und korrekten Insertion des Amplifikates in das Akzeptorplasmid.

Die Restriktionsendonukleasen und die zugehörigen Puffer wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2-3) Reinigung restringierter Amplifikate und Vektoren

Die Reinigung der Restriktionsansätze dient der Entfernung freier und überschüssiger Nukleotide, Enzyme und weiteren Additiven, sowie gegebenenfalls dem Umpuffern und der Aufkonzentrierung der Ansätze. Zur Reinigung wurde das *Kit MSB® Spin PCRapace* (Invitex) verwendet. Hierbei wird die DNA erst an eine Silikamembran immobilisiert und nachfolgend in einem vorgefertigten 10 mM TRIS/HCl – Puffer (pH = 8,5) oder dH₂O eluiert. Die Prozedur der Reinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.2-4) Horizontale Gelelektrophorese und DNA-Analyse

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Analyse von Plasmidpräparationen, Restriktions – oder PCR – Reaktionen. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 0,35 g Agarose abgewogen und in 35 mL TAE (1 x) suspendiert. Die Suspension wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurde die auf 50 - 60 °C abgekühlte Suspension mit 20 µL Ethidiumbromid (c = 1 µg/µL) versetzt und in den Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach Aushärten und Entfernen des Kamms aus dem Gel erfolgte die Probenauftragung (5 µL Probe supplementiert mit 1 µL 6x Ladepuffer). Zur Größenabschätzung wurden 5 µL MassRuler™ DNA ladder Mix als Längenstandard aufgetragen (siehe Tab. 2. 6). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V und 400 mA für 60 min. Die Analyse wurde mittels der Geldokumentation von Syngene GenGenius (VWR, Deutschland) durchgeführt, die Bildbearbeitungssoftware war GeneSnap (Version 6.03).

2.2-5) Ligation

Die Ligation des pro-mTG(S2P) Gens in den pET28a – Vektor erfolgte bei 25 °C für 17 h im Thermomixer. Das Vektor : *insert* – Verhältnis betrug 1:3. Die Ligation des *cer* – Fragmentes in den pBS01 – Vektor erfolgte bei einem Vektor : *insert* – Verhältnis von 1:5 bei 25 °C für 1 h im Thermomixer. Die Berechnung des Vektor : *insert* – Verhältnis erfolgte nach der unten angegebenen Formel:

$$(1) \quad ng \text{ insert} = \frac{\text{Faktor} \times ng \text{ Vektor} \times bp \text{ insert}}{bp \text{ Vektor}}$$

Das Gesamtvolumen der Ligationsansätze betrug 20 µL mit einem T4 - Ligase Anteil von 5 U/µL in ATP - haltigen Ligasepuffer (ThermoScientific). Im Anschluss der Reaktion erfolgte die chemische Transformation des Ligaseansatzes in *E. coli* BL21 GOLD (DE3) (siehe 2.2-6).

2.2-6) Chemische Transformation

Für die chemische Transformation wurden chemokompetente *E. coli* BL21 Gold (DE3) oder DH5α Zellen genutzt. Die Transformation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von [Hanahan, 1983]. Hierfür wurde ein 100 µL Aliquot chemokompetenter *E. coli* BL21 Gold (DE3) auf Eis aufgetaut. Zuerst wurden 10 µL Ligationsansatz oder 2 µL Plasmidpräparation (50 ng/µL) unter vorsichtigem Rühren zu den Zellen gegeben und der Ansatz wurde für 20 – 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein kurzfristiger

Hitzeschock der kompetenten Zellen für 42 °C und 45 s im Wasserbad, welche danach umgehend auf Eis für 3 – 5 min gekühlt wurden. Nachfolgend wurden die Zellen mit 800 µL LB – Medium versetzt und für 45 – 60 min bei 37 °C unter 650 rpm im Thermomixer inkubiert. Final wurden die Zellen durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, in einem kleineren LB Medium resuspendiert und auf einer antibiotikahaltigen LB – Platte ausplattiert. Die Platten wurden für ~ 16 h im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2-7) Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen GeneJET Plasmid Miniprep *Kit* (ThermoScientific) entsprechend den Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 50 µL 10 mM TRIS/HCl – Puffer (pH = 8,5). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasmidpräparationen bei – 20 °C gelagert.

2.2-8) Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte entweder mit den spezifisch *designten* Primern oder den kommerziell erhältlichen T7 – Promotor bzw. T7 – Terminator (siehe Tab. 2. 7, S.23) durch Eurofins Genomics. Hierfür wurden 50 – 100 ng/µL Plasmidlösung in einem Gesamtvolumen von 20 µL versendet. Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Hilfe des Internet *open source* Programmes Clustal Omega (1.2.1) *multiple sequence alignment* [Madeira *et al.*, 2019] und der Software Serial Cloner (Version 2. 6. 1).

2.2-9) Golden Gate shuffling

Mittels einer bereits publizierten Methode die auf dem Einsatz von TypII Restriktionsendonukleasen (RE) basiert, wurde eine Klonbibliothek von 32 Konstrukten der *Sm* mTG generiert [Engler *et al.*, 2009; Engler, Kandzia, und Marillonnet 2008]. Hierfür wurde basierend auf den von [Marx *et al.*, 2008b] und [Buettner *et al.*, 2012] identifizierten Aminosäuresubstitutionen: S2P, S23Y, Y24N, G257S, K269S, H289Y und K294L das pro-mTG Gen in Fragmente unterteilt. Pro Fragment wurde eine Variante entworfen, die für die native Aminosäuresequenz codiert, und eine mit entsprechender Substitution. Aufgrund der räumlichen Nähe der S23Y und Y24N Substitutionen wurde entschieden, diese in einem Fragment zu belassen. Ebenfalls sollte die S2P Mutation, welche sowohl die thermische Resistenz als auch die spezifische Aktivität für CBZ-Gln-Gly-OH erhöht, in jeder Genvariante enthalten bleiben. Somit reduzierte sich die Anzahl der zu kombinierenden Fragmente auf fünf und man erhält die oben genannte Anzahl möglicher Varianten (n) von 32 ($n = 2^5$) bzw. der durchzuführenden Reaktionsansätze. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl von Reaktionsansätzen wurde sich entschieden kein *shuffling* durchzuführen, sondern die möglichen Varianten in Einzelansätzen *in vitro* zu generieren.

Im Hinblick auf eine spätere Produktion einer oder mehrerer Varianten, wurde eine Anpassung der Gensequenz zur Steigerung der Translationseffizienz in *E. coli* durchgeführt. Aufgrund der Redundanz des

genetischen Codes, codieren 61 Basentriplets (plus 3 Stopcodons) für 20 kanonische Aminosäuren. Dadurch ergibt sich, dass für eine Aminosäure bis zu sechs synonyme Codons (z.B. Leu) verwendet werden können. Diese werden, je nach Organismus unterschiedlich oft genutzt. So wird das Codon AGG für Arg in *E. coli* mit einer Frequenz von < 0,2 % verwendet, während es in Eukaryoten > 1,5 % frequentiert ist [Makrides 1996; Rosano und Ceccarelli, 2014]. Vereinfacht gesagt, gibt es dementsprechend je nach Organismus für jede Aminosäure präferierte Codons [D. Chen und Texada, 2005]. Insbesondere bei der rekombinanten Proteinproduktion kann die Anpassung an präferierte Codons eines heterologen Gens oder die Überexpression der entsprechenden seltenen tRNAs in einer erhöhten Proteinproduktion resultieren [Baneyx 1999; Terpe 2006].

Die Synthese der Fragmente (siehe Anhang 3) und deren Klonierung in den Donorvektor pHSG398 (siehe Anhang 2, Abb.8. 3) über die Schnittstellen *SacI* und *SalI* erfolgte durch die Firma GeneScript Corp. (Hong Kong, China). Als Akzeptorvektor wurde ein modifizierter pET28a - Vektor (siehe Anhang 1, Abb.8. 1) genutzt, in dessen *multiple cloning site* (MCS) ein LacZ α - Fragment über die Restriktionsschnittstellen *BglIII* und *XhoI* (siehe Anhang 1, Abb.8. 2) eingefügt wurde. Durch die Klonierung des LacZ α - Fragmentes wurde der T7 - Promotor ebenfalls entfernt. Um dies auszugleichen war der T7 - Promotor im Fragment I enthalten (siehe Anhang 3) und wurde so wieder miteingefügt. Die Klonierung des LacZ α - Fragmentes und Bereitstellung des Akzeptorplasmides erfolgte ebenfalls durch die Firma GeneScript Corp. (Hong Kong, China).

Die Restriktion-Ligationsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 μ L mit den in Tab. 2. 10 aufgeführten Komponenten. Zuvor wurde in einer separaten Reaktion der Akzeptorvektor mit *BsaI* restringiert und mit alkalischer Phosphatase (Fast AP, ThermoScientific) dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung zu verhindern und die Ligationseffizienz zu steigern. Die Dephosphorylierung erfolgte für 30 min bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung bei 80 °C für 15 min von *BsaI* und der Fast AP. Der restringierte und dephosphorylierte Vektor konnte anschließend für den Restriktions-Ligationsansatz genutzt werden. Die Reaktion erfolgte nach [Engler *et al.*, 2009] und ist in Tab. 2. 11 dargestellt.

Tab. 2. 10) Komponenten und Konzentrationen der Komponenten im Restriktions-Ligationsansatz.

Probe	V der Komponenten	C _{final}
pBS ⁿ (n = 1 – 32)	2,5 μ L Ligase Puffer (10x.)	1x
	5 μ L T4-DNA Ligase (3 U/ μ L)	15 U
	1 μ L <i>BsaI</i> (10 U/ μ L)	10 U
	Je 100 ng Donorplasmid (Fragment I-VI mutiert)	100 ng
	50 ng Akzeptorplasmid (pet28a_LacZ α)	50 ng
	1 μ L ATP (100mM)	4 mM
	ad 25 μ L dH ₂ O (autoklaviert)	----

Tab. 2. 11) Reaktionsbedingungen des Restriktions-Ligationsansatz.

Schritt	Temperatur	Zeit in min	Zyklen
Restriktion-Ligation	37 °C	5	50
Restriktion-Ligation	16 °C	5	
Finale Restriktion	50 °C	30	1
Inaktivierung	80 °C	15	
Pause	4°C	∞	

Alle 32 Varianten wurden nach der Restriktion-Ligationsreaktion in *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformiert (siehe 2.2-6) und auf Kanamycin Platten ausplattiert. Pro Variante wurden 4-5 Klone gepickt und in einer Restriktionsreaktionsanalyse mit *XhoI* und *NcoI* auf Insertion und Größe des Fragmentes untersucht (siehe 2.2-2). Nach positiver Restriktionsanalyse wurde jedes putativ positive Konstrukt mit den Primern T7 – Promotor und T7 – Terminator entsprechend 2.2-7 sequenziert.

2.2-10) Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm (OD₂₆₀ = 1 entspricht 50 µg/mL bei unverdünnter Lösung mit dsDNA) entweder in einer Quarzglaszuvette (Helma Suprasil, d = 10 mm) mit dem Ultraspec 2100 pro (Amersham) oder am NanoDrop™ OneC (ThermoScientific). Zur Abschätzung der Reinheit der DNA diente der Quotient aus 260/280 nm, bei der ein Wert von ~1,8 als hinreichend rein für eine DNA – Präparation gilt.

2.3) Mikrobiologische Methoden

2.3-1) Heterologe Produktion der Sm mTG – Varianten in *E. coli* BL21 Gold (DE3) im 0,2 L Maßstab

Die Produktion der rekombinanten Wt mTG, der thermoresistenten mTG - Varianten und der TG¹⁶:Q328 - Substitutionsvarianten erfolgte im 0,2 L Maßstab als Zymogen (inaktive pro – Form). Hierfür wurden 5 mL LB - Medium mit 5 µL Kanamycin-Lösung ($c_{\text{final}} = 50 \mu\text{g/mL}$) bzw. Ampicillin-Lösung ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{g/mL}$) versetzt und mit einer Einzelkolonie oder Zellmaterial einer Glycerinkultur inokuliert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Vorkultur bei 37°C und 180 rpm für ~ 16 h. Die anschließende Produktion der Enzyme erfolgte mittels Autoinduktionsmedium modifiziert nach [Studier, 2014] in 0,2 L Hauptkulturen (0,5 L Schikanekolben). Hierfür wurden 186 mL LB - Medium mit 4 mL OnEx - Lösung 1, 10 mL OnEx - Lösung 2, 0,2 mL OnEx - Lösung 3 sowie 0,2 mL des entsprechenden Antibiotikums supplementiert (siehe 2.1-3, Tab. 2. 3). Nachfolgend wurde die Hauptkultur bei 28 °C und 110 rpm für 22 - 24 h inkubiert.

Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Metabolisierung von Glukose, Glycerin und Laktose. Glukose wird als Primärkohlenstoffquelle präferiert und fördert das Wachstum zu hohen Zelldichten. Durch den

genregulatorischen Mechanismus der Katabolitrepression wird die frühzeitige Transkription durch die RNA-Polymerase verhindert und somit wird, bei ausreichender Menge an Glukose, die Produktion des Zielproteins verhindert. Steht Glukose nicht mehr im ausreichendem Maß als Primärquelle zur Verfügung, nutzt die Zelle andere bereitgestellte Kohlenstoffquellen (Laktose und Glycerin). Um ein diauxisches Wachstum zu verhindern, dient Glycerin, welches die typische *lag* – Phase nach Umstellung des Metabolismus auf andere C-Quellen überbrückt bis Laktose im ausreichenden Maße metabolisiert werden kann. Laktose wird nicht nur für ein weiteres Wachstum benötigt, sondern induziert auch die Genexpression an *lac* basierenden Promotoren. Die Induktion führt zur Expression der T7 RNA-Polymerase, welche wiederum die Überexpression des Zielgens einleitet.

Vorteile des Autoinduktionssystems sind eine erhöhte Proteinproduktion im Vergleich zur IPTG Induktion, die Vermeidung der Aufnahme von Wachstumskurven und damit einhergehend eine leichtere Handhabung und eine hohe Vergleichbarkeit.

Vor „Ernte“ der Zellen wurden jeweils 2 - 3 1/OD - Proben für spätere Analysen angelegt. Das benötigte Volumen der Probe zur Anfertigung von 1/OD - Proben wurde entsprechend der unten aufgeführten Formel (2) berechnet:

$$(2) \quad V_{Probe} (mL) = 1/OD_{600}$$

Final wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 17.700 g und 4 °C pelletiert, in einem 15 mL Falcon überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Untersuchung der Plasmidstabilität wurde 0,1 L Hauptkultur in einem 0,5 L Schikanekolben mit und ohne entsprechendes Antibiotikum kultiviert. Die Kultivierung erfolgte durchgehend in Minimalmedium [Wilms *et al.*, 2001]. Zur Inokulation der Hauptkultur wurde eine zuvor angelegte 5 mL Vorkultur genutzt und es wurde eine Start-OD₆₀₀ von ~ 0,1 eingestellt. Vor Induktion wurde die Hauptkultur bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und die OD₆₀₀ stündlich verfolgt. Die Induktion zur Proteinproduktion erfolgte mittels Zugabe von IPTG ($c_{final} = 0,7$ mM) bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6. Die Hauptkultur wurde anschließend bei 29 °C und 160 rpm bis zu einer Gesamtkultivierungszeit von 6 h inkubiert. Zur Überwachung der Plasmidstabilität wurden vor Zugabe von IPTG und zum Ende der Kultivierung Aliquote entnommen und entsprechend 2.3-3 untersucht.

2.3-2) Heterologe Produktion der *Sm* mTG – Varianten in *E. coli* BL21 Gold (DE3) im 11,5 L Maßstab

Die rekombinante Produktion der *Sm* mTG erfolgte im Fermentationssystem Biostat® C entsprechend [Sommer *et al.*, 2011]. Die Aufzeichnung und Ansteuerung einzelner Parameter, u.a. Säure - und Basezugabe, Rührgeschwindigkeit etc., erfolgte durch die Software MFCS (Version 3.0). Als Medium

diente Minimalmedium (MM) nach [Wilms *et al.*, 2001] (siehe Tab. 2. 3). Zur Herstellung des Inokulums wurden mehrere Vorkulturen (VK I - IV) angesetzt (siehe Abb. 2. 1, S.31). Die Inokulation von Vorkultur I erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie (gewachsen auf einer mit Kanamycin supplementierten Minimalmediumsplatte (50 µg/mL)).

Zur Inokulation der 9,5 L Hauptkultur (HK) wurden viermal 0,5 L VK steril in einer 5 L Schottflasche vereinigt und auf Eis inkubiert, um das weitere Wachstum der *E. coli* – Zellen zu inhibieren. Der Transfer der 2 L VK IV in die 9,5 L HK erfolgte automatisch in der Nacht, sodass die initiale Phase des Wachstums (*batch* Phase) nicht verfolgt werden konnte. Der Glukosegehalt zu Beginn der Fermentation wurde eingestellt auf ca. 24 g/L und die Start OD₆₀₀ (gemessen mit Genesys 6) wurde anhand der finalen OD₆₀₀ der 2 L VK IV berechnet.

Der schematische Ablauf einer Fermentation der rekombinanten *Sm* mTG erfolgte nach [Sommer *et al.*, 2011] in drei Phasen. In der *batch* (1) und *feeding* (2) Phase erfolgt die Kultivierung bei 37 °C. Während es in der *batch* Phase zu keiner Zugabe oder Austausch von Medien bzw. *feed* – Lösung kommt. Die Zugabe der *feeding* – Lösung (500 g/kg Lösung) in der *feed* Phase erfolgte entsprechend dem Modell von [Sommer *et al.*, 2011], bei der ein Wachstum unter Glukoselimitation eingestellt wird um Acetatbildung bei Glukoseüberschuss zu vermeiden. Die Produktion des Zielproteins erfolgte in der Induktionsphase (3), durch Zugabe von IPTG mit einer finalen Konzentration von 1 mM und vorherigen Absenken der Temperatur auf 29 °C. Durch Erhöhung der Zugabe an *feed* - Lösung nach Induktion für ca. 2 h wurde eine Limitierung an Substrat während der Proteinproduktion vermieden. Die Induktionsphase zur Produktion der rekombinanten *Sm* mTG(S2P) bzw. TG¹⁶ verlief über 5 h. Der Gesamtkultivierungszeitraum einer Fermentation betrug 13,5 – 14 h. Währenddessen wurde zur Aufrechterhaltung eines pH – Wertes von 7 automatisch Säure (20% H₃PO₄) bzw. Base (25% Ammoniaklösung) zugegeben. Ein Sollwert von 25% gelösten Sauerstoff wurde eingestellt, welcher über eine Kaskade mittels Rührgeschwindigkeit (400 – 1200 rpm) und Begasungsrate (4,5 – 30 L/min) automatisch geregelt wurde. Die Bildung von Schaum wurde manuell durch Zugabe von Antischaummittel (20% Struktol J673) reguliert.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 6000 g für 15 – 20 min (LYNX 6000 Sorvall, Rotor: F9-6x 1000 LEX). Die erhaltene Biofeuchtmasse (BFM) wurde bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Untersuchung der Plasmidstabilität wurden vor Induktion und zum Ende der Kultivierung Aliquote entnommen und entsprechend 2.3-3 untersucht. Für eine spätere Analyse der Proteinproduktion wurde kurz vor Induktion und anschließend halbstündlich 1/OD - Proben entnommen. Die Analyse der OD₆₀₀ und des Glukosegehaltes erfolgte am Fermentationstag.

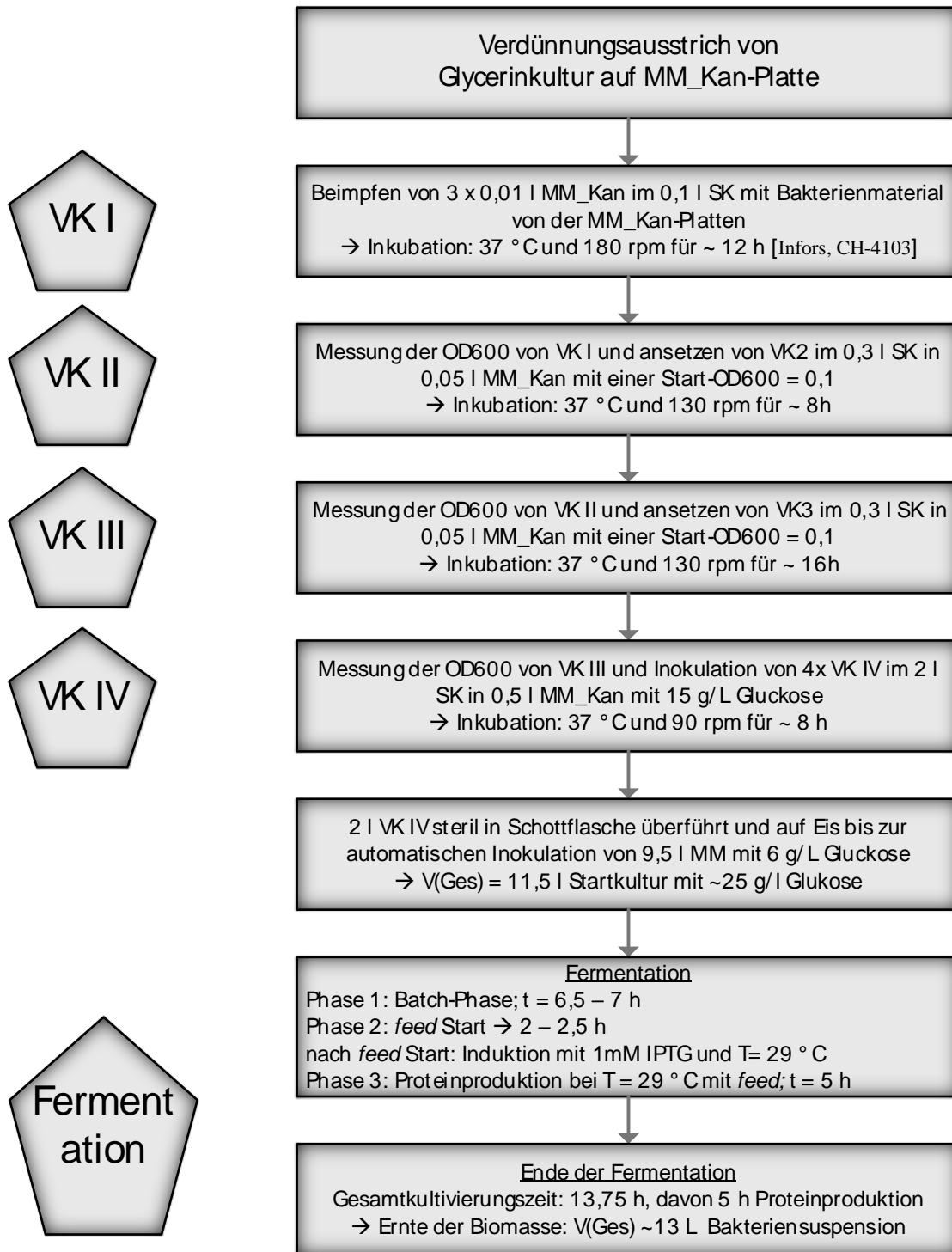


Abb. 2. 1) Schematische Ablauf einer Fermentation im 11,5 L Maßstab von *E. coli* BL21 Gold (DE3) zur rekombinanten Produktion der TG⁰⁴(S2P) bzw. TG¹⁶.

MM... Minimalmedium, SK... Schüttelkoben, VK... Vorkultur, HK... Hauptkultur

2.3-3) Bestimmung der Plasmidstabilität

Die Bestimmung der Plasmidstabilität erfolgte durch Ausplattieren von 100 µl Aliquoten der entsprechenden Kultur in verschiedenen Verdünnungsstufen (10^{-6} - 10^{-8}) auf LB-Platten ohne Antibiotikum (AB), unter sterilen Bedingungen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C für ~ 16 h inkubiert. Am Folgetag wurden insgesamt 100 Kolonien von den angelegten LB Platten steril gepickt und jeweils auf einer LB-Platte mit und ohne Antibiotikum ausgestrichen und erneut bei 37 °C für ~16 h inkubiert. Die Impfstiche konnten dann nach erfolgter Inkubation ausgezählt werden und die Plasmidstabilität entsprechend Formel (3) berechnet werden [Chen *et al.*, 2008].

$$(3) \quad \text{Plasmidstabilität [\%]} = \frac{\text{Koloniezahl auf LB-Platte mit AB}}{\text{Koloniezahl auf LB-Platte ohne AB}} \times 100$$

2.3-4) Zellaufschluss: enzymatisch und mechanisch

Der enzymatisch – physikochemische Aufschluss der *E.coli* BL21 Gold (DE3)_pBSn Stämme mit einer durchschnittlichen BFM von 1,6 – 1,8 g erfolgte durch Suspension der Biomasse in 5 mL Lysepuffer (50 mM TRIS/HCl (pH = 8,0); 0,2 mg/mL Lysozym; 1 mM MgCl₂; 250 U/mL Benzonase) und anschließender Inkubation bei 37 °C (Thermoblock) für 60 min unter gelegentlichem Invertieren des Ansatzes. Nachfolgend wurden drei Gefrier - Tau - Zyklen (15 min bei -80 °C und 15 min bei 25 °C) durchgeführt. Die Suspension wurde für 20 min und 4 °C bei 17.700 g zentrifugiert, um den Rohextrakt zu erhalten.

Für die Untersuchungen zur Hitzestabilität, sowie zur Charakterisierung der TG¹⁶:Q328 - Varianten erfolgte ein Aufschluss der Biofeuchtmasse mittels OneShot. Hierfür wurde die tiefgefrorene Biomasse in einem Eins zu Eins Verhältnis in 50 mM TRIS/HCl (pH = 8,0) aufgenommen und mittels eines Ultra – Turrax homogenisiert. Anschließend erfolgten ein bis zwei Passagen bei 20 kpsi entsprechend den Herstellerangaben, um einen nahezu vollständigen Aufschluss, sowie ein effizientes Scheeren der Nukleinsäuren zu erreichen. Die Suspension wurde für 30 min und 4 °C bei 17.700 g zentrifugiert (Avanti J-30I), um den Rohextrakt zu erhalten.

2.3-5) Analyse von 1/OD - Proben

Die angelegten 1/OD-Proben (Abschnitt 2.3-1) wurden nach Lagerung bei -20 °C auf Eis aufgetaut und in 210 µL Lysepuffer resuspendiert und anschließend 1 h bei 37 °C lysiert. Zur Separation der löslichen von der unlöslichen Fraktion erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 16.100 g. Anschließend wurden 50 µL des Überstandes (lösliche Fraktion) mit 50 µL Probenpuffer versetzt. Zur Analyse der unlöslichen Fraktion (Pellet) wurde diese in 210 µL 50 mM TRIS/HCl (pH = 8) resuspendiert, 50 µL Probe entnommen und ebenfalls mit 50 µL Probenpuffer versetzt. Final wurden die PAGE - Proben für 3 – 5 min bei 95 °C inkubiert und konnten anschließend für eine gelelektrophoretische Analyse (siehe 2.4-3) verwendet werden oder bei – 20 °C gelagert werden.

Zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität (A_V) wurden 70 μL Überstand entnommen, mit 10 μL Dispase versetzt ($C_{\text{final}} = 1 \text{ U/mL}$) und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der A_V entsprechend 2.4-4. Zur Überprüfung der vollständigen Aktivierung wurden 10 μL des aktivierten Überstands entnommen und mit 10 μL Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 3 - 5 min inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert (2.4-3).

2.3-6) Aktivierung der pro – mTG Varianten mit Proteinase K

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Aktivierung rekombinant produzierter pro – mTG mittels Proteinase K. Hierfür wurde pro mL Rohextrakt 1 μL Proteinase K verwendet, was einer finalen Konzentration von 0,6 U/mL entsprach. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C im Wasserbad. Bei Mengen von über 0,5 L zu aktivierenden Rohextrakt erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C im Wasserbad.

2.3-7) Reinigung der aktivierten mTG – Varianten mittels HisGraviTrap Säulen

Die Isolierung der aktivierten mTG – Varianten mittels HisGraviTrap Säulen erfolgte in Anlehnung nach [Marx *et al.*, 2008b] und [Sommer *et al.*, 2012]. Im ersten Schritt wurde das Säulenmaterial (1 mL Nickel Sepharose 6 *Fast Flow*) mit 10 mL Bindepuffer (50 mM TRIS/HCl (pH = 8), 0,02 M Imidazol, 0,3 M NaCl) äquilibriert mit anschließender Applikation des Rohextraktes (ca. 4 – 5 mL) auf die Säule. Nach Passage des Rohextraktes durch das Säulenmaterial wurde dieses mit zweimal 5 mL Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von dreimal 1 mL Elutionspuffer (50 mM TRIS/HCl (pH = 8), 0,5 M Imidazol, 0,3 M NaCl), wobei 0,5 - 1 mL Aliquote aufgefangen und auf ihre Aktivität untersucht wurden. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer auf 300 mM gesenkt, ohne dass es zu einer beobachtbaren Reduktion der Ausbeute an eluierten Zielprotein kam. Aliquote mit einer volumetrischen Gesamtaktivität von > 30 U/mL wurden einer Dialyse unterzogen.

2.3-8) Isolierung der pro-TG¹⁶ durch Abtrennung von Wirtszellproteinen mittels Hitzefällung

Die Entwicklung des Reinigungsprotokolls zur Isolierung der pro-mTG bzw. von pro-TGⁿ – Varianten wird ausführlich in der vorliegenden Arbeit anhand der pro-TG¹⁶ unter dem Abschnitt 3.2-3 (S. 77) beschrieben. Die Produktion der Biomasse stammte aus einer Fermentation im 11,5 L Maßstab (siehe Abschnitt 2.3-2, S. 29) und wurde bei -20 °C gelagert. Im ersten Schritt wurde die tiefgefrorene Biomasse in einem Eins zu Eins Verhältnis in TRIS/HCl – Puffer aufgetaut und mittels UltraTurrax resuspendiert. In Vorversuchen (Maßstab 20 – 50 mL) erfolgte der Aufschluss der Biomassesuspension mittels OneShot entsprechend Abschnitt 2.3-4 (S. 32). Der Aufschluss von 950 g *E. coli* BL21 GOLD (DE3)_pBS16 erfolgte mittels Hochdruckhomogenisator (APV-2000) bei ~ 1000 bar in 3 Passagen. Anschließend wurde bei 15.000 g für 30 min und 4 °C zentrifugiert (Avanti Beckmann, Rotor JA-10). Der Überstand wurde anschließend für 1 h bei 65 °C in einem Wasserbad erhitzt und bei 15.000 g für 0,5 h und 4 °C zentrifugiert. Die Aktivierung des zentrifugierten Überstandes erfolgte entsprechend Abschnitt 2.3-6, jedoch mit einer

verlängerten Inkubationszeit von 1,5 h. Nachfolgend wurde der Überstand ü.N. (16-20 h) in 25 – 50 mM TRIS/HCl bei 4 °C dialysiert (MWC 25 kDa). Nach Dialyse wurde dem Dialysat DTT (c_{final} = 1 mM) zugegeben und das Enzym anschließend bei 16.100 g für 30 min bei 4 °C zur Pelletierung zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet konnte anschließend bei - 20 °C gelagert oder in 50 mM TRIS/HCL (pH = 8,0; 300 mM NaCl) zur weiteren Analyse resolubilisiert werden.

2.3-9) Dialyse und Lagerung der aktivierten mTG – Varianten

Die Dialyse diente, neben der Entfernung des Imidazol, vor allem der Entfernung des NaCl aus den Elutionsfraktionen. Durch Entzug des NaCl aus der Präparation kommt es zur Präzipitation der aktivierten mTG in Form eines weißlichen Niederschlags. Ebenfalls sinkt die Löslichkeit mit Herabsetzen der Temperatur, weshalb die Dialyse u.a. bei 4 °C stattfand. Die Elutionsfraktionen wurden jeweils zweimal in ~ 4 L Dialysepuffer (50 mM TRIS/HCl (pH = 8)) unter moderaten, gleichmäßigen Rühren in einer Membran mit einem MWC von 25 kDa dialysiert. Nach Dialyse erfolgte die Zugabe von DTT (zum Schutz vor Oxidation) zum Dialysat mit einer finalen Konzentration von 1 mM. Final wurde das Dialysat in 0,2 – 0,5 mL Fraktionen aliquotiert und bei 16.100 g und 2 - 4 °C zentrifugiert, der Überstand durch pipettieren sorgfältig entfernt und die verbliebenen Aliquote mit pelletierter mTG bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4) Proteinbiochemische Methoden

2.4-1) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [Bradford, 1976]

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) erfolgt colorimetrisch durch Messung der Absorption bei 595 nm. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie *Brilliant Blue* G-250 an basische oder aromatische Aminosäureseitenketten wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben [Bradford, 1976]. Zur Herstellung des Farbreagens wurden 100 mg Coomassie *Brilliant Blue* G-250 in 50 mL 95 %igem Ethanol gelöst und mit 100 mL 85 %iger Phosphorsäure versetzt. Anschließend wurde mit dH₂O auf 600 mL aufgefüllt, die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin zugegeben und das Farbreagenz für 24 h bei RT gelagert.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 975 µL Farbreagenz mit 25 µL Proteinlösung für 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm ermittelt und die Proteinkonzentration, je nach eingesetztem Puffer, anhand einer Kalibrierung mit bovines Serumalbumin (BSA) als Standardprotein in 200 mM TRIS/Acetate (pH = 6) berechnet.

2.4-2) Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV – Absorption bei 280 nm

Die Bestimmung der Proteinkonzentration (E₀) mittels UV – Absorption bei 280 nm wurde bei gereinigten Proteinpräparationen genutzt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Solubilisierung der Enzyme in 200 mM TRIS/Acetate (pH = 6) unter gelegentlichem Invertieren auf Eis bzw. RT für 1 h - 2 h. Im Anschluss

wurden die Proben für 5 min bei 16.100 g zentrifugiert und in ein neues 1,5 mL Gefäß überführt, um Schwebstoffe und größere Aggregate abzutrennen. Der theoretische Extinktionskoeffizient (ϵ) jeder mTG - Variante wurde mit Hilfe des Internetprogramms ProtParam [Gasteiger *et al.*, 2005] berechnet (siehe Tab. 8. 1, Anhang 4, S. 133). Über das Molekulargewicht (MW) lässt sich anschließend der Faktor der Absorption bei 280 nm (A_{280}) einer 1 mg/mL ($A_{280}^{0,1\%}$) konzentrierten Enzymlösung berechnen (Formel 4). Anschließend kann die Enzymkonzentration via Formel 5 ermittelt werden.

$$(4) \quad A_{280}^{0,1\%} = \frac{\epsilon \left[\frac{L}{mol} * cm \right]}{MW \left[\frac{g}{mol} \right]}$$

$$(5) \quad E_0 \left[\frac{mg}{mL} \right] = A_{280} / A_{280}^{0,1\%}$$

2.4-3) SDS – PAGE und Färbung mittels Coomassie

Die Durchführung der SDS-PAGE wurde in Anlehnung der Methode nach Laemmli [Laemmli, 1970] durchgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem diskontinuierlichen System, bestehend aus einem Sammel - und Trenngel (siehe Tab.2.12). Zu analysierende Proben wurden, falls nicht anders angegeben, 1:1 mit SDS-Probenpuffer verdünnt und 3 - 5 min bei 95 °C inkubiert. Proben welche Proteinase K enthielten, wurden mit PMSF ($c_{\text{final}} = 1 \text{ mM}$) behandelt, um eine Proteolyse der Proteine (v.A. pro-mTG/mTG) zu verhindern. Es wurden jeweils 10 μL Probe und 5 μL Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zweistufig: Stufe (1) 300 V, 80 mA, ~ 6 min und Stufe (2) 300 V, 60 mA, ~ 40 min. Die anschließende Färbung des PA - Gels, zur Visualisierung der Proteinbanden, erfolgte mittels Coomassie Brillant Blau – Färbelösung (siehe Tab. 2.14). Hierzu wurde das PA - Gel in Färbelösung über Nacht auf einem Wipptisch geschüttelt und am Folgetag durch mehrmalige (mind. dreimalige) Inkubation in Entfärbelösung (siehe Tab.2.14) für 0,5 - 2 h bis zu einem ausreichenden Kontrast zwischen Hintergrund und Proteinbanden entfärbt (siehe Tab. 2.13). Final wurde das PA - Gel in eine durchsichtige Klarsichtfolie luftblasenfrei positioniert und zur Dokumentation eingescannt.

Tab. 2. 12) Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (d = 1 mm).

Komponenten	2 Trenngele (12,5 %)	2 Sammelgele (4,5 %)
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/Bis-Acrylamid (30 %)	4,2 mL	0,75 mL
dH2O	3,3 mL	3 mL
TEMED	10 μL	10 μL
gesättigte APS Lösung	20 μL	8 μL

Tab. 2. 13) Komponenten der Lösungen zur Durchführung der SDS – PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen zur Herstellung
Trenngelpuffer	181,8 g TRIS 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung pH 8,8	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst, pH mit 3 M HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt
Sammelgelpuffer	60,6 g TRIS 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung pH 6,8	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt
Acrylamid/Bisacrylamid - Lösung (30 %); Mix 32:1	290,9 g/L Acrylamid 9,1 g/L Bisacrylamid	-
APS-Lösung (gesättigt)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	In einem Reaktionsgefäß dH ₂ 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 ₃ -Lösung	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst und mit dH ₂ 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 ₂ O gelöst, pH mit 3 M HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung wurden 10 µL Mercaptoethanol je mL SDS - Probenpuffer zugesetzt

Tab. 2. 14) Lösungen zur Durchführung der Coomassie-Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen zur Herstellung
Färbelösung	1 g/L Coomassie Brillant Blau G-250 20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassie Brillant Blau in 700 mL dH ₂ O gelöst, danach Zugabe der Lösungsmittel
Entfärbelösung	20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Lösungsmittel gemischt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt

2.4-4) Bestimmung der volumetrischen (A_V) und spezifischen Aktivität (A_{spez}) der mTG – Varianten

Die Bestimmung der volumetrischen Aktivität (A_V) der Transglutaminase - Varianten erfolgte nach [Folk und Cole, 1966]. Dieser colorimetrische, diskontinuierliche Test gehört zu den am häufigsten verwendeten *assay`s* in der TG - Literatur und lässt somit einen breiten Vergleich mit dieser zu. Unter Verwendung des Dipeptids CBZ-Gln-Gly-OH als Acyldonor und Hydroxylamin als Acylakzeptor katalysiert die mTG die Bildung von CBZ-Glutaminyl- γ -Hydroxamat-Glycin, bei der es in Anwesenheit von Eisen(III) zur Bildung eines bräunlich-rötlichen Farbkomplexes kommt (siehe Abb. 2. 2). Die Bildung des Farbkomplexes wird anschließend bei einer Wellenlänge von 525 nm photometrisch detektiert. Der Umsatz von einem μmol Substrat pro Minute wurde als ein *unit* [$U = \mu\text{mol}/\text{min}$] Transglutaminase Aktivität definiert. Der Reaktionszeitraum betrug, wenn nicht anders angegeben, 10 Minuten.

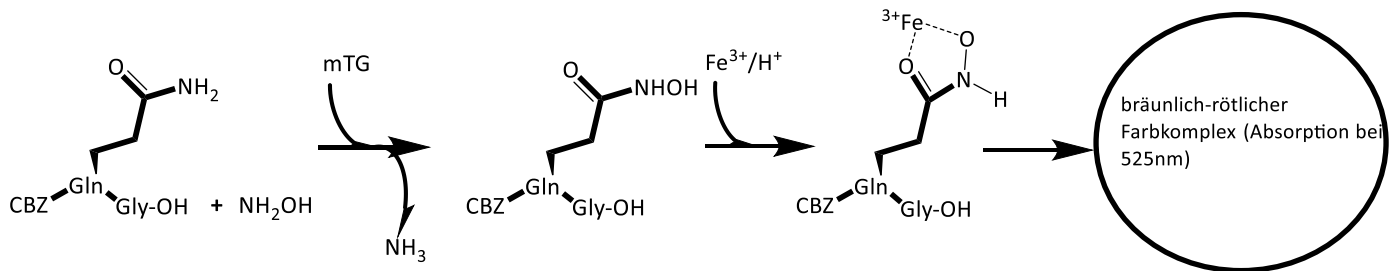


Abb. 2. 2) Reaktionsschema des diskontinuierlichen Tests nach [Folk und Cole, 1966].

Die Durchführung des Tests erfolgte in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß. Hierfür wurden 455 μL Substrat-Lösung (Konzentration im Test: 200 mM TRIS/Acetat, 100 mM Hydroxylamin, 10 mM reduziertes Glutathion und 30 mM CBZ-Gln-Gly-OH, pH = 6) für 3 min in einem Thermomixer vorinkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 μL Enzymlösung gestartet. Nach 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 525 μL Stopp-Reagenz (1:1:1 (v/v) 3 M HCl, 12 % Trichloracetat und 5 % Eisen(III)chlorid-Lösung in 0,1 M HCl) terminiert. Der Ansatz wurde zeitnah für 1,5 min bei 16.100 g zentrifugiert, der Überstand in eine semi-micro UV – Küvette (Brand GmbH & Co. KG) transferiert und die Absorption bei 525 nm bestimmt (Ultrospec 2100 pro). Die Volumenaktivität (A_V) [U/mL] wurde entsprechend Formel (6) berechnet.

$$(6) \quad A_V \left[\frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{A_{525} * V_{\text{Test}}}{\epsilon * d * V_{\text{Enzym}} * t_{\text{Reaktion}}}$$

A_{525} ... Absorption bei 525 nm; V_{Test} ... Volumen des Reaktionsansatzes (1,05 mL); ϵ ... Extinktionskoeffizient (0,4995 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), V_{Enzym} ... Volumen der Enzympräparation (0,07 mL); t_{Reaktion} ... Reaktionszeit bei 37 °C [min]

Aus der A_V lässt sich unter Einbeziehung der Proteinkonzentration (siehe 2.4-2) die spezifische Aktivität (A_{spez}) entsprechend Formel (7) berechnen.

$$(7) \quad A_{spez} \left[\frac{U}{mg} \right] = \frac{A_V}{E_0}$$

E_0 ... ermittelte Proteinkonzentration [mg/mL]

Für die Messung der Absorption bei 525 nm in Mikrotiterplatten (MTP) erfolgte die Reaktion in 140 µL Substratlösung mit 10 µL Enzymlösung in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß bei 37 °C in einem Thermomixer. Die Reaktion wurde mit 150 µL Stopp-Reagenz terminiert, für 1,5 min bei 16.100 g zentrifugiert und 200 µL Überstand wurden in eine MTP Falcon 1172 (96 Kavitäten, klar) transferiert. Die Aufnahme der Absorption bei 525 nm erfolgte am FLUOstar Galaxy (BMG). Bei allen ermittelten A_{525} - Werten wurde im Vorfeld die Absorption einer Blindwertlösung ($\lambda = 525$ nm) bestimmt und von den Absorptionswerten der Reaktionsansätze abgezogen. Die Herstellung der Blindwertlösung erfolgte analog zum Reaktionsansatz, bei der die Enzymlösung durch die Pufferlösung substituiert wurde.

2.4-5) Aufnahme der Inaktivierungskinetiken, Bestimmung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und Inaktivierungsenergie (iE_A) der mTG - Varianten

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Transglutaminase – Varianten wurden Inaktivierungskinetiken im Bereich von 55 - 70 °C aufgenommen. Zuerst erfolgte die Solubilisierung der entsprechenden Variante in 200 mM TRIS/Acetat - Puffer (pH = 6) und eine Einstellung der Proteinkonzentration auf 0,3 mg/mL. Anschließend wurden für jeden Zeitpunkt jeweils 35 µL der Enzymlösung in ein dünnwandiges PCR – Gefäß übertragen und bei 37 °C für 3 - 5 min vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der PCR- Gefäße bei der entsprechenden Temperatur für definierte Zeitabschnitte in einem Thermocycler (T Professional Basic Gradient, Biometra). Jedes PCR – Gefäß wurde nach Inkubation sofort auf Eis inkubiert, um eine weitere thermische Inaktivierung zu vermeiden. Anschließend wurden die Ansätze bei ~ 2000 g für 3 min zentrifugiert (Rotilabo®-Mini-Zentrifuge, 0,5 mL Adapter, Roth), um größere Präzipitate zu pelletieren. Zur Bestimmung der Restaktivität wurde der Hydroxamattest (siehe 2.4-4) durchgeführt und die Absorption bei 525 nm in MTP detektiert. Für jeden Zeitpunkt wurde der Hydroxamattest zweimal durchgeführt. Die Initialaktivität zum Zeitpunkt $t = 0$ bildete den 100 % Wert.

Durch Auftragen der Restaktivität gegen die Zeit und Anpassen der Datenpunkte nach einem exponentiellen Zerfall erster Ordnung (siehe Formel 8) lässt sich die Halbwertszeit und die Geschwindigkeitskonstante ermitteln (siehe Formel 9). Die Anpassung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes Origin® 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)).

$$(8) \quad A(t) = A_0 * e^{-k_{inakt} * t}$$

$$(9) \quad t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{inakt}} \quad \text{bzw.} \quad k_{inakt} = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

A_t ... Aktivität zum Zeitpunkt t ; A_0 ... Aktivität zum Zeitpunkt $t = 0$; k_{inakt} Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung; t ... Zeit

Die Bestimmung der Inaktivierungsenergie (iE_A) der rekombinanten Transglutaminase - Varianten TG⁰⁴(S2P), TG¹⁶ und Wt mTG erfolgte durch Auftragen des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante ($\ln k_{\text{inakt}}$) bei einer bestimmten Temperatur gegen das Reziproke der Temperatur (Arrheniusplot). Durch lineare Anpassung wurde die Steigung ermittelt, welche dem Ausdruck $-iE_A/R$ entspricht. Die Inaktivierungsenergie wurde anschließend entsprechend Formel 10 berechnet.

$$(10) \quad iE_A = m * (-R)$$

E_A ... Inaktivierungsenergie; m ... Steigung; R ... allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J} * \text{mol}^{-1} * \text{K}^{-1}$)

2.4-6) Aufnahme von Temperaturübergangskurven von mTG – Varianten mittels nanoDSF

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes (T_M), sowie der Temperatur bei der die Entfaltung (T_{on}) und die Aggregation (T_{Agg}) des Proteins beginnt, erfolgte die Aufnahme von Temperaturübergangskurven mittels *nano differential scanning calorimetry* (nDSF, Prometheus NT.48).

Hierfür wurde die entsprechende Variante in 0,02 M Phosphatpuffer (pH = 7) [Cold Spring Harbor Protocols, 2006] solubilisiert, die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.4-2) und auf 1 mg/mL eingestellt. Für die Untersuchung der TG¹⁶:IA wurde diese durch Zugabe von Iodacetamid (IA) (c_{final} : 1 mM IA auf 1mg/mL TG¹⁶) inhibiert und die Lösung bei RT für 30 - 60 min inkubiert. Im Anschluss wurde die volumetrische Aktivität (Abschnitt 2.4-4, S. 37) bestimmt. Da keine Restaktivität nach Zugabe von IA gemessen werden konnte, wurde von einer vollständigen Inhibierung ausgegangen. Anschließend wurde eine 10 μL Glaskapillare mit Enzymlösung gefüllt, entsprechend den Herstellerangaben im Gerät positioniert und die Messung gestartet. Die Einstellung der Temperatur (25 - 95 °C und der Aufheizrate (1 °C/min)), sowie die Ermittlung der Parameter T_M , T_{on} und die T_{Agg} erfolgte mittels der Herstellersoftware PR.ThermControl.

2.4-7) Kopplung von Monodansylcadaverin (MDC) an und mittels mTG

In Anwesenheit von Monodansylcadaverin (MDC), einer aktiven Transglutaminase und einem Substratprotein kommt es zur Kopplung des MDC (freie Aminogruppe) mit einer reaktiven γ - Carboxyamid Gruppe. Der Test wurde in dieser Arbeit genutzt, um zu untermauern, dass gereinigte TG¹⁶ durch Inkubation bei 60 °C zur Selbstquervernetzung führt und um Hinweise zu erhalten, ob selbstquervernetzte TG¹⁶ Restaktivität aufweist.

Die Kopplung wurde bei 60 °C für die aktive TG¹⁶, die hitzeinaktivierte TG¹⁶ (inkubiert bei 95 °C) und TG¹⁶:IA (c_{final} 1 mM IA auf 1 mg/mL Enzym) durchgeführt. Die inaktiven Varianten wurden als Kontrolle mitgeführt, um u.a. unspezifische Kopplungs - bzw. Anlagerungsereignisse auszuschließen. Weiterhin wurde ein Reaktionsansatz mit aktiver TG¹⁶ und MDC bei 25 °C durchgeführt, um zu untersuchen, ob es auch bei geringeren Temperaturen bereits zu einer Kopplung kommt.

Für die Kopplung wurde eine in 0,1 M Essigsäure gesättigte MDC – Lösung hergestellt, mit Alufolie

umwickelt und kühl gelagert. Die Proteinkonzentration der Enzymlösungen betrug 1,25 mg/mL. Für die Reaktion wurden 800 µL Enzymlösung mit 200 µL MDC – Lösung versetzt und bei 25 °C bzw. 60 °C in einem Thermoblock für 60 min inkubiert. 50 µL Aliquots wurden nach 0, 5, 10, 15, 30 und 60 min entnommen und die Reaktion durch zügigen Transfer der Probe in, zuvor auf 95 °C vorgeheizten, 50 µL SDS – Probenpuffer abgestoppt. Anschließend wurden die Proben entsprechend 2.4-3) behandelt, mit der Ausnahme, dass vor Coomassie – Färbung eine Dokumentation der Gele mittels UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm erfolgte. Zum Vergleich des Laufverhaltens und zur leichteren Bandenidentifizierung von dem ungefärbten, unter UV – Licht betrachtetem Gel und dem Coomassie – gefärbtem Gel, wurden Aufnahmen mit einem fluoreszierenden Lineal mit entsprechender Skalierung gemacht.

2.4-8) Identifizierung von intrinsischen Quervernetzungsstellen mittels LC/MS

Zur Identifizierung von Quervernetzungsstellen innerhalb der TG¹⁶, die an der Selbstquervernetzung beteiligt sind, erfolgte eine Analyse mittels LC/MS. Hierfür wurden zunächst mTG – Pellets in 200 mM TRIS/Acetat – Puffer (pH = 6) solubilisiert und in 50 µL Pellets aliquotiert. Anschließend wurde ein Aliquot mit 50 µL SDS - Probenpuffer versetzt und für 3 - 5 min bei 95 °C erhitzt. Ein weiteres wurde für 45 min bei 60 °C inkubiert und im Anschluss an die thermische Behandlung ebenfalls mit 50 µL Probenpuffer versetzt und für 3 - 5 min bei 95 °C erhitzt. Beide Proben wurden mittels SDS – PAGE aufgetrennt, gefärbt und entfärbt (siehe 2.4-3). Final wurden Gelbanden möglichst exakt mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten, wobei das Gel währenddessen in dH₂O lag. Der nachfolgende *in gel* Verdau, die LC/MS – Analyse und Auswertung der Daten erfolgten in der AG Sinz (Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, MLU) durch Dr. C. Ihling.

2.4-9) Bestimmung der pH – Wert Stabilität und chemischen Resistenz der TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG

Die Bestimmung der pH - Wert Stabilität der Varianten TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG erfolgte durch Inkubation der Enzyme bei verschiedenen pH - Werten und nachfolgender Bestimmung der Restaktivität. Hierfür wurden 10 µL einer 3 mg/mL Enzymlösung der entsprechenden Variante mit 90 µL Universalpuffer (UB4) (20 mM HEPES, 20 mM MES, 20 mM Natriumacetat) [Brooke *et al.*, 2015] mit den pH-Werten 3-9 versetzt ($c_{\text{final}}(\text{Enzym}) = 0,3 \text{ mg/mL}$). Anschließend wurden die Enzymlösungen bei 25 °C im Thermomixer für 25 h inkubiert. Nach 25 h wurde die Restaktivität durch Messung der Absorption bei 595 nm in MTP bestimmt (siehe 2.4-4). Als 100 % wurde der Wert mit der höchsten gemessenen Absorption bei 525 nm genommen.

Die Bestimmung der chemischen Resistenz erfolgte für die Variante TG¹⁶ und der Wt mTG. Hierfür wurden 10 µL Enzymlösung (0,6 mg/mL) mit $y \mu\text{L}$ 8 M Guanidiniumhydrochlorid – Lösung (GnHCl) ($y = 0,08 \text{ M} - 6,4 \text{ M GnHCl}$) versetzt (siehe Pipettierschema Anhang 11) und für 2,5 h bzw. 24 h bei RT

(20 – 25 °C) inkubiert. Anschließend wurde die strukturelle Entfaltung durch Änderung der intrinsischen Fluoreszenz (ausgedrückt durch den Quotienten F350 nm/330 nm) mittels nanoDSF (Prometheus NT.48) bestimmt und gegen die jeweilige G_NHCl aufgetragen. Die Darstellung der Entfaltungskurven erfolgte mit Hilfe des Programmes Origin® 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)).

2.4-10) Ermittlung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur wurden im Vorfeld jeweils 5 mL Aliquots der Substratlösung je zu testender Temperatur hergestellt. Um eine Beeinflussung der Änderung des pH – Wertes bei der jeweilig zu testenden Temperatur zu minimieren, wurde für jedes Aliquot der pH – Wert bei entsprechender Temperatur eingestellt (37 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C). Hierfür wurde ein 5 mL Aliquot der Substratlösung in ein 15 mL Falcon - Gefäß überführt und in einem Thermomixer (Eppendorf) bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Das Erreichen der finalen Temperatur wurde mittels eines digitalen Thermometers verfolgt. Im Anschluss erfolgte die Einstellung des pH – Wertes 6 mittels 3 M Acetat-Lösung. Final wurden die Lösungen auf 10 mL aufgefüllt und bei -20 °C für max. 4 Wochen gelagert. Zur Herstellung der Enzymlösungen erfolgte die Solubilisierung der WT mTG und TG¹⁶ in 200 mM TRIS/Acetat (pH = 6). Anschließend wurde die Proteinkonzentration entsprechend 2.4-2 (S. 34) bestimmt und Enzymlösungen von 0,3 mg/mL bzw. 0,15 mg/mL beider Varianten hergestellt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur wurde pro Temperatur und Variante ein Aliquot von 1174 µL Substratlösung der entsprechenden Temperatur in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und in einem vorgeheizten Thermomixer bei der jeweilig zu testenden Temperatur für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 84 µL Enzymlösung mit einer Konzentration 0,3 mg/mL für die Temperaturen 37 °C und 50 °C bzw. 0,15 mg/mL für die Temperaturen 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C gestartet. Die errechneten Startkonzentrationen der Enzyme pro Ansatz und Temperatur ergaben 0,02 mg/mL bzw. 0,01 mg/mL. Nach t = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240, 360, 480 und 600 sek wurden 105 µL Aliquots entnommen und in 105 µL Stopplösung überführt. Im Anschluss erfolgt die Bestimmung der Absorption bei 525 nm im MTP Format entsprechend 2.4-4 (S. 37).

Zur Berechnung der Produktmenge der Enzymreaktion und Bestimmung des Temperaturoptimums der Varianten TG¹⁶ und der Wt mTG wurde eine Kalibrierkurve mittels L-Glutamat-Gamma-mono-Hydroxamat erstellt (siehe Anhang 8, Abb.8. 5, S. 148). Mittels der Steigung und dem Wert der Absorption bei 595 nm konnte im Anschluss die Konzentration an Hydroxamat kalkuliert werden.

2.4-11) Bestimmung der kinetischen Parameter der TG¹⁶, TG⁰⁴ und der Wt mTG

Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mittels des kontinuierlichen Glutamat-Dehydrogenase (GDH) gekoppelten *assay*'s [Day und Keillor 1999; Oteng-Pabi und Keillor 2013]. Das Prinzip beruht auf der Quantifizierung des während der Transglutaminasereaktion freigesetzten Ammoniums. Hierfür wird die GDH als Hilfsenzym genutzt, welches in Gegenwart von Ammonium, NADH und α -Ketoglutarat zu L-Glutamat umsetzt (siehe Abb. 2. 3).

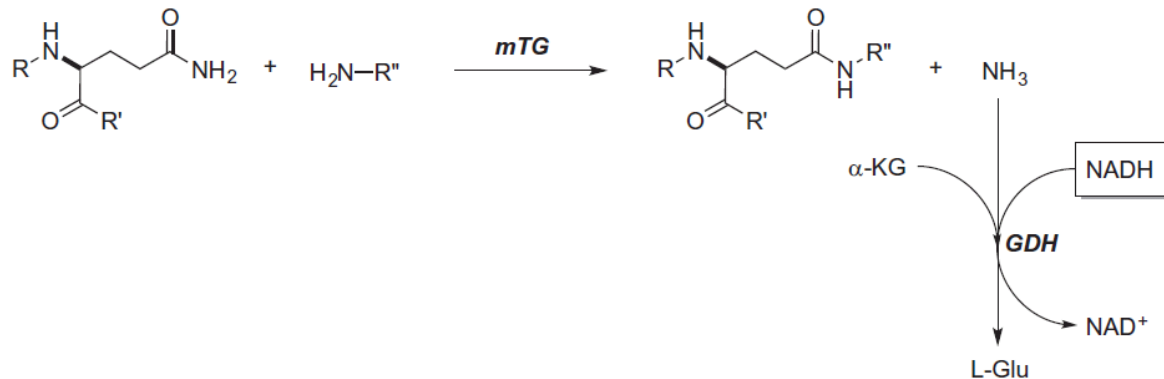


Abb. 2. 3) Reaktionsschema des GDH gekoppelten Transglutaminase assay's [Oteng-Pabi und Keillor 2013].

Alle Messungen wurden bei 37 °C in einer Quarzglasküvette (suprasil) am Ultrospec 2100 pro durchgeführt. Zu Beginn wurden 950 μ L des Reaktionspuffers (200 mM MOPS/KOH (pH 7.2), 1 mM EDTA, 10 mM α -Ketoglutarat, 0,5 mM NADH, 0 - 30 mM CBZ-Gln-Gly-OH, 10 mM Glycin-Methylester und 25 U/mL GDH) für 7 min bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ L einer 0,2 U/mL Enzymlösung der jeweiligen Variante gestartet. Die Abnahme von NADH wird durch Messung der Absorption bei 340 nm spektroskopisch verfolgt. Die lineare Anpassung der resultierenden Kurve erfolgte mit Hilfe des Programmes Origin[®] 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)). Die Reaktionsraten bei der jeweiligen Substratmenge wurden aus dem Quotienten des Anstiegs und des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH ($6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) ermittelt. Durch Auftragen der Reaktionsraten gegen die Substratkonzentration erhielt man eine Michaelis - Menten - Kurve. Die Herleitung der Michaelis - Menten Konstante (K_M) und der maximalen Geschwindigkeit unter Substratsättigung (V_{\max}) erfolgte aus der Michaelis - Menten - Gleichung (Formel 11).

$$(11) \quad v = \frac{V_{\max} * [S]_0}{[S]_0 * K_M + [S]_0}$$

[S]₀ ... Substratkonzentration zum Zeitpunkt t = 0; v ... Reaktionsgeschwindigkeit

Die Berechnung der katalytischen Effizienz erfolgte durch Bildung des Quotienten von k_{kat} und K_M . Die Ermittlung von der Umsatzrate erfolgte entsprechend Formel 12.

$$(12) \quad k_{kat} = \frac{V_{max}}{[E]_0}$$

[E]₀ ... Enzymkonzentration zum Zeitpunkt t = 0

Die unspezifische Oxidation von NADH wurde im Vorfeld durch Messung der Absorption bei 340 nm ohne mTG – Substrat CBZ-Gln-Gly-OH ermittelt und von den nachfolgenden Messungen abgezogen.

2.4-12) Bestimmung des Umsatzes von β – Casein für die Varianten TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG

Zur Ermittlung des Umsatzes eines proteinogenen Substrates wurde die Polymerisierung des monomeren Enzyms β – Casein untersucht. Hierfür wurde kommerzielles β-Casein mit einer Konzentration von 1,1 mg/mL in 200 mM MOPS/KOH - Puffer (pH = 7,3) solubilisiert, sowie die entsprechende mTG - Variante in 200 mM TRIS/Acetat – Puffer (pH = 6,0) solubilisiert und auf eine Konzentration von 100 U/mL eingestellt. Anschließend erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 100 µL mTG - Lösung zu 900 µL der β-Casein - Lösung (*c*_{final} = 1mg/mL Casein und 10 U/mL mTG – Variante). Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C bzw. bei 60 °C für 1 h im Thermomixer inkubiert. Über den Reaktionszeitraum von t = 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 45 und 60 min wurden 50 µL Aliquots entnommen und entsprechend 2.4-3 zur Analyse im Gel behandelt. Der Umsatz an monomerem β-Casein wurde durch densitometrische Messung der Abnahme der relativen Bandenintensität über die Zeit mit Hilfe des System G:Box und des zugehörigen Programmes GeneTools Software (Syngene International) gemessen. Die Darstellung der relativen Abnahme der Bandenintensität über die Zeit erfolgte über das Programm Origin[®] 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)).

2.4-13) Moleküldynamische Untersuchungen der TG¹⁶ und der Sm mTG

Um den Einfluss der einzelnen Mutationen der TG¹⁶ auf die Gesamtstruktur zu ermitteln, wurden Moleküldynamiksimulationen (MDS) der TG¹⁶ und vergleichend dazu der Sm mTG erstellt. Die Modellierung und Dynamik - Simulation der Strukturen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Herrn Dr. W. Brandt am Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie. Die Modellierung wurde mit Hilfe des Programmes YASARA [Krieger *et al.*, 2009] und dem Programm AMBER03 (Simulation von Kraftfeldern) basierend auf der publizierten Kristallstruktur der Sm mTG (pdb: 1IU4, [Kashiwagi *et al.*, 2002]) erstellt. Zur Modellierung der TG¹⁶ wurden die Substitutionen S2P, S23Y, Y24N, H289Y und K294L eingefügt. Final erfolgte eine Energieoptimierung beider erhaltenen Strukturen. Die MDS wurden für einen Zeitraum von 50 ns bzw. 100 ns bei 298 K (25 °C) und 333 K (60 °C) durchgeführt. Die erhaltenen *root mean square deviation* (RMSD) Werte der Cα - Atome und *root mean square fluctuation* (RMSF) Werte der Aminosäuren wurden mit Hilfe des Programmes Origin[®] 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)) ausgewertet.

3.) Resultate

3.1) Generierung und Charakterisierung thermoresistenter Varianten der Sm mTG

Im Nachfolgenden wird die Konstruktion, Produktion und Isolierung der thermoresistenten TG - Varianten beschrieben werden. Ebenfalls wird die partielle Charakterisierung der thermischen Resistenz der Varianten anhand ihrer Inaktivierungskinetiken bei 60 °C und der Entfaltungs- und Aggregationskinetik, sowie der daraus abgeleiteten Parameter erfolgen. Weitergehende Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses auf die Selbstquervernetzung wurden gemacht, um Einblicke in den thermischen Inaktivierungsmechanismus zu erhalten. Die pH - Stabilität und die chemische Stabilität wurde untersucht. Weiterhin erfolgte eine Bestimmung der spezifischen Aktivität bei 37 °C aller Varianten, sowie die Ermittlung kinetischer Parameter ausgewählter Varianten für das Dipeptid CBZ-Gln-Gly-OH (Standardsubstrat im Aktivitätstest nach [Folk und Cole, 1966]) und Untersuchungen zur Umsetzung eines proteinogenen Substrates.

3.1-1) Konstruktion thermoresistenter Sm mTG – Varianten durch gezielte Rekombination

Ziel des Versuches war es, thermoresistente Varianten der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (Sm mTG) zu konstruieren. Dazu sollte, basierend auf bereits publizierten Ergebnissen von Marx *et al.*, (2008) und Buettner *et al.*, (2012), eine gezielte Rekombination der Aminosäurepositionen S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y und K294L in der maturen Sequenz vorgenommen werden [Buettner *et al.*, 2012; Marx *et al.*, 2008b]. Da die S2P – Mutation nicht nur zur thermischen Resistenz, sondern auch zu einer erhöhten spezifischen Aktivität um den Faktor 1,8 führt [Marx *et al.*, 2008b], wurde die Mutation in allen Varianten beibehalten.

Die gezielte Kombination der identifizierten Aminosäurepositionen erfolgte *in vitro* mittels einer publizierten Methode nach [Engler *et al.*, 2009] (siehe 2.2-9, S. 26). Diese Methode, genannt *Golden Gate shuffling*, fußt auf der Nutzung der Restriktionsendonuklease *BsaI* (Typ II). Basierend auf dieser Methode wurde das codierende Gen für die mature mTG in sechs Fragmente unterteilt, um diese anschließend in Einzelansätzen gezielt miteinander zu rekombinieren. Bei der Auswahl der Fragmente war es zwingend erforderlich palindromische Überhänge zu vermeiden, da es sonst zu einer Selbstassemblierung der Fragmente kommen kann und somit unerwünschte Nebenprodukte in der Ligationsreaktion auftauchen.

Wie unter Abschnitt 2.2-9 (S. 26) geschildert, wurde zusätzlich die alkalische Phosphatase zu den jeweiligen *cut - ligation* Ansätzen gegeben, um eine Rezirkularisierung des Akzeptorvektors zu verhindern. Als Folge daraus minimierte sich der *screening* – Aufwand und pro Ansatz wurden jeweils vier Klone analysiert, wobei ausschließlich Klone mit *insert* gefunden wurden. Die erzeugten Konstrukte wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf die korrekte Assemblierung der Fragmente und auf eine fehlerfreie Sequenz analysiert.

Eine Darstellung der Aminosäuresequenz der Wt mTG und der Aminosäuresubstitutionen für die

Kombinationsvarianten ist in Tab. 8. 1 (Anhang 4, S. 133) aufgeführt. Die Konstrukte wurden beginnend von 03 bis 34 (pBSn mit n = 03 - 34) durchnummeriert. In Tab. 2. 5 (S. 20) sind die erzeugten Konstrukte mit den entsprechenden mTG – Varianten und einigen Merkmalen des Expressionsvektor dargestellt. Final erfolgte eine Transformation der Klonbibliothek (pBS – Konstrukte) in chemisch kompetente *E. coli* BL21 Gold (DE3).

3.1-2) Rekombinante Produktion und Reinigung der TGⁿ - Varianten

Im Folgenden sollte eine Strategie zur Reinigung der TGⁿ (n = 03 – 34) Varianten entwickelt werden, bei der ein paralleler Aufschluss der Biomasse und eine Isolierung der Enzyme erfolgen konnte. Dies sollte sowohl ein zeiteffizientes *screening* der 32 Varianten sicherstellen, als auch durch eine möglichst hohe Reinheit der Enzyme, die Qualität der im nachfolgenden aufzunehmenden Inaktivierungskinetiken sicherstellen. Die Produktion der TGⁿ – Varianten erfolgte nach dem Protokoll von [Studier, 2014]. Das Prinzip der Autoinduktion wird im Abschnitt 2.3-1 (S. 28) näher beschrieben.

Die Kultivierung der *E. coli* BL21 Gold (DE3)-pBSn (n = 03, 04, 05, ..., 34) erfolgte im 0,2 L Schüttelkolben Maßstab wie unter 2.3-1 (S. 28) beschrieben. Im Durchschnitt konnte dabei pro Stamm eine Biofeuchtmasse (BFM) von 1,5 - 1,7 g geerntet werden. Die Produktion der TGⁿ - Varianten wurde mittels SDS-PAGE als Ganzzellproben (1/OD - Proben) untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde festgestellt, dass es zu keiner Produktion der Variante TG⁰⁹ kam. Die Gründe hierfür wurden nicht untersucht. Da die Produktion der verbleibenden TG - Varianten jedoch erfolgreich verlief, wurden zunächst diese isoliert und charakterisiert. Im Abschnitt 4.4 (S. 96) der Diskussion wird erläutert warum es unwahrscheinlich ist, dass die Kombinationen der Aminosäuresubstitutionen der Variante TG⁰⁹ zu einer höheren thermischen Resistenz führt, als die beste Variante.

Der Aufschluss der TGⁿ – Varianten erfolgte wie unter 2.3-4 (S. 32) beschrieben enzymatisch (Lysozym) und mechanisch (Gefrier – Tau Zyklen). Der bei dieser Vorgehensweise geringere apparative Aufwand, ermöglichte einen parallelen Aufschluss von bis zu 6 Ansätzen. Die Effizienz des Aufschlusses wurde im Vorhinein durch Messung an freigesetztem Zellprotein mittels der Bradford Methode quantifiziert. Der Versuch wurde mit zwei Stämmen durchgeführt, bei der die TG⁰³ und TG⁰⁴ - Varianten nach der oben beschriebenen Methode produziert und aufgeschlossen wurden. Bereits nach dem dritten Gefrier-Tau Zyklus konnte keine wesentliche Freisetzung an weiteren Zellproteinen mehr detektiert werden (Abb. 3. 1 (A)). Das Ergebnis zeigt, dass zwischen 15-30 mg/mL Zellprotein aus 1,6 g BFM \triangleq 0,533 g BTM (0,3 * 1.6 g) freigesetzt werden konnten (Abb. 3. 1 (A)). Unter der Annahme, dass ca. 55 % des Gewichtes der BTM Proteine ausmachen, folgt daraus das: 533 mg * 0,55 = 293 mg an freigesetztem Protein möglich gewesen wären. Bei 30 mg freigesetztem Protein würde dies einer Effizienz von ~ 10 % entsprechen, d.h es wurden (theoretisch) etwa 10 % an möglichem Protein freigesetzt

Die Isolierung der TG⁰³ und TG⁰⁴ - Varianten aus dem Zellextrakt (nach Zentrifugation) mittels HisGraviTrap Säulen wurde ebenfalls verfolgt, um die Effizienz der Bindung und Elution der TG - Varianten an der Säule abschätzen zu können. Die gelelektrophoretische Analyse ist in Abb. 3. 1 (C) dargestellt. Sowohl für die TG⁰³ als auch für die TG⁰⁴ zeigt sich anhand der Bandenintensität, dass das Zielprotein (pro-TGⁿ-His₆) im Überstand (Ü) (Spur 1 und 6) ein Großteil der löslichen Fraktion darstellt. Wie in Spur 2 und 7 ersichtlich, führte die Aktivierung mittels Proteinase K (siehe Abschnitt 2.3-6, S. 33) zur vollständigen Prozessierung der pro-TG - Varianten. Die Bindungskapazität des Säulenmaterials für die aktivierte TG erwies sich als ausreichend, da kein Zielprotein im Durchfluss (D) (Fraktion an ungebundenen Protein nach Auftragen des Überstandes und Passage durch die Säule) zu erkennen ist (Spur 3 und 8). Im Anschluss erfolgte die Analyse der Eluierbarkeit der immobilisierten TG - Varianten von der Säule. Hierfür wurde die volumetrische Aktivität (A_v) in den einzelnen Elutionsfraktionen (V ~ 1 mL) bestimmt, um das Elutionsverhalten zu verfolgen (siehe Abb. 3. 1 (B)). Für die Reinigung der TG⁰³ wurde eine volumetrische Aktivität (A_v) von insgesamt 1785 U/mL berechnet und für die Reinigung der TG⁰⁴ wurden 2924 U/mL berechnet. In beiden Fällen wurden die Fraktionen 2, 3 und 4 vereinigt, was einer A_v von 1687 U/mL (~ 95 %) bzw. 2924 U/mL (~ 98 %) für die TG⁰³ respektive TG⁰⁴ entsprach. Nachfolgend wurden diese Fraktionen in der Dialyse bei 4 °C zur Präzipitation des Enzyms verwendet und entsprechend Abschnitt 2.3-9 (S. 34) aufgearbeitet und gelagert. Eine anschließende gelelektrophoretische Analyse des solubilisierten Enzyms (aus dem Präzipitat) zeigt in dem Coomassie gefärbten Gel (siehe Abb. 3. 1 (C), Spur 4 und 9), dass die Isolierung der TG - Varianten bis zur chromatographischen Bandenreinheit erfolgte.

Abschließend lässt sich sagen, dass trotz der schlechten Effizienz des Aufschlusses die Menge an freigesetzter pro-mTG ausreichte, um ausreichend aktivierte mTG mit entsprechender Reinheit zu isolieren. Trotz der vergleichsweise hohen Verluste beim Aufschluss (~ 10 %), wurde die verwendete Vorgehensweise aufgrund des wesentlich geringeren Zeitaufwandes als sinnvoll erachtet und alle TG - Varianten (bis auf die TG⁰⁹) konnten nach diesem Schema bis zur elektrophoretischen Bandenreinheit isoliert werden.

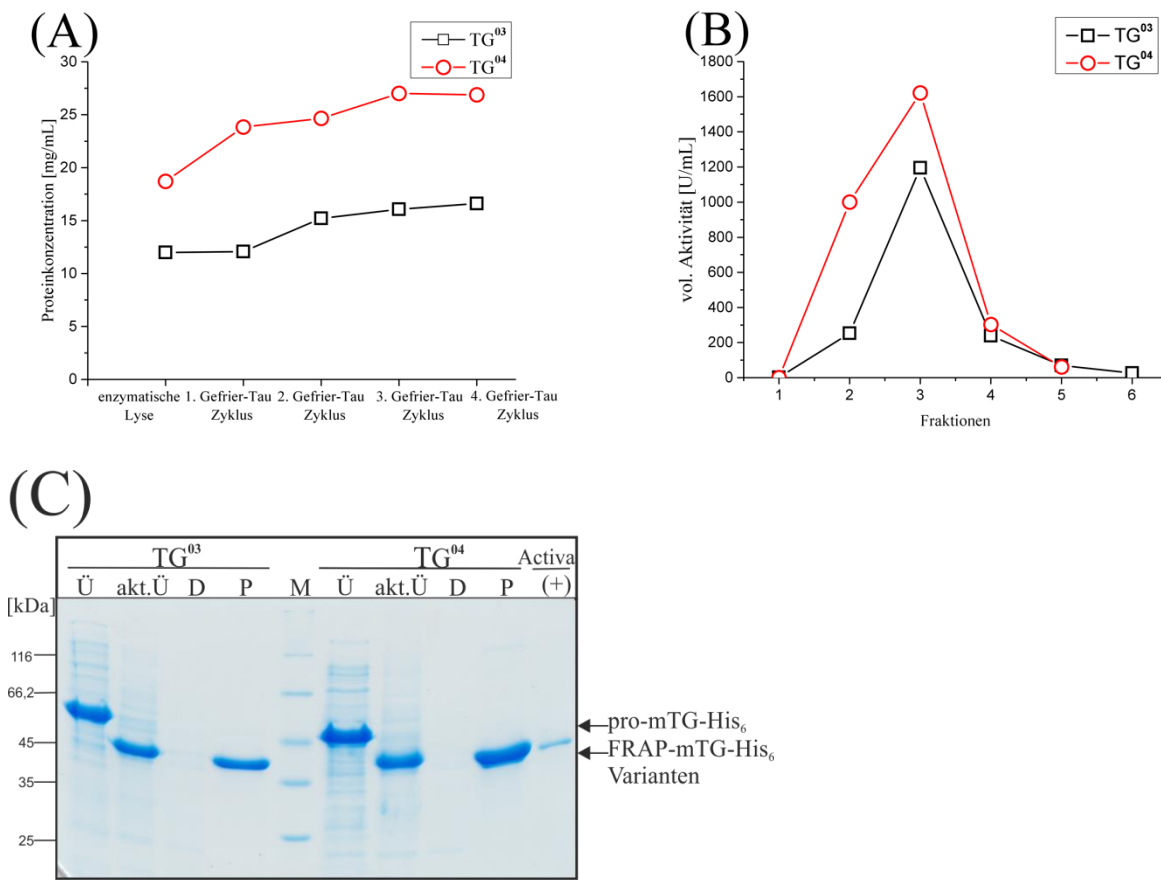


Abb. 3. 1) Quantifizierung an freigesetzten Zellprotein nach enzymatischer Lyse und Gefrier-Tau Zyklen (A), des Reinigungsverlaufes mittels HisGravi Trap Säulen (B) und gelelektrophoretische Auftrennung eines Reinigungsansatzes mittels HisGravi Trap Säulen am Beispiel der Varianten TG⁰³ und TG⁰⁴.

(A) Quantifizierung an freigesetztem Zellprotein im Rahmen der Reinigung der TG⁰³ und TG⁰⁴ – Variante mittels Bradford Methode.

(B) Volumetrische Aktivität der Elutionsfraktionen der Reinigung von TG⁰³ und TG⁰⁴ mittels HisGravi Trap Säulen.

(C) Denaturierende PAGE Analyse der Testreinigung der TG - Varianten TG⁰³ und TG⁰⁴ mittel HisGravi Trap Säulen.

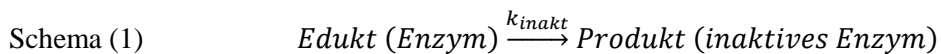
Ü... Überstand, akt. Ü ... mit Proteinase K behandelter Überstand, D... Durchfluss, P...solubilisiertes Pellet nach Dialyse, (+) ... positiv – Kontrolle solubilisierter Activa® WM

3.1-3) Charakterisierung der TGⁿ - Varianten in Bezug zur thermischen Resistenz: Bestimmung der Halbwertszeiten (60 °C) und Aufnahme von Entfaltungskurven zur Bestimmung des Schmelzübergangs und der Aggregationskinetik

Die Ermittlung der Halbwertszeit der isolierten TG - Varianten erfolgte wie unter Abschnitt 2.4-5 (S. 38) beschrieben. Um den Einfluss der Enzymkonzentration auf die Bestimmung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) zu eruieren, wurden zunächst Inaktivierungskinetiken am Beispiel der rekombinanten Wt mTG im Konzentrationsbereich von 0,1 - 3 mg/mL analysiert. Erwartungsgemäß zeigte sich mit Abnahme der Proteinkonzentration ein höheres Signal-Rauschverhältnis, welches die Auswertung von Inaktivierungskinetiken bei 0,1 mg/mL stark fehlerbehaftet werden lässt (siehe Anhang 5, Abb.8. 4, S. 145). Eine Auswertung im Bereich von 0,3 - 3 mg/mL führt jedoch zu ermittelten Halbwertszeiten, von jeweils 1,9 min (3 mg/mL und 0,3 mg/mL) und sind somit vergleichbar. In den folgenden Experimenten zur Inaktivierung wurde daher entschieden eine Mindestkonzentration von 0,3 mg/mL Enzym für die

Inaktivierungskinetiken zu verwenden.

Für jede TG - Variante wurde einmalig eine Inaktivierungskinetik bei 60 °C mit jeweils zwei technischen Replikaten pro Zeitpunkt aufgenommen. In Abb. 3. 3 (A) (S. 53) ist für die in der vorliegenden Arbeit aufgenommenen Inaktivierungen eine repräsentative Kinetik am Beispiel der Variante TG¹⁶ dargestellt. Die Kinetik der Inaktivierung folgt dem Modell eines exponentiellen Zerfalls erster Ordnung, was an der guten Übereinstimmung der Datenpunkte zur Anpassung ersichtlich ist (R^2 – Werte zwischen 0,97 – 0,99) (siehe Abb. 3. 3 (A), S. 53). Die Möglichkeit der Anpassung nach einem exponentiellen Zerfall erster Ordnung, zeigt die unimolekulare Umwandlung des aktiven Enzyms in ein inaktives Enzym, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration an aktivem Enzym ist.



k_{inakt} ... Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung

Durch die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Geschwindigkeitskonstante lässt sich die Halbwertszeit wie unter Abschnitt 2.4-5 (S. 38) berechnen. Eine Übersicht der ermittelten Halbwertszeiten für die TG - Varianten ist in Tab. 3. 1 dargestellt (S. 51). Vergleichend zu den TGⁿ – Varianten wurde ebenfalls die Halbwertszeit für die UH308-B (thermoresistente, publizierte Variante; [Buettner *et al.*, 2012]) und die rekombinante Wt mTG ermittelt. Es ist anzumerken, dass die publizierte Variante mTG(S2P) der TG⁰⁴ Variante entspricht. Für die Varianten TG¹⁶, TG¹², TG⁰⁴, Wt mTG und der UH308-B wurden die Halbwertszeiten in drei individuellen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ermittelt.

Die gemessenen Halbwertszeiten der TGⁿ - Varianten zeigen, dass die thermische Resistenz im Bezug zum Wild Typ für alle Varianten erhöht werden konnte. Im Besonderen konnte eine Steigerung der Halbwertszeit um den Faktor 15,6 und 18,8 für die Variante TG¹² mit 31,51 min respektive TG¹⁶ mit 37,97 min bei 60 °C ermittelt werden. Weiterhin scheint es, dass der Beitrag der Aminosäuresubstitutionen kein simpler additiver Effekt ist, vergleicht man die Kombinationsvarianten mit den Einzelmutanten (siehe Tab. 3. 1, S. 51). Die konsequente Kombination der einzelnen Aminosäuresubstitutionen lässt ebenfalls einen direkten Vergleich der Einzelaustausche zu. So weisen die besten 50 % aller TG - Varianten die Substitutionen S23Y und Y24N und zeigen somit den hohen Einfluss dieser Substitutionen auf eine verbesserte thermische Resistenz. Auch die Substitutionen K294L und H289Y scheinen in den Kombinationsvarianten einen eher positiven Effekt auf die thermische Resistenz zu haben. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von [Buettner *et al.*, 2012].

Im Gegensatz hierzu scheinen sich die Mutationen K269S und G257S eher neutral bis negativ in Kombinationen mit anderen Mutationen zu verhalten. So hat die TG⁰⁴(S2P) eine Halbwertszeit von 3,9 min bei 60 °C, während die Halbwertszeit der Varianten TG²³(S2P, G257S) und TG²¹(S2P, G257S, K269S) mit 3,7 respektive 3,9 schlechter ist bzw. gleichbleibt. Varianten mit der Substitution G257S gehören

ausschließlich zu den untersten 50 % und führen in Kombinationen mit anderen Substitutionen zu einer verringerten thermischen Resistenz. Die Effekte der einzelnen Aminosäuresubstitutionen werden in der Diskussion unter Abschnitt 4.4 (S. 96) näher betrachtet.

Neben der Halbwertszeit wurden für alle Varianten Temperatur - Übergangskurven, hier und im Folgenden als Übergangskurven bezeichnet, mittels *nano differential scanning calorimetry* (nDSF) bestimmt (siehe Abschnitt 2.4-6, S. 39). Mittels Übergangskurven von Proteinen können Informationen über Parameter wie Schmelzpunkte (T_M), den Beginn der Entfaltung (*onset temperature*, T_{on}) oder die Reversibilität des Entfaltungsvorganges eines Proteins erhalten werden. Der T_M wird auch als Umschlagspunkt der Übergangskurven bezeichnet und gibt den Punkt an, bei dem 50 % der Proteine im ungefalteten Zustand vorliegen. Zur Aufnahme der Übergangskurven wurde die Änderung der intrinsischen Tryptophan Fluoreszenz gemessen. Die Messmethode beruht also weder auf der Aktivität des Proteins noch werden spezielle Farbstoffe als Marker benötigt, um die Entfaltung detektieren zu können. Die ermittelten T_M und T_{on} Werte für die TG - Varianten sind ebenfalls in Tab. 3.1 (S. 51) dargestellt. Die Ergebnisse zur Bestimmung des T_M - Wertes korrelieren mit den Ergebnissen der Halbwertszeiten und untermauern die ermittelte Reihenfolge zur thermischen Resistenz der TG - Varianten.

Beispielhaft sind die Übergangskurven für den Wt, der TG⁰⁴(S2P) und der TG¹⁶ in Abb. 3. 2 (A und B) dargestellt. Sowohl in der Verschiebung des T_M - Wertes als auch in der Form der Übergangskurven lassen sich Unterschiede erkennen.

Erwartungsgemäß kam es zu einer Erhöhung des T_M - Wertes aufsteigend von der Wt mTG mit 58,1 °C zur TG⁰⁴(S2P) mit 59,8 °C bis zur TG¹⁶ mit 65,9 °C. Die Differenz von 7,9 °C des T_M - Wertes zwischen Wt mTG und TG¹⁶ bestätigt die Ergebnisse der ermittelten Halbwertszeiten und der erhöhten thermischen Resistenz. Ebenfalls konnten keine isolierbaren Faltungsintermediate detektiert werden, welche sich in einem zusätzlichen Übergang äußern würden. Dies ist im Einklang zum dargestellten Schema (1) (S. 48) und untermauert die Auswertung des Inaktivierungsmechanismus hinsichtlich einer unimolekularen Reaktion pseudo-erster Ordnung.

Ausgehend von der Form der Kurven lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf den Entfaltungsvorgang ziehen. Vergleicht man in Abb. 3. 2 (B) die Peakhöhe und -breite, so zeigt sich, dass mit Zunahme des T_M auch die Peakhöhe zunimmt und gleichzeitig die Peakbreite abnimmt. Zusammen mit der später einsetzenden Entfaltung, spiegelt der schärfere Temperaturübergang eine höhere Kooperativität und/oder Rigidität der Struktur wider. Dies spricht im Allgemeinen für eine thermodynamische Stabilisierung, welche typischerweise mit der Erhöhung des T_M - Wertes einhergeht (Handbuch des nanoDSF, FAQ, Data Analysis V01_2016-01-11). Es ist daher anzunehmen, dass die Stabilisierung der Varianten zumindest zum Teil thermodynamisch erfolgt.

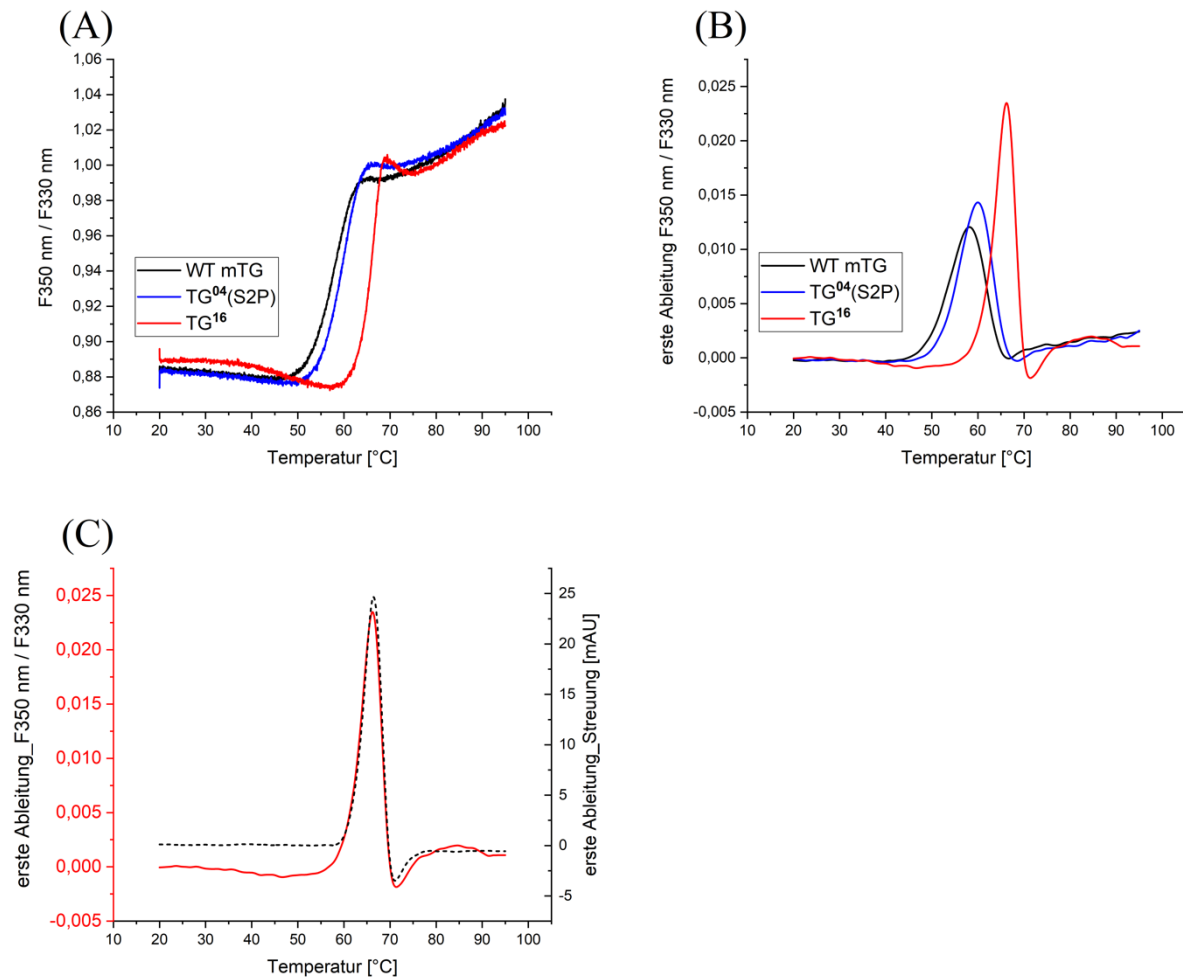


Abb. 3. 2) Entfaltungskurven der Wt mTG, TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶ und Aggregationsverhalten der TG¹⁶.

(A) Vergleichende Darstellung der Entfaltungskurven der Wt mTG (schwarze Linie), der TG⁰⁴(S2P) (blaue Linie) und der TG¹⁶ (rote Linie) und dessen erste Ableitung (B).

(C) Vergleich der thermisch induzierten Entfaltung (Rote, durchgehende Linie) und Aggregation (Schwarz, gestrichelt Linie) der TG¹⁶.

Die Enzymkonzentration der TG¹⁶ betrug 1 mg/mL in 0,02 M Phosphatpuffer (pH = 7). Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit einer Heizrate von 1 °C/min. Der untersuchte Temperaturbereich betrug 20 °C – 95 °C.

Exemplarisch wurde die Reversibilität der rekombinanten Wt mTG, der TG⁰⁴(S2P) und der TG¹⁶ untersucht, indem nach dem Aufheizen von 95 °C wieder auf 25 °C gekühlt wurde. Bei Reversibilität der Entfaltung kommt es zum Rückfalten des Proteins während des Abkühlvorgangs. Dabei ist die Übergangskurve der Rückfaltung entweder identisch zur Entfaltungskurve (vollständige Reversibilität) oder unterscheidet sich bei unvollständiger Reversibilität von dieser. Für die oben genannten Varianten kam es erwartungsgemäß zu keiner Rückfaltung, was die Auswertung nach dem Modell pseudo - erster Ordnung untermauert.

Neben der Rückfaltung war es ebenfalls möglich die Kinetik der Aggregation durch spezielle Reflektionsoptiken zu verfolgen. Dabei wird die Abschwächung des Lichtsignals durch Streuung (im Bereich von >25 nm Partikeln) detektiert und in *milli Attenuation Units* (mAU) angegeben. Mit Hilfe der

Reflektionsoptik lässt sich der Startpunkt der Aggregation (T_{ogg}) während der Entfaltung detektieren und eine qualitative Aussage über die zu messende Probe hinsichtlich des Anteils an größeren Aggregaten tätigen. Bei einem Signal von 70-100 mAU, welches dem Wasserwert entspricht, ist der Anteil an Aggregaten in der Probe zu vernachlässigen.

Die Aggregations- und Entfaltungskinetik für die TG¹⁶ ist exemplarisch für alle weiteren TGⁿ – Varianten in Abb. 3. 2 (C) dargestellt. Vergleicht man die Aggregationskinetik mit der Entfaltung, so lässt sich ein kongruentes Verhalten erkennen, d.h. die Entfaltung der mTG geht mit der Bildung von Aggregaten einher. Das kongruente Verhalten zwischen Aggregation und Entfaltung zeigt eine frühzeitige Aggregation der mTG während der Entfaltung auf. Dies impliziert, im Rahmen der Detektionsmöglichkeiten des Gerätes (Zeitauflösung im Sekundenbereich), dass die Entfaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und unterstützt die Auswertung der Inaktivierung pseudo – erster Ordnung.

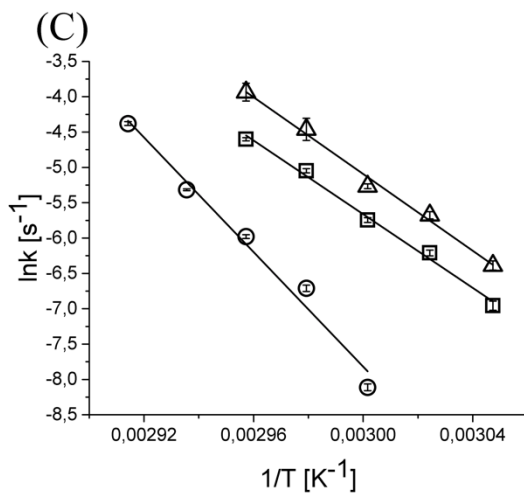
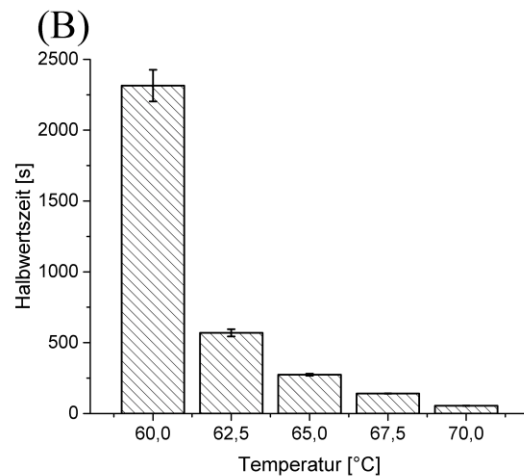
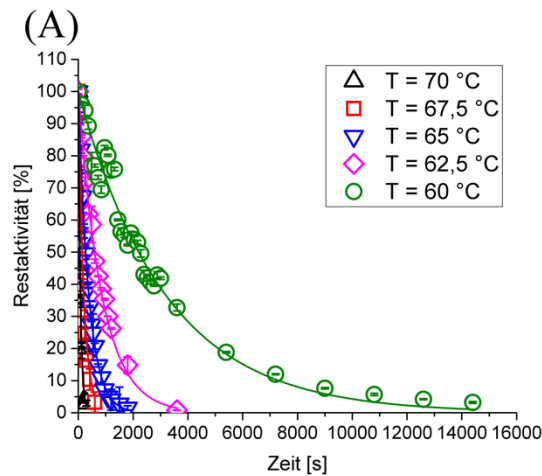
Tab. 3. 1) Halbwertszeiten (60 °C) und spezifische Aktivitäten (Aspez) der TGⁿ - Varianten, Wt mTG und der UH308-B. Die Auflistung der Varianten erfolgt in absteigender Reihenfolge bezüglich der ermittelten Halbwertszeiten.

Varianten	Aminosäureaustausch	$t_{1/2}$ (60 °C) [min]	Faktor	T_{on} [°C]	T_M [°C]
TG ¹⁶	S2P, S23Y-Y24N, H289Y, K294L	37,97*(1,03)	18,8	59,9*	65,9
TG ¹²	S2P, S23Y-Y24N, K269S, H289Y, K294L	31,51*(1,3)	15,6	59,6	64,6
TG ¹⁸	S2P, S23Y-Y24N, K294L	28,9	14,3	58,3	64,3
TG ⁰⁸	S2P, S23Y-Y24N, G257S, H289Y, K294L	25,70	12,7	58,7	64,3
TG ¹⁴	S2P, S23Y-Y24N, K269S, K294L	24,7	12,2	59,1	64,6
TG ⁰³	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y, K294L	21,47	10,6	58,8	63,6
TG ¹⁰	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K294L	21,23	10,5	55,9	63,2
TG ⁰⁶	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, K294L	17,27	8,55	57,7	63,2
UH308-B	S2P, S23V-Y24N, K294L	15,97*(0,54)	7,91	n.b.	n.b.
TG ¹³	S2P, S23Y-Y24N, K269S, H289Y	15,43	7,64	57,3	63,7
TG ¹⁷	S2P, S23Y-Y24N, H289Y	14,88	7,37	57,2	64,4
TG ¹⁵	S2P, S23Y-Y24N, K269S	12,3	6,09	56,6	63,8
TG ¹¹	S2P, S23Y-Y24N, G257S	11,36	5,62	55,3	63,3
TG ⁰⁵	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y	10,88	5,39	56,9	62,6
TG ¹⁹	S2P, S23Y-Y24N	10,4	5,15	56,4	64,3
TG ³²	S2P, H289Y, K294L	9,7	4,80	56,1	63,1
TG ⁰⁷	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S	9,32	4,61	55,9	62,4
TG ²⁸	S2P, K269S, H289Y, K294L	8,5	4,21	55,4	63,0
TG ²⁴	S2P, G257S, H289Y, K294L	8,4	4,16	55,3	62,6

TG ³⁴	S2P, K294L	7,5	3,71	54,6	62,6
TG ²⁶	S2P, G257S, K294L	7,0	3,47	54,7	62,4
TG ²⁰	S2P, G257S, K269S, H289Y, K294L	6,9	3,42	55,6	62,0
TG ³⁰	S2P, K269S, K294L	6,7	3,32	55,0	62,5
TG ²²	S2P, G257S, K269S, K294L	5,8	2,87	54,2	61,7
TG ³³	S2P, H289Y	5,2	2,57	52,9	60,5
TG ²⁹	S2P, K269S, H289Y	4,8	2,38	53,2	60,9
TG ³¹	S2P, K269S	4,2	2,08	52,1	60,2
TG ²⁵	S2P, G257S, H289Y	4,1	2,03	52,3	60,1
TG ⁰⁴	S2P	3,92* (0,2)	1,94	51,4	59,8
TG ²¹	S2P, G257S, K269S, H289Y	3,9	1,93	52,1	60,1
TG ²³	S2P, G257S, K269S	3,7	1,83	51,0	59,7
TG ²⁷	S2P, G257S	3,4	1,68	51,0	59,6
Wt mTG	-----	2,02* (0,2)	1,00	48,1	58,1

* $t_{1/2}$ und Aspez wurden in biologischen Triplikaten mit jeweils 2 technischen Duplikaten ermittelt (in Klammern gesetzte Werte geben die Standardabweichung an), alle weiteren Aspez und $t_{1/2}$ in technischen Duplikaten. Für die T_M - Werte der TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und Wt mTG erfolgte eine Doppelbestimmung, für alle restlichen Varianten erfolgte eine Einfachbestimmung. n.b. ... nicht bestimmt

Neben der thermischen Resistenz bei 60 °C wurden Inaktivierungskinetiken für Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C für die Varianten TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶ und der Wt mTG bestimmt. Aus den daraus erhaltenen Kinetiken konnten die entsprechenden Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten (k_{inakt} , siehe Schema 1, S. 48) der Inaktivierung berechnet (Formel zur Berechnung siehe 2.4-5, S. 38) werden. Bei semi-logarithmischer Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen das Reziprok der Temperatur lässt sich die Inaktivierungsenergie (iE_A) berechnen (Formel zur Berechnung siehe 2.4-5, S. 38). Die ermittelten iE_A sind in Abb. 3. 3 für die Varianten TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶, sowie der Wt mTG in der Tab. 3. 2 aufgeführt. Abb. 3. 3 (A) zeigt exemplarisch für die TG¹⁶ die Primärplots zur Ermittlung der Halbwertszeiten (Abb. 3. 3 (B)) und Geschwindigkeitskonstanten. Abb. 3. 3(C) zeigt die resultierenden Arrheniusplots für die Varianten TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶, sowie der Wt mTG. Eine tabellarische Zusammenfassung der berechneten Parameter ist im Anhang 6 (Tab. 8. 2, S. 145) aufgeführt.



Tab. 3. 2) Ermittelte Inaktivierungsenergien der Wt mTG und der Varianten TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶.

mTG	iE _A [kJ/mol]	SD [kJ/mol]
Wt	228,6	(+/- 0,03)
TG ⁰⁴	219,5	(+/- 0,03)
TG ¹⁶	339,9	(+/- 0,03)

Abb. 3. 3) Darstellung der Inaktivierungskinetiken (Primärplots) der TG¹⁶(A), der daraus berechneten Halbwertszeiten (B) und der Arrheniusplot (Sekundärplot) für die der Wt mTG, TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶ (C).

(A) Darstellung der erhaltenen Inaktivierungskinetiken der TG¹⁶ für die Temperaturen 60 °C, 62,5 °C, 65 °C, 67,5 °C und 70 °C
 (B) Vergleichende Darstellung der ermittelten Halbwertszeiten der TG¹⁶ für die Temperaturen 60 °C, 62,5 °C, 65 °C, 67,5 °C und 70 °C.

(C) Arrheniusplot der Wt mTG (leeres Dreieck), der TG⁰⁴(S2P) (leere Quadrate) und der TG¹⁶ (leere Kreise). Die Enzymkonzentration der Varianten und der Wt mTG betrug 0,3 mg/mL. Die Enzymlösung wurde in PCR-Gefäßen vorgelegt und im Heizblock eines Thermocycler bei 37 bzw. 50 °C vorinkubiert für t = 3-5 min und anschließend für t = X min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Nach Ablauf von t = x min wurden diese sofort auf Eis abgekühlt, um die Inaktivierung zu beenden. Nach Zentrifugation für 3 min bei ~2000 g wurde der Standardhydroxamattest durchgeführt: 140 µL Substratlösung + 10 µL Enzymlösung für t = 10 min bei 37 °C im Thermomixer (1,5 mL Reaktionsgefäße). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µL Stoppreagenz abgestoppt und anschließend für 1,5 min bei 16.100 g zentrifugiert Die A525-Werte wurden am FLUOstar Galaxy (BMG) aufgenommen.

Die Auswertung der Inaktivierungskinetiken zur Bestimmung der Halbwertszeiten und der Geschwindigkeitskonstanten, sowie die Darstellung des Arrheniusplot erfolgten mit Hilfe des Programmes Origin® 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)). Die Aufnahme der Inaktivierungskinetiken erfolgte in Doppelbestimmung mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Die Inaktivierungskinetiken am Beispiel der TG¹⁶ (Abb. 3. 3 (A)) zeigen, dass die Datenpunkte in dem ausgewählten Temperaturbereich hinreichend einer Exponentialfunktion folgen. Der drastische Abfall der Halbwertszeit mit zunehmender Temperatur (Abb. 3. 3 (B)) spiegelt die hohe Sensitivität der Enzyme gegenüber einer Temperaturerhöhung wider. Bereits bei einer Temperaturerhöhung um 2,5 °C reduziert sich die Halbwertszeit nahezu um den Faktor 5 (siehe Abb. 3. 3 (B)) und macht deutlich, wie wichtig die Einhaltung der Reaktionstemperatur in späteren Prozessen ist.

Die erhaltenen Datenpunkte der Arrheniusplots für die Wt mTG, der TG⁰⁴ und der TG¹⁶ zeigen in dem gewählten Temperaturbereich eine gute Übereinstimmung mit der linearen Regressionsfunktion (siehe Abb. 3. 3 (C), $R^2 \geq 0,98$). Die aus der Steigung ermittelten Inaktivierungsenergien sind in Tab. 8. 2 aufgeführt und zeigen mit 228,6 respektive 219,5 kJ/mol ähnliche Inaktivierungsenergien für die Wt mTG und der TG⁰⁴(S2P) auf. Die Inaktivierungsenergie gibt nach der Theorie des Übergangs (*transition state theory*, TST) die Energie an, die in diesem Fall benötigt wird, um die Energiebarriere zur Inaktivierung des Enzyms zu überwinden. Eine erhöhte Resistenz gegenüber thermischer Inaktivierung, gemessen an der Inaktivierungsenergie, konnte für die TG⁰⁴(S2P) also nicht gemessen werden. Im Vergleich hierzu, zeigt die TG¹⁶ eine deutlich erhöhte Inaktivierungsenergie im Vergleich zur Wt mTG und bestätigt somit die, durch $t_{1/2}$ - und T_M -Werte ermittelte, erhöhte thermische Resistenz.

3.1-4) Untersuchungen zum thermischen Inaktivierungsmechanismus der mTG

Die in der Literatur gängige Auswertung der thermischen Inaktivierung von Transglutaminasen nach dem Model pseudo - erster Ordnung [Cui *et al.*, 2008; Menéndez *et al.*, 2006; de Souza *et al.*, 2009] erwies sich auch in der vorliegenden Arbeit als geeignet. So zeigte sich anhand von R^2 – Werten, welcher ein Ausdruck der Übereinstimmung der Anpassungsfunktion an die experimentell ermittelten Datenpunkte darstellt, eine sehr gute Übereinstimmung (R^2 – Werte zwischen 0,97 – 0,99). Eine genaue Betrachtung erfolgte bisher jedoch selten in der Literatur.

Durch die unter 3.1-3 dargestellten Ergebnisse war bekannt, dass es bereits frühzeitig in der Entfaltung der Wt mTG und der TGⁿ - Varianten zur messbaren Aggregation kommt (siehe Abschnitt 3.1-3, Abb. 3. 2 (C), S. 50). Diese Aggregate „halten“ das Enzym in einem nicht reversiblen, inaktiven Zustand. Gleichzeitig wird die Population des ungefalteten Zustandes verhindert, wodurch die Auswertung nach Schema 1 (S. 48) erfolgen kann. Aufgrund der Quervernetzungsaktivität des Enzyms kann die Aggregation durch die intrinsische Aktivität (Selbstquervernetzung) oder durch die ungerichtete Zusammenlagerung freiwerdender hydrophober Bereiche erfolgen. Eine Kombination beider Effekte wäre ebenfalls möglich. Um den Einfluss der Aktivität auf das Aggregationsverhalten zu untersuchen, wurden Übergangskurven der aktiven TG¹⁶ mit denen einer inaktiven Variante (TG¹⁶:C64S) bzw. einer durch Iodacetamid inhibierten TG¹⁶ (TG¹⁶:IA) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3. 4 dargestellt.

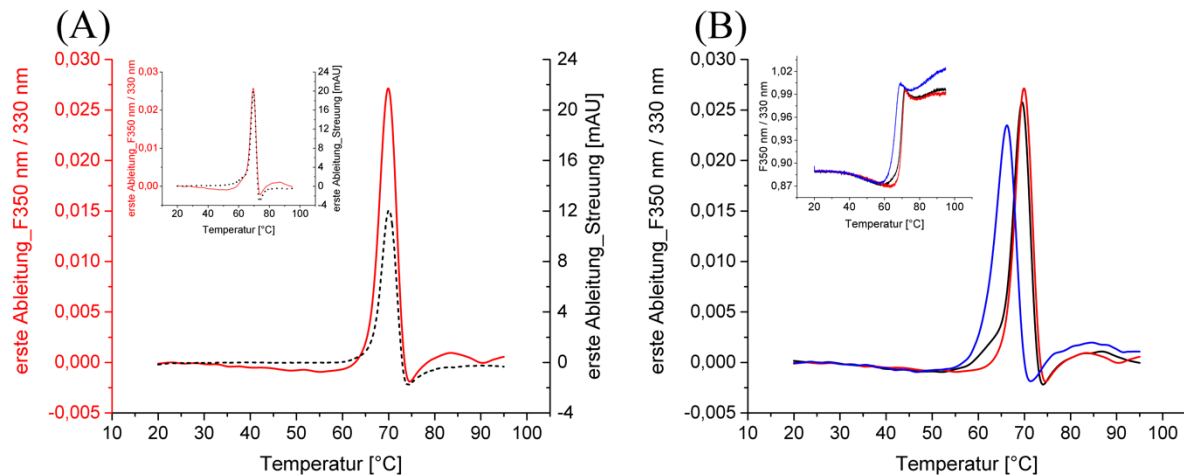


Abb. 3. 4) Temperaturübergangskurven und Streuungssignal der TGⁿ – Varianten.

(A) Vergleichende Darstellung der Temperaturübergangskurve (rote, durchgehende Linie) und des Streuungssignal (schwarze, gestrichelt Linie). Die Variante TG¹⁶:C64S ist die Hauptdarstellung und das eingefügte Diagramm zeigt die TG¹⁶:IA

(B) Darstellung der Temperaturübergangskurven der TG¹⁶ (blaue Linie), der TG¹⁶:C64S (rote Linie) und der TG¹⁶:IA (schwarze Linie). Das eingefügte Diagramm (*inset*) zeigt den Primärplot, bei der das Verhältnis aus den Wellenlängen bei 350 und 330 nm abgebildet wird (F350/F330).

Die Enzymkonzentration der verwendeten Varianten betrug 1 mg/mL in 0,02 M Phosphatpuffer (pH = 7). Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit einer Heizrate von 1 °C/min in einem Temperaturbereich von 20 °C – 95 °C. Die Aufnahme der Übergangskurven erfolgte in Doppelbestimmung.

Tab. 3. 3) Darstellung der ermittelten T_{on} und T_M - Werte für die TG¹⁶, TG¹⁶:C64S und TG¹⁶:IA. Die Inhibierung der TG¹⁶:IA erfolgte mit einer finalen IA Konzentration von 1 mM bei einer Enzymkonzentration von 1 mg/mL in 0,02 M Phosphatpuffer (pH = 7).

Variante	T _{on} [°C]	T _M [°C]
TG ¹⁶	58,6 / 58,7	65,9 / 65,9
TG ¹⁶ :C64S	65,6 / 65,5	69,6 / 69,7
TG ¹⁶ :IA	64,8 / 64,8	69,3 / 69,2

Abb. 3. 4 (A) zeigt vergleichend die erste Ableitung der Temperaturübergangskurve (rote, durchgehende Linie) und des Streuungssignals (schwarze, gestrichelte Linie) für die Variante TG¹⁶:C64S. Die Variante TG¹⁶:IA ist als *inlet* im Diagramm angezeigt. In beiden Fällen zeigt sich ein vergleichbares Aggregationsverhalten zur TG¹⁶, bei der mit Beginn der Entfaltung auch die Aggregation einsetzt. Demzufolge kommt es trotz fehlender Aktivität zur Aggregation, was eine ausschließlich durch die Aktivität verursachte Aggregation ausschließt. Die in diesem Fall detektierte Aggregation dürfte eine Folge der Zusammenlagerung exponierter, hydrophober Bereiche durch Entfaltung sein.

Überraschenderweise zeigte sich eine Schmelzpunktverschiebung der inaktiven Varianten hin zu höheren Temperaturen, wobei beide inaktive Varianten einen vergleichbaren T_M aufweisen (siehe Tab. 3. 3). Es scheint, dass die Aktivität der mTG einen Einfluss auf die thermische Resistenz hat, welche sich in der Verschiebung der Schmelzpunkte zu höheren Temperaturen äußert.

Da die Quervernetzungsaktivität der mTG zu hochmolekularen Produkten führen sollte, wurde eine denaturierende PAGE - Analyse zur Detektion dieser genutzt. Zur Analyse wurde die TG¹⁶ bei 65 °C inkubiert und Proben zu den Zeitpunkten t = 0 und t = 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min entnommen und die Quervernetzungsreaktion in vorgeheizten Probenpuffer bei 95 °C gestoppt. Durch die reduzierenden und denaturierenden Bedingungen im Probenpuffer, sollten nur kovalent verbrückte Aggregate und das entsprechende Monomer vorkommen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 3. 5 (A) dargestellt.

Die PAGE – Analyse zeigt das Vorkommen von hochmolekularen Produkten (*high molecular weight products*, HMW) im Bereich von 65 - 120 kDa. Ebenfalls ist das Monomer der TG¹⁶ mit einem Molekulargewicht von 38,9 kDa ersichtlich. Interessanterweise zeigt sich mit fortschreitender Inkubation bei 65 °C die Akkumulation einer dominanten Spezies mit einer höheren elektrophoretischen Mobilität als die Monomerbande (Spur 1, Kontrolle bei Zeitpunkt t = 0 min). Das gleiche Quervernetzungsprodukt konnte ebenfalls für die Wt mTG und die TG⁰⁴(S2P) detektiert werden (Daten hier nicht gezeigt). Da die Spezies mit der höheren elektrophoretischen Mobilität zum Zeitpunkt t = 0 min fehlt, handelt es sich entweder um ein mögliches Quervernetzungsprodukt, entstanden aus einer partiellen Auffaltung der TG¹⁶ gefolgt von einer intramolekularen Quervernetzung, oder um einen partiellen Abbau der TG¹⁶, z.B. aufgrund proteolytischer Aktivitäten.

Ein partieller Abbau der TG¹⁶ konnte experimentell ausgeschlossen werden (siehe (I) – (IV)).

- (I) Durch eine massenspektrometrische Analyse konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus mit der FRAP - Extension vor und nach Hitzebehandlung (T = 60 °C) unverändert vorlag. Dementsprechend konnte TG¹⁶ identifiziert werden und der N - Terminus war nicht betroffen. Der C - Terminus konnte in seiner zu erwartenden AS - Sequenz nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Proteinogene Verunreinigungen, im speziellen durch andere Proteasen, konnten nicht nachgewiesen werden.
- (II) Bei Abbau des C - Terminus liegt die Vermutung nahe, dass der C - terminale LE - His₆ tag ebenfalls betroffen ist. Aufgrund dessen wurde eine affinitätschromatographische Reinigung entsprechend 2.3-7 durchgeführt an einer bei 60 °C und 30 min inkubierten TG¹⁶, um zu sehen ob das verkürzte TG¹⁶ - Produkt weiterhin an dem Ni - NTA - Material bindet. Bei einer fehlenden Bindung, z.B. aufgrund des proteolytischen Abbaus, befände sich das TG¹⁶ - Produkt im „Durchfluss“ nach Passage der Probe durch die HisGraviTrap - Säule. Anhand einer gelelektrophoretischen Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass das TG¹⁶ - Produkt weiterhin vollständig am Säulenmaterial immobilisiert bzw. nachfolgend eluiert werden konnte. Der LE - His₆ tag verblieb also funktional am C - Terminus und wurde nicht abgespalten (Daten nicht gezeigt).

- (III) Durch Zugabe von Proteinase K (1 ng/mL - 1 mg/mL) zu aktiver TG¹⁶ (1mg/mL) wurde das Abbaumuster mittels gelelektrophoretischer Analyse untersucht. Der Abbau durch die Proteinase K führte nicht zu der beschriebenen distinkten Bande (TG¹⁶ - Produkt) wie diese in Abb. 3. 5 zu sehen ist (Daten nicht gezeigt).
- (IV) Die Bildung des TG¹⁶ - Produktes konnte ebenfalls nicht für die TG¹⁶:C64S und TG¹⁶:IA nachgewiesen werden. Die Bildung ist dementsprechend von der Quervernetzungsaktivität abhängig (Daten nicht gezeigt) und nicht durch mögliche Verunreinigungen von anderen, spezifischeren Proteasen als die Proteinase K zu erklären.

Das entstandene intramolekulare Quervernetzungsprodukt wird hier und im Folgenden als xTG (x = intramolekular quervernetzt) bezeichnet, um dieses von den hochmolekularen Produkten (HMW, intermolekulare Quervernetzung) zu unterscheiden.

Neben dem Vorkommen der xTG ist es umso erstaunlicher, dass dieses Quervernetzungsprodukt über die Zeit in signifikanten Mengen gegenüber den restlichen Quervernetzungsprodukten akkumuliert und nicht oder nur in einem geringen Maß in den nachfolgenden Reaktionen weiter als Substrat dient. Dies impliziert, dass die kovalente(n) Bindung(en) eine weitere intermolekulare Quervernetzung verhindert bzw. das xTG Produkt ein schlechteres Substrat darstellt als z.B. entfaltete Spezies. Um die Annahme zu untermauern, dass die xTG kein weiteres Substrat für die aktive TG¹⁶ darstellt, wurde eine Kopplung mittels Monodansylcadaverin (MDC) durchgeführt (siehe 2.4-7, S. 39). MDC hat eine freie Aminogruppe, welche mit Glutaminen im Substrat gekoppelt werden kann und so Substrate markiert. Unter UV – Licht fluoresziert MDC und kann so zeigen, ob ein Glutamin/Protein für die mTG-Reaktion zugänglich ist. Bei 25 °C kam es über einen Zeitraum von 1 h nachweislich zu keiner sichtbaren Kopplung von MDC an die TG¹⁶ (Daten nicht gezeigt). Auch bei Inkubation von inaktiver TG¹⁶ (bei 95 °C inkubiert und IA inhibiert) mit MDC bei 60 °C kam es zu keiner sichtbaren Kopplung, was eine unspezifische Reaktion bei erhöhter Temperatur ausschließt (Daten nicht gezeigt). Durch Inkubation von MDC mit aktiver TG¹⁶ konnte jedoch eine Kopplung bei 60 °C über den gesamten Reaktionszeitraum (t = 1 h) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3. 5 (B) dargestellt und zeigen eine Markierung von hochmolekularen Produkten und der xTG. Eine Markierung der Monomerbande scheint nicht erfolgt zu sein. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen xTG und des Monomers ist jedoch schwierig, aufgrund des geringen Laufunterschiedes. Die Kopplung von MDC an die mTG zeigt, dass die xTG zumindest reaktive Glutamine für die Reaktion besitzt und so theoretisch weiter als Substrat dient. Warum es zu einer Akkumulation der xTG über die Zeit kommt und nicht zu einer „Abreaktion“, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig geklärt werden. Die Ursache liegt vermutlich in der Kinetik der Quervernetzungsreaktion. Denkbar wären eine schlechtere Zugänglichkeit reaktiver Glutamine bzw. Lysine der xTG und damit eine deutlich verringerte Umsatzrate der xTG im Vergleich zur Bildung dieser. Bei Fortschreiten der Reaktion

kommt zusätzlich der Effekt der thermischen Inaktivierung der TG¹⁶ hinzu, wodurch eine weitere Polymerisierung der xTG verhindert wird.

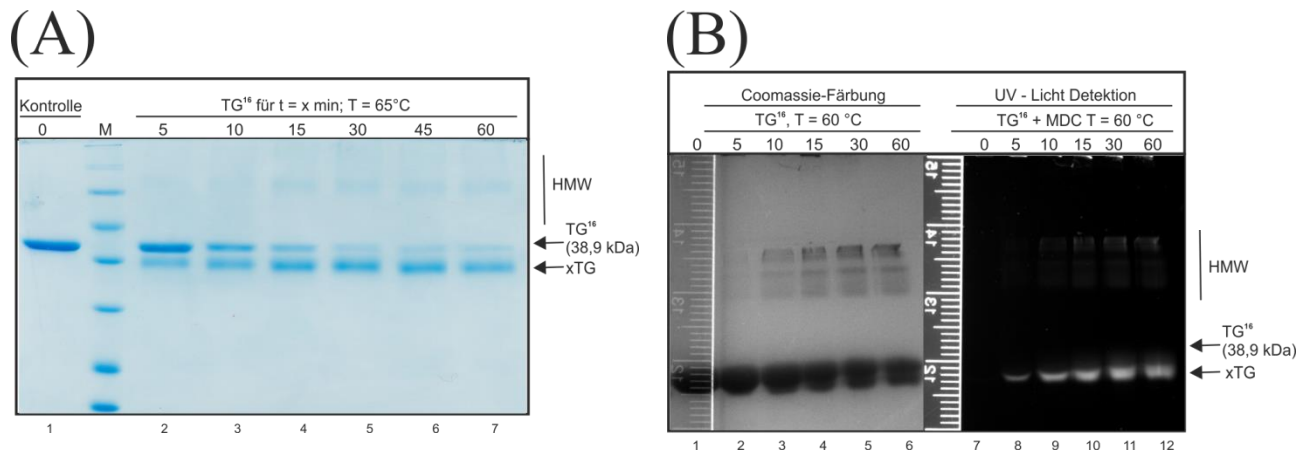


Abb. 3.5) Untersuchungen zur Selbstquervernetzung der TG¹⁶.

(A) Analyse der Quervernetzungsprodukte nach Inkubation gereinigter TG¹⁶ bei 65 °C über einen Zeitraum von 60 min.

(B) Visualisierung der Kopplungsreaktion der TG¹⁶ mit MDC bei 60 °C unter UV – Licht und Vergleich des Bandenmusters nach Coomassie - Färbung.

Die Auftrennung erfolgte in einem 12,5 %igen Trenngel. Die Proteinkonzentration in den Proben betrug 1 mg/mL, aufgetragen wurden 10 µL Probe.

M...MW Marker (ThermoScientific); 0, 5, 10 etc.... Inkubationszeit in min; MDC ... Monodansylcadaverin;

xTG ...intramolekulares Quervernetzungsprodukt; HMW ... hochmolekulare Quervernetzungsprodukte

Weiterhin scheint die xTG selbst keinerlei Aktivität aufzuweisen. Vergleicht man die PAGE - Analyse mit der Inaktivierungskinetik, so nimmt die Restaktivität der TG¹⁶ ab, während die xTG akkumuliert. Zudem reagiert die xTG auch bei verlängerter Inkubation bei 65 °C nicht weiter, was ebenfalls für eine fehlende Aktivität spricht.

Durch nanoDSF - Analyse und PAGE - Analyse gelang es Einblicke in den Inaktivierungsmechanismus der mTG, im speziellen der TG¹⁶, zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass es schon frühzeitig während der Entfaltung zur Aggregation und zur Selbstquervernetzung des Enzyms kommt. Eine Spezies, bezeichnet als xTG, populiert dabei in signifikanten Mengen und verwehrt sich weiterer Selbstquervernetzung. Weiterhin konnte anhand von Temperaturübergangskurven gezeigt werden, dass es auch in Abwesenheit einer Transglutaminaseaktivität zur Aggregation kommt. Interessanterweise konnte durch die Analyse inaktiver TG¹⁶ - Varianten eine Erhöhung des Schmelzpunktes festgestellt werden. Dies impliziert, dass die Selbstquervernetzung der TG¹⁶ sich negativ auf die thermische Resistenz auswirkt. Schlussfolgernd würde die Inhibierung der Selbstquervernetzung möglicherweise mit einer Erhöhung der thermischen Resistenz einhergehen. Zur Eruierung dieser Hypothese wurden weitergehende Experimente zur Identifikation der Quervernetzungsstellen und Substitution dieser durchgeführt.

3.1-5) Identifizierung der (intrinsischen) Quervernetzungsstellen und Generierung von Einzelmutanten zur Inhibition der Selbstquervernetzung

Basierend auf der Hypothese, dass die Quervernetzungsaktivität die thermische Resistenz mindert (siehe 3.1-4, S. 54, erhöhter T_M - Wert bei TG¹⁶:C64S und TG¹⁶:IA), sollten die intrinsischen Quervernetzungsstellen ermittelt werden. Durch die Analyse der Selbstquervernetzungsprodukte wurde die xTG – Spezies identifiziert, welche durch intramolekulare Quervernetzung entstand. Aufgrund der Präferenz vornehmlich die xTG - Produkte zu bilden, wurde eine Identifizierung der Quervernetzungsstellen in den xTG - Produkten mittels LC/MS durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4-8, S. 40). Die identifizierten Peptide der LC/MS - Analyse sind in Anhang 7 Tab. 8. 3 (S. 146) angegeben.

Bei der Analyse der xTG - Spezies konnten insgesamt acht Glutamine (Q) und 11 Lysine (K) von möglichen 10 respektive 17 identifiziert werden. Das xTG Produkt ist demnach ein Konglomerat aus verschiedensten Quervernetzungsprodukten. Durch den Vergleich einer thermisch unbehandelten (TG¹⁶) mit einer thermisch behandelten (xTG) Probe konnte ein nahezu quantitativer Umsatz des Glutamins 328 (Q328) festgestellt werden. Quantitativ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass weniger als 1 % nicht quervernetztes Q328 in dem xTG Produkt detektiert werden konnte. Das Gln328 ist in der mTG am C - Terminus lokalisiert. In der Kristallstruktur erscheint der C - Terminus als flexible Region (Abb. 3. 6 (C), S 61), was die Zugänglichkeit bei erhöhter Temperatur des Gln erklären könnte.

Obwohl zahlreiche reaktive Glutamine und Lysine identifiziert wurden, spricht die vergleichsweise quantitative Umsetzung dafür, dass das Q328 als „Substrat“ präferiert wird. Ein Austausch des Q328 könnte demnach die Selbstquervernetzung substantiell unterdrücken und so zur Erhöhung der thermischen Resistenz führen. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden Q328 Substitutionsvarianten der TG¹⁶ generiert und im Folgenden als TG¹⁶:Q328n (n = Asn, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Glu) bezeichnet. Dabei wurde die Asn - Substitution als konservativer Austausch angesehen, während die Substitutionen des Q328 zu Ala, Val, Leu, Ile und Trp einen zusätzlich stabilisierenden Charakter durch Einbringen hydrophober Wechselwirkungen haben sollten (persönliche Kommunikation von W. Brandt, IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie).

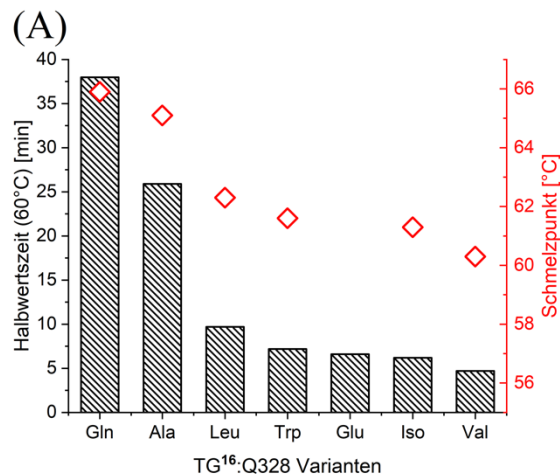
Die TG¹⁶:Q328n - Varianten wurden analog zur TG¹⁶ in *E. coli* BL21 Gold (DE3) produziert und mittels Nickelaffinitätschromatographie bis zur Bandenreinheit isoliert (siehe Abschnitt 2.3-7, S. 33). Anschließend wurde die Halbwertszeit bei 60 °C und die Temperaturübergangskurve (Abb. 3. 6(A)), sowie die Bildung des xTG - Produktes nach 60 min (Abb. 3. 6 (B)) für jede Variante analysiert. Es erfolgte keine Bestimmung des T_M - Wertes und gelelektrophoretische Auftrennung für die TG¹⁶:Q328E, da diese nur in geringen Mengen löslich produziert wurde und die gereinigte TG¹⁶:Q328E für die Bestimmung der Halbwertszeit aufgebraucht wurde. Auf eine erneute Produktion und Reinigung wurde verzichtet, da von keinem weiteren Erkenntnisgewinn auf Basis eines ermittelten T_M - und T_{ON} - Wertes für diese Variante

ausgegangen wurde.

Entgegen der Erwartung zeigte sich in allen untersuchten Varianten eine Verringerung der thermischen Resistenz (Abb. 3. 6(A)). Der Austausch des Gln328 zu Leu, Trp, Iso oder Val resultierte in einer deutlichen Absenkung der Halbwertszeit bei 60 °C und des T_M – Wertes (siehe Tab. 3. 4). Noch drastischer wirkte sich die Substitution zum Asn aus. Obwohl chemisch ähnlich (polar, neutral), reduzierte sich die thermische Resistenz deutlich und ist vergleichbar mit der Wt mTG ($t_{1/2} = 2,02$ min und $T_M = 58,01$ °C). Offensichtlich spielt der C – Terminus oder zumindest das Gln328 eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der mTG bzw. TG¹⁶. Wie bei der TG¹⁶, der TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG verschob sich mit dem T_M auch der Beginn der Aggregation (T_{Agg}) hin zu niedrigeren Temperaturen, was eine früher einsetzende Entfaltung im Vergleich zur TG¹⁶ bedeutet und damit eine geringere thermische Resistenz.

Neben der thermischen Resistenz wurde die Selbstquervernetzung, im speziellen die Bildung der xTG - Produkte nach 60 min bei 65 °C analysiert. Bei allen Varianten konnte trotz Austausches des Q328, weiterhin ein xTG Produkt nachgewiesen werden. Interessanterweise scheint die Verringerung der Bildung an xTG mit der thermischen Resistenz zu korrelieren. So zeigt die TG¹⁶:Q328A mit der höchsten thermischen Resistenz der Q328n - Varianten gleichzeitig auch den höchsten Grad an xTG - Produkten. Die TG¹⁶:Q328N hingegen weist den geringsten Grad an xTG Produkten auf, sowie die niedrigste thermische Resistenz. Offenkundig scheint das Gln hier eine duale Bedeutung zu haben. So spielt es einerseits eine wesentliche Rolle in der Selbstquervernetzung. Andererseits scheint es einen diffizilen Einfluss auf die thermische Resistenz zu haben, bei der ein Austausch des Q328 zu einer drastischen Senkung ebendieser führen kann.

Durch Substitution des Gln328 sollte die Selbstquervernetzung inhibiert und die thermische Resistenz gesteigert werden. Mehrere Substitutionsvarianten führten zwar zu einer deutlichen Reduktion der xTG - Produkte, jedoch mit einhergehendem Verlust an thermischer Resistenz. Dies spiegelt die Komplexität zwischen strukturgebenden Faktoren und der Selbstquervernetzung wider und wie diese sich auf die thermische Resistenz auswirken können.



Tab. 3. 4) Halbwertszeiten und T_M der untersuchten TG¹⁶:Q328n - Varianten.

Q328n - Variante	$t_{1/2}$ [min] (60°C)	T_M [°C]	T_{ON} [°C]
Gln (TG ¹⁶)	38°C	65,9	58,6
Ala	25,9	65,1	57,1
Leu	9,7	62,3	55,7
Trp	7,2	61,6	53,6
Iso	6,2	61,3	55,7
Glu	6,6	--	--
Val	4,7	60,3	53,5
Asn	1,7	56,6	49,4

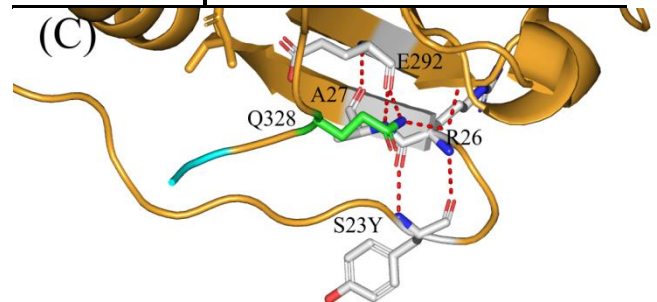
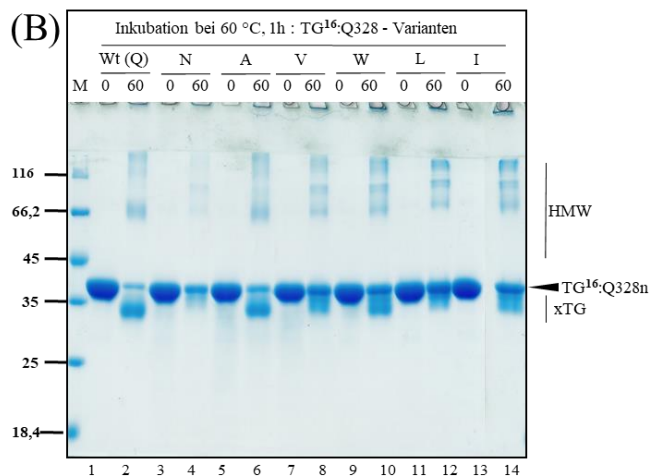


Abb. 3. 6) Analyse der thermischen Resistenz und Selbstquervernetzung der TG¹⁶:Q328 – Varianten.

(A) Analyse der Halbwertszeit bei 60 °C und des Schmelzpunktes für die TG¹⁶:Q328 - Varianten. Die Bestimmung erfolgte wie unter Abschnitt 2.4-5 (S. 38) angegeben. Zum Vergleich ist die TG¹⁶ (Gln) ebenfalls aufgeführt. Die Messung der Halbwertszeit und des T_M erfolgte in einer Einfachbestimmung mit technischen Duplikaten.

(B) Bildung von Quervernetzungsprodukten durch Inkubation der TG¹⁶:Q328 – Varianten bei 65 °C. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 12,5 %igen Trenngel. Die Proteinkonzentration der Proben betrug 1 mg/mL, aufgetragen wurden 10 µL Probe. Eine Spur des Fotos wurde ausgeschnitten und als Spur 14 (Q328I nach 60 min) eingefügt, um den Effekt der Inkubation bei 60 °C für diese Variante optisch besser vergleichen zu können. Das Originalgelbild ist in Anhang 15 (S. 154) gezeigt.

(C) Lokalisierung des Gln 328 in der mTG Struktur und Darstellung stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen. Die Proteinstruktur ist in orange dargestellt, das Gln328 in grün und mögliche stabilisierende Aminosäuren in grau. Der Aminosäureaustausch des Ser23 gegen Tyr in der TG¹⁶ wurde durch *in silico* Mutation mit dem Programm PyMOL (Version 1.3) [Schrodinger, 2010] durchgeführt. Die Struktur basiert auf der nativ produzierten *Sm* mTG (pdb: 1IU4) [Kashiwagi *et al.*, 2002]. M ... MW Marker (ThermoScientific); xTG ... intramolekulares Quervernetzungsprodukt; HMW ... hochmolekulare Quervernetzungsprodukte, TG¹⁶:Q328n ... Q328 – Varianten

3.1-6) Chemische Resistenz und pH – Wert Stabilität der TG¹⁶

Um die chemische Resistenz der TG¹⁶ zu untersuchen, wurde die Lagerstabilität bei verschiedenen pH – Werten analysiert, sowie die Widerstandsfähigkeit gegenüber Guanidinium Hydrochlorid (GnHCL) (siehe 2.4-9, S. 40). Das dadurch gewonnene Wissen kann für industrielle Anwendungen von Vorteil sein, bei denen die mTG hohen pH - Wert Schwankungen ausgesetzt ist oder die Reaktionen bei nicht-physiologischen pH - Werten ablaufen. Die pH - Stabilität hat ebenfalls Einfluss auf die Lagerstabilität der

solubilisierten TG¹⁶. Da grundsätzlich eine Bestimmung thermodynamischer Parameter zur Messung der Protein­stabilität mittels GnHCl induzierter Entfaltung möglich ist, sollte auch dies überprüft werden. Voraussetzung für diese Analysenmethode ist jedoch, dass sich ein Gleichgewicht zwischen der entfalteten und der gefalteten Spezies einstellt [Johnson und Fersht 1995; Pace und Scholtz, 1997].

Die Analyse der Lagerstabilität erfolgte durch Inkubation der TG¹⁶ bei den pH – Werten 3 – 9 für 25 h bei 25 °C. Eine Temperatur von 25 °C wurde gewählt, um eine Denaturierung des Enzyms durch thermische Einflüsse zu minimieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 3. 7 (A) für die TG¹⁶, die TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG dargestellt. Gezeigt wird die relative Aktivität bei dem der Messwert mit der höchsten Aktivität dem 100 % Wert entspricht.

Es ist zu erkennen, dass die TG¹⁶ eine Verschiebung in das azide Milieu hinsichtlich ihrer Stabilität zeigt. Das pH_{Stabilitäts}-Optimum verschiebt sich dabei von pH = 6 (Wt mTG) auf pH = 4 - 5 (TG¹⁶). Die TG¹⁶ behielt dabei auch nach 25 h Inkubation bei einem pH = 3 noch 64 % ihrer relativen Aktivität. Im Vergleich hierzu verlor sowohl die TG⁰⁴(S2P) als auch die Wt mTG mit 13 % respektive 17 % deutlich an Restaktivität. Ein Unterschied der pH - Wert Stabilität im basischen Bereich zwischen der TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG konnte nicht beobachtet werden.

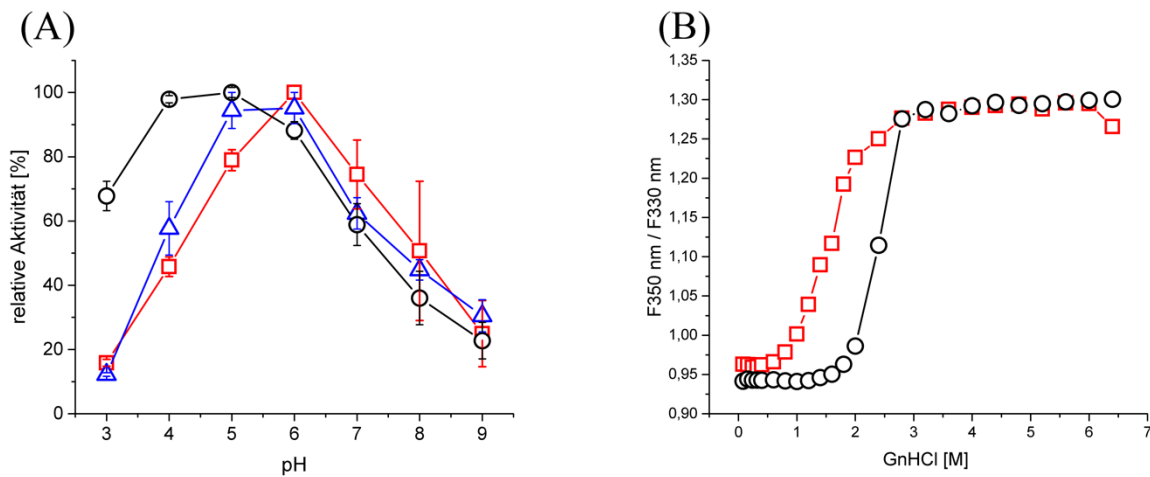


Abb. 3. 7) Chemische Resistenz und pH – Wert Stabilität der TG¹⁶.

(A) 10 µL einer 3 mg/mL Enzym­lösung wurden mit 90 µL UB4 (20 mM HEPES, 20 mM MES, 20 mM Natriumacetat) der pH-Werte 3-9 versetzt (C_{final} (Enzym) = 0,3 mg/mL). Anschließend wurde die Enzym­lösung bei 25 °C für 25 h inkubiert. Nach 25 h wurde die Restaktivität bestimmt. Hierfür wurden jeweils 200 µL eines Ansatzes in eine Kavität einer 96 well – Platte (Falcon, 1172, durchsichtig) übertragen und im FLUOstar Galaxy (BMG) bei 525 nm vermessen. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte in biologischen Duplikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten. Dargestellt sind die TG¹⁶ (leere, schwarze Kreise), die TG⁰⁴(S2P) (leere, blaue Dreiecke) und die Wt mTG (leere, rote Quadrate).

(B) Es wurden insgesamt 24 GnHCl – Lösungen mit einer Enzym­konzentration von 0,6 mg/mL eingesetzt und für 24 h bei Raumtemperatur (RT, 20 – 25 °C) zur Einstellung des Gleichgewichtes inkubiert. Die Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels Prometheus NT.48. Es wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die TG¹⁶ (leere, schwarze Kreise) und die Wt mTG (leere, rote Quadrate).

Die Untersuchung der chemischen Widerstandsfähigkeit gegenüber GnHCL erfolgte über die Aufnahme von Entfaltungskurven mit Hilfe eines nanoDSF - Gerätes (siehe Abb. 3. 7 (B)). Die Entfaltung der Wt mTG

und der TG¹⁶ wurde bei 25 °C und einer GnHCl - Konzentration von 0,08 - 6,4 M gemessen. Durch Aufnahme der Entfaltungskurven nach t = 2,5 h (Daten nicht gezeigt) und 24 h (Abb. 3. 7 (B)) wurde geprüft, ob sich ein Gleichgewicht zwischen dem entfalteten (U) und gefalteten (native, N) Zustand einstellt.

Für die TG¹⁶ und der Wt mTG erwies es sich, dass sich unter den eingestellten Bedingungen kein Gleichgewicht einstellte. Mit fortschreitender Zeit verschob sich das Gleichgewicht zu niedrigeren GnHCl - Konzentration. Ebenfalls nahm die Aggregation, verfolgt über die Reflektionsoptiken im Gerät, mit der Zeit zu, wodurch eine exakte Bestimmung der Konzentration an N und U nicht möglich ist. Eine thermodynamische Auswertung konnte unter den eingestellten Bedingungen dementsprechend nicht erfolgen

Wie in Abb. 3. 7 (B) jedoch ersichtlich ist, weist die TG¹⁶ eine erhöhte Resistenz gegenüber chemisch induzierter Entfaltung bei den GnHCl - Konzentrationen auf.

3.1-7) Bestimmung der spezifischen Aktivität der TGⁿ – Varianten und Vergleich mit der WT mTG und der UH308-B

Nicht nur die Stabilität von Enzymen, sondern auch deren Aktivität spielt eine wesentliche Rolle in der technischen/industriellen Anwendung. So kann z.B. bei erhöhter Aktivität des Enzyms der Reaktionszeitraum verkürzt oder die einzusetzende Menge des Substrates verringert werden. Eine Verbesserung der enzymatischen Aktivität erlaubt es Prozesse effizienter und kostengünstiger zu gestalten.

Da die Mutationen ebenfalls einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität haben [Buettner *et al.*, 2012; Marx *et al.*, 2008b], wurde die spezifische Aktivität (A_{spez}) der TGⁿ - Varianten nach dem Standardtest von [Folk und Cole, 1966] bestimmt (siehe auch 2.4-4, S. 37). Als Substrat dient hierbei das synthetische Dipeptid CBZ-Gln-Gly-OH. Die Ermittlung der A_{spez} nach dem Standardtest erlaubt einen breiten Vergleich mit der Literatur und deren veröffentlichten Varianten. Die Ergebnisse der ermittelten A_{spez} aller getesteten TGⁿ – Varianten, sowie der Wt mTG und der UH308B sind in Abb. 3. 8 dargestellt. Es ist nochmals darauf hinzuweisen, dass alle in der vorliegenden Arbeit erzeugten Varianten die Aminosäuresubstitution S2P enthalten.

Neben dem Einfluss der G257S - Substitution, ist ebenfalls der Effekt der S2P - Substitution ersichtlich. Bei Fehlen der G257S - Mutation und gleichzeitiger Anwesenheit der S2P - Substitution, zeigen alle Varianten eine erhöhte spezifische Aktivität von 65 U/mg (+/- 5U/mg). Offenkundig führt die S2P - Substitution zur erhöhten spezifischen Aktivität, da diese als einzige Substitution in jeder Variante vorkommt. Die Substitutionen S23Y, Y24N, K269S, H289Y und K294L scheinen für vergleichsweise minimale Unterschiede in der Aktivität zu sorgen. Dies steht im Einklang mit der unter Abschnitt 4.4 (S. 96) gemachten Schlussfolgerung, dass die S23Y, Y24N, K269S, H289Y und K294L hauptsächlich einen Resistenz modulierenden Charakter haben. Bezüglich der TG¹⁶ ($A_{\text{spez}} = 62 \text{ U/mg}$ (+/- 1,5 U/mg)) konnten keine wesentlichen Differenzen der spezifischen Aktivität von den Varianten TG¹² ($A_{\text{spez}} = 65 \text{ U/mg}$) oder

TG¹⁸ ($A_{\text{spez}} = 62 \text{ U/mg}$) gemessen werden, welche die zweit- bzw. dritthöchste thermische Resistenz besitzen. Somit wurde für die weitere Charakterisierung nur noch die TG¹⁶, welche die höchste thermische Resistenz besitzt, in Betracht gezogen.

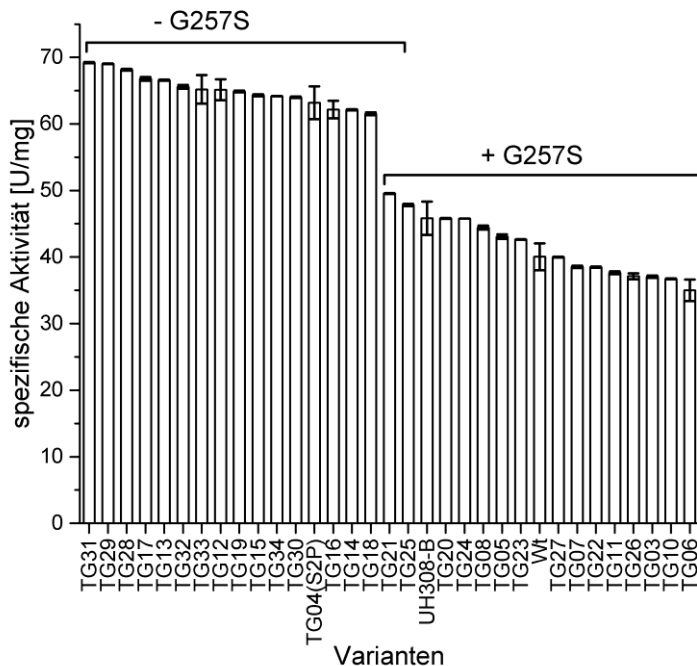


Abb. 3. 8) Ermittelte spezifische Aktivitäten der TGⁿ - Varianten.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte nach [Folk und Cole, 1966]. Die spezifische Aktivität der Varianten TG¹², TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P), UH308-B und der Wt mTG wurden in biologischen Duplikaten mit technischen Triplikaten bestimmt. Für alle weiteren Varianten erfolgte eine Einfachbestimmung mit technischen Duplikaten. Die jeweiligen Aminosäuresubstitutionen zu den entsprechenden Varianten sind in Tab. 3.1 (S. 51) aufgeführt.

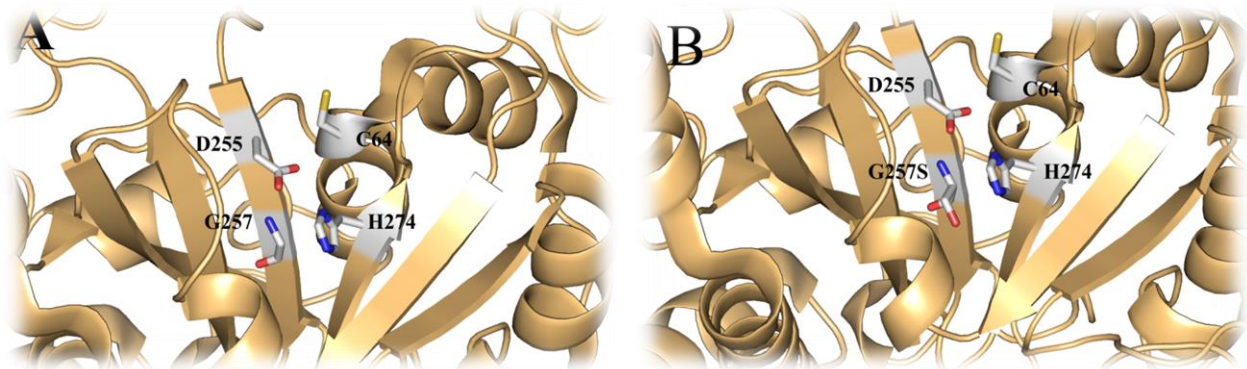
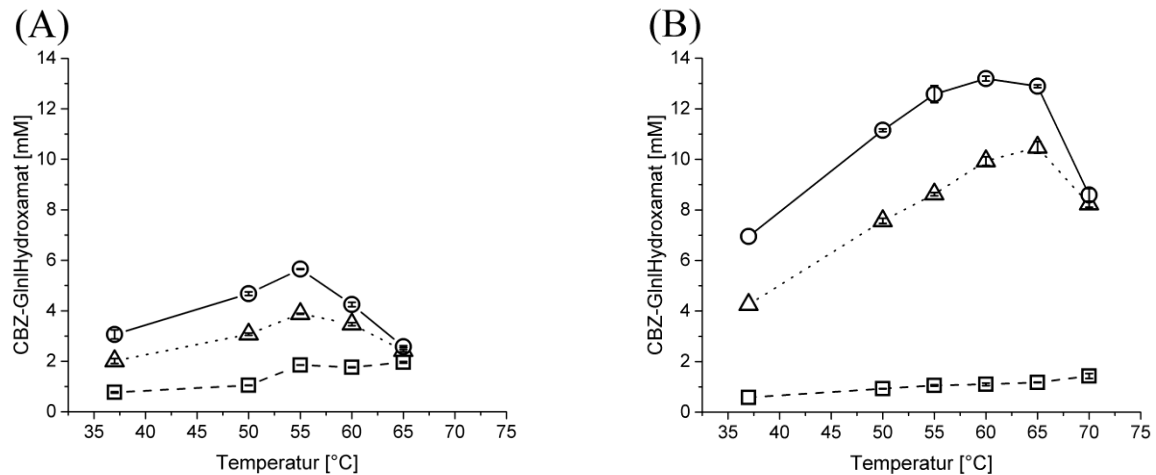


Abb. 3. 9) Lokalisierung des Glycins 257 (A) in der Proteinstruktur in der *Sm* mTG und *in silico* Substitution zu Serin (B).

Die katalytisch reaktiven Seitenketten Cys64, Asp255 und His274, sowie die Aminosäure Gly257 sind als *sticks* dargestellt. Die *in silico* Substitution wurde mit dem Programm PyMOL (Version 1.3) [Schrodinger, 2010] durchgeführt. Die Struktur basiert auf der nativ produzierten *Sm* mTG (pdb: 1IU4) [Kashiwagi *et al.*, 2002].

Da die Aktivität eines Enzyms in besonderem Maße von der Temperatur beeinflusst wird, wurde die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur für die Variante TG¹⁶ und zum Vergleich für die

Wt mTG gemessen (siehe 2.4-10, S. 41). Bei einer Auftragung an gebildetem Produkt in Abhängigkeit von der Temperatur lässt sich somit das Temperaturoptimum für den jeweils betrachteten Zeitraum bestimmen. Die Produktmenge wurde mittels einer zuvor erstellten Kalibrierkurve (Anhang 8, S. 148, Abb.8. 5), wobei kommerzielles L-Glutamat- γ -mono-Hydroxamat zur Kalibrierung verwendet wurde, berechnet. In Abb. 3. 10 ist das Ergebnis für den Zeitraum nach 1 min, 6 min und 10 min für die Wt mTG (A) und die TG¹⁶ (B) dargestellt.



Zeit [min]	T _{opt} [°C]	Zeit [min]	T _{opt} [°C]
1	65	1	70
6	55	6	60
10	55	10	55-60

Abb. 3. 10) Produktbildung in Abhängigkeit der Temperatur und Zeit für die Wt mTG (A) und die Variante TG¹⁶(B).

Zu sehen ist die Produktbildung für die Zeiträume t = 1 min (leere Vierecke), t = 6 min (leere Dreiecke) und t = 10 min (leere Kreise) der Wt mTG (A) und der TG¹⁶ (B).

Zur Ermittlung der Temperaturoptima wurde Substratlösung verwendet, bei denen der pH-Wert bei der jeweiligen Temperatur angepasst wurde. Die Substratlösung wurde im Wasserbad für 10 min bei entsprechender Temperatur vorinkubiert. Anschließend wurden 1174 μ L der Substratlösung in ein Eppendorfgefäß übertragen, welches in einem vorgeheizten Thermomixer inkubiert wurde. Die Reaktion wurde mit 84 μ L (0,3 bzw. 0,15 mg/mL) Enzymlösung gestartet. Für die Temperaturen 55, 60 und 65 °C im wurde eine Enzymlösung von 0,15 mg/mL genutzt. Eine Produktbildung bei 70 °C konnte für die Wt mTG nicht detektiert werden. Aliquots von 105 μ L wurden nach 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240, 360, 480 und 600 Sek entnommen und mit 105 μ L Stopplösung abgestoppt. Die Ansätze wurden für 1 min bei 4 °C und 16.100 g zentrifugiert und anschließend wurden 200 μ L Überstand in eine Mikrotiterplatte Falcon 1172, 96 well transferiert. Die A525-Werte wurden am FLUOstar Galaxy (BMG) aufgenommen. Zur Auswertung und Darstellung der Daten wurde das Programm Origin® 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)) verwendet.

Die Produktmenge wurde in biologischen Duplikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten gemessen.

Erwartungsgemäß sinkt das Temperaturoptimum (T_{opt}) mit zunehmendem Zeitraum, aufgrund der unterschiedlichen thermischen Resistenzen der Wt mTG und der TG¹⁶ bei den jeweiligen Temperaturen. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass mit der Zeit zwar die Produktmenge zunimmt, aber zugleich eine Inaktivierung des Enzyms stattfindet.

Vergleicht man den Wt und die TG¹⁶ miteinander, so kam es zu einer generellen Verschiebung des Temperaturoptimums für die TG¹⁶ hin zu höheren Temperaturen. Je nach Anwendung und Reaktionszeit

sollten dementsprechend unterschiedliche Temperaturen für die Variante TG¹⁶ eingesetzt werden. So bietet sich bei Reaktionszeiträumen >10 min eine Temperatur von 55 °C, während bei Zeiträumen von < 10 min durchaus auch 60 °C für eine hohe Produktausbeute empfehlenswert sein kann.

3.1-8) Bestimmung der kinetischen Parameter K_M , k_{kat} und k_{kat}/K_M der Varianten TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG

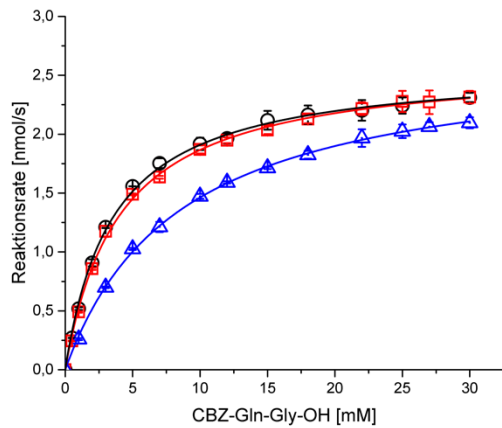
Um mehr über die Ursache der erhöhten spezifischen Aktivität zu erfahren, wurde die Michaelis – Menten Konstante (K_M), sowie die Umsatzrate (k_{kat}) und die aus diesen Parametern abgeleitete katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) bestimmt. Dazu sollten die Varianten Wt mTG, TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶ miteinander verglichen werden, um den Einfluss der Mutationen zu eruieren. Weiterhin wurde der K_M - Wert bestimmt, da in der Literatur diverse Angaben im Bereich zwischen 11,6 mM bis 58 mM zu finden sind. Das genaue Wissen über verschiedene kinetische Parameter zum Substratumsatz ist jedoch für die technische Anwendung günstig. So kann z.B. ein besserer Umsatz des Substrates zum Produkt erreicht werden, wenn der K_M – Wert verbessert ist und man unter nicht sättigenden Bedingungen arbeitet.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte in einem enzymatisch gekoppelten *assay*, unter kontinuierlicher Verfolgung der Produktbildung. Das Prinzip des *assay*'s und dessen Aufbau sind unter Abschnitt 2.4-11 (S. 42) aufgeführt. Die K_M -, k_{kat} - und k_{kat}/K_M - Werte sind in Tab. 3. 5 dargestellt.

Wie in Abb. 3. 11 zu sehen, stimmen die Datenpunkte gut mit der Auswertung nach einer Michaelis - Menten Kinetik überein ($R^2 = 0,99$).

Wie in Tab. 3. 5 ersichtlich, unterscheiden sich die Parameter zwischen dem Wt, der TG⁰⁴(S2P) und der TG¹⁶ hauptsächlich in dem K_M - Wert voneinander. Der K_M - Wert wird vereinfacht als Indiz für die Affinität des Substrates zum Enzym angesehen und gibt die Substratkonzentration an, bei der eine halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Der K_M - Wert verringerte sich für die Varianten TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶ um den Faktor 2,1 respektive. 2,4 (siehe Tab. 3. 5) im Vergleich zur Wt mTG und erklärt somit die erhöhte spezifische Aktivität der genannten Varianten. Es ist zu beachten, dass die erfolgte Messung bei einer Substratkonzentration von 30 mM stattfand, was der Konzentration im Standardtest entspricht [Folk und Cole, 1966]. Eine Messung bei höheren Substratkonzentrationen konnte jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit des Substrates im verwendeten Puffer nicht erfolgen. Somit fand die Reaktion unter nicht-sättigenden Bedingungen statt, welche im Allgemeinen erst bei einer Substratkonzentration von $\geq 10 K_M$ angenommen werden kann [Bisswanger, 2014]. Die Messung unter nicht-sättigenden Bedingungen mit dem Substrat CBZ-Gln-Gly-OH, im Fall der Wt mTG und teilweise auch der TG⁰⁴ (S2P), kann demnach die Ursache für eine verringerte Produktbildung innerhalb des Messzeitraumes im Standardtest sein. Dies wiederum würde in einer verringerten spezifischen Aktivität der Wt mTG und teilweise auch der TG⁰⁴ führen. Alternativ hätte man die kinetischen Parameter auch mit einem anderen Dipeptid oder Tripeptid, welche einen höhere Reaktivität gegenüber mTG's zeigen (siehe Abschnitt

1.1-3, S. 6), bestimmen können. So hätte man eher Substrat - sättigende Bedingungen für die Reaktion erreicht.



Tab. 3. 5) Kinetische Parameter der Wt mTG, TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶.

	WT	TG ⁰⁴ (S2P)	TG ¹⁶
K_M [mM]	8,55 (± 0,96)	4,02 (± 0,25)	3,53 (±0,13)
k_{kat} [s ⁻¹]	27,37 (± 1,4)	33,92 (± 1,13)	32,18 (± 1,13)
k_{kat}/K_M [s ⁻¹ * mM ⁻¹]	3,22 (± 0,2)	8,45 (± 0,24)	9,10 (± 0,02)
R²	0,99	0,99	0,99

Abb. 3. 11) Michaelis – Menten Plot der Wt mTG (blaue, leere Dreiecke), der TG⁰⁴(S2P) (rote, leere Vierecke) und TG¹⁶(schwarze, leere Kreise).

Die Freisetzung von Ammoniak wurde mittels des kontinuierlichen Glutamat Dehydrogenase (GDH) gekoppelten *assay*'s gemessen [Day und Keillor, 1999; Oteng-Pabi und Keillor, 2013]. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C unter variierenden Konzentrationen von CBZ-Gln-Gly-OH (0 – 30 mM) in Gegenwart von 1 mM EDTA, 10 mM α-Ketoglutarat, 0.5 mM NADH, 10 mM Glycin Methylester und 25 U/mL GDH in 200 mM MOPS Puffer. Die Bestimmung erfolgte in biologischen Duplikaten. Zur Auswertung und Darstellung der Daten wurde das Programm Origin® 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)) verwendet.

Da sowohl die TG⁰⁴(S2P) als auch die TG¹⁶ einen vergleichbaren K_M - Wert und beide Varianten die S2P – Mutation besitzen, leiten sich die verbesserten kinetischen Eigenschaften sehr wahrscheinlich von dieser ab. Dies scheint plausibel, da die S2P - am N - Terminus der mTG lokalisiert ist und somit in räumlicher Nähe zur Bindungstasche. Die Substitution zum Prolin führt zu einer konformationellen Änderung, wodurch die Bindung des flexiblen, kleinen Substrates CBZ-Gln-Gly-OH in der aktiven Tasche erleichtert wird.

Es bleibt festzuhalten, dass die Erhöhung der spezifischen Aktivität vermutlich durch einen verringerten K_M - Wert unter nicht - sättigenden Substratbedingungen verursacht wird. Ein verbesserter K_M - Wert für kleine, flexible Substrate kann sich als äußerst vorteilhaft für Anwendungen mit *linker* - Sequenzen erweisen, wie sie z.B. in der Herstellung von ADC Verwendung finden. Aus den gewonnenen Messdaten kann jedoch nicht geschlossen werden, ob sich die verbesserten Eigenschaften auch auf nicht - artifizielle, proteinogene Substrate übertragen lassen. In diesem Kontext wurde die Umsatzrate eines proteinogenen Substrates analysiert.

3.1-9) Umsatz eines proteinogenen Substrates am Beispiel von β – Casein für die Varianten TG¹⁶, TG⁰⁴(S2P) und der Wt mTG

Der Vorteil des artifiziellen, kleinen und flexiblen Substrates CBZ-Gln-Gly-OH ist es, dass ermittelte kinetische Parameter aus der Reaktion ausschließlich auf das Gln zurückzuführen sind. Ebenso ist eine gute

Zugänglichkeit (3D – Umgebung) zur reaktiven Gln-Seitenkette gegeben. Die Bestimmung kinetischer Parameter ist somit, im Vergleich zu komplexeren, proteinogenen Substraten, simpler und lässt eine eindeutige Zuordnung zu.

Bei proteinogenen Substraten verhält es sich jedoch wesentlich komplexer. So kommt im Allgemeinen mehr als nur ein reaktives Gln bzw. Lys im Substrat vor. Ebenfalls üben die Zugänglichkeit und die flankierenden Aminosäuren eine enorme, aber noch nicht vollständig geklärte, Rolle aus. Eine nähere Betrachtung der vorhandenen Literatur ist unter Abschnitt 1.1-3 (S. 6) aufgeführt.

Da sich eine Bestimmung der kinetischen Parameter aufgrund der aufgeführten Komplexität des Substrates als äußerst aufwendig und für die Anwendung auch unnötig erweist, wurde der Gesamtumsatz gemessen. Als Modellprotein diente gereinigtes β - Casein, welches ein Hauptbestandteil von Kuhmilch ist. Die Verfolgung der Quervernetzungsreaktion von β - Casein zu hochmolekularen Spezies, erfolgte durch densitometrische Messung anhand der Signalabnahme der Monomerbande in einem denaturierenden Gel. Der Umsatz an β - Casein wurde für die Temperaturen 37 °C und 60 °C verfolgt. Die Ergebnisse der densitometrischen Analyse sind in Abb. 3. 12 (A) (37 °C) und (B) (60 °C) dargestellt. Die Methode ist unter 2.4-12 (S. 43) beschrieben.

Wie in Abb. 3. 12 (A) zu sehen, unterscheidet sich der Umsatz an β - Casein bei 37 °C nicht, die Substratabnahme ist nahezu identisch. So scheint der Umsatz in den ersten 15 - 20 min nahezu linear zu verlaufen und geht dann in eine nicht-lineare Abnahme über. Die verbesserten kinetischen Eigenschaften (K_M , k_{kat}) der TG - Varianten scheinen keinen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit von β - Casein bei 37 °C zu haben. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Reaktion in Substratsättigung stattfindet oder sich der verbesserte K_M - Wert nicht auf die reaktiven Gln im β - Casein übertragen lässt. Nähere Untersuchungen hierzu wurden jedoch nicht unternommen.

Neben dem Umsatz des β - Casein bei 37 °C wurde auch der Umsatz bei 60 °C untersucht, um den Einfluss der erhöhten thermischen Resistenz mit einzubeziehen (siehe Abb. 3. 12 (B)). Es zeigt sich, dass es sowohl im Bezug zur Wt mTG als auch für die die TG⁰⁴(S2P) zu keinem vollständigen Umsatz von β - Casein kommt. Obwohl alle Enzyme in den ersten 2,5 – 5 Minuten einen ähnlichen Umsatz zeigen, bricht dieser beim Wt nach 5 min und bei der TG⁰⁴(S2P) nach 10 min vollständig ab. Die TG¹⁶ hingegen scheint über den gesamten Zeitraum Substrat umzusetzen, wobei nach ca. 10 min 50 % und nach ca. 30 – 45 min mehr als 90 % umgesetzt sind. Vergleichend hierzu wurden bei 37 °C erst nach 20 min 50 % Substrat umgesetzt und nach 60 min mehr als 90 %. Der Vorteil der TG¹⁶ zeigt sich also vornehmlich in Anwendungen, die höhere Temperaturen voraussetzen oder bei denen höhere Temperaturen angewendet werden können.

Katalytische Reaktionen, die bei höheren Temperaturen ablaufen, zeigen einen erhöhten Umsatz an Substrat in einer definierten Zeit und sorgen somit für kürzere Prozesszeiten. Ein weiterer Vorteil bei Ablaufen der mTG - Reaktion bei höheren Temperaturen könnte sich durch eine partielle Entfaltung von (nicht-)Substrat Proteinen ergeben. Durch diese können mögliche reaktive Seitenketten zugänglich(er) werden und erlauben

so einen höheren Quervernetzungsgrad oder auch erst die „Umwandlung“ eines Nicht-Substratproteins in ein Substratprotein. Ein *Screening* solcher putativen neuen Substrate könnte entsprechende Anwendungen um bisher vernachlässigte nicht Substratproteine erweitern und somit neue Möglichkeiten eröffnen.

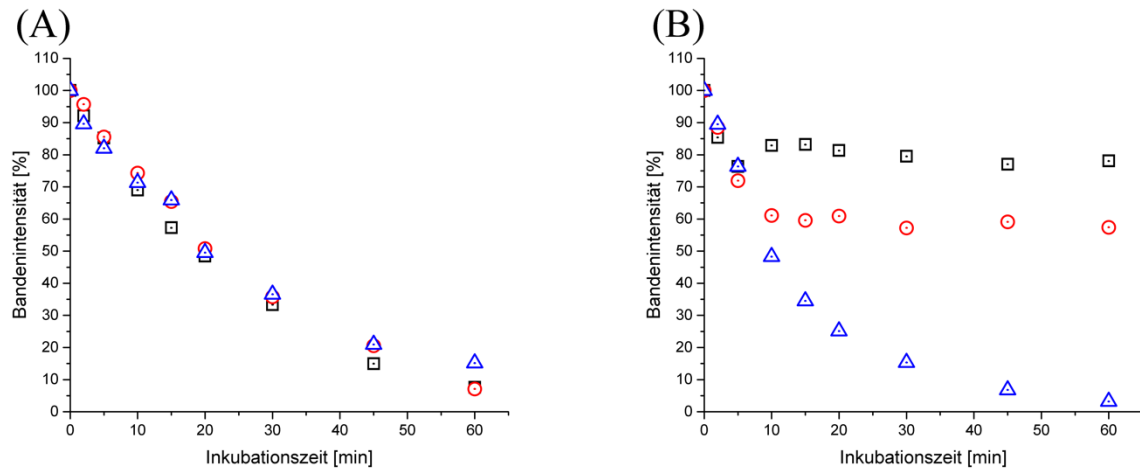


Abb. 3.12) Änderung der Intensität der monomeren β – Casein Bande bei 37 °C (A) und 60 °C (B) über die Zeit.

1 mg/mL β -Casein wurde mit 0.0002 mg/mL der Wt mTG (schwarze, leere Quadrate), TG⁰⁴(S2P) (rote, leere Kreise) oder TG¹⁶ (blaue, leere Dreiecke) bei 37 °C (A) oder 60 °C (B) inkubiert. Aliquots wurden nach definierten Zeitpunkten entnommen und in vorgeheizten SDS –Probenpuffer transferiert. Die PAGE – Proben wurden in einem PA - Gel aufgetrennt und die Abnahme an monomeren β -Casein mittels densitometrischer Analyse verfolgt. Die Aufnahme der relativen Bandenintensitäten erfolgte mit der Software GeneTools (Syngene International) und die Darstellung über das Programm Origin® 2016G (b9.3.2.303 (Lehre)).

3.1-10) Strukturelle Analyse der TG – Varianten (Modellierung)

Um den Einfluss der einzelnen Mutationen der TG¹⁶ auf die Gesamtstruktur zu ermitteln, wurde eine Modellierung basierend auf der bereits veröffentlichten, nativ produzierten *Sm* mTG durchgeführt [Kashiwagi *et al.*, 2002]. Im Vergleich zur rekombinant produziertem TG¹⁶, fehlt die N - terminale FRAP Extension und der C - terminale LE-His₆ tag.

Zur Bestimmung der Rigidität des Proteinrückgrates in Abhängigkeit zur Temperatur, wurde zusätzlich eine Simulation bei 25 °C (298 K) und bei 60 °C (333 K) durchgeführt. Die Rigidität wird anhand von *root mean square deviation* (RMSD) Werten der C α - Atome angegeben und ist ein Maß für die Fluktuation des C α - Rückgrates (*backbone*) im Vergleich zum Referenzprotein (hier Wt mTG) bei der entsprechenden Temperatur. Neben der Rigidität werden ebenfalls *root mean square fluctuation* (RMSF) Werte berechnet, welche Ausdruck der Fluktuation einer Aminosäure bzw. eines Atoms zu seiner Referenzposition ist [C. Zhang *et al.*, 2018]. Analog zu der TG¹⁶ wurde ebenfalls die Energieminimierung und Moleküldynamiksimulation (MDS) mit der Wt mTG bei 25 °C (298 K) und bei 60 °C (333 K) durchgeführt. Die MDS wurde mit dem Programm YASARA [Krieger *et al.*, 2009] und die Energieminimierung mit dem Programm Amber03 durchgeführt.

Ein Vergleich der Gesamtstruktur zeigt nur geringfügige Unterschiede zwischen der TG¹⁶ und der Kristallstruktur *Sm* mTG (siehe Abb. 3.13 A). Der Einfluss der Substitutionen auf die Gesamtstruktur wird

dementsprechend als geringfügig bewertet. Auffällig ist jedoch die Bildung einer β - *sheet* Struktur in einer *loop* - Region (siehe Abb. 3. 13 B, gelb eingefärbt). Untersuchungen zur Stabilität der *Sm* TG unterstrichen bereits die bedeutende Rolle von β - *sheet* Strukturen in der Stabilisierung. Möglicherweise trägt die Bildung dieses β - *sheet*s auch zur erhöhten thermischen Resistenz bei. Weiterhin ist auffällig, dass die Substitutionen auf der Enzymoberfläche lokalisiert sind. Die Verteilung von stabilisierenden Substitutionen auf der Oberfläche von Enzymen konnte bereits häufiger beobachtet werden [Colón *et al.*, 2017; Strickler *et al.*, 2006; Zhao und Arnold 1999].

Betrachtet man die Mikroumgebung der eingebrachten Aminosäuresubstitutionen, entstanden ebenfalls neue, stabilisierende Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen). So konnten für die Substitution H289Y und K29L zum Val30 respektive V271 hydrophobe Interaktionen identifiziert werden (persönliche Kommunikation W. Brandt, IPB Halle, Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie). Interessanterweise sind Val30 und Val271 auf dem β 7 respektive β 6 Strang der β - Faltblattstruktur lokalisiert [Kashiwagi *et al.*, 2002]. Die Interaktionen könnten somit zusätzlich stabilisierend auf die β - Faltblattstruktur wirken, welche maßgeblich zur thermischen Resistenz beitragen soll [Aprodu *et al.*, 2013; Menéndez *et al.*, 2006]. Durch den Austausch von S23Y und Y24N entstand eine neue Wasserstoffbrückenbindung, bei der das Proton der Hydroxylgruppe des Tyr23 mit der Carboxygruppe des Asn24 wechselwirkt (siehe Abb. 3. 13 B). Dadurch wird im Besonderen die *loop* - Struktur deutlich stabilisiert. Weiterhin zeigte sich, wie erwartet, eine konformationelle Änderung des flexiblen N - terminalen Bereiches aufgrund der Substitution von Serin an Position zwei zu Prolin (S2P). Da Prolin nur eine eingeschränkte Rotation in der N - α Bindung zulässt, erhöht sich dadurch die Rigidität der flexiblen Region und somit putativ auch die Thermoresistenz.

Ein Vergleich der RMSD Werte zeigte nur geringfügig weniger Fluktuation des $\text{C}\alpha$ - Rückgrates für 25 °C (298 K) als auch für 60 °C (333 K) (siehe Abb. 3. 14 A und B) und damit eine Tendenz zur erhöhten Rigidität im Vergleich zur *Wt* mTG an. Die RMSD - Werte der TG¹⁶ sind im Mittel jedoch niedriger und scheinen schneller ein stabileres Niveau als bei der *Wt* mTG zu erreichen.

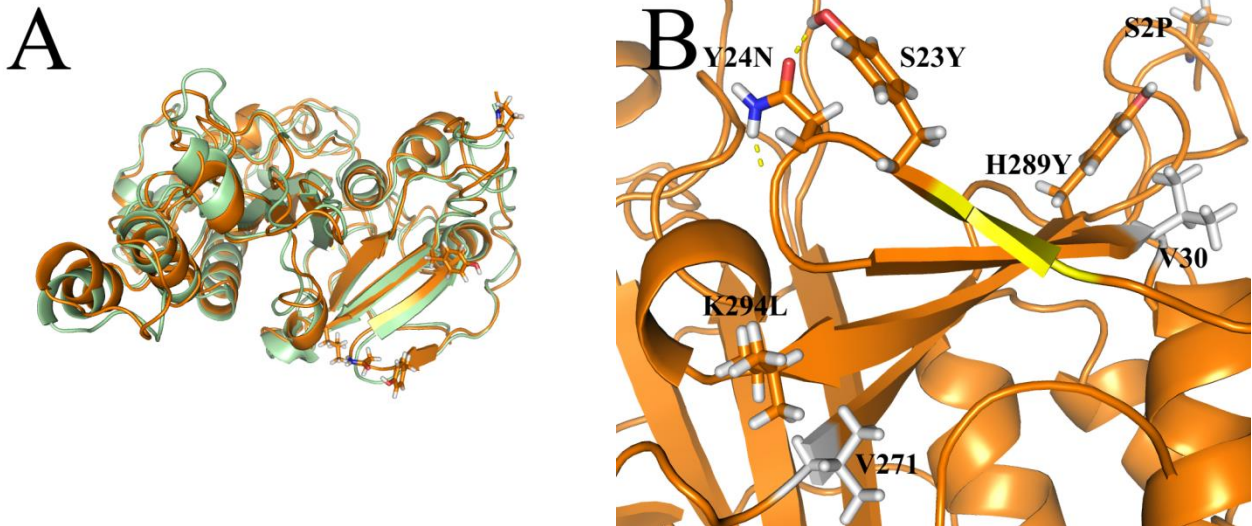


Abb. 3.13 Vergleich der resultierenden Gesamtstrukturen der TG¹⁶ (orange) und der *Sm* TG (grün) (A) und Darstellung der Mikroumgebung der Aminosäuresubstitutionen S23Y, Y24N, H289Y, K294L und S2P (B). Die eingebrachten Aminosäuresubstitutionen sind als *sticks* in orange gezeigt. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, gestrichelte Linie dargestellt. Putative Aminosäuren, die hydrophobe Interaktionen zu den Aminosäureaustauschen bilden, sind in grau als *sticks* eingblendet. Zur Darstellung der Strukturen wurde das Programm PyMOL (Version 1.3) [Schrodinger, 2010] genutzt.

Durch Modellierung der Proteinstruktur für die TG¹⁶ und Simulation der Fluktuation des Rückgrates, konnten keine wesentlichen strukturellen Veränderungen zur Wt mTG bestimmt werden. Obwohl die thermische und chemische Resistenz der TG¹⁶ deutlich erhöht ist, scheint die Gesamtstruktur davon nur unwesentlich betroffen zu sein. Eine erhöhte Rigidität des Rückgrates konnte zwar berechnet werden, jedoch scheint das Ausmaß vergleichsweise gering zu sein. Dies spricht dafür, dass die Stabilisierung der Struktur wohl nur zu einem geringen Teil durch eine erhöhte Rigidität verursacht wird.

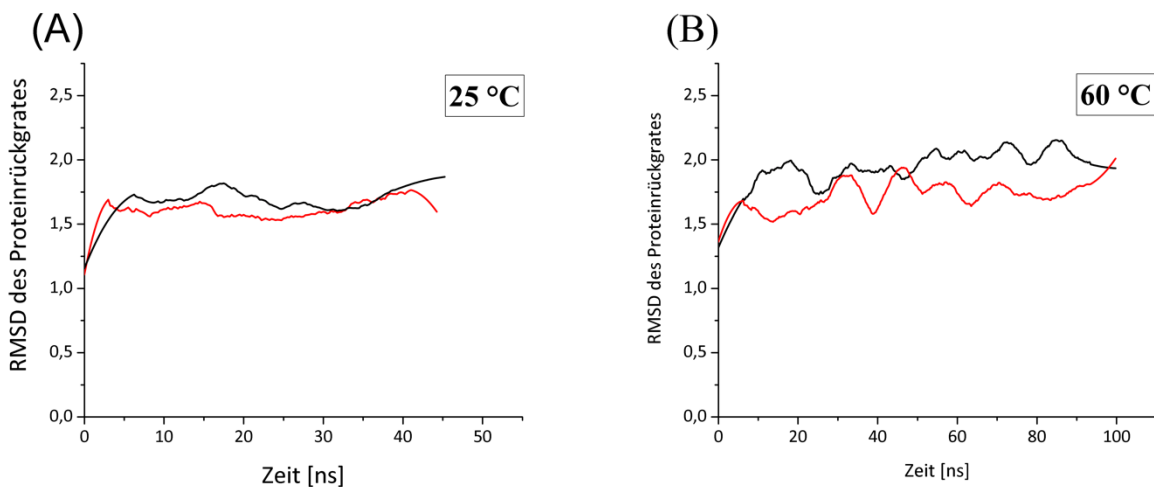


Abb. 3.14 Vergleich der RMSD Werte des Proteinrückgrates bei 25 °C und 60 °C für die Wt mTG und der TG¹⁶.

Das RMSD Profil der Fluktuation des Proteinrückgrates der TG¹⁶ (rote Linie) und der Wt mTG (schwarze Linie) bei 25 °C (A) und 60 °C (B). Die Darstellung des RMSD Profils erfolgte über das Programm Origin[®] 2016G (b9.3.2.303 (Lehre).

3.2 Optimierung der Produktion und Versuche zur Etablierung einer chromatographie-freien Isolierung rekombinant produzierter TG – Varianten

Da die Produktion ein wichtiger Kostenfaktor für Anwendung von Enzymen darstellt, wurde geprüft, ob sich der Produktionsprozess ökonomischer gestalten lässt. Daher soll im Folgenden die Optimierung der Produktionsbedingungen der mikrobiellen Transglutaminase anhand der TG⁰⁴(S2P) und TG¹⁶(S2P, S23Y, Y24N, H289Y und K294L) beschrieben werden. Im Fokus stand dabei die Verbesserung der Plasmidstabilität, als auch die Erhöhung der Ausbeute durch Optimierung der Translationsrate.

Neben der Produktion ist auch die Isolierung des Enzyms maßgeblich mit dessen ökonomischer Anwendung verknüpft. So können etwaige Materialkosten einen erheblichen Teil der Gesamtkosten ausmachen. Um diese gering zu halten, wurden Bedingungen zur chromatographie-freien Isolierung des Enzyms getestet.

3.2-1) Optimierung der rekombinanten Produktion der mTG(S2P) in *E. coli* durch Erhöhung der Plasmidstabilität

Vor Beginn der experimentellen Arbeit waren bereits vorhergehende Erkenntnisse zur verbesserten rekombinanten Produktion in *E. coli* bekannt. Dabei wurden die Herstellungsparameter Temperatur, Induktorkonzentration und Glukose - *feeding* analysiert. Durch eine Modell basierte Parameteroptimierung (*design of experiment*, DoE) konnte eine deutliche Steigerung der Produktion an rekombinanter mTG gezeigt werden [Sommer *et al.*, 2011]. Es kam jedoch, trotz Einsatz von Ampicillin als Selektivum, zum Plasmidverlust während der *fed – batch* Kultivierung. Dadurch akkumulierten bis zu 30 % an plasmidfreien Zellen, wodurch die Ausbeute an mTG deutlich sank [Sommer *et al.*, 2011]. Unter Plasmidverlust wird die stabile Weitergabe (Segregation) von Plasmiden während der Teilung von Bakterienzellen verstanden.

Um eine weitere Steigerung der mTG Produktion zu erreichen, sollte daher die Plasmidstabilität erhöht werden. Als wahrscheinlichste Ursache für die genannte verringerte Plasmidstabilität galt der Einsatz von Ampicillin als Selektivum. Dieses gilt als ein vergleichsweise instabiles Antibiotikum aufgrund des β -Lactam Ringes. Dieser wird über die Zeit durch zwei Prozesse inaktiviert: (I) durch eine sekretierte, aus dem Periplasma stammende, β - Lactamase (enzymatischer Abbau) und (II) einem chemischen Abbau. Bei dem chemischen Abbau kommt es zur hydrolytischen Spaltung des β - Lactamringes, welcher im Laufe der Kultivierungszeit mit Abnahme des pH - Wertes im Medium zunimmt. Zur Sekretion der β - Lactamase kommt es durch plasmidhaltige Zellen, da diese das Resistenzgen *bla* tragen. Paradoxerweise erfolgt die Inaktivierung des Antibiotikums daher durch resistente, plasmidhaltige Zellen (auch interne Kontamination genannt) [Korpimäki *et al.*, 2003]. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das pro-mTG - Gen zunächst in einen Vektor mit einer Kanamycin - Resistenz (Kan^R) kloniert. Kanamycin gilt als deutlich stabiler und kann in geringeren Mengen während einer Kultivierung eingesetzt werden.

Ausgehend von dem in der Publikation von [Sommer *et al.*, 2011] verwendeten pCM203 - Konstrukt [Marx *et al.*, 2008b] wurde das für die pro-mTG(S2P) codierende Gen in den pET28a(+) Vektor kloniert. Dieser enthält, wie auch der pCM203 - Vektor, einen T7 – Promotor zur Induktion der Genexpression des Zielgens und einen pBR322 - Replikationsursprung (ORI, *origin of replication*). Im Unterschied zum pCM203 – Konstrukt trägt der pET28a(+) - Vektor jedoch ein Kan^R - Gen. Das entstandene Konstrukt wurde im Folgenden als pBS01 bezeichnet und in *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformiert.

Zur Eruierung der Plasmidstabilität der *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pCM203 bzw. -pBS01 Stämme erfolgten Kultivierungsversuche im 0,1 L - Maßstab. Der experimentelle Ablauf ist unter Abschnitt 2.3-1 (S. 28) beschrieben. Um den Einfluss des jeweiligen Antibiotikums auf die Plasmidstabilität zu bestimmen, wurden für jeden Stamm Kultivierungsversuche mit und ohne entsprechendes Antibiotikum durchgeführt (siehe Tab. 3. 6). Dabei wurden Proben kurz vor Induktion und zum Ende der Kultivierungsphase analysiert. Wie in Tab. 3. 6 ersichtlich, kam es ohne Einsatz von einem Antibiotikum zum Verlust von Plasmiden. Teilweise traten plasmidfreie Zellen schon vor der Induktionsphase auf. Obwohl beide Plasmide nahezu identisch aufgebaut sind, bis auf das codierende Resistenzgen, kam es bei dem *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pCM203 zu einem höheren Verlust von 33 % im Vergleich zum *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS01. Anscheinend führt die Anwesenheit des Resistenzgens für Ampicillin (Amp^R) im pCM203 - Konstrukt zu einer höheren Plasmid Instabilität im verwendeten *E. coli* BL21 Gold (DE3) Stamm.

Da trotz Wechsel des Antibiotikums von Ampicillin zu Kanamycin weiterhin plasmidfreie Zellen auftraten (5 % plasmidfreie Zellen), wurde eine Antibiotika unabhängige Methode zur Aufrechterhaltung der Plasmidstabilität gewählt. In der Literatur werden eine Vielzahl von Antibiotika-freien Methoden zur Aufrechterhaltung der Plasmidstabilität beschrieben, wie z.B. die Nutzung eines auxotrophen Systems, eines Toxin - Antitoxin Systems oder durch Insertion des *cer* Locus [Peubez *et al.*, 2010]. Da sowohl das auxotrophe als auch das Toxin - Antitoxin System eine Modifikation des Genoms im Produktionsorganismus voraussetzen, wurde das *cer* - Element als Alternative getestet.

Die Nutzung der *cer* - Sequenz zur stabilen Weitergabe von Plasmiden wurde im Besonderen durch Summers und Kollegen analysiert [Summers, 1991; Summers *et al.*, 1988; Summers *et al.*, 1984]. Die *cer* - Sequenz stammt aus dem ColE1 *multy copy* - Plasmid, welche die Dimerisierung und Multimerisierung von Plasmiden verhindert. Da die Verteilung von *multy copy* - Plasmiden zufällig erfolgt und nicht aktiv, hängt die stabile Weitergabe von der Anzahl der zu verteilenden Plasmide ab. Diese wiederum, wird jedoch durch die Bildung von Dimeren bzw. Multimeren Plasmiden verringert, welche durch homologe Rekombination entstehen [Field und Summers 2011; Smith 1989]. Um dies zu verhindern, codieren native Plasmide für die XerCD Rekombinase - spezifische Sequenz *cer*. Die XerCD - Rekombinase katalysiert die Umwandlung von Plasmiddimeren bzw. -multimeren zu Monomeren. Ebenfalls kommt es bei Anwesenheit der *cer* - Sequenz zur Expression einer kurzkettigen RNA (*Rcd*), welche die Zellteilung arretiert und damit zur vollständigen Auflösung der Plasmid Oligomere beiträgt [Field und Summers, 2011].

Durch Klonierung der *cer* - Sequenz in den pBS01 - Vektor (pET28a(+)_pro-mTG(S2P)-LE-His₆) entstand der Vektor pBS02. Dieser wurde ebenfalls in *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformiert und auf dessen Plasmidstabilität in Kultivierungsversuchen (0,1 L) mit und ohne Kanamycin getestet (siehe Tab. 3. 6). Wie in Tab. 3. 6 ersichtlich, bewirkte die Einführung des *cer* - Elementes eine stabile Weitergabe des Plasmides, mit und ohne Antibiotikum, über die gesamte Kultivierungszeit. Neben der Untersuchung der Plasmidstabilität entsprechend 2.3-3 (S. 32) [Chen *et al.*, 2008], erfolgte für die Kultivierungen von *E. coli* BL21 Gold (DE3) _pCM203, ~_pBS01, ~_pBS02 und ~_pBS35 (Kontrolle pET28a(+)_*cer*_Kan^R ohne pro-mTG – Gen) ebenfalls die Untersuchung der Plasmidstabilität durch Extraktion der Plasmide aus 1/OD - Proben und anschließender Auftrennung in einem 1 % Agarosegel. Durch Ethidiumbromidfärbung konnten die Plasmide mittels UV - Licht visualisiert werden. Die Methode zur Visualisierung der plasmidischen Multimerisierungsprodukte bzw. deren Reduktion aufgrund der Anwesenheit der *cer* - Sequenz basiert auf der Publikation von Wilms und Kollegen [Wilms *et al.*, 2001]. Die Ergebnisse für die Zeitpunkte vor Induktion und nach Induktion (5 h Kultivierungszeit im 0,1 L Minimalmedium) sind in Abb. 3. 15 gezeigt. Analog zu Wilms und Kollegen führte die Klonierung der *cer* - Sequenz deutlich zur Reduktion von plasmidischen Multimerisierungsprodukten und untermauert somit die in Tab. 3. 6 aufgeführten Ergebnisse zur Plasmidstabilität.

Tab. 3. 6) Plasmidstabilität der *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pCM203 bzw. _pBS01 Stämme mit und ohne Antibiotikum. Die Kultivierung erfolgte im 0,1 L Maßstab in Minimalmedium [Wilms *et al.*, 2001]. Das Wachstum vor Induktion erfolgte bei 37 °C, nach Induktion mit 0,7 mM IPTG bei 29 °C [Sommer *et al.*, 2011]. Bei Kultivierungen mit Zugabe von Antibiotika erfolgte diese zu Beginn. Die Konzentrationen von Ampicillin und Kanamycin betragen 100 µg/mL respektive 50 µg/mL.

Konstrukt	Merkmale	Plasmidstabilität			
		Mit Antibiotikum		Ohne Antibiotikum	
		Vor Ind.(0h)	Nach Ind.(5h)	Vor Ind. (0h)	Nach Ind.(5h)
pCM203	Amp ^R ,pro-mTG(S2P)	91 %	68 %	100 %	77 %
pBS01	Kan ^R , pro-mTG(S2P)	100 %	95 %	97 %	85 %
pBS02	Kan ^R , pro-mTG(S2P), <i>cer</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
pBS36	Kan ^R , pro-mTG(S2P) _{opt} , <i>cer</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
pBS16_ <i>cer</i>	Kan ^R , pro-TG ¹⁶ (opt), <i>cer</i>	100 %	100 %	100 %	100 %

Kan^R...Resistenzgen für Kanamycin, Amp^R... Resistenzgen für Kanamycin

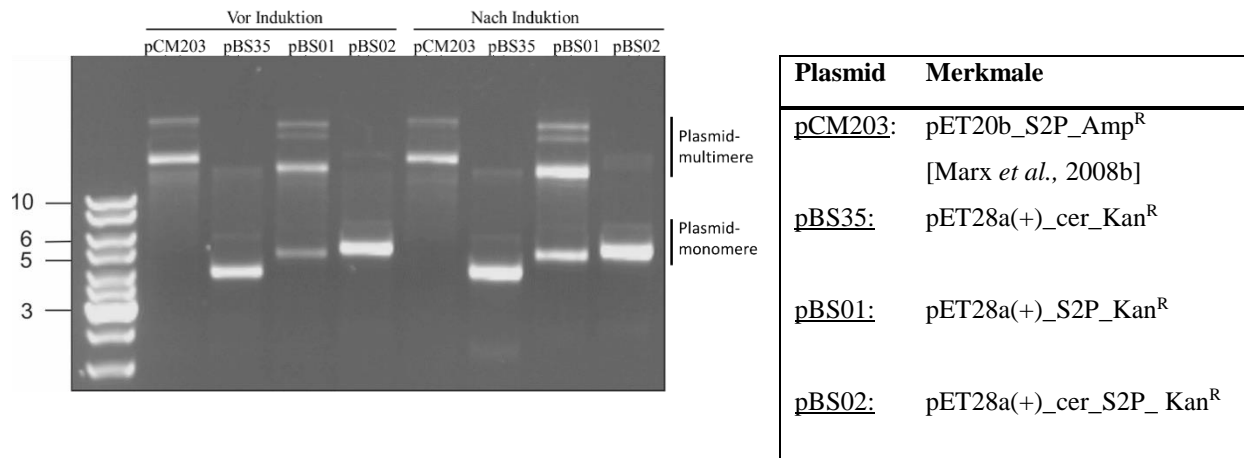


Abb. 3. 15) Analyse des Einflusses der cer - Sequenz auf die Bildung bzw. Reduktion von plasmidischen Multimerisierungsprodukte in *E. coli* BL21 Gold (DE3) - Stämmen.

Analysiert wurden 0,1 L Kultivierungen von *E. coli* BL21 Gold (DE3) _pCM203, ~_pBS01, ~_pBS02 und ~_pBS3 - Stämmen in Minimalmedium (MM) in Anwesenheit des jeweilig nötigen Selektivums vor und nach IPTG - Induktion. Die Kultivierung der *E. coli* - Zellen erfolgte vor Induktion bei 37 °C und wurde nach Induktion mit 0,7 mM IPTG auf 29 °C herabgesenkt. Die Plasmidpräparation aus den 1/OD - Proben erfolgte entsprechend 2.2-7, S. 26 und die Auftrennung und Visualisierung der Proben entsprechend 2.2-4, S. 25.

M...Marker

In anschließenden Kultivierungsversuchen (0,1 L) konnte die erhöhte Plasmidstabilität entsprechend 2.3-3 (S. 32) [Chen *et al.*, 2008] ebenfalls für die Stämme *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS36 bzw. _pBS16_cer gezeigt werden (siehe Tab. 3. 6). Als besonders vorteilhaft erweist sich, dass eine Nutzung von Antibiotika als Selektivum nicht mehr notwendig war. Dies vermeidet u.a. eine kostenintensive Aufbereitung/Entsorgung des Mediums und regulatorische Auflagen mit dem Gesetzgeber bzw. Auftraggeber [Mignon *et al.*, 2015; Peubez *et al.*, 2010].

3.2-2) Erhöhung der Produktion rekombinanter mTG: Steigerung der Translationsrate durch Anpassung der Gensequenz

Um den Effekt einer möglichen verbesserten Translation durch Anpassung der Gensequenz (*codon usage*) zu untersuchen, erfolgte eine Optimierung und Klonierung des pro-mTG(S2P) - Gens durch die Firma Geneart (Regensburg, Deutschland). Der generierte pET20b_pro-mTG(S2P)_{opt} Vektor stand vor Beginn der Arbeit zur Verfügung (optimierte Sequenz, siehe Anhang 9, S. 148). Durch Umklonierung des Codon - optimierten pro-mTG(S2P) Gens in den pET28a(+)_cer (pBS35) Vektor wurde das pBS36 - Konstrukt generiert. Basierend auf der angepassten pro-mTG(S2P) Sequenz, wurden auch die TGⁿ - Varianten (pBS03 - pBS34, siehe 2.1-5, S. 20) mit optimierter Gensequenz mittels *Golden Gate shuffling* generiert. Für die Variante pBS16 erfolgte eine nachträgliche Klonierung des *cer* - Elementes durch die Firma BioCat (Heidelberg, Deutschland). Der resultierende Vektor wurde im Folgenden als pBS16_cer bezeichnet. Vor der Fermentation wurde die Plasmidstabilität analog zu 2.3-1 im 0,1 L Maßstab für die Stämme *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS36 bzw. ~_pBS16_cer analysiert. Dies war notwendig, da eine erhöhte Translationsrate möglicherweise zu einer höheren metabolischen Last führt und somit die Plasmidstabilität negativ beeinflussen kann [Diaz Ricci und Hernández, 2000]. Wie in Tab. 3. 6 angegeben,

fürte die Optimierung der Gensequenz zu keinem negativen Effekt hinsichtlich der Plasmidstabilität im 0,1 L - Maßstab.

Um einen Vergleich mit der bestehenden Literatur zu ermöglichen, wurden die Effekte der erhöhten Plasmidstabilität durch das *cer*-Element und der Gen - Optimierung für eine gesteigerte Produktion der pro-mTG(S2P) bzw. der pro-TG¹⁶ - Variante im 11,5 L Maßstab (entsprechend [Sommer *et al.*,2011]) untersucht (siehe Tab. 3. 7). Wie in Tab. 3. 7 dargestellt, konnte eine Erhöhung der rekombinanten Produktion sowohl für die pro-mTG(S2P), als auch für die pro-TG¹⁶ - Variante realisiert werden. Im Fall der pro-TG¹⁶ wurde ebenfalls eine Erhöhung der Biomassespezifischen Aktivität um den Faktor 4,3 im Vergleich zur Literatur [Sommer *et al.*, 2011] erreicht werden. Die volumetrische Aktivität nahm um den Faktor 6,6 zu, was auf die erhöhte Zelldichte (erkennbar am kalkulierten Parameter der Biotrockenmasse, BTM) pro Liter Medium zurückzuführen ist. Vergleicht man die Fermentation von *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS02 mit und ohne Antibiotikum in der Hauptkultur, zeigte sich analog zu den Experimenten im Schüttelkolbenmaßstab eine stabile Weitergabe des Plasmids. Bei der Produktion des *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS16_*cer* Stammes konnte eine deutliche Erhöhung der Zelldichte erreicht werden. Gründe hierfür könnten der Verzicht auf ein Selektivum sein oder die veränderte metabolische Last durch Optimierung der Gensequenz. Dies konnte ebenfalls im 0,1 L Maßstab für die optimierte pro-mTG(S2P) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zur Analyse des Löslichkeitsverhaltens an gebildeter pro-TG¹⁶ wurden 1/OD - Proben entsprechend 2.3-5 (S. 32) behandelt und die löslichen und unlöslichen Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert (siehe 2.4-3, S. 35). Die gelelektrophoretische Analyse zeigte eine deutlich sichtbare Bande an unlöslich - produzierter pro-TG¹⁶ (siehe Anhang 12, S. 151). Offenbar führte die Veränderung der Translationsrate ebenfalls zu einer Verschiebung der Löslichkeitsverhältnisse an pro-TG¹⁶ in der Zelle. Die ermittelten Bedingungen von Sommer und Kollegen zur löslichen Produktion der pro-mTG müssten auf Grundlage der genetischen Veränderungen erneut angepasst werden. Mögliche Maßnahmen werden in Abschnitt 4.6 (S. 103) diskutiert. Um den kombinierten Effekt der Gensequenzanpassung (*codon-usage*) und des *cer*-Elementes zu untersuchen, wurde eine Fermentation des *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS16_*cer* - Konstruktes durchgeführt. In der anschließenden Auswertung der Fermentation konnte jedoch keine Produktion der pro-TG¹⁶, weder in löslicher noch unlöslicher (*inclusion bodies*) Form nachgewiesen werden. Gründe hierfür sind nicht ersichtlich, könnten aber ihre Ursachen in einer fehlerhaften Durchführung der Fermentation (z.B. keine oder fehlerhafte Induktion) haben. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der fermentierte *E. coli* - Stamm plasmidlos war, da in den Vorkulturen ohne Selektivum gearbeitet wurde. Eine Wiederholung der Fermentation konnte aufgrund von Zeitmangel nicht realisiert werden.

Die oben genannten Untersuchungen zeigen, dass durch die Optimierung der Gensequenz und Erhöhung der Plasmidstabilität bei gleichzeitigem Verzicht eines Antibiotikums in der Hauptkultur, die rekombinante

Produktion der pro-mTG durchaus gesteigert werden kann. Ebenfalls konnten eine deutliche Erhöhung der Produktion im Vergleich zur Literatur bezüglich der biomassespezifischen Aktivität (Faktor 4,3) bzw. der volumetrischen Aktivität (Faktor 6,6) erreicht werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Fermentationen nur einmalig durchgeführt wurden und eine Reproduktion der aufgeführten Daten aussteht.

Tab. 3. 7) Übersicht zur Produktion rekombinanter mTG – Varianten im 11,5 L Maßstab.

<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3)_	<i>Codon usage</i>	<i>cer</i>	AB	BTM [g/L]	Av [U/L _{Fermenter}]	Biom. spez Akt. [U/g _{BTM}]	Plasmid-stabilität	Referenz
pCM203 (pro-TG(S2P))	Nein	Nein	Amp	20	23000	1150	70%	[Sommer <i>et al.</i> , 2011]
pBS02 (pro-TG(S2P))	Nein	Ja	Kan	22,2	22313	1000	100%	vorliegende Arbeit
pBS02 (pro-TG ⁰⁴ (S2P))	Nein	Ja	Nein	18,7	28708	1290	100%	vorliegende Arbeit
pBS16 (pro-TG ¹⁶)	Ja	Nein	Nein	~ 30	151700	5000	86%	vorliegende Arbeit

BTM...Biotrockenmasse, Biom. spez.-Akt. ... Biomasse spezifische Aktivität, Av ...volumetrische Aktivität, AB ... verwendetes Antibiotikum (Art des Antibiotikums)

3.2-3) Etablierung einer alternativen Reinigungsmöglichkeit zur Isolierung der pro-mTG

Die Reinigung der rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase beinhaltet bis heute mindestens einen chromatographischen Schritt [Ando *et al.*, 1989; Gerber *et al.*, 1994; Marx *et al.*, 2008]. Da bei einer chromatographischen Reinigung spezielles Equipment und kostenintensive Säulenmaterialien verwendet werden, bestand ein hohes Interesse an der Entwicklung einer chromatographie - freien Reinigungsmethode. Hierzu sollte die erhöhte thermische Resistenz der zymogenen Form der Transglutaminase (pro-mTG) genutzt werden, welche bereits Pasternack und Kollegen für die nativ produzierte pro-mTG aus *Streptomyces mobaraensis* bewiesen [Pasternack *et al.*, 1998]. Während die native, aktive mTG nach 1 h Inkubation bei 60 °C komplett inaktiviert wurde, wies die pro-mTG keinerlei Aktivitätsverlust auf [Pasternack *et al.*, 1998]. Daraus wurde geschlossen, dass das Propeptid durch Stabilisierung der aktiven mTG eine faltungshelfende Aktivität besitzt.

Ausgehend von den verbesserten Eigenschaften der aktiven TG¹⁶ hinsichtlich der erhöhten thermischen Resistenz sollte untersucht werden, ob die pro-TG¹⁶ ebenfalls eine erhöhte thermische Resistenz im Bezug zur rekombinanten Wt pro-mTG aufweist. Wie in Abb. 3. 16 (A) zu sehen, kam es zu einer leichten Verschiebung der thermischen Resistenz der pro-TG¹⁶ gegenüber der Wt pro-mTG hin zu höheren Temperaturen. Eine Erhöhung der thermischen Resistenz der aktiven TG (hier in Form der TG¹⁶) hat somit auch einen resistenzsteigernden Effekt auf die zymogene Form.

Nach einer Inkubation bei 69,9 °C für 30 min wurden nur ~16 % pro-TG¹⁶ „inaktiviert“ (+/- 4,5 %), während die Wt pro-mTG zu ~90 % (+/- 0,6 %) inaktiviert wurde. Bei 65° C konnte keine Inaktivierung der pro-TG¹⁶ innerhalb der ersten 60 min festgestellt werden (siehe Abb. 3. 16 (B)), während ein Verlust an

Wt pro-mTG von 19 % (+/- 4,4 %) bereits nach 30 min auftrat. Ebenfalls ist ersichtlich, dass es bei Temperaturen über 72,5 °C zu einer schnellen Inaktivierung der pro-TG¹⁶ kommt.

Die in Abb. 3. 16 (B) eingestellten nicht - äquidistanten Temperaturen kommen aufgrund der Gradienteneinstellung am Thermocycler zustande und waren daher technisch bedingt.

Basierend auf den Inaktivierungskinetiken der zymogenen pro-TG¹⁶ wurde eine Aufreinigung des Enzyms via Hitze-fällung von Wirtszellproteinen entworfen (siehe Abschnitt 2. 3-8, S. 33). Der Hitze-fällungsschritt erfolgte für 60 min bei 65 °C. Das entsprechende Fließschemata ist in Abb. 3. 18 (S. 81) gezeigt. Eine Analyse mittels denaturierender SDS-PAGE ist in Abb. 3. 17 gezeigt. Dabei lässt sich erkennen, dass bereits nach 1 h bei 65 °C die Wirtszellproteine in den unlöslichen Zustand überführt wurden (bis zur Bandenreinheit in der SDS-PAGE) und sich somit leicht durch Zentrifugation pelletieren ließen. In einem nachfolgenden Experiment konnte dies auch für Temperaturen ab 60 °C gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

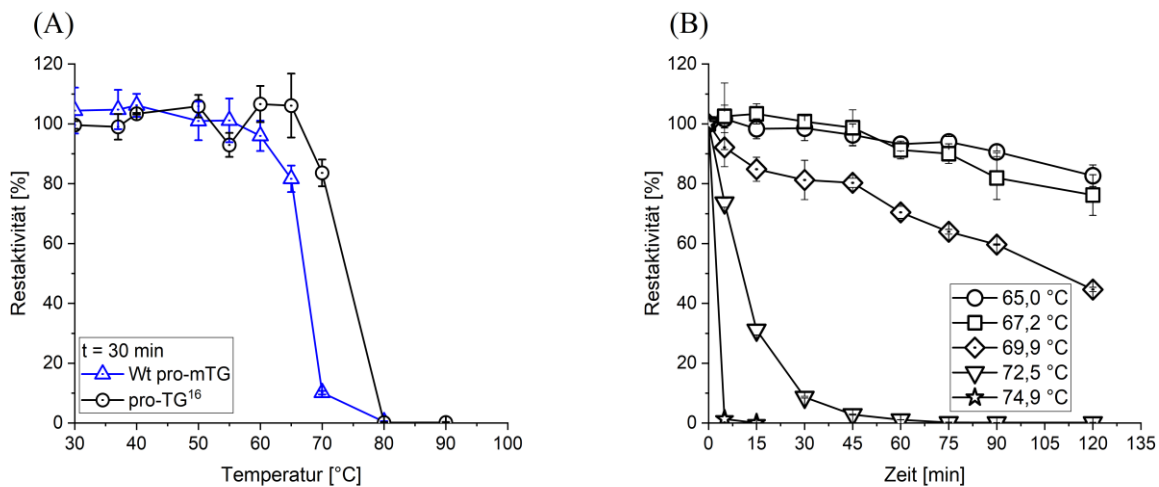


Abb. 3. 16) Thermische Resistenz der Wt pro-mTG und der pro-TG¹⁶.

Aliquote einer 1 mg/mL Enzymlösung wurden bei der jeweiligen Temperatur (30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C und 90 °C) im Thermocycler inkubiert und anschließend sofort auf Eis inkubiert um die Inaktivierung zu stoppen. Nachfolgend wurden die Proben bei 16.100 g zentrifugiert und die Restaktivität nach [Folk and Cole, 1966] bestimmt. Hierfür erfolgte eine Aktivierung mittels Proteinase K (30 U/mL) für 30 min bei 37 °C. Der 37 °C - Wert entspricht 100 % Restaktivität. Die Bestimmung erfolgte in biologischen Duplikaten mit jeweils 3 technischen Triplikaten.

(A) Inaktivierungsverhalten der pro-mTG Wt (blaue, leere Kreise) und der pro-TG¹⁶ (schwarze, leere Kreise). Die Inkubationszeit betrug t = 30 min.

(B) Inaktivierungskinetik gereinigter pro-TG¹⁶ bei 65,0 °C (leere Kreise); 67,2 °C (leere Vierecke); 69,9 °C (leere Diamanten), 72,5 °C (leere Dreiecke), 74,9 °C (leere Sterne). Die Inkubationszeiten betragen t = 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, und 120 min.

Bemerkenswert ist dabei, dass Anzeichen einer Quervernetzungsaktivität detektiert werden konnten. Diese äußerte sich unter anderem in einem „gelatineartigen“ Zustand des Überstandes nach Inkubation bei 65 °C für 1 h. Weiterhin konnte mittels denaturierender PAGE - Analyse die Bildung von hochmolekularen Spezies (HMW) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3. 17; S. 80), welche während der Inkubation bei 65 °C entstanden sind. Dies impliziert eine zumindest partiell hitzeinduzierbare Aktivität der pro-TG¹⁶. Eine Folge daraus ist, dass es während der Inkubation bei 65 °C zur Quervernetzung der Wirtszellproteine kommt und diese in den unlöslichen Zustand überführt. Durch anschließende Zentrifugation ließen sich diese bei

geringer Beschleunigung ≤ 15.000 g von der löslichen Proteinfraction separieren. Die hitzeinduzierbare Transglutaminaseaktivität der pro-TG¹⁶ wurde, basierend auf den Erkenntnissen der Hitzereinigung, ebenfalls in einem Experiment bei den Temperaturen 60 °C, 65 °C, 70 °C und 75 °C nachgewiesen (siehe Anhang 13). Das Experiment wurde jedoch nur einmalig durchgeführt. Für eine Bestätigung der hitzeinduzierbaren Aktivität der pro – TG¹⁶ bedarf es einer Wiederholung des Experimentes, um die erhaltenen Resultate bzw. ermittelten Produktbildungsraten zu reproduzieren.

Zur vollständigen Aktivierung des Enzyms ist jedoch eine, meist proteolytische, Abspaltung des pro-Peptides notwendig. Hierfür eignet sich u.a die Proteinase K, welche eine N-terminale FRAP Extension zurücklässt [Sommer *et al.*, 2012].

In der Literatur [Kütemeyer *et al.*, 2005] und auch durch eigene Experimente konnte gezeigt werden, dass die Löslichkeit der aktivierten mTG nach Abspaltung des pro-Peptides stark von der Temperatur und Ionenstärke abhängt. So kommt es bei der Inkubation auf Eis oder bei 4 - 6 °C zur Pelletierung der mit Proteinase K aktivierten mTG. Dieser Prozess erwies sich als reversibel und die aktivierte mTG ließ sich bei RT resolubilisieren.

Für die Pelletierung der aktivierten mTG wurde eine Dialyse in 25 - 50 mM TRIS/HCl (MWC 25 kDa) bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Dies diente der Abtrennung vorhandener „Farbstoffe“ aus dem Medium. Eine Pelletierung in Eiswasser ist prinzipiell auch möglich und hätte den Vorteil, dass die Pelletierung der mTG in einem kürzeren Zeitrahmen erfolgt. Wie in Abb. 3. 17 zu erkennen, kann die TG¹⁶ durch die hier beschriebene Methode bandenrein isoliert werden (siehe Spur 8, Pellet nach Dialyse). Ebenfalls ist zu erkennen, dass die TG¹⁶ nicht vollständig pelletiert ist. Neben einer Verunreinigung mit einem höheren Molekulargewicht, verbleiben größere Mengen an TG¹⁶ im Überstand (siehe Spur 9, Überstand nach Dialyse). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Fällung ein konzentrationsabhängiger Prozess ist und aktive TG¹⁶ nur solange pelletiert, solange das System über der Löslichkeitsgrenze liegt. Eine erneute Konzentrierung der mTG im Überstand und nachfolgender Präzipitation bei niedriger Temperatur und niedrigem Salzgehalt dürfte den Verlust an Enzym minimieren. Dies würde den Prozess jedoch um mindestens zwei weitere Aufarbeitungsschritte erweitern.

Als besonders nachteilig zeigt sich, dass mit der TG¹⁶ auch aktive Proteinase K copräzipitiert. Dies ist erkennbar am proteolytischen Abbau der TG¹⁶ in Gegenwart von SDS ohne Proteinase K-Inhibitor (PMSF) (Spur 9). SDS wirkt aktivierend auf die proteolytische Aktivität der Proteinase K [Hilz *et al.*, 1975] und führt zum raschen Abbau der TG¹⁶. Ebenfalls befindet sich immer noch Proteinase K im Überstand (Dialysat) (Spur 10). Eine Möglichkeit zur Abtrennung der Proteinase K wurde noch nicht weiterverfolgt, wäre aber wünschenswert, da diese die TG¹⁶ über die Zeit abbaut.

Tab. 3. 8) Reinigungstabelle der TG¹⁶. Aufgeschlossen wurden 900 g *E. coli* BL21 GOLD (DE3)_pBS16. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte entsprechend Abschnitt 2.4-4 (S. 37) und die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte entsprechend Abschnitt 2.4-1 (S. 34).

Probe	V [mL]	Σ Protein [g]	c _{Protein} [mg/mL]	Σ Aktivität [U]	A _{spez} [U/mg]	Ausbeute [%]	RF
ÜS2	750	23,36	31,15	553378,4	23,7	100	1
ÜS3	660	10,66	16,15	461801,8	43,33	83,45	1,8
ÜS4	660	9,29	14,08	458135,1	49,3	82,79	2,1
P3 ^(a)	600	7,07	11,78	376096,1	53,2	67,96	2,3

a... resolubilisiert in 50 mM TRIS/HCl (pH = 8) und 300 mM NaCl, RF ...Reinigungsfaktor

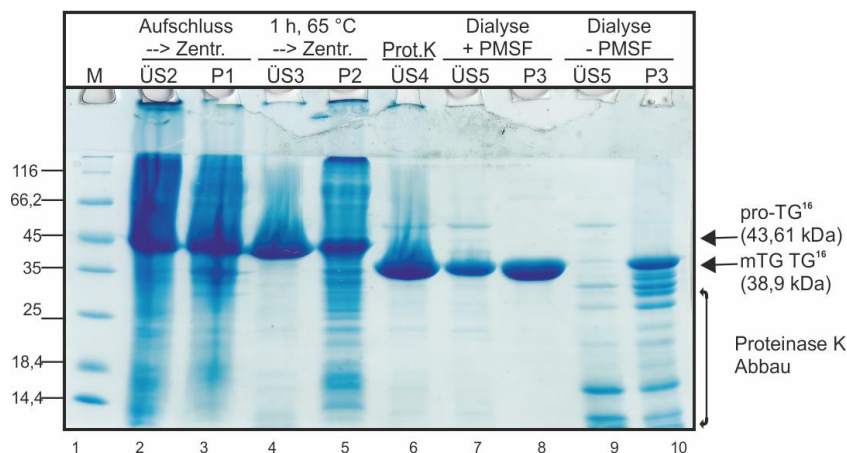


Abb. 3. 17) Reinigung zur Isolierung der TG¹⁶ mittels Hitzefällung.

950 g BFM wurden mit 900 mL 50 mM TRIS/HCl (pH = 8,0) aufgetaut und mittels UltraTurrax resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mittels Hochdruckhomogenisator (APV-2000) bei ~ 1000 bar in 3 Passagen aufgeschlossen und dann bei 15.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert (Avanti Beckmann, Rotor **JA-10**). Der Überstand wurde anschließend für 1 h bei 65 °C in einem Wasserbad erhitzt und anschließend bei 15.000 g für 0,5 h und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Aktivierung mit Proteinase K (0,6 U/mL Überstand) und eine Inkubation für 1,5 h bei 37 °C im Wasserbad. Der Überstand wurde ü.N. (16-20 h) in 25 – 50 mM TRIS/HCl dialysiert (MWC 25 kDa), mit DTT (c_{final} = 1 mM) und darauf folgend aliquotiert. Die Aliquote wurden bei 16.100 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet konnte anschließend bei - 20 °C gelagert oder in 50 mM TRIS/HCL (pH = 8,0, 300 mM NaCl) zur weiteren Analyse resolubilisiert werden.

M...Marker (MW, ThermoScientific); ÜS...Überstand; P...Pellet, PMSF ... Phenylmethylsulfonylfluorid

Durch Ausnutzen der erhöhten thermischen Resistenz der pro-TG¹⁶ konnte eine alternative, chromatographiefreie Reinigungsmöglichkeit etabliert werden, bei der die aktivierte TG¹⁶ elektrophoretisch rein (siehe Abb. 3. 17, Spur 8) mit einer A_{spez} von 53 U/mg isoliert werden konnte. Dabei ist zu beachten, dass es während der Resolubilisierung der präzipitierten TG¹⁶ und der nachfolgenden Aktivitätsbestimmung zu einem potentiellen partiellen Abbau dieser durch die Proteinase K kommen konnte und so der A_{spez} – Wert fehlerbehaftet ist. Die via Affinitätschromatographie gereinigte TG¹⁶ besitzt eine A_{spez} von 62 U/mg.

Die Reinigungsmethode lässt sich insbesondere im Werkstoffbereich gut einsetzen, da Aspekte wie die Produktion mittels GRAS Stämmen keine Rolle spielen. Zudem ist der apparative Aufwand vergleichsweise gering und die Kosten konnten durch Wegfallen von Chromatographie Material verringert werden. Als

problematisch erweist sich der Verbleib der Proteinase K im Pellet wie auch im Dialysat. Diese führt über die Zeit zum proteolytischen Verdau und damit zur Inaktivierung der mTG. Eine alternative Aktivierungsmöglichkeit der pro-mTG wäre für diese Reinigungsform äußerst vorteilhaft.

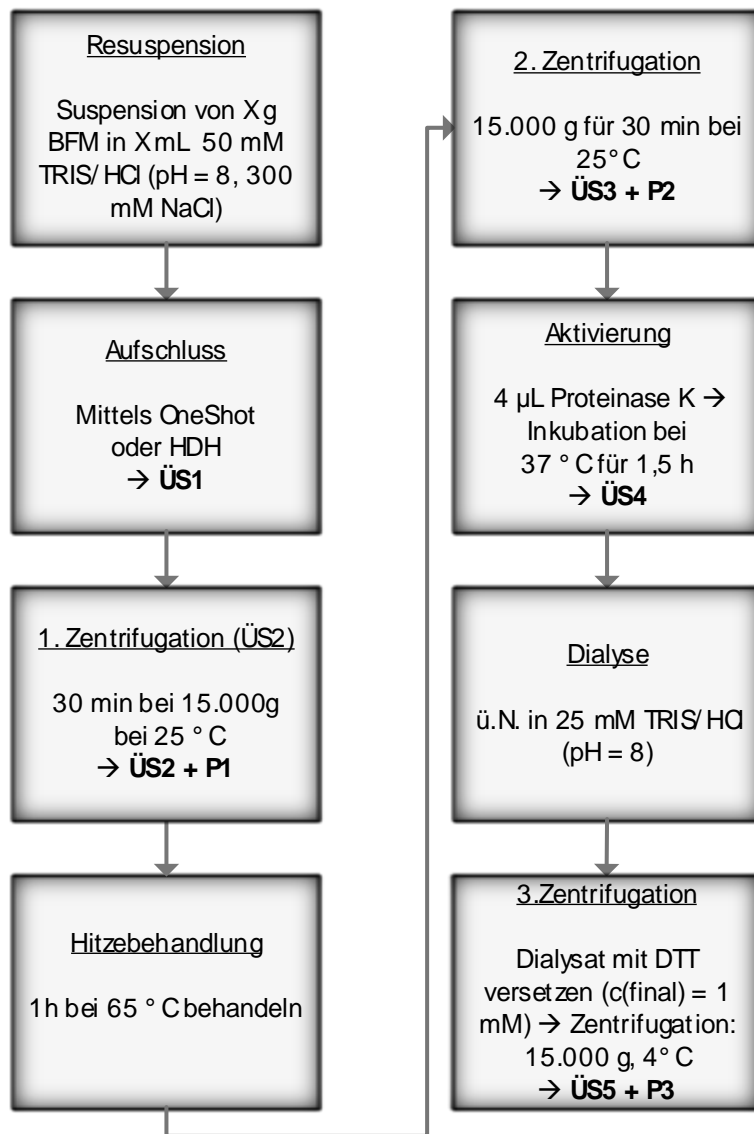


Abb. 3. 18) Allgemeiner schematischer Ablauf der Abtrennung von Wirtszellproteinen von der pro-mTG mittels Hitze.
BFM... Biofeuchtmasse, ü.N. ... über Nacht, X...jeweilig eingesetzte Menge an Biomasse / Puffer, ÜS ... Überstand, P ... Pellet

4.) Diskussion

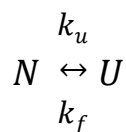
Aminosäuresubstitutionen, die zur thermischen Resistenz beitragen ([Buettner *et al.*, 2012; Marx *et al.*, 2008b)), wurden zur Generierung von neuen, thermoresistenten TG - Varianten miteinander kombiniert. Die resultierenden 31 Varianten wurden auf ihre Halbwertszeit ($t_{1/2}$) bei 60 °C getestet. Mit einer Halbwertszeit von ~38 min, was ca. dem 19-fachen der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Wildtyps (Wt) entspricht, erwies sich die TG¹⁶ mit den Mutationen S2P, S23Y, Y24N, H289Y und K294L als thermoresistenteste Variante. Ebenfalls zeigte diese eine erhöhte spezifische Aktivität (A_{spez}) für das CBZ-Gln-Gly-OH Substrat, sowie einen erhöhten Substratumsatz von β -Casein bei 60 °C im Vergleich zum Wt.

4.1) Zur Begrifflichkeit der thermodynamischen und kinetischen Stabilität

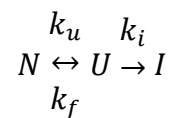
Der Begriff der Proteinstabilität kann unter den Gesichtspunkten einer generellen Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch thermische Einflüsse, Detergenzien (z.B. SDS), Proteasen oder ähnlichem verwendet werden. Ebenso kann eine Unterscheidung bezüglich der thermodynamischen Stabilität (auch Thermostabilität genannt) oder kinetischen Stabilität unternommen werden [Arnold, 2011]. Dabei ist es nicht ungewöhnlich, dass die Stabilität der Proteine sowohl thermodynamisch als auch kinetisch kontrolliert sein kann [Sanchez-Ruiz, 2010; Vieille und Zeikus, 2001]. Zur Charakterisierung der kinetischen Stabilität wird oftmals die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) [Polizzi *et al.*, 2007] oder die Inaktivierungsenergie (E_A) [Vieille und Zeikus, 2001] genutzt.

Im Fall der thermodynamischen Stabilität geht man von einem Gleichgewicht zwischen dem nativen (N) und dem ungefalteten (U, dies schließt auch partiell entfaltete Zustände mit ein) Zustand des Proteins aus [Sanchez-Ruiz, 2010] (siehe Schema 1 und Abb. 4. 1 a). Das Protein ist dabei unter thermodynamischer Kontrolle, wenn der native Zustand ein globales Minimum der freien Energie (ΔG) besitzt [Baker und Agard, 2002; Murphy, 2001]. Die Stabilität wird demnach ausgedrückt als Differenz der freien Energie zwischen dem nativen und dem ungefalteten Zustand. Da bei einer thermodynamischen Stabilisierung ein striktes Gleichgewicht herrscht, kann neben der Angabe der freien Energie auch die Gleichgewichtskonstante oder der Umschlagspunkt im Schmelzdiagramm (T_M , auch Schmelzpunkt genannt) des Proteins angegeben werden [Polizzi *et al.*, 2007; Vieille und Zeikus, 2001]. Prominente Beispiele für thermodynamisch stabilisierte Proteine sind u.a. die RNaseA, Barnase oder das *hen egg white* Lysozym (HEW).

Schema 1: Gleichgewichtsreaktion



Schema 2: Lumry-Eyring Model



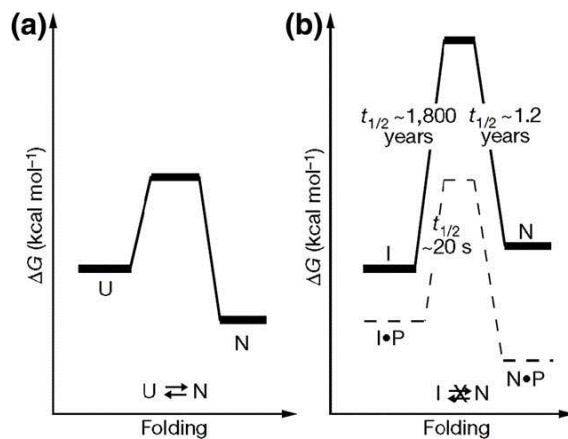


Abb. 4. 1) Vergleich von Faltungsenergiendiagrammen eines thermodynamisch stabilisierten Zustandes (a) und eines kinetisch stabilisierten Zustandes am Beispiel der α -lytic Protease (b). Das Diagramm wurde der Publikation [Jaswal *et al.*, 2002] entnommen.

(a) Thermodynamisch stabilisiertes Protein. Der ungefaltete (U) und der native (N) Zustand sind im Gleichgewicht, wobei der native Zustand energetisch begünstigt ist.

(b) Kinetische Stabilisierung der α -lytic Protease. Die durchgezogene Linie zeigt die energetischen Zustände ohne Propeptid. Die Umwandlung des nativen (N) Zustand in ein intermediäres (I) Faltungsprodukt wird durch eine hohe energetische Barriere verlangsamt. Es bildet sich kein Gleichgewicht zwischen dem instabileren nativen Protein und dessen intermediären Entfaltungsprodukt. Bei Anwesenheit des Propeptides sinkt die zu überwindende Energiebarriere des Faltungsweges und das native Protein nimmt einen energetisch günstigeren Zustand ein als I. Die Faltung zu N ist daher begünstigt [Jaswal *et al.*, 2002].

Eine kinetische Stabilisierung eines Proteins kann vorliegen, wenn zwar der native Zustand thermodynamisch stabilisiert ist (die freie Energie von N ist kleiner als U), aber eine „Abreaktion“ des ungefalteten Zustandes (oder anderer intermediären Zustände) in einem inaktiven, nicht-reversiblen finalen Zustand stattfindet (Schema 2) [Lumry *et al.*, 1954; Sanchez-Ruiz, 2010]. Hierbei stellt sich kein Gleichgewicht mehr ein. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung hängt davon ab, welcher Prozess schneller abläuft. Sie ist demnach kinetisch kontrolliert. Neben diesem Szenario kann ein Protein auch vollständig kinetisch stabilisiert sein, d.h. der native Zustand N ist thermodynamisch instabiler als U oder I. Diese Art der Stabilisierung tritt gehäuft bei Proteinen auf, deren Faltungsweg in den nativen Zustand durch Chaperone oder Pro-Peptide katalysiert wird. Ein bekanntes Beispiel in der Literatur ist die α -lytic Protease bei der der native Zustand instabiler als der gefaltete Zustand ist (siehe Abb. 4. 1 b). Das Enzym wird jedoch als Zymogen mit kovalent gebundenem Propeptid synthetisiert. Dieses fungiert als Faltungshelfer und wird erst nach Erreichen des nativen Zustands proteolytisch abgespalten. Der native Zustand (N) wird durch eine hohe energetische Barriere (Aktivierungsenergie für die Entfaltung) beibehalten, wodurch die Entfaltung nur sehr langsam unter physiologischen Bedingungen stattfindet (siehe Abb. 4. 1 b) [Baker und Agard, 2002; Cunningham *et al.*, 1999; Jaswal *et al.*, 2002]. Weitere Beispiele für kinetisch stabilisierte Proteine sind z.B. die Protease B aus *Streptomyces griseus* oder die Subtilisin Protease BPN1 aus *Bacillus amyloliquefaciens* [Eder *et al.*, 1993].

Es ist anzumerken, dass die hohe kinetische Stabilität eine wichtige physiologische Rolle im Fall der oben genannten Proteasen spielt. Bei einer thermodynamischen Stabilisierung, bei der N und U im Gleichgewicht sind, geht man von keiner hohen energetischen Barriere zwischen den beiden Zuständen aus. Das hat zur

Folge, dass die Bildung von U im Allgemeinen deutlich schneller abläuft als bei einer kinetischen Stabilisierung mit einer hohen energetischen Barriere. Findet nun eine schnelle Bildung von N zu U statt, kommt es, unter Bezug zu den oben genannten Proteasen, zu einer Autoproteolyse des Enzyms (das native Protein stellt kein Substrat dar). Bei einer langsamen Umwandlung von N zu U, also einer kinetisch stabilisierten Protease, ist deren biologische Halbwertszeit im Vergleich zur thermodynamischen Stabilisierung deutlich erhöht. In Abb. 4. 2 ist dies zur Verdeutlichung nochmals schematisch dargestellt [Colón *et al.*, 2017; Jaswal *et al.*, 2002; Sanchez-Ruiz, 2010].

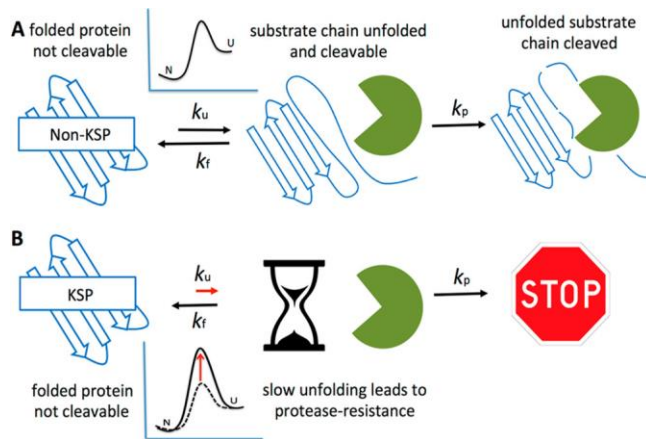


Abb. 4. 2) Schematische Darstellung wie kinetische Stabilität (B) zu einer erhöhten proteolytischen Resistenz gegenüber thermodynamischer Stabilität führen kann. Die Abbildung wurde der Publikation [Colón *et al.*, 2017] entnommen.

Für die vorliegende Arbeit ist aufgrund der irreversiblen thermischen Inaktivierungsreaktion eine Auswertung entsprechend Schema 1 (S. 48) nicht möglich. Trotzdem kann z.B. durch Einbringen der Aminosäuresubstitutionen eine Stabilisierung der nativen Struktur stattgefunden haben. Dies würde einer thermodynamischen Stabilisierung entsprechen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass eine Erhöhung der energetischen Barriere zum ungefalteten Zustand erreicht wurde, was einer kinetischen Stabilisierung entspräche. Da beide „Effekte“ zu einer verlangsamten Inaktivierung führen würden und eine thermodynamische Analyse der Inaktivierungsreaktion nicht erfolgte, ist eine Unterscheidung aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente nicht möglich. Es wird daher der allgemeinere Begriff der „thermischen Resistenz“ verwendet.

Nichtsdestotrotz lassen sich zu den oben beschriebenen Proteasen Parallelen bezüglich der Stabilisierung der mTG ziehen:

(1) Die native *Sm* mTG wird ebenfalls als Zymogen mit kovalent gebundenem Propeptid synthetisiert. Hier liegen bereits Untersuchungen in der Literatur vor, dass das Propeptid eine faltungshelfende und stabilisierende Wirkung besitzt [Pasternack *et al.*, 1998; Rickert *et al.*, 2016].

(2) Ähnlich der autoproteolytischen Resistenz der Proteasen aufgrund ihrer kinetischen Stabilität konnte auch für die mTG und deren erzeugten Varianten keine Selbstquervernetzung des nativen Enzyms bei

ambienten Temperaturen ($\leq 37\text{ °C}$) festgestellt werden. Erst bei erhöhter Temperatur ($\geq 60\text{ °C}$, nicht-physiologischen Bedingungen) und einer damit einhergehenden Auffaltung, findet eine Selbstquervernetzung statt (größtenteils intramolekular) (siehe 3.1-5, S. 59). Analog zur α -lytic Protease scheint die aktive mTG vor einer autokatalytischen Inaktivierung (hier Selbstquervernetzung) durch eine ausreichend hohe energetische Barriere geschützt zu sein. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass die mTG vornehmlich kinetisch stabilisiert ist und dies u.a. dem Schutz vor einer autokatalytischen Selbstquervernetzung dient.

4.2) Einordnung der thermoresistenten TG¹⁶ in die bestehende Literatur

Eine Übersicht über bereits publizierte Varianten der Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis*, inklusive der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen TG¹⁶, ist in Tab. 4. 1 (S. 86) dargestellt. Neben der thermischen Resistenz wurden auch Literaturstellen einbezogen, die den Fokus auf die Erhöhung der spezifischen Aktivität legen. In Tab. 4. 1 ist zu erkennen, dass sich die TG¹⁶ in den bisher publizierten Varianten vorne mit „einreicht“, nimmt man die Thermoresistenz als Kriterium.

In der Literatur sind bereits mehrere Versuche beschrieben, die thermische Resistenz des Enzyms zu erhöhen. So beschrieben Yokoyama und Kollegen erst kürzlich ein rationales Design zur Stabilisierung der Struktur der *Sm* TG mittels Disulfidbrücken (Cystinen) [Yokoyama *et al.*, 2021]. Hierbei wurden mehrere TG - Varianten erzeugt und hinsichtlich ihrer thermischen Resistenz beschrieben. Die Variante T7C/E58C zeigte eine Steigerung des Schmelzpunktes (T_M , analysiert mittels CD-Aufnahmen, Heizrate = $0,7\text{-}0,8\text{ °C}$ pro Minute) im Vergleich zur Wt mTG, um $4,3\text{ °C}$. Die Angaben der entsprechenden T_M - Werte für die Varianten bzw. dem Wildtyp sind in der Publikation jedoch nicht aufgeführt. Versucht man aus der Abbildung den T_M - Wert für die Wt mTG zu entnehmen, so lässt sich ein Umschlagspunkt kurz unter der 60 °C Marke abschätzen. Dies würde im Bereich des in der vorliegenden Arbeit ermittelten T_M - Wertes von $58,1\text{ °C}$ (siehe Tab. 3. 1, S. 51) liegen. Der abgelesene T_M - Werte für die Wt mTG liegt somit in einem vergleichbaren Temperaturbereich mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten T_M - Werten. Nimmt man die Differenz des T_M - Wertes zur Wt mTG als Maß, so weist die TG¹⁶ eine höhere Differenz ($7,9\text{ °C}$) und damit eine höhere thermische Resistenz als die T7C/E58C - Variante (Differenz von $4,3\text{ °C}$ zur Wt mTG) auf. Diese Aussage ist jedoch unter Vorbehalt zu nehmen, da die wirklich gemessenen Werte fehlen. Nichtsdestotrotz ist festzuhalten, dass die Heizrate mit $0,7\text{ - }0,8\text{ °C}$ geringer eingestellt wurde als die in der vorliegenden Arbeit. Eine geringere Heizrate kann zu einer Verschiebung des T_M - Wertes in niedrigere Temperaturbereiche führen [Zainal *et al.*, 2021]. Neben der Bestimmung des T_M - Wertes wurde ebenfalls die Restaktivität der disulfidverbrückten Varianten nach 10-minütiger Inkubation bei 65 °C analysiert. Hier ermittelten Yokoyama und Kollegen eine Restaktivität von 28% [Yokoyama *et al.*, 2021]. Zur Ermittlung der Inaktivierungsenergie in der vorliegenden Arbeit, wurden ebenfalls Inaktivierungskinetiken für die TG¹⁶ bei 65 °C über einen Zeitraum von $t = 0\text{ - }30\text{ min}$ erstellt. Die dadurch ermittelte Restaktivität nach 10 min

bei 65 °C beträgt 22 % (+/- 0,9 %, biologische Duplikate mit technischen Triplikaten). Die T7C/E58C - Variante scheint in diesem Fall eine geringfügig höhere thermische Resistenz aufzuzeigen. Ob die TG¹⁶ oder die T7C/E58C – Variante eine höhere thermische Resistenz aufweisen, kann aufgrund der fehlenden Angaben/Daten in der Publikation von [Yokoyama *et al.*, 2021] nicht eindeutig beantwortet werden. Nimmt man den T_M - Wert, welcher die Auffaltung der Struktur charakterisiert, als Kriterium, scheint die TG¹⁶ eine höhere thermische Resistenz aufzuweisen. Nimmt man den Verlust an Aktivität bei 65 °C als Detektionsmöglichkeit, so sind beide in ihrem Ergebnis vergleichbar bzw. die T7C/E58C - Variante scheint eine leicht erhöhte thermische Resistenz aufzuzeigen.

Neben der thermischen Resistenz wurde ebenfalls die spezifische Aktivität (A_{spez}) nach [Folk und Cole 1966] der disulfidverbrückten Varianten ermittelt. Für die Wt mTG fand man eine A_{spez} von 27 U/mg und für die T7C/E58C - Variante eine A_{spez} von 22 U/mg (Bradford, BSA als Kalibrierstandard). Durch Einfügen einer Disulfidbrücke kam es also zur Verringerung der spezifischen Aktivität für das Substrat CBZ-Gln-Gly-OH. Wie in der vorliegenden Arbeit unter Abschnitt 3.1-9 (S.67) geschildert, lässt jedoch eine verringerte A_{spez} für das Substrat CBZ-Gln-Gly-OH keine Rückschlüsse auf sterisch anspruchsvollere, proteinogene Substrate zu und stellt, je nach Anwendung, nicht unbedingt einen Nachteil dar.

Tab. 4. 1) Übersicht der Literatur zur Optimierung der thermischen Resistenz bzw. der Aktivität der mTG.

Ursprungs-Organismus	Variante (Aminosäure-substitutionen)	Methode	N-Terminus	t _{1/2} (60°C) [min ⁻¹]	A _{spez} [U/mg] ¹	T _M [°C]	Referenz
Sm	S2P	randomisierte Mutagenese	FRAP-	4,6	43 ²	n.a.	[Marx <i>et al.</i> , 2008b]
	TG ⁰⁴ (S2P)	<i>Golden gate cloning</i>	FRAP-	3,9	63,2	59,8	vorliegende Arbeit
Sm	T7C/E58C	Einfügen von	---	n.a.	22,2	62-65 ³	[Yokoyama
	Wt	Cystinen		n.a.	27	< 60 ³	<i>et al.</i> , 2021]
Sm	Wt	Sättigungs-		2,0	26	n.a.	
	S2P	mutagenese	FRAP-	2,9	46	n.a.	[Buettner <i>et al.</i> , 2012]
	UH308-B (S23V, Y24N, K294L)	<i>DNA-shuffling</i>		24,3	39	n.a.	
	Wt UH308-B (S23V, Y24N, K294L)	<i>Golden gate cloning</i> <i>DNA-shuffling</i>	FRAP-	2,0 16	35 46	58,1 n.a.	vorliegende Arbeit
Sm	DM01 (S2P, S23V, S24N, S199A, K294L)	gezielte Mutagenese	AP-	24,8	55,7	n.a.	[Mu <i>et al.</i> , 2018]
Sm	20, 62, 171 (Einbau von 3-Chloro-L-Tyrosin)	genetische Code Expansion	n.a. ⁴	n.a.	n.a.	n.a.	[Ohtake <i>et al.</i> , 2018]
Sm	TG ¹⁶ (S2P, S23Y, Y24N, K294L, H289Y)	<i>Golden gate cloning</i>	FRAP-	38	62,2	65,9	vorliegende Arbeit
Sm	FRAPD-TGm3	<i>Proli-scan + surface-charge-design</i>	FRAPD	122	84	68,7	[X. Wang <i>et al.</i> , 2021]

¹ detektiert nach [Folk und Cole, 1966], n.a...nicht angegeben, Sm...*Streptomyces mobaraensis*, ² angegeben in [Sommer *et al.*, 2011], ³ kein absoluter Wert angegeben, Wert aus Abb. 5 [Yokoyama *et al.*, 2021] geschätzt, ⁴ keine Angaben der Autoren, Aktivierung erfolgte mittels Alcalase, Einfluss auf verbliebenen N-terminale Extensionen ist unbekannt

In einem anderen methodischen Ansatz etablierten Yokoyama und Kollegen ein Protokoll zum Einbau von halogenierten Tyrosinen in Proteine [Ohtake *et al.*, 2018]. Durch Einbau von Chlor-Tyrosin-Derivaten an den Positionen 20, 62 und 171 konnte eine relative Steigerung der Halbwertszeit bei 60 °C um den Faktor 5,1, sowie eine relative Steigerung der Gesamtaktivität um 1,4 im Vergleich zur Wt mTG ermittelt werden. Leider wurden von den Autoren keine absoluten Halbwertszeiten oder spezifischen Aktivitäten genannt, sodass auch hier der direkte Vergleich nur bedingt möglich ist. Nimmt man jedoch die relative Steigerung der Halbwertszeit und der spezifischen Aktivität „als Maß“, so weist die TG¹⁶ eine höhere thermische Resistenz bzw. spezifische Aktivität auf.

In einem rationalen Ansatz wurden, basierend auf den Ergebnissen von [Marx *et al.*, 2008b], [Yokoyama *et al.*, 2010] und [Buettner *et al.*, 2012], drei Varianten mit je fünf Aminosäuresubstitutionen generiert [Mu *et al.*, 2018]. Jede der drei Penta-Varianten beinhaltet die Substitutionen S23V, Y24N und K294L, sowie variierend die Substitutionen S2P, S199A und K269D. Die thermoresistenteste Variante, die DM01 (S2P, S23V, Y24N, S199A, K294L), besitzt eine A_{spez} von 55,7 U/mg und eine $t_{1/2}(60\text{ °C})$ von 24,8 min. Vergleicht man die Halbwertszeit mit der UH308-B (S23V, Y24N, K294L) [Buettner *et al.*, 2012] mit denen der DM01, so lässt sich keine Verbesserung hinsichtlich der thermischen Resistenz erkennen. Vergleichend, sowohl zur UH308-B wie auch der DM01 - Variante, weist die TG¹⁶ eine um ~13 min höhere Halbwertszeit bei 60 °C auf. Die von [Mu *et al.*, 2018] ermittelte erhöhte A_{spez} von ~ 56 U/mg zeigt ähnlich erhöhte Werte bezüglich des Wildtyps auf, wie die Varianten in der vorliegenden Arbeit, bei denen die S2P – Substitution vorliegt (65 +/- 5 U/mg) (siehe 3.1-7, S. 63). Dies untermauert die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Annahme, dass die erhöhte spezifische Aktivität der Varianten der S2P-Substitution zuzuordnen ist. Die S199A Substitution der DM01 entstammt aus einer Publikation von [Yokoyama *et al.*, 2010], welche eine Erhöhung der A_{spez} auf 42,9 U/mg bei Vorhandensein des N - terminalen FRAP - Restes bewirkte. Ist kein FRAP - Rest vorhanden, sinkt die Aktivität auf 30 U/mg [Yokoyama *et al.*, 2010]. Eine FRAP - Extension verbleibt nach einer unvollständigen Abspaltung des Pro-Peptides (siehe 1.1-2, S. 3). Obwohl Yokoyama und Kollegen einen Unterschied in der Aktivität feststellten, so konnte in der vorliegenden Arbeit und in anderen Publikationen [Marx *et al.*, 2008; Zotzel *et al.*, 2003b] ein Einfluss auf die Aktivität durch die FRAP-Extension nicht festgestellt werden. Für die DM01 erfolgte die Aktivierung mittels der Endoprotease Trypsin, welche eine N - terminale Extension von AP hinterlässt und nicht FRAP. Dies könnte ein Grund sein, dass es zu keiner zusätzlichen Erhöhung der A_{spez} durch die S199A Substitution kam.

Basierend auf der DM01 – Variante kam es bei der finalen Bearbeitung der vorliegenden Arbeit zur Publikation einer weiteren Arbeit, welche sich mit der Steigerung der thermischen Resistenz befasste. Hierbei wurde die Variante FRAPD-TGm3 generiert. Diese Variante besitzt eine zusätzliche N-terminale Extension aufgrund einer Fusionsierung des Propeptides aus *S. hygroscopicus* mit Thioredoxin - Gen (*TrxA*), welches eine bessere Expressionsrate zur Folge haben soll und einer nachträglichen *in vitro* - Aktivierung mittels Dispase [X. Wang *et al.*, 2021]. Durch Fusionierung des muren Peptides der

Sm mTG mit dem Pro-Peptid aus *S. hygroscopicus*, weist der N – Terminus der aktivierten FRAPD-TGm3 Variante nach Aktivierung mittels Dispase ein zusätzliches Aspartat auf im Unterschied zu TG – Varianten bei denen das Pro-Peptid aus *S. mobaraensis* stammt. Für die FRAPD-TGm3 wurden eine $t_{1/2}(60\text{ °C})$ von ~ 123 min, eine A_{spez} von 84 U/mg und einen T_M von 68,7 °C. Vergleichend hierzu zeigt die TG¹⁶ aus der vorliegenden Arbeit eine $t_{1/2}(60\text{ °C})$ von ~ 38 min, eine A_{spez} von 62 U/mg (via A_{280}) und einen T_M - Wert von 65,9 °C. Die FRAPD-TGm3 zeigt bezüglich der drei aufgeführten Parameter deutliche Verbesserungen.

Neben der Halbwertszeit der TG¹⁶ wurden zur Vergleichbarkeit in der vorliegenden Arbeit die Halbwertszeiten bei 60 °C für die Wt mTG, der TG⁰⁴(S2P) und der UH308-B erneut getestet. Bezüglich der Wt mTG und der TG⁰⁴(S2P) decken sich die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte (siehe Tab. 3. 1, S. 51) mit denen der Literatur [Buettner *et al.*, 2012; Marx *et al.*, 2008b]. Für die UH308-B Variante wurde jedoch eine $t_{1/2}(60\text{ °C})$ von 16 min ermittelt, was den von [Buettner *et al.*, 2012] ermittelten Wert von 24,3 min um 8,3 min unterschreitet. Da die Originaldaten (Laborbuch 4, 09.12.2010) innerhalb der Arbeitsgruppe Pietzsch weiterhin vorlagen, wurden diese erneut in die Auswertesoftware Origin[®] (b9.3.2.303 (Lehre)) eingegeben, und eine Halbwertszeit von 20,1 min errechnet (siehe Abb. 4. 3 (A)). Vergleichend hierzu sind in Abb. 4. 3 (B) die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten bezüglich der UH308-B dargestellt. In Abb. 4. 3 (C) sind beide Datensätze (Buettner und vorliegende Arbeit) in einem Diagramm übereinandergelegt. In Abb. 4. 3 (C) ist zu sehen, dass die Datensätze von Buettner und der vorliegenden Arbeit bis zu einem Zeitraum von 0 - 20 min gut miteinander übereinstimmen. Abweichend zu den Daten der vorliegenden Arbeit kommt es bei Buettner jedoch in dem Zeitraum von 22 – 30 min zu keinem weiteren Abfall der Restaktivität. Dies führt zu einer unterschiedlichen Krümmung der Anpassungsfunktion und so zu der erhöhten berechneten Halbwertszeit von 20,1 min. Eine bessere Anpassung der Daten an eine Funktion des Zerfalls erster Ordnung ließe sich durch Verfolgen der Inaktivierung bis zu einer Restaktivität von Null erreichen.

Zusätzlich scheint es bei den von Buettner (2012) erhaltenen Inaktivierungskurven zu einer kurzzeitigen Steigerung der Initialaktivität (Werte nach 1 – 2 min sind erhöht) zu kommen, was ebenfalls zu geringen Abweichungen führen kann. Der berechnete Unterschied in den Halbwertszeiten von $t_{1/2} = 20,1$ min (Buettner) vs. $t_{1/2} = 15,97$ min (vorliegende Arbeit, Tab. 3. 1, S. 51) ließe sich so erklären. Es bleibt jedoch weiterhin eine Differenz zur der publizierten Halbwertszeit von $t_{1/2} = 24,3$ min [Buettner *et al.*, 2012]. Neben dem Vergleich der ermittelten Restaktivitäten bezogen auf die Zeitpunkte, lässt sich ebenfalls die in der vorliegenden Arbeit verwendete Anpassungsfunktion mit der von Buettner verwendeten Anpassungsfunktion (Buettner, Laborbuch 4, 09.12.2010) vergleichen. Daher wurde eine Anpassung entsprechend der in Laborbuch 4 (09.12.2010) von Buettner angegebenen Anpassungsfunktion durchgeführt (siehe Abb. 4. 3 (D)). Sowohl die in der vorliegenden Arbeit als auch die von Buettner genutzte Anpassung basiert auf einem exponentiellen Zerfall erster Ordnung entsprechend Formel (13):

$$(13) \quad y = A_1 * e^{-\frac{x}{t_1}} + y_0$$

A_1 = Amplitude, y = Restaktivität, t_1 = Zeitkonstante, y_0 = *offset*

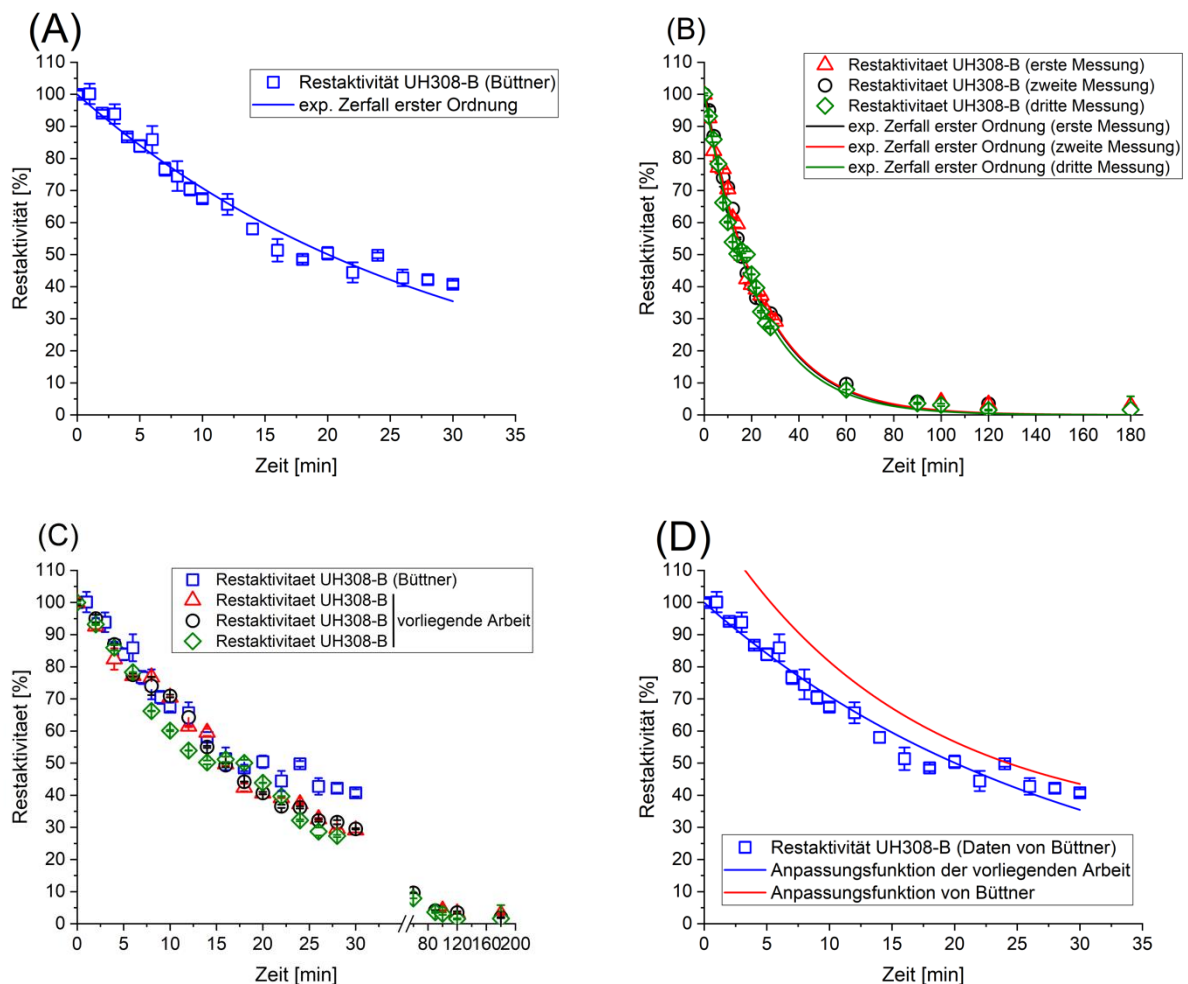


Abb. 4.3 Vergleich der ermittelten Halbwertszeiten für die UH308-B.

(A) Auftragung der Originaldaten von Büttner (Laborbuch 4, 09.12.2010). $R^2 = 0,97$; $t_{1/2} = 20,1$ min

(B) Auftragung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten.

Erste Messung: $R^2 = 0,99$; $t_{1/2} = 16,6$ min

Zweite Messung: $R^2 = 0,99$; $t_{1/2} = 16,5$ min

Dritte Messung: $R^2 = 0,99$; $t_{1/2} = 15,4$ min

(C) Vergleichende Darstellung der verwendeten Datensätze von Büttner (Laborbuch 4, 09.12.2010) und der Datensätze in der vorliegenden Arbeit.

(D) Vergleich der verwendeten Anpassungsfunktion der vorliegenden Arbeit (blau) und der von Büttner angegebenen Funktion (Laborbuch 4, 09.12.2010). Von Büttner verwendete Parameter $A_1 = 100$, $y_0 = 28,90199$ und $t_1 = 15,60703$

($R^2 = 0,047$). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Anpassungsfunktion des Datensatzes UH308-B wurden folgende Parameter genutzt: $A_1 = 100$, $y_0 = 0$ und $t_1 = 28,94058$ ($R^2 = 0,97$). Die aus den Funktionen berechneten Halbwertszeiten betragen $t_{1/2} = 24,3$ min (Büttner, rote Anpassungsfunktion) bzw. 20,1 min (vorliegende Arbeit, blaue Anpassungsfunktion).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *offset* der Y-Achse von Null und eine Amplitude von 100 % verwendet. Büttner setzte ebenfalls die Amplitude auf 100 %, beließ aber den *offset* auf den von der Auswertesoftware (Origin) vorgeschlagenen Wert von 28,9 %. Dementsprechend wurde die Funktion entlang der Y-Achse nach oben verschoben. Die daraus zu ermittelnde Halbwertszeit von 24,3 min

entspricht der angegebenen Halbwertszeit der Publikation [Buettner *et al.*, 2012] ist jedoch falsch, da die Anpassungsfunktion nicht mit den real ermittelten Daten übereinstimmt (siehe Abb. 4. 3 (D), $R^2 = 0,047$). Nach derzeitigem Stand des Wissens, weist die TG¹⁶ die zweithöchste thermische Resistenz in der Literatur auf (siehe Tab. 4. 1, S. 86). Es ist jedoch möglich, dass die disulfidverbrückte Variante T7C/E58C [Yokoyama *et al.*, 2021] eine ähnlich hohe thermische Resistenz aufweist. Jedoch werden in dieser Publikation absolute Werte (T_M - Wert, Halbwertszeiten) nicht genannt und erschweren daher die Einordnung der Variante hinsichtlich ihrer thermischen Resistenz. Vergleichende Experimente dieser Variante mit der TG¹⁶ würden mehr Aufschluss über die Einordnung zur Thermoresistenz bringen. Weiterhin wäre es interessant zu sehen, ob eine Kombination der Substitutionen der TG¹⁶ und der T7C/E58C synergistische Effekte auf die Thermoresistenz hat, wie die Autoren in der Publikation von [Yokoyama *et al.*, 2021] ausführten.

Neben der thermischen Resistenz, wurde in Tab. 4. 1) ebenfalls die spezifische Aktivität (A_{spez}) mit aufgeführt, um den Einfluss der Mutationen auf die Aktivität abschätzen zu können. Es ist anzumerken, dass die ermittelten A_{spez} in der vorliegenden Arbeit nicht den i. A. angegebenen Literaturwerten entsprechen. So liegen publizierte Werte für die *Sm* mTG (Wt, rekombinant und nativ) zwischen 22,6 U/mg und 27,2 U/mg [Ando *et al.*, 1989; Sommer *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2010] bzw. für die mTG(S2P) mit 43,1 U/mg [Sommer *et al.*, 2012] vor. Marx und Kollegen ermittelten eine A_{spez} für die gereinigte *Sm* mTG (gereinigt aus ActivaWM - Mischung) von 31 U/mg [Marx *et al.*, 2008]. Es werden in der Literatur jedoch auch A_{spez} - Werte für hochreine *Sm* mTG von 36 U/mg genannt [Zotzel *et al.*, 2003b]. Diese ermittelte spezifische Aktivität ist mit der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten A_{spez} von 40 U/mg der rekombinanten Wt mTG durchaus vergleichbar. Da die Messung der spezifischen Aktivität in hohem Maße von der Reinheit der Proteinpräparation, sowie von der Messmethode der Proteinkonzentration abhängt, können sich Unterschiede in den Werten ergeben. Bei der Reinheit der Proteinpräparation gilt, je reiner das entsprechende Enzym vorliegt, desto höher die A_{spez} . Im Fall der Messmethode kann u.a. die Wahl des Standardproteins, welches für die Anfertigung der Kalibration genutzt wird, durchaus zu Unterschieden führen. Aufgrund dessen nutzte [Buettner *et al.*, 2012] einen ermittelten Faktor von 1,4 um vergleichbare Werte zu den spezifischen Aktivitäten zu erhalten, die mittels Bradford ermittelt wurden. Hierfür wurden die mittels UV - Absorption (A_{280}) erhaltenen Proteinkonzentrationen mit einem Faktor von 1,4 multipliziert. Dadurch steigt der Wert der Proteinkonzentration und die berechnete A_{spez} sinkt.

Zur Reproduktion und Nachvollziehbarkeit des von Buettner ermittelten Faktors und zum besseren Vergleich mit publizierten Werten, wurde in einem gesonderten Experiment die spezifische Aktivität mit einer Proteinkonzentration berechnet, die sowohl mittels Bradford-Methode (siehe 2.4-1, S. 34, Kalibration mit BSA) bestimmt wurde, als auch mittels A_{280} - Messung (siehe 2.4-2, S. 34). Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 4. 2 (S. 93) dargestellt. Zur Ermittlung des Faktors wurden die Wt mTG, die TG⁰⁴, die TG¹⁶ und die

UH308-B genutzt. Vergleichend hierzu sind die publizierten Werte von [Buettner *et al.*, 2012] ebenfalls in Tab. 4. 2 (S. 93) mit dargestellt. Die theoretisch, resultierenden A_{spez} - Werte via A_{280} - Messung von [Buettner *et al.*, 2012] wurden durch Multiplikation mit dem Faktor 1,4 des angegebenen A_{spez} - Wertes für die jeweilige Variante berechnet. Das diese kalkulierten A_{spez} - Werte (mit dem Faktor 1,4) mit den real ermittelten Werten in guter Näherung übereinstimmen, lässt sich z.B. anhand der Abbildung 3 aus der Publikation von [Buettner *et al.*, 2012] entnehmen (dargestellt in Anhang 14, Abb.8. 8, S. 153). In der vorliegenden Arbeit, wurde ein Faktor (Quotient aus Enzymkonzentration via A_{280} / Enzymkonzentration via Bradford (kalibriert mit BSA)) von 0,65 (Kehrwert: 1,54) errechnet. Dieser entspricht dem von [Buettner *et al.*, 2012] angegebenen Faktor von 0,71 (Kehrwert: 1,4) in guter Näherung. Dividiert man nun die in der vorliegenden Arbeit ermittelten A_{spez} - Werte für die einzelnen Varianten mit 1,5, so erhält man vergleichbare A_{spez} - Werte mit denen der Literatur aufgeführten (siehe Tab. 4. 2).

Aus dem oben dargestelltem Experiment bleibt jedoch offen, ob der ermittelte Faktor durch Kalibrierung der Bradford Methode mittels BSA als Referenzprotein resultiert oder aber ob es an der Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung an sich liegt. Um den Einfluss des Kalibrierproteins zu auszuschließen, wurde eine Kalibrierung mit der TG^{04} (S2P) nach Bradford durchgeführt und mit einer TG^{04} - A_{280} - Kalibrierung verglichen. Hierfür wurde zunächst eine TG^{04} (S2P)-Stammlösung hergestellt durch Solubilisierung eines Enzympellets. Diese wurde anschließend auf eine initiale Konzentration von 1 mg/mL in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:5, 1:3,33, 1:2,5 und 1:2 angefertigt und nach der Bradford-Methode (siehe 2.4-1, S. 34) gemessen (siehe Abb. 4. 4). Die Herstellung der 1 mg/mL Enzymlösung erfolgte durch Bestimmung der Proteinkonzentration mittels A_{280} - Messung (siehe 2.4-2, S. 34). Vergleichend zur Bradford - Messung wurde die Proteinkonzentration der Verdünnungslösungen erneut mittels A_{280} - Messung bestimmt. Die Ergebnisse der erhaltenen Datenpunkte und der daraus ermittelten linearen Anpassungsfunktion sind in Abb. 4. 4 dargestellt.

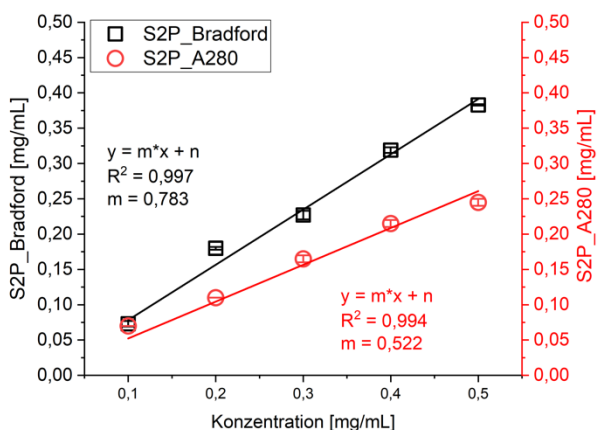


Abb. 4. 4) Vergleich des Anstieges der ermittelten linearen Regressionsgeraden für die Verdünnungslösungen der TG^{04} mittels Absorptionsmessung bei 280 nm ($S2P_{A280}$) und der Bradford - Methode bei 595 nm ($S2P_{Bradford}$).

Aus den bestimmten Absorptionswerten der entsprechenden Methode wurde jeweils eine Regressionsgerade ermittelt. Wie in Abb. 4. 4 ersichtlich ist der berechnete Anstieg der aus den A_{280} – Werten ermittelten Regressionsgerade mit $m = 0,522$ geringer als der berechnete Anstieg für die aus der Bradford – Methode ermittelten Regressionsgerade mit $m = 0,783$. Daraus lässt sich über die Formel (14) ein Faktor von 0,67 (1,5) berechnen und ist mit den weiter oben aufgeführten Faktoren von 0,71 (1,4) [Buettner *et al.*, 2012]) bzw. 0,65 (1,54, vorliegende Arbeit) vergleichbar.

$$(14) \quad F = m_{A_{280}}/m_{Bradford} = 0,522/0,783 = 0,67$$

F... berechneter Korrekturfaktor; $m_{A_{280}}$... Anstieg der Regressionsgeraden durch Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorption bei 280 nm; $m_{Bradford}$... Anstieg der Regressionsgeraden durch Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der Bradford – Methode

Es scheint, dass der ermittelte Faktor nicht durch die Verwendung von BSA als Kalibrierprotein zustande kommt, sondern durch die gewählte Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. So wurden in der vorliegenden Arbeit keine denaturierenden Bedingungen vor der Bestimmung der Proteinkonzentration eingestellt, d.h. die Enzyme lagen nativ vor. Bei Messung mittels Bradford findet jedoch eine Entfaltung der Enzyme statt. Dadurch ergibt sich u.a. die in Abb. 4. 4 ermittelte Differenz in den Anstiegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels A_{280} ohne eine vorherige Entfaltung/Denaturierung des Enzyms, keinen unmittelbaren Vergleich mit den Literaturwerten zulässt. Um die ermittelten Konzentrationen und die daraus abgeleiteten Parameter wie A_{spez} oder A_V jedoch mit der Literatur vergleichen zu können, muss ein Faktor einberechnet werden. Der von Buettner ermittelte Faktor liegt bei 0,71 (1,4) [Buettner *et al.*, 2012]. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Faktoren liegen bei 0,65 (1,54) bzw. 0,67 (1,5).

Tab. 4. 2) Vergleich der ermittelten spezifischen Aktivität (A_{spez}) der Wt mTG, sowie der Varianten TG⁰⁴(S2P), TG¹⁶ und der UH308B.

Die Wt mTG und die Varianten TG⁰⁴(S2P), TG¹⁶ und UH308b wurden (siehe 2.3-9, S. 34) in 200 mM TRIS-Acetat Puffer solubilisiert und zur Abtrennung von möglichen, größeren Aggregaten für 5 min bei 16.100 g (RT) zentrifugiert und in ein neues 1,5 mL Gefäß überführt. Anschließend wurde die Enzymkonzentration mittels A280 – Messung bestimmt (siehe 2.4-2, S. 34). Darauffolgend wurden Enzymlösungen der Varianten mit einer Konzentration von 0,075 mg/mL hergestellt. Anschließend wurde die eingestellte Enzymkonzentration mittels der colorimetrischen Bradford-Methode (siehe 2.4-1, S. 34) erneut bestimmt (Doppelbestimmung). Als Standardprotein zur Kalibrierung diente hier BSA, welches oftmals in der Literatur verwendet wird [Ando *et al.*, 1989; Marx *et al.*, 2008b; Sommer *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2010]. Anschließend erfolgte eine Doppelbestimmung der volumetrischen Aktivität (AV). Aus dem erhaltenen Mittelwert der AV wurde die A_{spez} (siehe 2.4-4, S. 37) berechnet. Die mittlere Abweichung einer Doppelbestimmung ist in Klammern angegeben.

FRAP-TG- LE-His ₆	In der vorliegenden Arbeit genutzte Methode zur Bestimmung der Enzymkonzentration (A ₂₈₀ - Methode)				In der Literatur genutzte Methode zur Bestimmung der Enzymkonzentration (colorimetrisch, Bradford)			Faktor	Kehrwert
	ϵ [M ⁻¹ *cm ⁻¹]	E [mg/mL]	AV [U/mL]	A_{spez} [U/mg]	E [mg/mL]	AV [U/mL]	A_{spez} [U/mg]		
Wt mTG	1,824	0,075	2,99 (0,003)	39,9	0,11 (0,0018)	2,99 (0,003)	27,20	0,68 ^a	1,47
TG ⁰⁴ (S2P)	1,823	0,075	5,2 (0,015)	69,3	0,12 (0,0021)	5,17 (0,015)	43,1	0,62 ^a	1,61
UH308B	1,788	0,075	3,87 (0,015)	51,6	0,12 (0,0029)	3,87 (0,015)	32,3	0,63 ^a	1,59
TG ¹⁶	1,859	0,075	4,96 (0,006)	66,1	0,11 (0,0021)	4,96 (0,006)	45,1	0,68 ^a	1,47
							Durchschnitt	0,65	1,54
abgelesene A_{spez} – Werte aus der Publikation [Buettner <i>et al.</i> , 2012]					entnommene A_{spez} – Werte aus der Publikation [Buettner <i>et al.</i> , 2012]				
Wt mTG	-----	-----	-----	36,4 ^b			26 ^c	0,714 ^d	1,4
UH308B	-----	-----	-----	54,6 ^b			39 ^c		1,4

^a Faktor aus A via A₂₈₀ / E [mg/mL] via Bradford; ^b errechnet aus dem Faktor 1,4 [Buettner *et al.*, 2012]; ^c aus [Buettner *et al.*, 2012] entnommen; ^d berechneter Faktor zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe bestimmt mittels A₂₈₀ vs Bradford [Buettner *et al.*, 2012]

4.3) Mögliche Einsatzgebiete der TG¹⁶

Ein Einsatzgebiet für eine thermisch resistenterere mTG ist der verbesserte Substratumsatz bei erhöhter Temperatur zum Vorteil des wirtschaftlichen Nutzens. Dies konnte beispielhaft in der vorliegenden Arbeit anhand des Umsatzes von β - Casein gezeigt werden (siehe 3.1-9, S. 67). Es ist jedoch zu bedenken, dass erhöhte Temperaturen ebenfalls zu einem Abbau von temperatursensitiven Stoffen führen können, was z.B. in der Lebensmittelindustrie nachteilig sein kann [Marx *et al.*, 2008]. Genaue Kenntnisse der Hitzebeständigkeit einzelner Komponenten und der ablaufenden Reaktion sind daher nützlich. Gleichzeitig können temperatursensitive Komponenten auch ein Vorteil im Fall der mTG - Reaktion sein. Durch Ablaufen der Quervernetzungsreaktion bei erhöhter Temperatur könnte ein nicht-reaktives Substrat in ein reaktives Substrat umgewandelt werden. So könnte es z.B. zur (partiellen) Auffaltung eines Substratproteins kommen, wobei reaktive Glutamine oder Lysine frei werden. Somit kann durch die Verwendung der thermisch resistenten TG¹⁶ das Substratspektrum um putative, temperatursensitive Substrate oder Substratregionen erweitert werden.

Zusätzlich zur thermischen Resistenz finden sich in der Literatur Versuche die pH - Stabilität zu erhöhen. So zeigt die Variante T7C/E58C [Yokoyama *et al.*, 2021] (siehe Tab. 4. 1), S. 86) eine erhöhte pH - Stabilität bei pH = 3 im Vergleich zur *Sm* mTG (11 % Aktivitätsverlust bei Inkubation für 1 h bei RT). Eine pH - stabilere *Sm* TG kann laut Yokoyama und Kollegen potentiell in der Textil - und Lederindustrie Anwendung finden [Yokoyama *et al.*, 2021]. Dort konnte bereits gezeigt werden, dass die *Sm* TG zur Texturverbesserung von Stoffen wie Wolle genommen werden kann [G. Du *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2019] oder zur Glättung von Ledermaterialien durch das sogenannte *filling* [Duarte *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2006; Tesfaw, 2014]. Im Kontext dessen wäre auch die TG¹⁶, mit ihrer erhöhten pH - Stabilität (siehe 3.1-6, S. 61), eine attraktive Alternative für die genannte Anwendung. Zusätzliche Untersuchungen zur Quervernetzungsaktivität im entsprechenden Milieu wären jedoch notwendig, um die Aktivität bei den jeweiligen Bedingungen zu eruieren.

Weitere Einsatzgebiete, neben den bereits aufgeführten, sind für die TG¹⁶ denkbar. So ist ein aufkommendes Einsatzgebiet der TG¹⁶ die Herstellung von Antikörperwirkstoffkonjugaten (ADC). Um die mTG zur Herstellung von ADC nutzen zu können ist bis dato jedoch eine spezifische Konjugation der biologisch aktiven Substanz über eine Erkennungssequenz am Antikörper notwendig. Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich dabei mit dem *screening* und deren Charakterisierung hinsichtlich der Reaktivität und Zugänglichkeit solcher Erkennungssequenzen [Bolzati und Spolaore 2021; Deweid *et al.*, 2019; Spolaore *et al.*, 2012]. So kann im Fall des Immunglobulin 1 (IgG1) nur eine Konjugation mittels mTG am Gln295 durch Entfernung des Glycans am Asn297 erzielt werden. Findet keine Entfernung des Glycans statt, so kommt es auch zu keiner Modifikation am IgG 1 [Jeger *et al.*, 2010]. Dieckgiesser und Kollegen entwickelten in einem Ansatz eine mTG - Variante, durch gezielte Mutagenese von Aminosäurepositionen

in der Nähe des aktiven Zentrums, welche eine Modifikation des kommerziellen IgG 1 Antikörpers Trastuzumab ohne Entfernung der Zuckerketten zuließ [Dickgiesser *et al.*, 2020]. Es wäre denkbar, dass die TG¹⁶ mit ihrer erhöhten thermischen Resistenz (siehe Abschnitt 3.1-3), pH – oder chemischen Stabilität (siehe Abschnitt 3.1-6) oder aber auch ihrer veränderten kinetischen Eigenschaften für peptidische Erkennungssequenzen (siehe Abschnitt 3.1-8), ebenfalls für eine solche Anwendung genutzt werden kann. So könnte durch Variation der Reaktionsbedingungen, wie z.B. einer Erhöhung der Reaktionstemperatur oder aber der Zugabe von chemischen Denaturanzien, eine Freilegung von nativen Erkennungssequenzen erfolgen und so eine Kopplung von Wirkstoff und Antikörper erzielt werden.

In einem anderen Ansatz gelang Schneider und Kollegen die Herstellung von Trastuzumab Derivaten, indem ein Peptid – tag (Erkennungssequenz für mTG, LLQG) am C – Terminus fusioniert wurde [Schneider *et al.*, 2019]. Durch Einbringen solcher Sequenzen lässt sich der Antikörper nicht nur regioselektiv modifizieren, sondern auch die Reaktivität mit der Erkennungssequenz modulieren [Schneider *et al.*, 2019].

In einer Publikation von Malešević und Kollegen (2015) wurde im Rahmen eines umfassenden *screenings* die Reaktivität von Tripeptiden bezüglich der rekombinanten *Sm* mTG und der mTG(S2P) analysiert [Malešević *et al.*, 2015]. Dabei konnten unterschiedliche Substratpräferenzen für die mTG(S2P) festgestellt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen ließen sich möglicherweise peptidische Erkennungssequenzen für die TG¹⁶ zur Herstellung von ADC designen.

Neben der pH - Stabilität und thermischen Resistenz könnte eine erhöhte Druckstabilität (insbesondere hydrostatischer Druck) der mTG ebenfalls von Vorteil sein.

So zeigte eine Studie zum Einfluss der Druckstabilität von β - Casein und der mTG aus *S. mobaraensis*, dass sich durch den Einsatz der *Sm* mTG in Gegenwart von erhöhtem Druck und Temperatur eine Verbesserung von Textureigenschaften erreichen lässt [Lauber *et al.*, 2003]. Der Einsatz der mTG in Bezug auf Milchproteine wird vor allem als vorteilhaft zur Herstellung von Joghurt- bzw. Milhdessertprodukten angesehen [Guyot und Kulozik 2011; Kulozik *et al.*, 2003]. Für die TG¹⁶ wäre zu prüfen, ob aus der erhöhten thermischen Resistenz ebenfalls eine erhöhte Druckstabilität resultiert.

Es bleibt festzuhalten, dass sich die typischen Anwendungsgebiete der mTG aus *S. mobaraensis* in dem Lebensmittelbereich zur Herstellung von Formfleisch, Joghurt etc. finden. Mit den Jahren kamen jedoch weitere mögliche Einsatzgebiete der mTG dazu [Deweid *et al.*, 2019; Miwa 2020; L. Wang *et al.*, 2018].

4.4) Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf die thermische Resistenz und Aktivität der mTG

Anhand der ermittelten Halbwertszeiten aller generierten thermoresistenten TG - Varianten, ließ sich in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Beitrag der einzelnen Aminosäure - Substitutionen nicht nur ein additiver Effekt ist. Dies ist insbesondere zu sehen, vergleicht man die Kombinationsvarianten mit den Einzelmutanten (siehe Tab. 4. 3). Auch in der Literatur sind solche Effekte bereits beschrieben worden, wie z.B. für die Endo-1,4- β -xylanase aus *Trichoderma reesei*. Einzelmutationen, welche nur geringfügige Steigerungen der Stabilität zur Folge hatten, führten bei Kombination dieser zu synergistischen Effekten [Hoelsch *et al.*, 2013; Turunen *et al.*, 2001; S. Zhang *et al.*, 2010].

Addiert man zum Beispiel im Fall der TG¹⁶ die Steigerung der Halbwertszeiten bei 60 °C der Einzelmutanten S2P und K294L mit den Werten 1,9 min respektive 2,6 min [Buettner *et al.*, 2012], erhält man eine kalkulierte Halbwertszeit von 6,5 min (errechnet sich aus der $t_{1/2}$ (60 °C) des Wt mit 2 min + 1,9 min (S2P) + 2,6 min (K294L)) und dementsprechend eine theoretische Steigerung um 4,5 min im Vergleich zu Wt mTG. Die Kombination aus S2P und K294L (\triangleq TG³⁴) resultiert jedoch in einer Steigerung von 5,5 min mit einer gemessenen Halbwertszeit von 7,5 min (siehe siehe Tab. 4. 3, S. 97). Deutlicher wird der Effekt, nimmt man die Mutation S23Y und Y24N mit einer verlängerten Halbwertszeit bei 60 °C um 1,3 min (S23Y, [Buettner *et al.*, 2012]) bzw. 1,8 min (Y24N, [Marx *et al.*, 2008b]) hinzu (\triangleq TG¹⁸ (S2P, K294L, S23Y, Y24N)). Theoretisch würde sich bei dieser Variante eine „additive“ Steigerung von 7,6 min ergeben, was einer Halbwertszeit von 9,6 min bei 60 °C entspricht. Mit einer Halbwertszeit von 28,9 min und einer Steigerung von 26,9 min liegt der experimentelle Wert jedoch deutlich höher und zeigt, dass durch das Hinzufügen der Mutationen S23Y und Y24N ein synergistischer Effekt hervorgerufen wurde. Unter Betrachtung der MD-Simulation lässt sich der Effekt im Fall der S23Y-Y24N - Substitution erklären (siehe Abb. 3. 13 B, S. 71). So zeigte sich, dass insbesondere die benachbarten Positionen S23Y und Y24N durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung eine stabilisierende Kombination ergeben. Die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton der Hydroxylgruppe des 23Y mit der Carboxygruppe des 24N stabilisiert eine vom N - Terminus beginnende *loop*-Struktur, nahe des zentralen β - *sheet*s. Die Bedeutung der zentralen β - *sheet* - Struktur für die Druck- und Temperaturstabilität des Enzyms wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [Aprodu *et al.*, 2013; Menéndez *et al.*, 2006] (siehe auch Abschnitt 1.1-3, S. 6). Der positive Einfluss der Doppelsubstitution ist nicht zuletzt daran zu erkennen, dass diese ausschließlich in den besten 50 % der TG - Varianten zu finden ist (siehe Tab. 3. 1, S. 51).

Tab. 4. 3) Vergleich der berechneten Differenz der, in der vorliegenden Arbeit ermittelten $t_{1/2}$ (60 °C). Aufgeführt ist die Wt mTG, sowie ausgewählte Varianten mit Einzelsubstitution als auch kombinierten AS-Substitutionen.

AS-Substitution	$t_{1/2}$ (60 C) [min ⁻¹]	Differenz zum Wt [min ⁻¹]	Art der Substitution	Referenz
--- (Wt mTG)	2,0	---	---	vorliegende Arbeit
S2P	3,9	1,9	einzelne Substitutionen	vorliegende Arbeit
H289Y	3,4	1,4		[Marx <i>et al.</i> , 2008b]
K294L	4,6	2,6		[Buettner <i>et al.</i> , 2012]
S23Y	3,3	1,3		[Buettner <i>et al.</i> , 2012]
Y24N	3,8	1,8		[Marx <i>et al.</i> , 2008b]
TG ³⁴ (S2P, K294L)	7,5	5,5	kombinierte Substitutionen	vorliegende Arbeit
TG ¹⁸ (S2P, S23-Y-Y24N, K294L)	28,9	26,9		vorliegende Arbeit
TG ¹⁶ (S2P, S23Y-Y24N, H289Y, K294L)	38	36		vorliegende Arbeit

AS...Aminosäure

Auch die Substitutionen H289Y und K294L finden sich zu einem Großteil in den thermoresistentesten 50 % der Varianten. Anhand der mittels MD-Simulation resultierenden Struktur der TG¹⁶ konnten hydrophobe Interaktionen der Substitutionen H289Y und K294L mit V271 des β 1 - Faltblattstranges respektive V30 des β 6 - Faltblattstranges identifiziert werden (siehe Abb. 4. 5 A, persönliche Kommunikation von W. Brandt, IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie). Beide Substitutionen sind auf dem β 7 - Faltblattstrang lokalisiert. Vermutlich spielen auch hier wieder stabilisierende Interaktionen zur β - Faltblattstruktur eine wichtige Rolle.

Nicht eindeutig zeigt sich hingegen der Einfluss der Substitutionen K269S und G257S. Obwohl beide Substitutionen einzeln genommen eine stabilisierende Wirkung haben, so scheinen Kombinationen mit den Substitutionen H289Y und K294L zu einer verringerten thermischen Resistenz zu führen (siehe Tab. 3. 1; S. 51). So besitzt die Variante mit den Substitutionen S2P, S23Y, Y24N und K294L (TG¹⁸) eine Halbwertszeit bei 60°C von 28,9 min, während bei Anwesenheit der Substitutionen K269S, G257S oder K269S und G257S die Halbwertszeit auf 24,7 min, 21,2 min respektive 17,27 min sinkt. Auch dies untermauert den synergistischen Charakter der Stabilisierung. Bei Analyse der Varianten zeigt sich, dass die G257S Substitution in Kombination mit H289Y, K294L oder beiden stets zu einer Verringerung der thermischen Resistenz führt. Wohingegen sich die K269S - Substitution nur in Kombination mit der K294L negativ auswirkt. Im Fall der K269S Substitution lässt sich dies durch die räumliche Nähe zur K294L Substitution bzw. zum V30 erklären (siehe Abb. 4. 5 A). Vermutlich interferiert die K269S Substitution mit der stabilisierenden, hydrophoben Interaktion zwischen den Aminosäuren K294L und V30.

Die Substitution G257S ist auf einem β - Strang der zentralen β - Faltblattstruktur positioniert und liegt in

direkter räumlicher Nähe zu den Aminosäuren Cys64, Asp255 und His274, welche die katalytische Triade des Enzyms bilden (siehe Abb. 4.5 B). Durch Substitution des Glycin zum Serin kommt es zur Einführung einer polaren (hydrophilen) Seitenkette, welche Wasserstoffbrücken zu möglichen Wasserstoffakzeptoren bilden könnte oder repulsive Kräfte innerhalb der Struktur bilden kann. Wie bereits ausgeführt, ist die β -Faltblattstruktur essentiell für die hohe Stabilität der *Sm* mTG. Ein destabilisierender Einfluss der G257S Mutation auf die β -Faltblattstruktur würde den negativen Einfluss auf die thermische Resistenz erklären.

Neben dem modulierenden Charakter bezüglich der thermischen Resistenz, konnte auch eine Verringerung der spezifischen Aktivität für das CBZ-Gln-Gly-OH Substrat im Bezug zur G257S Substitution gezeigt werden. Da die Substratspezifität des CBZ-Gln-Gly-OH hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen und π - π -Interaktionen erfolgt [Kashiwagi *et al.*, 2002; Ohtsuka *et al.*, 2000; Tagami *et al.*, 2009], könnte die Einbringung eines polaren Restes, durch Substitution des Glycin an Position 257 mit Serin, innerhalb der Substraterkennungsregion zu einer Verringerung der Aktivität führen. Mutationen innerhalb und um die aktive Tasche, die für die Substraterkennung wichtige hydrophobe Umgebung schwächen, sollten demnach vermieden werden.

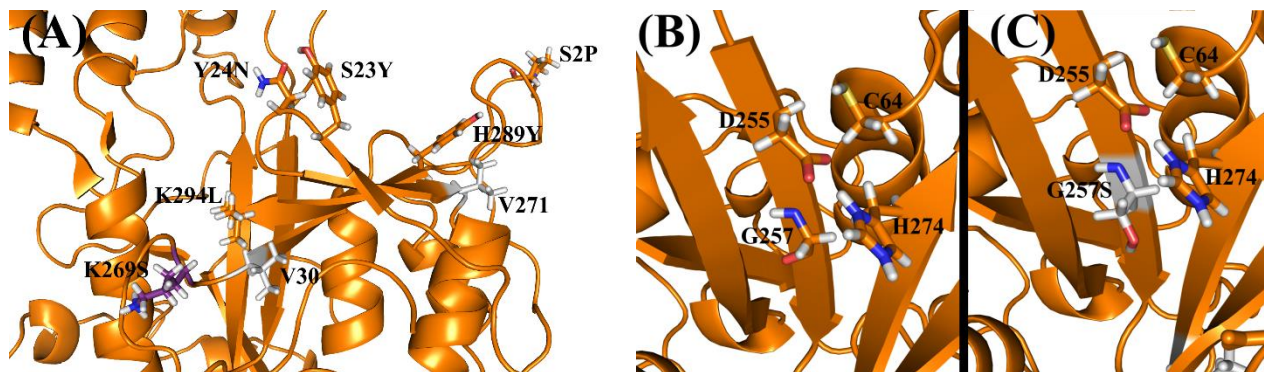


Abb. 4.5) Einfluss der K269S auf die K294L Substitution (A) und Lokalisierung der G257S Substitution in der Proteinstruktur der TG¹⁶ (B und C).

Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt aus der MD-Simulation erhalten TG¹⁶ Struktur, basierend auf der Kristallstruktur der *Sm* TG (pdb 1IU4, [Kashiwagi *et al.*, 2002]). Wichtige Aminosäuren wurden als sticks dargestellt.

(A) Die eingebrachten Substitutionen der TG¹⁶ sind in orange, die Substitutionen K269S in lila und mögliche, interagierende Aminosäuren mit K294L und H289Y in grau.

(B) und (C) zeigen die aktive Tasche ohne respektive mit Mutation des Glycin an Position 257.

Zur Darstellung der Strukturen und Mutation der Aminosäuren G257 und K269 wurde das Programm PyMOL (Version 1.3) [Schrodinger, 2010] genutzt.

Im Gegensatz zur G257S Substitution führt die S2P Mutation sowohl zu einer Erhöhung der thermischen Resistenz, als auch zur Erhöhung der spezifischen Aktivität für das CBZ-Gln-Gly-OH Substrat [Marx *et al.*, 2008b]. Die S2P-Substitution befindet sich am flexiblen N-Terminus. Es ist anzunehmen, dass die Erhöhung der thermischen Resistenz durch die S2P-Substitution u.a. in der eingeschränkten, konformationellen Freiheit des N-Terminus begründet liegt. Ebenfalls geht man heutzutage davon aus,

dass ein Austausch einer Aminosäure mit Prolin (Xaa \rightarrow Pro) in einer reduzierten Entropie des entfaltenen Zustandes resultiert und somit der gefaltete Zustand stabilisiert wird [Matsui und Harata, 2007; Sterner und Liebl, 2001; Vieille und Zeikus, 2001]. Obwohl die Insertion des Prolins nur zu einer geringfügigen Veränderung der Konformation des N - Terminus (siehe Abb. 3. 13 A, S. 71) führt, so scheint es dennoch zu einer besseren Zugänglichkeit des peptidischen Substrates CBZ-Gln-Gly-OH zu kommen. Dies würde die erhöhte spezifische Aktivität erklären ([Marx *et al.*, 2008b], vorliegende Arbeit) und den geringeren K_M - Wert erklären (Tab. 3. 5, S. 67). Die geringe Veränderung der Konformation ist dementsprechend auch der Grund, weshalb der Umsatz proteinogener Substrate (wie in 3.1-9 (S. 67) für β - Casein beschrieben) nicht gleichermaßen mit erhöht ist. So ist die Zugänglichkeit der im proteinogenen Substrat enthaltenen Lysin -und Glutaminseitenketten nicht homogen und u.a. auch deren Zugänglichkeit durch die 3D-Umgebung definiert. Dessen Umsatz gestaltet sich dementsprechend komplexer im Vergleich zu einem kleineren, peptidischen Substrat. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse des Standard Hydroxamattest nicht eins zu eins auf proteinogene Substrate übertragbar sind. Auch weitere Autoren, wie [Tagami *et al.*, 2009], kamen bei einem Vergleich der Reaktivität zwischen dem CBZ-Gln-Gly-OH und Ovalbumin verschiedener *Sm* mTG - Varianten zu derselben Schlussfolgerung.

Die TG⁰⁹, mit den Kombinationen S2P, S23Y-Y24N, G257S H289Y, konnte nicht produziert werden (siehe 3.1-2, S 45). Trotz fehlender experimenteller Daten ist eine höhere thermische Resistenz gegenüber der TG¹⁶, unwahrscheinlich. Einerseits trägt die Variante die G257S - Substitution, welche sowohl zur Verringerung der spezifischen Aktivität gegenüber dem CBZ-Gln-Gly-OH (siehe Abb. 3. 8, S. 64) führte, als auch die thermische Resistenz negativ beeinflusste. Außerdem fehlt der Variante der stabilisierende, synergistische Effekt der K294L und H289Y Substitutionen.

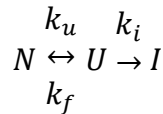
Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus den Inaktivierungskinetiken, der durchgeführten MD-Simulationen und der kinetischen Untersuchungen lässt sich der Effekt der einzelnen Mutationen als synergistisch zusammenfassen. Vorteilhaft wäre eine Analyse des Einflusses der einzelnen Aminosäureaustausche durch röntgenkristallographische Untersuchungen, um die Ergebnisse der MD-Simulation aus vorliegende Arbeit zu untermauern.

4.5) Einfluss der autokatalytischen Quervernetzungsaktivität der mTG auf ihr Inaktivierungsverhalten

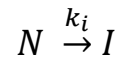
Die thermische Inaktivierung der mTG bei erhöhter Temperatur ist ein irreversibler Prozess, der in der Bildung eines inaktiven Produktes resultiert. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung durch erhöhte Temperatur lässt sich durch die globale Inaktivierungskonstante k_{inakt} (k_i) ausdrücken, entsprechend dem Zweizustandsmodell (siehe Schema 2). Dieses ist ein vereinfachtes Modell des ursprünglichen Modells von Lumry und Eyring (siehe Schema 1), welches von einem Gleichgewicht zwischen dem nativen und dem

entfalteten Zustand ausgeht, wobei der entfaltete Zustand mit der Geschwindigkeit k_i in einem irreversiblen Zustand übergehen kann [Lumry und Eyring, 1954; Sanchez-Ruiz, 2010].

Schema 1: Lumry-Eyring



Schema 2: vereinfachtes Zweizustandsmodell



Bei dem vereinfachten Zweizustandsmodell werden auftretende Zwischenzustände (U, andere Intermediate) außer Acht gelassen und nur die Gesamtreaktion ($N \rightarrow I$) betrachtet. Diese Intermediate kann man vernachlässigen, da eine Population des ungefalteten Zustands (oder anderen transienten, intermediären Zuständen) vernachlässigbar klein ist, aufgrund einer deutlich schnelleren Abreaktion ($k_i \gg k_f$) zum inaktiven Produkt [Sanchez-Ruiz, 1992, 2010; Sterner und Liebl, 2001].

Auch wenn die Auswertung der thermischen Inaktivierung in der vorliegenden Arbeit nach dem vereinfachten Zweizustandsmodell erfolgt, so könnte die Identifizierung möglicher Entfaltungsintermediate bzw. ~regionen Aufschluss über labile/instabile Regionen im Protein geben. Solche Regionen können z.B. Strukturen sein, die frühzeitig entfalten und zu einer schnellen Inaktivierung des Proteins führen. Die Identifizierung solcher Entfaltungsregionen und anschließende Stabilisierung könnte wiederum Ausgangspunkt für weitere, resistenterere Varianten sein.

Im Fall der TG¹⁶ ist es möglich, dass eine solche Region anhand der Selbstquervernetzungsstudien der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde. Durch Inkubation der TG¹⁶ bei erhöhter Temperatur und anschließender Bestimmung der quervernetzten Regionen (Peptide) mittels LC/MS, konnte der flexible C - Terminus mit dem reaktiven Glutamin an Position 328 (Q328) als präferierte Region für eine enzymatische Selbstquervernetzung identifiziert werden (siehe 3.1-5, S. 59 bzw. Abschnitt 4.4). Die Bildung der Isopeptidbindung fand vornehmlich zum Lysin an Position 194 (K194) statt. Dieses ist in der β -sheet - Struktur lokalisiert, einer recht starren und strukturstabilisierenden Region der mTG. Interessanterweise kommt es bei ambienten Temperaturen (≤ 37 °C) zu keiner detektierbaren Quervernetzungsreaktion. Dies muss jedoch nicht heißen, dass eine Quervernetzung nicht stattfindet, sondern nur, dass diese im untersuchten Zeitraum nicht nachweisbar war. Wie unter Abschnitt 1.1-4 (S. 8) dargelegt, spielt sowohl die sterische Zugänglichkeit des Glutamins bzw. Lysins als auch deren flankierende Aminosäuren, eine enorme Rolle für die Substratpräferenz. Da keine detektierbare Quervernetzung bei ambienten Temperaturen stattfand, ist davon auszugehen, dass durch die Erhöhung der Temperatur der C - Terminus zugänglicher wurde und damit die Reaktivität des Q328 deutlich erhöht wurde. Neben der verbesserten Zugänglichkeit verstärkt die erhöhte Umsatzrate bei solchen Temperaturen (≥ 60 °C) den Effekt umso mehr. Unter Berücksichtigung der hohen Reaktivität des Q328 und der damit verbundenen lokalen Strukturänderung am C - Terminus kann angenommen werden, dass der C - Terminus zu den

ersten, thermisch induzierten Entfaltungsregion der mTG gehört. Eine Stabilisierung der C – terminalen Struktur könnte demnach zu einer Erhöhung der Gesamtstabilität des Proteins führen.

In einem Vergleich zwischen löslichen und immobilisierten Proteinen postulierten Ulbrich-Hofman und Kollegen die These, dass die Entfaltung von Proteinen in bestimmten Regionen startet und so einen spezifischen Entfaltungsweg einschlägt [Schellenberger und Ulbrich, 1989; Ulbrich *et al.*, 1993]. In einem weitergehenden rationalen Ansatz wurden Thermolysin-ähnliche Protease (TLP) - Varianten durch Einbringen von Disulfidbrücken in solchen putativen Entfaltungsregionen erzeugt. Hierdurch war es möglich eine Steigerung der $t_{1/2}$ (92,5 °C) um den Faktor 120 im Vergleich zum Wt zu erreichen [Johanna Mansfeld *et al.*, 1997]. Auch eine Immobilisierung an ebenjenen Entfaltungsregionen führte zu einer Steigerung der $t_{1/2}$ [Mansfeld *et al.*, 2000; Mansfeld *et al.*, 1999]. Interessanterweise führte eine Stabilisierung an den putativen Entfaltungsregionen zu einem veränderten Inaktivierungsverhalten. Ein vormals unimolekularer Mechanismus erster Ordnung, wurde zu einem biphasischen Mechanismus zweiter Ordnung. Laut den Autoren der Studien führte die Stabilisierung der Entfaltungsregionen dazu, dass der ursprüngliche Entfaltungsweg „fixiert“ wurde und ein alternativer Entfaltungsweg entstand [Ulbrich-Hofmann *et al.*, 1993].

Die Identifizierung solcher flexiblen Regionen kann auch durch eine limitierte Proteolyse erfolgen [Arnold *et al.*, 2005]. Hierbei werden unter Entfaltungsbedingungen und gleichzeitiger Proteolyse leicht zugängliche (besonders flexible, proteolytisch suszeptible) Strukturänderungen identifiziert. Im Kontext dessen zeigten Spolaore und Kollegen für die Proteine apo- α -Lactalbumin, apo-Myoglobin und einem Fragment des Thermolysin Proteins einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Modifikation der genannten Proteine mittels mTG und zuvor gemachten Studien mittels limitierter Proteolyse [Spolaore *et al.*, 2012]. So identifizierte man im Fall des apo- α -Lactalbumin mittels limitierter Proteolyse eine helikale Strukturregion (AS 82 - 97). Kopplungsversuche mit CBZ-Gn-Gly-OH und Monodansylcadaverin (MDC) der mTG führten zur Identifikation der Aminosäuren Q91, K96 und K98. Die Kopplung mittels mTG und die limitierte Proteolyse fanden also in der gleichen Region statt. Ebenso verhielt es sich für die beiden anderen genannten Proteine. Spolaore und Kollegen schlussfolgerten konsequenterweise, dass strukturelle Eigenschaften (wie potentielle Entfaltungsregionen) von Proteinen die z.B. mittels limitierter Proteolyse erkannt werden können, ebenfalls durch mTG vermittelter Konjugation erkannt werden können [Spolaore *et al.*, 2012].

Neben der Identifizierung der Quervernetzungsstellen innerhalb der mTG, konnten Untersuchungen an inaktiven TG¹⁶ – Varianten (Austausch des katalytischen Cystein 64 durch Serin (TG¹⁶:C64S) bzw. Inhibition durch Iodacetamid (TG¹⁶:IA)) zeigen, dass die Quervernetzung selbst einen Einfluss auf die thermische Resistenz des Enzyms hat. So zeigte sich eine Erhöhung des T_M um 3,4 bzw. 3,7 °C für die TG¹⁶:IA respektive TG¹⁶:C64S. Basierend auf der Erkenntnis, dass die Selbstquervernetzung zur Reduktion der thermischen Resistenz der mTG führen kann, wurden Q328 - Substitutionsvarianten (TG¹⁶:Q328n) mit

dem Ziel der Inhibition der Selbstquervernetzungsaktivität und einer damit einhergehenden Steigerung der thermische Resistenz generiert.

Obwohl die Substitution des Q328 durch Aminosäuren mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (basisch, neutral, verzweigt und unverzweigt) zur Reduktion der Selbstquervernetzung führte, reduzierte sich gleichermaßen der T_M -Wert (siehe 3.1-3, S. 47). Diese Resultate unterstreichen einerseits die Bedeutung des Q328 für die Gesamtstabilität des Enzyms, andererseits ist anzunehmen, dass weitere Austausche ebenfalls zur Senkung der Stabilität führen. Um den Effekt der Selbstquervernetzung auf die thermische Resistenz weiter zu untersuchen, könnten u.a. Austausche an dem Lysin 194 vorgenommen werden. Wie bereits aufgeführt, ist jedoch auch hier der mögliche stabilisierende Einfluss des K194 zu beachten. Dieses befindet sich in der zentralen β -sheet-Struktur, welche wiederum einen hohen Einfluss auf die Stabilisierung der mTG-Struktur besitzt (siehe 1.1-5, S. 11). Eine Substitution des K194 mit anderen Aminosäuren dürfte sich demnach als herausfordernd darstellen.

Bisherige Berichte bezüglich der Quervernetzungsaktivität und Spezifität der mTG beziehen sich auf Peptide bzw. proteinogene Substrate und nicht auf die mTG selbst. Dass die mTG einer autokatalytischen inter- und intramolekularen Selbstquervernetzung unterliegt und dies Auswirkung auf die thermische Resistenz hat, wurde bisher nicht veröffentlicht. Dass die enzymatische Aktivität jedoch Auswirkungen auf die Stabilität bzw. Halbwertszeit haben kann ist u.a. für Proteasen wie Trypsin bekannt [Nord *et al.*, 1956] oder aber auch für Oxygenasen, wie der Cytochrom P450 Oxygenase. Im Fall der Oxygenase erfolgt eine autokatalytische Inaktivierung durch die Bildung von oxidativen Spezies (H_2O_2) in Nebenreaktionen [Hrycay und Bandiera, 2012; Karuzina und Archakov, 1994]. Im Fall des Trypsins ist dies insbesondere interessant, da der autokatalytische Abbau eng mit pathophysiologischen Ursachen verknüpft ist. So führt z.B. die Substitution des Arg an Position 117 zu einem deutlich verringerten autokatalytischen Abbau des Trypsins und damit zur Akkumulation von aktivem Trypsin in der Pankreas. Das aktive Trypsin sorgt anschließend für einen verstärkten Abbau von Zellbestandteilen innerhalb der Pankreas, was wiederum als eine Hauptursache für Pankreatitis gilt [Sahin-Tóth, 2001; Simon *et al.*, 2002].

Ob die autokatalytische Inaktivierung der mTG ebenfalls eine physiologische Rolle besitzt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, zumal die physiologische Rolle der mTG noch nicht vollständig geklärt ist [Zhang *et al.*, 2009]. Da bisher nur wenig native Substratproteine der mTG bekannt sind [Sarafeddin *et al.*, 2009, Sarafeddin *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2008], ist nicht auszuschließen, dass die (Selbst)Quervernetzungsaktivität (und damit die kinetische Stabilität/Halbwertszeit) eine physiologische Rolle spielen kann. So spielt im Fall des *Streptomyces subtilisin* und TAMEP Inhibitors (SSTI), ein kürzlich entdecktes natives Substrat der mTG, die Quervernetzung eine modulierende Rolle in der Regulierung der mTGase-Aktivität. SSTI ist ein Inhibitor der TAMEP, welche die Abspaltung des Pro-Peptides von der mTG katalysiert und somit zur Aktivierung dieser beiträgt. Wird die TAMEP

inhibiert, so kommt es zur Inhibition der Aktivierung der mTG. In der frühen Wachstumsphase der mTG inhibiert SSTI die Prozessierung der pro-mTG. Erhöht sich die Menge an mTG und aktivierender Proteasen, sodass es vermehrt zur Prozessierung der pro-mTG kommen kann, entsteht eine positive Rückkopplung, bei der aktivierte mTG wiederum den SSTI - Spiegel durch intermolekulare Quervernetzung senkt [Schmidt *et al.*, 2008]. Die Autoren fanden ebenfalls heraus, dass die Effektivität der Quervernetzung durch N-Lauroylsarcosin (LS) gesteigert werden konnte. LS wirkt strukturmodullierend auf SSTI, sodass reaktive Gln frei werden und die Quervernetzung durch die mTG somit gesteigert wird. Dies ist von Interesse, da LS z.B. bei Phosphatmangel verstärkt gebildet wird und die Quervernetzung des SSTI durch die mTG somit *triggert*. Da Phosphatmangel u.a. auch die Sporulation von *S. mobaraensis* induzieren kann, spekulieren die Autoren, dass die Aktivität der mTG und die Sporulation in einem physiologischen Zusammenhang stehen [Schmidt *et al.*, 2008].

Die Erkenntnisse aus der Quervernetzung führen zu einem besseren Verständnis der Aktivitäts – Struktur - Beziehungen. Die Identifizierung der reaktiven Gln - und Lys - Reste lässt möglicherweise Schlüsse auf putative Entfaltungsregionen bzw. auf temperatursensitive Regionen zu. Ausgehend hiervon bietet sich die Möglichkeit einer weiteren Erhöhung der thermischen Resistenz, indem man die Selbstquervernetzung unterdrückt.

Obwohl keinerlei Untersuchungen zur Selbstquervernetzung im Zusammenhang mit der physiologischen Rolle der mTG gemacht wurden, könnten die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit ein Hinweis zu einer möglichen physiologischen Rolle (Selbstinaktivierung der mTG) sein.

4.6) Produktion der mTG - Varianten

Neben der Stabilität bildet eine möglichst kostengünstige Bereitstellung die Basis für einen ökonomischen Einsatz von Enzymen. Faktoren wie Produktion, Reinigung und Formulierung eines Enzyms, bestimmen u.a. die Wirtschaftlichkeit einer Anwendung [Ferreira *et al.*, 2018].

Zur Produktion der mTG wurde ein literaturbeschriebenes Verfahren unter Verwendung von *E. coli* BL21 Gold (DE3) genutzt [Sommer *et al.*, 2011]. Die rekombinante Produktion der mTG und ihrer Varianten im Organismus *E. coli* bietet den Vorteil schneller Wachstumsraten, etablierter molekularbiologischer Methoden und definierter, kostengünstiger Medien [Ferreira *et al.*, 2018]. Analog zu Sommer und Kollegen (2011) erfolgte die Produktion des Enzyms als inaktive pro - Form in Minimalmedium via *fed - batch* Prozess. Sommer und Kollegen (2011) konnten so eine volumetrische Aktivität von 23000 U/L bzw. eine Biomasse spezifische Aktivität von 1150 U/g(BTM) erreichen, was einer Ausbeute von ~ 500 mg/L pro mTG(S2P) entspricht (siehe Tab. 4. 4, S. 106). Die erzielte Produktausbeute wurde jedoch durch den Verlust an Plasmid während der Produktion (Plasmidinstabilität) um bis zu 30 % gemindert [Sommer *et al.*, 2011].

Um dem Problem zu begegnen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einsatz des *cer* Locus für die bestehenden Fermentationsbedingungen getestet. Dieser codiert für die XerCD Rekombinase - spezifische Sequenz, welche eine Multimerisierung von Plasmiden verhindern soll und damit einem Plasmidverlust entgegenwirkt (siehe 3.2-1, S. 72) [Field und Summers, 2011]. So konnten Peubez und Kollegen für die rekombinante Produktion der Urease und dem Adhäsins AlpA aus *Helicobacter pylori* in *E. coli* BL21 GOLD (DE3) eine deutlich erhöhte Plasmidstabilität durch den Einsatz des *cer* Locus nachweisen. Die rekombinante Produktion (im Schüttelkolbenmaßstab, IPTG Induktion) des Adhäsins AlpA führte ohne *cer* Locus bereits nach 6 h Kultivierungszeit zu einem Plasmidverlust von 80 %, während unter analogen Bedingungen mit *cer* Locus 100 % plasmidhaltige Zellen nachgewiesen wurden [Peubez *et al.*, 2010].

Wie unter Abschnitt 3.2-1 dargestellt, führte das Einbringen der *cer* – Sequenz zur stabilen Weitergabe der Plasmide, sodass selbst ohne Zugabe eines Antibiotikums (Ampicillin oder Kanamycin) eine Stabilität von 100 % beibehalten werden konnte. Dies konnte sowohl im Schüttelkolben Maßstab (0,1 L) für die pro-Formen der TG⁰⁴ und TG¹⁶ (siehe Tab. 3. 6, S. 74), als auch im 11,5 L Maßstab für die pro-TG⁰⁴(S2P) (siehe Tab. 3. 7, S. 77) gezeigt werden. Es ist anzumerken, dass im Fall der Fermentation (11,5 L; Produktion: pro-TG⁰⁴) Kanamycin in den Vorkulturen als Selektivum genutzt wurde. Die Hauptkultur wurde ohne Antibiotikum angesetzt, jedoch ist aufgrund der Überimpfung der Vorkulturen weiterhin Kanamycin in der Hauptkultur enthalten ($\leq 10 \mu\text{g/mL}$). Die Konzentration an Kanamycin in der Hauptkultur wurde nicht weiter bestimmt. Da die vorhandene Restkonzentration an Kanamycin jedoch nicht ausreichend ist, um ein Hochwachsen plasmidloser Zellen zu verhindern, ist an den Ergebnissen der Fermentation *E. coli* BL21 Gold (DE3) _pBS16 (Kan^R, ohne *cer*-Sequenz) in Tab. 3. 7 (S. 77) zu erkennen. Hier fand eine Fermentation analog zur Fermentation der TG⁰⁴ statt und resultierte, trotz vorhandener Restkonzentration von Kanamycin ($\leq 10 \mu\text{g/mL}$), in einem Verlust von 14 % plasmidhaltigen Zellen. Durch vollständigen Wegfall der Zugabe eines Antibiotikums im Fermentationsprozess könnte dieser ökologisch verträglicher werden [Peubez *et al.*, 2010] und mögliche potentielle Risiken, wie z.B. einem ungewollten Transfer des Resistenzgens „auf“ natürlich vorkommende Mikroben, vermieden werden [Mairhofer *et al.*, 2008]. Hierzu wäre jedoch ebenfalls eine Entfernung oder Inaktivierung des Resistenzgens im Plasmid notwendig. Weiterhin ließen sich im Fall von Kanamycin als Selektivum, mögliche Kosten durch aufwendige Inaktivierungs- bzw. Entsorgungsmaßnahmen sparen, da Kanamycin als vergleichsweise stabil gilt [Peteranderl *et al.*, 1990; Traub und Leonhard, 1995]. Ampicillin gilt zwar als instabiler und wäre somit leichter zu inaktivieren (im Kontext der Entsorgung) [Peteranderl *et al.*, 1990; Traub und Leonhard, 1995], jedoch reicht dessen Anwesenheit nicht aus, um eine ausreichende Plasmidstabilität zu gewährleisten [Sommer *et al.*, 2011] (siehe 3.2-1, Tab. 3. 7, S. 77). Zudem stehen β -Lactam Antibiotika, wozu Ampicillin gehört, im Verdacht allergische Reaktionen zu verursachen [Peubez *et al.*, 2010].

Ohne Einsatz des Selektivums in der Hauptkultur, konnte ebenfalls eine höhere Produktausbeute pro Zelle

erreicht werden (zu sehen anhand der U/g_{BTM} , Tab. 3. 7, S. 77). Es liegt nah, dass u.a. die verringerte metabolische Last durch die Bildung des Produktes des entsprechenden Resistenzmarkers sich positiv auf die Bildung der pro-mTG auswirkte.

Neben der Verbesserung der Plasmidstabilität und dem Wegfall des Selektivum, konnte die Ausbeute an pro-mTG nochmals durch Anpassung der Gensequenz, entsprechend der Codon - Nutzung (*codon usage*) von *E. coli*, erreicht werden. Die *codon usage* Optimierung soll im Organismus zu einer erhöhten Translationsrate führen.

Obwohl in der Literatur bereits häufig eine für *E. coli* optimierte Gensequenz der pro-mTG genutzt wurde [Javitt *et al.*, 2017; Rickert *et al.*, 2016], wurden keine Literaturstellen gefunden, die die Auswirkungen auf die Produktion beschreiben.

Durch Anpassung der codierenden Gensequenz für die pro-mTG konnte eine Steigerung der Produktion an pro-TG¹⁶ um das Vier - bis Fünffache an U/g_{BTM} bzw. $U/L_{Fermenter}$ im Vergleich zu den Literaturwerten erreicht werden (siehe Tab. 4. 4). Ebenfalls erhöhte sich die Zelldichte. Eine höhere Zelldichte scheint kontraintuitiv zu sein, da man vermuten könnte, dass die erhöhte Produktion an Zielprotein zu einer gleichermaßen erhöhten metabolischen Last (hoher Verbrauch an ATP) führt. Vermutlich kommt es jedoch zu einer „Entlastung“ des Organismus, da dieser häufig vorkommende tRNA nutzen kann, anstatt seltener vorkommender tRNAs im Organismus.

Die Optimierung der codierenden Sequenz für den Expressionswirt ist heutzutage ein gängiges Mittel um die Expressionsrate zu erhöhen bzw. Translationsfehler zu senken [Kane, 1995], kann jedoch in einzelnen Fällen negative Auswirkungen auf die Produktausbeute haben. Es ist ebenfalls beschrieben, dass die Optimierung der *codon usage* Einfluss auf die Faltung von Proteinen haben kann [Fredrick und Ibba, 2010]. So kann es je nach Position und Häufigkeit von seltenen Codons zu einer Veränderung der Syntheserate kommen, was wiederum Effekte auf die Faltung hat [Cortazzo *et al.*, 2002; Marin, 2008]. Dabei kann es unter anderem zur ungewollten Bildung von *inclusion bodies* durch Fehlfaltung oder Translationsabbrüchen kommen [Angov, 2011]. Es ist somit notwendig die Auswirkung einer *codon usage* im Einzelfall zu prüfen. Als alternative Möglichkeit könnte die sogenannte Codon Harmonisierung in Betracht gezogen werden. Hierbei werden Codons nicht gegen die am meisten präferierten ausgetauscht werden, sondern gegen jene die der „nativen Häufigkeit“ am nächsten kommen [Angov *et al.*, 2008].

Mit der Erhöhung der Produktion an pro-TG¹⁶ pro Zelle kam es zu einer verstärkten Bildung unlöslicher pro - TG¹⁶ (siehe Anhang 12). Eine Quantifizierung des Verhältnisses löslich/unlöslich über Densitometrie erfolgte nicht. Das Problem der unlöslichen Produktion der pro-mTG wurde ursprünglich von Marx und Kollegen durch Herabsenken der Temperatur auf 28 °C nach Induktion umgangen [Marx *et al.*, 2007]. Mittels *design of experiment* (DoE) setzten Sommer und Kollegen die Temperatur anschließend auf 29 °C fest [Sommer *et al.*, 2011]. Durch die in der vorliegenden Arbeit erhöhte Produktion der pro-mTG pro Zelle

wurde die Löslichkeit erneut verschoben und eine erneute Anpassung der Temperatur würde sich anbieten. Alternativ könnte die Löslichkeit durch löslichkeitsfördernde *tags*, z.B. *small ubiquitin – related modifier* (SUMO), oder durch Überproduktion an Faltungshelfern wie Chaperonen erhöht werden. Zur Verbesserung der Löslichkeit und Produktion von rekombinanten Proteinen gibt es zahlreiche *Reviews* in der Literatur [Baneyx, 1999; Makrides, 1996; Rosano und Ceccarelli, 2014; Thomas *et al.*, 1997], sodass in der vorliegenden Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

Tab. 4. 4) Auswahl an publizierter Literatur zur Produktion der pro-mTG / mTG.

Organismus	produzierte mTG	Konzentration / Ausbeute			Bemerkung	Referenz
		U/L	mg/L	U/L/h		
<i>Sm. mobaraensis</i> (S-8112)	Sm mTG	2500	k.A.	31,25 ^b	Erstmalige Identifizierung und Produktion einer mikrobiellen Transglutaminase	[Ando <i>et al.</i> , 1989]
<i>Sm. mobaraensis</i> (WSH-Z2 ^a)	mTG	3320	k.A.	83	Anpassung der Sauerstoffversorgung durch Rührgeschwindigkeit (Zwei-Stufen Strategie)	[Yan <i>et al.</i> , 2005]
<i>E. coli</i> (JM109)	Met-mTG	6000 – 9000 ^b	200-300	k.A.	Unlösliche Produktion der aktiven mTG, ~ 15 % aktives Enzym nach Rückfaltung, <i>codon - usage</i> Optimierung des mTG - Gens	[Yokoyama <i>et al.</i> , 2000]
<i>E. coli</i> (BL21 Gold (DE3))	FRAP-mTG	23000 ^c	500 ^c	1438 ^c	<i>fed-batch</i> Fermentation, Optimierung durch <i>Design of Experiment</i> (DoE), Aktivierung durch Zugaben von Dispase (46 U/mg)	[Sommer <i>et al.</i> , 2011]
<i>C. glutamicum</i> (ATCC 13869)	FRAP-mTG	21996	846	305,5 ^b	Sekretion der pro-mTG über den Tat - <i>pathway</i> , Überexpression von TatABC	[Kikuchi <i>et al.</i> , 2009]
<i>C. ammonia-genes</i> ATCC6872	FRAP-mTG	57500 ^b	2500	810	Sekretion von pro-mTG mit N-terminalem CspB Signalpeptid, gereinigte	[Itaya und Kikuchi, 2008]
<i>P. pastoris</i> ^f	FRAP-mTG	37640	738 ^g	477 ^g	Abspaltung des pro-Peptides mittels Dispase I im Fermentationsüberstand (51 U/mg)	[Türkanoglu Özçelik <i>et al.</i> , 2019]
<i>C. glutamicum</i> (ATCC 13032 (DE3))	mTG	49000	k.A.	1166 ^h	Intein-medierte Abspaltung des pro-Peptides, intrazelluläre Produktion der pro-TG	[N. Zhang <i>et al.</i> , 2020]
<i>E. coli</i> (BL21 Gold (DE2))_pBS16	FRAP-mTG (TG ¹⁶)	151700	3034 ^d	11670	<i>Codon usage</i> optimiert, ohne Antibiotikum, Produkt: pro-TG ¹⁶ , keine <i>cer</i> Sequenz	vorliegende Arbeit

k.A....keine Angaben, TEV ... *tobacco etch virus*, ^a mutierter Stamm von *Sm. mobaraensis* CBS20778, ^b...kalkulierte Werte, ^c Produktion einer rekombinanten, mTG(S2P) mit Aktivität (46,1 U/mg), ^d...kalkuliert mit einer spezifischen Aktivität von 50 U/mg; ^e... kalkulierter Wert mit einer spezifischen Aktivität von 22,7 U/mg; ^f...auch *Komagataella phaffii* genannt, ^g... kalkulierte Werte basierend auf 79 h Fermentationszeit und ein A_{spez} = 51 U/mg, ^h... kalkulierte Werte basierend auf 79 h Fermentationszeit

Zusammenfassend konnte im Schüttelkolbenmaßstab gezeigt werden, dass die Kombination des *cer* Locus und der *codon usage* zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute führen kann. Weder der Einsatz des *cer* Locus, noch die Verbesserung der Plasmidstabilität in *E. coli* im Bezug zur Produktion der pro-mTG wurden bis dato beschrieben.

Auch wenn eine Produktion im Organismus *E. coli* einer Verwendung des Enzyms für den Lebensmittelbereich aufgrund des fehlenden GRAS – Status entgegensteht, so ist doch eine Nutzung für pharmazeutische Anwendungen (ADC – Herstellung etc.) oder für werkstofftechnische Anwendungen (Folien, Holzwerkstoffindustrie etc.) weiterhin möglich. Die oben genannten Anpassungen machen den Einsatz der mTG für diese Industrien attraktiver, bei der ein ökonomischer Einsatz des Enzyms eine maßgebliche Rolle spielt.

4.7) Reinigung der mTG mittels Hitzebehandlung

Neben der Produktion spielt auch die kosteneffiziente Reinigung eine maßgebliche Rolle für die Verwendung der mTG außerhalb des Lebensmittelbereiches. Der Kostenanteil für die Aufarbeitung (*downstream* - Prozesse) von biotechnologischen Produkten wie Enzymen kann bis zu 50 % ausmachen [Beilen und Li, 2002; Ferreira *et al.*, 2018]. Diese Kosten werden u.a. durch den Einsatz der Verbrauchsmaterialien (Chromatographiematerial, Filtrationsmembranen, etc.), dem Einsatz von speziellen Gerätschaften (Zentrifugen, Chromatographieranlagen etc.) oder der aufgewendeten Energie definiert. Ausgehend von der thermischen Resistenz der TG¹⁶ wurde ein Reinigungsprotokoll etabliert, dass eine Isolierung des Enzyms mittels Hitzebehandlung vorsieht. Ziel war es die bisher in der Literatur verwendeten chromatographischen Reinigungsschritte (Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie) zu vermeiden und eine Reinigungsmöglichkeit mit reduzierten Kosten, aufgrund des geringeren apparativen Aufwandes und dem Verbrauch spezieller Chromatographiematerialien, zu etablieren.

Das unter Abschnitt 3.2-3 (S. 77) etablierte Reinigungsprotokoll zeigt eine Ausbeute von ~68 % Proteinase K - aktivierter TG¹⁶ mit einer A_{spez} von ca. 53 U/mg.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der Bradford – Methode [Bradford, 1976]. Diese resultiert, im Vergleich zur spektroskopischen Messung mittels Absorption bei 280 nm (A_{280}), in erhöhten Proteinkonzentrationswerten und damit in verringerten A_{spez} – Werten (siehe Abschnitt 4.2, S. 85). Die erhöhten Werte ergeben sich vermutlich v.a. durch Entfaltung der Proteine, bedingt durch das saure Milieu in der Messlösung. Um die Reinheit der via Hitzebehandlung isolierten TG¹⁶ – Präparation und der via Affinitätschromatographie gereinigten TG¹⁶ – Präparation anhand der A_{spez} vergleichen zu können, muss ein Faktor einberechnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Faktor von 1,5 ermittelt (siehe Abschnitt 4.2, S. 85). Ein ähnlicher Wert wurde zuvor von Buettner und Kollegen erhalten, die einen Wert

von 1,4 ermittelten [Buettner *et al.*, 2012]. Für die TG¹⁶ ergibt sich somit eine spezifische Aktivität von ~ 45 U/mg ermittelt (siehe Tab. 4. 2, S. 93). Vergleichend zu diesem Wert ergibt sich eine etwas höhere Reinheit für die durch Hitzebehandlung gewonnene TG¹⁶ – Präparation.

Obwohl es zahlreiche Publikationen zur Produktion und dessen Optimierung der pro-mTG/mTG in verschiedenen Organismen gibt, so ist die Zahl der Literaturstellen bezüglich der Reinigung vergleichsweise gering. Angaben zur Effizienz und der Ausbeute in Form einer Reinigungstabelle sind oftmals nicht vollständig, was eine vergleichende Darstellung der bestehenden Literatur erschwert. Daher wurden für die vorliegende Arbeit nur Literaturstellen berücksichtigt, bei denen diese Angaben vorlagen. Ein Überblick über die gefundenen Literaturdaten zur Reinigung der pro-mTG/mTG aus *S. mobaraensis* ist in Tab. 4. 5 dargestellt. Desweiteren konnten im Rahmen der Literaturrecherche für die vorliegende Arbeit keine Daten bezüglich des Ablaufs bzw. der Effizienz der kommerziellen Reinigung der *Sm* mTG, wie sie z.B. zur Herstellung und Formulierung der ActivaTM - Mischungen genutzt werden, gefunden werden.

Ein Vergleich mit der bestehenden Literatur zeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte alternative Reinigung mittels Hitzepräzipitation in Effizienz und Ausbeute im wesentlichen vergleichbar ist. So liegt die Ausbeute im Allgemeinen zwischen 40 – 70 % (siehe Tab. 4. 5). Über die Hitzereinigung konnte eine Ausbeute an rekombinanter pro-TG¹⁶ von ~ 83 % erzielt werden (siehe Tab. 3. 8, S. 80). Im Vergleich hierzu erzielte [Marx *et al.*, 2008] mittels Affinitätschromatographie eine Ausbeute von ~43 % pro-mTG. Beide rekombinant produzierten mTG - Varianten besitzen einen C - terminalen His₆ -tag. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Reinheit der chromatographisch gereinigten pro-mTG-His₆ höher sein könnte.

Bei Vergleich der aktivierten TG¹⁶ ist zu beachten, dass diese nach der Aktivierung und Fällung noch Spuren von Proteinase K enthielt (in Pellet und Dialysat), während die rekombinant produzierte und über Affinitätschromatographie gereinigte mTG-His₆ [Marx *et al.*, 2008; Sommer *et al.*, 2012] frei von Proteinase K ist. Obwohl die Reinheit von Enzympräparation, je nach Anwendungsgebiet, nicht zwangsläufig hoch sein muss, führt die Anwesenheit der Proteinase K während der Lagerung zu einem proteolytischen Verdau des Enzyms und somit zu einer Verringerung des Zielproteins über die Zeit. Die Anwendbarkeit der mittels Hitze gereinigten mTG ist somit eingeschränkt und eine alternative Aktivierung oder eine Entfernung der Proteinase K wäre erstrebenswert. Eine alternative Aktivierungsmöglichkeit könnte z.B. via dem Inteinsystem erfolgen. Dies wurde bereits für die mTG aus *S. hygroscopicus* gezeigt, bei der die Aktivierung durch einen pH – abhängigen Schritt erfolgte. Die Aktivität nach Abspaltung des pro-Peptides war vergleichbar mit der des nativen Wildtyps [Du *et al.*, 2014]. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von immobilisierter Proteinase K. Zwar konnten Sommer und Kollegen eine Reduktion der proteolytischen Aktivität der Proteinase K, vermutlich aufgrund der Diffusionslimitierung, feststellen, jedoch konnte die pro-mTG im Rohextrakt erfolgreich aktiviert werden. Ebenso zeigten die Autoren, dass

es zu keinem *bleeding* der Proteinase K kam und eine Wiederverwendung der immobilisierten Proteinase K somit möglich ist [Sommer *et al.*, 2012]. Eine interessante Alternative würde sich auch durch den Einsatz einer thermolabilen Proteinase K ergeben. So bietet die Firma *new england biolabs* (neb) eine thermolabile Proteinase K an, welche bereits ab einer Temperatur von 55 °C inaktiviert wird (vollständige Inaktivierung bei 55 °C für 10 min.; Quelle: <https://international.neb.com/products/p8111-thermolabile-proteinase-k#Product%20Information>; Zugriff: 10.10.2021). Bei der genannten Inaktivierungstemperatur von 55 °C ließe sich die Proteinase K einfach und effizient in das bestehende Reinigungsschema (siehe Abb. 3. 18, S. 81) einfügen, indem nach der Aktivierung bei 37 °C eine Inaktivierung der Proteinase K bei 55 °C erfolgt. Hierbei ist die erhöhte thermische Resistenz der aktivierten TG¹⁶ äußerst vorteilhaft, wo es nur zu einer geringfügigen thermischen Inaktivierung dieser kommen würde.

Neben der Verwendung der Proteinase K, wurden in der Literatur bereits spezifischere Proteasen zur Aktivierung getestet. So erreichten Rickert und Kollegen eine Aktivierung durch Einfügen einer 3C-Protease Schnittstelle zwischen pro-Peptid und maturem Peptid [Rickert *et al.*, 2016]. Das Nutzen der TAMEP, welche die native Prozessierung der *Sm* mTG katalysiert, ist ebenfalls möglich [Marx *et al.*, 2008]. Diese ist jedoch nur in geringen Mengen und hochpreisig verfügbar (1 mg kostet zwischen 1000 – 2000 \$, Quelle: <https://www.mybiosource.com/tamep-recombinant-protein/transglutaminase-activating-metalloproteinase-partial/1082194>, Zugriff: 29.08.2019).

Obwohl vergleichbare Ausbeuten an aktivierter pro-TG¹⁶ bzw. aktivierter TG¹⁶ zu Literaturwerten gereinigter pro-TG bzw. aktivierter TG - Varianten erreicht werden konnten, so verblieb doch ein recht hoher Anteil an Ausbeute nach der Dialyse im Dialysat (siehe Abb. 3. 17, Spur 7, S. 80). Eine Erhöhung der Ausbeute wäre demnach durch eine effizientere Pelletierung der mTG aus dem Dialysat möglich.

Tab. 4. 5) Stand der Literatur zur Reinigung der pro-mTG/mTG aus *S. mobaraensis*.

Organismus	Produzierte mTG	A _{spez} [U/mg]	Ausbeute [%]	RF	Literatur
<i>S. mobaraensis</i>	<i>Sm</i> mTG	22,6	42	174 ^a	[Ando <i>et al.</i> , 1989]
<i>S. mobaraensis</i>	<i>Sm</i> mTG	17,6	~59	128	[Gerber <i>et al.</i> , 1994]
<i>S. mobaraensis</i>	<i>Sm</i> . Ser-mTG (N-terminales Asp fehlt, rückgefaltetes Protein)	30	~15	k.A.	[Yokoyama <i>et al.</i> , 2000]
<i>S. mobaraensis</i>	rekombinante pro-mTG-His ₆	k.A.	42,9	k.A.	[Marx <i>et al.</i> , 2008]
<i>S. mobaraensis</i>	rekombinante FRAP-mTG-His ₆	26,8	58,8	1,8	[Sommer <i>et al.</i> , 2012]
	Rekombinante FRAP-mTG(S2P)-His ₆	43,1	65,9	2,9	
<i>S. mobaraensis</i>	rekombinante pro-TG ¹⁶ -His ₆	43	83	1,8	vorliegende Arbeit (siehe Tab. 3. 8, S. 80)
	rekombinante FRAP-TG ¹⁶ -His ₆	53	68	2,3	

Sm mTG...nativprozessierte mTG aus *S. mobaraensis*, ^a ... kalkulierter Wert, k.A ...keine Angaben, RF ... Reinigungsfaktor

Um den Abbau zu verhindern und um die Ausbeute zu erhöhen könnte die hitzebehandelte Pro-TG¹⁶-His₆ Lösung gelagert werden und die Aktivierung erst kurz vor Verwendung erfolgen. Dies würde sich anbieten, da das pro-Enzym eine höhere Stabilität als das aktive Enzym aufweist. Ebenfalls wird das aktive Zentrum durch das pro-Peptid vor oxidativen Einflüssen oder anderweitigen chemischen Modifikationen geschützt. Somit würde kein Abbau durch die Proteinase K erfolgen.

5.) Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und Charakterisierung thermoresistenter Varianten der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (*Sm* mTG), sowie deren kostengünstige Bereitstellung durch Optimierung der rekombinanten Produktion und Reinigung. Hierfür wurden zuvor identifizierte Aminosäuresubstitutionen, die zur Erhöhung der thermischen Resistenz beitragen mittels *Golden Gate shuffling* miteinander kombiniert. Insgesamt konnten 31 thermoresistente Varianten konstruiert, produziert und gereinigt werden. Von diesen wurden Inaktivierungskinetiken bei 60 °C und Temperaturübergangskurven aufgenommen, um die jeweiligen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) und Schmelzpunkte (T_M) zu bestimmen. Als thermoresistenteste Variante wurde die TG¹⁶ mit den fünf Aminosäuresubstitutionen S2P, S23Y, Y24N, H289Y und K294L identifiziert. Die Halbwertszeit bei 60 °C beträgt 37,97 min und konnte um den Faktor 18,8 im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp der mTG (2,02 min) gesteigert werden. Ebenfalls verschob sich der T_M - Wert um 7,9 °C zu höheren Temperaturen. Neben einer erhöhten thermischen Resistenz zeigte die TG¹⁶ ebenfalls eine erhöhte spezifische Aktivität von 62,2 U/mg im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp (Wt mTG) mit 40,05 U/mg für das peptidische Substrat CBZ-Gln-Gly-OH.

Tiefere Einblicke in den thermischen Inaktivierungsmechanismus konnten durch eine nanoDSF - Analyse und PAGE - Analyse erhalten werden. So führt eine Inkubation der Wt mTG und TG - Varianten bei Temperaturen von 60 °C und höher, zur Selbstquervernetzung und vornehmlich zur Bildung eines intramolekularen Quervernetzungsprodukten (genannt xTG). Folgeuntersuchungen mittels LC/MS führten zur Identifikation der quervernetzten Glutamine (n = 8) und Lysine (n = 11). Hierbei konnte eine nahezu quantitative Umsetzung des Glutamins an Position 328 (Q328), welches am C - Terminus des Enzyms lokalisiert ist, festgestellt werden. Um den Einfluss des Q328 auf das Selbstquervernetzungsverhalten zu analysieren wurden sechs Substitutionsvarianten TG¹⁶:Q328n (n = Asn, Ala, Val, Leu, Ile, Trp) generiert und auf ihr Inaktivierungs - und Aggregationsverhalten analysiert. Hierdurch konnte die Selbstquervernetzung zu unterschiedlichen Graden unterdrückt werden, jedoch ging dies stets mit einem Verlust der thermischen Resistenz einher. Dies lässt vermuten, dass das Q328 am C - Terminus nicht nur eine Rolle in der Selbstquervernetzung, sondern auch eine strukturstabilisierende Rolle spielt.

Interessanterweise zeigten Untersuchungen an inaktivierten TG¹⁶ - Varianten (Inaktivierung durch Iodacetamid als Inhibitor (TG¹⁶:IA) und durch Austausch des Cys64 im aktiven Zentrum (TG¹⁶:C64S)) eine Erhöhung des Schmelzpunktes um 3,4 – 3,7 °C. Daraus wurde geschlossen, dass die Quervernetzungsaktivität einen negativen Einfluss auf die thermische Resistenz der TG¹⁶ ausübt.

Neben den Eigenschaften zur thermischen Resistenz wurde auch die Produktbildungsrate der TG¹⁶ anhand des peptidischen Substrates CBZ-Gln-Gly-OH und für β - Casein untersucht und mit der Wt mTG und einer

publizierten Substitutionsvariante mTG(S2P) verglichen. Für die TG¹⁶, die mTG(S2P) und die Wt mTG wurde ein K_M -Wert von 3,53 mM, 4,02 mM respektive 8,55 mM für das Substrat CBZ-Gln-Gly-OH bestimmt. Eine Substituierung des CBZ-Gln-Gly-OH mit dem proteinogenen Substrat β -Casein, zeigte keine Steigerung der Umsatzrate des Substrates. Demnach zeigte die S2P Substitution nur bei dem strukturell gut zugänglichen peptidischen Substrat CBZ-Gln-Gly-OH einen positiven Einfluss.

Durch Einsatz der TG¹⁶ konnte jedoch eine deutlich längere Umsetzung von β -Casein bei 60 °C erreicht werden, weshalb sich ein Einsatz der TG¹⁶ bei höheren Prozesstemperaturen anbietet.

Um den möglichen Einsatz der TG¹⁶ für eine industrielle Anwendung ökonomischer zu gestalten, wurden die Bedingungen für die rekombinante Produktion in *E. coli* optimiert. Durch Erhöhung der Translationsrate und Wegfall eines Antibiotikums als Selektivum in der Hauptkultur, konnte im Vergleich zum publizierten Wert von [Sommer *et al.*, 2011] eine Steigerung von 4,4 der Biomassespezifischen Aktivität (5000 U/g_{BTM}) bzw. von 6,6 der volumetrischen Aktivität (151700 U/L_{Fermenter}) erreicht werden. Desweiteren konnte eine 100 %ige Plasmidstabilität, ohne Einsatz eines Antibiotikums, im Schüttelkolbenmaßstab erzielt werden.

Weiterhin wurde eine alternative Reinigungsmöglichkeit basierend auf der thermischen Resistenz der pro-TG¹⁶ etabliert. Die Reinigung des Enzyms erfolgt hierbei ohne Einsatz von chromatographischen Schritten. Interessanterweise konnte hierbei eine temperaturinduzierte Aktivität bei 60 °C und höher festgestellt werden, welche durch Quervernetzung von *E. coli* eigenen Wirtszellproteinen, die Effektivität der Reinigung verbesserte.

6.) Ausblick

In der vorliegenden Arbeit kam es zur Generierung rekombinanter, thermoresistenter Varianten der *Sm* mTG und der Charakterisierung des Inaktivierungsverhaltens bei erhöhter Temperatur. Durch Vergleich des Inaktivierungsverhaltens aller Varianten und der eingeführten Aminosäuresubstitutionen, sowie einer durchgeführten MD – Simulation für die TG¹⁶ – Variante wurden erste Eindrücke zu den molekularen Wechselwirkungen der einzelnen Substitutionen erhalten. Die Bestimmung der 3D – Struktur durch röntgenkristallographische Analysen der rekombinanten TG¹⁶ und der Vergleich mit dem rekombinanten Wt könnten weitere Aufschlüsse zu Struktur-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Substitutionen geben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig intrinsische Quervernetzungsstellen der TG¹⁶ identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass die inter- und intramolekulare Quervernetzung einen negativen Einfluss auf die thermische Resistenz des Enzyms hat. Bei der Identifizierung bevorzugter intermolekularer Quervernetzungsstellen handelt es sich um putative frühe Entfaltungsregionen. Eine weitergehende Charakterisierung der Selbstquervernetzung könnte ein Weg sein, potentielle (Ent)faltungsintermediate des Enzyms zu identifizieren. Weiterhin könnte mit den gewonnenen Erkenntnissen eine mögliche Quervernetzung verhindert und so die Halbwertszeit der TG¹⁶ vermutlich erhöht werden.

Hinsichtlich einer Anwendung der thermisch resistenten TG¹⁶ wäre ein *screening* von Proteinen interessant, die erst bei höheren Temperaturen (z.B. ≥ 60 °C) oder einem niedrigeren pH – Wert zum Substrat werden. So könnten die Anwendungsspektren der TG¹⁶ erweitert und für die Industrie attraktiver gemacht werden.

Durch Klonierung der *cer*-Sequenz konnte eine verbesserte Plasmidstabilität in *E. coli* BL21 Gold (DE3) realisiert werden. Ebenfalls wurde durch Anpassung der Codon - Nutzung an den Produktionsorganismus *E. coli* die rekombinante Produktionsrate deutlich gesteigert. Hierbei kam es jedoch zu einer ungewollten Bildung an unlöslicher pro-mTG. Um die Effektivität der rekombinanten Produktion der mTG weiter zu steigern, sollte eine erneute Anpassung der Produktionstemperatur erfolgen, um die Bildung an unlöslicher pro-mTG zu verhindern. Alternativ könnten Faltungshelfer co-produziert bzw. als *tag* fusioniert werden, um eine Fehlfaltung zu verhindern. Eine Fermentation zur Untersuchung des kombinierten Effektes aus Gensequenzanpassung und *cer*-Sequenz auf die rekombinante Produktion schlug aus unbekanntem Gründen fehl und konnte aufgrund von Zeitmangel nicht wiederholt werden. Eine Wiederholung der Fermentation wäre erstrebenswert, da eine deutliche Steigerungen an rekombinanter pro-TG¹⁶ zu erwarten ist.

Im Zusammenhang der Reinigung der TG¹⁶ mittels Hitzefällung konnte keine Separation der Proteinase K von der aktiven TG¹⁶ erreicht werden. Eine nicht-chromatographische Abtrennung der Proteinase K von der aktiven mTG wäre wünschenswert. Dies ließe sich möglicherweise durch eine alternative Protease, durch Ausnutzen eines Intein-Systems oder durch eine thermolabile bzw. immobilisierte Protease erreichen.

Referenzen

Recipe „Sodium Phosphate“. *Cold Spring Harb Protoc* **2006**

Ando, H.; Adachi, M.; Umeda, K.; Matsuura, A.; Nonaka, M.; Uchio, R.; Tanaka, H.; Motoki, M.
„Purification und Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms.“
Agricultural und Biological Chemistry **1989**, 53

Angov, E. „Codon Usage: Nature’s Roadmap to Expression und Folding of Proteins.“ *Biotechnol J* **2011**,
6

Angov, E.; Hillier, C. J.; Kincaid, R. L.; Lyon, J. A. „Heterologous Protein Expression Is Enhanced by
Harmonizing the Codon Usage Frequencies of the Target Gene with Those of the Expression Host.“ *PLoS*
One **2008**, 96

Aprodu, I.; Stănciuc, N.; Banu, I.; Bahrim, G. “Probing Thermal Behaviour of Microbial
Transglutaminase with Fluorescence und in Silico Methods.” *Journal of the Science of Food und*
Agriculture **2013**, 93

Arnold, U. “Stability und Stabilization of Proteins: The Ribonuclease A Example.” In *Protein Folding*;
2011; Vol. 2, pp 83–118

Arnold, U.; Köditz, J.; Markert, Y.; Ulbrich-Hofmann, R. “Local Fluctuations vs. Global Unfolding of
Proteins Investigated by Limited Proteolysis.” *Biocatalysis und Biotransformation* **2005**, 23

Baeshen, M. N.; Al-Hejin, A. M.; Bora, R. S.; Ahmed, M. M. M.; Ramadan, H. A. I.; Saini, K. S.;
Baeshen, N. A.; Redwan, E. M. “Production of Biopharmaceuticals in E. Coli: Current Scenario and
Future Perspectives.” *J Microbiol Biotechnol* **2015**, 25

Baker, D.; Agard, D. A. Kinetics versus Thermodynamics in Protein Folding (accessed 2021 -12 -19).

Baneyx, F. “Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli.” *Current Opinion in Biotechnology*
1999, 10

Beilen, J. B. van; Li, Z. Enzyme Technology: An Overview. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13

Beninati, S.; Bergamini, C. M.; Piacentini, M. An Overview of the First 50 Years of Transglutaminase
Research. *Amino Acids* **2008**, 36

Bisswanger, H. Enzyme Assays. *Perspectives in Science* **2014**, 1

- Bolzati, C.; Spolaore, B. Enzymatic Methods for the Site-Specific Radiolabeling of Targeting Proteins. *Molecules* **2021**, *26*
- Bradford, M. M. A Rapid und Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*
- Brooke, D.; Movahed, N.; Bothner, B.; Brooke, D.; Movahed, N.; Bothner, B. Universal Buffers for Use in Biochemistry und Biophysical Experiments. *AIMSBPOA* **2015**, *2*
- Buettner, K.; Hertel, T. C.; Pietzsch, M. Increased Thermostability of Microbial Transglutaminase by Combination of Several Hot Spots Evolved by Random und Saturation Mutagenesis. *Amino Acids* **2012**, *42*
- Caporale, A.; Selis, F.; Sandomenico, A.; Jotti, G. S.; Tonon, G.; Ruvo, M. The LQSP Tetrapeptide Is a New Highly Efficient Substrate of Microbial Transglutaminase for the Site-Specific Derivatization of Peptides und Proteins. *Biotechnology Journal* **2015**, *10*
- Chan, S. K.; Lim, T. S. Bioengineering of Microbial Transglutaminase for Biomedical Applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103*
- Chen, D.; Texada, D. E. Low-Usage Codons und Rare Codons of Escherichia Coli. **2005**, *12*
- Chen, S.-J.; Ke, B.-S.; Chiu, I.-C. A Fermentation Strategy for Production of Recombinant Protein Subjected to Plasmid Instability. *Korean J. Chem. Eng.* **2008**, *25*
- Clarke, D. D.; Mycek, M. J.; Neidle, A.; Waelsch, H. The Incorporation of Amines into Protein. *Archives of Biochemistry und Biophysics* **1959**, *79*
- Colón, W.; Church, J.; Sen, J.; Thibeault, J.; Trasatti, H.; Xia, K. Biological Roles of Protein Kinetic Stability. *Biochemistry* **2017**, *56*
- Cortazzo, P.; Cerveñansky, C.; Marín, M.; Reiss, C.; Ehrlich, R.; Deana, A. Silent Mutations Affect in Vivo Protein Folding in Escherichia Coli. *Biochemical und Biophysical Research Communications* **2002**, *293*
- Cui, L.; Du, G.; Zhang, D.; Chen, J. Thermal Stability und Conformational Changes of Transglutaminase from a Newly Isolated Streptomyces Hygroscopicus. *Bioresource Technology* **2008**, *99*
- Cunningham, E. L.; Jaswal, S. S.; Sohl, J. L.; Agard, D. A. Kinetic Stability as a Mechanism for Protease Longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*

- Day, N.; Keillor, J. W. A Continuous Spectrophotometric Linked Enzyme Assay for Transglutaminase Activity. *Analytical Biochemistry* **1999**, *274*
- de Jong, G. A. H.; Wijngaards, G.; Boumans, H.; Koppelman, Stef. J.; Hessing, M. Purification und Substrate Specificity of Transglutaminases from Blood und Streptovercillium Mobarraense. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*
- de Souza, C. F. V.; Faccin, D. J. L.; Mertins, O.; Heck, J. X.; da Silveira, N. P.; Secchi, A. R.; Ayub, M. A. Z. Kinetics of Thermal Inactivation of Transglutaminase from a Newly Isolated Bacillus Circulans BL32. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2009**, *84*
- Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Brégeon, D.; Belmant, C.; Gauthier, L.; Lhospipe, F.; Romagne, F.; Schibli, R. Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody–Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*
- Deweid, L.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Microbial Transglutaminase for Biotechnological und Biomedical Engineering. *Biological Chemistry* **2019**, *400*
- Diaz Ricci, J. C.; Hernández, M. E. Plasmid Effects on Escherichia Coli Metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology* **2000**, *20*
- Dickgiesser, S.; Deweid, L.; Kellner, R.; Kolmar, H.; Rasche, N. Site-Specific Antibody–Drug Conjugation Using Microbial Transglutaminase. In *Enzyme-Mediated Ligation Methods*; Nuijens, T., Schmidt, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, **2019**; pp 135–149
- Dickgiesser, S.; Rieker, M.; Mueller-Pompalla, D.; Schröter, C.; Tonillo, J.; Warszawski, S.; Raab-Westphal, S.; Kühn, S.; Knehans, T.; Könnig, D.; Dotterweich, J.; Betz, U. A. K.; Anderl, J.; Hecht, S.; Rasche, N. Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*
- Du, G.; Cui, L.; Zhu, Y.; Chen, J. Improvement of Shrink-Resistance und Tensile Strength of Wool Fabric Treated with a Novel Microbial Transglutaminase from Streptomyces Hygroscopicus. *Enzyme und Microbial Technology* **2007**, *7*
- Du, K.; Liu, Z.; Cui, W.; Zhou, L.; Liu, Y.; Du, G.; Chen, J.; Zhou, Z. PH-Dependent Activation of Streptomyces Hygroscopicus Transglutaminase Mediated by Intein. *Applied und Environmental Microbiology* **2014**, *80*

Duarte, L.; Matte, C. R.; Bizarro, C. V.; Ayub, M. A. Z. Review Transglutaminases: Part II—Industrial Applications in Food, Biotechnology, Textiles und Leather Products. *World J Microbiol Biotechnol* **2019**, *36*

Eder, J.; Rheinnecker, M.; Fersht, A. R. Folding of Subtilisin BPN': Role of the Pro-Sequence. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *233*

Engler, C.; Gruetzner, R.; Kandzia, R.; Marillonnet, S. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II's Restriction Enzymes. *PLOS ONE* **2009**, *4*

Engler, C.; Kandzia, R.; Marillonnet, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLOS ONE* **2008**, *3*

Ferreira, R. da G.; Azzoni, A. R.; Freitas, S. Techno-Economic Analysis of the Industrial Production of a Low-Cost Enzyme Using E. Coli: The Case of Recombinant β -Glucosidase. *Biotechnology for Biofuels* **2018**, *11*

Fiebig, D.; Schmelz, S.; Zindel, S.; Ehret, V.; Beck, J.; Ebenig, A.; Ehret, M.; Fröls, S.; Pfeifer, F.; Kolmar, H.; Fuchsbaauer, H.-L.; Scrima, A. Structure of the Dispase Autolysis-Inducing Protein from *Streptomyces Mobaraensis* und Glutamine Cross-Linking Sites for Transglutaminase. *J Biol Chem* **2016**, *291*

Field, C. M.; Summers, D. K. Multicopy Plasmid Stability: Revisiting the Dimer Catastrophe. *Journal of Theoretical Biology* **2011**, *291*

Folk, J. E.; Cole, P. W. Transglutaminase: Mechanistic Features of the Active Site as Determined by Kinetic und Inhibitor Studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology und Biological Oxidation* **1966**, *122*

Fontana, A.; Spolaore, B.; Mero, A.; Veronese, F. M. Site-Specific Modification und PEGylation of Pharmaceutical Proteins Mediated by Transglutaminase. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*

Fredrick, K.; Ibba, M. How the Sequence of a Gene Can Tune Its Translation. *Cell* **2010**, *141*

Fuchs, G.; Schlegel, H.-G. *Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlegel*; Georg Thieme Verlag, **2006**

Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification und Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Humana Press: Totowa, NJ, **2005**; pp 571–607

- Gerber, U.; Jucknischke, U.; Putzien, S.; Fuchsbauer, H. L. A Rapid und Simple Method for the Purification of Transglutaminase from *Streptoverticillium Mobaraense*. *Biochem J* **1994**, 299
- Giordano, D.; Facchiano, A. Classification of Microbial Transglutaminases by Evaluation of Evolution Trees, Sequence Motifs, Secondary Structure Topology und Conservation of Potential Catalytic Residues. *Biochemical und Biophysical Research Communications* **2019**, 509
- Gundersen, M. T.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N. Microbial Transglutaminase Displays Broad Acyl-Acceptor Substrate Specificity. *Appl Microbiol Biotechnol* **2014**, 98
- Guyot, C.; Kulozik, U. Effect of Transglutaminase-Treated Milk Powders on the Properties of Skim Milk Yoghurt. *International Dairy Journal* **2011**, 21
- Hanahan, D. Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **1983**, 166
- Hilz, H.; Wiegers, U.; Adamietz, P. Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids und the Degradation of 'Masked' Proteins. *European Journal of Biochemistry* **1975**, 56
- Hoelsch, K.; Sührer, I.; Heusel, M.; Weuster-Botz, D. Engineering of Formate Dehydrogenase: Synergistic Effect of Mutations Affecting Cofactor Specificity und Chemical Stability. *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, 97
- Hrycay, E. G.; Bandiera, S. M. The Monooxygenase, Peroxidase, und Peroxygenase Properties of Cytochrome P450. *Archives of Biochemistry und Biophysics* **2012**, 522
- Itaya, H.; Kikuchi, Y. Secretion of *Streptomyces Mobaraensis* Pro-Transglutaminase by Coryneform Bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, 78
- J. Walsh, S.; D. Bargh, J.; M. Dannheim, F.; R. Hanby, A.; Seki, H.; J. Counsell, A.; Ou, X.; Fowler, E.; Ashman, N.; Takada, Y.; Isidro-Llobet, A.; S. Parker, J.; S. Carroll, J.; R. Spring, D. Site-Selective Modification Strategies in Antibody–Drug Conjugates. *Chemical Society Reviews* **2021**, 50
- Jacob, M. Untersuchungen zum Ersatz von Duroplasten durch enzymatisch quervernetzte Proteine., *Dissertation*, **2012**
- Jaswal, S. S.; Sohl, J. L.; Davis, J. H.; Agard, D. A. Energetic Landscape of α -Lytic Protease Optimizes Longevity through Kinetic Stability. *Nature* **2002**, 415

Javitt, G.; Ben-Barak-Zelas, Z.; Jerabek-Willemsen, M.; Fishman, A. Constitutive Expression of Active Microbial Transglutaminase in Escherichia Coli und Comparative Characterization to a Known Variant. *BMC Biotechnology* **2017**, *17*

Jeger, S.; Zimmermann, K.; Blanc, A.; Grünberg, J.; Honer, M.; Hunziker, P.; Struthers, H.; Schibli, R. Site-Specific und Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*

Johnson, C. M.; Fersht, A. R. Protein Stability as a Function of Denaturant Concentration: The Thermal Stability of Barnase in the Presence of Urea. *Biochemistry* **1995**, *34*

Kane, J. F. Effects of Rare Codon Clusters on High-Level Expression of Heterologous Proteins in Escherichia Coli. *Current Opinion in Biotechnology* **1995**, *6*

Karuzina, I. I.; Archakov, A. I. The Oxidative Inactivation of Cytochrome P450 in Monooxygenase Reactions. *Free Radical Biology and Medicine* **1994**, *16*

Kashiwagi, T.; Yokoyama, K.; Ishikawa, K.; Ono, K.; Ejima, D.; Matsui, H.; Suzuki, E. Crystal Structure of Microbial Transglutaminase From Streptovercillium Mobarraense. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*

Kieliszek, M.; Misiewicz, A. Microbial Transglutaminase und Its Application in the Food Industry. A Review. *Folia Microbiol (Praha)* **2014**, *59*

Kikuchi, Y.; Date, M.; Yokoyama, K.; Umezawa, Y.; Matsui, H. Secretion of Active-Form Streptovercillium Mobarraense Transglutaminase by Corynebacterium Glutamicum: Processing of the Pro-Transglutaminase by a Cosecreted Subtilisin-Like Protease from Streptomyces Albogriseolus. *Applied und Environmental Microbiology* **2003**, *69*

Kikuchi, Y.; Itaya, H.; Date, M.; Matsui, K.; Wu, L.-F. TatABC Overexpression Improves Corynebacterium Glutamicum Tat-Dependent Protein Secretion. *Applied und Environmental Microbiology* **2009**, *75*

Korpimäki, T.; Kurittu, J.; Karp, M. Surprisingly Fast Disappearance of β -Lactam Selection Pressure in Cultivation as Detected with Novel Biosensing Approaches. *Journal of Microbiological Methods* **2003**, *53*

Krieger, E.; Joo, K.; Lee, J.; Lee, J.; Raman, S.; Thompson, J.; Tyka, M.; Baker, D.; Karplus, K. Improving Physical Realism, Stereochemistry und Side-Chain Accuracy in Homology Modeling: Four Approaches That Performed Well in CASP8. *Proteins* **2009**, *77*

Kües, U. Wood Production, Wood Technology, und Biotechnological Impacts. **2007**.

Kulozik, U.; Tolkach, A.; Bulca, S.; Hinrichs, J. The Role of Processing und Matrix Design in Development und Control of Microstructures in Dairy Food Production—a Survey. *International Dairy Journal* **2003**, *13*

Kumar, R.; Choudhary, V.; Mishra, S.; Varma, I. K. Enzymatically-Modified Soy Protein Part 2: Adhesion Behaviour. *Journal of Adhesion Science und Technology* **2004**, *18*

Kurth, L.; Rogers, P. J. Transglutaminase Catalyzed Cross-Linking of Myosin to Soya Protein, Casein und Gluten. *Journal of Food Science* **1984**, *49*

Kütemeyer, C.; Froeck, M.; Werlein, H.-D.; Watkinson, B. M. The Influence of Salts und Temperature on Enzymatic Activity of Microbial Transglutaminase. *Food Control* **2005**, *16*

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*

Langston, J.; Blinkovsky, A.; Byun, T.; Terribilini, M.; Ransbarger, D.; Xu, F. Substrate Specificity of Streptomyces Transglutaminases. *Appl Biochem Biotechnol* **2007**, *136*

Lauber, S.; Krause, I.; Klostermeyer, H.; Henle, T. Microbial Transglutaminase Crosslinks β -Casein und β -Lactoglobulin to Heterologous Oligomers under High Pressure. *Eur Food Res Technol* **2003**, *216*

Lauber, S.; Noack, I.; Klostermeyer, H.; Henle, T. Stability of Microbial Transglutaminase to High Pressure Treatment. *Eur Food Res Technol* **2001**, *213*

Lee, J.-H.; Song, C.; Kim, D.-H.; Park, I.-H.; Lee, S.-G.; Lee, Y.-S.; Kim, B.-G. Glutamine (Q)-Peptide Screening for Transglutaminase Reaction Using mRNA Display. *Biotechnology und Bioengineering* **2013**, *110*

Lumry, R.; Eyring, H. Conformation Changes of Proteins. *J. Phys. Chem.* **1954**, *58*

Luria, S. E.; Adams, J. N.; Ting, R. C. Transduction of Lactose-Utilizing Ability among Strains of E. Coli und S. Dysenteriae und the Properties of the Transducing Phage Particles. *Virology* **1960**, *12*

Madeira, F.; Park, Y. mi; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A. R. N.; Potter, S. C.; Finn, R. D.; Lopez, R. The EMBL-EBI Search und Sequence Analysis Tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*

Mairhofer, J.; Pfaffenzeller, I.; Merz, D.; Grabherr, R. A Novel Antibiotic Free Plasmid Selection System: Advances in Safe und Efficient DNA Therapy. *Biotechnol J* **2008**, *3*

Makarova, K. S.; Aravind, L.; Koonin, E. V. A Superfamily of Archaeal, Bacterial, und Eukaryotic Proteins Homologous to Animal Transglutaminases. *Protein Sci* **1999**, *8*

Makrides, S. C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia Coli. *Microbiol Rev* **1996**, *60*

Malešević, M.; Migge, A.; Hertel, T. C.; Pietzsch, M. A Fluorescence-Based Array Screen for Transglutaminase Substrates. *ChemBioChem* **2015**, *16*

Mansfeld, J.; Vriend, G.; Dijkstra, B. W.; Veltman, O. R.; Burg, B. V. den; Venema, G.; Ulbrich-Hofmann, R.; Eijnsink, V. G. H. Extreme Stabilization of a Thermolysin-like Protease by an Engineered Disulfide Bond *. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*

Mansfeld, J.; Vriend, G.; Van den Burg, B.; Eijnsink, V. G. H.; Ulbrich-Hofmann, R. Probing the Unfolding Region in a Thermolysin-like Protease by Site-Specific Immobilization. *Biochemistry* **1999**, *38*

Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R. Site-specific und random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics. *Biotechnology und Applied Biochemistry* **2000**, *32*

Marin, M. Folding at the Rhythm of the Rare Codon Beat. *Biotechnology Journal* **2008**, *3*

Marx, C.; Hertel, T. C.; Pietzsch, M. Random Mutagenesis of a Recombinant Microbial Transglutaminase for the Generation of Thermostable und Heat-Sensitive Variants. *Journal of Biotechnology*; **2008b**, *136*

Marx, C.; Hertel, T.; Pietzsch, M. Purification und Activation of a Recombinant Histidine-Tagged pro-Transglutaminase after Soluble Expression in Escherichia Coli und Partial Characterization of the Active Enzyme. *Enzyme und Microbial Technology*, **2008**, *42*

Marx, C. K.; Hertel, T. C.; Pietzsch, M. Soluble Expression of a Pro-Transglutaminase from Streptomyces Mobaraensis in Escherichia Coli. *Enzyme und Microbial Technology* **2007**, *40*

Matsui, I.; Harata, K. Implication for Buried Polar Contacts und Ion Pairs in Hyperthermostable Enzymes. *The FEBS Journal* **2007**, *274*

Menéndez, O.; Rawel, H.; Schwarzenbolz, U.; Henle, T. Structural Changes of Microbial Transglutaminase during Thermal und High-Pressure Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*

- Menéndez, O.; Schwarzenbolz, U.; Partschefeld, C.; Henle, T. Affinity of Microbial Transglutaminase to As1-, β -, und Acid Casein under Atmospheric und High Pressure Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*
- Mignon, C.; Sodoyer, R.; Werle, B. Antibiotic-Free Selection in Biotherapeutics: Now und Forever. *Pathogens* **2015**, *4*
- Miwa, N. Innovation in the Food Industry Using Microbial Transglutaminase: Keys to Success und Future Prospects. *Analytical Biochemistry* **2020**, *597*
- Motoki, M.; Nio, N. Crosslinking Between Different Food Proteins by Transglutaminase. *Journal of Food Science* **1983**, *48*
- Motoki, M.; Seguro, K. Transglutaminase und Its Use for Food Processing. *Trends in Food Science & Technology* **1998**, *9*
- Mu, D.; Lu, J.; Shu, C.; Li, H.; Li, X.; Cai, J.; Luo, S.; Yang, P.; Jiang, S.; Zheng, Z. Improvement of the Activity und Thermostability of Microbial Transglutaminase by Multiple-Site Mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology, und Biochemistry* **2018**, *82*
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1986**, *51*
- Murphy, K. P. Stabilization of Protein Structure. In *Protein Structure, Stability, und Folding*; Methods in Molecular BiologyTM; Humana Press: Totowa, NJ, **2001**, *1-16*
- Muszbek, L.; Bereczky, Z.; Bagoly, Z.; Komaromi, I.; Katona, É. Factor XIII: A Coagulation Factor with Multiple Plasmatic und Cellular Functions. *Physiological reviews* **2011**, *91*
- Nieuwenhuizen, W. F.; Dekker, H. L.; de Koning, L. J.; Gröneveld, T.; de Koster, C. G.; de Jong, G. A. H. Modification of Glutamine und Lysine Residues in Holo und Apo α -Lactalbumin with Microbial Transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*
- Nieuwenhuizen, W. F.; Dekker, H. L.; Gröneveld, T.; de Koster, C. G.; de Jong, G. A. H. Transglutaminase-Mediated Modification of Glutamine und Lysine Residues in Native Bovine β -Lactoglobulin. *Biotechnology und Bioengineering* **2004**, *85*
- Noda, S.; Miyazaki, T.; Tanaka, T.; Chiaki, O.; Kondo, A. High-Level Production of Mature Active-Form Streptomyces Mobarraensis Transglutaminase via pro-Transglutaminase Processing Using Streptomyces Lividans as a Host. *Biochemical Engineering Journal* **2013**, *74*

- Nord, F. F.; Bier, M.; Terminiello, L. On the Mechanism of Enzyme Action. LXI. The Self Digestion of Trypsin, Calcium-Trypsin und Acetyltrypsin. *Archives of Biochemistry und Biophysics* **1956**, *65*
- Ohtake, K.; Mukai, T.; Iraha, F.; Takahashi, M.; Haruna, K.; Date, M.; Yokoyama, K.; Sakamoto, K. Engineering an Automaturing Transglutaminase with Enhanced Thermostability by Genetic Code Expansion with Two Codon Reassignments. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*
- Ohtake, K.; Yamaguchi, A.; Mukai, T.; Kashimura, H.; Hirano, N.; Haruki, M.; Kohashi, S.; Yamagishi, K.; Murayama, K.; Tomabechi, Y.; Itagaki, T.; Akasaka, R.; Kawazoe, M.; Takemoto, C.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S.; Sakamoto, K. Protein Stabilization Utilizing a Redefined Codon. *Sci Rep* **2015**, *5*
- Ohtsuka, T.; Sawa, A.; Kawabata, R.; Nio, N.; Motoki, M. Substrate Specificities of Microbial Transglutaminase for Primary Amines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*
- Oteng-Pabi, S. K.; Keillor, J. W. Continuous Enzyme-Coupled Assay for Microbial Transglutaminase Activity. *Analytical Biochemistry* **2013**, *441*
- Pace, C. N.; Scholtz, J. M. Measuring the Conformational Stability of a Protein. *Protein structure: A practical approach* **1997**, *2*, 299–321
- Page, M. I. The Principles of Enzymatic Catalysis. *International Journal of Biochemistry* **1979**, *10*
- Pasternack, R.; Dorsch, S.; Otterbach, J.; Robenek, I. R.; Wolf, S.; Fuchsbauer, H. Bacterial Pro-Transglutaminase from *Streptovercillium Mobaraense*--Purification, Characterisation und Sequence of the Zymogen. *European journal of biochemistry* **1998**, *257*
- Patzsch, K.; Riedel, K.; Pietzsch, M. Parameter Optimization of Protein Film Production Using Microbial Transglutaminase. *Biomacromolecules* **2010**, *11*
- Peteranderl, R.; Shotts, E. B.; Wiegel, J. Stability of Antibiotics under Growth Conditions for Thermophilic Anaerobes. *Appl Environ Microbiol* **1990**, *56*
- Peubez, I.; Chaudet, N.; Mignon, C.; Hild, G.; Husson, S.; Courtois, V.; De Luca, K.; Speck, D.; Sodayer, R. Antibiotic-Free Selection in *E. Coli*: New Considerations for Optimal Design und Improved Production. *Microbial Cell Factories* **2010**, *9*
- Polizzi, K. M.; Bommarius, A. S.; Broering, J. M.; Chaparro-Riggers, J. F. Stability of Biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11*

Rachel, N. M.; Quaglia, D.; Lévesque, É.; Charette, A. B.; Pelletier, J. N. Engineered, Highly Reactive Substrates of Microbial Transglutaminase Enable Protein Labeling within Various Secondary Structure Elements. *Protein Sci* **2017**, *26*

Rickert, M.; Strop, P.; Lui, V.; Melton-Witt, J.; Farias, S. E.; Foletti, D.; Shelton, D.; Pons, J.; Rajpal, A. Production of Soluble und Active Microbial Transglutaminase in Escherichia Coli for Site-specific Antibody Drug Conjugation. *Protein Sci* **2016**, *25*

Rigoldi, F.; Donini, S.; Redaelli, A.; Parisini, E.; Gautieri, A. Review: Engineering of Thermostable Enzymes for Industrial Applications. *APL Bioengineering* **2018**, *2*

Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances und Challenges. *Frontiers in Microbiology* **2014**, *5*

Sahin-Tóth, M. The Pathobiochemistry of Hereditary Pancreatitis: Studies on Recombinant Human Cationic Trypsinogen. *Pancreatology* **2001**, *1*

Sanchez-Ruiz, J. M. Theoretical Analysis of Lumry-Eyring Models in Differential Scanning Calorimetry. *Biophys J* **1992**, *61*

Sanchez-Ruiz, J. M. Protein Kinetic Stability. *Biophys Chem* **2010**, *148*

Sarafeddinoy, A.; Arif, A.; Peters, A.; Fuchsbauer, H.-L. A Novel Transglutaminase Substrate from Streptomyces Mobaraensis Inhibiting Papain-Like Cysteine Proteases. *Journal of microbiology und biotechnology* **2011**, *21*

Sarafeddinoy, A.; Schmidt, S.; Adolf, F.; Mainusch, M.; Bender, A.; Fuchsbauer, H.-L. A Novel Transglutaminase Substrate from *Streptomyces Mobaraensis* Triggers Autolysis of Neutral Metalloproteases. *Bioscience, Biotechnology, und Biochemistry* **2009**, *73*

Sarkar, N. K.; Clarke, D. D.; Waelsch, H. An Enzymically Catalyzed Incorporation of Amines into Proteins. *Biochim Biophys Acta* **1957**, *25*

Sato, H.; Hayashi, E.; Yamada, N.; Yatagai, M.; Takahara, Y. Further Studies on the Site-Specific Protein Modification by Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*

Schellenberger, A.; Ulbrich, R. Protein Stabilization by Blocking the Native Unfolding Nucleus. *Biomed Biochim Acta* **1989**, *48*, 63–67.

Schmidt, S.; Adolf, F.; Fuchsbauer, H.-L. The Transglutaminase Activating Metalloprotease Inhibitor from *Streptomyces Mobaraensis* Is a Glutamine und Lysine Donor Substrate of the Intrinsic Transglutaminase. *FEBS Letters* **2008**, 582

Schneider, H.; Deweid, L.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Recent Progress in Transglutaminase-Mediated Assembly of Antibody-Drug Conjugates. *Analytical Biochemistry* **2020**, 595

Schneider, H.; Deweid, L.; Pirzer, T.; Yanakieva, D.; Englert, S.; Becker, B.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Dextramabs: A Novel Format of Antibody-Drug Conjugates Featuring a Multivalent Polysaccharide Scaffold. *ChemistryOpen* **2019**, 8

Schrodinger, L. *The PyMOL Molecular Graphics System.*; Version 1.2; **2010**

Shi, Y.-G.; Qian, L.; Zhang, N.; Han, C.-R.; Liu, Y.; Zhang, Y.-F.; Ma, Y.-Q. Changes in Morphology und Activity of Transglutaminase Following Cross-Linking und Immobilization on a Polypropylene Microporous Membrane. *Molecules* **2011**, 16

Siegmund, V.; Schmelz, S.; Dickgiesser, S.; Beck, J.; Ebenig, A.; Fittler, H.; Frauendorf, H.; Piater, B.; Betz, U. A. K.; Avrutina, O.; Scrima, A.; Fuchsbauer, H.-L.; Kolmar, H. Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, 54

Simon, P.; Weiss, F. U.; Sahin-Tóth, M.; Parry, M.; Nayler, O.; Lenfers, B.; Schnekenburger, J.; Mayerle, J.; Domschke, W.; Lerch, M. M. Hereditary Pancreatitis Caused by a Novel PRSS1 Mutation (Arg-122 → Cys) That Alters Autoactivation und Autodegradation of Cationic Trypsinogen. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277

Smith, G. R. Homologous Recombination in Prokaryotes: Enzymes und Controlling Sites. *Genome* **1989**, 31

Sommer, C.; Hertel, T. C.; Schmelzer, C. E. H.; Pietzsch, M. Investigations on the Activation of Recombinant Microbial Pro-Transglutaminase: In Contrast to Proteinase K, Dispass Removes the Histidine-Tag. *Amino Acids* **2012**, 42

Sommer, C.; Volk, N.; Pietzsch, M. Model Based Optimization of the Fed-Batch Production of a Highly Active Transglutaminase Variant in *Escherichia Coli*. *Protein Expression und Purification* **2011**, 77

Spolaore, B.; Raboni, S.; Ramos Molina, A.; Satwekar, A.; Damiano, N.; Fontana, A. Local Unfolding Is Required for the Site-Specific Protein Modification by Transglutaminase. *Biochemistry* **2012**, 51

Spycher, P. R.; Amann, C. A.; Wehrmüller, J. E.; Hurwitz, D. R.; Kreis, O.; Messmer, D.; Ritler, A.; Küchler, A.; Blanc, A.; Béhé, M.; Walde, P.; Schibli, R. Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase. *ChemBioChem* **2017**, *18*

Sterner, R.; Liebl, W. Thermophilic Adaptation of Proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2001**, *36*

Strickler, S. S.; Gribenko, A. V.; Gribenko, A. V.; Keiffer, T. R.; Tomlinson, J.; Reihle, T.; Loladze, V. V.; Makhatadze, G. I. Protein Stability und Surface Electrostatics: A Charged Relationship. *Biochemistry* **2006**, *45*

Strop, P. Versatility of Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*

Studier, F. W. Stable Expression Clones und Auto-Induction for Protein Production in E. Coli. In *Structural Genomics: General Applications*; Chen, Y. W., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, **2014**, *1091:17-32*

Sugimura, Y.; Yokoyama, K.; Nio, N.; Maki, M.; Hitomi, K. Identification of Preferred Substrate Sequences of Microbial Transglutaminase from *Streptomyces Mobaraensis* Using a Phage-Displayed Peptide Library. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2008**, *477*

Summers, D. K.; Sherratt, D. J. Resolution of ColE1 Dimers Requires a DNA Sequence Implicated in the Three-Dimensional Organization of the *Cer* Site. *EMBO J* **1988**, *7*

Summers, D. K. The Kinetics of Plasmid Loss. *Trends Biotechnol* **1991**, *9*

Summers, D. K.; Sherratt, D. J. Multimerization of High Copy Number Plasmids Causes Instability: *Cole 1* Encodes a Determinant Essential for Plasmid Monomerization und Stability. *Cell* **1984**, *36*

Sun, X.; Bian, K. Shear Strength und Water Resistance of Modified Soy Protein Adhesives. *J Amer Oil Chem Soc* **1999**, *76*

Tagami, U.; Shimba, N.; Nakamura, M.; Yokoyama, K.; Suzuki, E.-I.; Hirokawa, T. Substrate Specificity of Microbial Transglutaminase as Revealed by Three-Dimensional Docking Simulation und Mutagenesis. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **2009**, *22*

Takehana, S.; Washizu, K.; Ando, K.; Koikeda, S.; Takeuchi, K.; Matsui, H.; Motoki, M.; Takagi, H. Chemical Synthesis of the Gene for Microbial Transglutaminase from *Streptovercillium* und Its Expression in *Escherichia Coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **1994**, *58*

- Taylor, M. M.; Bumanlag, L.; Marmer, W. N.; Brown, E. Use of Enzymatically Modified Gelatin and Casein as Fillers in Leather Processing. *Journal of the American Leather Chemists Association* **2006**, *101*,
- Terpe, K. Overview of Bacterial Expression Systems for Heterologous Protein Production: From Molecular und Biochemical Fundamentals to Commercial Systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*
- Tesfaw, A. Applications of Transglutaminase in Textile, Wool, und Leather Processing. *International Journal of Textile Science* **2014**, *3*
- Thomas, J. G.; Ayling, A.; Baneyx, F. Molecular Chaperones, Folding Catalysts, und the Recovery of Active Recombinant Proteins from E. Coli. To Fold or to Refold. *Appl Biochem Biotechnol* **1997**, *66* (3)
- Traub, W. H.; Leonhard, B. Heat Stability of the Antimicrobial Activity of Sixty-Two Antibacterial Agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1995**, *35*
- Türkanoğlu Özçelik, A.; Ersöz, F.; İnan, M. Extracellular Production of the Recombinant Bacterial Transglutaminase in Pichia Pastoris. *Protein Expression und Purification* **2019**, *159*
- Turunen, O.; Etuaho, K.; Fenel, F.; Vehmaanperä, J.; Wu, X.; Rouvinen, J.; Leisola, M. A Combination of Weakly Stabilizing Mutations with a Disulfide Bridge in the α -Helix Region of Trichoderma Reesei Endo-1,4- β -Xylanase II Increases the Thermal Stability through Synergism. *Journal of Biotechnology* **2001**, *88*
- Ulbrich-Hofmann, R.; Golbik, R.; Damerau, W. Fixation of the Unfolding Region - a Hypothesis of Enzyme Stabilization. In *Studies in Organic Chemistry*; van den Tweel, W. J. J., Harder, A., Buitelaar, R. M., Eds.; Stability und Stabilization of Enzymes; Elsevier, **1993**, *497*
- Vieille, C.; Zeikus, G. J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, und Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology und Molecular Biology Reviews* **2001**, *65* (1)
- Wang, X.; Du, J.; Zhao, B.; Wang, H.; Rao, S.; Du, G.; Zhou, J.; Chen, J.; Liu, S. Significantly Improving the Thermostability und Catalytic Efficiency of Streptomyces Mobaraenesis Transglutaminase through Combined Rational Design. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (50)
- Wang, J.; Cao, H.; Zhang, J. Z. H.; Qi, Y. Computational Protein Design with Deep Learning Neural Networks. *Sci Rep* **2018**, *8*
- Wang, L.; Yu, B.; Wang, R.; Xie, J. Biotechnological Routes for Transglutaminase Production: Recent Achievements, Perspectives und Limits. *Trends in Food Science & Technology* **2018**, *81*

- Wilms, B.; Hauck, A.; Reuss, M.; Sylatk, C.; Mattes, R.; Siemann, M.; Altenbuchner, J. High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the Escherichia Coli RhaBAD Promoter. *Biotechnology und Bioengineering* **2001**, *73*
- Yan, G.; Du, G.; Li, Y.; Chen, J.; Zhong, J. Enhancement of Microbial Transglutaminase Production by Streptovercillium Mobarraense: Application of a Two-Stage Agitation Speed Control Strategy. *Process Biochemistry* **2005**, *40*
- Yokoyama, K. I.; Nakamura, N.; Seguro, K.; Kubota, K. Overproduction of Microbial Transglutaminase in Escherichia Coli, in Vitro Refolding, und Characterization of the Refolded Form. *Biosci Biotechnol Biochem* **2000**, *64*
- Yokoyama, K.; Nio, N.; Kikuchi, Y. Properties und Applications of Microbial Transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol* **2004**, *64*
- Yokoyama, K.; Ogaya, D.; Utsumi, H.; Suzuki, M.; Kashiwagi, T.; Suzuki, E.; Taguchi, S. Effect of Introducing a Disulfide Bridge on the Thermostability of Microbial Transglutaminase from Streptomyces Mobarraensis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2021**, *105*
- Yokoyama, K.; Utsumi, H.; Nakamura, T.; Ogaya, D.; Shimba, N.; Suzuki, E.; Taguchi, S. Screening for Improved Activity of a Transglutaminase from Streptomyces Mobarraensis Created by a Novel Rational Mutagenesis und Random Mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *87*
- Zainal, N. F. A.; Saiter, J. M.; Halim, S. I. A.; Lucas, R.; Chan, C. H. Thermal Analysis: Basic Concept of Differential Scanning Calorimetry und Thermogravimetry for Beginners. *Chemistry Teacher International* **2021**, *3* (2), 59–75
- Zhang, C.; Samad, M.; Yu, H.; Chakroun, N.; Hilton, D.; Dalby, P. A. Computational Design To Reduce Conformational Flexibility und Aggregation Rates of an Antibody Fab Fragment. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15*
- Zhang, D.; Zhu, Y.; Chen, J. Microbial Transglutaminase Production: Understanding the Mechanism. *Biotechnology und Genetic Engineering Reviews* **2009**, *26*
- Zhang, N.; Zhang, S.; He, Y.; Chen, X.; Zhang, Y.; Dong, Z. Intein-Mediated Intracellular Production of Active Microbial Transglutaminase in Corynebacterium Glutamicum. *Enzyme Microb Technol* **2020**, *142*

Zhang, S.; Zhang, K.; Chen, X.; Chu, X.; Sun, F.; Dong, Z. Five Mutations in N-Terminus Confer Thermostability on Mesophilic Xylanase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *395*

Zhao, H.; Arnold, F. H. Directed Evolution Converts Subtilisin E into a Functional Equivalent of Thermitase. *Protein Eng* **1999**, *12*

Zheng, M.; Du, G.; Guo, W.; Chen, J. A Temperature-Shift Strategy in Batch Microbial Transglutaminase Fermentation. *Process Biochemistry* **2001**, *36*

Zhou, J. Q.; He, T.; Wang, J. W. The Microbial Transglutaminase Immobilization on Carboxylated Poly(N-Isopropylacrylamide) for Thermo-Responsivity. *Enzyme Microb Technol* **2016**, *87–88*

Zhu, Y.; Rinzema, A.; Bonarius, H. P. J.; Tramper, J.; Bol, J. Microbial Transglutaminase Production by *Streptovorticillium Mobaraense*: Analysis of Amino Acid Metabolism Using Mass Balances. *Enzyme and Microbial Technology* **1998**, *23*

Zhu, Y.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Bol, J. Microbial Transglutaminase—a Review of Its Production and Application in Food Processing. *Appl Microbiol Biotechnol* **1995**, *44*

Zhu, Y.; Tramper, J. Novel Applications for Microbial Transglutaminase beyond Food Processing. *Trends in Biotechnology* **2008**, *26*

Zotzel, J.; Keller, P.; Fuchsbauer, H.-L. Transglutaminase from *Streptomyces Mobaraensis* Is Activated by an Endogenous Metalloprotease. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*

Zotzel, J.; Pasternack, R.; Pelzer, C.; Ziegert, D.; Mainusch, M.; Fuchsbauer, H.-L. Activated Transglutaminase from *Streptomyces Mobaraensis* Is Processed by a Tripeptidyl Aminopeptidase in the Final Step. *Eur J Biochem* **2003b**, *270*

(1)

Anhang

Anhang 1

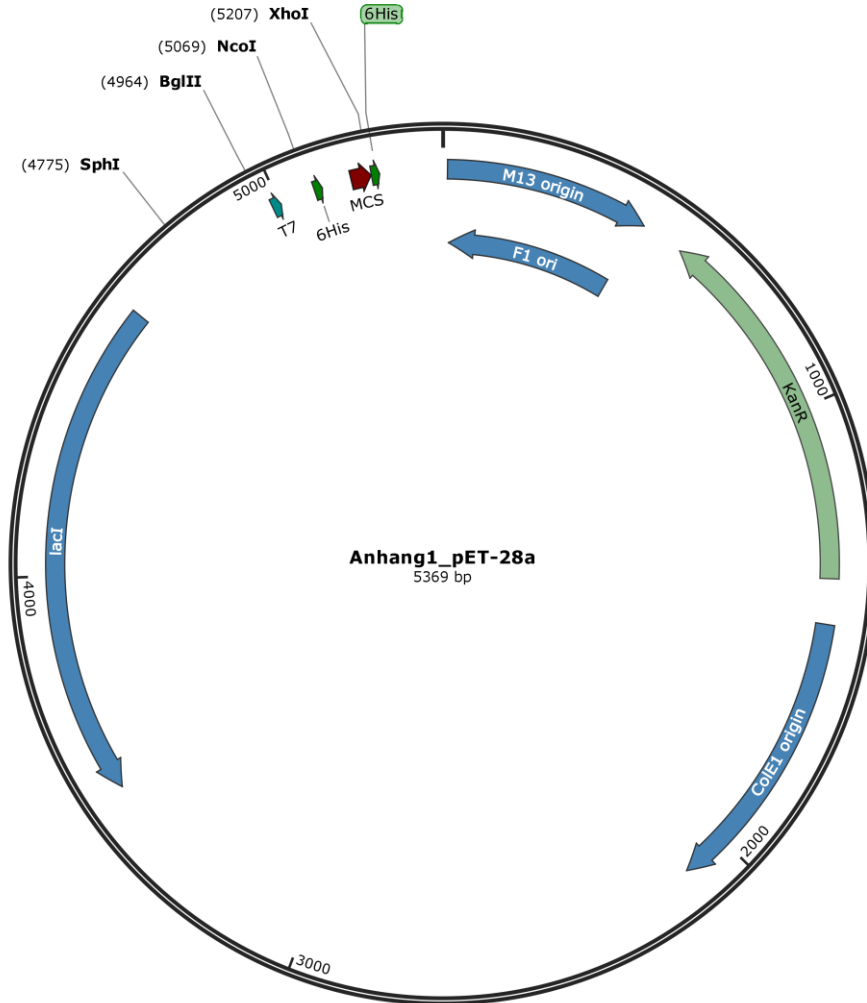


Abb.8. 1) Schematische Darstellung des pET28a(+)- Vektors.

Das pro-mTG(S2P) - Gen (siehe Anhang 7 optimierte und native Sequenz aus *S.mobaraensis*) aus dem pCM203 – Konstrukt wurde über die Schnittstellen *XhoI* und *NcoI* in den pET28a(+)- Vektor zur Generierung des pBS01 – Konstruktes kloniert. Die *cer* – Sequenz (siehe Anhang 10) zur Generierung des pBS02 – Konstruktes wurde über die Schnittstelle *SphI* ungerichtet kloniert. Zur Generierung des pET28a_LacZα – Akzeptorplasmides für das *Golden Gate shuffling* wurde das LacZα – Gen (siehe **Abb.8. 2)** via den Restriktionsschnittstellen *BglII* und *XhoI* in den pET28a – Vektor kloniert.

AGATCTGAGCCAACGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAACCCGTCGACTGGCGTTACCCAACCTAA		
<i>BglII</i>	<i>BsaI(fwd)</i>	<i>LacZα</i>
TCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCATATGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT		
<i>LacZα</i>		
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAGGTTCTCAAGCCTCGAG		
<i>LacZα</i>	<i>BsaI(rev)</i>	<i>XhoI</i>

Abb.8. 2) Schematische Darstellung des LacZα - Gens mit zugehöriger Nukleotid - Sequenz.

Anhang 2

Created with SnapGene®

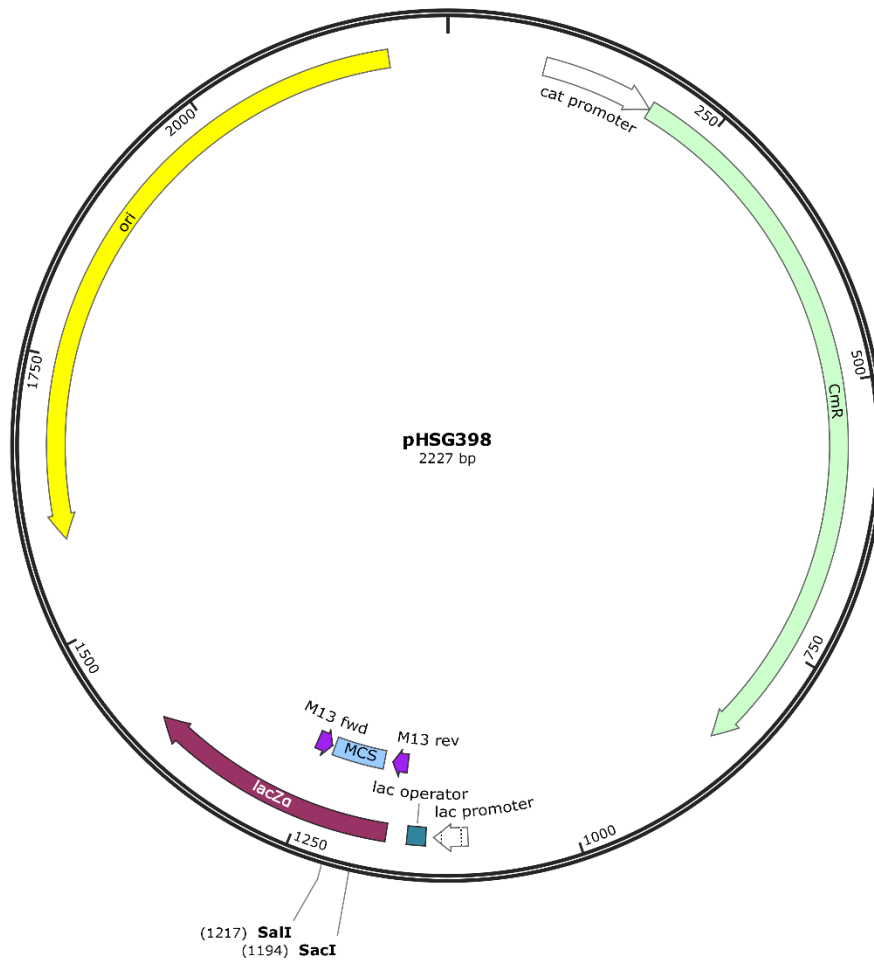


Abb.8. 3) Schematische Darstellung des pHSG398 – Plasmids (Donorvektor) mit kloniertem *LacZα* – Gens und Chloramphenicol-Resistenzen (CmR).

Der pHSG398 – Vektor ist ein pUC18 – Derivat und gehört somit zu den high – copy - Plasmiden. Die Klonierung der Fragmente I – VI erfolgte über die Restriktionsschnittstellen SalI und SacI.

Anhang 3

Schematische Darstellung der, für das Golden Gate shuffling, designten Fragmente I – VI mit zugehöriger Nukleotidsequenz. Die *BsaI* Schnittstelle ist durch einen doppelten Unterstrich gekennzeichnet. Die farbigen gekennzeichneten Nukleotidsequenzen entsprechen der farbigen Kennzeichnung in der zugehörigen schematischen Darstellung. Die wellenförmig unterstrichenen Nukleotide markieren die Substitutionspositionen.

Fragment I

GGTCTCAATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCCTC
TAGAAATAATTTTGTTAACCTTAAGAAGGAGATATACCATGGACAACGGTGCAGGTGAAGAAACC
AAATCCTATGCAGAAACCTACCGCCTGACTGCAGATGACGTAGCAAACATCAATGCTCTGAACGAA
TCCGCTCCGGCAGCATCCTCCGCTGGTCCGAGCTTCCGTGCCCGGATCCGGACGATCGTGTTACCC
CACCGGCTGAACCTCTGGATCGCATGCCGGACCCGTACCGAGAGACC

S2P: TCG → CCG

Fragment II

GGTCTCAACCGTCCGAGCTACGGTTCGCGCGGAAACGGTAGTCAACAACCTATATCCGTAATGGCAA
CAGGTTACTCCACCGTGACGGCCGCAAACAACAGATGACTGAAGAACAGCGTGAATGGCTGAGC
TACGGTTGTGTAGGCGTTACTTGGGTTAATCCGGTACAGTACCCGACCAACCGTCTGGCGTTCGCGTC
TTTCGACGAGGACCGCTTTAAAACGAACTGAAAACGGTTCGCCCTCGTAGCGGTGAAACCCGCGC
AGAATTTGAAGGTCGCGTAGCCAAGGAATCTTTGACGAGGAAAAAGGCTTTCAGCGTGCCCGCGA
GGTTGCAAGCGTGATGAACCGTGCTCTGGAACCGCACACGATGAAAGCGCATACTGGATAATCT
GAAAAAGGAGCTGGCAAACGGTAATGACGCGCTGCGTAACGAGGACGCGCGTAGCCCGTTTTATAG
CGCACTGCGTAACACTCCGAGCTTTAAAGAACGTAACGGCGGCAACCAAGAGACC

S23Y: AGC → TAC; Y24N: TAC → AAC

Fragment III

GGTCTCAACCATGACCCGTCTCGTATGAAAGCTGTGATCTACAGCAAACACTTCTGGTCCGGTCAGG
ACCGTAGCAGCTCTGCTGATAAACGCAAATATGGTGATCCGGACGCTTCCGTCCGGCGCCGGGCAC
TGGTCTGGTTGATATGTCTCGTGATCGCAACATTCCACGTTCTCCAACCTAGCCCGGGTGAAGGTTTCG
TAAACTTTGACTATGGCTGGTTTGGTGCTAGAGACC

G25S: GGC → AGC

Fragment IV



GGTCTCATGCTCAGACTGAAGCAGATGCGGACAAAACGGTATGGACCCACGGTAGAGACC

K269S: AAA → AGC

Fragment V



GGTCTCACGGTAATCACTACCACGCGCCGAACGGTTCTCTGGGCGCTATGCACGTTTACAGAGACC

H289Y: CAC → TAC

Fragment VI



GGTCTCATTACGAATCTAAATTCGTAATTGGTCCGAAGGTTACTCTGATTTCCGACCGTGGTGCGTAC
GTCATTACGTTTCATCCCGAAATCCTGGAACACCGCGCCAGACAAAGTGAAACAGGGCTGGCCTCTCG
AGCACCACCACCACCACTAATAAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCAGAGACC

K294L: AAA → CTG

Anhang 4

Tab. 8. 1) Auflistung der Aminosäuresequenzen mit den jeweiligen Aminosäuresubstitutionen und deren berechneten Extinktionskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit erzeugten Varianten.

Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des online Programmes ProtParam [Gasteiger *et al.*, 2005].

Variante	Mutationen	AS	ϵ [M ⁻¹ *cm ⁻¹]
wt mTG	--	FRAPDSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQREVEV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYALSALRNTPSFKERNNGGNHDP SRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDM SRDRNIPRSPTSPGEGFVNF DYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFRN	1,86

		WSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP LEHHHHHH*	
03	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFRN WSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP LEHHHHHH*	1,86
04	S2P	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMH V YESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,823
05	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR	1.859

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
06	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHIVYESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,823
07	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K269S	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHIVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,822
08	S2P, S23Y-Y24N, G257S, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFR	1,858

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
09	S2P, S23Y-Y24N, G257S, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMY V YES K FR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,857
10	S2P, S23Y-Y24N, G257S, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAM H VYES L FR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,821
11	S2P, S23Y-Y24N, G257S	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAM H VYES K FR	1,821

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
12	S2P, S23Y-Y24N, K269S, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDP SRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFRN WSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW PLEHHHHHH*	1,861
13	S2P, S23Y-Y24N, K269S, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDP SRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,860
14	S2P, S23Y-Y24N, K269S, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDP SRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESLFR	1,825

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
15	S2P, S23Y-Y24N, K269S	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHIVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,824
16	S2P, S23Y-Y24N, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,859
17	S2P, S23Y-Y24N, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR	1,858

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
18	S2P, S23Y-Y24N, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMH V YESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,823
19	S2P, S23Y-Y24N	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPYNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMH V YESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,822
20	S2P, G257S, K269S, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYSWFGAQTE ADADST V WTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFRN	1,861

		WSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW LEHHHHHH*	
21	S2P, G257S, K269S, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,860
22	S2P, G257S, K269S, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,824
23	S2P, G257S, K269S	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFR	1,824

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
24	S2P, G257S, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,859
25	S2P, G257S, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,858
26	S2P, G257S, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESLFR	1,822

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
27	S2P, G257S	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYSWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMH V YESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,822
28	S2P, K269S, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYGWFGAQTE ADADST V WTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFRN WSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW PLEHHHHHH*	1,862
29	S2P, K269S, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFYDYGWFGAQTE ADADST V WTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR	1,862

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
30	S2P, K269S, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHIVYESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,826
31	S2P, K269S	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADSTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHIVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,825
32	S2P, H289Y, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESLFR	1,86

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
33	S2P, H289Y	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMYVYESKFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,86
34	S2P, K294L	<u>FRAPDP</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESLFR NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	1,824
UH308-B	S23V-Y24N, K294L	<u>FRAPDS</u> DDRVTTPAEPLDRMPDPYRPVNGRAETV VNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELK NGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREV ASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALR NEDARSPFYSALRNTPSFKERNNGGNHDPSRMKAV IYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTG LVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE ADADKT V WTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESLFR	1,788

		NWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQG WPLEHHHHHH*	
--	--	--	--

Anhang 5

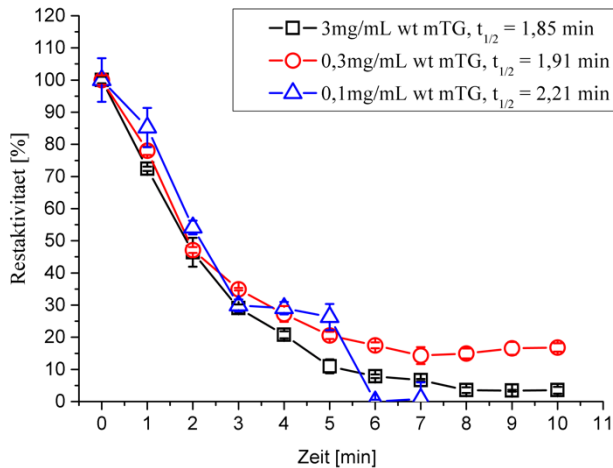


Abb.8. 4) Inaktivierungskinetiken der Wt mTG in Abhängigkeit der Enzymkonzentration.

Enzymlösungen mit Konzentrationen von 3,0 mg/mL; 0,3 mg/mL und 0,1 mg/mL wurden bei 60 °C für t = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 min inkubiert. Nach Ablauf von t = x min wurden diese sofort auf Eis abgekühlt, um den Inaktivierungsprozess zu unterbrechen. Anschließend wurden die Ansätze für 3 min bei ~3600 g zentrifugiert und die Restaktivität des Überstandes mittels Standardhydroxamattest nach [Folk und Cole, 1966] ermittelt (siehe 2.4-4, S. 37). Die ermittelten Halbwertszeiten betragen: E0 = 3,0 mg/mL mit t_{1/2}= 1,85 min (schwarze, leere Vierecke); E0 = 0,3 mg/mL mit t_{1/2}= 1,91 min (rote, leere Kreise) und E0 = 0,1 mg/mL mit t_{1/2}= 2,21 min (blaue, leere Dreiecke).

Anhang 6

Tab. 8. 2) Berechnete Parameter aus den Inaktivierungskinetiken bei den Temperaturen 55 – 65 °C für die Wt mTG und TG⁰⁴(S2P) bzw. den Temperaturen 60 – 70 °C für die TG¹⁶.

mTG	T [°C]	t _{1/2} [s]	k _{inakt} [s ⁻¹]	iE _A [kJ/mol]	iE _A [kcal/mol]
Wt	55	440	0,0016	228,6 (+/- 0,03)	54,6 (+/- 0,007)
		386,4	0,0018		
	57,5	192,4	0,0036		
		212,9	0,0033		
	60	139,1	0,0050		
		129,87	0,0053		
	62,5	70,3	0,0099		
		51,3	0,0135		
	65	40,2	0,0172		
		31,3	0,0221		

TG ⁰⁴ (S2P)	55	682,6	0,0010	219,5 (+/- 0,03)	52,5 (+/- 0,007)
		777,2	0,0009		
	57,5	331,7	0,0021		
		359,3	0,0019		
	60	224,3	0,0031		
		209,8	0,0033		
	62,5	104,8	0,0066		
		111,2	0,0062		
	65	67,6	0,0103		
		70,7	0,0098		
TG ¹⁶	60	2202,2	0,0003	339,9 (+/- 0,03)	81,2 (+/- 0,007)
		2425,9	0,0003		
	62,5	594,7	0,0012		
		544,3	0,0013		
	65	266,6	0,0026		
		280,9	0,0025		
	67,5	139,3	0,0050		
		142,8	0,0049		
	70	53,8	0,0129		
		56,9	0,0122		

Anhang 7

Tab. 8. 3) Durch LC/MS identifizierte Peptide im xTG Produkt.

quervernetzte Peptide (Q-Donor)		quervernetzte Peptide (K-Akzeptor)		Modifizierte AS in de xTG	
	Positionen		Positionen	Glutamin	Lysin
KWQQVYSHR	37-45	VAKESFDEEK	112-121	39	114
WQQVYSHR	38-45	MKAVIYISK	193-200		194
		NTPSFKER	176-183		181
		SSSADKR	209-215		214
		KELANGNDALR	151-162		152
		KYGDPAFRPAPGTGLVDMSR	216-236		216

KWQQVYSHR	37-45	MKAVIYSK	193-200	40	194
QQMTEEQR	50-57	MKAVIYSK	193-200	51	194
		KYGDPAFRPAPGTGLVDMSR	216-236		216
		LAFASFDEDRFKNELK	80-95		91
		NTPSFKER	176-183		181
QQMTEEQR	50-57	MKAVIYSK	193-200	56	194
KQQMTEEQR	49-57	MKAVIYSK	193-200	50	194
		NTPSFKER	176-183		181
ESFDEEKGFQR	115-125	NTPSFKER	176-183	124	181
GFQR	122-125	ALENAHDESAYLDNLKK	136-152		151
		KELANGNDALR	151-162		152
		KYGDPAFRPAPGTGLVDMSR	216-236		216
		MKAVIYSK	193-200		194
		FKNELK	90-95		91
		KWQQVYSHR	37-45		37
		SWNTAPDKVK	318-327		325
HFWSGQDR	201-208	SWNTAPDKVK	318-327	206	325
		NTPSFKER	176-183		181
		NELKNGRPR	92-100		91
		VAKESFDEEK	112-121		114
QGWPLEHHHHHH	328-340	MKAVIYSK	193-200	328	194
		NTPSFKER	176-183		181
		VAKESFDEEK	112-121		114
		KYGDPAFRPAPGTGLVDMSR	216-236		216

AS ... Aminosäuren

Anhang 8

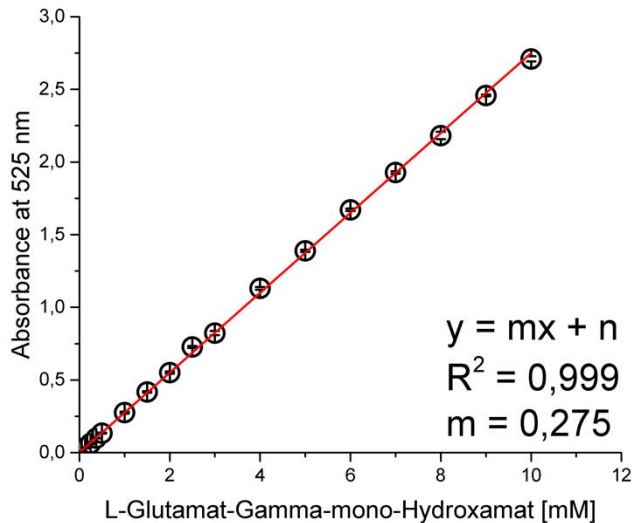


Abb.8. 5) Kalibrationskurve zur Ermittlung der mittels Standardhydroxamattest entstandenen Produktmenge im MTP – Maßstab. Als Kalibrationssubstanz diente L-Glutamat-γ-mono-Hydroxamat.

Anhang 9

Aminosäuresequenz der nicht – optimierten mTG(S2P) (native Sequenz mit S2P Mutation) und optimierten Sequenz (mit S2P – Mutation). CLUSTAL O(1.2.4) *multiple sequence alignment*.

```
native      Atggacaatggcgcggggaagagacgaagtcctacgccgaaacctaccgcctcacggcg 60
optimierte  ATGGACAACGGTGCAGGTGAAGAAACCAAATCCTATGCAGAAACCTACCGCCTGACTGCA 60
***** ** ** * ***** ** * ***** ** ***** ** ***** ** **

native      gatgacgtcggaacatcaacgcgctcaacgaaagcgctccggcgcgcttcgagcgccggc 120
optimierte  GATGACGTAGCAAACATCAATGCTCTGAACGAATCCGCTCCGGCAGCATCCTCCGCTGGT 120
***** ** ***** ** ** ***** ***** ** ** *** **

native      ccgtcggtccggggcccccgacccccgacgacaggggtcaccctcccgcgagccgctcgac 180
optimierte  CCGAGCTCCGTGCCCGGATCCGGACGATCGTGTACCCACCGGTGAACCTCTGGAT 180
*** ***** ** ** ***** * ** ***** ** ** ** ** ** **

native      aggatgcccgacccgtaccgtccctcgtacggcagggccgagacggctcgtcaacaactac 240
optimierte  CGCATGCCGGACCCGTACCGTCCGAGCTACGGTCGCGCGGAAACGGTAGTCAACAACAT 240
* ***** ***** ***** ***** * ** * ***** *****

native      atacgcaagtggcagcaggtctacagccaccgacggcaggaagcagcagatgaccgag 300
optimierte  ATCCGTAAATGGCAACAGGTTTACTCCACCGTGACGCCGCAAACACAGATGACTGAA 300
** ** * ***** ***** ** ***** ***** * ** ** ***** **

native      gagcagcgggagtggtgtcctacggctgcgctcgggtgcacctgggtcaattcgggtcag 360
optimierte  GAACAGCGTGAATGGCTGAGCTACGGTTGTGTAGGCGTTACTTGGGTAAATCCGGTCAG 360
** ***** ** ***** ***** ** ** ** ** ** ** ***** *****
```

native taccgcgacgaacagactggccttcgctccttcgacgaggacaggttcaagaacgagctg 420
optimierte TACCCGACCAACCGTCTGGCGTTCGCGTCTTTCGACGAGGACCGCTTTAAAAACGAACTG 420
***** ** * ***** ***** ***** * ** * ** ***** **

native aagaacggcaggccccgggtccggcgagacgcgggcgagggttcgagggccgctgcaag 480
optimierte AAAAACGGTCGCCCTCGTAGCGGTGAAACCCGCGCAGAATTTGAAGGTGCGGTAGCCAAG 480
** ***** * ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native gagagcttcgacgaggagaagggttccagcgggcgctgaggtggcgtccgtcatgaac 540
optimierte GAATCTTTTGACGAGGAAAAAGGCTTTCAGCGTGCCCGCGAGGTTGCAAGCGTGATGAAC 540
** * ** ***** ** ***** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native agggccctggagaacgccacgacgagagcgcttacctcgacaacctcaagaaggaactg 600
optimierte CGTGCTTGAAAAACGCACACGATGAAAGCGCATACCTGGATAATCTGAAAAAGGAGCTG 600
* ** ***** ***** ***** ** ***** ***** ** * ** * ** * ** * ** * **

native gcgaacggcaacgacgccttgcgcaacgaggacgccggttccccgttctactcggcgctg 660
optimierte GCAAACGGTAATGACGCGCTGCGTAACGAGGACGCGCTAGCCCGTTTATAGCGCACTG 660
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ** * ** * ** * ** * ** * **

native cggaacacgcccgtccttcaaggagcggaacggaggcaatcacgaccgctccaggatgaag 720
optimierte CGTAACACTCCGAGCTTTAAAGAACGTAACGGCGGCAACCATGACCCGCTCTCGTATGAAA 720
** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native gccgtcatctactcgaagcattctggagcggccaggaccggtcgagttcggccgacaag 780
optimierte GCTGTGATCTACAGCAAACACTTCTGGTCCGGTCAGGACCGTAGCAGCTCTGCTGATAAA 780
** * ** ***** ** ***** ***** ***** ***** ** * ** * ** * ** * **

native aggaagtacggcgaccggcagccttccgccccgccccgggcaccggcctggctgacatg 840
optimierte CGCAAATATGGTGATCCGGACGCTTTCGGTCCGGCGCCGGGCACCTGGTCTGGTTGATATG 840
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native tcgagggacaggaacattccgcgagccccaccagtcccgggtgagggattcgtcaatttc 900
optimierte TCTCGTGATCGCAACATTCACGTTCTCCAAGTACCCGGGTGAAGGTTTCGTAACATTT 900
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native gactacggctggttcggcgcccagacggaagcggacgcccgacaagaccgtctggaccac 960
optimierte GACTATGGCTGGTTTGGTGCTCAGACTGAAGCAGATGCGGACAAAACGGTATGGACCCAC 960
***** ***** ** * ** ***** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native ggaaatcactatcacgcgcccgaatggcagcctgggtgccatgcatgtctacgagagcaag 1020
optimierte GGTAATCACTACCACGCGCCGAACGGTCTCTGGGCGCTATGCACGTTTACGAATCTAAA 1020
** ***** ***** ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * **

native ttccgcaactggtccgaggggttactcggacttcgaccgaggcctatgtgatcaccttc 1080
optimierte TTTTCGTAATTGGTCCGAAGGTTACTCTGATTTTCGACCGTGGTGCCTACGTCATTACGTC 1080
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

native atccccaaagagctggaacaccgccccgacaaggtaaagcagggtggccg 1131
optimierte ATCCCGAAATCCTGGAACACCGCGCCAGACAAAAGTGAACAGGGCTGGCCT 1131
***** ** ***** ***** ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * **

Anhang 10

Darstellung der Nukleotid – Sequenz der *cer* – Region.

CCGGAAATACAGGAACGCACGCTGGATGGCCCTTCGCTGGGATGGTGAACCATGAAAAATGGCAGCTTCAGTGATTAAGTGGGG
TAATGTGGCCTGTACCCTCTGGTTGCATAGGTATTCATACGGTTAAAATTTATCAGGCGCATCGCGCAGTTTTTCGGGTGGTTTG

TTGCCATTTTTACCTGTCTGCTGCCGTGATCGCGCTGAACGCGTTTTAGCGGTGCGTACAATTAAGGGATTATGGTAAATCCACTTA
 CTGTCTGCCCTCGTAGCCATCGA

Anhang 11

Pipettierschema zur Bestimmung der chemischen Resistenz der TG¹⁶ bzw. der Wt mTG. Als Puffer wurde 200 mM TRIS/Acetat - Puffer verwendet. Die Konzentration der Enzymstammlösung betrug 0,6 mg/mL und die der Guanidiniumhydrochlorid - Stammlösung 8,0 M.

Ansatz	GnHCl final [M]	GnHCl [μ l]	Puffer [μ l]	dH ₂ O [μ l]	Enzym [μ l]
1	6,400	80	10	0	10
2	6,000	75	10	5	10
3	5,600	70	10	10	10
4	5,200	65	10	15	10
5	4,800	60	10	20	10
6	4,400	55	10	25	10
7	4,000	50	10	30	10
8	3,600	45	10	35	10
9	3,200	40	10	40	10
10	2,800	35	10	45	10
11	2,400	30	10	50	10
12	2,000	25	10	55	10
13	1,800	22,5	10	57,5	10
14	1,600	20	10	60	10
15	1,400	17,5	10	62,5	10
16	1,200	15	10	65	10
17	1,000	12,5	10	67,5	10
18	0,800	10	10	70	10
19	0,600	7,5	10	72,5	10
20	0,400	5	10	75	10
21	0,320	4	10	76	10
22	0,240	3	10	77	10
23	0,160	2	10	78	10
24	0,080	1	10	79	10

Anhang 12

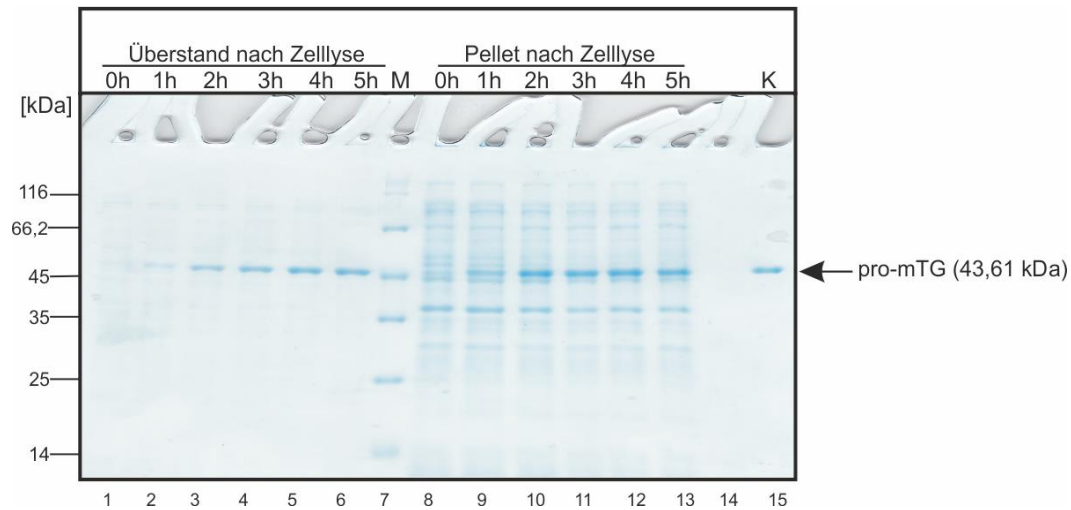


Abb.8. 6) Elektrophoretische Auftrennung der aus den 1/OD-Proben präparierten löslichen Proteinfraktion (Überstand nach Zellyse) und unlöslicher Proteinfraktion (Pellet nach Zellyse).

Die 1/OD – Proben wurden während der fed-batch Kultivierung des Stammes *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pBS16 zur Produktion der pro-TG¹⁶ genommen (siehe Tab. 3. 7, S. 77).

Es ist zu sehen, dass die zur mTG korrespondierende Bande im PA-Gel, an Intensität im Verlauf der Induktionszeit zunimmt (Spur 2-6 für die lösliche Phase und Spur 9-13 für die unlösliche Phase). Ebenfalls zeigt sich keine Produktion der pro-TG¹⁶ vor Induktion (Spur 1 und 8). Die aufgeführten Zeitpunkte sind in Stunden nach Induktion angegeben [h⁻¹]. Die gezeigten Molekulargewichte wurden aus der Publikation [Sommer *et al.*, 2012] entnommen. Es wurden 5 µL Probe und Marker aufgetragen.

M...Marker (*molecular weight, unstained*); K...positiv-Kontrolle mikrobielle Transglutaminase

Anhang 13

Temperaturabhängige Aktivierbarkeit der pro-TG¹⁶.

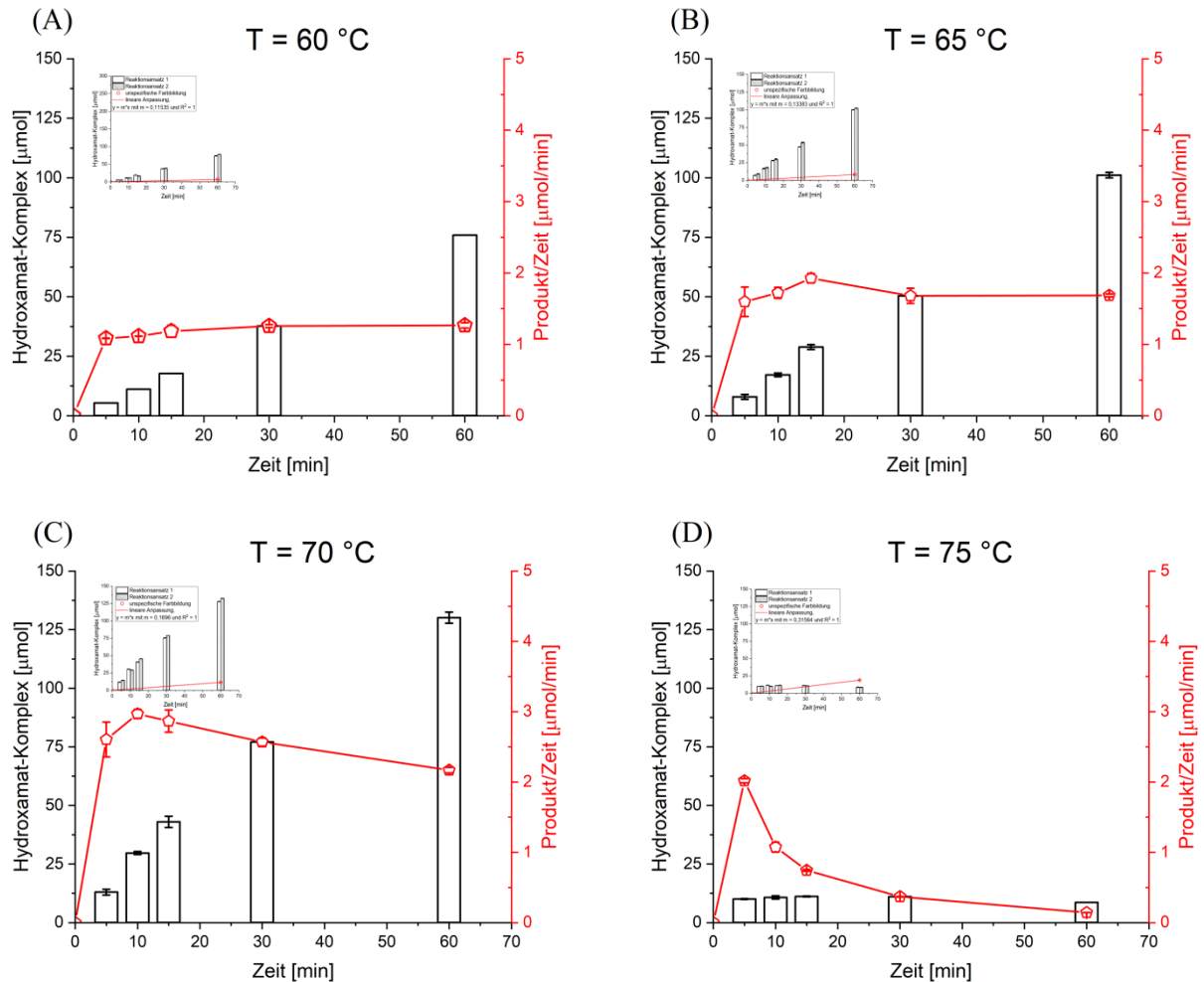


Abb.8. 7) Temperaturabhängige Aktivierbarkeit der pro-TG¹⁶.

75 µL einer 2 mg/mL pro-TG¹⁶ - Lösung wurden mit 1050 µL Substratlösung (30 mM CBZ-Gln-Gly-OH, 100 mM Hydroxylamin, 10 mM red. GSH, 200 mM TRIS/Acetate; pH = 6) versetzt ($c(\text{Enzym})_{\text{final}} = 0,133 \text{ mg/mL}$). Die Substrat - Lösung wurde vor Zugabe entsprechend vorinkubiert und die Soll - Temperatur mittels digitalem Thermometer überprüft. Ebenfalls erfolgte die pH - Wert Einstellung der Substrat - Lösung bei der jeweilig zu testenden Temperatur. Die Inkubation erfolgte bei (A) 60, (B) 65, (C) 70 oder (D) 75 °C und wurden nach $t = 0, 5, 10, 15, 30$ und 60 min. abgestoppt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 150 µL Aliquots entnommen und mit 150 µL Stopp-Lösung versetzt und für 1 min. bei 16,100 g zentrifugiert. Jeweils 200 µL des Ansatzes wurden anschließend in eine Kavität einer 96 well -Platte (Falcon, 1172, durchsichtig) übertragen und im FLUOstar Galaxy (BMG) bei 525 nm vermessen. Pro Temperatur wurde in 2 getrennten Ansätzen zweimal die Produktmenge über die Absorption bei 525 nm bestimmt ($n = 2$ technische Replikate, siehe auch inset-Diagramme Reaktionsansatz 1 und 2). Das Experiment wurde einmalig durchgeführt ($n = 1$ biologische Replikate). Dargestellt ist die Gesamtproduktbildung [µmol] bzw. die Produktbildung pro Minute [$U = \mu\text{mol/min}$] abzüglich der berechneten, unspezifischen Farbbildung bei den jeweiligen Temperaturen (siehe Anmerkung).

Anmerkung:

Parallel zu den oben beschriebenen Ansätzen mit den pro-TG¹⁶ - Lösungen, wurde zu jeder Temperatur ein Ansatz mit 350 µL Substratlösung (ebenfalls bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert) und 25 µL Solubilisierungspuffer mitinkubiert (Blindwert-Kontrolle). Zu den Zeitpunkten $t = 0$ und $t = 60$ min wurden 150 µL Aliquots aus der Kontrolle entnommen und die Reaktion mit 150 µL Stopp-Lösung gestoppt. Durch

die Blindwert-Kontrollansätze sollte der Einfluss einer möglichen, unspezifischen Bildung des Farbkomplexes, möglicherweise verursacht durch eine hydrolytische Deaminierung des Substrates, verfolgt und ausgeglichen werden. Hierfür wurde die Absorption bei 525 nm detektiert. Aus den resultierenden zwei Punkten ($t = 0$ min und $t = 60$ min) wurde einer Regressionsgerade ermittelt mit der die unspezifische Bildung des Farbkomplexes über den Reaktionszeitraum interpoliert wurde. Mittels der resultierenden Regressionsgleichung (angegeben in den *insets* der Abb.8. 7) konnte die Bildung des Farbkomplexes rechnerisch abgeschätzt werden und der berechnete Wert so von der Produktbildung abgezogen werden.

Anhang 14

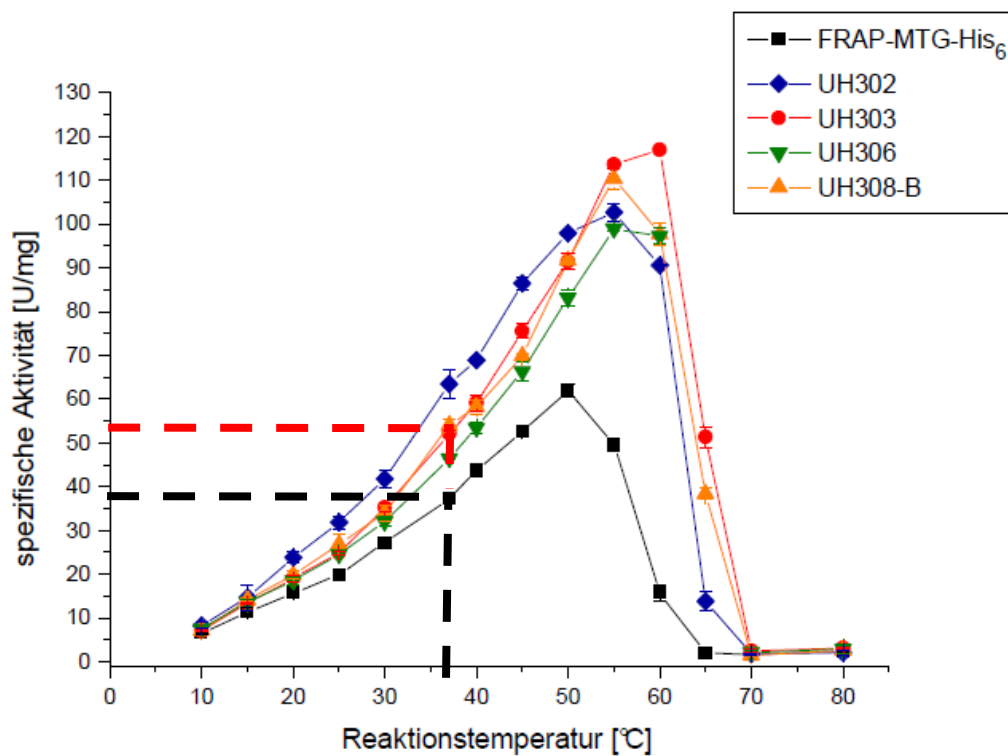


Abb.8. 8) Aus der Publikation von [Buettner *et al.*, 2012] zum Abschätzen der mittels A280 ermittelten Aspez.

Für die Wt mTG wird mittels der eingefügten Linie eine Aspez von 38 U/mg abgelesen (schwarze, gestrichelte Linie). In [Buettner *et al.*, 2012] ist eine Aspez von 26 U/mg angegeben. Für die UH308B wird eine Aspez von 53 U/mg abgelesen, angegeben sind in [Buettner *et al.*, 2012] 39 U/mg.

Die Differenz der ermittelten Aspez zwischen den abgelesenen Werten und den in der Publikation angegebenen Werten ergibt sich durch Einberechnung eines Faktors von 0,714, ermittelt aus A280 vs. Bradford. Der Faktor wurde in der Publikation von [Buettner *et al.*, 2012] erstmals eingeführt und ist dieser entnommen.

Anhang 15

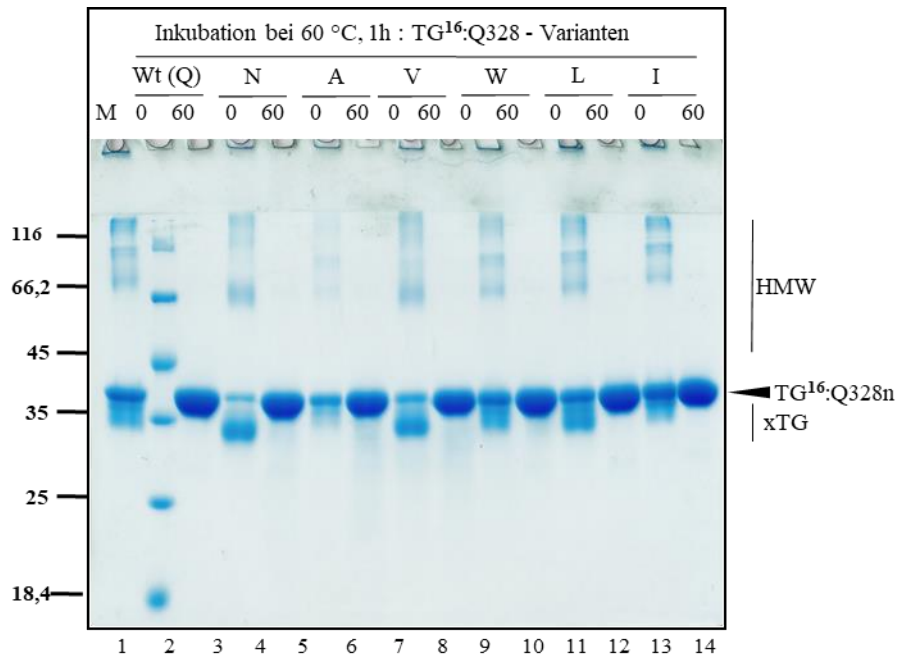


Abb.8. 9) Bildung von Quervernetzungsprodukten durch Inkubation der TG¹⁶:Q328 – Varianten bei 65 °C.
Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 12,5 %igen Trenngel. Die Proteinkonzentration der Proben betrug 1 mg/mL, aufgetragen wurden 10 µL Probe und Marker.
M...Marker (molecular weight, unstained), HMW ... high molecular weight products

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Benjamin Böhme (geb. Schrank)
Geburtsdatum:
Geburtsort:

Berufliche Laufbahn

Juni 2021 – heute *InfraLeuna GmbH* – Fachkraft für Wasser- und Abwasseranalytik
November 2019 – Juni 2021 *Analytikum Merseburg* – Laborant für ICP – OES, ICP – MS und AAS Analytik
September 2019 – Oktober 2019 *MVZ Labor Dessau GmbH* – Laborant für Immunoassay`s

Akademische Laufbahn

Januar 2016 – Juli 2019 *Institut für Pharmazie / AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte (Prof. Dr. Pietzsch)* – Promotionsstudent mit dem Dissertationsthema „Untersuchung zur Erzeugung, Herstellung und partiellen Charakterisierung thermoresistenter mikrobieller Transglutaminase Varianten“
November 2015 – Dezember 2015 *Institut für Pharmazie / AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte (Prof. Dr. Pietzsch)* – wissenschaftlicher Mitarbeiter
Oktober 2010 – November 2015 *Martin – Luther Universität Halle – Wittenberg* – B.Sc. und M.sc. im Fachbereich Biochemie

Schulische Ausbildung

Oktober 2008 – Juli 2010 *Dr. von Morgenstern Schule* (Berufsschule) – statl. geprüfter Biologisch Technischer Assistent
Oktober 2004 – August 2007 *Johann-Joachim-Winckelmann Gymnasium* – allg. Hochschulreife
Oktober 1998 – August 2004 *Sekundarschule Seehausen* – erweiterter Realschulabschlss
August 1994 – August 1998 *Grundschule Seehausen*

Sonstiges

September 2007 – September 2008 *Landesamt für Kultur und Denkmalpflege* (Schwerin) – Freiwilliges Soziales Jahr

Publikationen

Böhme, B., B. Moritz, J. Wendler, T. C. Hertel, C. Ihling, W. Brandt, M. Pietzsch. „Enzymatic Activity and Thermoresistance of Improved Microbial Transglutaminase Variants“. *Amino Acids* **2020** ,52

Poster

Schrank, B., B. Moritz, M. Pietzsch, T. C. Hertel. „Generation of a thermo-resistant microbial Transglutaminase and studies on the thermal inactivation behavior" VAAM, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, Wolfsburg, **2018**