

# Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Random Mutagenese

## Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Herrn Dipl.-Nat. Christian Marx**  
geboren am 04.02.1975 in Neuwied

Halle (Saale) 2008

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Markus Pietzsch

Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert

Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael Schlömann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.09.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014407**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014407>]

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Christian Marx, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel - selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Christian Marx

Halle, den 13.03.2008

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Arbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Viele Menschen haben mich während dieser Zeit unterstützt und dazu beigetragen, dass ich mich sowohl wissenschaftlich als auch zwischenmenschlich sehr wohl gefühlt habe. Diesen Personen möchte ich im Folgenden danken.

Dem Leiter der Arbeitsgruppe, Prof. Dr. Markus Pietzsch, danke ich für die interessante Aufgabenstellung und für viele anregende Diskussionen. Er gab mir die Gelegenheit, Teile der Arbeitsgruppe mit aufzubauen, indem er mir viel Verantwortung übertrug, von der Einrichtung des Labors mit den notwendigen Geräten bis hin zur Entwicklung und Etablierung geeigneter Methoden. Als mein Doktorvater gab er mir immer seine volle Unterstützung und sein Engagement für seine Mitarbeiter wird mir ein Vorbild sein.

Dr. Thomas Hertel war stets als sehr kompetenter Biochemiker für mich da. Er half mir mit vielen wertvollen Hinweisen und Ratschlägen weiter und hatte in jeder Situation die passende Bemerkung parat. In seinem Garten haben wir außerdem viele sehr schöne Feste gefeiert. Für all das danke ich ihm, ich werde ihn als Büronachbarn vermissen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und stets gefüllte Keks- und Kuchenteller. Ein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden und Freunden Katja Patzsch, Hany Hassounah, Christian Sommer und Matthias Jacob, durch die ich viele gute Anregungen erhielt und die für das perfekte Arbeitsklima sorgten. Frau Martina Schreiber danke ich für ihre zuverlässigen Handgriffe im Labor, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Uneingeschränkte Unterstützung hatte ich ebenfalls von meinen Eltern, die mich immer meinen eigenen Weg gehen ließen. Dafür danke ich ihnen ganz besonders.

Anke hat letztlich dafür gesorgt, dass die Zeit der Promotion hier in Halle eine nahezu perfekte Zeit war, deshalb danke ich ihr für ihre Begleitung in allen Lebenslagen.

# Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

## Inhaltsverzeichnis

<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>2</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen</b> .....	<b>4</b>
Inhaltsverzeichnis .....	4
Abkürzungen .....	5
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>6</b>
1.1 Einleitung .....	6
1.1.1 Vorbemerkungen zum Aufbau der Arbeit .....	6
1.1.2 Stand des Wissens .....	6
1.1.3 Motivation .....	15
1.2 Zielsetzung .....	15
<b>2 Lösliche Expression rekombinanter MTG</b> .....	<b>16</b>
2.1 Einleitung .....	16
2.2 Zielstellung .....	19
2.3 Ergebnisse und Diskussion .....	19
<b>3 Aktivierung der rekombinanten MTG</b> .....	<b>24</b>
3.1 Einleitung .....	24
3.2 Zielstellung .....	25
3.3 Ergebnisse und Diskussion .....	25
<b>4 Optimierung der rekombinanten MTG</b> .....	<b>34</b>
4.1 Einleitung .....	34
4.2 Zielstellung .....	36
4.3 Ergebnisse und Diskussion .....	37
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>53</b>
<b>6 Literatur</b> .....	<b>55</b>
<b>7 Lebenslauf</b> .....	<b>60</b>
<b>8 Publikationsliste</b> .....	<b>61</b>
<b>9 Anhang: Der Dissertationsschrift zu Grunde liegende     Veröffentlichungen</b> .....	<b>62</b>

## Abkürzungen

BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen = 1000 Basen (b)
LB	lysogeny broth
MTG	Mikrobielle Transglutaminase aus <i>Streptomyces mobaraensis</i>
rMTG	rekombinante, Dispase- oder TAMEP-aktivierte FRAP-MTG-His <sub>6</sub>
slpm	Standard-Liter pro Minute
SM-TAP	Tripeptidyl Aminopeptidase aus <i>Streptomyces mobaraensis</i>
TAMEP	TG-aktivierende Metalloprotease aus <i>Streptomyces mobaraensis</i>
TG	Transglutaminase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit ( $\mu$ mol/min)

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

### Aminosäuren

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

### Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Vorbemerkungen zum Aufbau der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beginnt mit einer allgemeinen Einleitung über den Stand des Wissens im Bereich der Transglutaminasen, insbesondere der mikrobiellen Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (MTG). Es folgen drei Hauptabschnitte (Abschnitt 2 bis 4), die sich thematisch an bereits veröffentlichten bzw. eingereichten Publikationen orientieren und aufeinander aufbauen. Jeder dieser Hauptabschnitte enthält eine eigene, spezifische Einleitung, sowie eine Darstellung und Diskussion der jeweiligen Ergebnisse.

Abschnitt 2 behandelt die lösliche, rekombinante Expression der mikrobiellen Transglutaminase in *E. coli*. Die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht [Marx et al., 2007a]. Die Originalpublikation befindet sich in Anhang 9 A.

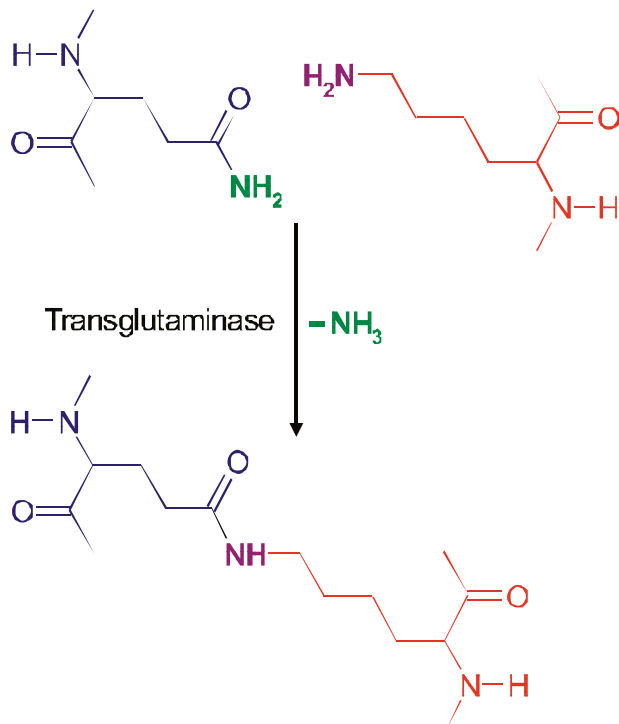
Die Ergebnisse zu Abschnitt 3, Aktivierung der rekombinanten MTG, sind ebenfalls veröffentlicht worden [Marx et al., 2008a]. Anhang 9 B enthält die Originalpublikation.

Abschnitt 4 behandelt die Optimierung der mikrobiellen Transglutaminase mittels Random Mutagenese und die Charakterisierung thermostabiler sowie hitzeempfindlicher Varianten. Auch diese Ergebnisse wurden publiziert [Marx et al., 2008b], siehe Anhang 9 C. Außerdem wurden die thermostabilen MTG-Varianten zum Patent angemeldet [Marx et al., 2007b].

### 1.1.2 Stand des Wissens

#### 1.1.2.1 Durch Transglutaminasen katalysierte Reaktionen

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



**Abb. 1:** Transglutaminasen katalysieren die Verknüpfung der Seitenketten von proteingebundenem Glutamin und Lysin und bilden eine Isopeptidbindung.

TGs gehören zur Enzymklasse der Transferasen und die Bezeichnung nach der Enzymnomenklatur lautet Protein-Glutamin  $\gamma$ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.13).

Der Reaktionsmechanismus entspricht einer katalytischen Triade, gebildet von den Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat. Als Zwischenprodukt wird ein Acyl-Enzym-Komplex gebildet, bei dem das peptidgebundene Glutamin als Acyl-Donor dient und im Übergangszustand kovalent mit dem reaktiven Cystein verbunden ist. Das primäre Amin dient schließlich als Acyl-Akzeptor.

Die Verknüpfung von Proteinen durch eine Isopeptidbindung ist vergleichbar mit der Umkehrreaktion einer Proteolyse, bei der eine Peptidbindung gespalten wird, mit dem Unterschied, dass es sich dabei um eine  $\alpha$ -Peptidbindung handelt.

### 1.1.2.2 Verbreitung der Transglutaminasen

Transglutaminasen sind weit verbreitet und kommen in den verschiedensten Organismen vor. Die bekanntesten Vertreter der tierischen Transglutaminasen sind Faktor XIIIa und verschiedene Tissue TG [Chung, 1972; Greenberg et al., 1991]. Faktor XIII wird als inaktives Zymogen synthetisiert und durch die Serinprotease Thrombin zu Faktor XIIIa aktiviert. Dieser

spielt eine entscheidende Rolle im letzten Schritt der Blutgerinnungskaskade, indem er die gebildeten Fibrin-Polymere quervernetzt.

Eukaryotische Transglutaminasen sind in der Regel Calcium-abhängig, so auch die TG aus der Meerschweinchenleber [Folk und Cole, 1966a] und die Fisch-TG [Yasueda et al., 1995], und einige sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut.

Die humanen Transglutaminasen werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Chorea Huntington, bei denen TGs an der Bildung zytotoxischer Proteinaggregate beteiligt sein könnten, sowie Zöliakie, bei der TGs eine Rolle bei der Entstehung von Autoantikörpern spielen [Kim et al., 2002].

Datenbankrecherchen haben ergeben, dass es in Archaeobakterien, Bakterien, Pflanzen, Hefen und in Nematoden Proteine gibt, die zu den tierischen Transglutaminasen homolog sind [Makarova et al., 1999]. Gemeinsames Merkmal sind drei konservierte Bereiche um die Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat, die beispielsweise im Faktor XIIIa die katalytische Triade bilden. Allerdings wird angenommen, dass diese homologen Proteine zum größten Teil keine Transglutaminase-, sondern Proteaseaktivität besitzen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Pseudomurein-Endoisozeptidase eines Phagen aus *Methanobacterium*, die als Protease eine Rolle in der Zellwandlyse des Wirtsorganismus spielt [Pfister et al., 1998]. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die eukaryotischen Transglutaminasen evolutionär aus prokaryotischen Proteasen entwickelt haben.

Es existieren auch nicht-tierische Transglutaminasen, allerdings weisen diese keine Sequenzhomologie zu tierischen Transglutaminasen auf.

### 1.1.2.3 Aufbau und Substratspezifität der mikrobiellen Transglutaminase

Die erste mikrobielle Transglutaminase (MTG) wurde 1989 nach einem Enzymscreening in *Streptoverticillium* S-8112 entdeckt, einem Stamm, der nach der heute gültigen Nomenklatur zur Gattung *Streptomyces* gehört und *Streptomyces mobaraensis* genannt wird. Die MTG besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer Molmasse von etwa 38 kDa, hat einen isoelektrischen Punkt von 8,9 und ist Calcium-unabhängig [Ando et al., 1989]. Sie wird vom Originalstamm in das umgebende Medium sekretiert.

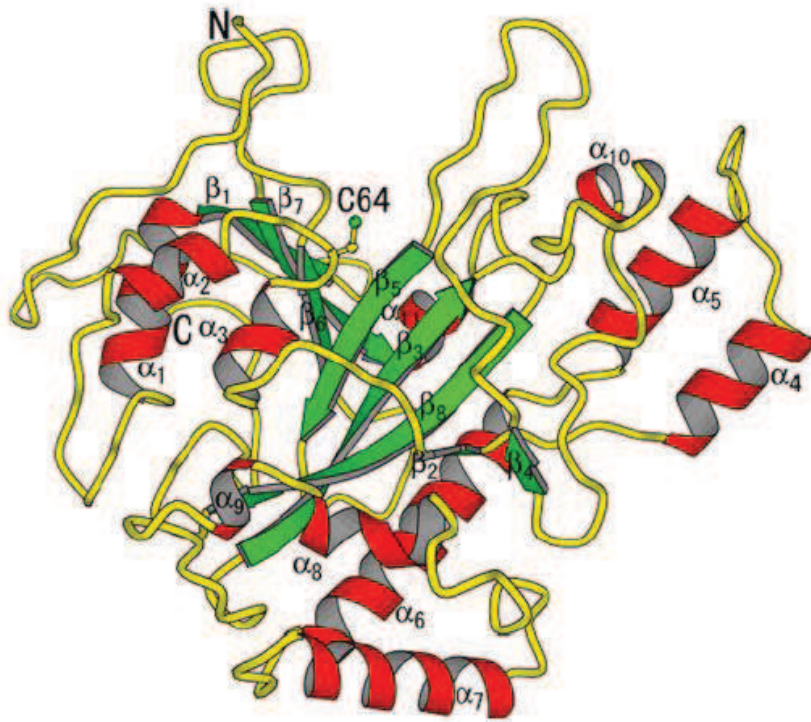
Die Proteinsequenz der aktiven MTG aus Sv. S-8112 wurde 1993 erstmals bestimmt [Kanaji et al., 1993]. Kurz darauf wurde ebenfalls die Nukleotidsequenz aufgeklärt, sowie kloniert und die MTG in *Streptomyces lividans* exprimiert [Washizu et al., 1994]. Die veröffentlichte Nukleotidsequenz enthielt allerdings Fehler, die später von Pasternack et al. korrigiert wurden [Pasternack et al., 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass die MTG als Prä-Pro-



Enzym translatiert wird. Die Struktur entspricht dem Aufbau vieler sekretorischer Proteine in grampositiven Bakterien [Eckhardt et al., 1987; Silhavy et al., 1983]. Die N-terminale Prä-Sequenz, eine aus 31 überwiegend hydrophoben Aminosäuren bestehende Region, dient dem Transport des Enzyms zum Sekretionsapparat in der Cytoplasma-Membran. Das Prä-Pro-Enzym wird aus der Zelle ausgeschleust und die Prä-Sequenz durch eine Signalpeptidase abgespalten. Bakterielle Pro-Sequenzen erfüllen verschiedene Funktionen. Sie können zum Beispiel ein intramolekulares Chaperon sein, die Sekretion unterstützen, die Stabilität erhöhen oder die eigene Aktivität hemmen [Braun und Tommassen, 1998]. Die Pro-Sequenz der MTG ist 45 Aminosäuren lang und dient zumindest der eigenen Inhibierung, denn die Pro-MTG ist inaktiv. Es wird jedoch auch eine Stabilisierungsfunktion diskutiert, was erklären würde, dass die Pro-MTG eine erhöhte Thermostabilität gegenüber der aktiven MTG besitzt [Pasternack et al., 1998].

*Streptomyces mobaraensis* sekretiert zwei Proteasen, die nacheinander die Pro-MTG aktivieren. Zunächst schneidet die TG-aktivierende Metalloprotease (TAMEP) die Pro-Sequenz bis auf einen Rest von vier Aminosäuren ab [Zotzel et al., 2003a], welcher in einem zweiten Schritt durch die Tripeptidyl Aminopeptidase (SM-TAP) entfernt wird [Zotzel et al., 2003b]. Bereits nach dem ersten Aktivierungsschritt zeigt die MTG allerdings ihre volle Aktivität [Zotzel et al., 2003a]. Die physiologische Funktion der zweiten Protease ist bisher unbekannt.

Die dreidimensionale Struktur der aktiven MTG wurde 2002 aufgeklärt [Kashiwagi et al., 2002b]. Demnach besteht das Enzym aus einer kompakten, scheibenartigen Domäne mit einer tiefen Tasche an einer Seite, in deren Zentrum sich das für die katalytische Aktivität verantwortliche Cys<sup>64</sup> befindet (Abb. 2).



**Abb. 2: Dreidimensionale Struktur der mikrobiellen Transglutaminase.** Die MTG besitzt eine scheibenartige Form mit einer zentralen  $\beta$ -Faltblattstruktur, die an drei Seiten von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Im Zentrum der Substrattasche befindet sich das für die katalytische Aktivität verantwortliche Cys<sup>64</sup>. Quelle: [Kashiwagi et al., 2002b]

Die Struktur der MTG gehört zu der  $\alpha+\beta$  Faltungsklasse, sie enthält 11  $\alpha$ -Helices und 8  $\beta$ -Faltblätter. Das zentrale  $\beta$ -Faltblatt bildet eine siebensträngige anti-parallele Struktur, mit einer starken Verdrehung zwischen  $\beta_5$  und  $\beta_6$ . Die Hauptverbindung zwischen diesen Faltblättern besteht nur aus einer einzigen Wasserstoff-Brückenbindung zwischen Trp<sup>258</sup> und Thr<sup>273</sup>. In der Substrattasche befinden sich viele saure Aminosäuren, unter anderem Asp<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Asp<sup>4</sup>, Glu<sup>249</sup>, Asp<sup>255</sup> und Glu<sup>300</sup>. Auf der Oberfläche um die Tasche herum liegen viele aromatische Reste, wie Trp<sup>59</sup>, Tyr<sup>62</sup>, Trp<sup>69</sup>, Tyr<sup>75</sup>, Tyr<sup>278</sup>, Tyr<sup>291</sup>, Tyr<sup>302</sup>. Dieser charakteristische Aufbau hat laut Kashiwagi et al. Einfluss auf die Substratspezifität. Die linke Seite der Substrattasche wird durch einen N-terminalen Loop (Asp<sup>1</sup> bis Ala<sup>10</sup>) sowie durch einen Loop zwischen den Faltblättern  $\beta_6$  und  $\beta_7$  (Asn<sup>276</sup> bis Met<sup>288</sup>) gebildet. Ein relativ flexibler Loop zwischen Asn<sup>239</sup> und Asn<sup>253</sup> bildet eine weitere Seite der Substrattasche. Die Aminosäuren am N-Terminus beeinflussen besonders die Aktivität der MTG. So wurde gezeigt, dass eine MTG-Variante, der das N-terminale Asp fehlt, eine höhere Reaktionsrate besitzt [Shimba et al., 2002b].

Interessanterweise vermuten Kashiwagi et al. für den Reaktionsmechanismus der MTG statt einer katalytischen Triade, bestehend aus Cys<sup>64</sup>, His<sup>274</sup> und Asp<sup>255</sup>, eine Cys-Asp-Diade, bei

der Asp<sup>255</sup> die Rolle übernimmt, die sonst (beispielsweise bei Faktor XIII) das His spielt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die MTG-Aktivität nahezu komplett verloren geht, wenn man Asp<sup>255</sup> durch Ala ersetzt, dass aber noch 50 % Restaktivität verbleiben, wenn man His<sup>274</sup> durch Ala austauscht [Kashiwagi et al., 2002b].

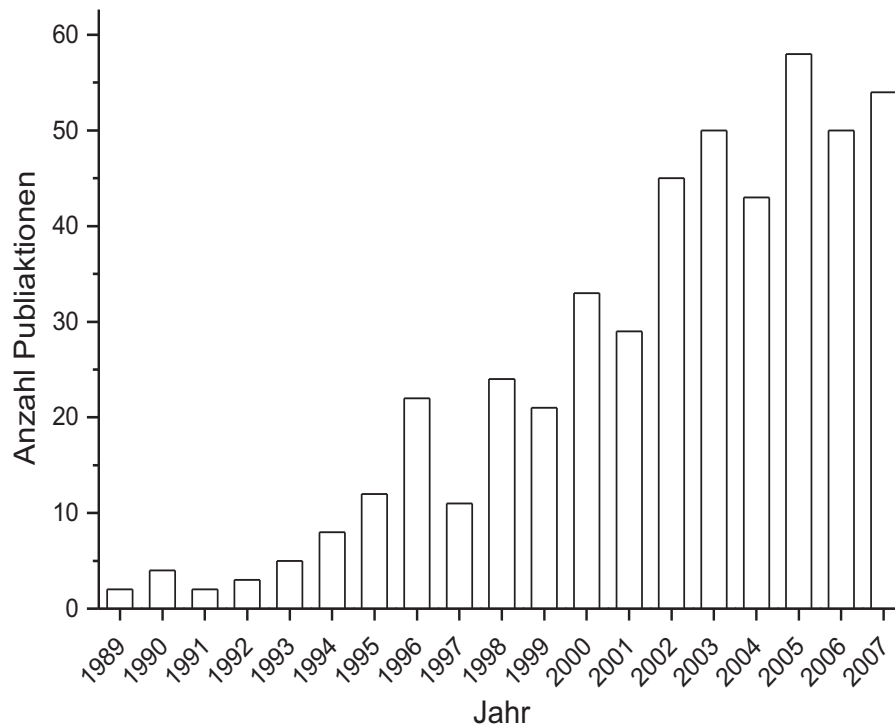
Die MTG besitzt eine breite Spezifität für Acyl-Akzeptor-Substrate. Es werden primäre Amine, Polyamine und peptidgebundenen Lysin akzeptiert. Als Acyl-Donor dienen jedoch ausschließlich peptidgebundene Glutaminreste.

Aliphatische Amine werden erkannt, sofern sie keine Seitenkette neben der Aminogruppe aufweisen. Die  $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren wird von der MTG nicht erkannt. Neben L-Lysin ist aber auch D-Lysin ein Substrat für die MTG. Ethylester von Glycin und Alanin, bei denen die Carboxylgruppe verestert wurde, werden ebenfalls akzeptiert. Außerdem werden Amine mit diversen funktionellen Gruppen akzeptiert, wie Carbonylgruppen, Phosphatgruppen, oder Saccharide. In der Regel ist jedoch ein Spacer aus mindestens vier C-Atomen ohne Seitenkette nötig [Ohtsuka et al., 2000b].

Aus der dreidimensionalen Struktur der MTG wurde abgeleitet, dass ein Acyl-Donor-Substrat (peptidgebundenen Glutamin) auf der C-terminalen Seite eine große konformationelle Flexibilität und kleine Seitenketten aufweisen muss. Eine Vermutung, die durch ein Experiment unterstützt wird, bei dem gezeigt wurde, dass solche Verbindungen gute Substrate der MTG sind, bei denen an der N-terminalen Seite des reaktiven Glutamins von Gly verschiedene sowie positiv geladene Aminosäurereste vorhanden sind. Die Aktivität der MTG nimmt jedoch drastisch ab, wenn sich an der C-terminalen Seite des Glutamins andere Aminosäuren außer Gly befinden [Ohtsuka et al., 2000a].

#### 1.1.2.4 Anwendungsgebiete für die mikrobielle Transglutaminase

Die physiologische Funktion prokaryotischer Transglutaminasen ist weitgehend unbekannt. Möglich ist, dass sie eine Rolle bei der Sporulation spielen [Kobayashi et al., 1996]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung, dass ein Sporenhüllenprotein aus *Bacillus subtilis* durch eine Transglutaminase quervernetzt wird [Ragkousi und Setlow, 2004]. So wenig die natürliche Funktion der MTG bekannt ist, so vielfältig sind dagegen die industriellen Anwendungsmöglichkeiten [Mariniello und Porta, 2005]. Abb. 3 zeigt die Anzahl der Publikationen zum Thema „microbial transglutaminase“ seit deren Entdeckung 1989. Das Interesse an diesem Enzym hat seitdem kontinuierlich zugenommen.



**Abb. 3: Anzahl der Publikationen zum Thema "microbial transglutaminase" seit Entdeckung der MTG im Jahr 1989.** Quelle: SciFinder.

In der Lebensmittelindustrie werden TGs eingesetzt, um Lebensmittelproteine quervernetzen [de Jong und Koppelman, 2002; Dube et al., 2007; Kuraishi et al., 2001]. Verwendung finden sie seit 1980 [Ikura et al., 1980; Motoki und Nio, 1983]. Man stellte fest, dass verschiedene Proteine industriell gefertigter Lebensmittel gute Substrate der verwendeten tierischen TGs sind, beispielsweise Casein und Sojaproteine. Eine Quervernetzung dieser Proteine führte zu verbesserten Eigenschaften in Bezug auf Gelierung, Löslichkeit und Emulgierfähigkeit [Motoki et al., 1984; Nio et al., 1986]. Hohe Kosten und geringe Verfügbarkeit der tierischen TGs schränkten die Anwendungsmöglichkeiten zunächst ein. Das änderte sich 1989 mit der Entdeckung der MTG, die in größeren Mengen produziert werden kann.

Bei Milchprodukten wird hauptsächlich Casein verknüpft, Molkeproteine wie  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin sind wesentlich schlechtere Substrate [Matsumura et al., 1996]. Bevorzugt wird die MTG daher in der Joghurtproduktion eingesetzt, wo sie die Gelstärke erhöht und die Trennung von flüssiger und fester Phase verringert [Lorenzen, 2000].

Bei Backwaren werden TGs ebenfalls eingesetzt. Sie sind in der Lage, Gluten-Proteine zu vernetzen, wodurch die physikochemischen und rheologischen Eigenschaften des Teigs

positiv beeinflusst werden [Larre et al., 2000]. In Japan findet die TG auch in der Produktion von Nudeln Anwendung [Kuraishi et al., 2001].

Bei der Fleisch- und Wurstherstellung wird ebenfalls TG eingesetzt. Myosin B, Myosin und Actin werden verknüpft, Textur, Elastizität und Festigkeit von Fleisch können verbessert werden und die Beständigkeit gegenüber Erhitzen und Einfrieren wird erhöht [Kuraishi et al., 2001].

Überwiegend in Japan wird die TG zur Herstellung von Surimi, einer Fischpaste, verwendet [Sakamoto et al., 1995]. Hier wird die Transglutaminase im ersten Prozessschritt, vor dem Kochen, zugesetzt und verbessert die Elastizität und Festigkeit.

Oftmals werden zusätzlich Sojaproteine zugesetzt, die Substrate der TG sind und die Textureigenschaften der Lebensmittel weiter verbessern können [Kuraishi et al., 2001].

Weitere Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelindustrie werden für Proteine aus Reis, Erbsen, Lupinen, Sonnenblumen und Sesam diskutiert. Allerdings sind manche Proteine nur als Substrate geeignet, wenn sie vorher teilweise denaturiert oder hydrolysiert werden. Ebenfalls wäre es möglich, Nahrungsmittel gezielt mit Aminosäuren anzureichern, um deren Nährwert zu erhöhen [Dube et al., 2007].

Die MTG wurde des Weiteren verwendet, um Enzyme zu immobilisieren, beispielsweise Trypsin und  $\alpha$ -Amylase auf Ionenaustauschern [Kamata et al., 1992] und  $\beta$ -Glucosidase auf einer Silica-Gel-Matrix [Synowiecki und Wolosowska, 2006].

Wenn Proteine miteinander verknüpft werden sollen, die kein Substrat der MTG sind, kann man Gln- oder Lys-Tags anbringen. Dies wurde bereits erfolgreich durchgeführt um GFP-Varianten zu verknüpfen oder wiederum Enzyme zu immobilisieren. Als Tags dienten beispielsweise Teile der F-Helix aus Myoglobin und modifizierte S-Peptid-Varianten [Kamiya et al., 2003a; Kamiya et al., 2003b; Takazawa et al., 2004; Tanaka et al., 2004], sowie kürzere Peptidsequenzen [Kamiya et al., 2005; Tominaga et al., 2004].

Auch bei kosmetischen Produkten kann man sich die Eigenschaften der TG zu Nutzen machen, um primäre Amine an Keratinocyten-Proteine zu binden. Auf diese Weise könnte man eine Reihe von Verbindungen einbringen, beispielsweise Sonnenschutzmittel, Haut- oder Haarpflegemittel, entzündungshemmende Stoffe, Farbstoffe, Parfüme oder Insektenabwehrmittel. Mikropartikel mit Gruppen, die als TG-Substrat dienen, könnten ebenfalls auf die Hautoberfläche aufgebracht und verknüpft werden [Mariniello und Porta, 2005].

In der Lederindustrie kann mittels TG modifiziertes Casein als Beschichtung eingesetzt werden [Mariniello und Porta, 2005] und auch bei der Bearbeitung von Wolle findet die MTG

Anwendung, wo sie die Zugfestigkeit wieder erhöhen kann, die durch vorherige Bearbeitungsschritte reduziert wurde [Cardamone, 2007].

Neuere Technologien beschäftigen sich mit dem Einsatz der mikrobiellen Transglutaminase bei der Herstellung bioabbaubarer Polymere, wie beispielsweise Filme und Folien aus Proteinen wie Zein oder Casein. Durch die MTG können die Eigenschaften der Polymere verändert werden, zum Beispiel lässt sich die Wasserlöslichkeit verringern oder die Elongation erhöhen [Chambi und Grosso, 2006; Oh et al., 2004]. Auch die Eigenschaften von Gelatine lassen sich durch die MTG modifizieren [Taylor et al., 2005; Taylor et al., 2006].

#### 1.1.2.5 Tests zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität

Ein schneller und zuverlässiger Test zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität ist der Hydroxamattest [Folk und Cole, 1966b] (Abb. 4). Z-Gln-Gly dient hierbei als Glutamin-Substrat, das von der TG mit Hydroxylamin zu Z- $\gamma$ -Glutaminyl-Hydroxamat-Gly umgesetzt wird. Mit Eisen bildet sich ein Farbkomplex, der bei 525 nm photometrisch detektiert werden kann.

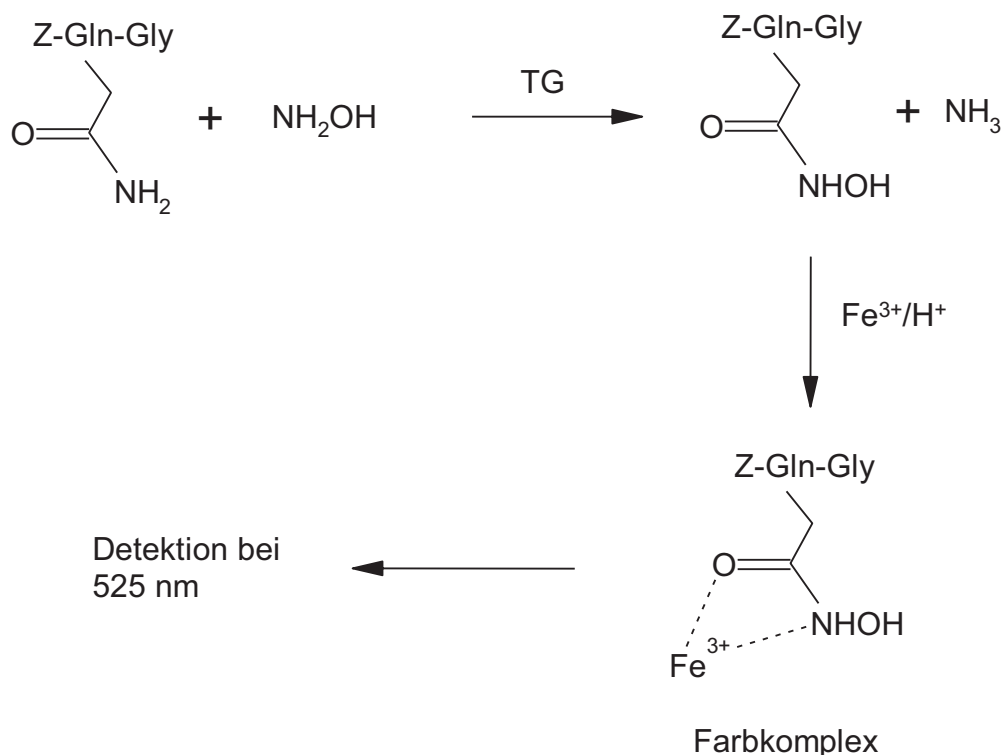


Abb. 4: Prinzip des Hydroxamattests zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität.

Ein weiterer Aktivitätstest, bei dem größere Substrate eingesetzt werden, basiert auf dem Einbau von Monodansylcadaverin in N,N'-Dimethylcasein. Die Verknüpfungsreaktion kann außerdem kontinuierlich verfolgt werden. Messprinzip ist eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums des freien Monodansylcadaverins (535 nm) zum gebundenen (515 nm) [Lorand et al., 1971].

Zur Visualisierung der TG-Aktivität wird auch die nachweisbare Molmassenvergrößerung mittels SDS-PAGE nach der Homoquervernetzung bzw. Heteroquervernetzung von Proteinen genutzt [de Jong et al., 2001].

### 1.1.3 Motivation

Bisher war es nicht gelungen, die mikrobielle Transglutaminase in löslicher Form intrazellulär in *E. coli* zu exprimieren. Sie fiel ausschließlich in Form unlöslicher inclusion bodies an und musste erst per Rückfaltung in ihren nativen Zustand überführt werden. Eine lösliche rekombinante Expression ist jedoch Voraussetzung, um Enzyme mittels zufallsbasierter Mutagenese verändern zu können. Es gibt viele Ziele für solche Veränderungen, beispielsweise die Optimierung der Stabilität oder eine Veränderung der Substratspezifität.

Eine thermostabile MTG könnte Anwendung in Prozessen finden, die den Einsatz höherer Temperaturen erfordern, beispielsweise bei der Herstellung von Folien mittels Extrusion.

Für den Lebensmittelbereich wäre eine hitzeempfindliche Variante sinnvoll, die bei niedrigeren Temperaturen eine normale Aktivität aufweist, die aber bei höheren Temperaturen schneller denaturiert. Dies wäre in Prozessen sinnvoll, in denen die MTG deaktiviert werden soll, aber aufgrund anderer Zutaten Zeiten mit höherer Temperatur so kurz wie möglich sein müssen.

## 1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es

1. Die Pro-Form der mikrobiellen Transglutaminase in löslicher Form in *E. coli* zu exprimieren, um damit gentechnische Manipulationen zu vereinfachen und um eine Optimierung mittels zufallsbasierter Mutagenese erstmals zu ermöglichen.
2. Mögliche Proteasen für die Aktivierung der rekombinanten Pro-MTG zu identifizieren.
3. Eine Bibliothek zufällig mutierter MTG-Varianten zu erzeugen und diese sowohl nach erhöhter Thermostabilität als auch nach erhöhter Hitze-Sensitivität zu screenen. Dazu war es zunächst nötig, ein Screeningverfahren zu etablieren, das erstmals den zusätzlichen Schritt der Aktivierung eines Pro-Enzyms beinhaltet.

Diese Ziele wurden bearbeitet und die Ergebnisse publiziert. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Meilensteine gesondert vorgestellt und erläutert.

## 2 Lösliche Expression rekombinanter MTG

Siehe Anhang 9A: Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1543 - 1550.

### 2.1 Einleitung

Bisher wird die MTG durch konventionelle Kultivierung des Wildtyp-Stamms *Streptomyces mobaraensis* gewonnen. Die sekretierte Pro-MTG wird durch zwei *Streptomyces*-eigene Proteasen aktiviert und anschließend kann das aktive Enzym aus dem Kulturüberstand isoliert werden. Die Ausbeute liegt bei etwa 100-150 mg/L Bioreaktorvolumen [Ando et al., 1989; Zheng, 2002].

Es wurden bereits viele Versuche unternommen, die MTG in löslicher Form rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Eine Produktion in *E. coli* als Standardorganismus würde gentechnische Arbeiten wesentlich vereinfachen. Durch eine lösliche Expression könnte die Produktion ökonomischer werden, da eine Rückfaltung unlöslicher inclusion bodies entfiel. Absolut notwendig ist eine lösliche Expression für Hochdurchsatzscreening-Methoden im Rahmen der Optimierung des Enzyms mittels Random Mutagenese. Bisher war ein solches Screening nicht möglich, da die Rückfaltung der inclusion bodies zu zeitaufwändig wäre [Kashiwagi et al., 2002a].

Alle bisherigen Versuche, die MTG in löslicher Form in *E. coli* zu exprimieren, schlugen jedoch fehl (siehe auch Tab. 1).

Unter anderem waren folgende Ansätze nicht erfolgreich:

- Die Original-Gensequenz wurde im Bezug auf die Codon Usage optimiert und durch eine ompA-Sequenz sollte ein Transport ins Periplasma erzielt werden. Die Ausbeute war mit 5 mg/L jedoch sehr gering [Takehana et al., 1994].
- Die N-terminale Fusion mit einem T7 Signalpeptid führte zu unlöslichen inclusion bodies, von denen nur 20 % durch Rückfaltung wieder in die aktive Form überführt werden konnten [Kawai et al., 1997].
- Eine weitere Optimierung der Codon Usage für *E. coli* führte ebenfalls zu unlöslichen inclusion bodies, die Ausbeute nach Rückfaltung betrug hier nur 15 % [Yokoyama et al., 2000].

Nach Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ein Expressionssystem für die MTG in *Corynebacterium glutamicum* etabliert, da die lösliche Expression in *E. coli* nicht erreicht wurde. In diesem System wird die Pro-MTG ins Medium sekretiert und durch eine co-



sekretierte Protease aktiviert [Kikuchi et al., 2003]. Die Ausbeuten betragen bis zu 900 mg/L [Date et al., 2004]. Allerdings bietet dieser grampositive, GC-reiche Wirtsorganismus nicht die Vorteile einer Expression in *E. coli*, wie einfache Transformierbarkeit und Klonierung.

Da die MTG in ihrer aktiven Form durch ihre Protein vernetzende Aktivität für die Wirtszelle höchstwahrscheinlich toxisch ist, muss die inaktive Pro-Form exprimiert werden, die dann in einem separaten Schritt aktiviert werden kann.

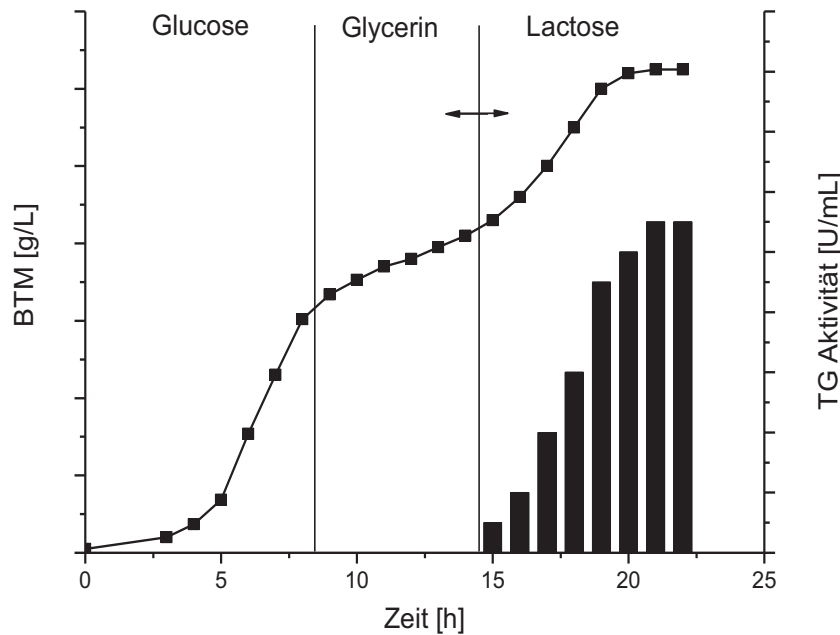
Viele Faktoren beeinflussen die Menge und Löslichkeit rekombinanter Proteine [Baneyx, 1999; Jana und Deb, 2005], darunter:

- Art des Induktors
- Induktorkonzentration
- Kopienzahl des Plasmids
- Lokalisierung des exprimierten Proteins
- Temperatur nach Induktion

Die bisherige Expression der MTG im Cytosol von *E. coli* führte zur Bildung von unlöslichen inclusion bodies. Wie für verschiedene Proteine gezeigt wurde, kann ein Transport ins Periplasma zu erhöhten Mengen an löslichem und korrekt gefaltetem Enzym führen. Viele Prä-Sequenzen wurden für das Targeting ins Periplasma untersucht und es werden diverse Gründe für eine erhöhte Löslichkeit diskutiert, darunter eine niedrigere Proteinkonzentration und das Vorhandensein von Chaperonen [Mergulhao et al., 2005].

Die Kultivierungstemperatur sowie die Temperatur nach Induktion beeinflussen ebenfalls die Menge an löslichem Protein. Eine niedrigere Wachstumstemperatur als 37 °C [Schein und Noteborn, 1988], sowie ein Absenken der Temperatur nach IPTG-Induktion [Kataeva et al., 2005] können zu einem höheren Anteil an löslichem Protein führen.

Eine Induktionsvariante, die verschiedene Vorteile vereint, ist die Verwendung eines Autoinduktionsmediums [Studier, 2005] (Abb. 5).



**Abb. 5: Beispiel für die Proteinexpression in Autoinduktionsmedium.** Das Medium besteht aus LB-Medium mit Glucose, Glycerin, Lactose, einem Phosphatpuffer zur Stabilisierung des pH-Wertes und  $MgSO_4$ , das bei *E. coli* für das Erreichen höherer Zelldichten sorgt. Die Zellen verwerten zunächst Glucose als C-Quelle. Ist die Glucose verbraucht, stellt sich der Stoffwechsel auf Lactose um, zur Überbrückung dient Glycerin. Die Lactose wird zu Galactose verstoffwechselt und die Proteinexpression wird induziert (Balkendiagramm). Die zwei Hauptvorteile dieses Mediums sind das Erreichen höherer Zelldichten sowie ein flexibler Induktionszeitpunkt.

Üblichem LB-Medium werden Glucose, Glycerin und Lactose, sowie ein Phosphatpuffer und  $MgSO_4$  zugesetzt. Die Zellen wachsen zunächst auf Glucose. Ist diese verbraucht, stellen die Zellen ihren Stoffwechsel auf Lactose um, in der Zwischenzeit dient Glycerin als C-Quelle. Die Lactose wird zu Glucose und Galactose hydrolysiert, letztere induziert die Proteinexpression. Der Phosphatpuffer verhindert, dass der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung zu stark absinkt und das  $MgSO_4$  ist bei *E. coli* essenziell für höhere Zelldichten. Dieses Medium bietet mehrere Vorteile. Im Gegensatz zur IPTG-Induktion, bei der in der Regel bei einer relativ niedrigen optischen Dichte von 0,5 induziert wird, wachsen die Zellen bei den richtigen Konzentrationen an zugesetzten C-Quellen zunächst zu einer hohen Dichte an, bevor die Proteinexpression induziert wird. Die Induktion erfolgt nicht zu einem festgelegten Zeitpunkt. Dies ist vor allem ein Vorteil bei der parallelen Expression einer großen Anzahl an Klonen, beispielsweise in einem Hochdurchsatz-Screening, bei dem zwangsläufig kleine Unterschiede in der Start-Biomasse auftreten, wodurch die Zellen bei IPTG-Induktion in leicht unterschiedlichen Phasen des Wachstums induziert werden würden.

## 2.2 Zielstellung

Die Pro-Form der mikrobiellen Transglutaminase sollte in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden, um damit gentechnische Manipulationen zu vereinfachen und um eine Optimierung mittels zufallsbasierter Mutagenese erstmals zu ermöglichen. Zur leichteren Reinigung sollte das Enzym außerdem einen Affinitätstag erhalten.

Mit dem Anbringen einer Signalsequenz sollte untersucht werden, ob sich die MTG in das Periplasma transportieren lässt und ob sich die Löslichkeit dadurch verbessert.

Da das Pro-MTG-Gen aus einem GC-reichen Organismus stammt, sollte weiterhin untersucht werden, ob sich die Expression positiv beeinflussen lässt, indem seltene tRNAs zur Verfügung gestellt werden.

Als Induktionsmethode sollte neben der IPTG-Induktion eine Autoinduktionsvariante untersucht werden, die sich durch höhere erreichbare Zelldichten und einen flexiblen Induktionszeitpunkt auszeichnet.

## 2.3 Ergebnisse und Diskussion

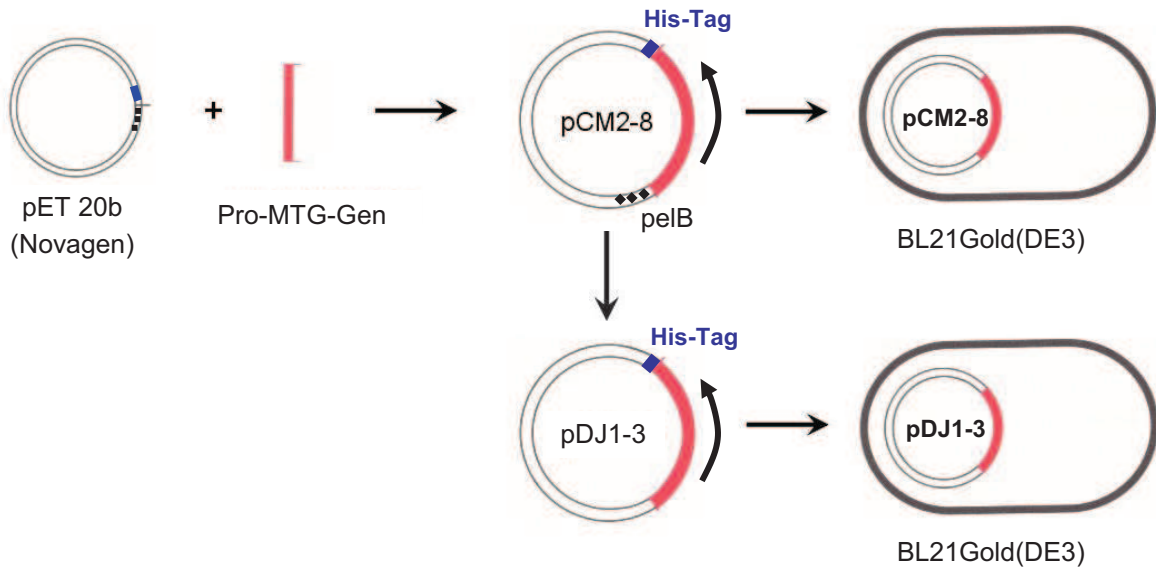
Bisher schlugen alle Versuche die MTG in löslicher Form in *E. coli* zu exprimieren fehl. *E. coli* ist dank einer guten Transformierbarkeit, einfachen Klonierungsverfahren und Möglichkeiten zur Hochzelldichtefermentation mit Abstand der am weitesten verbreitete Mikroorganismus für die Produktion rekombinanter Enzyme. Eine lösliche Expression ist notwendig, wenn eine Enzybibliothek nach verbesserten Eigenschaften gescreent werden soll, die zum Beispiel durch gerichtete Enzymevolution erzeugt wurde. Für die MTG würde dies bedeuten, dass der Zeitaufwand zu groß wäre, die einzelnen Enzymvarianten aus inclusion bodies rückzufalten. Damit war eine Veränderung der MTG mit diesen Methoden bisher nicht möglich [Kashiwagi et al., 2002a].

Aus der bisherigen Literatur war bekannt, dass die Klonierung und Expression der MTG an verschiedenen Stellen Probleme bereiten kann. Es wurden daher unterschiedliche Konstrukte und Expressionsorganismen untersucht, sowie verschiedene Induktionsvarianten getestet.

Da die MTG für den Wirtsorganismus toxisch wäre, wenn sie in aktiver Form in der Zelle vorläge, sollte die inaktive Pro-Form exprimiert werden.

Da die Primärsequenz der Pro-MTG bekannt war [Pasternack et al., 1998], wurde zunächst die genomische DNA aus *Streptomyces mobaraensis* isoliert und das Gen für die Pro-MTG amplifiziert. Das amplifizierte Gen wurde mittels Restriktions-Endonukleasen geschnitten und so in das ebenfalls geschnittene Plasmid pET20b (Novagen) ligiert, dass sich vor dem Pro-MTG-Gen die Sequenz für ein pelB-Signalpeptid und dahinter die Sequenz für einen Hexahistidin-Tag befanden (Abb. 6). Die pelB-Signalsequenz für einen potenziellen

Transport ins Periplasma befindet sich dementsprechend nach der Expression N-terminal an der Pro-MTG und der Histidin-Tag C-terminal.



**Abb. 6: Übersicht über die Klonierung der mikrobiellen Transglutaminase.** Das Pro-MTG-Gen wurde aus genomischer DNA von *S. mobaraensis* amplifiziert und in das Plasmid pET20b (Novagen) so ligiert, dass das Enzym eine N-terminale pelB-Signalsequenz und einen C-terminalen His-Tag erhält (Bezeichnung pCM2-8). Dieses Plasmid wurde in *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) transformiert. In einem weiteren Schritt wurde das Pro-MTG-Gen aus pCM2-8 erneut amplifiziert und so in pET20b ligiert, dass nur noch das Enzym mit C-terminalem His-Tag exprimiert wird (Bezeichnung pDJ1-3). Auch dieses Plasmid wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Dieses Konstrukt, pCM2-8, wurde in *E. coli* BL21Gold(DE3) transformiert. Außerdem wurde das Pro-MTG-Gen aus pCM2-8 erneut amplifiziert und so in das Plasmid pET20b ligiert, dass nur noch der Histidin-Tag vorhanden war und nicht mehr die pelB-Sequenz. Auch dieses Konstrukt, pDJ1-3, wurde in *E. coli* BL21Gold(DE3) transformiert. Die Korrektheit der Sequenzen wurde jeweils durch eine Sequenzierung nachgewiesen.

Der Histidin-Tag ermöglicht zum einen die Reinigung des exprimierten Enzyms mittels Affinitätschromatographie. Zum anderen hat die C-terminale Lage einen weiteren Vorteil. Ist der Histidin-Tag vorhanden, zeigt dies an, dass das Enzym vollständig synthetisiert wurde. Es musste damit gerechnet werden, dass durch den hohen GC-Gehalt des Pro-MTG-Gens Probleme bei der Translation auftreten könnten, diese wurden für genau dieses Gen bereits vorhergesagt [Yokoyama et al., 2000].

Die pelB-Sequenz führt in manchen Fällen zu einem Periplasma-Transport des Zielproteins [Mergulhao et al., 2005]. Durch die beiden verschiedenen Konstrukte sollte untersucht werden, ob die Pro-MTG ebenfalls in den periplasmatischen Raum transportiert wird und ob sich dadurch die Löslichkeit verbessern lässt. Da sich die Signalsequenz am N-Terminus der Pro-MTG befindet, würde sie durch die Aktivierung, das heißt die Abspaltung der Pro-Sequenz, mit entfernt, so dass sie im aktiven Enzym nicht mehr vorhanden wäre.

Das aus pCM2-8 gebildete Enzym wurde dementsprechend pelB-Pro-MTG-His<sub>6</sub> genannt, das aus pDJ1-3 gebildete Enzym Pro-MTG-His<sub>6</sub>.

Zunächst wurde BL21Gold(DE3) mit pCM2-8 bei 37 °C in einem Schüttelkolben mit LB<sub>Amp</sub>-Medium inkubiert und die Expression von pelB-Pro-MTG-His<sub>6</sub> mit IPTG induziert. Wurde die Temperatur bei 37 °C belassen, wurden ausschließlich unlösliche inclusion bodies gebildet, was der Literatur zufolge zu erwarten war [Kawai et al., 1997; Takehana et al., 1994; Yokoyama et al., 2000]. Die pelB-Signalsequenz führte bei dieser Temperatur nicht zu einer erhöhten Löslichkeit. Eine Temperaturabsenkung auf 24 °C zeitgleich mit der Induktion führte zu etwa 30 % löslicher pelB-Pro-MTG-His<sub>6</sub>. Diese Strategie wurde gewählt, um schnelleres Wachstum am Beginn und niedrigere Proteinexpressionsraten nach Induktion zu kombinieren, was nach Literatur zu einer geringeren IB-Bildung führen kann [Baneyx, 1999; Jana und Deb, 2005]. Die Ausbeuten betragen 105 U / L Bioreaktor, bzw. 326 U / g BTM.

Als nächstes wurde die Induktionsmethode geändert und statt IPTG ein Autoinduktionsmedium verwendet, bei dem die Expression durch die Metabolisierung von Lactose induziert wird. BL21Gold(DE3) pCM2-8 wurde bei 28 °C in 100 mL LB<sub>Amp</sub>-Medium kultiviert, das die Autoinduktions-Lösungen nach Studier enthielt [Studier, 2005]. Der Anteil löslicher pelB-Pro-MTG-His<sub>6</sub> konnte mit dieser Methode auf etwa 50 % erhöht werden und die Ausbeute betrug 968 U / L Bioreaktor, bzw. 511 U / g BTM.

Die Kultivierungstemperatur von 28 °C hatte sich in Vorversuchen als geeigneter Kompromiss zwischen ausreichender Wachstumsgeschwindigkeit und löslicher Expression herausgestellt.

Um zu untersuchen, ob der Zusatz seltener tRNAs die (lösliche) Expression des GC-reichen Pro-MTG-Gens verbessern würde, wurde das Plasmid pCM2-8 in *E. coli* Rosetta(DE3) transformiert. Dieser Stamm enthält ein weiteres Plasmid, das für sechs in *E. coli* selten vorkommende tRNAs kodiert. Die Zellen wurden erneut im Schüttelkolben mit Autoinduktionsmedium und bei 28 °C kultiviert. Die Löslichkeit ließ sich jedoch nicht erhöhen, sie lag weiterhin bei 50 %. Auch die Ausbeute verbesserte sich nicht, sie betrug 966 U / L

Bioreaktor, bzw. 501 U / g BTM. Der Zusatz seltener tRNAs brachte also keine Verbesserung.

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob die *pelB*-Signalsequenz die Pro-MTG überhaupt in das Periplasma transportiert. Um dies zu untersuchen, wurde die Periplasmafraktion isoliert und die Aktivität der MTG mit der Aktivität im Gesamtzellaufschluss verglichen. Zur Kontrolle wurde jeweils auch die Aktivität zweier Markerenzyme bestimmt (Alkalische Phosphatase als Periplasma-Enzym und  $\beta$ -Galactosidase als Cytoplasma-Enzym). In der Periplasmafraktion lagen 80 % der Alkalischen Phosphatase vor, aber nur 7 % der  $\beta$ -Galactosidase und 3 % der MTG. Die *pelB*-Pro-MTG-His<sub>6</sub> wird demnach nicht ins Periplasma transportiert, sondern verbleibt im Cytoplasma.

Da die *pelB*-Sequenz nicht für einen Periplasma-Transport sorgt, sollte untersucht werden, inwieweit diese Sequenz die Menge an exprimiertem Zielenzym bzw. dessen Löslichkeit beeinflusst.

Dazu wurde das Plasmid pDJ1-3 wie oben beschrieben in *E. coli* BL21Gold(DE3) transformiert. Die Zellen wurden bei 28 °C im Schüttelkolben mit Autoinduktionsmedium kultiviert. Interessanterweise betrug der Anteil löslicher pro-MTG-His<sub>6</sub> ohne *pelB*-Signalsequenz mehr als 90 %. Die *pelB*-Sequenz trägt demnach nicht zu einer erhöhten Löslichkeit bei, das Gegenteil ist der Fall. Die Ausbeute an aktiver MTG-His<sub>6</sub> konnte auf 1456 U / L Bioreaktor, bzw. 627 U / g BTM gesteigert werden. Ein Vergleichsexperiment mit IPTG-Induktion führte zu Ausbeuten von 102 U / L Bioreaktor, bzw. 447 U / g BTM. Die geringere Raum-Ausbeute ist hier auf die im Vergleich zur Autoinduktion verringerte Zelldichte zurückzuführen. Die Löslichkeit lag aber auch hier bei über 90 %.

**Tab. 1: Vergleich der Ausbeuten der TG-Produktion in verschiedenen Wirtsstämmen.** Werte in Klammern geben die Ausbeute an inclusion bodies vor der Rückfaltung an. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Ausbeuten dieser Arbeit anhand der Ergebnisse für die Pro-MTG-His<sub>6</sub> ohne pelB-Signalsequenz berechnet, unter der Annahme einer spezifischen Aktivität von 22,6 U/mg Enzym [Ando et al., 1989].

Referenz	Wirtsstamm	MTG pro Reak- torvolumen (mg/L)	MTG pro BTM (U/g)	Anmerkungen
[Ando et al., 1989]	<i>S. mobaraensis</i>	93	125	Originalstamm; sekretiert, Werte aus Literaturabbildung abgeleitet
[Takehana et al., 1994]	<i>E. coli</i>	5		Keine Pro-Sequenz, ompA-Sequenz angefügt, Aktivität geschätzt aus der Bandenintensität des Western Blots durch die Autoren
[Kawai et al., 1997]	<i>E. coli</i>	60 (300)		Inclusion bodies, 20 % Aktivität nach Rückfaltung
[Yokoyama et al., 2000]	<i>E. coli</i>	30-45 (200-300)		Codon usage an <i>E. coli</i> angepasst, inclusion bodies, 15 % Aktivität nach Rückfaltung
[Kikuchi et al., 2003]	<i>C. glutamicum</i>	142		Sekretiert und aktiviert, co-exprimierte Protease
[Date et al., 2004]	<i>C. glutamicum</i>	700-881		Sekretiert, aktiviert, chimäre Pro-Sequenz
Diese Arbeit	<i>E. coli</i>	65	627	Intrazellulär, 90 % löslich, Lactose-Induktion
Diese Arbeit	<i>E. coli</i>	4.5	447	IPTG, Temperaturprofil, > 90 % löslich

Tab. 1 fasst die in der Literatur bisher bekannten Ausbeuten und die Ergebnisse der löslichen Expression dieser Arbeit zusammen. Mit der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen die Pro-Form der mikrobiellen Transglutaminase in löslicher Form in *E. coli* zu exprimieren. Über 90 % des Pro-Enzyms waren löslich, was entweder durch eine IPTG-Induktion mit Temperaturabsenkung auf 24 °C erreicht wurde, oder durch die Verwendung eines Lactose-Autoinduktionsmediums mit einer durchgängigen Inkubationstemperatur von 28 °C. Da bei Kultivierung im Autoinduktionsmedium höhere Zelldichten erreicht wurden, war die Ausbeute hier höher und sie betrug 65 mg / L Bioreaktor. Durch eine Optimierung der Fermentationsbedingungen könnte sich die Ausbeute sehr wahrscheinlich weiter erhöhen lassen. Dies war jedoch kein Ziel dieser Arbeit, entscheidend war die hochgradig lösliche Expression.

## 3 Aktivierung der rekombinanten MTG

Siehe Anhang 9B: Marx, C. K., Hertel, T. C. and Pietzsch, M. (2008). "Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E. coli* and partial characterization of the active enzyme." *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 568-575.

### 3.1 Einleitung

Toxische Enzyme werden in vivo oft als inaktive Pro-Form exprimiert. Das ist auch bei der mikrobiellen Transglutaminase der Fall, die von *Streptomyces mobaraensis* als Prä-Pro-MTG gebildet wird. Die Prä-Sequenz sorgt für einen Transport aus der Zelle in das umgebende Medium. Die Pro-Sequenz wird in einem zweistufigen Prozess durch zwei ebenfalls sekretierte Proteasen abgespalten. Zunächst schneidet die TG-aktivierende Metalloprotease (TAMEP) die Pro-Sequenz bis auf einen Rest von vier Aminosäuren ab [Zotzel et al., 2003a], welcher in einem zweiten Schritt durch die Tripeptidyl Aminopeptidase (SM-TAP) entfernt wird [Zotzel et al., 2003b]. Bereits nach dem ersten Aktivierungsschritt zeigt die MTG allerdings ihre volle Aktivität [Zotzel et al., 2003a].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pro-MTG erstmals als lösliches Enzym rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die Expression der MTG als inaktives Pro-Enzym macht eine intrazelluläre, lösliche Produktion erst möglich, andererseits ist es dadurch notwendig, das Enzym vor dem Einsatz durch Abspalten der Pro-Sequenz zu aktivieren.

Neben den originalen *Streptomyces*-Proteasen wurden bereits die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Dispase in freier oder immobilisierter Form für eine Aktivierung der Pro-MTG eingesetzt [Pasternack et al., 1998; Zotzel et al., 2003a].

In neueren Experimenten, die während der Erstellung der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden, wurde die Pro-MTG in *Corynebacterium glutamicum* exprimiert und sekretiert sowie mit einer co-sekretierten Protease aus *Streptomyces albogriseolus* aktiviert [Date et al., 2004]. Diese Protease, SAM-P45, baute jedoch die MTG nach längerer Kultivierungszeit wieder ab [Date et al., 2003; Kikuchi et al., 2003], so dass deren Verwendung kritisch ist.



## 3.2 Zielstellung

Die rekombinant in löslicher Form in *E. coli* exprimierte Pro-MTG-His<sub>6</sub> muss vor einem möglichen Einsatz zunächst durch die Abspaltung der Pro-Sequenz aktiviert werden. Die *Streptomyces*-eigenen Proteasen, insbesondere TAMEP, sind bisher nicht kommerziell erhältlich. Es sollte daher untersucht werden, welche kommerziellen Proteasen in der Lage sind, die rekombinante Pro-MTG-His<sub>6</sub> zu aktivieren. Darüber hinaus sollte eine größere Menge rekombinanter Pro-MTG-His<sub>6</sub> bereitgestellt werden.

## 3.3 Ergebnisse und Diskussion

Es existieren viele Anwendungsmöglichkeiten für die MTG, wie in Abschnitt 1.1.2.4 beschrieben. Die lösliche, rekombinante Expression der Pro-MTG-His<sub>6</sub> ist eine effiziente Möglichkeit um größere Mengen dieses Enzyms bereitzustellen. Deshalb sollte in einem ersten Schritt ein Scale-Up der Produktion vom Schüttelkolben- zum Fermentermaßstab vollzogen werden.

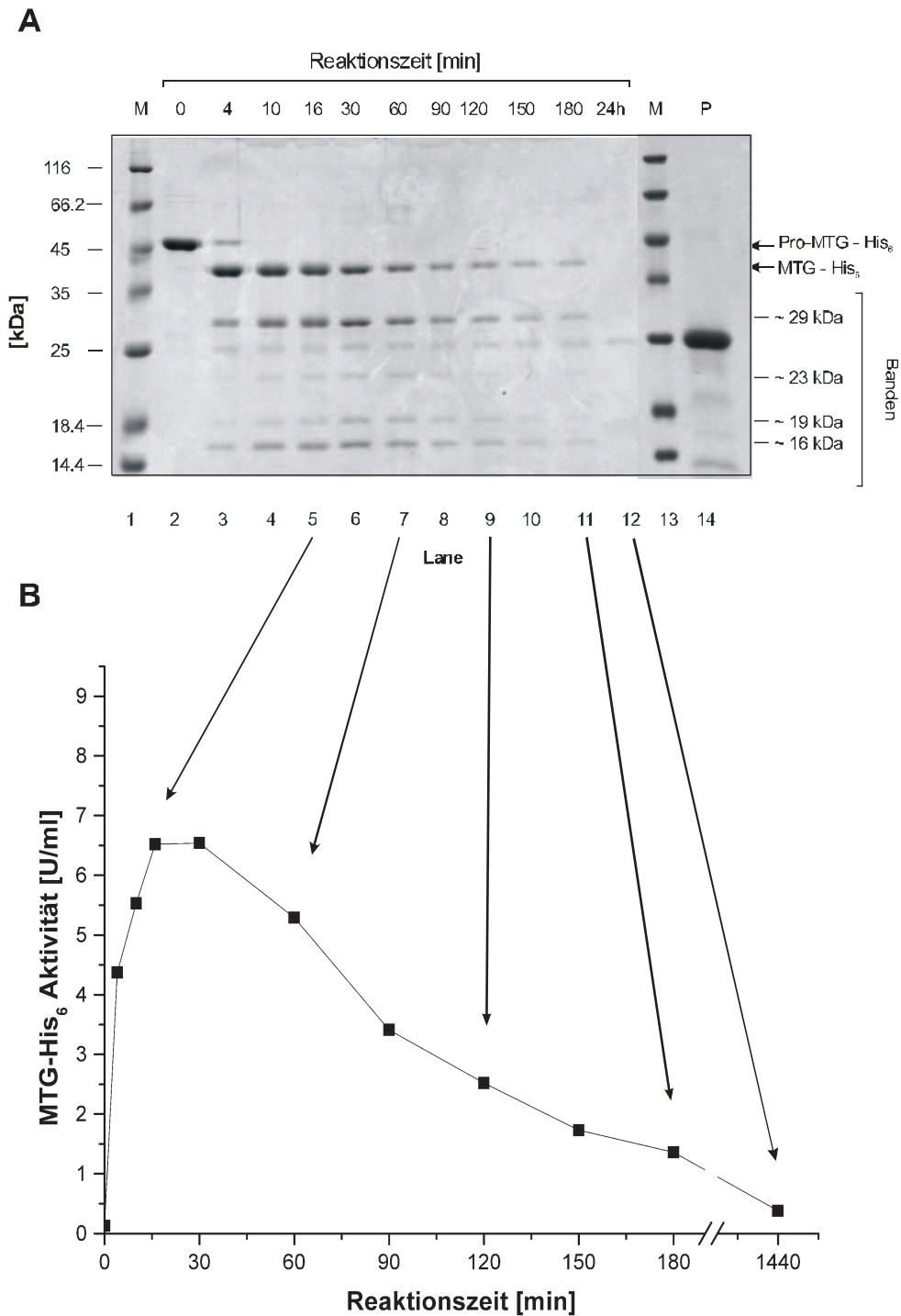
Dazu wurde die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pDJ1-3 auf einen Bioreaktor mit 15 L Autoinduktionsmedium (LB-Medium, zusätzlich Glucose, Glycerin, Lactose, MgSO<sub>4</sub> und Phosphatpuffer) durch ein einfaches Scale-Up übertragen. Nach drei Vorkulturen wurde der Fermenter mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Temperatur betrug durchgängig 28 °C bei einer Rührerdrehzahl von 300 rpm und einer Begasungsrate von 4,0 slpm. Der pH-Wert wurde während der Fermentation gemessen aber nicht geregelt. Nach 19 Stunden wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Es wurden 238 g Biofeuchtmasse (BFM) geerntet und bei - 80 °C gelagert.

Die Zellen wurden mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen und der Überstand wurde auf eine Streamline Ni-NTA Chromatographiesäule aufgetragen und mit Imidazol eluiert. Fraktionen mit gereinigter Pro-MTG-His<sub>6</sub> wurden gepoolt und gegen Lagerpuffer dialysiert, der GSH enthielt um eine Oxidation der MTG zu verhindern [Folk und Cole, 1966b], sowie CaCl<sub>2</sub>, das häufig zur Stabilisierung der untersuchten Proteasen eingesetzt wird [Bajorath et al., 1988; Schwert und Takenaka, 1955; Zotzel et al., 2003a]. Aus 10 g BFM konnten auf diese Weise 43 mg reiner Pro-MTG-His<sub>6</sub> erhalten werden.

Die Pro-MTG-His<sub>6</sub> zeigte nach 21 Tagen Lagerung bei -20 °C im verwendeten Lagerpuffer nach Aktivierung mittels TAMEP noch 97 % der ursprünglichen Aktivität, konnte also problemlos über diesen Zeitraum verwendet werden.

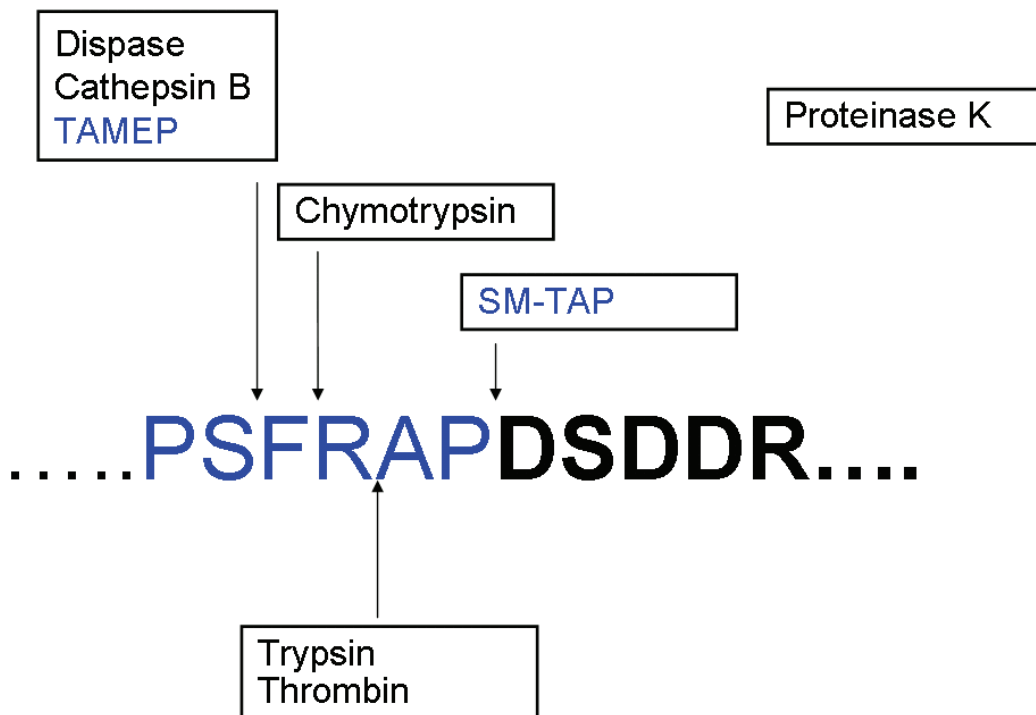
Von TAMEP, der Pro-MTG aktivierenden Protease aus *Streptomyces mobaraensis* ist bekannt, dass sie die Pro-Sequenz bis auf vier Aminosäurereste abspaltet und die MTG nicht weiter abbaut [Zotzel et al., 2003a]. Da diese Protease aber nicht kommerziell erhältlich ist, sollten Alternativen zur Aktivierung der rekombinanten Pro-MTG-His<sub>6</sub> untersucht werden. Trypsin wurde als geeignet für die Aktivierung der Wildtyp-Pro-MTG aus *Streptomyces mobaraensis* beschrieben [Pasternack et al., 1998]. Erstaunlicherweise zeigte sich aber in eigenen Experimenten nach Inkubation der rekombinanten Pro-MTG-His<sub>6</sub> mit Trypsin, dass verschiedene distinkte Abbaubanden entstehen (Abb. 7). Dieser Effekt wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Die MTG wird schon abgebaut, bevor sie vollständig aktiviert wurde. Damit stand fest, dass sich Trypsin für eine Aktivierung nicht eignet.



**Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Pro-MTG-His<sub>6</sub>-Aktivierung mittels Trypsin.** Eine reine Pro-MTG-His<sub>6</sub>-Lösung (0,25 mg/mL) wurde in Standard-Aktivierungspuffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GSH, pH 8,0) mit Trypsin (Endkonzentration: 20 µg/mL) bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe des Trypsins und nach jeweils 4, 10, 16, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min wurden Proben entnommen. A: SDS-PAGE, Coomassie-Färbung. Die Probe wurde 1:1 mit SDS-Probenpuffer verdünnt und in jede Lane wurden 10 µL aufgetragen. Lane 14 zeigt Trypsin in einer Konzentration von 400 µg/mL. M = Marker. B: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung gereinigter Pro-MTG-His<sub>6</sub> nach Trypsinbehandlung. Die TG-Aktivität wurde unmittelbar nach Probenahme mittels Hydroxamat-Test bestimmt.

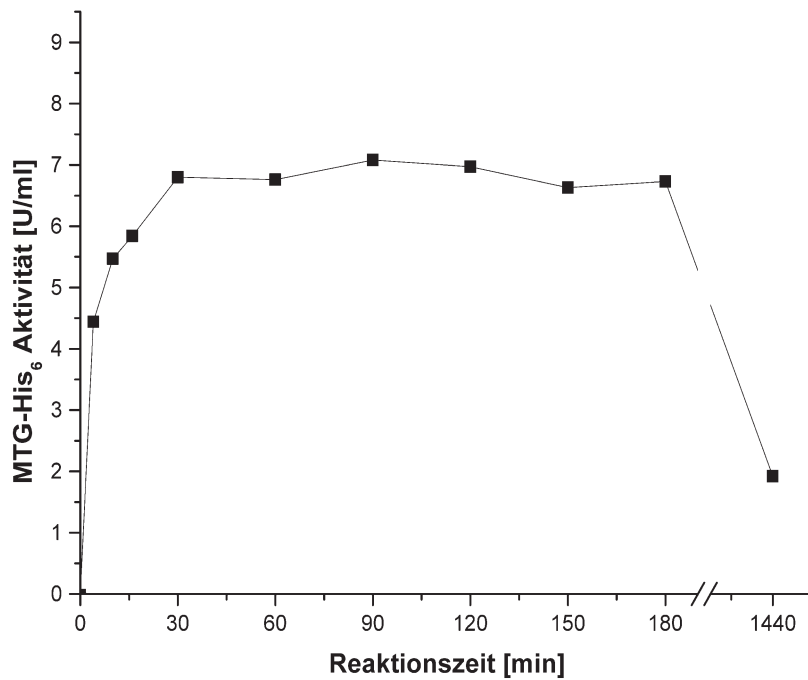
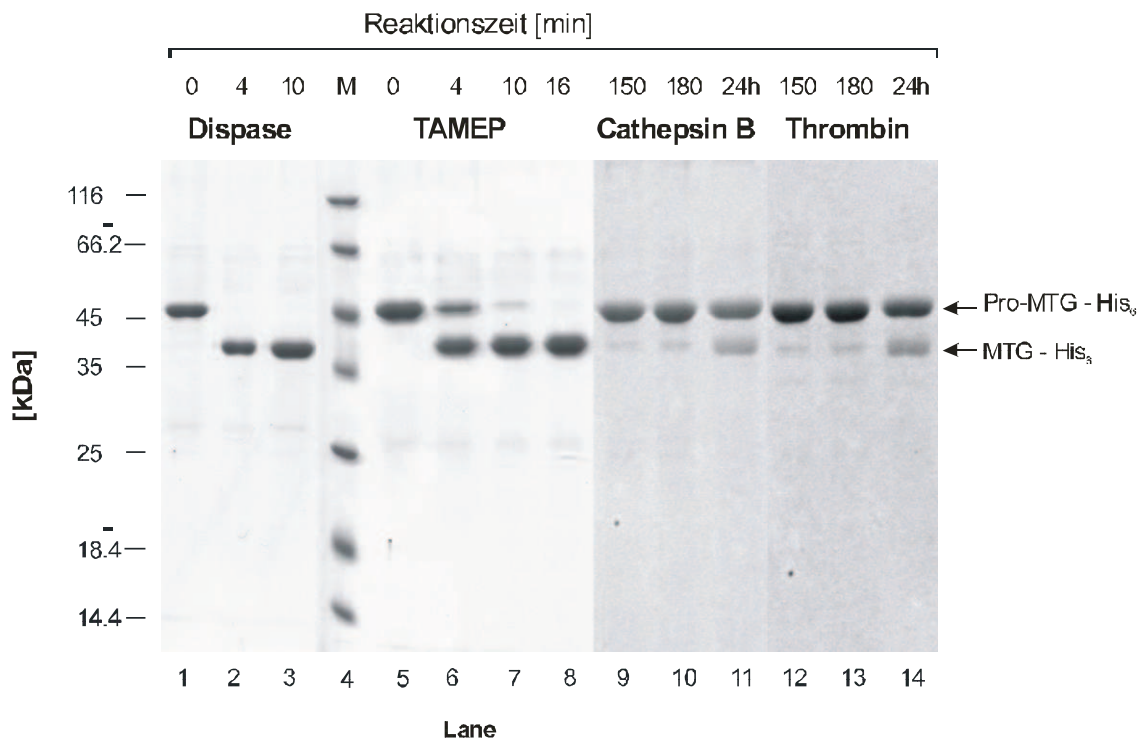
Es wurden daraufhin weitere kommerziell erhältliche Proteasen auf die Fähigkeit hin untersucht, die Pro-MTG-His<sub>6</sub> zu aktivieren. Neben Trypsin wurden in der Literatur bereits Dispase und Chymotrypsin für die Aktivierung der Pro-MTG aus *Streptomyces mobaraensis* verwendet. Diese beiden Proteasen wurden erneut untersucht. Ebenfalls untersucht wurden Proteinase K und Thrombin, die für die Aktivierung der Protransglutaminase E aus der Meerschweinchenhaut eingesetzt wurden [Kim et al., 1990], sowie Cathepsin B, das in der Lage ist, zwischen den Aminosäuren Ser (S) und Phe (F) zu spalten. Abb. 8 zeigt eine Übersicht über die Spaltstellen der verschiedenen Proteasen innerhalb der Pro-MTG. Proteinase K ist eigentlich eine unspezifische Protease, die an der Carboxyl-Seite aliphatischer, aromatischer und hydrophober Aminosäuren spaltet. Sie wird bevorzugt für den Verdau von DNasen und RNasen bei der DNA- und RNA-Isolierung eingesetzt.



**Abb. 8: Spaltstellen verschiedener Proteasen innerhalb der Pro-MTG-Sequenz.** Angegeben sind die Spaltstellen der *Streptomyces*-eigenen Proteasen TAMEP und SM-TAP, außerdem, soweit aus der Literatur bekannt, die Spaltstellen kommerziell erhältlicher Proteasen. Das Ende der Pro-Sequenz ist blau, der Anfang der MTG-Sequenz in schwarz dargestellt. Proteinase K ist eine unspezifische Protease, die nach aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren spaltet.

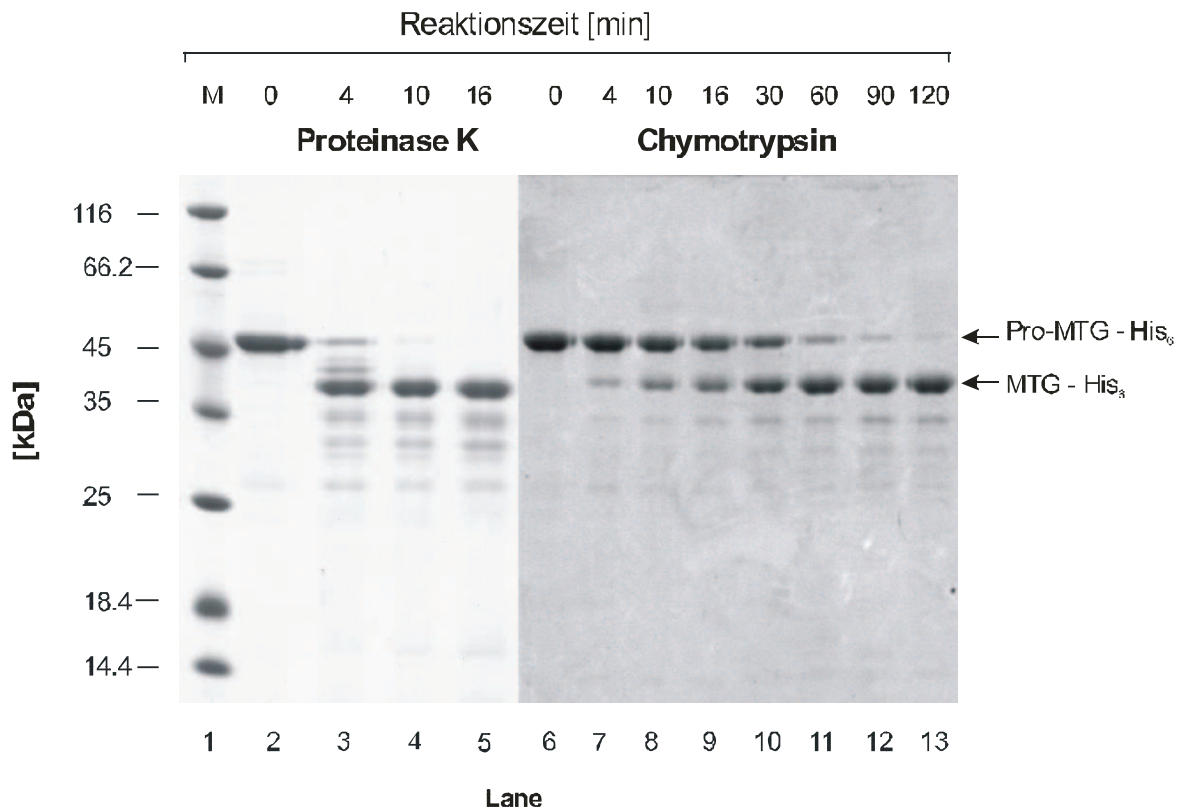
Zunächst wurde sichergestellt, dass alle untersuchten Proteasen im verwendeten Puffer aktiv sind. Dazu wurde die caseinolytische Aktivität bestimmt. Bis auf Thrombin zeigten alle Proteasen eine entsprechende Aktivität.

Die untersuchten Proteasen konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe der Proteasen, die die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktivieren und nicht weiter abbauen, gehören Cathepsin B, Thrombin und Dispase (Abb. 9). Cathepsin B und Thrombin zeigten in den verwendeten Konzentrationen allerdings eine sehr geringe Aktivität. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Enzyme in höheren Konzentrationen die MTG ebenfalls weiter abbauen würden. Cathepsin B und Thrombin sind allerdings sehr teure Enzyme, es wäre daher unwirtschaftlich, sie in höheren Konzentrationen einzusetzen. Dispase zeigte eine gute Pro-MTG-His<sub>6</sub>-Aktivierung und es waren keine Abbaubanden erkennbar.

**A****B**

**Abb. 9: Proteasen, die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktivieren und nicht abbauen. A:** Zeitlicher Verlauf der Aktivierung mittels Dispase **B:** Ausschnitte der Aktivierungsmuster für Dispase, TAMEP, Cathepsin B und Thrombin nach den angegebenen Reaktionszeiten. Für Reaktionsbedingungen siehe Bildunterschrift zu Abb. 7.

Zur zweiten Gruppe - Proteasen, die die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktivieren aber weiter abbauen - gehören Trypsin (Abb. 7), Chymotrypsin und Proteinase K (Abb. 10). Es entstehen definierte Abbaubanden und die Intensität der Bande, die der aktivierten MTG entspricht, nimmt über die Zeit ab, analog zur Aktivität. Diese Proteasen sind daher für eine vollständige Aktivierung nicht geeignet.



**Abb. 10: Proteasen, die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktivieren und weiter abbauen.** Ausschnitte der Aktivierungsmuster für Proteinase K und Chymotrypsin nach den angegebenen Reaktionszeiten. Für Reaktionsbedingungen siehe Bildunterschrift zu Abb. 7.

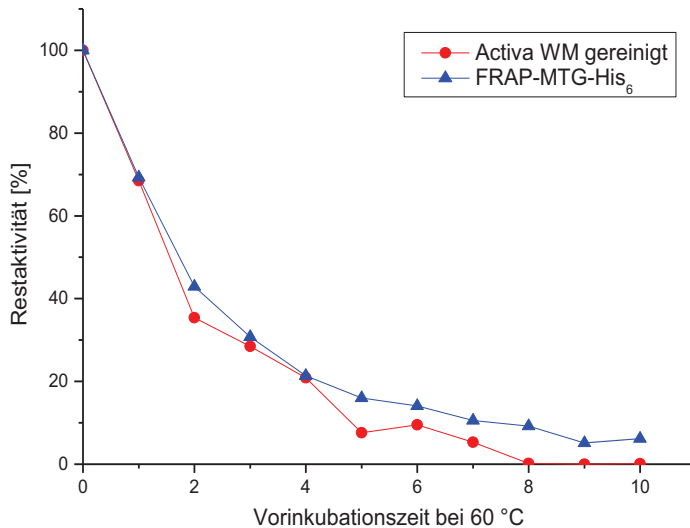
Die rekombinante Pro-MTG-His<sub>6</sub> wurde bezüglich Temperaturstabilität und Temperaturoptimum charakterisiert. Dazu wurde sie mittels TAMEP zur FRAP-MTG-His<sub>6</sub> aktiviert. Die Spaltstelle wurde mittels Edman-Abbau verifiziert und entspricht der des Wildtyp-Enzyms.

Zum Vergleich wurde die MTG aus *Streptomyces mobaraensis* aus der kommerziell erhältlichen Präparation Activa WM mittels Gelchromatographie gereinigt. Dies war nötig, da Activa WM Maltodextrin zur Stabilisierung enthält (ca. 99% w/w).

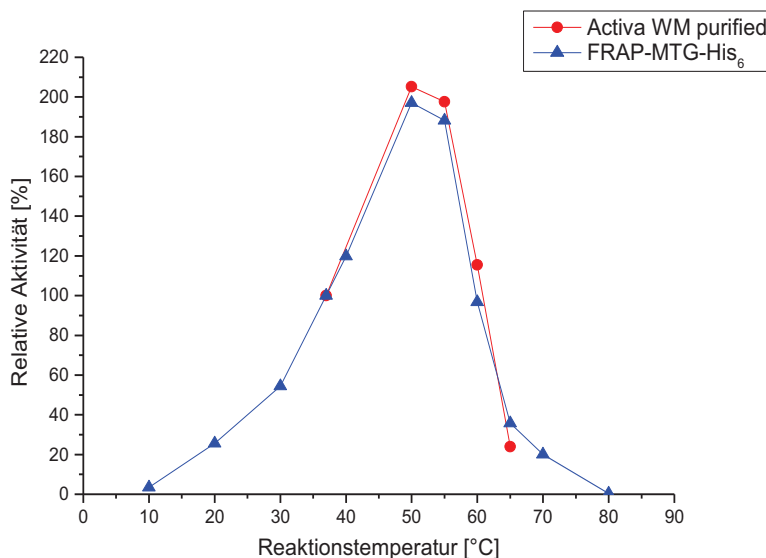
Die spezifische Aktivität der rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> lag mit 23 U/mg nahe bei der ursprünglich publizierten spezifischen Aktivität der Wildtyp-MTG von 22,6 U/mg [Ando et al., 1989]. Das Temperaturoptimum lag bei 50 °C und die Halbwertszeit bei 60 °C betrug

1,7 min. Dies entspricht den Ergebnissen für die gereinigte MTG aus Activa WM (Optimum: 50 °C, Halbwertszeit: 1,6 min).

Abb. 11 zeigt das Inaktivierungsverhalten und Abb. 12 das Temperaturoptimum der rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> im Vergleich zur Wildtyp-MTG.



**Abb. 11: Temperaturstabilität der reinen FRAP-MTG-His<sub>6</sub> und der Wildtyp-MTG.** Zeitabhängige Inaktivierung durch Vorinkubation bei 60 °C, anschließend Hydroxamat-Test unter Standardbedingungen (10 min Reaktionszeit bei 37 °C)



**Abb. 12: Temperaturoptimum der reinen FRAP-MTG-His<sub>6</sub> und der Wildtyp-MTG.** Temperaturoptimum bei Standard-Testbedingungen (Hydroxamat-Test, 10 min Reaktionszeit bei 37 °C). Die jeweilige spezifische Aktivität bei 37 °C wurde auf 100 % festgelegt.



Sowohl das Inaktivierungsverhalten als auch die relative temperaturabhängige spezifische Aktivität sind nahezu identisch. Offensichtlich beeinflussen weder der C-terminale Histidin-Tag noch der N-terminale FRAP-Rest die Temperatureigenschaften des rekombinanten Enzyms. Für den N-terminalen Rest war dies bereits bekannt [Zotzel et al., 2003a]. Für den C-terminalen Histidin-Tag wurde dies erstmals nachgewiesen.

Es gibt mehrere prinzipielle Wege, eine spezifische Pro-MTG-Aktivierung zu erreichen. Die TAMEP arbeitet sehr spezifisch, muss aber bislang aufwändig aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces mobaraensis* aufgereinigt werden. Die vollständige Sequenz dieser Protease ist noch nicht aufgeklärt, trotzdem könnte man versuchen über die Homologie zu verwandten Proteasen Primersequenzen abzuleiten, um eine rekombinante Expression der TAMEP zu ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Modifikation am Ende der Pro-Sequenz, um eine Schnittstelle für eine sehr spezifische Protease zu konstruieren. Auf diese Weise könnte zum Beispiel die Spaltung durch Thrombin optimiert werden.

## 4 Optimierung der rekombinanten MTG

Siehe Anhang 9C: Marx, C. K., Hertel, T. C. and Pietzsch, M. (2008). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162

### 4.1 Einleitung

Die MTG findet als industrielles Enzym heute eine breite Anwendung. Die proteinverknüpfende Aktivität kann in vielen Prozessen genutzt werden, um Produkteigenschaften zu verbessern (siehe auch Abschnitt 1.1.2.4).

Für manche dieser Anwendungen wäre es von Vorteil, die Verknüpfungsreaktion bei höheren Temperaturen durchzuführen, beispielsweise bei der Herstellung von Biopolymeren mittels Extrusion. Eine generelle Steigerung der spezifischen Aktivität ist in der Regel immer vorteilhaft, da sich so mit der gleichen Enzymmenge die Reaktion in kürzerer Zeit durchführen lässt, bzw. die Enzymmenge reduziert werden kann.

Es wurden bereits Enzyme aus verschiedenen Enzymklassen erfolgreich bezüglich der Thermostabilität optimiert [Eijsink et al., 2005]. Aus der Klasse der Transferasen wurden bisher nur wenige Enzyme mittels Random Mutagenese optimiert, darunter eine Glutathiontransferase [Gulick und Fahl, 1995], eine O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyl-Transferase [Christians et al., 1997] und eine Galaktokinase [Hoffmeister et al., 2003]. Allerdings wurde in diesen Fällen nach einer veränderten Substrat- bzw. Stereospezifität gescreent.

Für andere Anwendungen, beispielsweise in der Lebensmittelindustrie, wäre es vorteilhaft, eine Enzymvariante zur Verfügung zu haben, die bei niedrigen bis mittleren Temperaturen eine hohe Aktivität aufweist, sich aber bei höheren Temperaturen schnell inaktivieren lässt [Hatti-Kaul et al., 2006]. Eine hitzeempfindliche MTG, die bei niedrigen Temperaturen mindestens die Aktivität des Wildtyp-Enzyms besitzt, wäre daher wünschenswert.

Weitere Optimierungsmöglichkeiten der MTG liegen im Bereich der Substratspezifität. Viele Proteine, bei denen eine Vernetzung gewünscht ist, oder an die Moleküle kovalent gekoppelt werden sollen, sind keine Substrate für die MTG. Gerade im Bereich der posttranslationalen Modifizierungen ist das Potenzial dieses Enzyms noch nicht ausgeschöpft. So könnte es zum Beispiel verwendet werden um Proteine in vitro zu PEGylieren, wenn die Substrat- bzw. Sequenzspezifität der MTG das zuließe.

Um die Eigenschaften eines Enzyms zu verändern, bieten sich zwei grundlegende Herangehensweisen an.

Wenn Kenntnisse über die Struktur-Funktions-Beziehung vorhanden sind, können gezielt einzelne Aminosäuren der Primärsequenz ausgetauscht werden. Oft lässt sich der Einfluss

einzelner Aminosäuren auf bestimmte Eigenschaften jedoch nicht vorhersagen und Computermodelle, die den Einfluss aller möglichen Austausche zuverlässig simulieren können, scheitern häufig noch an der Komplexität großer Moleküle wie Proteinen.

Der zweite Ansatz besteht darin, das Gen für ein Enzym an zufälligen Positionen zu mutieren, die Bibliothek mutierter Enzyme zu exprimieren und in einem Screening die Varianten mit den verbesserten Eigenschaften zu identifizieren. Dies ist auch der Ansatz der Wahl, um Bereiche, so genannte hot spots, zu identifizieren, an denen Austausche bevorzugt zu Eigenschaftsänderungen führen.

Folgende Punkte sind bei der Optimierung eines Enzyms mittels Random Mutagenese entscheidend:

- eine gleichmäßige Verteilung der Mutationen innerhalb des Gens
- keine starke Bevorzugung bestimmter Basenaustausche
- einfache Kontrolle der Mutationsfrequenz
- Etablierung eines Screeningverfahrens mit möglichst geringen Abweichungen

Mutationen lassen sich durch die Verwendung einer DNA-Polymerase erzeugen, die fehleranfällig ist, bzw. durch geeignete Reaktionsbedingungen dazu wird. Die Fehleranfälligkeit der *Taq* DNA Polymerase lässt sich beispielsweise steigern, indem im PCR-Ansatz  $MnCl_2$  zugegeben wird und die  $MgCl_2$ -Konzentration und die Menge an Pyrimidinbasen erhöht werden [Cadwell und Joyce, 1994].

Besser geeignet sind Enzymmischungen wie die kommerzielle Polymerasemischung Mutazyme<sup>®</sup>II [Stratagene, 2005], die ein ausgeglicheneres Mutationsspektrum (A- und T-Austausche gegenüber G- und C-Austauschen) aufweist. Die Mutationsfrequenz kann zwischen 1 und 16 pro kb variiert werden, indem unterschiedliche Mengen an Template-Plasmid verwendet werden. Um Struktur-Funktions-Beziehungen aufzuklären, wird der Austausch einer Aminosäure pro Enzym (das entspricht 1-2 Basenaustauschen pro Gen) angestrebt [Vartanian et al., 1996]. Für Directed-Evolution-Experimente werden gewöhnlich 1-4 Aminosäuren pro Enzym ausgetauscht [Cherry et al., 1999; Shafikhani et al., 1997; Wan et al., 1998].

Ein Nachteil der Random Mutagenese mittels fehleranfälliger PCR ist, dass nicht jede einzelne Aminosäure durch alle möglichen anderen Aminosäuren ersetzt werden kann, da dafür der Austausch aller Basen eines codierenden Triplets nötig wäre. Dies ließe sich jedoch nur durch eine aufwändige gezielte Synthese aller möglichen Genvarianten umgehen. Ein Austausch von jeweils einer Aminosäure im MTG-Protein (ca. 300 Aminosäuren) gegen alle 19 anderen führt zu  $19 * 300 = 5700$  theoretisch möglichen Varianten. Auf Genebene ergibt sich beim Austausch jeweils einer Base gegen alle drei anderen jedoch für die maximal mögliche Anzahl an verschiedenen Varianten eine Obergrenze von  $3 * 900 = 2700$ .

Diese Zahl ist immer noch größer als die Anzahl der tatsächlich möglichen Varianten, da nicht jeder Basenaustausch auch zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz führt.

Bislang war eine Optimierung der MTG mittels Random Mutagenese nicht möglich, da ein Screening durch die Rückfaltung der unlöslichen inclusion bodies zu zeitaufwändig und mit zu großen Schwankungen behaftet gewesen wäre. Durch die erstmalige lösliche Expression der MTG in *E. coli* [Marx et al., 2007a] konnte nun ein Screeningverfahren auf verbesserte Varianten entwickelt werden.

Ein geeignetes Screeningverfahren muss im Wesentlichen zwei Bedingungen erfüllen. Zum einen sollten durch die große Anzahl an zu untersuchenden Varianten möglichst viele Klone parallel kultiviert werden. Zum anderen sollten die Abweichungen möglichst gering sein, um verbesserte Varianten tatsächlich zu identifizieren und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

In den letzten Jahren wurden Mikrotiterplatten (MTP) erfolgreich als „Minibioreaktoren“ für das Wachstum von Klonbibliotheken in *E. coli* eingesetzt [Kumar et al., 2004]. Deepwell-Platten mit einer quadratischen Grundfläche sind normalen MTPs im Bezug auf die Sauerstofftransferate überlegen, wenn Schüttelradius und -frequenz richtig eingestellt werden [Duetz et al., 2000; Hermann et al., 2003]. Diese Platten stellen demnach die erste Wahl für ein optimales aerobes Wachstum von Mikroorganismen im Miniaturmaßstab dar.

Die Verfolgung des Wachstums in einer MTP mit photometrischen Methoden birgt viele Probleme [Samorski et al., 2005]. Die Lichtabsorption einer mikrobiellen Kultur ist nichtlinear, die verwendeten Abdeckmembranen sind in der Regel nicht transparent und eine abnehmbare Abdeckung birgt das Risiko einer (Kreuz-)Kontamination. Mögliche Lösungen sind die Messung der Autofluoreszenz einer bakteriellen Kultur [Zimmermann et al., 2004] oder eine Offline-Messung von Proben aus den einzelnen Wells. Jede Unterbrechung des Schüttelprozesses führt jedoch zu Phasen anaeroben Wachstums, die den Verlauf der Kultivierung beeinflussen [Samorski et al., 2005].

## 4.2 Zielstellung

Nachdem die MTG erstmals in löslicher Form in *E. coli* exprimiert worden war, waren die Voraussetzungen geschaffen, das Enzym erstmals mittels Random Mutagenese optimieren zu können.

Zuvor musste jedoch ein Screeningverfahren etabliert werden, in dem die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktiviert sowie auf verschiedene veränderte Eigenschaften getestet werden konnte.

Anschließend sollte eine Bibliothek veränderter MTG-Gene mittels Random Mutagenese erzeugt und in *E. coli* transformiert werden.

In dem Screeningverfahren sollte nach thermostabilen und hitzeempfindlichen Varianten gesucht werden.

Optimierte Varianten sollten identifiziert und hinsichtlich der veränderten Eigenschaften charakterisiert werden. Außerdem sollten die Regionen innerhalb der MTG-Struktur identifiziert werden, die bevorzugt für die Thermoeigenschaften des Enzyms verantwortlich sind.

### 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Durch die erfolgreiche lösliche rekombinante Expression der Pro-MTG war es nun erstmals möglich, das Enzym mittels Random Mutagenese zu optimieren. Dazu musste als erstes ein Screeningverfahren etabliert werden.

Dieses Verfahren wurde zunächst mit unveränderter rekombinanter Pro-MTG-His<sub>6</sub> getestet. Um die Abweichungen im Screening möglichst gering zu halten, wurden die Zellen (*E. coli* BL21(DE3) mit pDJ1-3) in Deepwell-Mikrotiterplatten übertragen und in einem zweistufigen Prozess kultiviert (siehe unten). Der erste Wachstumsschritt in normalem LB-Medium bei 37 °C bis zum Erreichen der stationären Phase sorgt dafür, dass die Zellen in den einzelnen Wells möglichst ähnliche optische Dichten erreichen. Im zweiten Schritt wurde dann ein Aliquot auf eine zweite Deepwell-Platte übertragen, die Autoinduktionsmedium enthielt (vergleiche Abschnitt 2.3, S. 22). Diese Platte wurde bei 28 °C inkubiert, da sich diese Temperatur als guter Kompromiss zwischen hinreichend schnellem Wachstum der Zellen und guter Löslichkeit des Zielproteins herausgestellt hatte. Das Autoinduktionsmedium sorgt dafür, dass die Zellen in den verschiedenen Wells nicht alle zum gleichen Zeitpunkt induziert werden, wie es beispielsweise bei IPTG-Induktion der Fall wäre. Vielmehr werden die Zellen alle in der etwa gleichen Wachstumsphase induziert. Dies kompensiert Schwankungen der Start-Biomasse-Konzentration, die unvermeidlich sind, da mit einem sterilen Zahnstocher von Agarplatte inokuliert wurde. Damit können die Abweichungen sowohl in der erreichten End-OD als auch in der Menge des exprimierten Zielproteins minimiert werden.

Nach der Induktionsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und lysiert. Die Möglichkeiten der Zellyse sind in Mikrotiterplatten naturgemäß eingeschränkt, die meisten mechanischen Methoden können nicht angewendet werden. Es wurde daher ein enzymatischer Aufschluss mit Lysozym durchgeführt. Der Lysepuffer enthielt außerdem Benzonase, um die durch freigesetzte genomische DNA erzeugte Viskosität zu verringern. Dies ist essenziell, um Pipettierfehler zu minimieren.

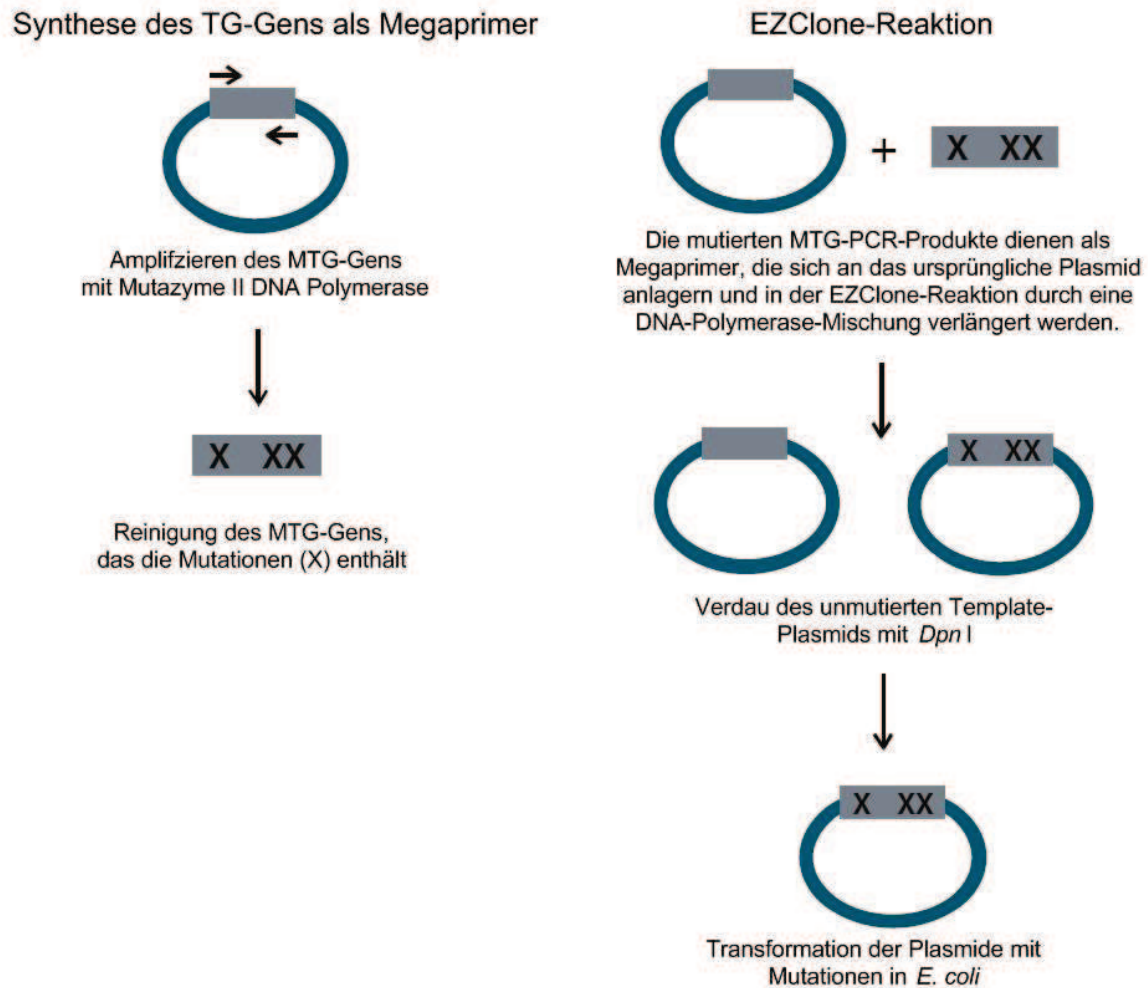
Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand, der den Rohenzymextrakt enthielt, in eine neue Mikrotiterplatte übertragen und die Pro-MTG-His<sub>6</sub> mittels Dispase aktiviert. Danach konnte die Aktivität mit einer auf das Mikrotiterplattenformat angepassten Variante des Hydroxamattests bestimmt werden.

Um die Größe der Abweichung im Screening abschätzen zu können, wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit *E. coli* BL21(DE3) pDJ1-3 angeimpft. Die Wells der letzten Spalte enthielten nur LB-Medium und dienten als Blank. Das Screeningverfahren wurde komplett wie oben beschrieben durchgeführt und die MTG-Aktivität bestimmt, sowohl mit als auch ohne Vorinkubation bei 55 °C. Die Standardabweichung betrug nach Vorinkubation 11 % und ohne Vorinkubation 23 %. Diese Abweichung ist gering genug, um thermostabile Varianten zu identifizieren und dies obwohl ein zusätzlicher Aktivierungsschritt im Screening erforderlich war. Möchte man Klone mit einer um 50 % verbesserten Aktivität finden, so ist die Wahrscheinlichkeit, falsch positive Klone zu identifizieren  $2,9 \cdot 10^{-7}$  bei einer Standardabweichung von 10 %, bzw.  $6,2 \cdot 10^{-7}$  bei einer Standardabweichung von 20 % [Salazar und Sun, 2003].

Die Bibliothek veränderter MTG-Gene wurde mit dem „GeneMorphII EZClone Domain Mutagenesis Kit“ (Stratagene) erzeugt (Abb. 13). Um die Mutationsrate abzuschätzen, wurde ein Teil der Bibliothek in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Mutationsrate von durchschnittlich einer Aminosäure pro Proteinvariante, bzw. ein bis zwei Basen pro Gen, liegt vor, wenn etwa 30 % der Mutanten keine Aktivität mehr zeigen [May et al., 2000]. Die Anzahl inaktiver Mutanten lag im vorliegenden Fall bei etwa 20 %. Weiterhin wurden sechs Klone zufällig ausgewählt und das MTG-Gen sequenziert. Ein Klon zeigte keinen Basenaustausch, drei hatten einen Austausch, einer zwei und einer drei Austausche. Die Austausche lagen zudem zufällig im Gen verteilt. Ausgehend von dieser Stichprobe lag die Mutationsrate bei etwa ein bis zwei Basen.

Daraufhin wurden weitere Zellen mit der Klonbibliothek transformiert und im Screening wurden etwa 5500 Klone auf veränderte Eigenschaften untersucht.

Pro 88 Klone (ein Durchlauf) wurden zwei Deepwell-MTP für die Kultivierung und Induktion, drei MTP für Lyse, Aktivierung und Aktivitätstests, eine transparente MTP zum Messen der Absorption, vier Folien und drei Noppenmatten zum Verschließen der Platten, sowie ca. 1000 Pipettenspitzen (200 µL und 300 µL) verbraucht. Um die 5500 Klone zu testen wurden insgesamt ca. 60 Durchläufe zeitversetzt innerhalb von sechs Wochen durchgeführt.



**Abb. 13: Prinzip der Random Mutagenese mittels GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis Kit.** Das Gen für die MTG wird zunächst mit der fehleranfälligen Mutazyme®II Polymerase amplifiziert. Dabei werden statistisch Mutationen eingebaut. Die PCR-Produkte werden gereinigt und dienen in einer zweiten Reaktion als Megaprimer, die sich an das ursprüngliche Plasmid anlagern und durch eine DNA-Polymerase-Mischung, die sehr exakt arbeitet, verlängert werden. Das nicht mutierte Template-Plasmid wird durch die Restriktionsendonuclease *DpnI* verdaut, die nur methylierte DNA schneidet. Die Plasmide, die die Mutationen enthalten, werden schließlich in *E. coli*-Zellen transformiert.

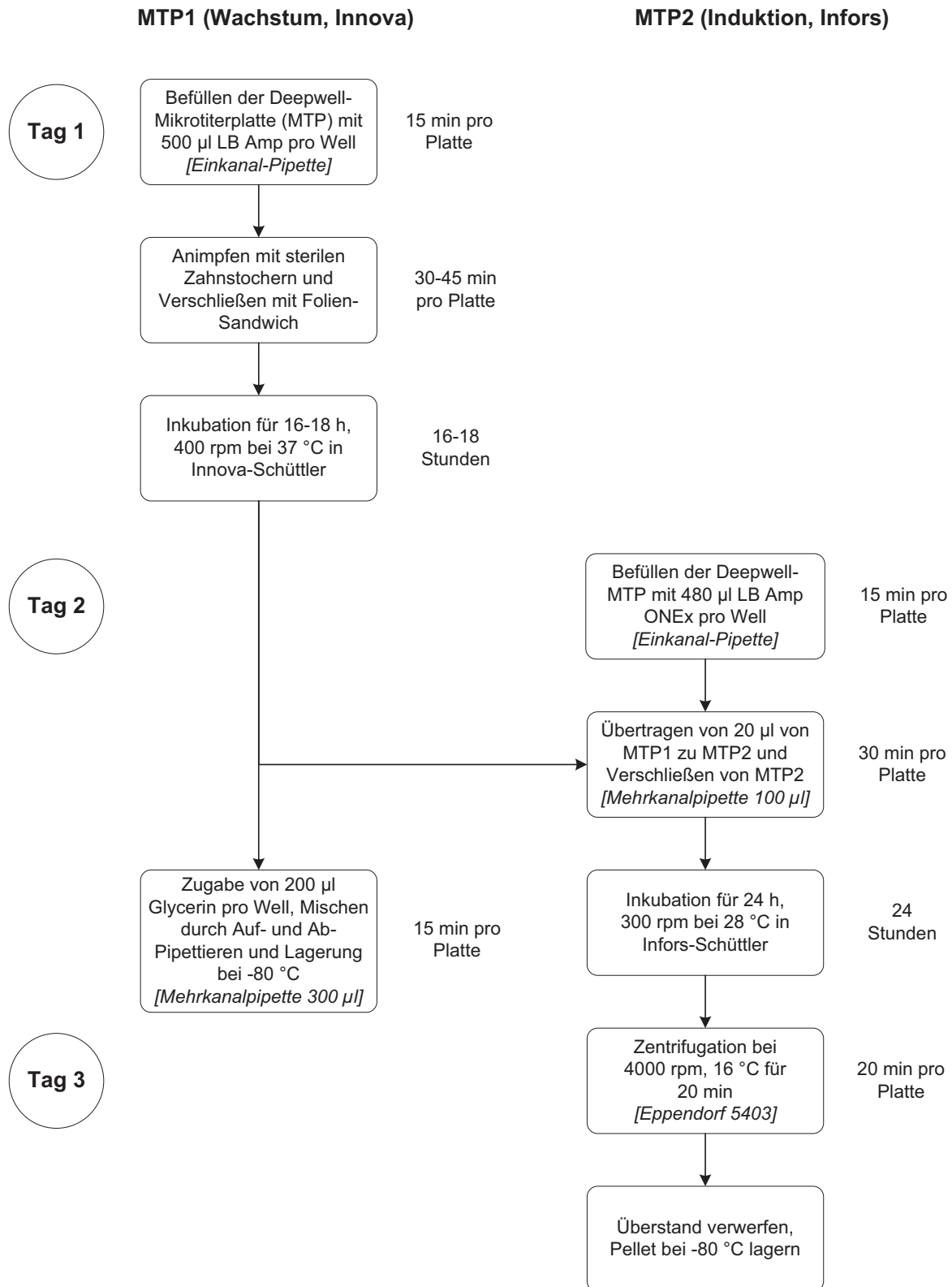
Die Klonbibliothek wurde nach folgenden zwei Kriterien gescreent: Varianten, die

- eine erhöhte Restaktivität nach Vorinkubation bei höherer Temperatur aufweisen
- eine normale oder erhöhte Aktivität bei niedriger Temperatur zeigen und die gleichzeitig nach Vorinkubation bei höherer Temperatur inaktiv sind

Im Falle der hitzeempfindlichen Varianten kann die niedrigere Expressionstemperatur von 28 °C von Vorteil sein, da sie bei Temperaturen von 37 °C unzureichend exprimiert oder inaktiviert werden könnten [Gerday et al., 2000].

Zunächst wurden die Klone auf Deepwell-Mikrotiterplatten übertragen und in LB-Medium kultiviert, dann auf eine weitere Deepwell-MTP mit Autoinduktionsmedium zur Enzymexpression übertragen. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert (Abb. 14).





**Abb. 14: Ablaufschema Screening 1: Kultivierung der Klonbibliothek und Induktion der Enzymvarianten in Deepwell-Mikrotiterplatten.** Die Schüttelradien betragen 2,5 cm (Innova-Schüttler) bzw. 5 cm (Infors-Schüttler).

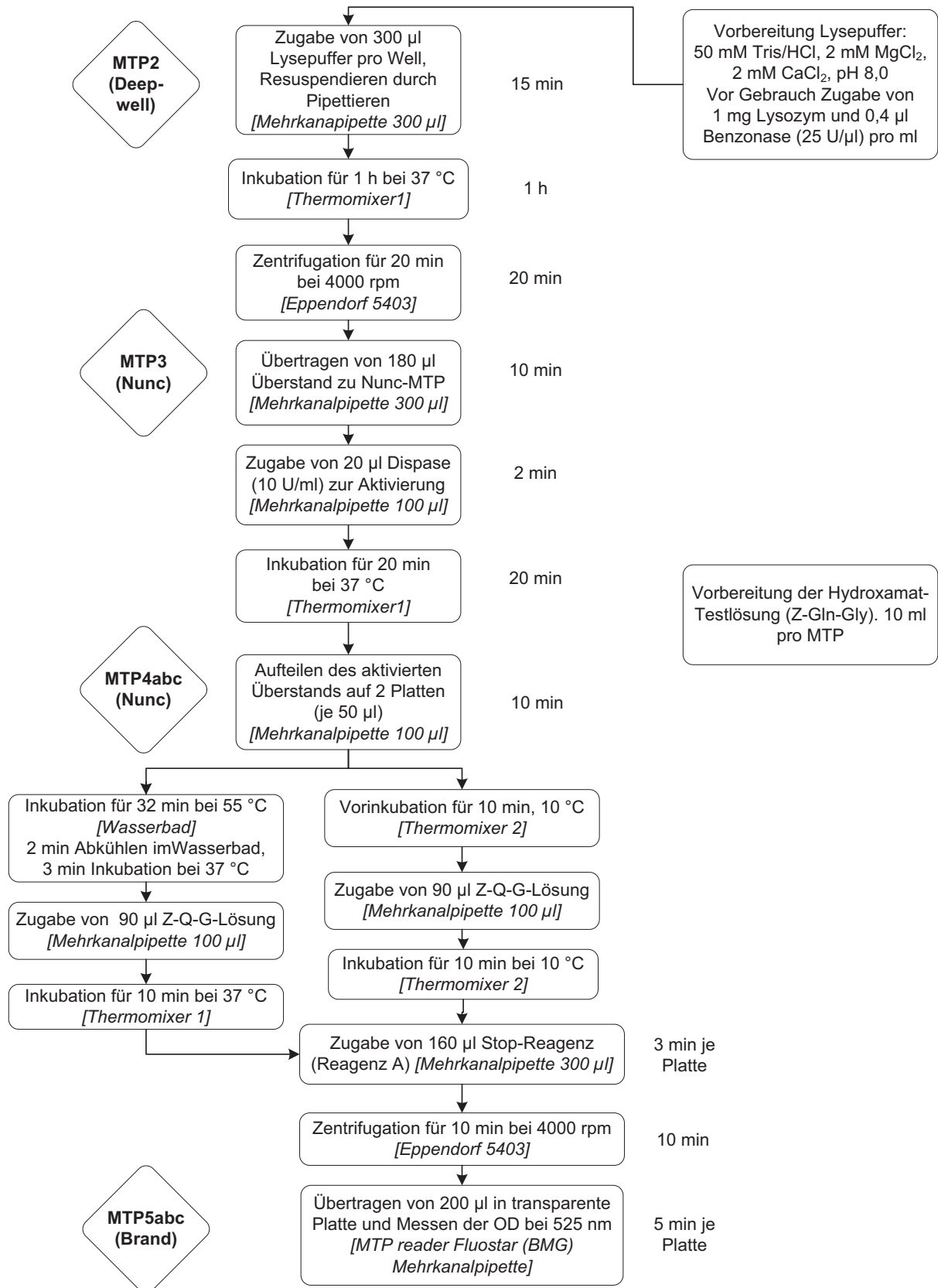


Abb. 15: Ablaufschema Screening 2: Zellyse, Aktivierung der Pro-MTG-His<sub>6</sub>-Varianten und Hydroxamattest unter verschiedenen Bedingungen.

Abb. 15 zeigt das Ablaufschema des Screenings unter den gewählten Bedingungen. Thermostabile Varianten wurden identifiziert, indem die Restaktivität nach Vorinkubation bei 55 °C im Wasserbad bestimmt wurde. Die eingefrorenen Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert, mit Dispase aktiviert und für etwa 30 min bei 55 °C im Wasserbad vorinkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität mittels Standard-Hydroxamattest bei 37 °C bestimmt. 70 Klone mit einer erhöhten Restaktivität wurden in einer zweiten Runde erneut gescreent, in der das Verhältnis aus Restaktivität nach Vorinkubation bei 55 °C und ursprünglicher Aktivität ohne Vorinkubation bestimmt wurde. Neun Klone wurden daraufhin ausgewählt und genauer untersucht. Von diesen neun Klonen zeigte einer zwei Aminosäure-Austausche und acht zeigten einen Aminosäure-Austausch. Tab. 2 zeigt die Position der Mutationen, zwei Klone wurden aussortiert, weil sie jeweils doppelt auftraten.

**Tab. 2: Basen- und Aminosäure-Austausche in FRAP-MTG-His<sub>6</sub>-Mutanten, erhalten durch Random Mutagenese und im Screening nach erhöhter Thermostabilität bei 55 °C identifiziert.**

Mutant ID	Base	Basen-Austausch	Position im Codon	Aminosäure	Aminosäure-Austausch
CM201	72	T → A	1	24	Tyr → Asn
	933	G → A	3	311	Still
CM203	4	T → C	1	2	Ser → Pro
CM205	68	C → T	2	23	Ser → Leu
CM211	769	G → A	1	257	Gly → Ser
CM213	280	C → T	1	94	Still
	519	G → A	3	173	Still
	805	A → G	1	269	Lys → Glu
CM224	865	C → T	1	289	His → Tyr
CM227	551	A → G	2	184	Asn → Ser
	881	A → T	2	294	Lys → Met

Für die Identifizierung hitzeempfindlicher Varianten wurden Klone ausgewählt, die bei 10 °C normale oder leicht erhöhte Aktivität zeigen, die jedoch nach Vorinkubation für 30 min bei 55 °C inaktiv waren. Es wurden 109 Klone ausgewählt und einer zweiten Screeningrunde unterworfen. Acht Mutanten wurden schließlich für eine genauere Charakterisierung ausgewählt. Zwei Klone hatten den gleichen Aminosäure-Austausch, aber unterschiedliche

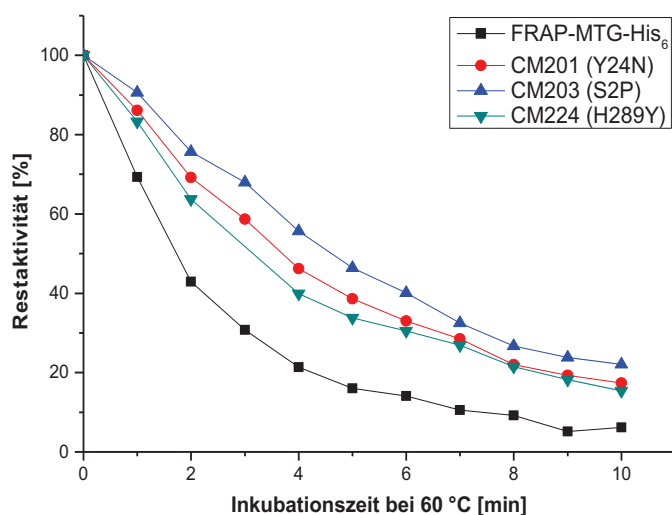
Basen-Austausche. Von den verbliebenen sieben Klonen hatten drei einen Aminosäure-Austausch bei drei Klonen waren zwei und bei einem Klon drei Aminosäuren ausgetauscht (Tab. 3).

**Tab. 3: Basen- und Aminosäure-Austausche in FRAP-MTG-His<sub>6</sub>-Mutanten, erhalten durch Random Mutagenese und im Screening nach Hitzeempfindlichkeit identifiziert.**

Mutant ID	Base	Basen-Austausch	Position im Codon	Aminosäure	Aminosäure-Austausch
CM207	73	G → A	1	25	Gly → Ser
CM208	73	G → A	1	25	Gly → Ser
	765	A → G	3	255	Still
CM215	26	C → T	2	9	Pro → Leu
CM216	73	G → A	1	25	Gly → Ser
	370	C → A	1	124	Gln → Lys
CM217	35	C → A	2	12	Pro → Gln
	38	T → C	2	13	Leu → Pro
	474	C → T	3	158	Still
	641	A → T	2	214	Lys → Met
CM218	73	G → T	1	25	Gly → Cys
	837	C → T	3	279	Still
	850	A → G	1	284	Ser → Gly
CM219	103	A → T	1	35	Ile → Leu
	623	G → A	2	208	Arg → Gln
CM225	28	G → A	1	10	Ala → Thr
	411	G → T	3	137	Still

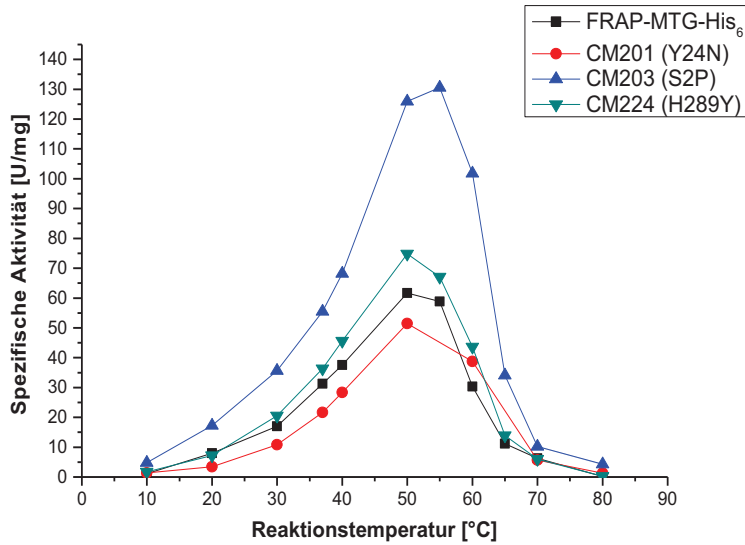
Die thermostabilen sowie die hitzeempfindlichen MTG-Varianten wurden für eine nähere Charakterisierung im 100 mL-Maßstab im Schüttelkolben exprimiert, mit der Protease TAMEP aktiviert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt.

Das Inaktivierungsverhalten ausgewählter thermostabiler Varianten ist in Abb. 16 dargestellt. Das aktivierte Enzym wurde jeweils für 10 min bei 60 °C inkubiert, jede Minute wurde eine Probe entnommen, auf Eis abgekühlt und anschließend die Restaktivität mittels Standard-Hydroxamattest bestimmt. Im Vergleich zur unveränderten, rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> zeigen die Mutanten eine deutlich verlangsamte Inaktivierung, was sich auch in einer Erhöhung der Halbwertszeit auf bis zu 270 % ausdrückt (siehe Tab. 4 und Abb. 18).



**Abb. 16: Inaktivierungsverhalten ausgewählter thermostabiler Varianten.** Die rekombinante, unveränderte FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (schwarz), sowie drei hitzestabile Varianten (CM201, CM203 und CM224) wurden für 10 min bei 60 °C inkubiert. Pro Minute wurde eine Probe entnommen und die verbliebene Restaktivität mittels Standard-Hydroxamattest bestimmt. Die Aktivität ohne Vorinkubation wurde jeweils gleich 100 % gesetzt.

In Abb. 17 ist die spezifische Aktivität der gleichen ausgewählten Varianten in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. CM201 und CM224 zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare spezifische Aktivität, die bei 60 °C leicht erhöht ist. Erstaunlicherweise zeigt CM203 eine etwa doppelt so hohe spezifische Aktivität bei allen Temperaturen. Außerdem liegt das Temperaturoptimum dieser Variante (bei einer Reaktionszeit von 10 min) bei 55 °C statt bei 50 °C im Falle der unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub>.

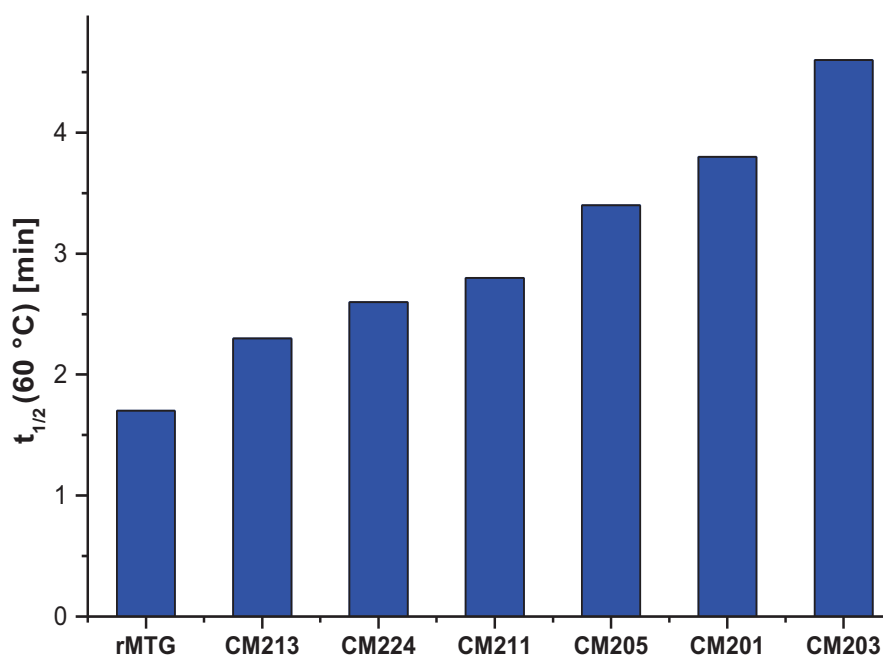


**Abb. 17: Spezifische Aktivität ausgewählter thermostabiler Varianten.** Die spezifische Aktivität der rekombinanten, unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (schwarz), sowie dreier hitzestabiler Varianten (CM201, CM203 und CM224) wurde in Abhängigkeit von der Temperatur mittels Hydroxamattest bestimmt. Die Substratlösung wurde 2 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert, dann wurde das Enzym zugegeben. Die Reaktionszeit betrug jeweils 10 min.

Tab. 4 fasst einige biochemische Eigenschaften der unveränderten, rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> sowie der thermostabilen Varianten, die genau einen Aminosäuren-Austausch tragen, zusammen. Das Temperaturoptimum von CM203 liegt bei 55 °C, das der anderen Varianten bei 50 °C. Deutlich erhöht sind bei allen Varianten die Restaktivität nach 10 min Inkubation bei 60 °C und die Halbwertszeit bei 60 °C.

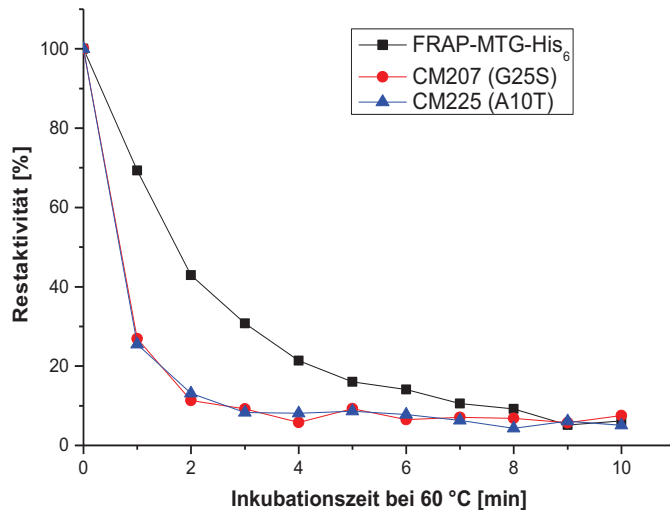
**Tab. 4:** Vergleich einiger biochemischer Eigenschaften der TAMEP-aktivierten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (rMTG) und thermostabilen Varianten, die genau einen Aminosäuren-Austausch tragen.  $t_{1/2}$  (60 °C) ist die Zeit, nach der 50% Restaktivität vorhanden sind nach einer Inkubation für 10 min bei 60 °C.

Art der MTG	rMTG	CM201	CM203	CM224	CM205	CM211	CM213
Mutation		Y24N	S2P	H289Y	S23L	G257S	K269E
$T_{opt}$ [°C]	50	50	55	50	50	50	50
Restaktivität nach 10 min Inkubation bei 60 °C [%]	6	17	22	15	13	19	11
$t_{1/2}$ (60 °C) [min]	1.7	3.8	4.6	3.4	2.8	2.3	2.6
Relative Zunahme in $t_{1/2}$ (60 °C) [%]		220	270	200	165	135	150



**Abb. 18:** Vergleich der Halbwertszeiten der thermostabilen FRAP-MTG-His<sub>6</sub>-Varianten. Alle sechs Varianten zeigen eine erhöhte Halbwertszeit bei 60 °C im Vergleich zur unveränderten, rekombinanten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (rMTG).

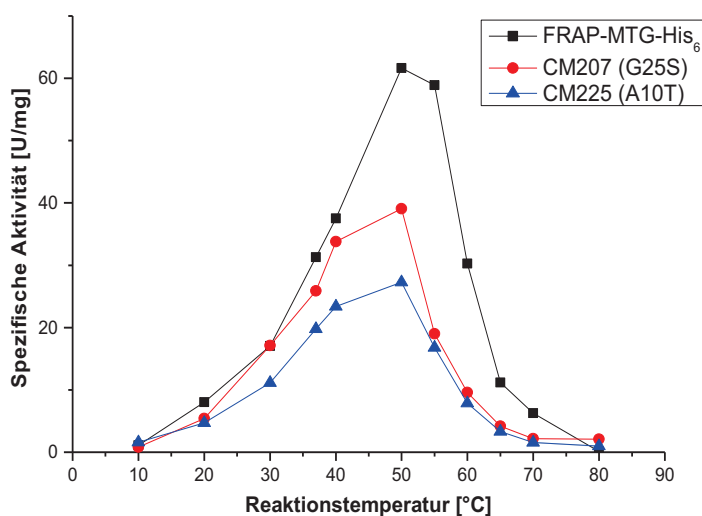
Die hitzeempfindlichen Varianten zeigen, wie erwartet, eine deutlich schnellere Inaktivierung bei 60 °C. Zur Verdeutlichung wurden zwei Varianten ausgewählt, CM207 und CM225 (Abb. 19). Bereits nach zwei Minuten Inkubation sinkt die Restaktivität auf etwa 10 % ab.



**Abb. 19: Inaktivierungsverhalten ausgewählter hitzeempfindlicher Varianten.** Die rekombinante, unveränderte FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (schwarz), sowie zwei hitzeempfindliche Varianten (CM207 und CM225) wurden für 10 min bei 60 °C inkubiert. Pro Minute wurde eine Probe entnommen und die verbliebene Restaktivität mittels Standard-Hydroxamattest bestimmt. Die Aktivität ohne Vorinkubation wurde jeweils gleich 100 % gesetzt.

Das Inaktivierungsverhalten von CM207 und CM225 bei 60 °C ist praktisch identisch. Eine Betrachtung der spezifischen Aktivität zeigt jedoch Unterschiede (Abb. 20). Während CM225 eine generell reduzierte spezifische Aktivität aufweist, ist CM207 bis zu Temperaturen von 40 °C in etwa so aktiv wie die unveränderte FRAP-MTG-His<sub>6</sub>. Erst bei höheren Temperaturen ist die Aktivität drastisch reduziert. Dieser Klon eignet sich daher besonders für Prozesse, in denen das Enzym nach Beendigung der Reaktion deaktiviert werden soll, höhere Temperaturen über einen längeren Zeitraum aber vermieden werden sollten.





**Abb. 20: Spezifische Aktivität ausgewählter hitzeempfindlicher Varianten.** Die spezifische Aktivität der rekombinanten, unveränderten FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (schwarz), sowie zweier hitzeempfindlicher Varianten (CM207 und CM225) wurde in Abhängigkeit von der Temperatur mittels Hydroxamattest bestimmt. Die Substratlösung wurde 2 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert, dann wurde das Enzym zugegeben. Die Reaktionszeit betrug jeweils 10 min.

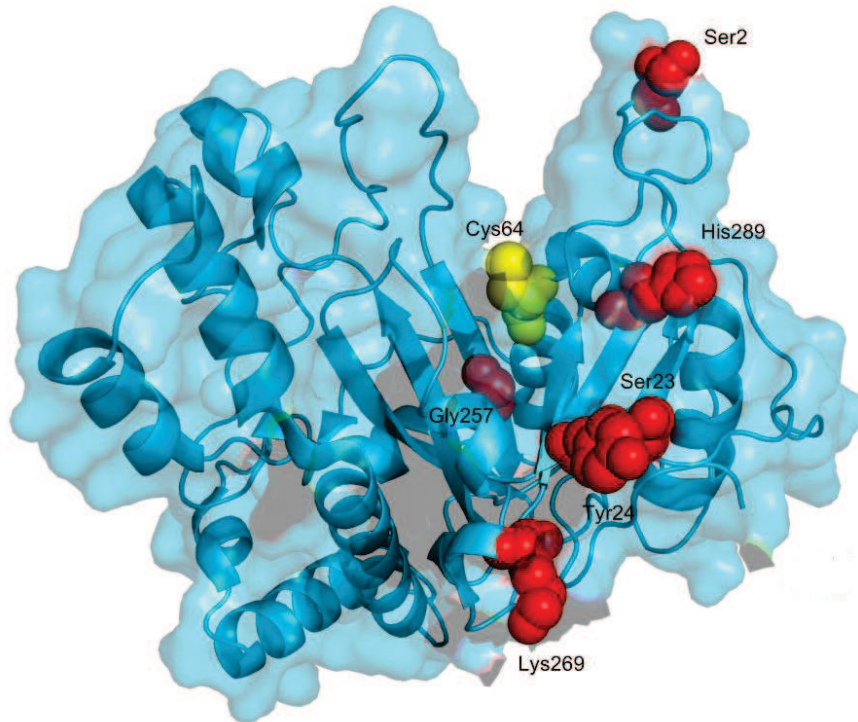
Die Verteilung der Mutationen innerhalb der dreidimensionalen Struktur der MTG liefert einige interessante Ergebnisse (Abb. 21). So fällt bei den thermostabilen Varianten auf, dass alle Mutationen bis auf eine in der N-terminalen Domäne, bzw. der linken Seite der Substrattasche liegen (im Vergleich zur ursprünglichen Darstellung von Kashiwagi et al. [Kashiwagi et al., 2002b] wurde die MTG-Struktur in Abb. 21 und Abb. 22 um 180° gedreht, damit die Stellen der Austausch besser sichtbar sind). Ser<sup>2</sup> spielt eine besondere Rolle, durch den Austausch zu Prolin wurde nicht nur die Thermostabilität erhöht, sondern auch die spezifische Aktivität verdoppelt. Dies ist in Einklang mit der Literatur, denn der Austausch von Ser<sup>2</sup> zu Arginin, Aspartat oder Tyrosin führte in der Literatur ebenso zu einer leicht erhöhten spezifischen Aktivität [Shimba et al., 2002a] wie die schrittweise Deletion der ersten drei N-terminalen Aminosäuren. Über die Thermostabilität dieser Varianten ist allerdings nichts bekannt.

Die Positionen 23 und 24 liegen unmittelbar vor dem ersten  $\beta$ -Faltblatt (26-30), also ebenfalls sehr nahe am N-terminalen Ende der MTG.

Gly<sup>257</sup> liegt unmittelbar neben Trp<sup>258</sup>, das zusammen mit Thr<sup>273</sup> die Hauptverbindung der zentralen Faltblattstruktur bildet. Eventuell wird durch den Austausch zu Serin diese Hauptverbindung stabilisiert. In unmittelbarer Nachbarschaft liegt ebenfalls D<sup>255</sup>, das Bestandteil der katalytischen Triade (oder mutmaßlichen Diade, vergleiche S. 10f) ist. Es wäre daher interessant zu untersuchen, inwieweit sich die Substratspezifität und weitere

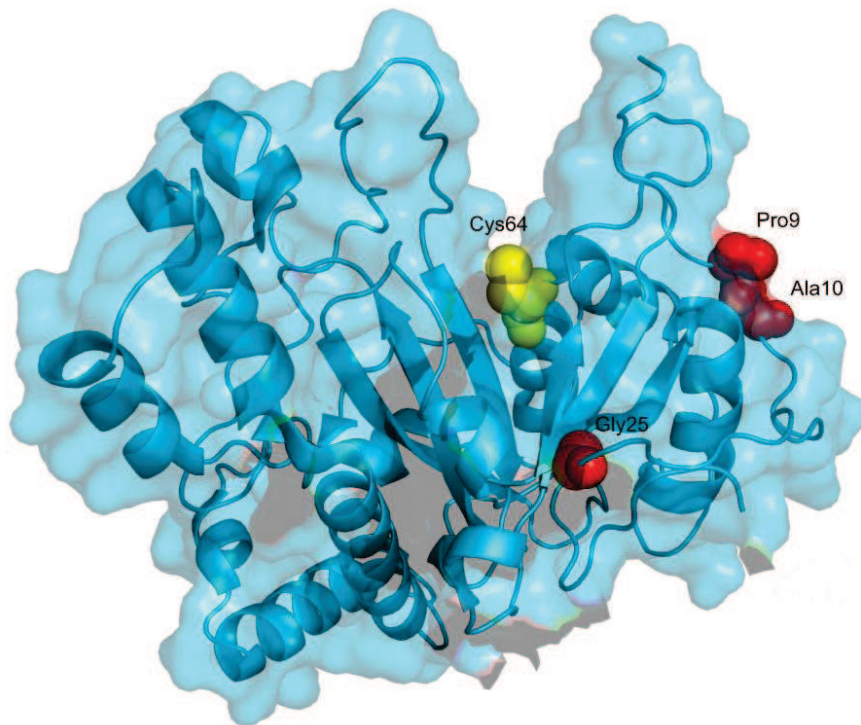
katalytische Eigenschaften neben der Thermostabilität dieser Variante eventuell geändert haben.

His<sup>289</sup> ist die erste Aminosäure des  $\beta_7$ -Faltblatts und liegt damit unmittelbar an dem Loop zwischen  $\beta_6$  und  $\beta_7$ , der zusammen mit dem N-terminalen Loop die linke Substrattasche bildet.



**Abb. 21: Identifizierung der hot spots für eine Erhöhung der Thermostabilität.** Kristallstruktur der MTG aus *Streptomyces mobaraensis* (PDB 1iu4) [Kashiwagi et al., 2002b]. Aminosäuren, die in den veränderten Varianten ausgetauscht wurden, sind raumfüllend dargestellt (rot). Ebenfalls raumfüllend ist das Cys64 im aktiven Zentrum dargestellt (gelb). Im Gegensatz zur ursprünglichen Darstellung von Kashiwagi et al. ist die Struktur um 180° gedreht worden, da die Austausche so besser sichtbar sind.

Die Bedeutung des N-terminalen Bereichs für die Thermoeigenschaften der MTG wird durch die Position der Aminosäure-Austausche in den hitzeempfindlichen Varianten unterstrichen. (Abb. 22). Alle Austausche in den drei Mutanten mit genau einem Austausch liegen im N-terminalen Loop (Pro<sup>9</sup> und Ala<sup>10</sup>), bzw. erneut unmittelbar vor Beginn des  $\beta_1$ -Faltblatts. Austausche an Position 25 finden sich ebenfalls in Doppelmutanten wieder.



**Abb. 22: Identifizierung der hot spots für Hitzeempfindlichkeit.** Kristallstruktur der MTG aus *Streptomyces mobaraensis* (PDB 1iu4) [Kashiwagi et al., 2002b]. Aminosäuren, die in den veränderten Varianten ausgetauscht wurden, sind raumfüllend dargestellt (rot). Ebenfalls raumfüllend ist das Cys64 im aktiven Zentrum dargestellt (gelb). Im Gegensatz zur ursprünglichen Darstellung von Kashiwagi et al. ist die Struktur um 180° gedreht worden, da die Austausche so besser sichtbar sind.

Diese Ergebnisse widerlegen teilweise die Behauptung von Shimba et al. [Shimba et al., 2002a], nach der der N-terminale Bereich der MTG zwar einen Einfluss auf die Aktivität und die Substratspezifität hat, nicht aber auf die globale Faltung. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch einzelner Aminosäuren im N-terminalen Bereich zwar eine Faltung der MTG nicht verhindert, aber gerade in diesem Bereich einen erheblichen Einfluss auf die Thermostabilität des Enzyms hat.

In einer einzigen Runde Random Mutagenese und Screening konnten thermostabile Varianten identifiziert werden, die eine deutlich verzögerte Inaktivierung bei höheren Temperaturen aufweisen und deren Halbwertszeit bei 60 °C auf das bis zu Dreifache gesteigert wurde. Eine Variante weist neben der hohen Thermostabilität ebenfalls eine etwa

doppelt so hohe spezifische Aktivität über den gesamten Temperaturverlauf auf. Die thermostabilen Varianten wurden zum Patent angemeldet [Marx et al., 2007b].

Unter den hitzeempfindlichen MTG-Mutanten gibt es interessante Varianten, die bis 40 °C die gleiche spezifische Aktivität wie die unmodifizierte, rekombinante FRAP-MTG-His<sub>6</sub> besitzen, bei 60 °C aber sehr schnell inaktiviert werden können. Eine Eigenschaft, die besonders im Lebensmittelbereich ihre Anwendung finden kann, wenn es darum geht, das Enzym nach der Reaktion thermisch zu inaktivieren und dabei die Erhitzungsphase möglichst kurz zu halten.

Für nur eine Mutagenese- und Screeningrunde sind die erzielten Veränderungen beachtlich. Die nächsten Schritte, die sich anbieten, sind:

- Eine Sättigungsmutagenese an den identifizierten Hot-Spots, um herauszufinden, welche Aminosäure an der jeweiligen Stelle die größte Verbesserung bringt.
- Weitere Runden Mutagenese und Screening, bei denen die optimierten Varianten als Ausgangspunkt dienen.
- Eine Rekombination der Aminosäure-Austausche, beispielsweise durch DNA-Shuffling
- Eventuell eine Mutagenese ausschließlich des N-terminalen Bereichs

Außerdem kann die erzeugte und gelagerte Klonbibliothek nach beliebigen weiteren veränderten Eigenschaften gescreent werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Substratspezifität der veränderten MTG-Varianten geändert hat.

## 5 Zusammenfassung

Die mikrobielle Transglutaminase (MTG) ist ein Enzym aus der Klasse der Transferasen, das in der Lage ist, Proteine kovalent zu verknüpfen. Sie findet als „biologischer Klebstoff“ unter anderem Verwendung in der Lebensmitteltechnologie, wo sie hauptsächlich eingesetzt wird, um Wurst schnittfest zu machen, Joghurt zu gelieren oder völlig neue Formen der Lebensmittelzubereitung zu ermöglichen. Mit Hilfe der MTG wurden außerdem erfolgreich Enzyme immobilisiert und sie zeigt ein großes Potenzial bei der Produktion biologisch abbaubarer Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen.

Bisher wird die MTG überwiegend durch Fermentation des Originalstammes *Streptomyces mobaraensis* gewonnen. Sämtliche früheren Versuche anderer Arbeitsgruppen, das Enzym in löslicher Form in *Escherichia coli* zu produzieren, schlugen fehl. Es wurden nur sehr geringe Ausbeuten erzielt und die MTG wurde nur in Form unlöslicher inclusion bodies gebildet.

Eine lösliche Expression der MTG in *E. coli* ist jedoch Voraussetzung, um das Enzym mittels Random Mutagenese verändern zu können. Für solche Veränderungen gibt es viele Ziele, beispielsweise die Optimierung der Stabilität oder eine Veränderung der Substratspezifität. Eine thermostabile MTG könnte in Prozessen eingesetzt werden, bei denen höhere Temperaturen notwendig sind, beispielsweise bei der Herstellung von Folien mittels Extrusion. Eine hitzeempfindliche Variante ist für alle Anwendungen interessant, bei denen das Enzym nach der Reaktion thermisch inaktiviert werden soll, aber aufgrund anderer Zutaten die Zeiten höherer Temperatur so kurz wie möglich sein sollten.

Es stellten sich für die vorliegende Arbeit folgende Herausforderungen:

1. Die mikrobielle Transglutaminase sollte in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden, um gentechnische Manipulationen zu vereinfachen und um eine Optimierung mittels Random Mutagenese erstmals zu ermöglichen. Da das Enzym in aktiver Form toxisch für die Wirtszelle ist, sollte es in der Pro-Form exprimiert werden.
2. Um das Enzym zu aktivieren, ist die Abspaltung der Pro-Sequenz nötig. Es sollten daher Proteasen identifiziert werden, die in der Lage sind, die Pro-MTG zu aktivieren, ohne das Enzym weiter abzubauen.
3. Es sollte mittels Random Mutagenese eine Bibliothek mutierter MTG-Varianten erzeugt werden. In einem Screening sollten aus diesen Varianten sowohl thermostabile als auch hitzeempfindliche Varianten identifiziert werden. Es war dazu ebenfalls nötig, ein Screeningverfahren zu entwickeln, das den zusätzlichen Schritt der Aktivierung eines Pro-Enzyms enthielt und mit dem mehrere tausend Klone untersucht werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine rekombinante Pro-MTG erzeugt, die in löslicher Form in *E. coli* exprimiert wird. Eine N-terminale pelB-Signalsequenz führte nicht zu

einem Transport ins Periplasma und erhöhte nicht die Löslichkeit. Ein Plasmid, das für in *E. coli* selten vorkommende tRNAs kodiert, hatte keinen Einfluss auf die Löslichkeit. Entscheidend war eine Temperaturabsenkung zum Induktionszeitpunkt, durch die über 90 % des Enzyms in löslicher Form exprimiert wurden. Neben einer Induktion mit IPTG wurde erfolgreich ein Lactose-Autoinduktionsmedium eingesetzt, durch das sich höhere Zelldichten und damit höhere Ausbeuten von 65 mg/L Bioreaktor bzw. 627 U/g BTM erzielen ließen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt mit diesem Medium zum gleichen Punkt in der Wachstumsphase und nicht zwangsläufig zum gleichen Zeitpunkt, was ein Vorteil bei der parallelen Kultivierung vieler Klone ist. Erstmals wurde die MTG mit einem Histidin-Tag versehen und mittels Affinitätschromatographie gereinigt.

Es wurden kommerzielle Proteasen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Pro-MTG-His<sub>6</sub> zu aktivieren. Die Proteasen konnten daraufhin in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Proteasen, die die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktivieren und nicht weiter abbauen, dazu gehören Cathepsin B, Thrombin und Dispase. Aufgrund ihrer geringen Aktivität sind jedoch Cathepsin B und Thrombin für einen Einsatz im größeren Maßstab nicht wirtschaftlich. Zur zweiten Gruppe, Proteasen die die Pro-MTG-His<sub>6</sub> aktivieren aber weiter abbauen, gehören Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K. Diese Proteasen sind für eine Aktivierung der Pro-MTG-His<sub>6</sub> nicht geeignet. Zum Vergleich wurde die Aktivierung der Pro-MTG-His<sub>6</sub> durch die Protease TAMEP untersucht, die bisher nicht kommerziell erhältlich ist und daher aus dem Überstand einer *Streptomyces mobaraensis* Kultur gereinigt wurde.

Mittels Random Mutagenese wurde eine Bibliothek veränderter MTG-Varianten erzeugt und ein Screeningverfahren etabliert, das erstmals den zusätzlichen Schritt der Aktivierung eines Pro-Enzyms enthielt. Es wurden etwa 5500 Varianten erzeugt und untersucht und es konnten sowohl thermostabile (sechs Varianten mit genau einem Aminosäure-Austausch) als auch hitzeempfindliche Varianten (drei Varianten mit genau einem Aminosäure-Austausch) identifiziert werden. Diese Enzymvarianten wurden einzeln kultiviert, aktiviert, gereinigt und bezüglich ihrer Thermostabilität und spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur charakterisiert. Es konnten darüber hinaus die Regionen in der dreidimensionalen Struktur der MTG identifiziert werden, die bevorzugte Ziele für Mutationen sind, wenn die thermischen Eigenschaften des Enzyms verändert werden sollen.

Die beste thermostabile Variante (Ser<sup>2</sup> → Pro) besitzt eine auf 270 % erhöhte Halbwertszeit bei 60 °C und hat außerdem bei allen Temperaturen eine doppelt so hohe spezifische Aktivität wie das rekombinante Wildtyp-Enzym. Eine hitzeempfindliche Variante (Gly<sup>25</sup> → Ser) zeigt eine dem Wildtyp-Enzym vergleichbare spezifische Aktivität bis zu Temperaturen von 40 °C, lässt sich jedoch bei 60 °C schnell inaktivieren.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen lassen sich neue Mutationsrunden anschließen, um die MTG weiter zu optimieren.

## 6 Literatur

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. und Motoki, M. (1989). "Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms." *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613-17.
- Bajorath, J., Hinrichs, W. und Saenger, W. (1988). "The enzymic activity of proteinase K is controlled by calcium." *European Journal of Biochemistry*, **176**, 441-7.
- Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 411-21.
- Braun, P. und Tommassen, J. (1998). "Function of bacterial propeptides." *Trends Microbiol*, **6**, 6-8.
- Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1994). "Mutagenic PCR." *PCR Methods Appl*, **3**, S136-40.
- Cardamone, J. M. (2007). "Enzyme-mediated crosslinking of wool. Part I: transglutaminase." *Textile Research Journal*, **77**, 214-221.
- Chambi, H. und Grosso, C. (2006). "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase." *Food Research International*, **39**, 458-466.
- Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A. und Pedersen, A. H. (1999). "Directed evolution of a fungal peroxidase." *Nat Biotechnol*, **17**, 379-84.
- Christians, F. C., Dawson, B. J., Coates, M. M. und Loeb, L. A. (1997). "Creation of human alkyltransferases resistant to O6-benzylguanine." *Cancer Res*, **57**, 2007-12.
- Chung, S. I. (1972). "Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII." *Ann NY Acad Sci*, **202**, 240-55.
- Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H. und Kikuchi, Y. (2003). "Production of native-type *Streptovercillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3011-4.
- Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H. und Kikuchi, Y. (2004). "High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase." *J. Biotechnol.*, **110**, 219-226.
- de Jong, G. A. und Koppelman, S. J. (2002). "Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications." *Journal of Food Science*, **67**, 2798-806.
- de Jong, G. A., Wijngaards, G., Boumans, H., Koppelman, S. J. und Hessing, M. (2001). "Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and *Streptovercillium mobaraense*." *J Agric Food Chem*, **49**, 3389-93.
- Dube, M., Schaefer, C., Neidhart, S. und Carle, R. (2007). "Texturization and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase." *European Food Research and Technology*, **225**, 287-299.
- Duetz, W. A., Ruedi, L., Hermann, R., O'Connor, K., Buchs, J. und Witholt, B. (2000). "Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates." *Appl Environ Microbiol*, **66**, 2641-6.
- Eckhardt, T., Strickler, J., Gorniak, L., Burnett, W. V. und Fare, L. R. (1987). "Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted beta-galactosidase from "*Streptomyces lividans*"." *J Bacteriol*, **169**, 4249-56.
- Eijsink, V. G. H., Gaseidnes, S., Borchert, T. V. und van den Burg, B. (2005). "Directed evolution of enzyme stability." *Biomolecular Engineering*, **22**, 21-30.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966a). "Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity." *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5518-25.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966b). "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies." *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 244-64.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georgette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M. A. und

- Feller, G. (2000). "Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology." *Trends Biotechnol*, **18**, 103-7.
- Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. und Rice, R. H. (1991). "Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues." *Faseb J*, **5**, 3071-7.
- Gulick, A. M. und Fahl, W. E. (1995). "Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8140-4.
- Hatti-Kaul, R., Birgisson, H. O. und Mattiasson, B. (2006). "Cold active enzymes in food processing." *Food Science and Technology (Boca Raton, FL, United States)*, **148**, 1631-1653.
- Hermann, R., Lehmann, M. und Buchs, J. (2003). "Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates." *Biotechnol Bioeng*, **81**, 178-86.
- Hoffmeister, D., Yang, J., Liu, L. und Thorson, J. S. (2003). "Creation of the first anomeric D/L-sugar kinase by means of directed evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13184-9.
- Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R. und Chiba, H. (1980). "Crosslinking of casein components by transglutaminase." *Agricultural and Biological Chemistry*, **44**, 1567-73.
- Jana, S. und Deb, J. K. (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**, 289-298.
- Kamata, Y., Ishikawa, E. und Motoki, M. (1992). "Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1323-1324.
- Kamiya, N., Doi, S., Tominaga, J., Ichinose, H. und Goto, M. (2005). "Transglutaminase-mediated protein immobilization to casein nanolayers created on a plastic surface." *Biomacromolecules*, **6**, 35-8.
- Kamiya, N., Takazawa, T., Tanaka, T., Ueda, H. und Nagamune, T. (2003a). "Site-specific cross-linking of functional proteins by transglutamination." *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 492-496.
- Kamiya, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Takazawa, T., Takeda, S., Watanabe, K. und Nagamune, T. (2003b). "S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*." *Bioconjug Chem*, **14**, 351-7.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. und Shimonishi, Y. (1993). "Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112." *J. Biol. Chem.*, **268**, 11565-72.
- Kashiwagi, T., Shimba, N., Ishikawa, K., Suzuki, E., Yokoyama, K. und Hirayama, K. "Method of modifying microbial transglutaminase substrate specificity by x-ray crystal structure-based designing and mutagenesis." WO 0214518 (21.02.2002), Ajinomoto Co., Inc., JP.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. und Suzuki, E. (2002b). "Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*." *J. Biol. Chem.*, **277**, 44252-60.
- Kataeva, I., Chang, J., Xu, H., Luan, C. H., Zhou, J., Uversky, V. N., Lin, D., Horanyi, P., Liu, Z. J., Ljungdahl, L. G., Rose, J., Luo, M. und Wang, B. C. (2005). "Improving solubility of *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium thermocellum* JW-20 proteins expressed into *Escherichia coli*." *J. Proteome Res.*, **4**, 1942-51.
- Kawai, M., Takehana, S. und Takagi, H. (1997). "High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 830-5.
- Kikuchi, Y., Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y. und Matsui, H. (2003). "Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: Processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 358-366.
- Kim, H. C., Lewis, M. S., Gorman, J. J., Park, S. C., Girard, J. E., Folk, J. E. und Chung, S. I. (1990). "Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization." *J. Biol. Chem.*, **265**, 21971-8.



- Kim, S. Y., Jeitner, T. M. und Steinert, P. M. (2002). "Transglutaminases in disease." *Neurochem. Int.*, **40**, 85-103.
- Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K. und Yamanaka, S. (1996). "epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiol. Lett.*, **144**, 157-160.
- Kumar, S., Wittmann, C. und Heinzle, E. (2004). "Minibioreactors." *Biotechnol Lett*, **26**, 1-10.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. und Susa, Y. (2001). "Transglutaminase: its utilization in the food industry." *Food Reviews International*, **17**, 221-246.
- Larre, C., Denery-Papini, S., Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C. und Lefebvre, J. (2000). "Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase." *Cereal Chemistry*, **77**, 32-38.
- Lorand, L., Lockridge, O. M., Campbell, L. K., Myhrman, R. und Bruner-Lorand, J. (1971). "Transamidating enzymes. II. A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma." *Anal Biochem*, **44**, 221-31.
- Lorenzen, P. C. (2000). "Renneting properties of transglutaminase-treated milk." *Milchwissenschaft*, **55**, 433-437.
- Makarova, K. S., Aravind, L. und Koonin, E. V. (1999). "A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases." *Protein Sci*, **8**, 1714-9.
- Mariniello, L. und Porta, R. (2005). "Transglutaminases as biotechnological tools." *Progress in Experimental Tumor Research*, **38**, 174-91.
- Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007a). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1543 - 1550.
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2007b) "Thermostabile Transglutaminase." 10 2007 042 727.3 (07.09.2007), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland.
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008a). "Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E. coli* and characterization of the active enzyme." *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 568-575
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008b). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162
- Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T. und Mori, T. (1996). "Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of alpha-lactalbumin in the molten globule state." *Biochim Biophys Acta*, **1292**, 69-76.
- May, O., Nguyen, P. T. und Arnold, F. H. (2000). "Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine." *Nat Biotechnol*, **18**, 317-20.
- Mergulhao, F. J., Summers, D. K. und Monteiro, G. A. (2005). "Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*." *Biotechnol. Adv.*, **23**, 177-202.
- Motoki, M. und Nio, N. (1983). "Crosslinking between different food proteins by transglutaminase." *J Food Sci*, **48**, 561-566.
- Motoki, M., Nio, N. und Takinami, K. (1984). "Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase." *Agric Biol Chem*, **48**, 1257-1261.
- Nio, N., Motoki, M. und Takinami, K. (1986). "Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase." *Agric Biol Chem*, **50**, 851-855.
- Oh, J.-H., Wang, B., Field, P. D. und Aglan, H. A. (2004). "Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase." *International Journal of Food Science and Technology*, **39**, 287-294.
- Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N. und Motoki, M. (2000a). "Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors." *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2608-13.

- Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. und Motoki, M. (2000b). "Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines." *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6230-6233.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S. und Fuchsbauer, H. L. (1998). "Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense* - purification, characterisation and sequence of the zymogen." *Eur. J. Biochem.*, **257**, 570-6.
- Pfister, P., Wasserfallen, A., Stettler, R. und Leisinger, T. (1998). "Molecular analysis of Methanobacterium phage psiM2." *Mol Microbiol*, **30**, 233-44.
- Ragkousi, K. und Setlow, P. (2004). "Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores." *J. Bacteriol.*, **186**, 5567-75.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Toiguchi, S., Seguro, K., Soeda, T. und Motoki, M. (1995). "Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture." *Journal of Food Science*, **60**, 300-4.
- Salazar, O. und Sun, L. (2003). "Evaluating a screen and analysis of mutant libraries." *Methods Mol Biol*, **230**, 85-97.
- Samorski, M., Muller-Newen, G. und Buchs, J. (2005). "Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: a novel measurement technique for shaken microtiter plates." *Biotechnol Bioeng*, **92**, 61-8.
- Schein, C. H. und Noteborn, M. H. M. (1988). "Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature." *Bio/Technology*, **6**, 291-294.
- Schwert, G. W. und Takenaka, Y. (1955). "Spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin." *Biochimica et Biophysica Acta*, **16**, 570-5.
- Shafikhani, S., Siegel, R. A., Ferrari, E. und Schellenberger, V. (1997). "Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization." *Biotechniques*, **23**, 304-10.
- Shimba, N., Shinohara, M., Yokoyama, K., Kashiwagi, T., Ishikawa, K., Ejima, D. und Suzuki, E. (2002a). "Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site." *FEBS Letters*, **517**, 175-179.
- Shimba, N., Yokoyama, K. und Suzuki, E. (2002b). "NMR-Based Screening Method for Transglutaminases: Rapid Analysis of Their Substrate Specificities and Reaction Rates." *J Agric Food Chem*, **50**, 1330-4.
- Silhavy, T. J., Benson, S. A. und Emr, S. D. (1983). "Mechanisms of protein localization." *Microbiol Rev*, **47**, 313-44.
- Stratagene. (2005). "GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit." *Manufacturer's Manual*.
- Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." *Protein. Expr. Purif.*, **41**, 207-34.
- Synowiecki, J. und Wolosowska, S. (2006). "Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by crosslinking with transglutaminase." *Enzyme and Microbial Technology*, doi:10.1016/j.enzmictec.2006.03.028.
- Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H. und Nagamune, T. (2004). "Enzymatic Labeling of a Single Chain Variable Fragment of an Antibody With Alkaline Phosphatase by Microbial Transglutaminase." *Biotechnology and Bioengineering*, **86**, 399-404.
- Takehana, S., Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Takeuchi, K., Matsui, H., Motoki, M. und Takagi, H. (1994). "Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Escherichia coli*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 88-92.
- Tanaka, T., Kamiya, N. und Nagamune, T. (2004). "Peptidyl linkers for protein heterodimerization catalyzed by microbial transglutaminase." *Bioconjug Chem*, **15**, 491-7.
- Taylor, M. M., Marmer, W. N. und Brown, E. M. (2005). "Characterization of biopolymers prepared from gelatin and sodium caseinate for potential use in leather processing." *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **100**, 149 - 159.

- Taylor, M. M., Marmer, W. N. und Brown, E. M. (2006). "Preparation and characterization of biopolymers derived from enzymatically modified gelatin and whey." *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **101**, 235 - 248.
- Tominaga, J., Kamiya, N., Doi, S., Ichinose, H. und Goto, M. (2004). "An enzymatic strategy for site-specific immobilization of functional proteins using microbial transglutaminase." *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 613-618.
- Vartanian, J. P., Henry, M. und Wain-Hobson, S. (1996). "Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions." *Nucleic Acids Res*, **24**, 2627-31.
- Wan, L., Twitchett, M. B., Eltis, L. D., Mauk, A. G. und Smith, M. (1998). "In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12825-31.
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S., Matsuura, A., Takagi, H., Motoki, M. und Takeuchi, K. (1994). "Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 82-7.
- Yasueda, H., Nakanishi, K., Kumazawa, Y., Nagase, K., Motoki, M. und Matsui, H. (1995). "Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*." *Eur. J. Biochem.*, **232**, 411-9.
- Yokoyama, K. I., Nakamura, N., Seguro, K. und Kubota, K. (2000). "Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, in vitro refolding, and characterization of the refolded form." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1263-70.
- Zheng, M. (2002). "pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovorticillium mobaraense*." *Enz. Microb. Technol.*, **31**, 477-81.
- Zimmermann, H. F., Trauthwein, H., Dingerdissen, U., Rieping, M. und Huthmacher, K. (2004). "Monitoring aerobic *Escherichia coli* growth in shaken microplates by measurement of culture fluorescence." *Biotechniques*, **36**, 580-2, 584.
- Zotzel, J., Keller, P. und Fuchsbauer, H. L. (2003a). "Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease." *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3214-22.
- Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M. und Fuchsbauer, H. L. (2003b). "Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step." *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4149-55.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Christian Marx  
 Akademischer Grad: Diplom-Naturwissenschaftler.  
 Geburtsdatum: 04.02.1975  
 Geburtsort: Neuwied  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

- [TU Bergakademie Freiberg]* 04/1997 - 09/2001
- Akademischer Grad: Diplom-Naturwissenschaftler
  - Studium der Angewandten Naturwissenschaft; Vertiefung: Biotechnologie
  - Diplomzeugnis vom 05.09.2001; Note: Sehr gut (1,3)
  - Diplomarbeit über „Klonierung einer Maltooligosaccharid bildenden Amylase und Experimente zur Transformation in *Bacillus*“
- [Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg]* 10/1994 - 03/1997
- Studium Physik (Diplom)
  - Zertifikat für interdisziplinäre Ergänzungsstudien Umweltwissenschaften
- [Werner-Heisenberg-Gymnasium Neuwied]* 1985 - 06/1994
- Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8); Abiturzeugnis vom: 08.06.1994
- [Kunostein Grundschule Neuwied-Engers]* 1981 - 1985

### Berufserfahrung

- [Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg]* 04/2002 - 03/2008
- Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Arbeitsgruppe Aufarbeitung biotechnischer Produkte
  - Promotion zum Thema „Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Random Mutagenese.“
- [European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Heidelberg]* 08/2001 - 02/2002
- PhD fellowship im Programm „Structural and Computational Biology“ zum Thema „Cryo-Elektronenmikroskopie und 3D-Bildrekonstruktion an Hepatitis-B-Virusproteinen“
  - Einmonatiger Aufenthalt an der Universitätsklinik Freiburg, rekombinante Expression und Aufreinigung von Virusproteinen
  - Predoctoral Core Course in Molecular Biology (2 Monate)

## 8 Publikationsliste

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1543 - 1550.

Marx, C. K., Hertel, T. C. and Pietzsch, M. (2008). "Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E. coli* and partial characterization of the active enzyme." *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 568-575.

Marx, C. K., Hertel, T. C. and Pietzsch, M. (2008). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162

### Patent

Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. "Thermostabile Transglutaminase." 10 2007 042 727.3 (07.09.2007), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland.

### Vortrag

Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2005) "Cloning of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* and high-level soluble expression in *Escherichia coli*" 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases (PCL8), Lübeck

## 9 Anhang: Der Dissertationsschrift zu Grunde liegende Veröffentlichungen

### Anhang 9 A

Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1543 - 1550.

### Anhang 9 B

Marx, C. K., Hertel, T. C. and Pietzsch, M. (2008). "Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E. coli* and partial characterization of the active enzyme.", *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 568-575.

### Anhang 9 C

Marx, C. K., Hertel, T. C. and Pietzsch, M. (2008). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants.", *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162



## Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*

Christian K. Marx, Thomas C. Hertel, Markus Pietzsch\*

Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
06099 Halle (Saale), Germany

Received 24 July 2006; received in revised form 26 October 2006; accepted 30 October 2006

### Abstract

Microbial pro-transglutaminase (MTG) from *Streptomyces mobaraensis* was cloned and expressed for the first time as a soluble protein at high levels in *Escherichia coli*. According to SDS-PAGE, more than 90% of the transglutaminase was produced in soluble form. This high solubility was obtained either by using a lactose auto-induction medium at a cultivation temperature of 28 °C or a temperature shift strategy comprising of growth at 37 °C and a post-induction temperature of 24 °C in a conventional LB medium and IPTG as the inductor. Using the auto-induction procedure the specific activity of MTG was as high as 627 U g<sup>-1</sup> CDM after activation by cleaving off the pro-sequence. Using shake flask cultivation, yields of 1460 U l<sup>-1</sup> bioreactor volume were obtained. This amount of soluble MTG is sufficient to enable high-throughput screening of mutant libraries without the restraint of refolding. Preceding optimization experiments of the transglutaminase expression included variation of the inductor type, temperature after expression, the localization as well as the supply of rare t-RNAs. Almost exclusively insoluble inclusion bodies were formed by IPTG induction at 37 °C. Transport to the periplasm using a pelB leader sequence failed and the supply of rare t-RNAs by *E. coli* Rosetta(DE3) did not enhance the soluble fraction of the protein. Thirty percent soluble transglutaminase were obtained by lowering the growth temperature from 37 to 24 °C after induction with IPTG when a pelB leader sequence was used.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Microbial transglutaminase; *Streptomyces mobaraensis*; Soluble recombinant expression; *E. coli*; Temperature shift strategy

### 1. Introduction

Transglutaminases (protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TG) are enzymes that catalyze an acyl transfer reaction between a  $\gamma$ -carboxamide group of a glutamine residue of a peptide and the  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue. This reaction leads to the formation of an  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine-link. Apart from lysine residues, several other primary amines can serve as substrates [1].

The currently known eukaryotic transglutaminases, including amongst others the human blood coagulation factor XIIIa, the tissue-TG [2], TG from the liver of guinea pig [3] and fish [4], are calcium-dependent and some of them are composed of several subunits. Human TGs play important roles in many different diseases [5].

In prokaryotes, TGs were found in *Streptomyces* [6,7], *Bacillus* strains [8] and in various other organisms [9]. Those TGs are Ca-independent and consist of only one subunit. The physiological role of prokaryotic TGs is largely unknown, a connection with sporulation was discussed [8]. Recently, a spore coat protein in *Bacillus subtilis* was found to be cross linked by transglutaminase, which supports this hypothesis [10].

In the food industry, microbial TG from *Streptomyces mobaraensis* (MTG) is widely used, amongst others for the cross linking of proteins in meat and fish and to support gelling of yogurt and cheese [11]. Furthermore MTG was used to immobilize enzymes, for example on ion exchangers [12] or silica gel [13].

Up to now, MTG is produced by conventional cultivation of the wild type *S. mobaraensis* strain and isolation of the secreted enzyme. The yield is about 100–150 mg l<sup>-1</sup> bioreactor volume [7,14]. Activation of the secreted inactive pro-enzyme is carried out by two endogenous proteases.

Several attempts have been made to overproduce MTG in a soluble form in *Escherichia coli*. A soluble expression is favorable for the economic production of high amounts of indus-

\* Corresponding author at: Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Department of Downstream Processing, 06099 Halle (Saale), Germany. Tel.: +49 345 55 25 949; fax: +49 345 55 27 260.

E-mail address: [markus.pietzsch@pharmazie.uni-halle.de](mailto:markus.pietzsch@pharmazie.uni-halle.de) (M. Pietzsch).

trial biocatalysts and absolutely necessary for high throughput screening (HTS) for optimized enzymes. HTS is applied to screen libraries consisting of a large number of variants produced by random mutation experiments such as directed evolution. As discussed for MTG, the lack of soluble expression in *E. coli* limits the random mutation approach so far, since refolding of insoluble inclusion bodies (IB) would be too time consuming [15]. Furthermore, refolding of enzymes for the application as industrial biocatalysts is not economically feasible.

Until now, all attempts to produce MTG in a soluble form in *E. coli* in considerable amounts have failed. Optimizing the original gene sequence with respect to the codon usage and addition of an ompA signal sequence to promote a transport into the periplasm resulted in only 5 mg l<sup>-1</sup> bioreactor volume [16]. The N-terminal fusion of a T7 leader peptide composed of 260 amino acids resulted in the accumulation of insoluble inclusion bodies in the cytosol, and only small amounts could be refolded to the active form [17]. The yield of activity after refolding of insoluble IBs in different approaches was only about 15% [18] to 20% [17]. Also optimization of the codon usage did not increase the level of soluble protein [18].

Due to the fact that all attempts for soluble expression of MTG in *E. coli* have so far failed, a *Corynebacterium* expression system was recently investigated in order to secrete the pro-MTG into the medium [19]. These experiments resulted in higher concentrations of the MTG (approximately 900 mg l<sup>-1</sup> cultivation medium [20]). However, the advantages of expression in *E. coli* such as easy transformation and cloning are lost by using this gram-positive and GC-rich expression strain.

In the wild type strain *S. mobaraensis*, MTG is expressed as a pre-pro-enzyme. The associated gene sequence is known [19,21]. The pre-peptide is necessary for the secretion of the pro-TG from the cells into the medium. Pro-MTG is enzymatically inactive and in order to activate the enzyme *S. mobaraensis* co-secretes two proteases which cleave the pro-peptide [22,23]. In vitro this activation can also be achieved by other proteases such as trypsin or dispase [21]. Considering the three dimensional structure of the active MTG, it has been predicted that the N-terminal pro-sequence covers the substrate pocket, thereby preventing the substrates from entering the active site [24].

Because of its protein cross linking activity, MTG is a potentially toxic protein for the expression host if produced intracellularly in an active form. Therefore, the expression as inactive pro-enzyme with subsequent activation by cleavage of the pro-sequence is necessary.

Optimization of the expression of heterologous proteins in *E. coli* has been the subject of many publications. In addition to the selection of the inductor, inductor concentration, plasmid copy number, and localization, temperature after induction is relevant for the total amount of protein expressed and for the solubility [25,26].

Concerning the localization, cytosolic expression of MTG in *E. coli* resulted predominantly in the formation of inclusion bodies as discussed above.

For several proteins it has been shown that transport to the periplasm in principle results in increased amounts of soluble, correctly folded protein. Many pre-sequences have been investi-

gated and numerous reasons such as lower protein concentration and presence of chaperones are discussed [27]. For MTG the application of the ompA signal sequence resulted in transport to the periplasm but the expression level remained low [16].

Concerning the temperature it has been shown that cultivation temperature and temperature after induction influence the level of soluble protein expressed. Growth at temperatures lower than 37 °C led to higher amounts of soluble protein [28]. As shown recently, the solubility of some proteins has been increased by lowering the growth temperature after induction by IPTG [29].

In order to provide an optimized production system for MTG from *S. mobaraensis* (i) the gene for the pro-MTG was amplified, (ii) inserted into a vector with and without a pelB-leader sequence to investigate if this alternative leader sequence directs the protein to the periplasm, (iii) the influence of a rare t-RNA producing *E. coli* strain was investigated and (iv) the inductor, medium and temperature were varied. The solubility of the inactive protein and the activity after activation were then compared.

Since the pelB leader sequence is located at the N-terminus of the expressed protein, it will be cleaved upon activation, together with the pro sequence. A His-tag at the C-terminus, also provided by the vector, was used to facilitate the purification and to indicate a complete transcription and translation of the pro-TG gene.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Unless otherwise stated all chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany. The protein marker (PageRuler Protein Ladder) used for SDS-PAGE was purchased from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany).

Deionised water was used throughout the experiments.

### 2.2. Bacterial strains

*S. mobaraensis* (DSM 40847) was purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). *E. coli* Rosetta(DE3) was purchased from Novagen (Bad Soden, Germany). *E. coli* BL21Gold(DE3) was purchased from Stratagene (Amsterdam, The Netherlands).

### 2.3. DNA extraction

Extraction of genomic DNA from *S. mobaraensis* was carried out using the Genomic DNA Purification Kit from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) in accordance with the manufacturers manual [30] employing the following modification. To facilitate cell lysis, lysozyme (3 mg ml<sup>-1</sup> final concentration) was added to the resuspended cells. The mixture was incubated for 1 h at 37 °C followed by addition of Proteinase K (150 µg ml<sup>-1</sup> final concentration) and SDS (0.5% final concentration).

### 2.4. PCR

For the amplification of the Pro-TG gene from *S. mobaraensis* genomic DNA a *Pfu* polymerase (Fermentas) was used. The amplification mix contained 5 µl *Pfu* buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA) with 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 µl 2 mM dNTP mix, 1 µl genomic DNA, 1 µl forward primer (12.5 pmol µl<sup>-1</sup>), 1 µl reverse primer (12.5 pmol µl<sup>-1</sup>), 0.5 µl *Pfu* polymerase (2.5 U µl<sup>-1</sup>) and water to 50 µl.



The forward primer (5'-CATG CCATG GAC AAT GGC GCG GGG GAA G-3') contained a *NcoI* recognition sequence, the reverse primer (5'-CCG CTC-GAG CGG CCA GCC CTG CTT TAC C-3') contained a *XhoI* recognition sequence.

The reaction was performed in a Whatman Biometra (Göttingen, Germany) Thermocycler with 10 min at 95 °C, addition of *Pfu* polymerase, 30 cycles of 1 min at 94 °C, 30 s at 65 °C, 2.5 min at 72 °C and a final elongation step of 10 min at 72 °C.

### 2.5. Construction of plasmid pCM2-8

Ten microlitre of pET20b (Novagen, about 20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) were digested with 0.5  $\mu\text{l}$  *NcoI* (10 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ) and *XhoI* (10 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ) with 6  $\mu\text{l}$  Y+ buffer (Fermentas) and water to 20  $\mu\text{l}$ . The PCR product was digested accordingly (10  $\mu\text{l}$ , about 8 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Incubation was carried out for 14 h at 37 °C followed by a heat inactivation of the restriction enzymes for 20 min at 80 °C.

The digested DNA was purified by preparative gel electrophoresis and the gel bands were purified with the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and eluted with 10  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl pH 8.5.

About 30 ng of plasmid were ligated with about 27 ng of PCR product (equivalent to a molar ratio of 1:3) with 2  $\mu\text{l}$  of T4 DNA ligase (2 U  $\mu\text{l}^{-1}$ , Fermentas) in 2  $\mu\text{l}$  ligation buffer and water to 20  $\mu\text{l}$ . The sample was incubated for 14 h at 14 °C followed by an inactivation of ligase for 10 min at 65 °C.

The resulting plasmid is called pCM2-8.

### 2.6. Preparation of competent cells and transformation

Preparation of electrocompetent cells of *E. coli* BL21Gold(DE3) (Stratagene) and *E. coli* Rosetta(DE3) (Novagen) and transformation via electroporation were carried out following the protocol in the Qiagen Bench guide [31].

One microlitre of the ligated product was introduced into 40  $\mu\text{l}$  of competent BL21 cells (approximately  $2 \times 10^{11}$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ). Cells were grown on LB medium containing ampicillin and clones containing the insert were identified by colony PCR. Positive clones were identified by sequencing (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) after plasmid preparation using the "QIAprep Miniprep Kit" (Qiagen). One microlitre of a plasmid with the correct sequence was transformed into 40  $\mu\text{l}$  of competent Rosetta cells. Positive clones were analyzed for activity.

### 2.7. Construction of plasmid pDJ1-3

The pro-MTG gene was cloned into pET20b employing the steps discussed above. The only difference here, was that the ligation was carried out such that the pelB signal sequence was removed. Primers used were the same as before, except for the forward primer containing an *NdeI* instead of an *NcoI* cleavage site.

### 2.8. Fermentation and induction

BL21(DE3) cells carrying pCM2-8 or pDJ1-3 were grown for up to 12 h in 5 ml LB medium containing 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin at 37 °C and shaken at 120 rpm (Multitron2, Infors, Basel, Switzerland). Three millilitre of this culture were added to 100 ml LB medium containing the same amount of antibiotics and grown at 37 °C. At an OD<sub>600</sub> of 0.5, cells were induced by addition of 400  $\mu\text{l}$  100 mM stock solution of IPTG (400  $\mu\text{M}$  final concentration). Growth was continued at 37 or 24 °C for up to 7 h.

For auto-induction, 3 ml of a pre-culture of BL21(DE3) or Rosetta(DE3) cells carrying pCM2-8 or pDJ1-3 were added to 100 ml LB medium containing 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin (plus 34  $\mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol for Rosetta) and the solutions of the Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen) prepared according to the manufacturers manual [32] and incubated for up to 24 h at 28 °C and 120 rpm. Alternatively, LB medium containing 0.45 g  $\text{l}^{-1}$  glucose, 1.2 g  $\text{l}^{-1}$  lactose, 4.5 g  $\text{l}^{-1}$  glycerol, 22.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub> was used, modified according to Studier [33].

After 0, 1, 2, 3 and 4 h of induction samples were taken. In order to compare the expression, samples were analyzed for biomass using UV spectroscopy.

1/OD samples of equal cell mass were prepared. The volume of sample was calculated using the equation  $V_{\text{sample}} = 1/\text{OD}_{600}$ .

For the SDS-PAGE of the total cell protein, the 1/OD sample was centrifuged and 100  $\mu\text{l}$  SDS sample buffer were added to the pellet. Ten microlitre were applied to the lane.

### 2.9. Activation of the pro-TG

The 1/OD samples were centrifuged and the pellets resuspended in 130  $\mu\text{l}$  50 mM Tris-HCl pH 8. Cells were lysed by five alternating freeze-thaw-steps (1 h at -25 °C, 20 min at 20 °C, whole cell extract) and centrifuged for 5 min at 16,100  $\times g$ . Activation of the pro-MTG to a constant activity level was performed by adding 10  $\mu\text{l}$  dispase (0.5 casein U  $\text{ml}^{-1}$ , ICN Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany) or 10  $\mu\text{l}$  trypsin (12,000 BAEE U  $\text{ml}^{-1}$ ) to the supernatant followed by incubation for 30 min at 30 °C according to Pasternack et al. [21].

### 2.10. Enzyme assay

The activity of MTG was assayed according to the colorimetric hydroxamate procedure [34].

A calibration curve was measured using commercially available L-glutamic acid  $\gamma$ -monohydroxamate in the range from 0 to 5 mM. One unit of MTG is defined as the formation of 1  $\mu\text{mol}$  L-glutamic acid  $\gamma$ -monohydroxamate per min at 37 °C.

### 2.11. Periplasm preparation

The periplasm fraction was prepared according to the method of Kang and Yoon [35].

Measurement of the activities of the periplasmic enzyme alkaline phosphatase and the cytosolic enzyme  $\beta$ -galactosidase was used to confirm the separation of periplasm from cytoplasm.

The activity of alkaline phosphatase was determined according to King and Delory [36]. The activity of  $\beta$ -galactosidase was determined according to Lederberg [37]. In the case of the whole cell extract the experiments have been repeated three times and for the periplasm fraction eight times.

### 2.12. Preparation of soluble and insoluble pro-MTG fractions

1/OD samples were dissolved in 130  $\mu\text{l}$  cell disintegration buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0) and lysed by five repeated freeze/thaw steps as described above. Insoluble matter (IBs, intact cells and cell debris) was removed by centrifuging for 5 min at 16,100  $\times g$ . Twenty-six microlitre of the supernatant, which represents the soluble fraction, were transferred to a fresh tube and the proteins were precipitated with 50  $\mu\text{l}$  of ice cold acetone. After incubation for 5 min and centrifugation for 10 min at 16,100  $\times g$ , 20  $\mu\text{l}$  of SDS sample buffer were added to the pellet and 10  $\mu\text{l}$  were applied on the SDS PAGE.

The pellet from the first centrifugation step containing the insoluble fraction of pro-MTG was resuspended in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Seventy microlitre 90 mM MgCl<sub>2</sub> and 10  $\mu\text{l}$  benzonase (2.5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ , Merck, Darmstadt, Germany) were added and the resuspended cells were incubated for 45 min at 25 °C. After centrifugation (5 min, 16,100  $\times g$ ) the pellet was washed with 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and centrifuged again. The supernatant was discarded and 100  $\mu\text{l}$  of SDS sample buffer was added to the pellet and 10  $\mu\text{l}$  were applied on the SDS page.

### 2.13. SDS-PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed according to the method of Laemmli [38] using a Mighty Small apparatus from Hoefer (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Gels were stained with Coomassie Blue. After staining, the gels were dried between two cellophane foils fixed in a frame. Quantitative analysis of the stained gels was carried out using a Gene Genius device (Syngene, Cambridge, United Kingdom) and the GeneSnap and GeneTools software. The amount of insoluble and soluble pro-MTG was determined

by integration of the peak areas of the corresponding bands by choosing “lowest slope” as the integration algorithm provided by the software.

#### 2.14. Purification of (*pelB*)-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub>

BL21(DE3) cells carrying pCM2-8 were cultivated in 100 ml medium as described above, using IPTG induction at 24 °C. The cells were harvested by centrifugation for 20 min at 10,000 × *g*. Cells were lysed by freeze-thaw-steps as described above. The lysed cells were centrifuged for 20 min at 20,000 × *g* and 1 volume of 2x concentrated binding buffer (final concentrations 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 20 mM sodium phosphate, pH 7.4) was added to the supernatant. The crude extract was applied to a “His Trap HP 1 ml” column (GE Healthcare, Freiburg, Germany). After washing with two column volumes of binding buffer, elution was performed using a linear gradient of 5–500 mM imidazole. The purest fraction was applied on the SDS-PAGE.

### 3. Results and discussion

Due to the ease of transformation, cloning and high cell density cultivation, *E. coli* is by far the most widely used microorganism for the production of recombinant proteins and enzymes. Solubility of the expressed enzymes is important if a screening for optimized properties is desired and if large libraries generated by directed evolution, for example have to be searched. Unfortunately, so far all attempts to express and overproduce microbial TG in soluble form in *E. coli* have failed.

Therefore, as already stated for MTG, a very time consuming process would have been necessary to refold inclusion bodies of a potential mutant library [15].

#### 3.1. Cloning of the *pro*-MTG gene

In order to amplify the MTG gene with its natural pro sequence primers were designed according to Pasternack et al. [21] and Kanaji et al. [39]. The *pro*-MTG expression plasmid

pCM2-8 was constructed by cloning the gene for *pro*-MTG into the pET20b plasmid. A *pelB* signal sequence was added at the N-terminus of the *pro*-MTG in order to target the pre-*pro*-MTG to the periplasm and to possibly overcome the problem with insoluble MTG. At the C-terminus a *His*<sub>6</sub>-tag was added to facilitate protein purification. The correct sequence was verified by sequencing. The final gene product is called *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> in the following.

#### 3.2. Expression of *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> in *E. coli*

In order to overexpress *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> we transformed the strain *E. coli* BL21Gold(DE3) with the expression plasmid pCM2-8. The expression strain was cultivated in a 100 ml shaking flask containing LB medium and ampicillin at 37 °C. Protein expression was induced by IPTG either at 37 °C, i.e. maintaining cultivation temperature or after cooling to 24 °C. Samples were taken up to 4 h after induction and MTG activity was determined after activation. The latter temperature shift strategy combines the advantages of fast growth with reduced expression rates which may lead to reduced IB formation [25,26].

To determine the amount of soluble and insoluble *pelB*-*pro*-MTG, 1/OD samples of both experiments were collected and lysed by freeze-thaw-steps. After centrifugation, the pellet represents the insoluble fraction and the supernatant represents the soluble fraction of *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub>, which was precipitated with cold acetone. Ten microlitre of each fraction were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1).

According to the SDS-PAGE shown in Fig. 1 at a temperature of 37 °C after induction the *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> was produced only as insoluble inclusion bodies (see lanes 1 and 2) and no activity could be detected after activation. This is in agreement with other trials to express MTG in *E. coli* [16–18] and the *pelB*

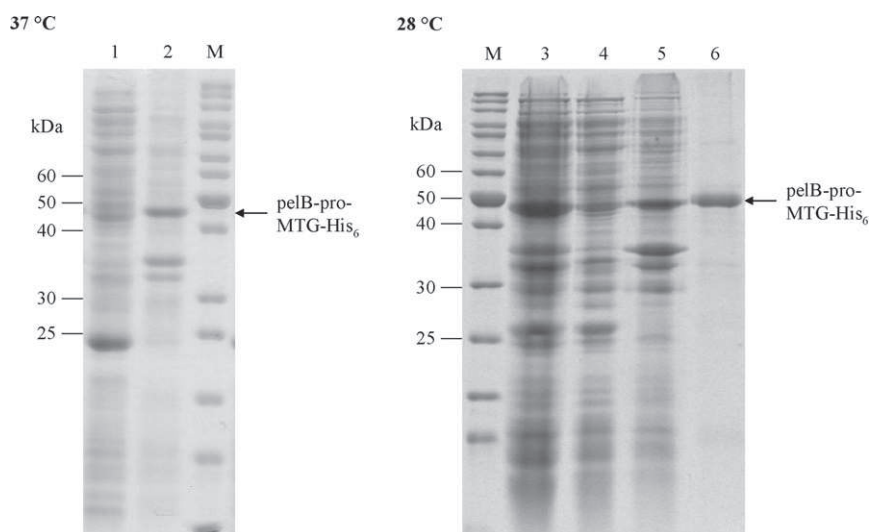


Fig. 1. SDS-PAGE showing the amount of *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> in the soluble and insoluble fractions at different temperatures after induction. *E. coli* BL21Gold(DE3)pCM2-8 was cultivated at 37 °C. At an OD<sub>600</sub> of 0.5 protein production was induced with IPTG at 37 °C (left) and after cooling to 24 °C (right). Lane 1 shows the soluble and lane 2 the insoluble protein fraction at 37 °C. At this temperature, only insoluble *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> was observed. Lane 3 shows the total cell protein content, lane 4 the soluble, and lane 5 the insoluble protein fraction at 28 °C. A purified *pelB*-*pro*-MTG-*His*<sub>6</sub> was applied in lane 6 (details see text). 1/OD samples were taken 3 h after induction. M=PageRuler Protein Ladder. Ten microlitre of sample was applied in each lane.

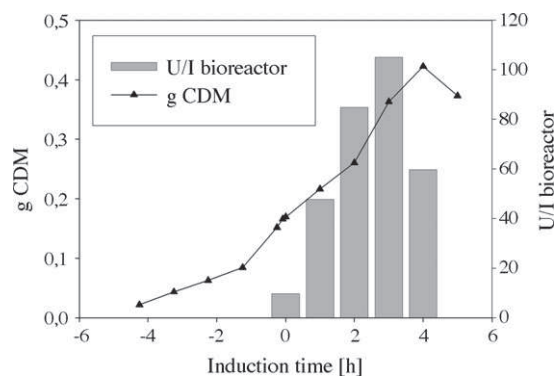


Fig. 2. TG production in *E. coli* BL21Gold(DE3) by induction with IPTG at 24 °C. Cells were grown in 100 ml LB medium containing Ampicillin at 37 °C. When an OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached TG production was induced with IPTG after lowering the temperature to 24 °C. 1/OD samples were taken in the first 4 h after induction, cells were lysed by freeze/thaw steps, and the pelB-pro-TG was activated by cleaving the pelB-pro-sequence with dispase, followed by the hydroxamate assay.

signal sequence does not seem to improve the solubility at this temperature.

After lowering the cultivation temperature to 24 °C and subsequent induction (Fig. 1, lanes 3–5), about 30% of the produced pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> became soluble, whereas 70% of the target protein was still insoluble.

PelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> shown as a reference in lane 6 was purified using standard affinity chromatography techniques using a HisTrap HP Column (GE Healthcare, Freiburg, Germany).

The purified pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> was activated by trypsin. The final product was not absolutely pure, showing some degradation of the MTG (data not shown). However the specific activity of the activated recombinant MTG was determined to be 14 U/mg which is in the range of specific activities published for wild type MTG purified from *S. mobaraensis* (22.6 U/mg [7]) or the recombinant one from *Corynebacterium glutamicum* (30 U/mg [40]).

Since, the protein band pattern is different in the soluble (e.g. Fig. 1, lane 4) and insoluble (e.g. Fig. 1, lane 5) fraction, i.e. some bands exclusively occur in the soluble or insoluble fraction, it is obvious that the insoluble protein preparation was mainly free of soluble proteins.

In order to determine the optimal cultivation time for maximal MTG production *E. coli* BL21Gold(DE3) carrying the plasmid pCM2-8 was grown in LB medium containing Ampicillin at 37 °C. When an OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached the temperature was lowered to 24 °C and then the MTG production was induced by addition of IPTG. 1/OD samples were taken in the first 4 h after induction and assayed for activity after cell disintegration.

As shown in Fig. 2 the MTG activity was found after activation without the necessity of refolding. The activity per bioreactor volume reached its maximum 3 h after induction and decreased afterwards.

As a result, pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> could be expressed by lowering the temperature to 24 °C and yields of up to 105 U l<sup>-1</sup> bioreactor and 326 U g<sup>-1</sup> CDM were achieved after activation.

### 3.3. Auto-induction medium

In order to investigate the influence of the cultivation medium and induction on the solubility of the target protein pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub>, *E. coli* BL21(DE3)pCM2-8 cells were cultivated in 100 ml LB medium containing ampicillin and auto-induction solutions according to Studier [33]. After preliminary tests at different temperatures, cells were grown at a constant temperature of 28 °C to balance between sufficient growth and soluble protein production. 1/OD samples were collected and lysed by freeze/thaw steps. After centrifugation, the pellet represents the insoluble fraction while the supernatant represents the soluble fraction of pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub>, which was precipitated with cold acetone. Ten microlitre of each fraction were applied to SDS-PAGE (Fig. 3, lanes 1–3).

The amount of soluble pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> was increased to about 50% and the maximum yield obtained was 968 U l<sup>-1</sup> bioreactor volume and 511 U g<sup>-1</sup> CDM.

### 3.4. Supply of rare t-RNAs

As the pro-MTG is coded by a GC-rich gene, we investigated if an expression could be optimized by supplying t-RNAs that are rare in *E. coli*. We transformed 1 µl of the expression plasmid pCM2-8 into *E. coli* Rosetta(DE3) that contains a second plasmid coding for six t-RNAs.

The cells were cultivated in a shaking flask containing 100 ml LB medium with ampicillin and the Overnight Express solutions. 1/OD samples were taken after overnight incubation beginning 17 h after inoculation.

The maximum yield obtained was 966 U l<sup>-1</sup> bioreactor volume and 501 U g<sup>-1</sup> CDM. As before, the solubility was determined to be 50% (data not shown). Altogether, the supply of rare t-RNAs did not affect yield, productivity or solubility.

### 3.5. Localization of expressed pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub>

In order to investigate whether the increased solubility is caused by the transport to the periplasm, the periplasmic protein fraction was isolated according to Kang and Yoon [35]. Whole cell extract was prepared by five repeated freeze/thaw steps. Samples of BL21Gold(DE3) pCM2-8 that were grown at 28 °C and induced with the Overnight Express System were used. The activity of two marker enzymes was determined as a control for the cytosolic (β-galactosidase) and periplasmic (alkaline phosphatase) fraction. Table 1 shows the activity of alkaline

Table 1

Comparison of the activity of alkaline phosphatase with that of β-galactosidase and TG after preparation of the periplasmic fraction and for the whole cell extract of *E. coli* BL21Gold(DE3) pCM2 (all values in mU g<sup>-1</sup> CDM)

	Alkaline phosphatase	β-Galactosidase	TG
Periplasm	1.2	34.2	10.6
Whole cell extract	1.5	484.1	313.0

The experiments have been repeated three times for the whole cell extract and eight times for the periplasm fraction. The data presented are the mean values.

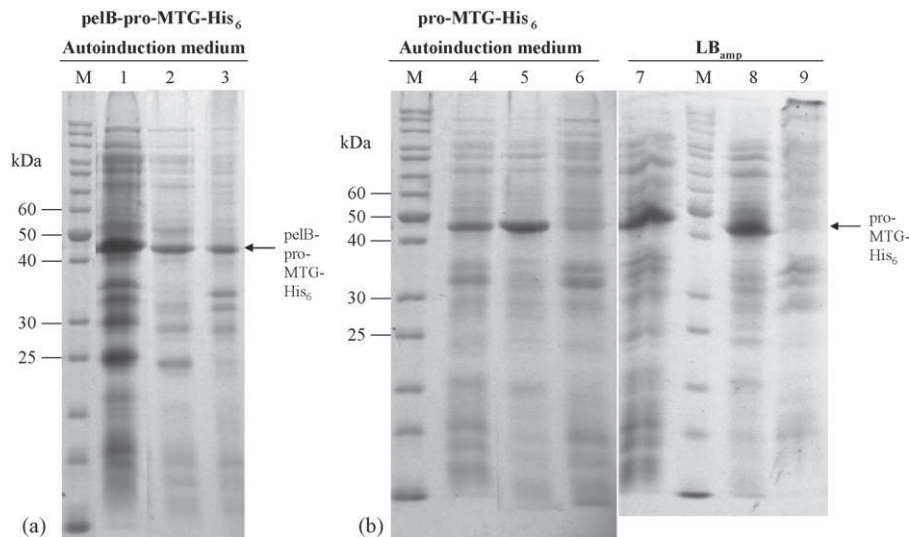


Fig. 3. SDS-PAGEs showing the amount of total, soluble, and insoluble fractions of (a) pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> and (b) pro-MTG-His<sub>6</sub> under different cultivation conditions. *E. coli* BL21Gold(DE3) carrying (a) pCM2-8 (lanes 1–3) or (b) pDJ1-3 (lanes 4–9) was cultivated and induced at 28 °C with Overnight Express Autoinduction Medium (lanes 1–6) or LB medium containing Ampicillin at 37 °C with induction by IPTG after cooling to 24 °C (lanes 7–9). 1/OD samples were taken after (a) 18 h or (b) 17 h after inoculation. Lanes 1, 4, and 7 shows the total cell protein content, lanes 2, 5, and 8 shows the soluble and lanes 3, 6, and 9 the insoluble protein fractions, respectively. M = PageRuler Protein Ladder. Ten microlitre of sample was applied in each lane.

phosphatase,  $\beta$ -galactosidase and MTG. In the periplasm fraction 80% of the alkaline phosphatase was present but only 7% of the  $\beta$ -galactosidase and 3% of the MTG. This result shows that the pelB-pro-MTG-His<sub>6</sub> is not transported into the periplasm due to recognition of the pelB signal sequence, but remains in the cytoplasm of the cells.

### 3.6. Expression of pro-MTG without signal sequence

Since the pelB signal sequence does not direct the pro-MTG into the periplasm of the host cell organism, we investigated how the presence or absence of this sequence influences the amount of pro-MTG expressed.

The pelB gene sequence was removed from the expression plasmid pCM2-8 by PCR amplification and restriction enzyme cleavage and the plasmid was transformed into *E. coli* BL21Gold(DE3) cells by electroporation. The successful removal was verified by sequencing. The expression plasmid without the signal sequence is called pDJ1-3 in the following.

*E. coli* BL21Gold(DE3) pDJ1-3 cells were cultivated in a shaking flask containing 100 ml LB medium with ampicillin and the Overnight Express solutions. 1/OD samples were taken after overnight incubation beginning 17 h after inoculation. As before the samples were lysed by freeze-thaw-steps. After centrifugation the pellet represents the insoluble fraction and the supernatant represents the soluble fraction of pro-MTG-His<sub>6</sub>, which was precipitated with cold acetone. Ten microlitre of each fraction were used for SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 3, lanes 4–6).

As a result, the expression of the pro-MTG-His<sub>6</sub> without the pelB leading signal sequence substantially increased the amount of soluble enzyme to more than 90% of the total expressed enzyme.

MTG activity was determined after activation. The maximum yield obtained was 1456 U l<sup>-1</sup> bioreactor volume and 627 U g<sup>-1</sup> CDM. The yield of CDM was 2.3 g l<sup>-1</sup>.

Finally, *E. coli* BL21Gold(DE3) pDJ1-3 was cultivated in shaking flasks, again using IPTG induction and the temperature shift strategy. Cells were grown at 37 °C until an OD<sub>600</sub> of approximately 0.5 was reached and the temperature was lowered to 24 °C after induction with IPTG. The amount of soluble pro-MTG-His<sub>6</sub> once more was >90% as determined by SDS-PAGE (Fig. 3, lanes 7–9). Due to a lower amount of CDM of 0.23 g l<sup>-1</sup> the maximum yield obtained was 102 U l<sup>-1</sup> bioreactor volume. The specific activity was 447 U g<sup>-1</sup> CDM.

To conclude, 90% of soluble pro-MTG-His<sub>6</sub> were obtained, using both IPTG induction with a temperature shift and auto-induction at a constant temperature.

In order to compare the results obtained in the present paper Table 2 gives an overview of the yields of MTG in different host strains.

Commonly, the specific activity in U g<sup>-1</sup> CDM is used for a comparison of the expression level. Unfortunately, this value is often missing in the literature concerning MTG production. In order to compare our results with literature data, the yield in mg l<sup>-1</sup> bioreactor volume is given in Table 2. However, this value varies with the achieved cell density, which is often not available from the published data. Calculating with a specific activity of 22.6 U g<sup>-1</sup> MTG [7], we achieved a maximum yield of about 65 mg MTG l<sup>-1</sup> bioreactor volume in a 100 ml shaking flask culture. This exceeds the previous production in *E. coli* but not yet that obtained with *C. glutamicum*.

With the temperature shift strategy employed in the present paper it was possible to overcome the obstacle of refolding insoluble inclusion bodies. Initial growth of the cells at 37 °C to produce sufficient cell mass and subsequent induction at 24 °C ensured a slow expression and lead to 90% soluble protein. This

Table 2  
Comparison of yields of TG production in different host strains

Reference	Host strain	MTG per bioreactor (mg l <sup>-1</sup> )	MTG per CDM (U g <sup>-1</sup> )	Remarks
Ando et al. [7]	<i>S. mobaraensis</i>	93	125	Original strain; secreted, values calculated from figure in the reference
Takehana et al. [16]	<i>E. coli</i>	5		No pro sequence, ompA sequence added, activity estimated from band intensity of western blot by the authors
Kawai et al. [17]	<i>E. coli</i>	60(300)		Inclusion bodies, 20% activity after refolding
Yokoyama et al. [18]	<i>E. coli</i>	30–45 (200–300)		Codon usage adjusted to <i>E. coli</i> ; inclusion bodies, 15% activity after refolding
Kikuchi et al. [19]	<i>C. glutamicum</i>	142		Secreted and activated; co-expressed protease
Date et al. [20]	<i>C. glutamicum</i>	700–881		Secreted, activated; chimeric pro sequence
This work	<i>E. coli</i>	65	627	Intracellular, 90% soluble, lactose induction
This work	<i>E. coli</i>	4.5	447	IPTG, temperature profile, >90% soluble

Numbers in parentheses indicate the yield of IBs before refolding. For comparison, the yield for this work was calculated from the maximum yield from the auto-induction of pro-MTG-His<sub>6</sub> without pelB signal sequence by assuming a specific activity of 22.6 U g<sup>-1</sup> enzyme [7].

is in agreement with the results of Kataeva et al. [29] who have shown that a reduction of temperature after induction enhanced the solubility of some other proteins expressed in *E. coli*.

To summarize, the amount of pro-MTG produced per cell was slightly increased by a factor of 1.4 using the autoinduction system compared to IPTG induction. The amount of pro-MTG produced per bioreactor volume increased by a factor of 14 due to the higher cell density achieved.

Optimization of the culture conditions as well as large scale high-cell density cultivation are underway and a further increase in yield is expected.

More important is the fact that it was possible to produce soluble pro-MTG in *E. coli* for the first time, rendering a refolding unnecessary and enabling genetic modifications by random mutagenesis.

## References

- Ohtsuka T, Sawa A, Kawabata R, Nio N, Motoki M. Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines. *J Agric Food Chem* 2000;48:6230–3.
- Chung SI. Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. *Ann NY Acad Sci* 1972;202:240–55.
- Folk JE, Cole PW. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *J Biol Chem* 1966;241:5518–25.
- Yasueda H, Nakanishi K, Kumazawa Y, Nagase K, Motoki M, Matsui H. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1995;232:411–9.
- Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM. Transglutaminases in disease. *Neurochem Int* 2002;40:85–103.
- Duran R, Junqua M, Schmitter JM, Gancet C, Goulas P. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamomeum* CBS 683.68. *Biochimie* 1998;80:313–9.
- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem* 1989;53:2613–7.
- Kobayashi K, Kumazawa Y, Miwa K, Yamanaka S. epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1996;144:157–60.
- Schäfer T, Bech L, Halkier T, Andersen JT, Noerrevang IA, Rasmussen G. Microbial transglutaminases, their production, gene cloning and sequence and use for protein crosslinking. US6190879, DK.
- Ragkousi K, Setlow P. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 2004;186:5567–75.
- de Jong GA, Koppelman SJ. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *J Food Sci* 2002;67:2798–806.
- Kamata Y, Ishikawa E, Motoki M. Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992;56:1323–4.
- Synowiecki J, Wolosowska S. Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by crosslinking with transglutaminase. *Enzyme Microb Technol*; 2006. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.1003.1028.
- Zheng M. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovorticillium mobaraense*. *Enzyme Microb Technol* 2002;31:477–81.
- Kashiwagi T, Shimba N, Ishikawa K, Suzuki E, Yokoyama K, Hirayama K. Method of modifying microbial transglutaminase substrate specificity by X-ray crystal structure-based designing and mutagenesis. WO 0214518 EP 1310560, Ajinomoto, PCT Int. Appl.
- Takehana S, Washizu K, Ando K, Koikeda S, Takeuchi K, Matsui H, et al. Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58:88–92.
- Kawai M, Takehana S, Takagi H. High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997;61:830–5.
- Yokoyama KI, Nakamura N, Seguro K, Kubota K. Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, in vitro refolding, and characterization of the refolded form. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1263–70.
- Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H. Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albobrigriseolus*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:358–66.
- Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamomeus* transglutaminase. *J Biotechnol* 2004;110:219–26.
- Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, Robenek IR, Wolf S, Fuchsbauer HL. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*—purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem* 1998;257:570–6.
- Zotzel J, Keller P, Fuchsbauer HL. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *Eur J Biochem* 2003;270:3214–22.
- Zotzel J, Pasternack R, Pelzer C, Ziegert D, Mainusch M, Fuchsbauer HL. Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is pro-

- cessed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *Eur J Biochem* 2003;270:4149–55.
- [24] Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H, et al. Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Biol Chem* 2002;277:44252–60.
- [25] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:411–21.
- [26] Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:289–98.
- [27] Mergulhao FJ, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 2005;23:177–202.
- [28] Schein CH, Noteborn MHM. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* 1988;6:291–4.
- [29] Kataeva I, Chang J, Xu H, Luan CH, Zhou J, Uversky VN, et al. Improving solubility of *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium thermocellum* JW-20 proteins expressed into *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 2005;4:1942–51.
- [30] Fermentas. Genomic DNA purification KIT. Manufacturer's manual; 2000.
- [31] Qiagen. Competent cells and transformation. Bench guide; 2001:2–3.
- [32] Novagen. Overnight express autoinduction system manual; 2005.
- [33] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Exp Purif* 2005;41:207–34.
- [34] Folk JE, Cole PW. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochim Biophys Acta* 1966;122:244–64.
- [35] Kang Y, Yoon J-W. Effect of modification of connecting peptide of proinsulin on its export. *J Biotechnol* 1994;36:45–54.
- [36] King EJ, Delory GE. The rates of enzymic hydrolysis of phosphoric esters. *Biochem J* 1939;33:1185–90.
- [37] Lederberg J. The  $\beta$ -D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J Bacteriol* 1950;60:381–92.
- [38] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [39] Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. *J Biol Chem* 1993;268:11565–72.
- [40] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y. Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:3011–4.



## Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli* and partial characterization of the active enzyme

Christian K. Marx, Thomas C. Hertel, Markus Pietzsch\*

Department of Downstream Processing, Faculty of Natural Sciences I, Institute of Pharmacy, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Weinbergweg 22, 06099 Halle (Saale), Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 September 2007

Received in revised form 11 January 2008

Accepted 7 March 2008

#### Keywords:

Recombinant microbial transglutaminase  
pro-MTG-His<sub>6</sub>

*Streptomyces mobaraensis*

Purification

Proteolytic activation

Characterization

### ABSTRACT

Pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* was expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein carrying a C-terminal histidine tag (pro-MTG-His<sub>6</sub>). The recombinant organism was cultivated in 15 L bioreactor scale and pro-MTG-His<sub>6</sub> was purified by immobilized metal affinity chromatography. Activation of the inactive pro-enzyme using trypsin resulted in an unexpected degradation of the transglutaminase and a concomitant loss of activity. Therefore, a set of commercially available proteases was investigated for their activation potential without destroying the target enzyme. Besides trypsin, chymotrypsin and proteinase K were found to activate but hydrolyze the (pro-MTG-His<sub>6</sub>). Cathepsin B, dispase I, and thrombin were shown to specifically hydrolyze pro-MTG-His<sub>6</sub> without deactivation. TAMEP, the endogenous protease from *S. mobaraensis* was purified for comparison and also found to activate the recombinant histidine-tagged transglutaminase without degradation. The TAMEP activated MTG-His<sub>6</sub> was purified and characterized. The specific activity (23 U/mg) of the recombinant histidine-tagged transglutaminase, the temperature optimum (50 °C), and the temperature stability ( $t_{1/2}$  at 60 °C = 1.7 min) were comparable to the wild-type enzyme. A C-terminal peptide tag did neither affect the activity nor the stability but facilitated the purification. The purification of the histidine-tagged protein is possible before or after activation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Transglutaminases (protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TG) are enzymes that catalyze an acyl transfer reaction between a  $\gamma$ -carboxamide group of a glutamine residue of a peptide and the  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue. This reaction leads to the formation of an  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl-) lysine-bond. Apart from lysine residues, several other primary amines can serve as substrates [1].

Transglutaminases have been detected in eukaryotes (including amongst others the human blood coagulation factor XIIIa, the tissue-TG [2], TG from the liver of guinea pig [3] and fish [4]), and prokaryotes (MTGs were found in *Streptomyces* [5,6], *Bacillus* strains [7] and in various other organisms [8]). In the food industry, micro-

bial TG (MTG) from *Streptomyces mobaraensis* is widely used, e.g. for the cross-linking of proteins in meat and fish and to support gelling of yogurt and cheese [9].

*In vivo*, toxic enzymes are often produced as inactive pro-enzymes. For a biotechnological application of the respective enzyme an activation is required, e.g. by proteolytic cleavage of the pro-sequence. Up to now, MTG is produced by conventional cultivation of the wild-type *S. mobaraensis* strain which is of GRAS status and subsequent isolation of the secreted enzyme. Activation of the secreted inactive pre-pro-enzyme is performed simultaneously by two endogenous proteases [6,10]. Recently, a *Streptomyces* pro-MTG carrying an histidine tag (pro-MTG-His<sub>6</sub>) was overproduced in soluble form in *Escherichia coli* for the first time [11].

The first report on the activation of a (eukaryotic) pro-transglutaminase using a commercial protease was published in 1975. Trypsin was used for the activation of Factor XIII [12]. Thrombin and Factor Xa where also effective in activation while chymotrypsin failed. Since that time several proteases have been investigated for the activation of various eukaryotic transglutaminases. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase [13] and was used

**Abbreviations:** BSA, bovine serum albumin; CV, column volume; IMAC, immobilized metal affinity chromatography; pro-MTG-His<sub>6</sub>, recombinant histidine-tagged microbial transglutaminase expressed in *Escherichia coli*; TG, transglutaminase; MTG, microbial transglutaminase.

\* Corresponding author. Tel.: +49 345 55 25 949; fax: +49 345 55 27 260.

E-mail address: [markus.pietzsch@pharmazie.uni-halle.de](mailto:markus.pietzsch@pharmazie.uni-halle.de) (M. Pietzsch).

for the first time in 1988 for the activation of skin transglutaminase activity of newborn mice [14]. Later, dispase, Proteinase K, trypsin, and thrombin were shown to activate pro-transglutaminase E from guinea pig skin whereas chymotrypsin and Endoproteinase Glu-C resulted in almost no activity but showed a considerable degradation of the zymogen [15]. Several of the proteases used before for the activation of mammalian pro-transglutaminases were also investigated for the activation of microbial pro-transglutaminase (pro-MTG).

Trypsin and dispase [16], and immobilized trypsin and chymotrypsin, and free dispase I [17] were previously used for the activation of pro-MTG isolated from *S. mobaraensis*. In contrast, trypsin and chymotrypsin were not able to activate pro-MTG from *Streptomyces cinnamomeum* [18].

Besides the commercially available proteases, several investigations have been carried out on endogenous proteases from *Streptomyces* species. Transglutaminase activating metalloprotease (TAMEP) was purified from *S. mobaraensis* DSM 40587 and characterized [17]. This protease is activating the endogenous transglutaminase of the same microbial strain and leaving a tetrapeptide (FRAP) on the N-terminus of the MTG. This extension does not affect the specific activity of the transglutaminase. In cultures of *S. mobaraensis* DSM 40847, FRAP-MTGase produced by TAMEP is further hydrolyzed by a tripeptidyl aminopeptidase (SM-TAP) resulting in the mature wild-type transglutaminase [19].

The three proteases from *Streptomyces albobriseolus* were investigated for the activation of the pro-MTG of this strain. SAM-P20 showed the highest activity, but caused a gradual decrease of the MTG activity. SAM-P26 did not completely process the pro-MTG and SAM-P45 showed only half of the activity of SAM-P20.

In order to optimize the production of MTG, co-expression and co-secretion of the protease SAM-P45 from *S. albobriseolus* together with the pro-MTG from *S. mobaraensis* was performed in *Corynebacterium glutamicum* [20]. However, the protease SAM-P45 was degrading the MTG after prolonged times of cultivation [21,22].

In our ongoing experiments for the isolation and production of large amounts of highly pure and active MTG we scaled-up the cultivation scale to 15 L using a bioreactor. Then, we purified our histidine-tagged recombinant pro-MTG-His<sub>6</sub> after expression in *E. coli* by means of immobilized metal affinity chromatography (IMAC). From the enzymes published for the activation of eukaryotic and/or prokaryotic MTGs we selected trypsin because it is commercially available in a stabilized form, which prevents auto-proteolysis. So far, unwanted side-reactions by trypsin have not been reported. Surprisingly, after applying trypsin we found severe hydrolysis of the (pro-)MTG-His<sub>6</sub> with concomitant decrease in activity. Since, this result was completely unexpected we carried out a screening of commercially available proteases previously investigated for their ability to activate eukaryotic or prokaryotic pro-transglutaminases as well as the endogenous protease from *S. mobaraensis* (TAMEP). The activated MTG-His<sub>6</sub> was characterized.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Unless otherwise stated all chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany. The protein marker (Protein Molecular Weight Marker) used for SDS–PAGE was purchased from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany). Material and equipment (ÄKTAEplorer 100) for chromatography was purchased from GE Healthcare, Freiburg, Germany.

The following commercial enzymes were used: Trypsin, TPCK treated (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany, order No T1426, lot No 026K7770), chymotrypsin (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany, order No C4129, lot No 105K7670), dispase I (ICN Biomedicals, Eschwege, Germany, order No 195022, lot No 6735E, 6.8 U/mg), Cathepsin B (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany, order No C6286, lot No 025K7670), Thrombin (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany, order No T7513, lot No 115K7589 and proteinase K (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany,

order No E00491, lot No 00019680). Casein was purchased from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany, order No 22080, lot No S33356 426).

The dialysis tube had a cut-off of 25 000 Da and was purchased from Roth (SpecTraPor 7, Karlsruhe, Germany). Silicone oil was purchased from Roth (Karlsruhe, Germany, order No 0865.2). Deionized water was used throughout the experiments.

### 2.2. Bacterial strains

*S. mobaraensis* DSM 40847 was purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). *E. coli* BL21Gold(DE3) was purchased from Stratagene (Amsterdam, The Netherlands).

### 2.3. Bioreactor cultivation

The cultivation of *E. coli* BL21(DE3) pDJ1-3 was carried out in a batch process using the auto-induction method as described previously [11].

Five milliliters of preculture I (LB medium) were inoculated by a single colony of *E. coli* BL21(DE3) pDJ1-3. After growth for 18 h at 37 °C at 200 rpm, 100 mL LB medium were inoculated with 3 mL preculture I (starting OD = 0.04) and grown for 7 h at 37 °C and 120 rpm (rotary shaker, preculture II). Five hundred milliliters of preculture III (LB medium) were inoculated with preculture II resulting in a starting OD<sub>600</sub> of 0.02 and grown overnight at 37 °C and 80 rpm to an OD<sub>600</sub> of 2.8. 14.73 L of fermentation medium (see below) were inoculated with 270 mL preculture III (starting OD = 0.05). Bioreactor cultivation was carried out using a 20 L Biostat C at a temperature of 28 °C, a stirrer speed of 300 rpm and an air flow rate of 4.0 standard liters per minute (slpm). During the fermentation, the pH was measured but not controlled. Silicone oil was used as an antifoaming agent.

After 19 h, the cells were harvested by centrifugation (4 °C, 6000 × g, Eppendorf ZK 630, Hamburg, Germany). The biomass was resuspended in 0.9% NaCl solution, centrifuged again, and stored as sheets of approximately 0.5 cm thickness at –80 °C. From 15 L of cultivation volume, 238 × g wet cell mass were harvested.

#### 2.3.1. Cultivation medium

For the preparation of 15 L auto-induction medium 135 g trypton (final concentration 9 g/L), 67.5 g yeast extract (4.5 g/L), and 135 g NaCl (9 g/L) were dissolved in 13.5 L deionized water in a 20 L Biostat C bioreactor (Braun Melsungen, Germany) and sterilized. Solutions of 7.5 g glucose, 75 g glycerol, 30 g lactose in 300 mL water, 51 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 53.25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 750 mL water, 7.40 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O in 15 mL water, and 1.5 g ampicillin in 30 mL water were prepared. After separate sterilization, these solutions were added to the bioreactor (final concentrations were 0.5 g/L glucose, 5 g/L glycerol, 2 g/L lactose, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, and 100 µg/mL ampicillin). The pH was adjusted to 7.5 using NaOH. Before inoculation, the volume was filled up with sterile water to 14.73 L.

#### 2.4. Purification of pro-MTG-His<sub>6</sub>

##### 2.4.1. Cell disintegration

Ten grams of frozen cells (*E. coli* BL21(DE3) pDJ1-3) were resuspended in 100 mL of 50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0, tempered to 4 °C and disintegrated by three passages at >10 000 psi using a high pressure homogenizer (EmulsiFlex-C5, Avestin Europe, Mannheim, Germany). After each passage, the suspension was allowed to cool to 4 °C before starting the next disintegration cycle. The suspension was then centrifuged for 20 min at 10 000 × g in order to get a clear solution. The clear supernatant (crude extract, 100 mL) was applied directly to an IMAC column.

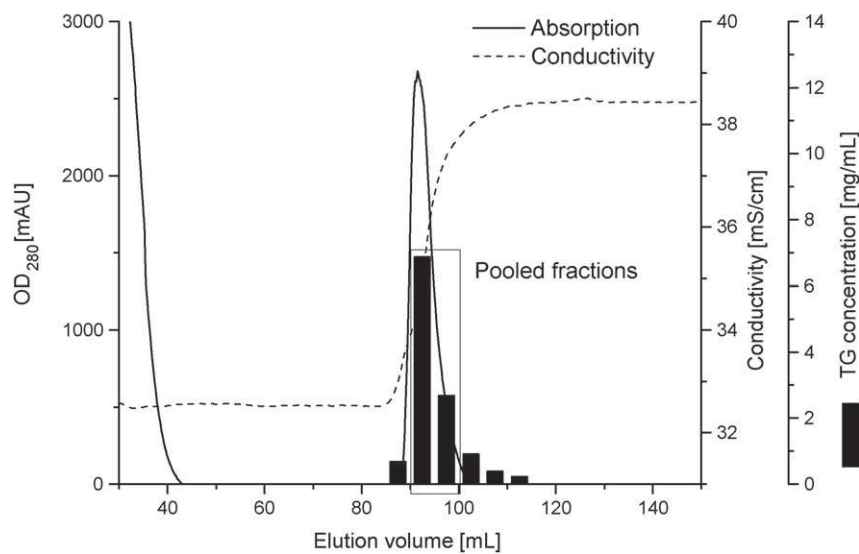
##### 2.4.2. Affinity purification

Histidine-tagged pro-MTG was purified by means of IMAC using the following conditions. Support: Streamline Chelating, Ni-NTA; column: XK 16/20; CV: 30 mL; flow rate for sample application: 3 mL/min; flow rate for washing and elution: 3 mL/min; binding buffer: 50 mM Tris/HCl buffer with 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0; elution buffer: 50 mM Tris/HCl buffer with 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0; sample: clarified lysate from *E. coli* containing pro-MTG-His<sub>6</sub> fusion protein after high pressure homogenization and centrifugation (crude extract); sample volume: 100 mL; fraction volume: 5 mL. After loading and washing the column with 3 CV of binding buffer, step elution was carried out at 500 mM imidazole using the elution buffer. Pro-MTG-His<sub>6</sub> containing fractions were analyzed by SDS–PAGE. Fractions were stored at 4 °C.

Pro-MTG-His<sub>6</sub> containing fractions were pooled (9.5 mL, see Fig. 1 for details) and dialyzed twice against 1000 mL of 50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0 for 1 h each at room temperature. Thirty-two microliters of a 300 mM GSH stock solution were added to 9.5 mL of dialysate (final concentration 1 mM). GSH was used in order to prevent oxidation of the enzyme [23]. CaCl<sub>2</sub> was used since it is frequently used in order to stabilize the proteases investigated (see, e.g. trypsin [24], Proteinase K [25], TAMEP and also (pro-) MTG [17]).

The dialysate (pure pro-MTG-His<sub>6</sub>) was stored in aliquots of 2 mL at 4 °C for a maximum of 4 days. The protein concentration was determined to be 4.56 g/L.





**Fig. 1.** Purification of pro-MTG-His<sub>6</sub> using nickel chelate affinity chromatography. Chromatogram (support: Streamline Chelating, Ni-NTA; column: XK 16/20; CV: 30 mL; flow rate for sample application: 3 mL/min; flow rate for washing and elution: 3 mL/min; binding and equilibration buffer: 50 mM Tris/HCl buffer with 300 mM NaCl, pH 8 and 20 mM imidazole; elution buffer: 50 mM Tris/HCl buffer with 300 mM NaCl, pH 8 and 500 mM imidazole; sample: clarified lysate from *E. coli* containing pro-MTG-His<sub>6</sub> fusion protein after high pressure homogenization and centrifugation; sample volume: 100 mL; fraction volume: 5 mL). Elution was carried out with 500 mM imidazole. The box indicates the pooled fractions.

### 2.5. Storage stability of pro-MTG-His<sub>6</sub>

Storage stability of pure pro-MTG-His<sub>6</sub> was determined at 4 and  $-20^{\circ}\text{C}$ . The pure pro-MTG-His<sub>6</sub> was diluted with storage buffer (50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GSH, pH 8.0) to a concentration of 0.25 mg/mL. Aliquots were stored at the indicated temperature and either thawed before assaying for activity or used directly. Activation was carried out using the standard procedure.

### 2.6. Investigation of the caseinolytic activity of different proteases in the standard activation buffer

In order to prove that the proteases investigated are active in the buffer used for storage of pure pro-MTG-His<sub>6</sub> (50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GSH, pH 8.0, also called standard activation buffer), this buffer was used in a standard protease test [26]. Casein was used as the standard protease substrate and dissolved in the standard activation buffer at a concentration of 10 mg/mL. Five hundred and fifty microliters of this 1% casein solution was incubated with 50  $\mu\text{L}$  of a protease preparation at  $37^{\circ}\text{C}$  for a defined time period. To stop the reaction, 900  $\mu\text{L}$  of cold 5% TCA were added, followed by a centrifugation for 10 min at  $16\,100 \times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . The extinction at 280 nm of the supernatant was determined. One unit of proteolytic activity is defined as 1 extinction unit at 280 nm/min.

### 2.7. Cleavage of pro-MTG-His<sub>6</sub> with different proteases

The following commercial proteases were dissolved in standard activation buffer (50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GSH, pH 8.0): Cathepsin B (4.7 mg/mL, 0.6 U<sub>cas</sub>/mL), chymotrypsin (1 mg/mL, 13 U<sub>cas</sub>/mL), dispase I (1.2 mg/mL, 13 U<sub>cas</sub>/mL), proteinase K (0.1 mg/mL, 2 U<sub>cas</sub>/mL), thrombin (250 U/mL), and trypsin (1 mg/mL, 12 U<sub>cas</sub>/mL). Eight microliters of the respective protease solution was added to 400  $\mu\text{L}$  of a tempered pro-MTG-His<sub>6</sub> solution (0.25 mg/mL) in standard activation buffer. The reaction solution was incubated for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Prior to the addition of the protease (blank), and after 4, 10, 16, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min, and 24 h samples were taken. Each sample was diluted immediately 1:1 with SDS sample buffer and heated to  $99^{\circ}\text{C}$  for 3 min. Ten microliters of each sample were applied to the SDS-PAGE. Ten microliters of the sample were used directly to start the MTG standard activity assay.

### 2.8. Production of TAMEP from *S. mobaraensis*

The pro-MTG activating protease TAMEP was purified from *S. mobaraensis* DSM 40847 according to the literature [19] with some modifications.

Five agar plates (each of 64 cm<sup>2</sup>) were prepared (the medium contained 4.0 g/L glucose, 4.0 g/L yeast extract, 10 g/L malt extract, 2.0 g/L CaCl<sub>2</sub>, and 12.0 g/L agar. The pH was adjusted to 7.2 before adding the agar). The plates were inoculated with a spore solution of *S. mobaraensis* DSM 40847 and incubated for 36 days at  $28^{\circ}\text{C}$ . After incubation, the agar with the cultures was transferred to a beaker containing 170 mL buffer A (50 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7) and incubated with shaking at

$28^{\circ}\text{C}$  for 18 h. The buffer solution was filtered through a fluted filter. One hundred forty milliliters of the filtrate were applied to a XK16 column (Q-Sepharose, 30 mL CV), followed by a washing step with 2 CV of buffer A. TAMEP was eluted with a gradient over 3 CV from buffer A to buffer B (buffer A + 500 mM NaCl). Fractions of 10 mL were collected. TAMEP was eluted at 300 mM NaCl. TAMEP activity was confirmed by incubating fractions from IMAC containing pro-MTG-His<sub>6</sub> for 40 min at  $30^{\circ}\text{C}$ , followed by the hydroxamate assay.

### 2.9. Production of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>

Wet biomass (0.5 g) of *E. coli* BL21(DE3) from the bioreactor cultivation were resuspended in 10 mL lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/mL Lysozym, 10 U/mL Benzonase) and lysed for 60 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation for 20 min at  $20\,000 \times g$  400  $\mu\text{L}$  TAMEP were added to the supernatant, to activate the pro-MTG-His<sub>6</sub>. After incubation for 60 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , 666  $\mu\text{L}$  4.8 M NaCl and 400  $\mu\text{L}$  elution buffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole pH 8) were added to the raw enzyme extract (final concentrations: 300 mM NaCl, 20 mM imidazole). Ten milliliters of this extract were applied to a Streamline Chelating Sepharose FF 5  $\times$  5 column (GE Healthcare, Freiburg) with a flow rate of 0.5 mL/min, washed with binding buffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8) and eluted with elution buffer. Four fractions of 0.5 mL were pooled (2 mL of 107 U/mL).

### 2.10. Characterization of TAMEP activated FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, Activa WM and MTG purified from Activa WM

The optimal temperature ( $T_{\text{opt}}$ ), and the temperature stability ( $T_{\text{stab}}$ ) of TAMEP activated MTG-His<sub>6</sub> were determined according to the literature [27,28]. The FRAP-MTG-His<sub>6</sub> concentration was adjusted to 15 U/mL by addition of binding buffer. The half-life time ( $t_{1/2}$ ) was determined by incubating 10 PCR tubes with 30  $\mu\text{L}$  of the pure MTG-His<sub>6</sub> solution at  $60^{\circ}\text{C}$  in a PCR thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Germany) for 1–10 min and cooled down immediately. Ten microliters of the preincubated solutions were assayed for activity using the standard activity assay [23].

The N-terminal sequence of TAMEP activated MTG-His<sub>6</sub> was confirmed by Edman degradation to be the tetrapeptide "FRAP". Pure MTG-His<sub>6</sub> was applied to SDS-PAGE, blotted onto polyvinylidene difluoride membranes using the semi-dry method, and stained with Coomassie blue R-250. The protein band was cut out and analyzed. The amino-terminal sequence analysis was carried out by Sequence laboratories Göttingen GmbH (Germany).

For comparison, the commercial Activa WM preparation was investigated using the same buffer as for the FRAP-MTG-His<sub>6</sub>. Since Activa WM is stabilized with maltodextrin, a sample was purified using size exclusion chromatography (column: Superdex 75, GE Healthcare, Freiburg, Germany) and eluted with binding buffer. The depletion of maltodextrin was determined quantitatively by measuring the amount of reducing sugar using dinitrosalicylic acid [29].

**Table 1**  
Purification table of pro-MTG-His<sub>6</sub>

Step	V <sub>0</sub> (mL)	Pro-MTG-His <sub>6</sub> concentration (mg/mL)	Amount Pro-MTG-His <sub>6</sub> (mg)	Yield (%)
Crude extract	100	1.01	101	100
Pool of IMAC	9.5	4.62	43.89	43.5
Dialysate	9.5	4.56	43.32	42.9

The amount of pro-MTG-His<sub>6</sub> in the crude extract was calculated from the band intensity of Coomassie stained SDS-PAGE by integration of the peak area of the corresponding band and comparison with a concentration marker of purified pro-MTG-His<sub>6</sub>. The concentration of the pooled fractions and of dialyzed pro-MTG-His<sub>6</sub> was calculated by measuring the absorption at 280 nm.

For determination of the temperature optimum, FRAP-MTG-His<sub>6</sub> was diluted with binding buffer to a concentration of 5 U/mL. The activity was determined using the standard activity assay at different temperatures.

### 2.11. Analytical methods

The activity of MTG-(His<sub>6</sub>) was assayed according to the colorimetric hydroxamate procedure [23] (MTG standard assay). Usually, the enzyme sample volume was 10 µL and the volume of the substrate solution 140 µL. A calibration curve was measured using commercially available L-glutamic acid γ-monohydroxamate in the range from 0 to 5 mM. One unit of MTG-(His<sub>6</sub>) is defined as the formation of 1 µmol L-glutamic acid γ-monohydroxamate per min at 37 °C. The absorption was measured using a microtiter plate reader (Fluostar Galaxy, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany).

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed according to the method of Laemmli [30] using a Mighty Small apparatus from Hoefer (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). 12.5% gels were stained with Coomassie Blue. After destaining, the gels were dried between two cellophane foils fixed in a frame. The amount of pro-MTG-His<sub>6</sub> in the crude extract was calculated from the band intensity of Coomassie stained SDS-PAGE by integration of the peak area of the corresponding band and comparison with a concentration marker of purified pro-MTG-His<sub>6</sub>.

The protein concentration of the purified pro-MTG-His<sub>6</sub> was determined by measuring the UV-absorption at 280 nm ( $\epsilon_{280\text{nm}}^{1\%} = 17.21$ ) [31].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Production and purification of pro-MTG-His<sub>6</sub>

*E. coli* biomass containing recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase (pro-MTG-His<sub>6</sub>) was produced using the overnight expression system as described previously [11].

The biomass was disintegrated by high-pressure homogenization, as described in material and methods. After centrifugation, the supernatant was applied to a Streamline Ni-NTA affinity column and eluted by an linear gradient of imidazole. The elution profile is shown in Fig. 1.

Pro-MTG-His<sub>6</sub> fractions containing the purified protein were pooled, dialyzed and used for the activation experiments.

The results of the purification procedure are summarized in Table 1. Some 43 mg of pro-MTG-His<sub>6</sub> could be isolated in highly pure form from 100 mL crude extract prepared from 10 g cell wet mass. The yield was calculated from the band intensity of the target protein compared to the initial amount to be 43%.

### 3.2. Storage stability of pro-MTG-His<sub>6</sub>

In order to use identical starting material throughout the experiments, the storage stability of pure pro-MTG-His<sub>6</sub> was determined at 4 and –20 °C. After several days of storage, the enzyme was activated by the standard method and assayed for activity. The result is shown in Fig. 2.

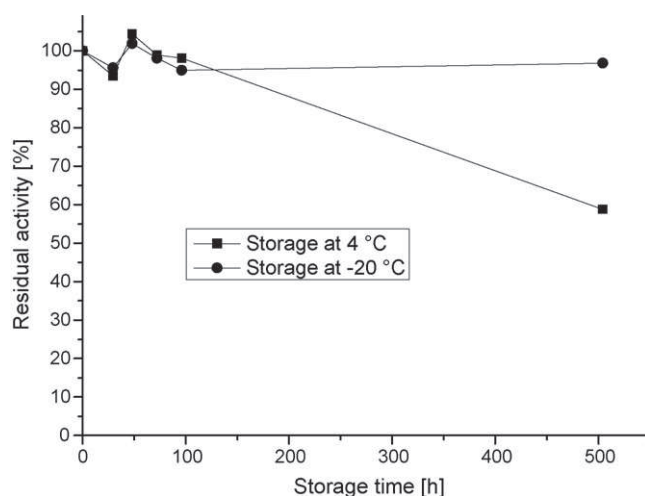
As can be seen from Fig. 2, after 21 days of storage of the zymogen at 4 and –20 °C, respectively, the MTG-His<sub>6</sub> after activation by TAMEP Exhibits 59 and 97% of the initial activity, respectively. Therefore, storage at –20 °C is recommended for the purified pro-MTG-His<sub>6</sub>.

### 3.3. Investigation of the activation of pro-MTG-His<sub>6</sub> using trypsin

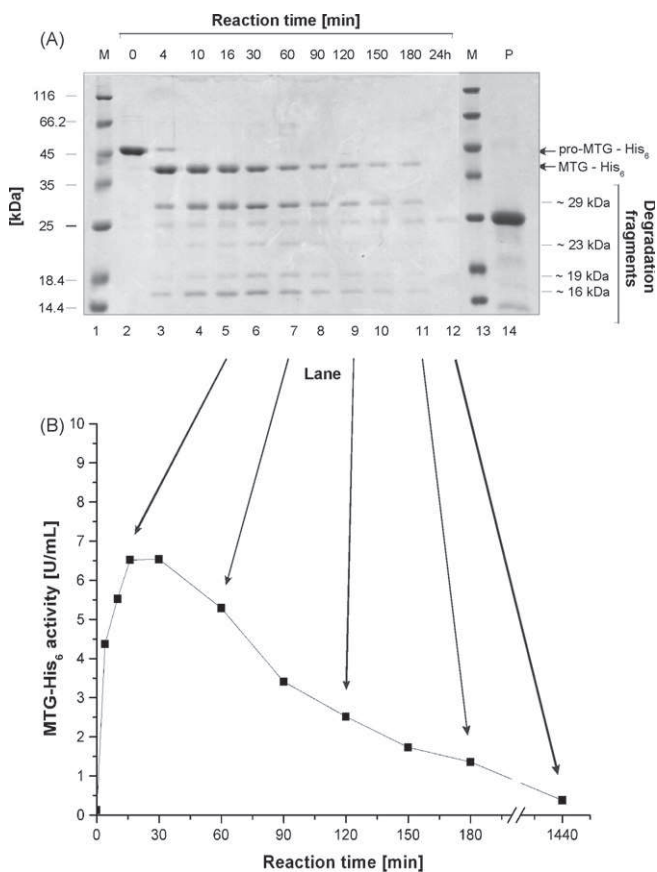
Previously, pro-MTG-His<sub>6</sub> has been successfully produced in *E. coli* in soluble form in high amounts [11]. In order to develop a preparative scale procedure for the activation of the recombinant histidine-tagged enzyme from the number of published proteases potentially useful for this reaction, trypsin was selected. Trypsin is commercially available in a stabilized form which prevents the protease against autoprolysis. According to Pasternack et al., trypsin was as useful as dispase for the activation of wild-type pro-MTG from *S. mobaraensis* [16]. Trypsin was added as a solution directly to the storage buffer of the pure pro-MTG-His<sub>6</sub> as described in material and methods. Fig. 3A shows the SDS-PAGE after different times of activation and Fig. 3B the corresponding activity profile.

Astonishingly, upon incubation of the pure pro-MTG-His<sub>6</sub> protein with trypsin, several degradation products are produced (see SDS-PAGE, Fig. 3A). These degradation products possess a distinct molecular weight, indicating several cleavage sites of trypsin in the enzyme. Lane 14 shows trypsin in a concentration of 400 µg/mL. A trypsin band corresponding to a concentration of 20 µg/mL as used in the experiment is hardly visible (see lanes 3–12). Despite, the concentrated trypsin solution shows some minor contaminations, these are not identical with the degradation products. A band with the molecular weight equivalent to the activated MTG-His<sub>6</sub> was found to decrease with reaction time. With the decrease of this band, the activity of the enzyme solution was also significantly decreasing (Fig. 3B).

This negative effect of protease treatment was never mentioned before in the literature reporting on wild-type MTG activation. The possible reasons may be a result of the changed activation conditions, caused by the histidine-tag added to the recombinant enzyme



**Fig. 2.** Storage stability of pro-MTG-His<sub>6</sub>. Aliquots were stored at the indicated temperature and assayed for activity. Activation was carried out using the standard procedure. Hundred-percentage activity corresponds to 5.8 U/mL protein.



**Fig. 3.** Time course of the treatment of pure pro-MTG-His<sub>6</sub> with trypsin in standard activation buffer. To a solution of pure pro-MTG-His<sub>6</sub> (0.25 mg/mL) in standard activation buffer (50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GSH, pH 8.0) trypsin was added (final concentration of 20 µg/mL). The solution was incubated at 37 °C. Samples were taken before addition of trypsin and after 4, 10, 16, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min. (A) SDS-PAGE, Coomassie stained. The sample was diluted 1:1 with SDS sample buffer and 10 µL of each sample were applied in each lane. Lane 14 shows trypsin in a concentration of 400 µg/mL (a trypsin band corresponding to a concentration of 20 µg/mL as used in the experiment is visible in the lanes 3–12). M = Marker; (B) time dependence of the activity of purified pro-MTG-His<sub>6</sub> upon treatment with trypsin. The TG activity of the solution was determined immediately after sampling by using the hydroxamate assay.

or by protease inhibitors present in the enzyme preparation from *S. mobaraensis*.

For a straightforward access of the active MTG-His<sub>6</sub> without degradation we decided to investigate other proteases besides trypsin for their ability to activate the enzyme.

### 3.4. Screening of different proteases for the activation of pro-MTG-His<sub>6</sub>

Since the first attempt to use a commercial protease to activate pro-MTG-His<sub>6</sub> without degradation failed, an extensive screening for a useful protease was carried out.

Chymotrypsin and dispase which have been previously applied for the activation of wild-type microbial transglutaminase were (re)investigated for their substrate specificity. Special focus was drawn on the potential degradation behavior of the substrate enzyme. In addition, the commercially available protease cathepsin B was used because it also potentially recognizes amino acids located near the N-terminus. Proteinase K and thrombin were investigated because it has been formerly used for the activation of guinea pig TG.

For comparison, TAMEP which is the endogenous pro-MTG activating protease from *S. mobaraensis* was investigated. The latter enzyme is commercially not available and was therefore produced and purified according to the literature.

Prior to the experiments related to pro-MTG-His<sub>6</sub> activation, the different proteases were assayed for activity in the standard activation buffer (which is the same buffer as used for storage of pure pro-MTG-His<sub>6</sub>). Casein was used as the substrate [26] and dissolved in the same buffer. The results are shown in Table 2.

As can be seen from Table 2 it was verified that all proteases except thrombin exhibit caseinolytic activity in the standard buffer. About 95% of all proteases are able to cleave α-casein [32].

For the screening for pro-MTG-His<sub>6</sub> activating proteases, purified pro-MTG-His<sub>6</sub> was used as the substrate. The time course of the activation reaction was measured between 4 min and 24 h as done previously for trypsin using the standard activity test and SDS-PAGE as described in Section 2. In Fig. 4A the complete time course of the activation of pro-MTG-His<sub>6</sub> by dispase I is shown. In Fig. 4B, the results for dispase, cathepsin B, and thrombin as well as for the non-commercial protease TAMEP (see below) are summarized. In Fig. 5, the results for chymotrypsin and proteinase K are summarized.

As a result, the commercially available proteolytic enzymes investigated can be classified into two groups:

Group I (Fig. 4): activating proteases without degradation of the target enzyme (cathepsin B, dispase I, and thrombin). Cathepsin B and thrombin show an apparent lower activation rate than dispase I. However, because of the high price only about 5% of caseinolytic activity was used in the case of cathepsin B (0.6 instead of 13 U<sub>cas</sub>/mL). Because of the lack of caseinolytic activity, for thrombin it was not possible to calculate comparable amounts.

**Table 2**

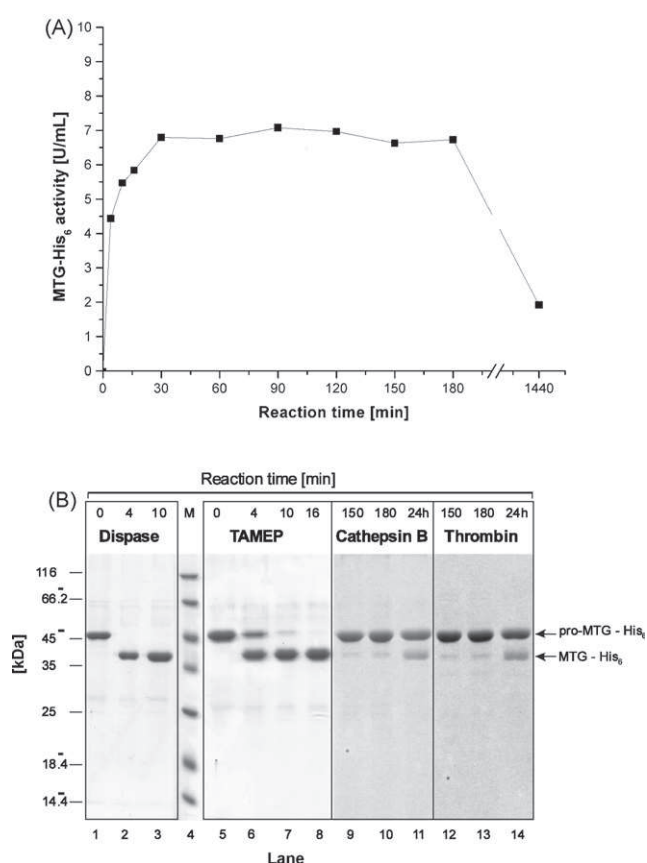
Activity of different proteases under the standard activation conditions [26]

Entry	Protease	Concentration <sup>a</sup>	Caseinolytic activity (U <sub>cas</sub> /mL)	Specific activity (U <sub>cas</sub> /mg)	Protease concentration used for pro-MTG-His <sub>6</sub> activation (U <sub>cas</sub> /mL)
1.	Cathepsin B	4.7 mg/mL	0.6	0.13	0.6
2.	Chymotrypsin	1 mg/mL	12.9	12.9	13
3.	Dispase I	18.4 mg/mL	202.4	11	13
4.	Proteinase K	18.9 mg/mL	380	20.1	2
5.	Thrombin	250 U/mL	0	0	–
6.	Trypsin	1 mg/mL	11.9	11.9	12
7.	TAMEP	Not detectable <sup>b</sup>	1.7	–	1.7

Substrate solution: Casein (10 mg/mL) was dissolved in 50 mM Tris/HCl buffer, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GSH, pH 8.0. Fifty microliters of a solution of the respective protease in the same buffer was added to 550 µL tempered substrate solution. The reaction was carried out at 37 °C for a defined period. One caseinolytic unit is defined as 1 extinction unit at 280 nm per min.

<sup>a</sup> Concentration according to the manufacturer.

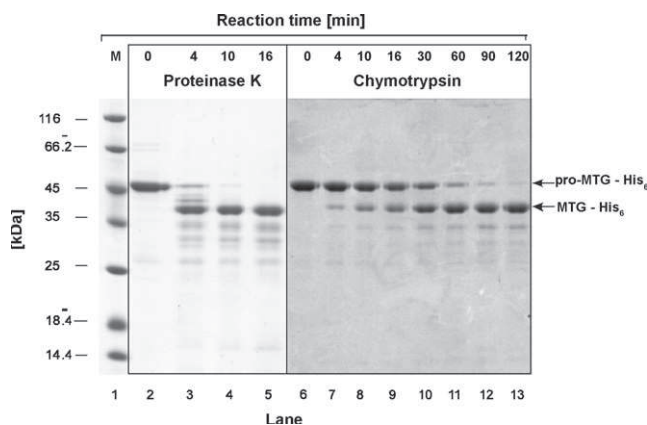
<sup>b</sup> The TAMEP concentration was too low.



**Fig. 4.** Proteases which activate and not degrade pro-MTG-His<sub>6</sub>. (A) Full time course of the activation by dispase and (B) parts of the activation patterns for dispase, TAMEP, cathepsin B, and thrombin after the indicated reaction times. For reaction conditions see legend of Fig. 3.

Group II (Fig. 5): activating proteases which show degradation of MTG-His<sub>6</sub> (chymotrypsin, and proteinase K). Trypsin also belongs to this group (Fig. 3).

For comparison, the commercially not available protease from *S. mobaraensis* (TAMEP) was investigated and shown to activate pro-MTG-His<sub>6</sub> without degradation (Fig. 4B) as shown previously [17]. Therefore this enzyme belongs to the group I proteases.



**Fig. 5.** Proteases which activate but degrade pro-MTG-His<sub>6</sub>. Parts of the activation patterns for chymotrypsin and proteinase K after the indicated reaction times. For other reaction conditions see legend of Fig. 3.

**Table 3** Comparison of some biochemical properties of dispase activated pure MTG-His<sub>6</sub> and own and literature data of wild-type MTG from *Streptomyces mobaraensis*

Reference	[6]	[27]	[33]	Own results	Own results	Own results
Type of MTG	Wild-type-MTG from <i>Streptomyces mobaraensis</i> S-8112	Isolated MTG from <i>Streptomyces mobaraensis</i>	MTG from <i>Streptoveriticium mobaraense</i> WSH Z-2	Activa WM	MTG from Activa WM after purification	TAMEP-activated FRAP-MTG-His <sub>6</sub>
Specific activity (U/mg)	22.6	25	5.2	6.2	7.6	23
T <sub>opt</sub> (°C)	60	50	50	50	50	50
Residual activity after 10 min incubation at 60 °C (%)	22.6	50	50	5	0	6
t <sub>1/2</sub> (60 °C) (min)	22.6	50	6	3	1.6	1.7
Reaction conditions	Standard hydroxamate activity assay according to Folk and Cole (10 min, pH 6.0) [23]					

Dispase and TAMEP activated MTG-His<sub>6</sub> did not lose activity for a period of at least 3 h. After elevated reaction times (24 h) the activity is reduced significantly, either because of thermal deactivation of MTG-His<sub>6</sub> or because of insterile conditions.

Group II proteases show a specific pattern of truncated transglutaminase in SDS-PAGE. Three distinct hydrolysis bands are found for chymotrypsin, four for trypsin, and at least four for proteinase K. For all proteases, the overall band intensity decreases with hydrolysis time, indicating that there is a further breakdown to small molecular weight peptides not visible on the SDS-PAGE. The activity of the transglutaminase is almost entirely depleted after elevated reaction times.

In conclusion, trypsin cannot be used to activate the pro-form of the recombinant, his-tagged microbial transglutaminase from *S. mobaraensis*. A distinct degradation pattern was found upon incubation with trypsin, as well as with chymotrypsin. Proteinase K also activates but degrades the pro-MTG-His<sub>6</sub> and should not be used for activation.

Cathepsin B and thrombin do activate the pro-MTG-His<sub>6</sub> but at a relatively low rate. The high concentrations potentially needed together with the high price would render their application uneconomic. However, it cannot be excluded that these proteases would also exhibit degradation when used at higher concentrations.

TAMEP can be used for activation, but it is not commercially available.

Dispase in its pure form is the only alternative, but is also rather too expensive for activating bulk quantities of pro-MTG.

### 3.5. Characterization of TAMEP activated MTG-His<sub>6</sub>

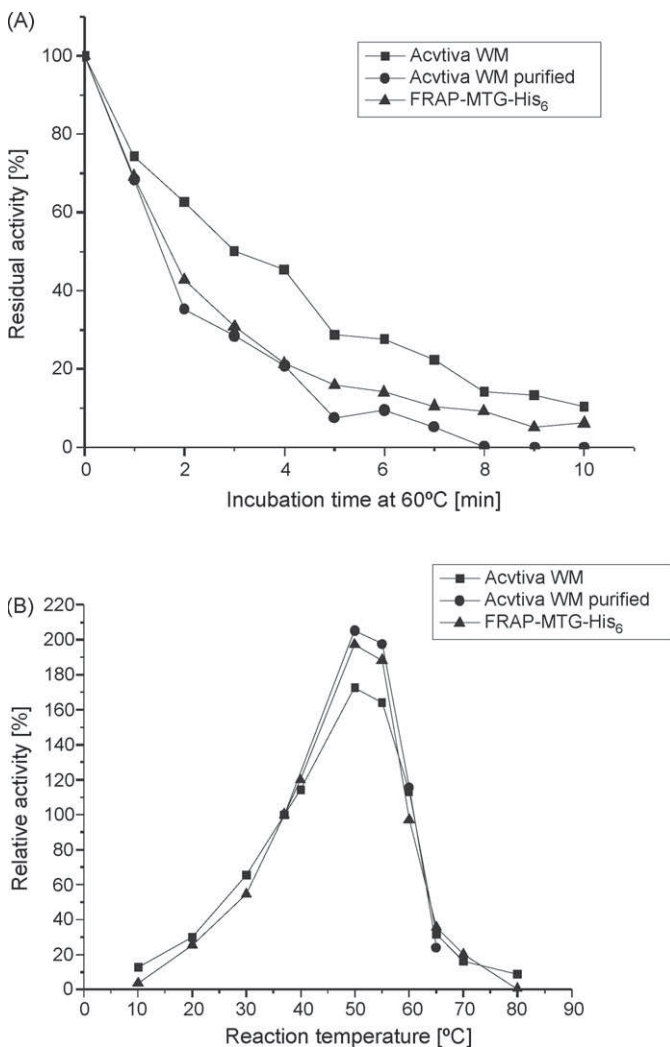
TAMEP activated MTG-His<sub>6</sub> was characterized as described in material and methods. Edman degradation of TAMEP activated and purified recombinant transglutaminase revealed a N-terminal sequence starting with "FRAP". This is identical to the sequence previously published for the TAMEP activated pro-transglutaminase from *S. mobaraensis* [17]. Obviously, in our TAMEP preparation SM-TAP, the second protease which is cleaving off the FRAP-residue in cultures of *S. mobaraensis*, was not present or active.

In Table 3, the kinetic and stability parameters of FRAP-MTG-His<sub>6</sub> are listed. For comparison, the table also contains literature data of the wild-type enzyme and data measured by ourselves for the wild-type enzyme under the same conditions as for the histidine-tagged recombinant enzyme. The temperature stability for the recombinant FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, for Activa WM and for purified MTG from Activa WM is shown in Fig. 6A and the temperature optimum in Fig. 6B, respectively.

The specific activity of the recombinant histidine-tagged transglutaminase purified from *E. coli* is comparable to the wild-type enzyme from *S. mobaraensis* S-8112 [6,27]. As can be seen from Fig. 6A, the inactivation curve at 60 °C is almost the same for the recombinant transglutaminase and the wild-type MTG purified from Activa WM. The reason for the apparent higher stability of the Activa WM (Table 3) is most probably the high content of maltodextrin (99%) present in the commercial enzyme preparation. As can be seen from Fig. 6B the optimal temperature is also identical for the three enzyme preparations. Obviously, neither the C-terminal fusion (histidine tag) nor the N-terminal fusion (FRAP-) present after proteolytic cleavage by TAMEP does affect the properties of the recombinant enzyme. While this is in agreement with the literature for the N-terminal fusion [17] this result is new for the C-terminal fusion which has not been published before. Using the C-terminal his-tag it is possible to purify both, either the inactive pro-enzyme before activation or the active enzyme after proteolysis by TAMEP.

## 4. Conclusions

For the production of large amounts of pure transglutaminase from *E. coli* it is in principle possible to use the his-tag provided by our FRAP-MTG-His<sub>6</sub> construct. Of the commercial enzymes investigated, only dispase completely activates the pro-MTG-His<sub>6</sub> without degradation as found, e.g. in the case of trypsin. Unfortunately, also dispase is much too expensive to be used for the activation of a food enzyme required in bulk quantities. As an alternative, TAMEP the endogenous protease from *S. mobaraensis* could also be used for the activation of the recombinant enzyme. However, this enzyme is not commercially available nor has it been cloned and expressed, so far. The production of MTG by co-expression of the SAM-P45 protease in *C. glutamicum* is obviously not industrially feasible, since (i) the productivity (approximately 9 U/L h) of the active MTG is relatively low and (ii) the SAM-P45 protease is degrading the target enzyme [22]. Furthermore, the enzyme secreted into the medium during *C. glutamicum* cultivation is necessarily relatively impure and may require further purification. To overcome the problems, optimiza-



**Fig. 6.** Characterization of the pure FRAP-MTG-His<sub>6</sub> and wild-type MTG. (A) Time dependence of the inactivation at 60 °C. Hundred-percentage relative activity of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, wild-type MTG (Activa WM), and purified wild-type MTG corresponds to 15, 7.4, and 4.5 U/mg, respectively. (B) Temperature optimum at standard assay conditions (hydroxamate assay, 10 min incubation). The respective specific activity at 37 °C was set to 100% (FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, wild-type MTG (Activa WM), and purified wild-type MTG corresponds to 6, 7, and 31 U/mg, respectively).

tion of the MTG sequence by mutating the protease cleavage sites recognized by trypsin or optimization of the N-terminal cleavage site for the recognition by a highly specific protease are possible.

As a consequence, today the proteolytic activation of bulk quantities of pro-transglutaminase remains an open task for industrial biotechnology.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [10.1016/j.enzmictec.2008.03.003](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.03.003).

## References

- [1] Ohtsuka T, Sawa A, Kawabata R, Nio N, Motoki M. Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines. *J Agric Food Chem* 2000;48:6230–3.
- [2] Chung SI. Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. *Ann NY Acad Sci* 1972;202:240–55.
- [3] Folk JE, Cole PW. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *J Biol Chem* 1966;241:5518–25.
- [4] Yasueda H, Nakanishi K, Kumazawa Y, Nagase K, Motoki M, Matsui H. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1995;232:411–9.
- [5] Duran R, Junqua M, Schmitter JM, Gancet C, Goulas P. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamoneum* CBS 683.68. *Biochimie* 1998;80:313–9.
- [6] Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem* 1989;53:2613–7.
- [7] Kobayashi K, Kumazawa Y, Miwa K, Yamanaka S. Epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1996;144:157–60.
- [8] T Schäfer, L Bech, T Halkier, JT Andersen, IA Noerrevang, G Rasmussen. Microbial transglutaminases, their production, gene cloning and sequence and use for protein crosslinking. 2001; US6190879, DK.
- [9] de Jong GA, Koppelman SJ. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *J Food Sci* 2002;67:2798–806.
- [10] Zheng M. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovorticillium mobaraense*. *Enzyme Microb Technol* 2002;31:477–81.
- [11] Marx C, Hertel T, Pietzsch M. Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1543–50.
- [12] McDonagh J, McDonagh RP. Alternative pathways for the activation of factor XIII. *Br J Haematol* 1975;30:465–77.
- [13] Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol* 1989;93:287–90.
- [14] Martinet N, Kim HC, Girard JE, Nigra TP, Strong DH, Chung SI, et al. Epidermal and hair follicle transglutaminases. Partial characterization of soluble enzymes in newborn mouse skin. *J Biol Chem* 1988;263:4236–41.
- [15] Kim HC, Lewis MS, Gorman JJ, Park SC, Girard JE, Folk JE, et al. Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem* 1990;265:21971–8.
- [16] Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, Robenek IR, Wolf S, Fuchsbauer HL. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*—purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem* 1998;257:570–6.
- [17] Zotzel J, Keller P, Fuchsbauer HL. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *Eur J Biochem* 2003;270:3214–22.
- [18] Taguchi S, Arakawa K, Yokoyama K, Takehana S, Takagi H, Momose H. Overexpression and purification of microbial pro-transglutaminase from *Streptomyces cinnamoneum* and in vitro processing by *Streptomyces albogriseolus* proteases. *J Biosci Bioeng* 2002;94:478–81.
- [19] Zotzel J, Pasternack R, Pelzer C, Ziegert D, Mainusch M, Fuchsbauer HL. Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *Eur J Biochem* 2003;270:4149–55.
- [20] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase. *J Biotechnol* 2004;110:219–26.
- [21] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y. Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:3011–4.
- [22] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H. Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:358–66.
- [23] Folk JE, Cole PW. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochim Biophys Acta* 1966;122:244–64.
- [24] Schwert GW, Takenaka Y. Spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1955;16:570–5.
- [25] Bajorath J, Hinrichs W, Saenger W. The enzymic activity of proteinase K is controlled by calcium. *Eur J Biochem* 1988;176:441–7.
- [26] Quiroga E, Priolo N, Marchese J, Barberis S. Behavior of araujiain, a new cysteine phytoprotease, in organic media with low water content. *Electron J Biotechnol* 2006;9:18–25.
- [27] Umezawa Y, Ohtsuka T, Yokoyama K, Nio N. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces* sp. *Food Sci Technol Res* 2002;8:113–8.
- [28] Lu S, Zhou N, Tian Y, Li H, Chen J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Food Biochem* 2002;27:109–25.
- [29] Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 1959;31:426–8.
- [30] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [31] Pace CN, Schmid FX. How to determine the molar absorption coefficient of a protein. Oxford: IRL Press; 1997.
- [32] Kim JH, Shin HJ, Cho H, Kwak SM, Cho H, Kim TS, et al. A microfluidic protease activity assay based on the detection of fluorescence polarization. *Anal Chim Acta* 2006;577:171–7.
- [33] Lu S, Zhou N, Tian Y, Li H, Chen J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Food Biochem* 2003;27:109–25.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

## Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants

Christian K. Marx, Thomas C. Hertel, Markus Pietzsch\*

Department of Downstream Processing, Faculty of Natural Sciences I, Institute of Pharmacy,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06099 Halle (Saale), Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 January 2008

Received in revised form 9 June 2008

Accepted 17 June 2008

## Keywords:

Random mutagenesis

Recombinant microbial transglutaminase

pro-MTG-His<sub>6</sub>*Streptomyces mobaraensis*

High throughput screening

Thermostability

## ABSTRACT

Recombinant microbial transglutaminase (rMTG), an enzyme useful for the cross-linking or the posttranslational modification of (therapeutic) proteins, was optimized by random mutagenesis for the first time. A screening method was developed which, in addition to state-of-the-art procedures, includes a proteolytic activation step of the expressed soluble pro-enzyme. The library of 5,500 clones was screened for variants with increased thermostability and heat-sensitivity, respectively. Mutant enzymes were overproduced, isolated and characterized. After just one round of mutagenesis, nine variants with a single amino acid exchange showed a remarkably increased thermostability at 60 °C. The exchange of a serine residue close to the N-terminus against proline resulted in an rMTG mutant (S2P) with 270% increased half-life. Seven variants exhibited an increased heat-sensitivity at 60 °C of which one mutant (G25S) retained its specific activity between 10 and 40 °C. The mutations responsible for the increased thermostability and the heat-sensitivity were identified and assigned to the three-dimensional (3D) structure. All single point mutations related to changed thermal properties of rMTG are located in the N-terminal domain (i.e. the left side wall of the active site cleft of the front view of the MTG as defined by the literature [Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., Suzuki, E., 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* 277, 44252–44260] showing the importance of this part of the protein.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Transglutaminases (protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TG) are enzymes that catalyze an acyl transfer reaction between a  $\gamma$ -carboxamide group of a glutamine residue of a peptide and the  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue.

In the food industry, microbial TG from *Streptomyces mobaraensis* (MTG) is widely used, e.g., for the cross-linking of proteins in meat and fish and to support gelling of yogurt and cheese (De Jong and Koppelman, 2002). Other potential applications are the site-directed covalent modification of therapeutic proteins, e.g., the PEGylation of recombinant human interleukin 2 (Sato, 2002) and the production of protein-based materials, for example, films (Mariniello and Porta, 2005).

*In vivo*, toxic enzymes as, e.g., the protein cross-linking transglutaminase are usually produced as inactive pro-enzymes. For any application of the respective enzyme, activation by proteolytic cleavage of the pro-sequence is required.

For some applications of MTG, it would be advantageous to carry out the cross-linking reaction at a higher temperature and with increased activity. For this purpose, a thermostable transglutaminase is required. On the other hand, for food processing, the application of enzymes at low temperatures provides various benefits, including lower energy requirements, protection of substrates and products from degradation and inactivation of the modifying enzyme by a mild increase of the temperature (Hatti-Kaul et al., 2006). For this purpose, a heat-sensitive MTG with retained activity at low temperatures is desired.

Several enzymes belonging to different enzyme classes have been successfully optimized with regard to thermostability (Eijssink et al., 2005).

In recent years, microtiter plates have been successfully used as “minibioreactors” for growth of clonal libraries in *Escherichia coli* (Kumar et al., 2004). A consistent growth and expression is necessary to minimize well-to-well variations of the enzyme level. Small variations of the initial biomass may lead to different growth behaviour, making it difficult to fix the optimal time for induction. By using an auto-induction medium, cells are not induced at the same time, but at the same phase of growth (Studier, 2005), thus compensating for deviations of the initial biomass. Recently,

\* Corresponding author. Tel.: +49 345 55 25 949; fax: +49 345 55 27 260.  
E-mail address: [markus.pietzsch@pharmazie.uni-halle.de](mailto:markus.pietzsch@pharmazie.uni-halle.de) (M. Pietzsch).

a pro-MTG carrying a histidine tag (pro-MTG-His<sub>6</sub>) was overproduced in soluble form in *E. coli* for the first time (Marx et al., 2007). This, together with the application of a suitable activating protease (Marx et al., 2008) was the basis for the development of a microtiter plate based screening method of MTG variants produced by random mutagenesis. The aim of the present work was to provide new transglutaminases with increased thermostability or increased heat-sensitivity.

## 2. Material and methods

### 2.1. General

Unless otherwise stated, all chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen). The protein marker (Protein Molecular Weight Marker) used for SDS-PAGE was purchased from Fermentas (St. Leon-Rot). Material and equipment (Äkta Purifier 100) for chromatography was purchased from GE Healthcare (Freiburg). The following commercial enzymes were used: Lysozyme (order no. 8259.2, lot no. 2357473, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), benzonase (order no. 1.01695.0001, lot no. K35986795 617, Merck KGaA, Darmstadt). Deionized water was used throughout the experiments.

### 2.2. Bacterial strains

*E. coli* BL21Gold(DE3) was purchased from Stratagene (Amsterdam, The Netherlands).

### 2.3. Random mutagenesis of MTG

Random mutagenesis of the MTG gene was carried out using the GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturers manual (Stratagene, 2005). Five hundred nanograms template DNA (MTG gene in plasmid pDJ1-3 (Marx et al., 2007), GenBank™ accession number: EU301664) were applied in the error-prone PCR reaction, the annealing temperature was 60 °C and the cycle number was 25 (Whatman Biometra Thermocycler, Göttingen). The PCR primers were derived from sequences at the beginning and at the end of the MTG gene without pro-sequence (forward-primer: 5'-GACTCCGACGACAGGGTACC-3', Reverse-Primer: 5'-GAGCGGCCAGCCCTGCTTTAC-3'). The PCR product was purified using the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). For the EZClone reaction, 50 ng template plasmid pDJ1-3 and 250 ng of mutated MTG gene as megaprimer were used. After digestion with DpnI, the resulting plasmids containing the mutated MTG gene were transformed into *E. coli* BL21Gold(DE3) (Stratagene) using electroporation as described previously (Marx et al., 2007). The transformed cells were plated on 30 agar plates (LB ampicillin, LB<sub>amp</sub>) with approximately 200 colonies each. Sequencing was carried out by MWG-Biotech AG (Ebersberg).

### 2.4. Cultivation in microtiter plates and expression of pro-MTG-His<sub>6</sub> and its mutants

Deepwell microtiter plates (MTP, no. 0030502.310, Eppendorf) were filled with 500 µl LB<sub>amp</sub> medium (10 g l<sup>-1</sup> tryptone/peptone, 10 g l<sup>-1</sup> NaCl, 5 g l<sup>-1</sup> yeast extract, pH 7.5, 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin) per well. Each well was inoculated with a single colony of transformed *E. coli* cells using a sterile toothpick. The MTP was sealed with two different sterile foils, first with BreathSeal (no. 676050, Greiner Bio-One, Solingen), then additionally with gas permeable adhesive seal (no. AB-0718, Abgene Germany, Hamburg). A combination of two foils was previously shown to be a good compromise

between low water evaporation and good growth of bacterial cultures (Börner et al., 2007). The MTP were incubated in a shaking incubator (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Edison, USA) at 400 rpm, 37 °C and 2.5 cm shaking radius for 16–18 h. For protein expression, 20 µl of the culture were used to inoculate a new deep-well MTP, containing 480 µl auto-induction medium according to Studier (Studier, 2005). This MTP was sealed as described above and incubated in a shaking incubator (Multitron, Infors HT, Bottmingen, Switzerland) at 300 rpm, 28 °C and 5 cm shaking radius for 24 h, followed by centrifugation (4000 rpm, 20 min. Centrifuge 5403, Eppendorf). The MTP containing the pellet was stored at –80 °C until cell lysis.

### 2.5. Cell lysis and activation of pro-MTG-His<sub>6</sub> and its mutants with dispase

To lyse the cells, 300 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl-buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0, 1 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme, and 10 U ml<sup>-1</sup> benzonase) were added per well and the pellet was resuspended. The MTP was sealed (sealing mat, order no. 0030 127.579, Eppendorf) and incubated at 650 rpm and 37 °C for 1 h in a thermomixer (Eppendorf). The cell debris was sedimented by centrifugation at 4000 rpm and 180 µl of the supernatant were transferred to a new MTP (no. 267245, Nunc). The pro-rMTG was activated with 20 µl dispase (final concentration: 1 U ml<sup>-1</sup>, no. 354235, BD Biosciences, Heidelberg) at 37 °C for 20 min in a thermomixer.

### 2.6. Activity test of FRAP-MTG-His<sub>6</sub> and its mutants in MTP

The activity of rMTG was assayed according to the colorimetric hydroxamate procedure (Folk and Cole, 1966) and was adapted to MTP format. To 50 µl of enzyme solution 90 µl substrate solution (final concentrations: 0.2 M Tris-HCl-buffer, 100 mM hydroxylamine, 10 mM reduced glutathione, 30 mM Z-Gln-Gly, pH 6.0) were added. After incubation at 37 °C for 10 min in a thermomixer, the reaction was stopped with 160 µl reagent A (1 vol. 3 M HCl, 1 vol. 12% trichloroacetic acid, 1 vol. 5% FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (in 0.1 M HCl)). An aliquot of 200 µl was transferred to a transparent MTP (no. 701304, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) and the extinction was measured at 525 nm using a microtiter plate reader (FluoStar, BMG Labtech GmbH, Offenburg). One unit of TG activity is defined as the formation of 1 µmol L-glutamic acid γ-monohydroxamate per min at 37 °C. The coefficient of variation (CV) in the screening validation experiment was calculated by  $CV = \text{standard deviation} / \text{mean} \times 100\%$ .  $\text{Standard deviation} = \sqrt{\sum (x - \text{mean})^2 / (n - 1)}$  (Salazar and Sun, 2003).

### 2.7. Screening for thermostable FRAP-MTG-His<sub>6</sub> variants

To screen for thermostable variants of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, one 96-well MTP containing 50 µl of the activated cell supernatant was sealed with a sealing mat (order no. 276002, Nunc) and incubated at 55 °C using a water bath. After 30 min, the MTP was cooled down in another water bath to 20 °C, and afterwards the enzyme activity was determined. Mutants with high residual activity were selected and used to inoculate another microtiter plate and assayed for activity with and without pre-incubation at 55 °C. The ratio between the activities with pre-incubation to the one without pre-incubation was used to identify the best mutants.

### 2.8. Screening for heat-sensitive FRAP-MTG-His<sub>6</sub> variants

To screen for heat-sensitive variants of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>, 50 µl of the activated cell supernatant were assayed using the stan-



**Table 1**DNA and amino acid substitutions in FRAP-MTG-His<sub>6</sub> mutants obtained by random mutagenesis and identified in a screening for increased thermostability at 55 °C

Mutant ID	Base	Base substitution	Position in codon	Amino acid	Amino acid substitution
CM201	72	T → A	1	24	Tyr → Asn
	933	G → A	3	311	Silent
CM203	4	T → C	1	2	Ser → Pro
CM205	68	C → T	2	23	Ser → Leu
CM211	769	G → A	1	257	Gly → Ser
CM213	280	C → T	1	94	Silent
	519	G → A	3	173	Silent
	805	A → G	1	269	Lys → Glu
CM224	865	C → T	1	289	His → Tyr
CM227	551	A → G	2	184	Asn → Ser
	881	A → T	2	294	Lys → Met

standard enzyme assay at 10 °C for 10 min. Clones were selected according to the following rules: (i) higher activity at 10 °C compared to other clones on the same plate and (ii) equal or slightly increased activity at 10 °C and, simultaneously, almost no activity after incubation at 55 °C. The expression was repeated in a second MTP and the confirmed clones were sequenced.

### 2.9. Expression and purification of selected FRAP-MTG-His<sub>6</sub> variants

Expression and purification of selected variants was carried out as described for rMTG (Marx et al., 2008). Cultivation was carried out using the auto-induction medium and activation by TAMEP.

### 2.10. Characterization of selected FRAP-MTG-His<sub>6</sub> variants

To determine the rate of inactivation at 60 °C, the isolated enzymes (30 µl each, using 10 parallel samples) were incubated in a PCR tube in a PCR thermocycler (Whatman) at 60 °C for 1–10 min. After 10 min the samples were cooled on ice. The activity was measured at 37 °C using the standard assay with 140 µl pre-incubated substrate solution, starting with 10 µl enzyme solution, and stopping with 150 µl reagent A. The half-life ( $t_{1/2}$  (60 °C)) was calculated using exponential fitting of the data points (Miyazaki et al., 2006). To determine the specific activity at different temperatures, enzyme samples were diluted to 5 U ml<sup>-1</sup>, followed by the standard assay at different temperatures (10, 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70, and 80 °C).

One enzyme variant (CM203 (S2P), see Table 1) was prepared according to the manufacturer's manual (Seqlab, 2007) and sent to Seqlab (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen) for sequencing.

## 3. Results

Only recently, a recombinant pro-transglutaminase was successfully expressed in high-levels in soluble form in *E. coli* (Marx et al., 2007). The pro-enzyme was proteolytically activated to yield FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (microbial transglutaminase carrying a N-terminal FRAP-appendix and a C-terminal hexa-histidine-tag, respectively, also called rMTG in the present paper), purified and partially characterized (Marx et al., 2008). Now, we report on the random mutagenesis and screening for thermostable and heat-sensitive variants of this enzyme.

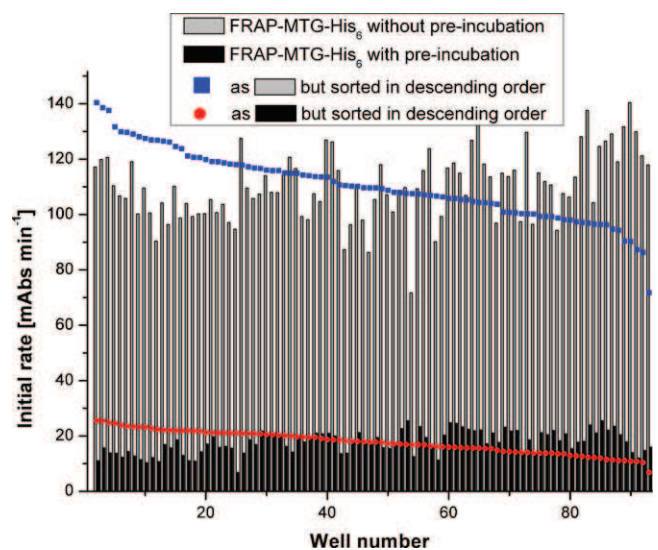
### 3.1. Design and validation of the screening protocol: expression, activation, and activity assay of FRAP-MTG-His<sub>6</sub> in microtiter plates

In order to verify that the standard deviation of the activity assay is in a suitable range, each well of a 96-well microtiter plate (MTP) was inoculated with *E. coli* BL21 pDJ1-3 producing the recombinant pro-rMTG and the complete screening procedure was carried out as described in experimental procedures. The final MTP was assayed both with and without pre-incubation at 55 °C (Fig. 1).

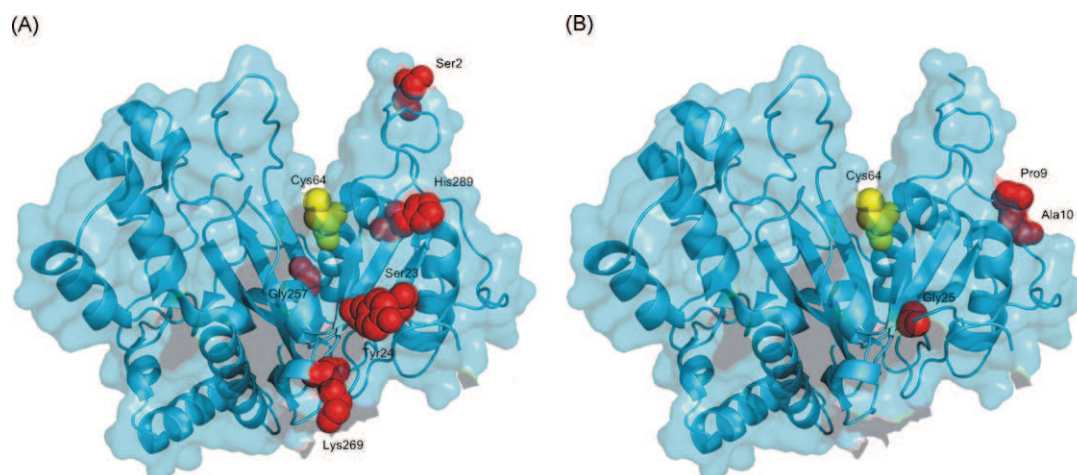
The coefficient of variation of the experiments with and without pre-incubation at 55 °C was calculated to be 11 and 23%, respectively. As a result, the coefficient of variation (Salazar and Sun, 2003) was low enough to identify mutants with increased thermal stability even though an additional activation step of the pro-rMTG had to be introduced to the screening.

### 3.2. Construction of the mutant library and estimation of the mutation rate

The mutant library was constructed using a commercial mutagenesis kit as described in the experimental procedures and



**Fig. 1.** Evaluation of the screening method. Enzyme activities of the rMTG are plotted vs. well positions (columns) and in descending order (squares and dots). Light columns and blue squares: Assay without pre-incubation at 55 °C. The coefficient of variation is 11%. Dark columns and red dots: assay with pre-incubation at 55 °C. The coefficient of variation is 23%. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



**Fig. 2.** Identification of hot spots for (A) thermostability and (B) heat-sensitivity. Crystal structure of MTG from *Streptomyces mobaraensis* (PDB 1iu4) (Kashiwagi et al., 2002). Exchanged amino acids are marked in space fill view (red colour). The Cys64 in the active site cleft is also depicted (yellow colour, not mutated). The original figure given by Kashiwagi et al. was turned by 180°, to show the amino acid substitutions, which otherwise would be located on the back side. The figures were produced using Polyview-3D (<http://polyview.cchmc.org/polyview3d.html>). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

assayed for activity. About 20% of the mutants showed no activity and six randomly selected clones were sequenced. Of these six clones, one had no base pair exchange, three had one exchange, one had two exchanges, and one had three exchanges. This result confirmed that the mutation rate was between one and two base pairs as desired. After this verification, further cells were transformed with the mutant library plasmids and about 5500 clones were investigated in the screening.

### 3.3. Screening for thermostable variants of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>

The clones produced by random mutagenesis were screened for increased thermostability. Of the 5500 initially screened clones, 70 showed a higher residual activity. These positive clones were selected and re-investigated in a second round. Nine clones with the highest ratio of residual to initial activity were selected and sequenced.

### 3.4. Identification of mutagenesis hot spots for thermostability

Of the nine selected clones, one showed two and eight showed one amino acid exchange. The results for the unique clones are summarized in Table 1. One mutation (S2P) was found to be located in the forward primer region at position 2, which can occur during the polymerization of the reverse strand. Fig. 2A shows the three-dimensional structure of the MTG as determined by Kashiwagi et al. (2002). The positions of single amino acid substitutions that lead to higher thermostability are indicated, as well as the Cys64 at the active site.

### 3.5. Partial characterization of selected thermostable FRAP-MTG-His<sub>6</sub> variants

The thermostable mutants showing unique double or single amino acid exchanges were expressed in shaking flasks, purified using affinity chromatography and characterized partially. After purification, the respective enzyme solutions were checked by SDS-PAGE and proven to be electrophoretically pure. All mutants investigated showed an increased residual activity after 10 min of pre-incubation at 60 °C and a higher half-life at 60 °C ( $t_{1/2}$  (60 °C), Table 2). Of the six mutants with one single amino acid exchange, S2P, Y24N, and H289Y showed the highest increase in residual activity after pre-incubation at 60 °C and in half-life. In Fig. 3, the inactivation curves of these mutants are shown in comparison to the non-mutated FRAP-MTG-His<sub>6</sub>.

For the variant S2P,  $t_{1/2}$  (60 °C) was increased by 270% after just one round of random mutagenesis and screening. For this variant, the temperature optimum was slightly shifted from 50 to 55 °C. This enzyme variant was purified and the N-terminal protein sequence was determined to be “FRAPDP”, confirming (i) the mutation at the second amino acid position of the primary sequence of the MTG and (ii) that the endogenous protease from *S. mobaraensis* (TAMEP) cleaves both the mutant and the original enzyme at the same position.

### 3.6. Screening for heat-sensitive variants of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>

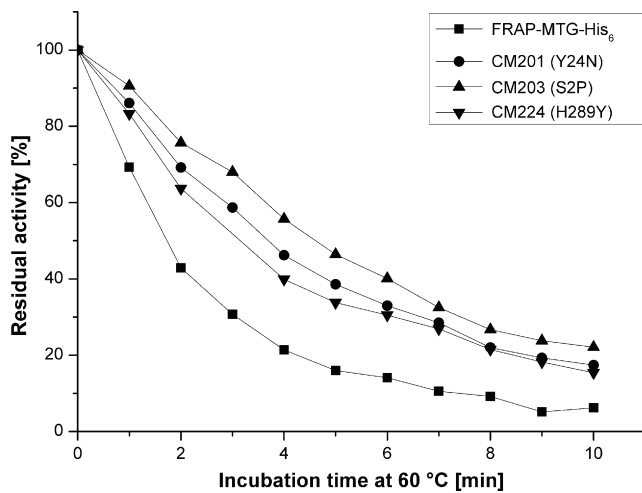
In order to screen for heat-sensitive enzymes with retained activity at low temperatures, after growth, induction, lysis, and activation, the activity was determined by the standard enzyme assay for 10 min at 10 °C. Of the 5500 initially screened clones, 109 showed a slightly higher activity at 10 °C when com-

**Table 2**

Comparison of some biochemical properties of TAMEP-activated FRAP-MTG-His<sub>6</sub> (rMTG), and thermostable variants with single amino acid exchanges

Type of MTG	rMTG (Marx et al., 2008)	CM201	CM203	CM224	CM205	CM211	CM213
Mutation		Y24N	S2P	H289Y	S23L	G257S	K269E
$T_{opt}$ (°C)	50	50	55	50	50	50	50
Residual activity after 10 min incubation at 60 °C (%)	6	17	22	15	13	19	11
$t_{1/2}$ (60 °C) (min)	1.7	3.8	4.6	3.4	2.8	2.3	2.6
Relative increase in $t_{1/2}$ (60 °C) (%)		220	270	200	165	135	150

Standard hydroxamate activity assay according to Folk and Cole (10 min, pH 6.0) (Folk and Cole, 1966).  $t_{1/2}$  (60 °C) is the time after which 50% of the enzyme activity are deactivated after an incubation at 60 °C.



**Fig. 3.** Thermostability of selected thermostable variants: thermostability of FRAP-MTG-His<sub>6</sub> and three selected FRAP-MTG-His<sub>6</sub> mutants (CM201, CM203 and CM224), 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 min incubation at 60 °C, followed by the standard hydroxamate assay (Folk and Cole, 1966). The standard deviation up to 60 °C is below 6% and between 7 and 11% at elevated temperatures.

pared to the other clones on the same plate. These clones were used to inoculate two new deepwell plates to confirm the results of the initial screening. Simultaneously, these clones were investigated for activity after pre-incubation at 55 °C for 30 min.

Eight mutants with a retained activity at 10 °C and no residual activity after pre-incubation at 55 °C were selected and sequenced. Two clones had the same single amino acid exchange, while different nucleotide exchanges. The identified base and amino acid substitutions are summarized in Table 3. Of the remaining seven clones, three had one amino acid exchange, three had two amino acid exchanges, and one had three amino acid exchanges.

Fig. 2B shows the three-dimensional structure of the MTG as determined by Kashiwagi et al. (2002). The positions of single amino acid substitutions that lead to heat-sensitive variants are indicated, as well as the Cys64 at the active site.

**Table 3**  
DNA and amino acid substitutions in FRAP-MTG-His<sub>6</sub> obtained by random mutagenesis and screening for heat sensitivity

Mutant ID	Base	Base substitution	Position in codon	Amino acid	Amino acid substitution
CM207	73	G → A	1	25	Gly → Ser
CM208	73	G → A	1	25	Gly → Ser
	765	A → G	3	255	Silent
CM215	26	C → T	2	9	Pro → Leu
CM216	73	G → A	1	25	Gly → Ser
	370	C → A	1	124	Gln → Lys
CM217	35	C → A	2	12	Pro → Gln
	38	T → C	2	13	Leu → Pro
	474	C → T	3	158	Silent
	641	A → T	2	214	Lys → Met
CM218	73	G → T	1	25	Gly → Cys
	837	C → T	3	279	Silent
	850	A → G	1	284	Ser → Gly
CM219	103	A → T	1	35	Ile → Leu
	623	G → A	2	208	Arg → Gln
CM225	28	G → A	1	10	Ala → Thr
	411	G → T	3	137	Silent

### 3.7. Partial characterization of heat-sensitive variants of FRAP-MTG-His<sub>6</sub>

The three heat-sensitive mutants were produced and characterized partially. In Fig. 4 the activity profiles of the three mutants are compared with the unmodified FRAP-MTG-His<sub>6</sub>. One variant (G25S) showed a comparable specific activity to that of the unmodified FRAP-MTG-His<sub>6</sub> at temperatures up to 40 °C, but a significantly reduced activity at 50 °C and above (Fig. 4A). The variant A10T showed a comparable activity profile but an overall reduced specific activity. The inactivation curves of the two variants at 60 °C are almost identical (Fig. 4B) and show a remarkably reduced thermostability when compared to the original enzyme. The third variant (P9L) shows a similar behaviour as mutant A10T at temperatures up to 40 °C and the same specific activity at 50 °C as mutant G25S, but retains a higher activity at 55 °C than the other two variants. The inactivation rate at 60 °C is lower than for the two other mutants but higher than for rMTG.

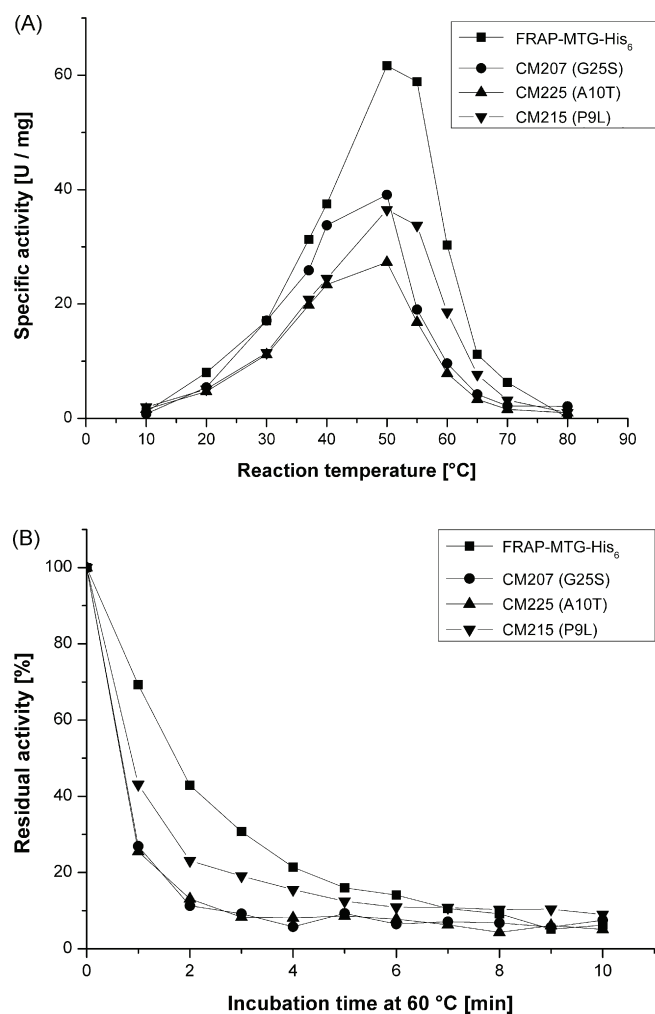
## 4. Discussion

In this paper, we describe the random mutagenesis of a microbial transglutaminase in order to arrive at both an increased thermostability and increased heat-sensitivity. The heat-sensitive mutants were additionally selected for retained activity at low to medium temperatures.

The random mutagenesis was performed only on the part of the gene of the recombinant transglutaminase which is coding for the active enzyme while the pro-region was not altered. This resulted in a mutant library of ~5500 individual clones. Sequencing of six randomly picked clones showed that mutation frequencies lie between 1 and 3 base pair substitutions per mutant. Furthermore, the mutations were scattered throughout the gene.

The mutant library was transformed into *E. coli* strain BL21Gold(DE3) and screened for improved properties.

The amino acid exchanges found in the mutant enzymes were assigned to the 3D-structure of the microbial transglutaminase from *S. mobaraensis* (Kashiwagi et al., 2002) in order to identify hot spots responsible for thermostability (Fig. 2). According to Kashiwagi et al., wt *S. m.* MTG adopts a disk-like shape and belongs to the  $\alpha + \beta$  folding class of proteins. The secondary structure is composed of 11  $\alpha$ -helices and 8  $\beta$ -strands. The active site is composed by a



**Fig. 4.** Specific activity and thermal inactivation of selected heat-sensitive variants. (A) Specific activity at different temperatures of FRAP-MTG-His<sub>6</sub> and three FRAP-MTG-His<sub>6</sub> mutants (CM207, CM215 and CM225). The substrate solution was pre-incubated for 2 min at the respective temperature, followed by the hydroxamate assay for 10 min at 10, 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70 and 80 °C. (B) Thermal inactivation of FRAP-MTG-His<sub>6</sub> and the three FRAP-MTG-His<sub>6</sub> mutants. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 min incubation at 60 °C, followed by the standard hydroxamate assay (Folk and Cole, 1966). The standard deviation was between 1 and 7%.

catalytic triad (C64, D255 and H274) with C64 as the reaction center forming the acyl-enzyme-complex. D255 and H274 are located in the  $\beta_5$  and  $\beta_6$  strands, respectively. The N-terminal region is linked to  $\beta_1$  and interacts with a loop between the  $\beta_6$  and  $\beta_7$  strands.

It was shown previously, that the N-terminal FRAP-tag does not affect the thermostability nor the specific activity of the transglutaminase variant (Zotzel et al., 2003; Marx et al., 2008).

All single point mutations leading to altered thermal properties of rMTG are located in the N-terminal domain (i.e. the left side wall of the front view of the MTG as defined by the literature (Kashiwagi et al., 2002)) or the bottom of the active site cleft.

#### 4.1. Mutants with increased thermostability: Hot spots and characterization

The mutation S2P close to the N-terminus obviously contributes a stabilization of the interactions to the  $\beta_6$  and  $\beta_7$  strands. The respective N-terminal region (DSDDR-) of the wt *S. m.* MTG was reported to be very important for the activity of the enzyme (Shimba et al., 2002). Three substitutions of Ser2 (S2R, S2D and

S2Y) were introduced by site-directed mutagenesis and shown to result in slightly higher specific activities. Also, a stepwise deletion or exchange of the first three N-terminal amino acids resulted in increased activities. Unfortunately, the thermal properties of these enzymes were not reported.

The mutations S23L and Y24N found in the present work both are located close to the N-terminal region of the first  $\beta$ -stand ( $\beta_1$ ) ranging from position 26–30. In addition, a mutation in position 25 (G25S) leading to increased heat-sensitivity was detected (see below).

The mutation G257S is located in the  $\beta_5$  strand and therefore in direct vicinity of the residue D255 which belongs to the catalytic triad of the enzyme. A substitution of a positive charge by a negative in mutant K269E is also resulting in an increased thermostability. This residue is located close to the N-terminus of the  $\beta_6$  strand. Both residues are located in or in direct vicinity of the secondary structure elements which contain the two amino acids of the catalytic triad (D255 is located in  $\beta_5$  and H274 in  $\beta_6$ , respectively).

#### 4.2. Mutants with increased heat-sensitivity: hot spots and characterization

All mutations based on single amino acid exchanges (P9L, A10T and G25S) leading to increased heat-sensitivity are located in the N-terminal part. The mutation G25S is located in direct vicinity of the N-terminal region of the first  $\beta$ -stand ( $\beta_1$ ) ranging from position 26–30 and in the same hot spot as S23 and Y24 (see above). The G25S mutant is as active as the wild-type enzyme at temperatures below 40 °C and can be faster inactivated at lower temperatures. This behaviour is useful in feed and food technology processes where the enzyme should be inactivated, but high temperatures should be omitted (Hatti-Kaul et al., 2006).

In this paper, a screening method was applied to a randomly mutated pro-transglutaminase for the first time. Despite proteolytic activation had to be introduced as an additional step, several optimized variants could be identified. After just one round of mutagenesis and screening, transglutaminase variants exhibiting a significantly increased thermostability and heat-sensitive variants were discovered. The N-terminal domain is a preferred target for mutations altering the thermal properties. Now, a number of optimized transglutaminase variants useful for different applications, as well as a transglutaminase clone library of ~5500 mutants, and a high throughput screening method are available.

#### References

- Börner, J., Buchinger, S., Schomburg, D., 2007. A high-throughput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 367, 143–151.
- De Jong, G.A., Koppelman, S.J., 2002. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *J. Food Sci.* 67, 2798–2806.
- Eijsink, V.G.H., Gaseidnes, S., Borchert, T.V., Van Den Burg, B., 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* 22, 21–30.
- Folk, J.E., Cole, P.W., 1966. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochim. Biophys. Acta* 122, 244–264.
- Hatti-Kaul, R., Birgisson, H.O., Mattiasson, B., 2006. Cold active enzymes in food processing. *Food Sci. Technol. (Boca Raton, FL, United States)* 148, 1631–1653.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., Suzuki, E., 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* 277, 44252–44260.
- Kumar, S., Wittmann, C., Heinzle, E., 2004. Minibioreactors. *Biotechnol. Lett.* 26, 1–10.
- Mariniello, L., Porta, R., 2005. Transglutaminases as biotechnological tools. *Prog. Exp. Tumor Res.* 38, 174–191.
- Marx, C.K., Hertel, T.C., Pietzsch, M., 2007. Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1543–1550.
- Marx, C.K., Hertel, T.C., Pietzsch, M., 2008. Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E.*

- coli* and characterization of the active enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 568–575.
- Miyazaki, K., Takenouchi, M., Kondo, H., Noro, N., Suzuki, M., Tsuda, S., 2006. Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution. *J. Biol. Chem.* 281, 10236–10242.
- Salazar, O., Sun, L., 2003. Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. *Methods Mol. Biol.* 230, 85–97.
- Sato, H., 2002. Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 487–504.
- Seqlab, 2007. Preparation of samples for N-terminal protein sequencing. Manufacturer's Manual, [www.seqlab.de](http://www.seqlab.de).
- Shimba, N., Shinohara, M., Yokoyama, K., Kashiwagi, T., Ishikawa, K., Ejima, D., Suzuki, E., 2002. Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site. *FEBS Lett.* 517, 175–179.
- Stratagene, 2005. GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit. Manufacturer's Manual.
- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41, 207–234.
- Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M., Fuchsbauer, H.L., 2003. Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *Eur. J. Biochem.* 270, 4149–4155.