

**" Mutagenese der (R)-Benzylsuccinat-Synthase: Erweiterung des
Substratspektrums und Verbesserung der Enzymaktivität"**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Ammar Alhaj Zein
aus Hama, Syrien

Marburg/Lahn, 2024

Die Untersuchungen zur vorgelegten Arbeit wurden von Oktober 2018 – September 2022 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Heider angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
(Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am _____.

Erstgutachter: Prof. Dr. Johann Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars Oliver Essen

Tag der Disputation: _____

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 KOHLENWASSERSTOFFE	5
1.2 ABBAUWEGE VON AROMATISCHEN KOHLENWASSERSTOFFEN	6
1.2.1 <i>Abbau unter aerobe Bedingungen</i>	6
1.2.2 <i>Abbau unter anaeroben Bedingungen</i>	8
1.2.3 <i>Fumarat-Addition</i>	9
1.2.4 <i>O₂-unabhängige Hydroxylierung</i>	9
1.2.5 <i>O₂-unabhängige Carboxylierung</i>	9
1.3 RELEVANZ DER FUMARAT-ADDIERENDEN ENZYME	11
1.4 BENZYLsuccINAT-SYNTHASE (BSS)	12
1.4.1 <i>Bedeutung der kleinen β-und γ-Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase</i>	15
1.4.2 <i>Reaktionsmechanismus der Benzylsuccinat-Synthase</i>	16
1.4.3 <i>BssD liefert das aktive Glycylradikal in BSS</i>	18
1.4.4 <i>β-Oxidation von Benzylsuccinat durch bbs Operon</i>	19
1.5 ANAEROBER ABBAU VON METHYLNAPHTHALIN DURCH SULFATREDUZIERENDES BAKTERIUM	21
1.6 ZIEL DIESER ARBEIT	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME	25
2.2 STÄMME, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	25
2.2.1 <i>Stämme</i>	25
2.2.2 <i>Plasmide</i>	26
2.2.3 <i>Oligonukleotide</i>	27
2.3 BAKTERIENKULTIVIERUNG	28
2.3.1 <i>Nährmedien und Supplemente</i>	28
2.3.2 <i>Kultivierung von Escherichia coli</i>	32
2.3.3 <i>Transformation chemisch kompetenter E. coli-Zellen durch Hitzeschock</i>	32
2.3.4 <i>Überproduktion von BSS in E. coli Zellen</i>	32
2.3.5 <i>Herstellung chemisch kompetenter E. coli-zellen</i>	32
2.3.6 <i>Konjugation von A. evansii</i>	33
2.3.7 <i>Kultivierung von Aromatoleum evansii</i>	34
2.3.8 <i>Überproduktion von BSS und NMS in Aromatoleum evansii</i>	34
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	35
2.4.1 <i>Isolierung von Plasmid-DANN</i>	35
2.4.1.1 <i>Mittels dem GeneJet Plasmid-Minipräp Kit</i>	35

2.4.1.2	Mittels alkalischer Lyse	35
2.4.2	DNA-Quantifizierung	36
2.4.3	Restriktionsanalyse.....	36
2.4.4	DNA-Gelelektrophorese	36
2.4.5	DNA-Sequenzierung.....	37
2.4.6	Primer Phosphorylierung	37
2.4.7	Ligation.....	37
2.4.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.4.9	Verdau mit DpnI	39
2.5	PROTEINANALYTISCHE METHODEN	40
2.5.1	Überexpression von BSS in <i>A. Evansii</i>	40
2.5.2	Zellernte.....	40
2.5.3	Zellaufschluss Mittels der French-Pressure-Cell-Press	41
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.5.5	Western Blot.....	42
2.5.6	Aufreinigung von Proteinen mittels Strep-Tactin	44
2.5.7	Aktivitätstest der BSS-Enzyme	45
2.5.8	Extraktion mit Diethylether	47
2.5.9	Analyse mittels der HPLC/LC-MS	47
2.5.10	Produkt Ion Scan.....	47
2.5.11	MRM-Methode (Multiple reaction monitoring)	48
2.5.12	Metallanalyse durch ICP-OES	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	AKTIVITÄTS-ASSAY DER REKOMBINANTEN BENZYLsuccinat-SYNTASE IN <i>A. EVANSII</i> & <i>E. COLI</i>	49
-	MUTAGENESE DER BENZYLsuccinat-SYNTASE.....	52
3.2	STEREOSELEKTIVITÄT MUTAGENESE DER α -UNTEREINHEIT DER BENZYLsuccinat-SYNTASE.	53
3.2.1	Herstellung der Mutanten	53
3.2.2	Untersuchung der spezifischen Aktivität der Gln707 und Trp613 Mutationen	54
3.2.3	Der Stereoselektivität Test	56
3.3	MUTAGENESE DER Toluol-BINDUNGSSTELLE.....	57
3.3.1	Herstellung der Mutationen	57
3.3.2	Untersuchung der spezifischen Aktivität der Tyr197 Mutationen	58
3.3.3	LC-MS Untersuchung der spezifischen Aktivität der Tyr197 Mutationen.....	59
3.3.4	Bestimmung des Substratumsatzes von Toluol-Alternativen.....	62
3.4	MUTAGENESE DER FUMARAT-BINDUNGSSTELLE	66
3.4.1	Herstellung der Arg Mutationen	66
3.4.2	Untersuchung der spezifischen Aktivität der Arg508 Mutationen	67
3.5	MUTAGENESE DER CYSTEINRESTE DER KLEINEN UNTEREINHEITEN (BSSb- BSSr).....	76

3.5.1	<i>Herstellung der Cys Mutationen</i>	76
3.5.2	<i>Reinigung von rekombinanter BSS und der Cys Mutationen durch Strep-Tag-Affinitätschromatographie</i>	77
3.5.3	<i>Bestimmung des Eisen-Gehalts</i>	79
3.6	HETEROLOGES PRODUKTIONSSYSTEM DER NAPHTHYL-2-METHYLSUCCINAT-SYNTASE IN <i>A. EVANSII</i>	81
4	DISKUSSION	84
4.1	(R)- ODER (S)-BENZYLSUCCINAT SYNTHASE.....	84
4.2	SUBSTRATSPEZIFITÄT DER TOLUOL-BINDUNGSTASCHE	85
4.3	ERWEITERUNG DER SUBSTRAT-DETERMINATION DURCH MUTIERTE BSS-VARIANTEN.....	88
4.4	DIE FUNKTION UND LOKALISATION VON EISEN-SCHWEFEL-CLUSTER.....	89
4.5	HETEROLOGE ÜBERPRODUKTION DER NMS	94
5	LITERATURVERZEICHNIS	97
6	ANHANG	104
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
	DANKSAGUNG	116
	LEBENSLAUF	118
	ERKLÄRUNG	119

Abbildung Verzeichnis

ABBILDUNG 1: STRUKTURELLE DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN VON BTEX-KOHLLENWASSERSTOFFEN.	5
ABBILDUNG 2: AEROBE UND ANAEROBE ATP-ABHÄNGIGE DEGRADATION VON BENZOAT.	7
ABBILDUNG 3: ANAEROBER ABBAU VON AROMATISCHEN KOHLLENWASSERSTOFFEN.	10
ABBILDUNG 4: PHYLOGENETISCHER BAUM DER A-UNTEREINHEITEN DER FAE-FAMILIE VON GLYCYLRADIKAL-ENZYMEN.....	12
ABBILDUNG 5: DIE UNTEREINHEITEN DER BSS(ABT) ₂ VON <i>T. AROMATICA</i> UND DAS ALLGEMEINE REAKTIONSMODELL.	13
ABBILDUNG 6: ORGANISATION DES BSS-OPERONS IN <i>THAUERA AROMATICA</i> STAMM K172.....	13
ABBILDUNG 7: BSS-AKTIVITÄTSZENTREN-MODELLE MIT FUMARAT UND TOLUOL.	14
ABBILDUNG 8: DAS AKTIVE ZENTRUM DES VOLLSTÄNDIGEN BSS-KOMPLEXES.	16
ABBILDUNG 9: GESAMTREAKTIONSMCHANISMUS VON BSS AUS <i>T. AROMATICA</i> K172.....	17
ABBILDUNG 10: DFT-MODELL DER GIBBS FREIEN ENTHALPIE FÜR DEN REAKTIONSMCHANISMUS VON BSS.	18
ABBILDUNG 11: REAKTIONSSSEQUENZ FÜR DEN ANAEROBEN ABBAU VON TOLUOL DURCH BENZYLsuccinat-SYNTHASE.....	20
ABBILDUNG 12: EIN VORSCHLAG FÜR DEN WEG DES ANAEROBEN ABBAUS VON 2-METHYLNAPHTHALIN.	23
ABBILDUNG 13: SCHEMATISCHE ANORDNUNG DES WESTERN BLOTS	43
ABBILDUNG 14: BSS-ÜBEREXPRESSIONSSYSTEM pASG3_BSS_STREP+BSSD-TXN-ORI FÜR DIE HERSTELLUNG VON AKTIVEN BSS.	49
ABBILDUNG 15: RP-HPLC-CHROMATOGRAMME DER PROBEN VON REKOMBINANTEM WILDTyp-BSS MIT TOLUOL UND FUMARAT.	50
ABBILDUNG 16: VERSCHIDENE HPLC-MESSUNG VON (R)-BENZYLsuccinat.....	51
ABBILDUNG 17: (10 %) SDS-PAGE UND WESTERN BLOT DER STREP-MARKIERTEN A-UNTEREINHEIT (110kDa) VON BSS-WT.	52
ABBILDUNG 18: MODELLE DES BSS-AKTIVEN ZENTRUMS IN DER A-UNTEREINHEIT.	54
ABBILDUNG 19: A. HPLC-MESSUNG DES NEUEN KONJUGIERTEN BSS-WT.	55
ABBILDUNG 20: (10 %) SDS-PAGE UND WESTERN BLOT DER MUTATIONEN GLN\TRP AUS <i>A. EVANSII</i> ZELLEXTRAKT.	55
ABBILDUNG 21: NP-HPLC-ANALYSE UND SPEKTRUM VON BENZYLsuccinat STANDARD (RACEMAT), GLN707GLU- UND BSS-WT- REAKTIONSGEMISCH.	57
ABBILDUNG 22: DIE POSITIONIERUNG UND BINDUNG VON FUMARAT UND TOLUOL MIT DER TARGET-AMINOSÄURE TYR197.	58
ABBILDUNG 23: (LC-ESI/MS) FÜR DEN BENZYLsuccinat-STANDARD (M=208).	59
ABBILDUNG 24: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR BENZYLsuccinat (M=208) VON DEM REKOMBINANTEN WILDTyp-BSS....	60
ABBILDUNG 25: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR BENZYLsuccinat (M=208) AUS DER REAKTION VON TOLUOL UND FUMARAT IN DER TYR197PHE-MUTANTE UND DER TYR197SER-MUTANTE.	60
ABBILDUNG 26: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR D5-BENZYLsuccinat (M=213) AUS DER REAKTION VON D5-TOLUOL UND FUMARAT IN DEM REKOMBINANTEN WILDTyp-BSS, DER TYR197PHE-MUTANTE UND DER TYR197SER-MUTANTE.....	61
ABBILDUNG 27: (10 %) SDS-PAGE UND WESTERN BLOT DER BEIDEN MUTATIONEN TYR197SER & TYR197PHE UND DES REKOMBINANTEN WILDTyp-BSS AUS <i>A. EVANSII</i> ZELLEXTRAKT.....	62
ABBILDUNG 28: DIE LC-MS-CHROMATOGRAMME ZEIGEN DIE SIGNALHÄUFIGKEIT DER PRODUKTE AUS O-, M-, UND P-KRESOL IM BSS.WT ZELLEXTRAKT, TYR197PHE ZELLEXTRAKT UND TYR197SER ZELLEXTRAKT.	63
ABBILDUNG 29: DIE LC-MS-CHROMATOGRAMME ZEIGEN DIE SIGNALHÄUFIGKEIT DER PRODUKTE AUS O-, M- UND P-XYLOL IM BSS.WT ZELLEXTRAKT, TYR197PHE ZELLEXTRAKT UND TYR197SER ZELLEXTRAKT.	64
ABBILDUNG 30: FUMARAT-ADDITIONSREAKTION AN DIE METHYLGRUPPE VON CRESOL.	65
ABBILDUNG 31: FUMARAT-ADDITIONSREAKTION AN DIE METHYLGRUPPE VON XYLOL.	65

ABBILDUNG 32: DIE POSITIONIERUNG VON TOLUOL UND BINDUNG VON FUMARAT MIT DEM KONSERVIERTEN CYS493.	66
ABBILDUNG 33: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR 3-BENZYL-PENTAN-4-ONAT (M=206) AUS DER REAKTION VON TOLUOL UND 3-ACETYLACRYLAT IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	68
ABBILDUNG 34: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR D5-3-BENZYL-PENTAN-4-ONAT (M=211) AUS DER REAKTION VON D5- TOLUOL UND 3-ACETYLACRYLAT IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	68
ABBILDUNG 35: GLUTACONSÄURE-ADDITIONSREAKTION AN DIE METHYLGRUPPE VON TOLUOL.	69
ABBILDUNG 36: GLUTACONSÄURE-ADDITIONSREAKTION AN DIE METHYLGRUPPE VON D5-TOLUOL.	69
ABBILDUNG 37: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR BENZYL-PENTANDISÄURE (M=222) AUS DER REAKTION VON TOLUOL UND GLUTACONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	70
ABBILDUNG 38: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR BENZYL-D5-PENTANDISÄURE (M=227) AUS DER REAKTION VON D5-TOLUOL UND GLUTACONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	70
ABBILDUNG 39: CROTONSÄURE-ADDITIONSREAKTION AN DIE METHYLGRUPPE VON TOLUOL ZUR BILDUNG 2-BENZYL-BUTANSÄURE BZW. DAS PRODUKT 2-BENZYL-D5-BUTANSÄURE.	71
ABBILDUNG 40: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR 2-BENZYL-BUTANSÄURE (M=178) AUS DER REAKTION VON TOLUOL UND CROTONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	72
ABBILDUNG 41: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR 2-BENZYL-D5-BUTANSÄURE (M=183) AUS DER REAKTION VON D5-TOLUOL UND CROTONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	72
ABBILDUNG 42: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR BENZYL-PENTANDISÄURE (M=222) AUS DER REAKTION VON TOLUOL UND GLUTACONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	73
ABBILDUNG 43: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR BENZYL-D5-PENTANDISÄURE (M=227) AUS DER REAKTION VON D5-TOLUOL UND GLUTACONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	73
ABBILDUNG 44: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR 2-BENZYL-BUTANSÄURE (M=178) AUS DER REAKTION VON TOLUOL UND CROTONSÄURE IN DER ARG508GLN-MUTANTE.	74
ABBILDUNG 45: (LC-ESI/MS) CHROMATOGRAMM FÜR 2-BENZYL-D5-BUTANSÄURE (M=183) AUS DER REAKTION VON D5-TOLUOL UND CROTONSÄURE IN DER ARG508PHE-MUTANTE.	74
ABBILDUNG 46: (10 %) SDS-PAGE UND WESTERN BLOT DER ARG MUTATIONEN.	75
ABBILDUNG 47: CHROMATOGRAMM DER AUFREINIGUNG VON BSS AUS EXTRAKTEN VON <i>E. COLI DH5A</i> UND <i>A. EVANSII</i> KB740... ..	78
ABBILDUNG 48: (10 %) SDS-PAGE UND WESTERN BLOT VON ZELLEXTRAKT UND ANREICHERUNG VON BSS AUS EXTRAKT VON <i>A.</i> <i>EVANSII</i> KB740.	79
ABBILDUNG 49: (20 %) SDS-PAGE VON ZELLEXTRAKT UND ANREICHERUNG VON BSS AUS EXTRAKT VON <i>A. EVANSII</i> KB740 MITTELS STREP-TACTIN AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.	80
ABBILDUNG 50: NMS-ÜBEREXPRESSIONSSYSTEM PASG3_NMS_STREP+NMSD-ORI.	81
ABBILDUNG 51: (10 %) SDS-PAGE UND WESTERN BLOT DER STREP-MARKIERTEN A-UNTEREINHEIT (110 kDa) VON NMS.	83
ABBILDUNG 52: BINDUNGSMODUS DES (R)-BENZYL-SUCCINATS UND BINDUNGSMODUS DES (S)-BENZYL-SUCCINATS.	84
ABBILDUNG 53: ALIGNMENT DER CYS-SCHLEIFE UND DER ALPHA-UNTEREINHEIT IN XSS-ENZYMEN.	88
ABBILDUNG 54: DER ZENTRALE HOHLRAUM DES AKTIVEN ZENTRUMS VON BSS MIT DEN BEIDEN SUBSTRATEN.	91
ABBILDUNG 55: SEQUENZALIGNMENT DER B- UND Γ-UNTEREINHEIT VON BSS UND BSS-ÄHNLICHEN ENZYMEN.	93
ABBILDUNG 56: ANORDNUNG DER NMS- UND BSS-GENCLUSTER FÜR DEN ANAEROBEN 2-METHYLNAPHTHALIN.	94

Tabellen Verzeichnis

TABELLE 1: DIE IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN STÄMME	25
TABELLE 2: DIE IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN PLASMIDE.....	26
TABELLE 3: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.	27
TABELLE 4: LURIA BERTANI MEDIUM (MILLER, 1972) (LB MEDIUM) FÜR DIE KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i>	29
TABELLE 5: NITRATREDUZIERER-MEDIUM (NM) FÜR DIE KULTIVIERUNG VON <i>A. EVANSII</i> UND <i>A. AROMATICUM</i>	29
TABELLE 6: DIE MENGE DER SUPPLEMENTE IM MEDIUM	29
TABELLE 7: ZUSÄTZLICHE SUPPLEMENTE BEI DER HERSTELLUNG VON MATING-PLATTEN.	30
TABELLE 8: PHOSPHAT-PUFFER-SYSTEM.....	30
TABELLE 9: SPURENELEMENTLÖSUNG SL10 (X1000) (WIDDEL ET AL., 1983) ^[45]	30
TABELLE 10: SELENIT-WOLFRAMAT-LÖSUNG	30
TABELLE 11: VITAMINLÖSUNG 7 (VL-7) (1000X) NACH PFENNIG (1978).....	31
TABELLE 12: VERWENDETE ANTIBIOTIKA UND INDUKTIONSMITTELS.	31
TABELLE 13: MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS UND MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS	31
TABELLE 14: VERWENDETE PUFFER ZUR HERSTELLUNG DER CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> -ZELLEN.....	33
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG DER ALKALISCHE LYSE-PUFFER.....	35
TABELLE 16: RESTRIKTIONSANSATZ.....	36
TABELLE 17: TAE-PUFFER.....	37
TABELLE 18: ANSATZ ZUR PRIMER-PHOSPHORYLIERUNG	37
TABELLE 19: LIGATIONSANSATZ	38
TABELLE 20: STANDARD PCR-PROGRAMM	39
TABELLE 21: STANDARD PCR-ANSATZ.	39
TABELLE 22: DPN1 VERDAUANSATZ	40
TABELLE 23: ZUSAMMENSETZUNG DER SDS-PAGE PUFFER.....	42
TABELLE 24:ZUSAMMENSETZUNG DES VERWANDETEN SDS-TRENNGELS UND SAMMELGELS.....	42
TABELLE 25: PUFFERZUSAMMENSETZUNG DES WESTERN BLOTS	44
TABELLE 26: ZUSAMMENSETZUNG DES STREP-TACTIN-REINIGUNGSPUFFERS	45
TABELLE 27: ZUSAMMENSETZUNG DES AKTIVITÄTSTESTS DER BSS FÜR VERSCHIEDENE VOLUMINA	46
TABELLE 28: IN DIESER ARBEIT GETESTETE SUBSTRATE DES AKTIVITÄTSTESTS	46
TABELLE 29: VERSCHIEDENE HPLC-MESSUNGEN DES REKOMBINANTEN BSS-WT INNERHALB EINES JAHR.....	51
TABELLE 30: ZUSAMMENFASSUNG DER ARG-MUTANTEN-ERGEBNISSE. (-) = KEIN PRODUKT NACHWEISBAR, (+) = PRODUKT NACHWEISBAR.....	76
TABELLE 31: PROTEINKONZENTRATION DER ELUATFRAKTIONEN VON BSS-PROTEIN, DAS DURCH STREPT-AVIDIN- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE IN <i>E. COLI</i> UND IN <i>A. EVANSII</i> ANGEREICHERT WURDE.	77
TABELLE 32: DIE MENGE AN EISEN IM VERHÄLTNISS ZU BSS-PROTEIN (MOL/ MOL) DER STREP-TACTIN AUFGEREINIGTEN PROBEN NACH ICP-MS METALLANALYSE.....	80

ZUSAMMENFASSUNG

Anaerober Toluolabbau folgt bei verschiedenen nicht verwandten Bakteriengruppen einem gemeinsamen Weg. Diese Bakterien bilden syntrophe Kokulturen, die den Toluolabbau mit der anaeroben Atmung oder Fermentation verknüpfen ^[1] ^[2]. Der Weg beginnt mit (R)-Benzylsuccinat-Synthase (BSS), einem Mitglied der Familie der Glycyl-Radikal-Enzyme. BSS enthält einen konservierte Glycinrest in der Nähe des C-Terminus, der durch ein aktivierendes Enzym in ein Glycyl-Radikal-Motiv umgewandelt wird ^[3]. Strukturell handelt es sich bei BSS um ein Heterohexamer mit einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Es katalysiert die Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung eines Fumarat-Cosubstrats und bildet (R)-Benzylsuccinat als erstes Zwischenprodukt im Abbauweg ^[4] ^[5]. BSS fungiert als Prototyp-Enzym für unterschiedliche Fumarat-addierende Enzyme (FAE), die den anaeroben Abbau verschiedener Kohlenwasserstoffe wie Xylol, Kresole, Methylnaphthalin oder Alkane initiieren.

In einer früheren Studie haben wir gezeigt, dass bereits eine einzige Mutation ausreicht, um eine Variante mit erweiterter Substratspektrum zu erzeugen. Diese Variante kann nun nicht nur die zuvor bekannten Substrate Toluol und die Kresolisomere umsetzen, sondern auch m-Xylol. Zudem ermöglicht eine Mutation des hochkonservierten Arginins zu Lysin die Umsetzung eines Fumarat-Analogons – 3-Acetylacrylat, was vom BSS-Wildtyp nicht umgesetzt wird.

In unserer Arbeit wurde erstmals ein rekombinantes Produktionssystem für aktive BSS eingesetzt. Dabei wurden gezielte Mutationen im aktiven Zentrum der Alpha-Untereinheit des Enzyms erzeugt, um das Substratspektrum des Enzyms zu erweitern und seine Fähigkeit zur Aufnahme größerer Substrate zu verbessern.

Mutationen von Tyr197Ser oder Tyr197Phe bilden eine Variante mit einem erweiterten Substratspektrum, die neben den bereits etablierten Substraten Toluol und den Kresol-Isomeren auch sämtliche Xylolisomere umsetzt. Zudem konnten wir aufgrund der empfindlichen Analysemethode (LC-ESI/MS), die in dieser Arbeit verwendet wurde, geringfügige Mengen der Umwandlung aller Xylol-Isomere im rekombinanten BSS-Wt nachweisen.

Andererseits konnten wir durch den Austausch von Arginin508 durch die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin (Phe) und die polar neutralen Seitenketten Glutamin (Gln) die Umwandlung der Fumarat-Analoga 3-Acetylacrylat, Crotonsäure und Glutaconsäure in der Mutante Arg508Phe sowie die Umwandlung von Crotonsäure und Glutaconsäure in der Mutante Arg508Gln nachweisen, die vom BSS-Wildtyp nicht umgesetzt werden.

Darüber hinaus wird die Bedeutung der Fe-S-Cluster ebenfalls gründlich untersucht. Die Untereinheiten von Fe-S-Cluster mehrerer BSS-Orthologe aus verschiedenen Organismen sind bekannt dafür, Teil des aktiven Enzyms zu sein. Ihre Relevanz und Bedeutung wurden bisher jedoch nicht gezeigt. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit drei gezielte Punktmutationen im Eisen-Schwefel-Cluster der β - und γ -Untereinheiten von BSS eingeführt. Eine Doppelmutante in der BSS γ -Untereinheit (Cys4Ala Cys7Ala), sowie eine Einzelmutante (Cys37Ala) und eine Doppelmutante (Cys19Ala Cys22Ala) in der BSS β -Untereinheit wurden erstellt, um entweder die Bildung des Clusters zu verhindern oder seine Redox-Eigenschaften zu verändern.

Außerdem zeigen wir in dieser Arbeit, dass die Doppelmutante in der BSS γ -Untereinheit (Cys4Ala Cys7Ala) zu einem signifikanten Rückgang der produzierten BSS α -Menge führte, während die anderen Mutanten (Cys37Ala) und (Cys19Ala Cys22Ala) in der BSS β -Untereinheit keine Auswirkungen auf die BSS α -Produktion hatten. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine einzelne oder doppelte Cystein-Mutation im Eisen-Schwefel-Cluster der β - oder γ -Untereinheit von BSS die Aktivität von BSS eliminiert.

SUMMARY

Anaerobic toluene degradation has been shown to follow a common pathway in various unrelated groups of bacteria. These bacteria engage in syntrophic cocultures, coupling toluene degradation with anaerobic respiration or fermentation ^[1] ^[2]. The pathway initiation involves (R)-Benzylsuccinate Synthase (BSS), a member of the glycy radical enzyme family. BSS contains a conserved glycine residue close to the C-terminus, which is converted to a glycy radical moiety by an activating enzyme ^[3]. Structurally, BSS is a heterohexamer with an $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ composition. It catalyzes the addition of the methyl group of toluene to the double bond of a fumarate cosubstrate, forming (R)-Benzylsuccinate as the first intermediate in the degradation pathway ^[4] ^[5]. BSS can be considered a prototype enzyme for various other fumarate-adding enzymes (FAE) that initiate the anaerobic degradation of different hydrocarbons, such as xylenes, cresols, methyl naphthalene, or alkanes.

In a previous study, we demonstrated that a single mutation is sufficient to generate a variant with an expanded substrate range, converting m-xylene in addition to the previously recognized substrates toluene and the cresol isomers. Furthermore, a mutation of a highly conserved arginine to lysine enables the conversion of a fumarate analogue – 3-acetyl acrylate, which is not converted by the wild-type BSS.

In our study, we utilized the first recombinant production system for activated BSS to produce several mutants affecting the active site in the alpha subunit of the enzyme, aiming to extend its substrate range and enhance its ability to take up larger substrates.

Mutations of Tyr197Ser or Tyr197Phe are sufficient to generate a variant with an expanded substrate range that converts all xylene isomers in parallel to the already established substrates toluene and the cresol isomers. Furthermore, due to the sensitive analysis method (LC-ESI/MS) used in this work, we were also able to detect the formation of barely detectable amounts of the conversion of all xylene isomers in recombinant BSS-Wt.

On the other hand, by replacing Arginine508 with the hydrophobic amino acid Phenylalanine (Phe) and the polar neutral side-chains Glutamine (Gln), we were able to detect the conversion of the fumarate analogue 3-acetyl acrylate, Crotonic acid, and Glutaconic acid in the Mutant Arg508Phe and the conversion of Crotonic acid and Glutaconic acid in the Mutant Arg508Gln, which are not converted by the wild-type BSS.

Furthermore, the significance of the Fe-S clusters will also be thoroughly investigated. The Fe-S clusters containing subunits of several BSS orthologues from different organisms are known to be part of the active enzyme. However, their relevance and importance have not been demonstrated thus far. To this end, in this study, three targeted point mutations were introduced to the iron-sulfur cluster of the β and γ subunits of BSS. A double mutant in the BSS γ subunit (Cys4Ala Cys7Ala), as well as a single mutant (Cys37Ala) and a double mutant (Cys19Ala Cys22Ala) in the BSS β subunit, were created to either prevent the cluster from assembling or to change its redox properties.

Furthermore, in this work we show that the double mutant in the BSS γ subunit (Cys4Ala Cys7Ala) led to a significant decrease in the amount of BSS α produced, while the other mutants (Cys37Ala) and (Cys19Ala Cys22Ala) in the BSS β subunit had no effect on BSS α production. In addition, it was observed that a single or double cysteine mutation in the iron-sulfur cluster of the β - or γ -subunit of BSS eliminated the activity of BSS.

1 Einleitung

1.1 Kohlenwasserstoffe

Die meisten Kohlenwasserstoffe auf der Erde kommen in Form von Erdöl, Kohle und anderen fossilen Brennstoffen vor und werden in der Regel als Ausgangsstoffe für eine Vielzahl industrieller Prozesse sowie als Quelle für viele chemische Syntheseverfahren, einschließlich Kohlenwasserstoffpolymere und Arzneimittel, verwendet.

In der organischen Chemie sind Kohlenwasserstoffe alle chemischen Verbindungen, die Kohlenstoff (C) und Wasserstoff (H) enthalten und werden in zwei Kategorien eingeteilt:

- I. Aliphatische Kohlenwasserstoffe: sind organische verzweigte oder unverzweigte, ketten- oder ringförmige Kohlenwasserstoffketten und werden in zwei Gruppen unterteilt:
 - a) Gesättigte Kohlenwasserstoffe: sind einfache Kohlenwasserstoffe mit Einfachbindung wie Alkane (z. B. Methan CH_4).
 - b) Ungesättigte Kohlenwasserstoffe: haben entweder eine Bindung zwischen Kohlenstoffatomen wie Alkene (z. B. Ethylen C_2H_4) oder mehrere Doppel- oder Dreifachbindungen wie Alkine (z. B. Acetylen C_2H_2).
- II. Aromatische Kohlenwasserstoffe (Arene): sind Kohlenwasserstoffe mit Ringform wie z.B. Benzol (C_6H_6), die einfachste Grundstruktur vieler aromatischer Verbindungen.

Aromaten sind zyklische, planare Kohlenwasserstoffe mit aromatischen Systemen, die aufgrund der Anzahl der delokalisierten π -Elektronen in der Ringebene eine erhöhte chemische Stabilität (Resonanzenergie) aufweisen und daher in der Umwelt schwer abbaubar sind. Die flüchtigen organischen BTEX-Verbindungen (Abbildung 1) Benzol (B), Toluol (T), Ethylbenzol (E) und p-Xylol (X) sind wichtige industrielle Lösungsmittel und Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von organischen Syntheseprodukten. Aufgrund ihrer hohen Toxizität und ihrer gewissen Wasserlöslichkeit sind sie jedoch die Hauptquelle für industrielle Schadstoffe und die Hauptursache für die Verschmutzung des Grundwassers. Darüber hinaus können BTEX-Stoffe aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in die Körperfette eindringen und chronische Krankheiten verursachen. Aus diesem Grund haben die natürlichen Abbauprozesse von Schadstoffen aus BTEX-Verbindungen eine sehr große Bedeutung.

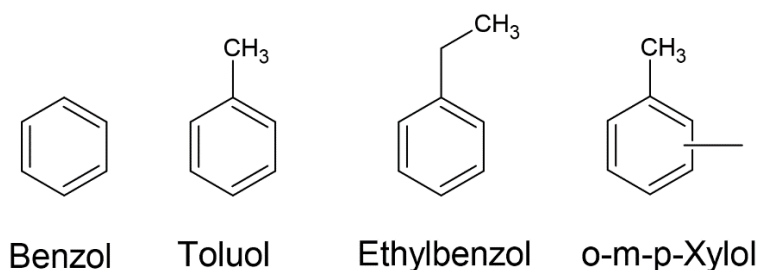


Abbildung 1: Strukturelle Darstellung der Verbindungen von BTEX-Kohlenwasserstoffen.

1.2 Abbauwege von aromatischen Kohlenwasserstoffen

1.2.1 Abbau unter aerobe Bedingungen

Der klassische mikrobielle O_2 -abhängige Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe erfolgt unter Verwendung von Sauerstoff als Elektronendonator und der Bildung von Catechol und Protocatechuat als zentrale Zwischenprodukte, wobei Monooxygenasen und Dioxygenasen zur chemischen Aktivierung und damit zum Abbau des Rings beteiligt sind.

Der Abbauweg verläuft im Allgemeinen unter Sauerstoffverbrauch in drei Schritten:

- 1- Umwandlung des Benzolrings mit Hilfe von Monooxygenasen und NAD(P)H durch Einbau einer Hydroxylgruppe in den aromatischen Ring. Dadurch wird der aromatische Ring leichter angreifbar
- 2- Abspaltung des Benzolrings durch Substitutions-Reaktionen in ortho- oder meta-Position mittels Dioxygenasen.
- 3- Bildung von Säuren und Aldehyden im letzten Schritt oder von β -Ketoacidat, das dann durch β -Ketoacidat-Weg zur Acetyl-CoA und Succinat umgewandelt wird.

Ein abweichender Abbauweg wurde in Bezug auf niedrige Sauerstoffkonzentration gefunden. Dieser Weg wird normalerweise von den Bakterien verwendet, die Benzoat, Phenylacetat oder ähnliche Substrate als Energiequelle nutzen.

Das denitrifizierende Betaproteobakterium *A. Evansii* nutzt den Weg, um den aromatischen Ring des Benzoat in Gegenwart von Sauerstoff abzubauen. Unter diesen Umständen wird der aromatische Ring durch eine ATP-abhängige CoA-Ligase aktiviert und das Zwischenprodukt Benzoyl-CoA kann durch aerobe oder anaerobe Stoffwechselwege abgebaut werden (Abbildung 2 Links).

In aeroben Bedingungen spaltet zunächst eine CoA-Oxygenase mit Hilfe von NADPH ein Wassermolekül ab, dann wird der aromatische Ring durch eine CoA-Dihydrodiol-Lyase geöffnet und es entsteht demnach das nicht-aromatische Produkt CoA-Semialdehyd und Formiat. Eine NADP⁺-spezifische Aldehyd-Dehydrogenase oxidiert dann das CoA-Semialdehyd. Dieses wird dann über die β -Oxidation und den β -Ketoacidat-Weg in Acetyl-CoA und Succinyl-CoA umgewandelt.

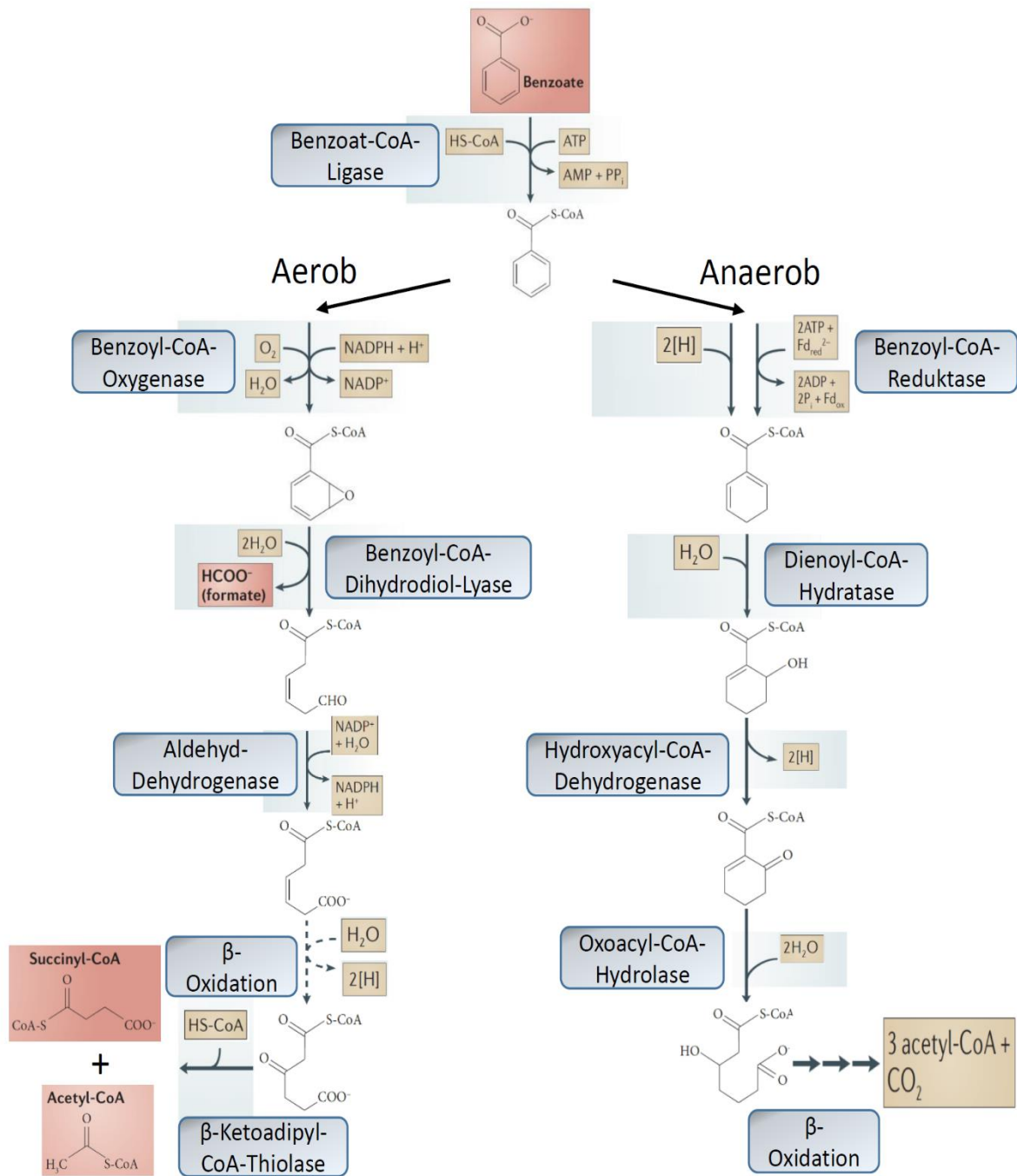


Abbildung 2: Aerobe und anaerobe ATP-abhängige Degradation von Benzoat. Der aerobe Weg in *Aromatoleum evansii* (Links): Benzoat wird durch Benzoyl-CoA-Ligase in Benzoyl-CoA umgewandelt. Danach bildet die Benzoyl-CoA-Oxygenase 2,3-Epoxybenzoyl-CoA, gefolgt von der Bildung von 3,4-Dehydroadipyl-CoA-Semialdehyd und Ameisensäure durch die Benzoyl-CoA-Dihydrodiol-Lyase. Anschließend oxidiert eine NADP⁺-spezifische Aldehyd-Dehydrogenase den Semialdehyd zu der entsprechenden Säure, 3,4-Dehydroadipyl-CoA. Diese wird dann durch β-Oxidation in das Produkt β-Ketoadipyl-CoA umgewandelt (gestrichelter Pfeil). Das β-Ketoadipyl-CoA wird durch β-Ketoadipyl-CoA-Thiolase zu den Endprodukten Acetyl-CoA und Succinyl-CoA abgebaut. Der anaerobe Weg in *Thauera aromatica* (Rechts): Benzoat wird durch Benzoyl-CoA-Ligase in Benzoyl-CoA umgewandelt. Benzoyl-CoA kann entweder durch ATP-abhängige oder ATP-unabhängige Benzoyl-CoA-Reduktase in cyclisches 1,5-Dienoyl-CoA umgewandelt werden. Anschließend wird 6-Hydroxyacyl-CoA durch Dienoyl-CoA-Hydratase gebildet, gefolgt von der Bildung von 6-Oxocyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA

durch Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase. Oxoacyl-CoA-Hydrolase erzeugt das Zwischenprodukt Cyclohex-1-en-carboxy-CoA. Dieses wird durch β -Oxidation in Acetyl-CoA umgewandelt. Modifiziert nach (Fuchs et al., 2011) ^[5].

1.2.2 Abbau unter anaeroben Bedingungen

Im anaeroben Stoffwechselweg wird auch die Umwandlung in Benzoyl-CoA durch Benzoyl-CoA-Ligase eingeleitet. Aber im Gegensatz zum aeroben Abbauweg erfolgt der anaerobe Abbauweg von Benzoyl-CoA jedoch durch Reduktion und nicht durch Oxidation des aromatischen Rings. Die anaerobe Reduktion von Benzoyl-CoA wurde entweder durch eine ATP-abhängige Klasse-I-Benzoyl-CoA-Reduktase katalysiert, die ein Ferredoxinrot als Elektronendonator und ATP-Hydrolyse verwendet, oder durch eine ATP-unabhängige Klasse-II-Benzoyl-CoA-Reduktase, die Fe-S-Cluster, Wolfram, Zink, Flavin und Selenocystein als Cofaktoren enthält. Trotz dieses Unterschieds erzeugen die beiden Reduktasen das gleiche Produkt, 1,5-Dienoyl-CoA, das im nächsten Schritt durch Dienoyl-CoA-Hydratase in 6-Hydroxyacyl-CoA umgewandelt wird. Der Ring wurde durch Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Oxoacyl-CoA-Hydrolase gespalten, und aus dem Zwischenprodukt Cyclohex-1-en-carboxy-CoA werden dann durch β -Oxidation drei Moleküle Acetyl-CoA gebildet (Abbildung 2 Rechts).

Alle drei Wege setzen am Ende das gleiche Endprodukt Benzoyl-CoA frei, das durch Benzoyl-CoA-Reduktase bzw. Oxygenase zu Cyclohex-1,5-dien-1-carboxyl-CoA umgesetzt und schließlich über einen modifizierten β -Oxidationsweg zu Acetyl-CoA oxidiert ^[7].

Sauerstoff und Nitrat sind die wichtigsten Elektronenakzeptoren für den biologischen Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen. Andere Elektronenakzeptoren wie Eisen(III) oder Sulfat nehmen nur unter streng anaeroben Bedingungen an den biologischen Abbauprozessen teil. In Anwesenheit von Sauerstoff bevorzugen die Mikroorganismen Sauerstoff als Elektronenakzeptor, aber wenn kein oder nur wenig Sauerstoff vorhanden ist, dienen Nitrat als Elektronenakzeptor bei den biologischen Abbauprozessen von anaeroben Bakterien. Denitrifizierende Bakterien sind in der Lage, Nitrat über Nitrit zu gasförmigem Stickstoff zu reduzieren (Denitrifikation). Dieser Prozess wird wegen seines höheren Energiegewinnes für die Mikroorganismen bevorzugt. Das Verfahren liefert nach der aeroben Atmung den größten Energiegewinn beim Umsatz kohlenwasserstoffhaltiger Verbindungen.

Andererseits wurde für einige aromatische Verbindungen wie BTEX, Naphthalin und 2-Methylnaphthalin festgestellt, dass die unabhängige Sauerstoffproduktion aus Benzoyl-CoA über drei neue alternative Wege erfolgt: Fumarat-Addition, O₂-unabhängige Hydroxylierung und Carboxylierung (Abbildung 3).

1.2.3 Fumarat-Addition

Das denitrifizierende Betaproteobakterium *T. aromatica* ist in der Lage das stereospezifische (R)-Benzylsuccinat als einziges Produkt zu bilden, indem es mit Hilfe des streng anaeroben Glycylradikal-Enzyms Benzylsuccinat-Synthase die Methylgruppe von Toluol an Fumarat addiert.

Der weitere Abbau von (R)-Benzylsuccinat erfolgt durch CoA-Transfer mit Succinyl-CoA zur Bildung von Benzylsuccinyl-CoA und zunächst durch β -Oxidation zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA.

Der Reaktionszyklus wird durch Succinat-Dehydrogenase, die das Fumarat-Cosubstrat der Benzylsuccinat-Synthase aus Succinat recycelt, und Benzoyl-CoA-Reduktase, die Benzoyl-CoA zu Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA abbaut, abgeschlossen. Die Addition von Fumarat ist nicht auf den anaeroben Abbau von Toluol beschränkt, sondern wurde auch beim initialen Angriff von Kresol-Isomeren, Xylol und 2-Methylnaphthalin in energiebegrenzten Organismen wie sulfatreduzierenden oder fermentierenden Bakterien nachgewiesen. Ähnlich wie beim anaeroben Abbau von Toluol wurde die Methylgruppe von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch die Zugabe von Fumarat aktiviert.

1.2.4 O₂-unabhängige Hydroxylierung

Denitrifizierende Bakterien wie *Aromatoleum aromaticum* (Stamm EbN1) nutzen einen anderen Weg, um die aromatische Verbindung Ethylbenzol abzubauen. Die erste Reaktion in denitrifizierenden Bakterien von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol wird durch ein periplasmatisches Molybdän-Enzym katalysiert, nämlich die Ethylbenzol-Dehydrogenase (EbDH), die zur Familie der Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktasen gehört.

Es folgt eine weitere Reaktion im Zytoplasma, bei der (S)-1-Phenylethanol durch eine (S)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase zu Acetophenon oxidiert wird.

Acetophenon wird im nächsten Schritt durch eine Acetophenon-Carboxylase zu Benzoylacetat carboxyliert. Anschließend aktiviert eine CoA-Ligase das Benzoylacetat zu Benzoyl-Acetyl-CoA, das dann thiolytisch in Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten wird. Am Ende wird das Benzoyl-CoA durch Benzoyl-CoA-Reduktase zu einem nicht-aromatischen Produkt reduziert.

1.2.5 O₂-unabhängige Carboxylierung

Die Aktivierung von nicht substituierten aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Benzol oder Naphthalin erfolgt vermutlich durch direkte Carboxylierung, wie Experimente mit isotoopenmarkierten Substraten nahelegen. Dieser Prozess umfasst die direkte Carboxylierung von Benzol durch

Benzolcarboxylase, gefolgt von der Aktivierung des entstandenen Benzoats zu Benzoyl-CoA durch Benzoat-CoA-Ligase. Obwohl es derzeit an biochemischen Nachweisen mangelt, deuten proteomische Studien an angereicherten Kulturen von anaeroben eisenreduzierenden oder sulfatreduzierenden Bakterien während des Abbaus von Benzol oder Naphthalin darauf hin. Einige stark induzierte Proteine weisen Ähnlichkeiten mit Untereinheiten der *T. aromatica* Phenylphosphat-Carboxylase auf, einem Schlüsselenzym des anaeroben Phenolabbaus. Die vermeintliche direkte Carboxylierung von Benzol und Naphthalin könnte eine Vorläuferrolle in der Phenylphosphat-Carboxylierung oder der direkt verbundenen Phenolcarboxylierung in streng anaeroben fermentierenden Bakterien spielen ^{[5][12][13]}.

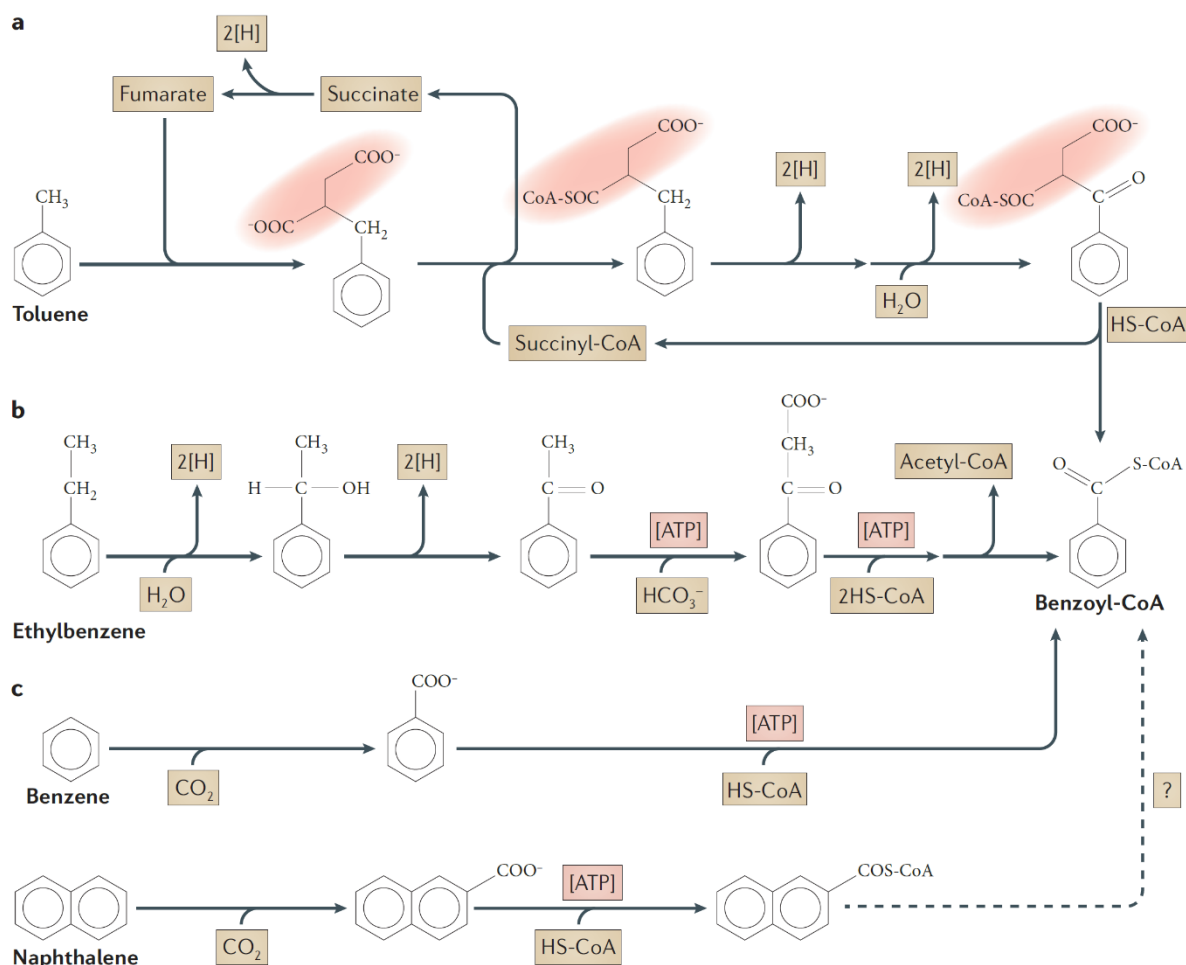


Abbildung 3: Anaerober Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen. A: durch Fumarat-Addition an Toluol, B: durch Hydroxylierung von Ethylbenzol, C: durch Carboxylierung von Benzol und Naphthalin. Alle drei Wege führen zur Freisetzung des gleichen Endprodukts Benzoyl-CoA ^[5]. Entnommen aus (Fuchs et al., 2011).

1.3 Relevanz der Fumarat-addierenden Enzyme

Fumarat-addierende Enzyme sind eine Familie von Enzymen, die eine wichtige Rolle im anaeroben Stoffwechsel spielen. Diese Enzyme katalysieren die Addition von Fumarat an eine Vielzahl organischer Moleküle wie Succinat, Malat und Citrat in einer Reaktion, die als Fumarataddition bekannt ist. Eine der Hauptaufgaben der Fumarat-addierenden Enzyme besteht in der anaeroben Atmung bestimmter Mikroorganismen. Bei der anaeroben Atmung verwenden einige Bakterien und Archaeen Fumarat als Elektronenakzeptor anstelle von Sauerstoff. Bei diesem Prozess wird Fumarat zu Succinat reduziert, und die bei dieser Reaktion freigesetzten Elektronen werden zur Erzeugung von ATP verwendet. Fumarat-addierende Enzyme sind auch am Abbau organischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen beteiligt. In einigen anaeroben Bakterien wird Fumarat zu organischen Verbindungen hinzugefügt, um sie für den weiteren Abbau zu aktivieren. So wird beispielsweise beim anaeroben Abbau von Benzoat Benzoyl-CoA durch das Enzym Benzoyl-CoA-Reduktase in den entsprechenden Fumarat-Ester umgewandelt. Dieser Fumarat-Ester kann dann von anderen Enzymen in diesem Stoffwechselweg weiter abgebaut werden. Darüber hinaus sind Fumarat-addierenden Enzyme an verschiedenen anderen biologischen Prozessen beteiligt, z. B. an der Biosynthese bestimmter Aminosäuren, der Regulierung der Genexpression und dem Stoffwechsel bestimmter Medikamente und Toxine.

Die Bedeutung von Fumarat-addierenden Enzymen (FAEs) beschränkt sich nicht nur auf die Aktivierung von Toluol, Xylol und Ethylbenzol, sondern findet sich auch in Alkylsuccinat-Synthasen (ASS) ^[8] für lang- und kurzkettige Alkane bzw. Alkene ^[9] und in Naphthylmethylsuccinat-Synthasen (NMS) für die Aktivierung von 2-Methylnaphthalin ^[10]. Zusammen bilden sie die Unterklasse der Fumarat-addierenden Enzyme (FAE) der Glycylradikal-Enzyme (Abbildung 4). Alle diese Enzyme sind extrem sauerstoffempfindlich und enthalten ein freies Radikal an einem konservierten Glycinrest, das von einem separaten S-Adenosylmethionin-abhängigen aktivierenden Enzym eingefügt wird^[11].

Im Gegensatz zu anderen bekannten Glycylradikal-Enzymen enthalten BSS und andere FAEs mindestens zwei zusätzliche Untereinheiten, die ungewöhnliches [4Fe-4S]-Cluster besitzen.

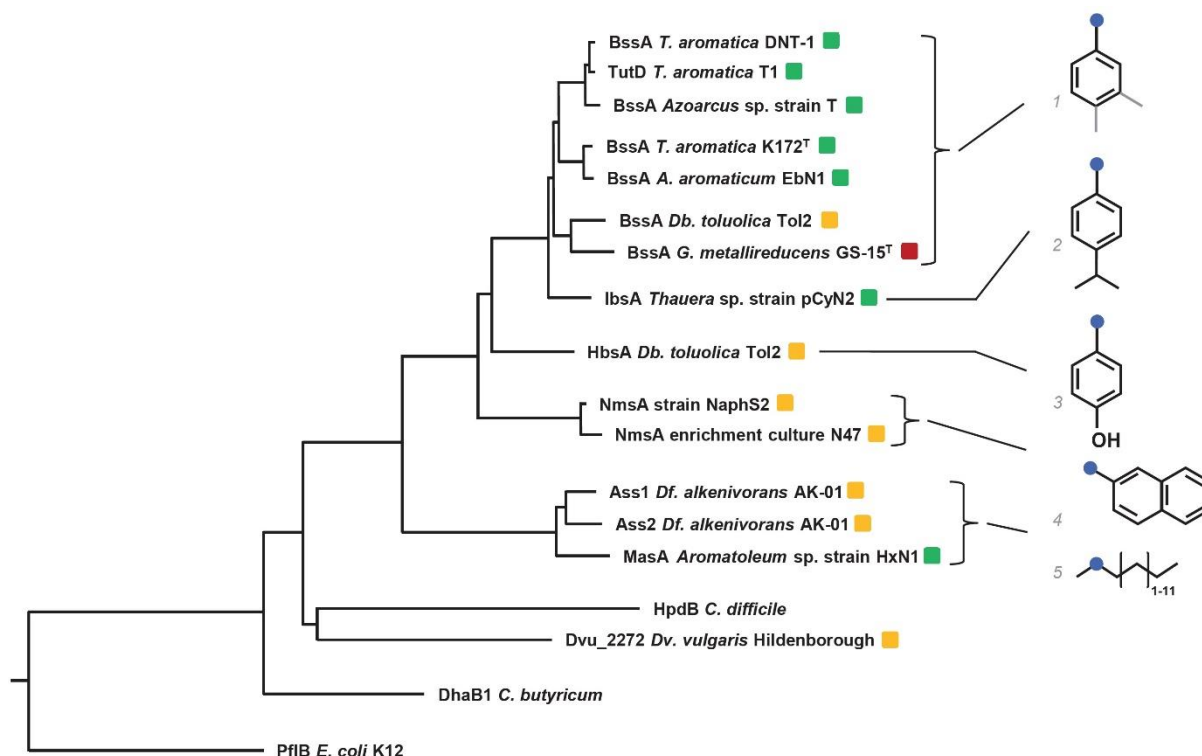


Abbildung 4: Phylogenetischer Baum der katalytischen aktiven α -Untereinheiten von Enzymen der FAE-Familie von Glycylradikal-Enzymen. Verbindungsnummern: 1 = Toluol, m-Xylol oder p-Xylol; 2 = p-Cymol; 3 = p-Kresol; 4 = 2-Methylnaphthalin; 5 = n-Alkane mit C 5 bis C 16 Kettenlänge. Die blauen Punkte zeigen das reaktive Kohlenstoffatom auf dem Kohlenwasserstoff Substrat. Grün zeigt Nitrat-reduzierende Bakterien, gelb zeigt Sulfat-reduzierende Bakterien und Rot zeigt Eisen-reduzierende Bakterien. Entnommen aus (R Rabus et al., 2016) ^[12].

1.4 Benzylsuccinat-Synthase (BSS)

BSS wurde zuerst in dem Bakterium *Thauera aromatica* entdeckt, das Toluol und andere aromatische Kohlenwasserstoffe als Energie- und Kohlenstoffquelle für das Wachstum nutzen kann. Seitdem wurden BSS-Homologe in anderen Bakterien gefunden, die in der Lage sind, Toluol und verwandte Verbindungen abzubauen. Der anaerobe Abbau von Toluol und anderen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Bakterien wie *Azoarcus* sp. T und *Thauera aromatica* ist ein wichtiger Umweltprozess, der dazu beiträgt, diese Schadstoffe aus der Umwelt zu entfernen.

Benzylsuccinat-Synthase gehört zur Familie der Fumarat-addierenden Glycyl-Radikal-Enzyme. Das Glycylradikalenzym katalysiert die Addition von Toluol an Fumarat, um (R)-Benzylsuccinat zu bilden. Kristallstrukturen von BSS aus *T. aromatica* Stamm T1, einem denitrifizierenden Bakterium, zeigen das neuartige Glycylradikal-Enzym, das aus drei Untereinheiten in einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Struktur (α 98 kDa, β 8,5 kDa, γ 6,5 kDa) besteht. BSS α ähnelt den Untereinheiten anderer Glycylradikal-Enzyme und trägt ein Glycylradikal, während die β - und γ -Untereinheiten ein [4Fe-4S]-Cluster binden, dessen Beteiligung an der Bildung von aktiver BSS noch nicht geklärt ist (Abbildung 5).

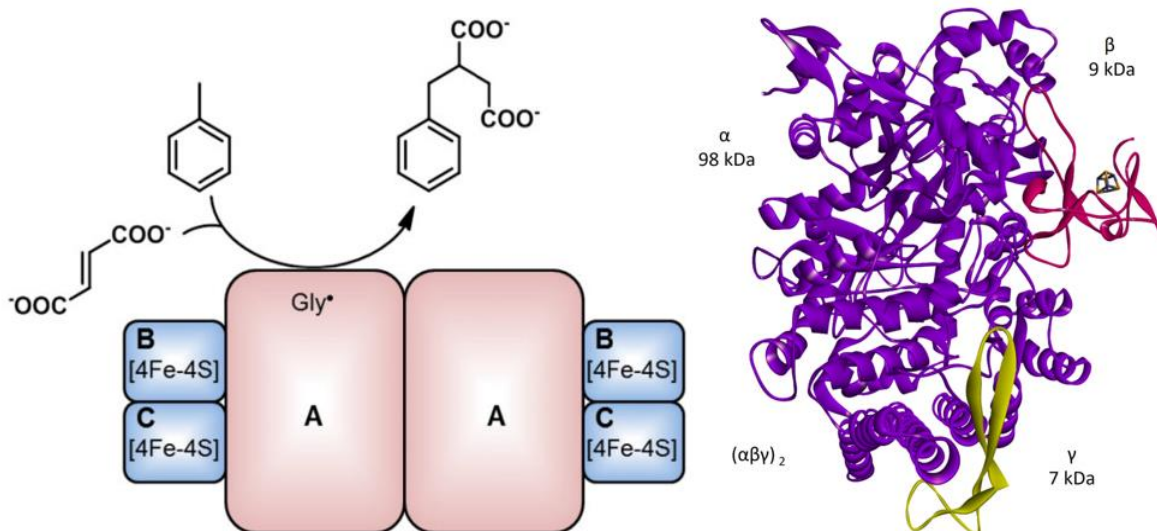


Abbildung 5: links Die Untereinheiten der BSS($\alpha\beta\gamma$)₂ heterohexamere von *T. aromatica* und das allgemeine Reaktionsmodell. Das Glycylradikal im aktiven Zentrum ist nur in einer der beiden großen Untereinheiten vorhanden, und möglicherweise unter Beteiligung von [4Fe-4S]-Cluster^[13]. Rechts Die Proteinstruktur der Benzylsuccinat-Synthase erklärt die Position der Untereinheiten und die Größe der einzelnen Untereinheiten. Die α -Untereinheit in lila mit 98 kDa, BSS β in Rot mit 9 kDa und BSS γ in Gelb mit 7 kDa. Entnommen aus (Boll et al., 2014)^[13].

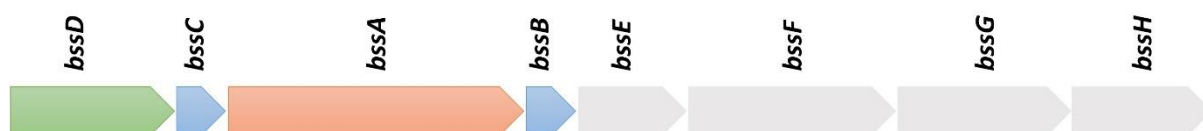


Abbildung 6: Organisation des *bss*-Operons in *Thauera aromatica* Stamm K172. Modifiziert nach (Meyer-Cifuentes et al., 2020)^[14].

Die Untereinheiten der Benzylsuccinat-Synthase werden von den *bssDCAB*-Genen kodiert, die im *bss*-Operon enthalten sind. Dabei kodiert *bssA* für die α -Untereinheit, *bssB* für die β -Untereinheit und *bssC* für die γ -Untereinheit. Das *bssD*-Gen kodiert ein aktivierendes Enzym für den Einbau von Glycylradikalen, das zu den Enzymen der "radikalen SAM-Familie" gehört, die S-Adenosylmethionin in einen Adenosylradikalgenerator an einem bestimmten Fe/S-Cluster in ihren aktiven Zentren umwandeln. Außerdem enthalten alle *bss*-Operons bis zu vier weitere co-exprimierte Gene (*bssE*, *bssF*, *bssG* und *bssH*), die keine Rolle bei der Bildung aktiver BSS spielen und deren Funktion noch unbekannt ist (Abbildung 6).

Sowohl experimentelle als auch theoretische Studien haben Aminosäuren identifiziert, die bei dem Reaktionsmechanismus von BSS eine Schlüsselrolle spielen könnten, indem sie entweder eine hydrophobe Wechselwirkung für die korrekte Positionierung von Toluol bereitstellen oder durch Wasserstoffbrückenbindung zur Positionierung und Fixierung von Fumarat beitragen. Docking-Studien

deuten darauf hin, dass die Bindung der Carboxylgruppe von Fumarat durch den positiv geladenen Argininrest Arg508 erfolgt ^[3]. Auf der anderen Seite des BSS-aktiven Zentrum wurden eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren identifiziert, die eine Rolle bei der Bindung von Toluol spielen könnten. Quantenmechanische Cluster-Modelle zeigen 9 Aminosäurereste im Zentrum, die die gebundenen Substrate umgeben: Glu189, Tyr197, Ser199, Ile384, Leu391, Leu492, Cys493, Arg508 und Val709 (Abbildung 7). Toluol enthält keine polaren funktionellen Gruppen, die seine Positionierung während der Katalyse erleichtern. Die Bindungsstelle wird hauptsächlich durch aliphatische und aromatische Reste gebildet. Rückstände aus zwei Regionen, α -Helix-Schleife 3' (Ile384, Phe385, Leu391) und die α -Helix-Schleife 8' und β -Faltblatt 8 (Val-709, Leu-711), bilden zusammen, was als "hydrophobe Wand" bezeichnet wird ^[3], die eine Seite der aktiven Stelle gegenüber Fumarat bildet, wodurch die Gly-Radikal-Domäne deutlich weniger lösungsmittelzugänglich ist, als in den anderen Enzymen der GRE-Familie. Ein Ring aus hydrophoben (Tyr197, Tyr381, Leu492, Ile617) und polaren (Glu189, Gln707) Resten bildet die Seiten der Toluol-Bindungstasche und passt perfekt zum Toluol-Molekül. Die letzte Seite der Bindungstasche wird von Fumarat selbst gebildet, wobei die Methylgruppe von Toluol gegen C2 von Fumarat gestapelt ist und der aromatische Ring von Toluol gegen das C1-Carboxylat von Fumarat gestapelt ist ^[15].

Diese Ausrichtung von Toluol ist mit der Produktion von (R)-Benzylsuccinat, wie zuvor beobachtet, konsistent, da C1 von Toluol direkt benachbart zu C2 von Fumarat platziert wird ^{[16] [17] [18] [19]}.

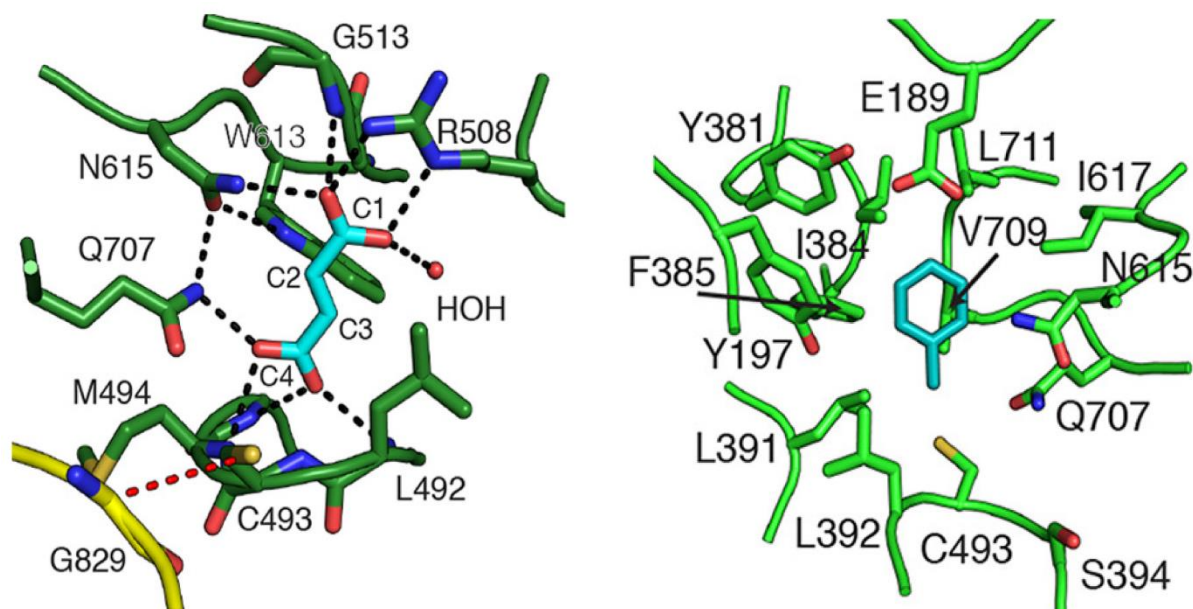


Abbildung 7: BSS-Aktivitätszentren-Modelle mit Fumarat (Links) und Toluol (Rechts). Im Fall von BSS mit Fumarat sind Wasserstoffbrückenbindungen in schwarzen Strichen für polare Abstände von weniger als 3,2 Å dargestellt. Im Fall von BSS mit Toluol wurden die Aminosäuren gezeigt, die aufgrund ihrer Nicht-Polarität als geeignete Kandidaten für die korrekte Positionierung und Bindung von Toluol angesehen werden. Entnommen aus (A. Funk et al., 2015) ^[15].

1.4.1 Bedeutung der kleinen β - und γ -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase

Die meisten GREs bestehen in der Regel aus zwei identischen Untereinheiten (Homodimeren). Darunter befinden sich auch die X-Succinat-Synthasen (XSS), die ungewöhnlich andere kleine Untereinheiten binden können.

Das [4Fe-4S]-Eisen-Schwefel-Cluster spielt eine entscheidende Rolle beim anaeroben Abbau verschiedener organischer Verbindungen. In vielen anaeroben Bakterien sind Enzyme, die [4Fe-4S]-Cluster enthalten, an den ersten Schritten des Abbaupfads beteiligt und erleichtern die Übertragung von Elektronen aus der organischen Verbindung auf die Elektronentransportkette.

Beim anaeroben Abbau von 2-Methylnaphthalin ist beispielsweise Naphthyl-2-Methyl-Succinat, das vom Enzym Naphthyl-2-Methyl-Succinat-Synthase (NMS) synthetisiert wird, ein wichtiges Zwischenprodukt des Weges. NMS enthält ein [4Fe-4S]-Cluster, das für seine Aktivität unerlässlich ist, da er als Elektronenträger zwischen dem Substrat und der Elektronentransportkette dient.

Auch beim Abbau von Benzoat, einem häufigen Zwischenprodukt beim anaeroben Abbau aromatischer Verbindungen, enthält das Enzym Benzoyl-CoA-Reduktase ein [4Fe-4S]-Cluster, das eine entscheidende Rolle bei der Reduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohex-1,5-dien-1-carbonyl-CoA spielt. Das [4Fe-4S]-Cluster dient als Elektronenüberträger zwischen dem Substrat und der Elektronentransportkette und ermöglicht die Übertragung von Elektronen auf den endgültigen Elektronenakzeptor.

BSS hingegen bindet im Vergleich zu den anderen GREs ausnahmsweise zwei kleine Untereinheiten BSS β und BSS γ , die Eisen-Schwefel-Cluster umfassen, aber aufgrund der geringen Größe der beiden β - und γ -Untereinheiten bleibt ihre genaue Funktion ungenau.

Die Abwesenheit vom Eisen-Schwefel-Cluster der γ -Untereinheit oder der gesamten BSS γ -Untereinheit sorgt für eine schlechte Expression der BSS α -Untereinheit, da die Chelatbildung von Eisen zur Auflösung der Untereinheit führt. Im Gegensatz dazu hat die Abwesenheit der β -Untereinheit keine signifikante Veränderung der BSS α Expression bzw. der Stabilität der α -Untereinheit (Abbildung 8)

[3][20][26]

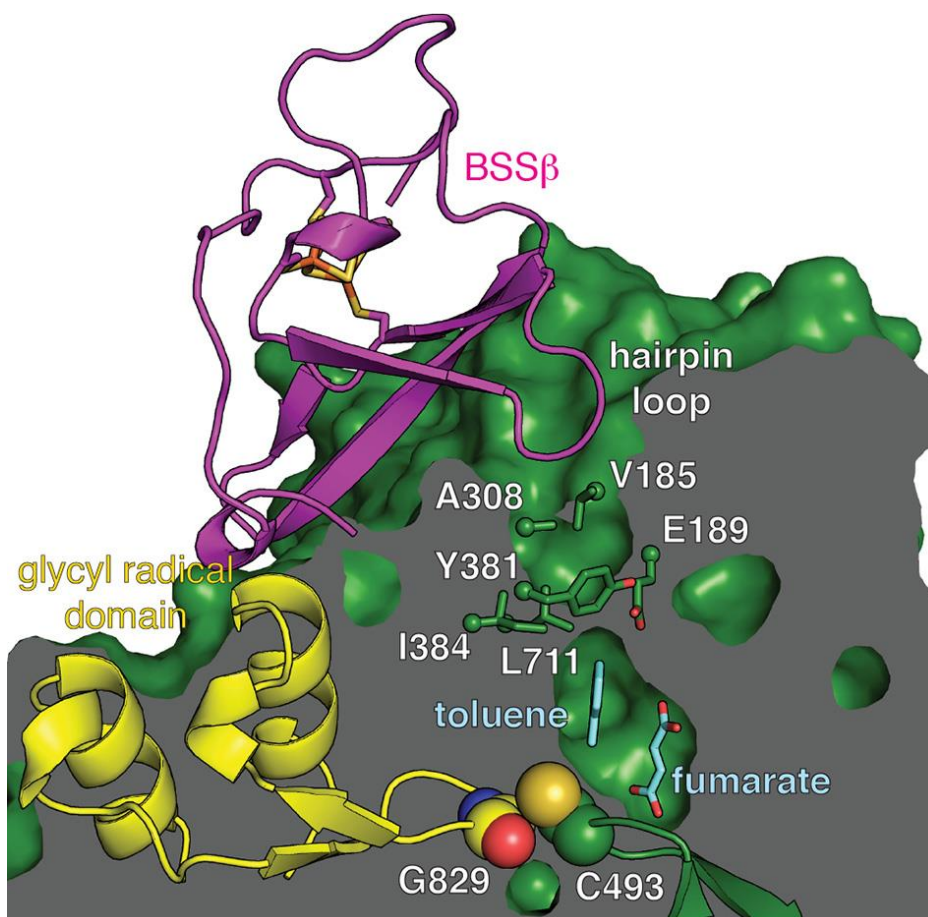


Abbildung 8: Das aktive Zentrum des vollständigen BSS-Komplexes zeigt, dass beide Substratzugangskanäle im zentralen Hohlraum des aktiven Zentrums oberhalb der Cys-Schleife und in der Nähe der Glycylradikal-Domäne (gelb) von BSS α gebunden sind, wobei die Hairpin-Schleife von BSS β in diesen Hohlraum hineinragt und ihn vollständig ausfüllt. Entnommen aus (A. Funk et al., 2015) [15].

Die Kristallstruktur zeigt, dass die Abwesenheit von BSS β zu einer Konformationsänderung führt, nämlich zu einer veränderten Position der Glycyl-Radikal-Domäne und einer Verkürzung des Abstands zwischen den Gly- und Cys-Schleifen im aktiven Zentrum, was die korrekte Positionierung der Toluol-Bindungstasche beeinflusst. Darüber hinaus hat BSS β mehrere Wechselwirkungen mit der Gly-Radikal-Domäne von BSS α . Teil der BSS β -Interaktionsoberfläche ist die Cys-Schleife, die den Zugangsweg für das Substrat am aktiven Zentrum einfügt. Sie ist perfekt strukturiert, um in den Hohlraum der BSS α -Kavität zu passen und den Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum zu kontrollieren [3][15].

1.4.2 Reaktionsmechanismus der Benzylsuccinat-Synthese

Aufgrund der relativen Stabilität von Glycylradikalen unter anaeroben Bedingungen wurde ein Reaktionsmechanismus für BSS vorgeschlagen (Abbildung 9). Die Reaktion beginnt, wenn sich beide Substrate (zuerst Fumarat, dann Toluol) im aktiven Zentrum des Enzyms befinden. Nach der

Substratbindung finden alle nachfolgenden Reaktionen in einer abgeschirmten Umgebung des aktiven Zentrums statt, um den Zugang unerwünschter reaktiver Verbindungen zu verhindern, was auf die hohe Reaktivität der anderen beteiligten radikalischen Zwischenprodukte zurückzuführen ist. Danach wird das Radikal vom Glycinrest Gly829 auf den Cysteinrest Cys493 übertragen, um das aktive Thiylradikal-Zwischenprodukt zu bilden. Das neu gebildete Thiylradikal abstrahiert ein Wasserstoffatom von der Methylgruppe des Toluols und bildet das enzymatische Benzylradikal-Zwischenprodukt. Dann greift das Benzylradikal die Doppelbindung des Fumarats an, das bereits im aktiven Zentrum gebundenen ist. Durch diesen Angriff wird eine neue C-C-Bindung gebildet, wodurch das Benzylsuccinylradikal mit umgekehrter Stereochemie an der ehemaligen Methylgruppe entsteht. Am Ende, bevor sich das aktive Zentrum öffnet, wird der ursprüngliche Wasserstoff von Cys493 zurück auf den Glycinrest übertragen, um den Glycylradikalzustand des Enzyms wiederherzustellen. Dann wird (R)-Benzylsuccinat freigesetzt und das Enzym ist frei für den nächsten Zyklus ^{[12][21]}.

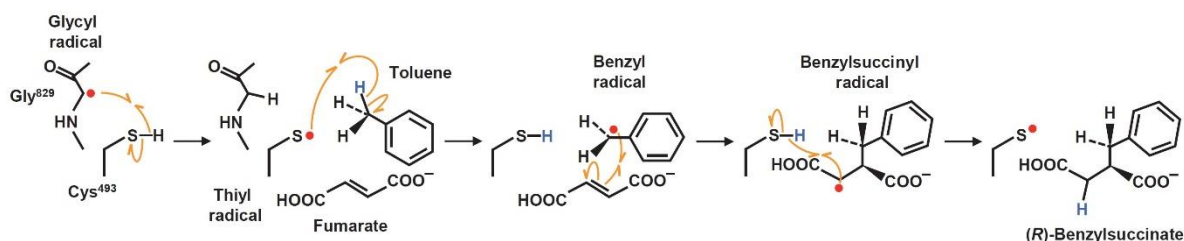


Abbildung 9: Gesamtreaktionsmechanismus von BSS aus *T. aromatica* K172. Orangene Pfeile zeigen die Neuordnung von Bindungen an, rote Punkte zeigen das voll Radikalprodukt an. Entnommen aus (R Rabus et al., 2016) ^[12].

Der Reaktionsmechanismus von BSS wurde mit Hilfe von DFT auf der Grundlage der Struktur der α -Untereinheit bestimmt. Die DFT-Modellierung zeigte, dass Fumarat am effektivsten an eine geladene COO-Gruppe bindet, die sich in Richtung des positiv geladenen Arg508-Rests erstreckt. Darüber hinaus zeigte das QM-Cluster-Modell neun Aminosäuren (Glu189, Tyr197, Ser199, Ile384, Leu391, Leu492, Cys493, Arg508 und Val709), die sich im aktiven Zentrum befinden und die gebundenen Substrate umgeben. Cys493 initiiert die Reaktion, indem es die Methylgruppe von Toluol angreift, um den ersten Übergangszustand (TS1) mit dem höchsten Energieniveau (18,4 kcal/mol) zu erzeugen. Anschließend bildet es das erste Zwischenprodukt, das Benzylradikal.

Der zweite Übergangszustand (TS2) mit einem niedrigen Energieniveau (13,6 kcal/mol) wird durch Angriff auf die Doppelbindung des Fumarats und anschließende Bildung einer C-C-Bindung erzeugt, wodurch ein Benzylsuccinylradikal entsteht. Der dritte Übergangszustand TS3 mit einem Energieniveau (15,2 kcal/mol) wird durch einen Rücktransfer eines H-Atoms von Cys493-SH-Gruppe erreicht, was zur Bildung des Endprodukts (R)-Benzylsuccinat und zum Zurückgewinnen des Thiylradikals an der konservierten Cys-Gruppe führt (Abbildung 10).

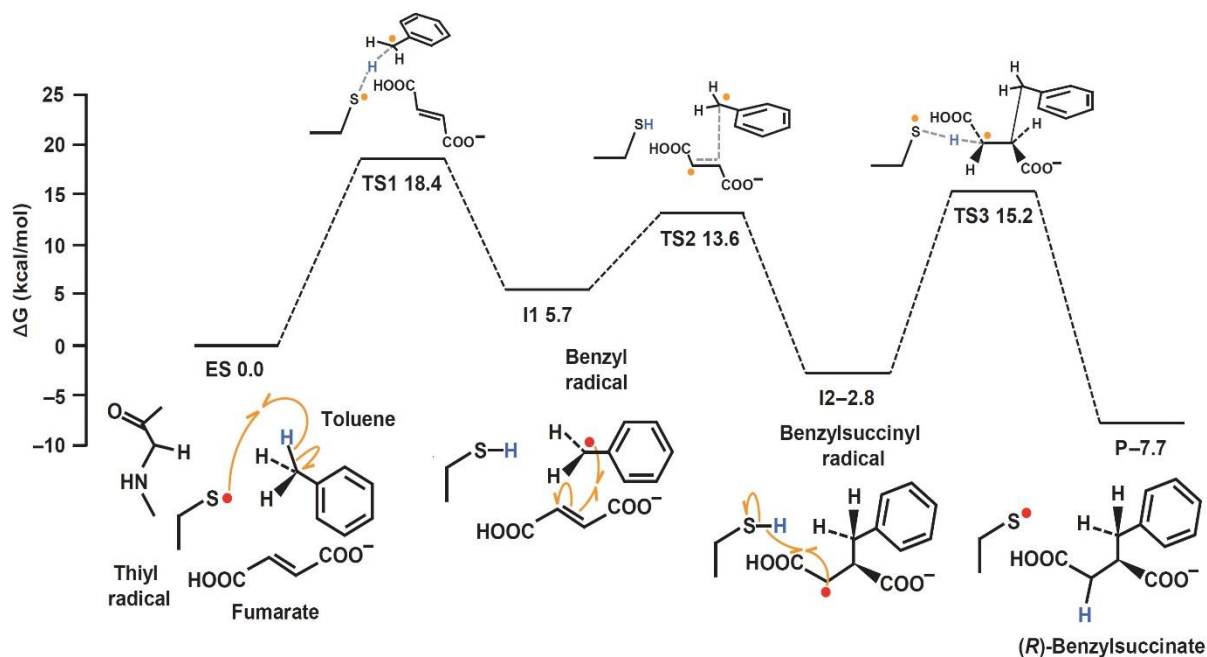


Abbildung 10: DFT-Modell der Gibbs freien Enthalpie für den Reaktionsmechanismus von BSS und berechnete Energiewerte der vorgeschlagenen Übergangszustände und Zwischenprodukte ES = Enzymsubstratkomplex, TS1 = erster Übergangszustand, I1 = erstes Zwischenprodukt, TS2 = zweiter Übergangszustand, I2 = zweites Zwischenprodukt, TS3 = dritter Übergangszustand, P = Produkt. Orange Pfeile zeigen die Neuordnung von Bindungen an, Punkte (rot) zeigen vollen radikalem Zustand und (orange) halben radikalem Zustand. Graue gestrichelte Linien zeigen Übergangsbindungen an. Entnommen aus (Rabus, et al. 2016, Heider, Szaleniec et al., 2016) ^{[2112][21]}.

1.4.3 BssD liefert das aktive Glycylradikal in BSS

Auch (R)-Benzylsuccinat-Synthase verfügt wie die anderen Glycylradikal-Enzyme über ein aktivierendes Enzym, das das Radikal posttranslational in die α -Polypeptidkette einführt und damit das Enzym in den aktiven Zustand versetzt. Das aktivierende Enzym der (R)-Benzylsuccinat-Synthase wird von *bssD*, dem ersten Gen im *bss*-Operon, kodiert (Abbildung 6).

Die abgeleitete Proteinsequenz des *bssD*-Gens aus *T. aromatica* zeigt starke Ähnlichkeit mit anderen Aktivatoren bekannter Glycylradikal-Enzyme wie der p-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* und der Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum*.

Wie bei allen aktivierenden Enzymen wird das [4Fe-4S]-Cluster ungewöhnlicherweise durch ein Cystein-Motiv koordiniert, das nur aus drei konservierten Cysteinresten besteht.

Die vierte Koordinationsstelle des Clusters bleibt dadurch unbesetzt und dient der Bindung des Co-Substrats S-Adenosylmethionin (SAM), das zur Bildung eines Glycylradikals verwendet wird.

In diesem Fall wird ein Elektron vom Eisen-Schwefel-Cluster auf das SAM-Kosubstrat übertragen, wodurch es homolytisch gespalten wird und ein Adenosylradikal und Methionin entsteht.

Das Adenosylradikal wird zur Bildung des Glycylradikals einer der beiden großen α -Untereinheiten im aktiven Zentrum des BSS verwendet, weshalb auf dem SDS-Gel eine für Glycylradikal-Enzyme charakteristische Doppelbande zu sehen ist.

Bis zu vier weitere offene Leserahmen finden sich im *bss*-Operon (*bssEFGH*, Abbildung 6). Diese werden zusammen mit *bssDCAB* kotranskribiert ^[16] und sind daher wahrscheinlich auch am ersten Schritt des anaeroben Toluolabbaus beteiligt. Die Aminosäuresequenz des BssE-Proteins zeigt Sequenzähnlichkeit u.a. mit einer ATP-bindenden Enzymklasse. Das *bssH*-Gen kodiert möglicherweise für ein membrangebundenes Transportprotein, aber trotz der Ähnlichkeit bleibt die genaue Funktion dieser vier Gene unklar ^[22].

1.4.4 β -Oxidation von Benzylsuccinat durch *bbs* Operon

Der β -Oxidationsweg von Benzylsuccinat durch das *bbs*-Operon umfasst den sequentiellen Abbau des Benzylsuccinatmoleküls in Acetyl-CoA, das von der Zelle weiter metabolisiert werden kann. Der Weg besteht aus mehreren enzymatischen Reaktionen, von denen jede durch ein spezifisches Enzym katalysiert wird, das von den Genen im *bbs*-Operon codiert wird (*bbsA*, *bbsB*, *bbsC*, *bbsD*, *bbsE*, *bbsF* und *bbsG*) (Abbildung 11).

Der Weg beginnt mit der Aktivierung von Benzylsuccinat durch das Enzym BbsA, das aus Benzylsuccinat und CoA Benzylsuccinyl-CoA bildet. Benzylsuccinyl-CoA wird dann von BbsB dehydriert, um Benzoyl-CoA und ein Molekül Acetyl-CoA zu produzieren. BbsC hydriert Benzoyl-CoA zu 3-Hydroxybenzoyl-CoA, das von BbsD zu 3-Oxoadipyl-CoA und einem Molekül NADH dehydriert wird. BbsE spaltet 3-Oxoadipyl-CoA, um Succinyl-CoA und ein weiteres Molekül Acetyl-CoA zu bilden.

Schließlich wird Succinyl-CoA von BbsF in Succinat umgewandelt, wobei gleichzeitig ein Molekül ATP produziert wird. Die während des Weges produzierten Acetyl-CoA-Einheiten können dann in den Citratzyklus eintreten oder für andere biosynthetische Prozesse in der Zelle verwendet werden.

Das *bbs*-Operon wird durch den Transkriptionsaktivator BbsR reguliert, der auf das Vorhandensein von Benzylsuccinat und verwandten aromatischen Verbindungen reagiert. BbsR bindet stromaufwärts des Operons und aktiviert die Transkription und Expression der Gene im Operon. Insgesamt ist das *bbs*-Operon ein wesentliches genetisches Element, das es mehreren bakteriellen Arten, wie *Thauera aromatica* und *Azoarcus evansii*, ermöglicht, aromatische Verbindungen unter anaeroben Bedingungen abzubauen ^[23].

1.5 Anaerober Abbau von Methylnaphthalin durch sulfatreduzierendes Bakterium

Methylnaphthalin ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, der häufig in Erdöl und petrochemischen Produkten vorkommt und aufgrund seiner Persistenz und Toxizität als bedeutender Umweltschadstoff gilt. Daher ist der anaerobe Abbau von Naphthalin durch sulfatreduzierende Bakterien ein spannendes Forschungsgebiet, das wichtige Auswirkungen auf die Umweltsanierung hat. Naphthyl-2-methylsuccinat (NMS) und Benzylsuccinat (BS) sind strukturell ähnliche Verbindungen, die an anaeroben Abbauwegen von aromatischen Kohlenwasserstoffen beteiligt sind. Die für ihre Bildung verantwortlichen Enzyme, die Naphthyl-2-methylsuccinat-Synthase (NMS-Synthase) und die Benzylsuccinat-Synthase (BSS), unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität und ihrem Reaktionsmechanismus ^{[40][47]}.

NMS und BSS gehören beide zur Familie der Glycylradikal-Enzyme und enthalten ein konserviertes Glycin-Motiv, das für ihre Aktivität wesentlich ist. Während die BSS jedoch spezifisch für die Bildung von Benzylsuccinat aus Toluol oder verwandten Alkylbenzolen ist, ist die NMS spezifisch für die Bildung von Naphthyl-2-methylsuccinat aus 2-Methylnaphthalin ^[10]. Der Reaktionsmechanismus der BSS beinhaltet die Bildung eines radikalischen Zwischenprodukts, das durch die reduktive Spaltung des Glycinmotivs entsteht. Dieses radikalische Zwischenprodukt greift dann die C-C-Bindung von Toluol oder verwandten Alkylbenzolen an, was zur Bildung des Benzylsuccinatprodukts führt. Im Gegensatz dazu beruht der Reaktionsmechanismus der NMS-Synthase auf einem ähnlichen radikalischen Mechanismus, wobei jedoch der Angriff auf den Naphthalinring anstelle einer Alkylgruppe erfolgt.

Die Aktivierung von 2-Methylnaphthalin durch Fumarataddition an die Methylgruppe ist ein wichtiger Schritt im anaeroben Abbauweg dieser Verbindung ^[46]. Diese Reaktion wird durch eine Klasse von Enzymen katalysiert, die als Fumaratadditionsenzyme bekannt sind und häufig in sulfatreduzierenden Bakterien und anderen anaeroben Mikroorganismen vorkommen.

Nach der Aktivierung unterliegt 2-Methylnaphthalin der β -Oxidation, einem Prozess, bei dem nacheinander zwei Kohlenstoffeinheiten aus der Alkylkette des Moleküls entfernt werden. Diese Reaktion wird durch eine Reihe von Enzymen katalysiert, darunter Acyl-CoA-Dehydrogenasen, Enoyl-CoA-Hydratasen und β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen ^[12].

Der erste Schritt der β -Oxidation ist die Umwandlung von 2-Methylnaphthalin-CoA in 2-Methyl-3-oxononanoat-CoA durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase. Bei dieser Reaktion wird eine Zwei-Kohlenstoff-Einheit aus dem Molekül entfernt und ein Molekül mit einer Ketogruppe an der β -Position

erzeugt. Das 2-Methyl-3-oxononanoat-CoA wird dann durch eine Enoyl-CoA-Hydratase zu 2-Methyl-3-hydroxybutyrat-CoA hydratisiert, gefolgt von der Entfernung einer zweiten Zwei-Kohlenstoff-Einheit durch eine weitere Acyl-CoA-Dehydrogenase, um 2-Methyl-2,3-epoxybutyrat-CoA zu erhalten. Schließlich wird das 2-Methyl-2,3-epoxybutyrat-CoA durch eine β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase in Acetyl-CoA und Succinyl-CoA umgewandelt (Abbildung 12) ^[10]. Das Acetyl-CoA kann dann in den Zitronensäurezyklus gelangen und weiter verstoffwechselt werden, um Energie für die Zelle zu erzeugen. Das Succinyl-CoA kann ebenfalls in den Citratzyklus gelangen oder über verschiedene biochemische Wege in andere Metaboliten umgewandelt werden.

Die Naphthyl-2-methylsuccinat-Synthase (NMS) katalysiert den ersten Schritt im anaeroben Abbauweg von 2-Methylnaphthalin. Der NMS-Enzymkomplex besteht aus drei Untereinheiten, NmsA, NmsB und NmsC. NmsA ist die größte Untereinheit und katalysiert die Hauptreaktion im NMS-Enzymkomplex, nämlich die Bildung von Naphthyl-2-methylsuccinate aus Fumarat und Methylnaphthalin. NmsB ist eine kleine Untereinheit, die für die Aktivität von NmsA unerlässlich ist und vermutlich an den Elektronentransferreaktionen beteiligt ist, die während des katalytischen Zyklus von NMS stattfinden.

Die Untereinheit NmsC enthält eine SAM-Radikal-Domäne, die für die Bildung des Glycyl-Radikals an NmsA erforderlich ist, das für die katalytische Aktivität von NMS wesentlich ist. Die NmsA-Untereinheit von NMS enthält mehrere konservierte Motive, darunter die Glycylradikalstelle, die Substratbindungsstelle und die Kofaktorbindungsstelle. Die Glycylradikalstelle ist für die Bildung des Glycylradikals an NmsA verantwortlich, das für die katalytische Aktivität von NMS wesentlich ist. Die NmsB-Untereinheit von NMS enthält ein [4Fe-4S]-Eisen-Schwefel-Cluster, von dem man annimmt, dass es an den Elektronentransferreaktionen beteiligt ist, die während des katalytischen Zyklus von NMS stattfinden ^[33].

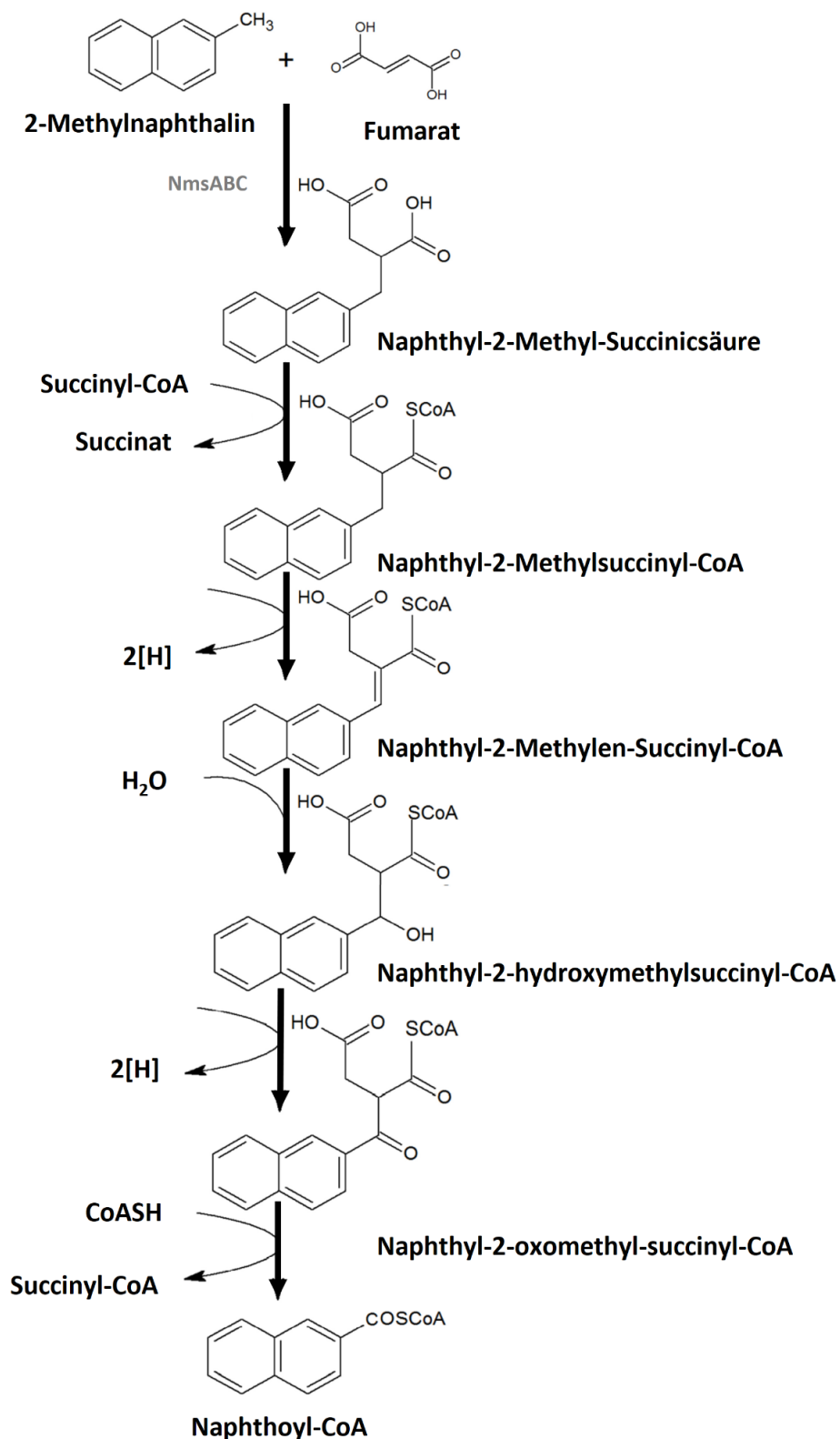


Abbildung 12: Ein Vorschlag für den Weg des anaeroben Abbaus von 2-Methylnaphthalin zu dem zentralen Zwischenprodukt 2-Naphthoesäure, wobei im ersten Schritt Fumarat durch die Naphthyl-2-Methyl-Succinat-Synthase (*nmsABC*) an die Methylgruppe von 2-Methylnaphthalin addiert wird. Naphthyl-2-Methyl-Succinat wird wahrscheinlich durch eine Succinyl-CoA-abhängige CoA-Transferase aktiviert, gefolgt von einer Oxidation zu Naphthyl-2-Methylen-Succinyl-CoA. Die nachfolgenden Reaktionen erfolgen durch Beta-Oxidation und führen zur Bildung des zentralen Zwischenprodukts, dem Naphthoyl-CoA. (modifiziert nach Annweiler et al., 2000)^{[10] [33]}.

1.6 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden unter Verwendung des Stammes *Aromatoleum evansii* KB740 mehrere neue Mutationen mit ausgetauschtem Arg508 erzeugt, wobei Arg durch eine der folgenden hydrophoben Aminosäuren ersetzt wird: Ile, Leu, Phe und die polaren neutralen Seitenketten Gln. Alle Mutanten werden mit dem Substrat Acetylacrylsäure sowie anderen Fumarat-Analoga wie Crotonsäure, Glutaconsäure und Pentansäure getestet.

Des Weiteren wird die Relevanz und Bedeutung der Fe-S-Cluster eingehend untersucht. Dazu werden in dieser Arbeit drei gezielte Punktmutationen an den beiden Eisen-Schwefel-Clustern der β - und γ -Untereinheiten von BSS durchgeführt. Eine Doppelmutante in der BSS γ -Untereinheit (Cys4Ala Cys7Ala) sowie eine Einzelmutteration (Cys37Ala) und eine Doppelmutante (Cys19Ala Cys22Ala) in der BSS β -Untereinheit wurden erzeugt, um die genaue Funktion dieses Clusters zu erforschen.

Da die Art der Fumaratbindung wahrscheinlich den größten Beitrag zur Bestimmung der stereospezifischen Reaktion leistet, werden in dieser Arbeit die Aminosäuren Trp613 und Gln707 ausgetauscht, um möglicherweise die Stereospezifität des Endprodukts zu beeinflussen. Zu diesem Zweck werden vier Einzelmutteranten erzeugt, zwei mit Trp613 (Trp613Phe/His) und zwei weitere Einzelmutteranten für Gln707 (Gln707Asn/Glu).

Um das Substratspektrum des Enzyms zu erweitern, werden auch zwei Einzelmutteranten mit ausgetauschtem Tyr197 erzeugt (Tyr197Ser oder Tyr197Phe). Diese Mutanten werden ebenfalls mit anderen Toluolanaloga wie Kresol-Isomeren, Xylen-Isomeren, 5-Methylindol usw. getestet.

Zusätzlich wird ein nahezu homologes Überexpressionssystem für aktive Naphthyl-2-methylsuccinatsynthase in *Azoarcus evansii* aufgebaut und die Aktivität mit dem nativen Substrat der rekombinanten Proteine wird untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität p.A. (pro Analysis) von folgenden Herstellern bezogen: Alpha Aeser (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Gase wurden von Praxair (Düsseldorf) und Nippon Gases (Düsseldorf) bezogen. Enzyme stammen von New England Biolabs (Frankfurt), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Stämme

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (rK-mK+), λ -	Woodcock et al., 1989
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB-mB-) λ [malB+]K-12(λ S)	Studier und Moffatt, 1986
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>hsdR17</i> , <i>endA</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , NxS, integriertesRP4-2 (Tc::Mu, Km,::Tn7), Mobilisatorstamm	Simon et al., 1983
<i>Escherichia coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ M15 RP4 1360 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341</i> ::[<i>erm pir</i>]	Dehio und Meyer, 1997
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Wildtyp	Rabus und Widdel, 1995
<i>Aromatoleum evansii</i> KB740 ^T	Wildtyp	Anders et al., 1995

2.2.2 Plasmide

Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmide	Genotyp, Eigenschaften	Referenz
pASG3_mob ⁺ _Bss_Strep+bssD-Txn (mit <i>E. coli</i> ori)→in dieser Arbeit	Amp ^R (<i>bla</i>), Plasmid für die homologe Überproduktion von BSS in <i>A. aromaticum</i> , <i>A. Evansii</i> und <i>E. coli</i>	Dissertation M. Hilberg, 2012
pASG3'-bss-Wt-Strep		
pASG3bssStrepArg508Lys	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	Dissertation D.Seyhan, 2016
pASG3bssStrepArg508Ile	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepArg508Leu	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepArg508Gln	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	Dissertation D.Seyhan, 2016
pASG3bssStrepArg508Phe	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepTyr197Phe	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepTyr197Ser	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepCys4-7Ala	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepCys19-22Ala	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepCys37Ala	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepGln707Glu	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepGln707Asn	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit

pASG3bssStrepTrp613His	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3bssStrepTrp613Phe	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, BSS	diese Arbeit
pASG3_Nms_Strep_ori	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>tetR</i> , pASG3'-Strep-Tag+ori1, Nms	diese Arbeit

2.2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert. Die Stammlösungen haben eine Konzentration von 100 µM.

Tabelle 3: In dieser Arbeit Verwendete Oligonukleotide.

*veränderte Sequenz ist in Rot.

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
1	Arg508Ile_for	GGCGCAGAAGACCATATCCGAGGGCGG
2	Arg508Leu_for	GGCGCAGAAGACCTATCCGAGGGCGG
3	Arg508Gln_for	GGCGCAGAAGACCCAGTCCGAGGGCGG
4	Arg508Phe_for	GGCGCAGAAGACCTTCTCCGAGGGCGG
5	Rev_Arg508 Ile\Leu \Gln\ Phe	TTGCGCCGGCCGGCCAGCCCCGGC
6	Tyr197→Ser_for	CGGTTTTCGCAACCGGCTCCAACAGC
7	Tyr197→Phe_for	CGGTTTTCGCAACCGGCTTCAACAGC
8	Tyr197→Ser/Phe_Rev	CGTCTCGTACGGCGGAATCAC
9	γ -Cys4-7Ala_for	CTTTTTTCAATTCCAGAGGACGCGGACG
10	γ -Rev_Cys4-7→Ala	AAAGCAGCGTCCTTGCGGTCGTCATTTG
11	β- Cys19-22→Ala_for	GCAAACGCCCGATCCGACCGATCCGC
12	β- Rev_Cys19-22→Ala	CATTTGGCCTTGCGGGCGGGCGGGTGT
13	β- Cys37→Ala_for	CCAAGCCACCGTTAACCGCCATGCGATGG
14	β- Rev_Cys37→Ala 2	CGGATCCAGCGTTTCCACACGCCGC
15	Gln707Glu_for	GCCTACGGGGGAGGCGGTTCGGCCTCTAC
16	Gln707Asn_for	GCCTACGGGGGAATGCGGTTCGGCCTCTAC
17	Rev_Gln707Glu\Asn	TTCACCGGACCGCCCGAGTAGTTGATGTTCTTC
18	Trp613His_for	CGGAACAGCCCAATGGCCACCATAACCCG

19	Trp613Phe_for	CGGAACAGCCCAATGGCTTCATAACCCG
20	Rev_Trp613His\Phe	ACAGGGCGTTCGCGTCCATGCCAGTTCCA
21	Seq-Primer-Tyr197	GCAGTGCAGGACTATCTGAAGAGC
22	γ-Seq-Primer	GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
23	β-Seq-Primer	CGGAAAAGCACCAGGACCTGATCGTGC
24	Trp613&Gln707-Seq-Primer	CGACCAGCTCTGGGAAGCCTCCGC
25	Seq-Primer Arg	CGACGGGCTCGGCTATCCTTCG
26	Rev-Seq-PrimerArg	CGCGGCATCTCCTCGTAGCC
27	16s_Fd	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
28	16s_Rd	AAGGAGGTGATCCAGCC
29	pASG_for	GAGTATTTTACCACTCCCT
30	pASG_rev	CGCAGTAGCGGTAAACG
31	NmsA for	AAGCTAGCTGGTCACATCCCAATTTGAGAAG GGTACCAGAAAAAATGTTGCCTTAAATATTTG
32	NmsD rev	TTAAGCTTTAGCTATCCTTGGCATTATCC
33	NmsC for	GGTCTAGATAAGGAGGAGAAAATGGCTGAA TGTAAGAGTGTCG
34	NmsC rev	TTGCTAGCGCTCATTGCTGTCTCC TCACACTTTCTTAACAAAGC

2.3 Bakterienkultivierung

2.3.1 Nährmedien und Supplemente

Alle Nährmedien und Puffern, wenn nicht anders angegeben, wurden mit Destilliertem Wasser hergestellt und nach Anaerobisierung bei 121 °C und 2 bar Druck sterilisiert. Um alle Kulturmedien, Supplemente und Puffern sauerstofffrei anzufertigen, wurden alle Flaschen mit einem Gummistopfen verschlossen und anaerobisiert. Die Anaerobisierung erfolgt durch Entgasung (Vakuum) und Begasung (Stickstoff), die je nach Größe der zu anaerobisierenden Flaschen in 15-20 Zyklen von jeweils 1 bis 3 Minuten durchgeführt wird.

Tabelle 4: Luria Bertani Medium (Miller, 1972) (LB Medium) für die Kultivierung von *E. coli*.

*Zugabe nur bei der Herstellung des festen Mediums

Komponente	Menge [g/l]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
Natriumchlorid (NaCl)	10
*Agar	15

Tabelle 5: Nitratreduzierer-Medium (NM) für die Kultivierung von *A. evansii* und *A. aromaticum*.

Komponente	Menge [mg/l]	Konz.im Medium [mM]
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	530	10
Magnesiumsulfat (Mg[SO ₄].7H ₂ O)	200	1.7
Kaliumnitrat (KNO ₃)	1000	10
Calciumchlorid (CaCl ₂ . 2H ₂ O)	25	0.2
Na-benzoate (C ₇ H ₅ NaO ₂)	500	3.5
*Agar	20 g	-

Das Medium und die Supplemente wurden getrennt hergestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die Supplemente mit der entsprechenden Menge (Tabelle 6) für das Medium zugesetzt und gegebenenfalls mit Antibiotika (Tabelle 12) versetzt.

*Zugabe nur bei der Herstellung der Mating- Agarplatten.

Tabelle 6: Die Menge der Supplemente im Medium

Komponente	Menge [ml/l]	Tabelle
KH ₂ PO ₄ (1M)	6	Tabelle 8
K ₂ HPO ₄ (1M)	26	Tabelle 8
Spurenelementlösung SL10 (X1000)	10	Tabelle 9
Vitaminlösung VL-7 (X1000)	5	Tabelle 11
Selenit-Wolframat-Lösung (X1000)	1	Tabelle 10
Antibiotika	1	Tabelle 12

Tabelle 7: Zusätzliche Supplemente bei der Herstellung von Mating-Platten.

Komponente	Menge	Konz.
Trypton	10 [g/l]	
Pyruvat	5 [ml/l]	1M
Na-Acetat	5 [ml/l]	1M

Tabelle 8: Phosphat-Puffer-System

Komponente	Menge [g/l]	Konz.
KH_2PO_4	136	1 M
K_2HPO_4	174.2	1 M

Tabelle 9: Spurenelementlösung SL10 (X1000) (Widdel et al., 1983) ^[45].

Komponente	Menge [mg/l]
Na_2EDTA	5200
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2100
H_3BO_3	30
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24
CuCl_2	29
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	144
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36

* Der pH wurde nach der Herstellung mit NaOH auf 6,5 eingestellt.

Tabelle 10: Selenit-Wolframat-Lösung

Komponente	Menge [mg/l]
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4
$\text{Na}_2 \text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8
NaOH	400

Tabelle 11: Vitaminlösung 7 (VL-7) (1000x) nach Pfennig (1978).

Komponente	Menge [g/l]
4-Aminobenzoesäure	80
Ca-D-(+)-Pantothenat	100
Cyanocobalamin (B12)	100
D (+) –Biotin	20
Nikotinsäure	200
Pyridoxamin-HCl (B6)	300
Thiamindichlorid (B1)	200

*Vitaminlösung wurde mit einem 0,2 µm Sterilfilter sterilfiltriert und anaerobisiert.

Tabelle 12: Verwendete Antibiotika und Induktionsmittels.

Komponente	Stammlösung [mg/ml]	Endkon. im Medium
Ampicillin	100	100 [µg/l]
Streptomycin	50	50 [µg/l]
Diaminopimelinsäure (DAP)	1 (50mM)	0.1 [µg/l]
Anhydrotetracyclin (AHT)	2 (gelöst in DMF)	0.2 [µg/l]

Alle Antibiotika wurden im Wasser ausgelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgt vor der Inokulation aus einer Stammlösung, wenn das Medium autoklaviert, ausreichend abgekühlt und supplementiert ist.

DAP wurde nur bei der Herstellung von Mating-Platten hinzugefügt, wenn diese für eine Konjugation mit dem Stamm *Escherichia coli* WM3064 verwendet wurde.

Tabelle 13: Molekularbiologische Kits und Molekulargewichtsstandards

Kit	Hersteller
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific (USA)
GeneJET™ PCR Purification Kit	Thermo Scientific (USA)
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Scientific (USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific (USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)

2.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die aerobe Kultivierung von *E. coli* wurden Reagenzröhrchen mit 5 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und mit einer Kolonie der Transformation-Platte beimpft. Diese wurden bei 37 °C über Nacht geschüttelt inkubiert und am nächsten Morgen für weitere Bearbeitung verwendet.

2.3.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Zunächst wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und dann mit 1 bis 10 µl (10-40 ng) Plasmid-DNA bzw. Ligationsprodukt gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde dann 30 min lang auf Eis gelegt, dann Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C im Wasserbad und anschließend sofort 30 sec auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde mit L.B Medium auf 1 ml aufgefüllt und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde verschiedene Volumina (100 µl, 200 µl, Rest) sowie eine 1:10-Verdünnung auf LB-Agarplatten (Tabelle 4) ausgestrichen oder Der Reaktionsansatz wurde 3 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt, dann wurde das Zellpellet resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Alle Platten müssen über Nacht bei 37 °C inkubiert werden.

Die LB-Agarplatten wurden unter sterilen Bedingungen gegossen und, falls erforderlich, mit dem entsprechenden Antibiotikum präpariert.

2.3.4 Überproduktion von BSS in *E. coli* Zellen

50 ng Plasmid wurden in 50 µL chemisch kompetente *E. coli* transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/mL, im Folgenden als LB-Amp100 bezeichnet Tabelle 12) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde in 100 mL LB-Amp100 angeimpft, und diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die gesamte Starterkultur wurde in 5 L LB-Amp100 eingeimpft, die gleichmäßig auf zwei 5 L Schüttelkolben aufgeteilt wurden. Die Kulturen wurden bei 37 °C kultiviert, bis die OD_{578 nm} 0,6 erreichte, zu diesem Zeitpunkt wurde AHT (0.2 µg/l (Tabelle 12)) zugegeben, um die Expression zu induzieren. Nach Induktion mit dem entsprechenden Induktor (Tabelle 12) wurden die Überexpressionskulturen für 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur weiter inkubiert und in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578 nm} von 2,0 bis 4,0 geerntet.

2.3.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) hergestellt.

Nach einer erfolgreichen Transformation des interessierenden *E. coli*-Stammes wurde mit einer einzelnen Kolonie eine 5-ml-LB Nachtkultur beimpft. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur in 250 ml SOB-Medium (Tabelle 14) beimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,4 bis 0,6 bei RT und 200 rpm kultiviert. Dann wurde die Zellsuspension zunächst 10 min lang auf Eis gelegt und anschließend 10 min bei 4 °C mit 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 80 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis und anschließend eine zehnminütige Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C. Am Ende wurden dann die Zellpellet in 20 ml Transformationspuffer (Tabelle 14) aufgenommen und mit 7 % (v/v) sterilem DMSO gemischt. Die resuspendierten Zellen wurden nach 10 min auf Eis Inkubation in je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 14: verwendete Puffer zur Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli*-zellen

Puffer	Komponente	Konzentration
SOB-Medium	Trypton	2 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	10 [mM]
	KCl	2.5 [mM]
	MgCl ₂	10 [mM]
	MgSO ₄	10 [mM]
Transformationspuffer **pH 6,7	PIPES	10 [mM]
	CaCl ₂	15 [mM]
	KCl	250 [mM]
	*MnCl ₂	55 [mM]
	* MnCl ₂ wurde nach Autoklavieren zugegeben.	
**pH wurde mit KOH vor Autoklavieren eingestellt.		

2.3.6 Konjugation von *A. Evansii*

Für die Konjugation wurden ein ÜK des Donorstammes *E. coli* WM3064 und eine Kultur des Rezipientenstammes *A. Evansii* WT verwendet. Die ÜK wurden in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 0,3 mM Diaminopimelinsäure (DAP) bei 200 U/min und 37 °C kultiviert. Der Rezipient wurde anaerob in NM-Flüssigmedium beimpft und zwei Tage lang bei 30 °C als Standkultur kultiviert. Für die Konjugation wurden die Kulturen in einem Verhältnis von (1,75: 0,25) (Rezipient/Donor) in einem 2-Milliliter-Eppendorf-Röhrchen entsprechend der OD_{578} gemischt und fünf Minuten lang bei 13000 rpm

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml supplementiertem NM-Medium gewaschen und zentrifugiert. Das finale Pellet wurde in 50 µl NM-Medium resuspendiert und über Nacht bei 28 °C aerob auf MATE-Festmedium in der Mitte ohne Ausplattieren inkubiert.

Die Zellen wurden dann mit einem Spatel von der Platte entfernt und in einem Eppendorf-Gefäß mit 600 µl supplementiertem NM-Medium resuspendiert und 2-3 Stunden lang unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Anschließend werden verschiedene Verdünnungen auf NM-Festmedium (ohne DAP) ausplattiert und bei 28 °C aerob und anaerob inkubiert. Die so entstandenen Einzelkolonien wurden in NM-Flüssigmedium überimpft und kultiviert. Schließlich wurde eine 16s-rRNA-Analyse durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich um *A. evansii* KB740 handelt.

2.3.7 Kultivierung von *Aromatoleum evansii*

A. evansii Kulturen wurden in 500 ml verschlossenen Flaschen unter anaeroben Bedingungen bei 28 °C in supplementiertem NM Medium mit Benzoat als einzigem Substrat inkubiert und gezüchtet (Tabelle 5). Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm überwacht.

Diese Kulturen dienten als Vorkulturen für 2 L Kulturen, die für eine Überproduktion verwendet wurden. Die Kulturen wurden diskontinuierlich mit Na-Benzoesäure als C-Quelle (3,5µM) und Kaliumnitrat (10µM) gefüttert.

2.3.8 Überproduktion von BSS und NMS in *Aromatoleum evansii*

Für die Überproduktion von Bss wurden *Aromatoleum evansii*-Vorkulturen, die mit dem Expressionsvektor pASG3bssstrep konjugiert waren, verwendet. Die BSS-Überproduktion wurde anaerob in einem 10-Liter-Maßstab durchgeführt. Die Flaschen wurden mit Initialer OD₅₇₈ (0.05) beimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die typische Verdopplungszeit von *A. evansii* betrug 3 Stunden. Am nächsten Tag wurden die Kulturen bei einer OD zwischen 0,5 und 0,7 mit 200 µl (100 µl/l) AHT (2 mg/ml in DFM) induziert und erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zunächst wurden die Zellen anaerob durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C geerntet. Anschließend wurden DTT, DNase und Lysozym zugegeben, in 1 Volumen (w/v) von 20 mM TEA/HCl (pH 7.8) resuspendiert und mittels French®-Press-Zelle aufgeschlossen. Die Zellen wurden durch 3 Passagen bei 137 MPa lysiert und direkt in ein entgastetes Hungate-Tube überführt, die mit der French®-Press-Zelle im Zelt verbunden ist. Das Lysat wurde eine Stunde bei 35000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das später für die Bss- bzw. Nms-Aktivität benutzt wurde. Die Proteinkonzentrationen des Überstands (Zellextrakte) wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt, wobei Rinderserum Albumin als Standard.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DANN

2.4.1.1 Mittels dem GeneJet Plasmid-Minipräp Kit

Das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) wurde für die schnelle Isolierung von Plasmid-DNA für Restriktions- und PCR-Analysen verwendet. Es wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Elution der Plasmid-DNA on der Säule erfolgt dann mit dest. H₂O.

2.4.1.2 Mittels alkalischer Lyse

Die Plasmide wurden mit selbst hergestellten Puffern isoliert (Tabelle 15). Zu diesem Zweck wurden 3 ml einer Übernachtskultur verwendet und 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl Puffer 1 mit RNase (Tabelle 15) resuspendiert und dann mit 300 µl Puffer2 durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 300 µl Puffer 3 zugegeben und erneut vollständig gemischt (nicht schütteln, nicht vortexen). Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben dann 15 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut 15 Minuten lang zentrifugiert. Um die DNA zu fällen, wurde der klare Überstand erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 650 µl Isopropanol gründlich gemischt. Nach 30 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und erneut 10 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurde der restliche Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol versetzt und erneut 10 Minuten lang zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und die DNA Pellet wurden über Nacht an Luft getrocknet, um alle Alkoholrückstände zu verdampfen. Schließlich wurden die DNA Pellet in 50 µl destilliertem Wasser aufgelöst.

Tabelle 15: Zusammensetzung der alkalische Lyse-Puffer

Puffer	Komponente	Konzentration
Puffer1 (pH 8)	Glucose	50 [mM]
	Tris/HCl	50 [mM]
	EDTA	10 [mM]
	*RNase	0,1 [mg/ml]
Puffer2**	NaOH	200 [mM]
	SDS	1 %
Puffer3 (pH 2.5)	Kaliumacetat	3 [M]

* RNase muss separat vorbereitet werden (10 mg/ml RNase in 5 mM Tris/HCl, pH 8, 10 min. auf 100 ° C erhitzt und auf Eis gekühlt).

** Muss vor Gebrauch frisch angesetzt werden

2.4.2 DNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das NanoDrop ND 1000 Spektralphotometer gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Das Photometer maß die Absorption bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm und berechnete die DNA-Konzentration in ng/μl sowie die Reinheit der DNA.

2.4.3 Restriktionsanalyse

Die Behandlung einer DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen dient zur komparativen Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Die Restriktionsenzyme wurden von verschiedenen Firmen bezogen und wie in den Herstelleranweisungen beschrieben verwendet.

Ein Restriktionsansatz (Tabelle 16) enthielt 0,5-3 μg DNA und wurde abhängig von den eingesetzten Enzymen für eine bestimmte Zeit (nach Herstellerangaben) bei 37 °C inkubiert.

Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und auf die erwartete Größe analysiert.

Tabelle 16: Restriktionsansatz

Komponente	Menge [mg/l]
DNA	0.5-3 μg
Puffer	3 μl
Restriktionsenzym	2 μl
Dest. H ₂ O	Ad 20 μl

2.4.4 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Analyseverfahren zur Trennung von DNA und RNA nach ihrer Größe. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die Moleküle unterschiedlich. Kürzere DNA-Fragmente wandern schneller, während die längsten Fragmente näher am Ursprung des Gels bleiben, was zu einer Trennung nach Größe führt. Die Färbung mit Ethidiumbromid ergibt ein charakteristisches Bandenmuster, das unter einer UV-Licht betrachtet werden kann.

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (Tabelle 17) durch Kochen in der Mikrowelle aufgelöst. Die Proben wurden mit 6x Loading-Dye (Thermo Scientific, USA) versetzt und auf das Gel aufgetragen, wobei für etwa 25 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt wurde. Als Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Mix von Thermo Scientific mit Fragmenten von 100 – 10000 Basenpaaren verwendet. Zuletzt wurde das Gel etwa 15 Minuten lang in einem Färbebad mit Ethidiumbromid (1 μg/ml in TAE-Pufferl) inkubiert, und die Banden wurden anschließend mit UV-Licht (λ = 312 nm) sichtbar gemacht.

Tabelle 17: TAE-Puffer

Komponente	Konzentration
Tris/HCl	40 [mM]
Essigsäure	11,42 %
Na ₂ EDTA	2 [mM]
*pH 8.5 mit HCl eingestellt	

2.4.5 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wurden etwa 800 - 2000 ng Plasmid-DNA bzw. 30 ng pro 100 Basen PCR-Fragment mit 200 pmol des jeweiligen Oligonukleotids in in einem Volumen von 20 µl gemischt. Die Sequenzierung wurde mittels der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) von Seqlab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

2.4.6 Primer Phosphorylierung

Für eine Ligation oder andere Klonierungs-Planung kann es notwendig sein, ein DNA-Fragment zu phosphorylieren. Primer für solche Zwecke können mit Hilfe der T4 Polynucleotide Kinase sehr einfach phosphoryliert werden. Der Primer wurde wie in (Tabelle 18) beschrieben angesetzt, dann für 30 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend 20 min bei 65 °C inaktiviert. Das Präparat wurde dann direkt verwendet oder bei 20 °C eingefroren.

Tabelle 18: Ansatz zur Primer-Phosphorylierung

Komponente	Menge
DNA (Forward oder reverse Primer)	bis zu 300 pmol der 5'-Termini
T4 PNK Reaction Buffer (10X)	5 µl
ATP (10 mM)	5 µl
T4 PNK	1 µl (10 Units)
Dest. H ₂ O	Ad 50 µl

2.4.7 Ligation

Der letzte Schritt bei der Konstruktion eines rekombinanten Plasmids ist die Bindung zwischen der verdauten Plasmid-DNA und der Insert-DNA. Die DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids und der 5'-Phosphatgruppe eines anderen in einer ATP-abhängigen Reaktion.

Das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA (ideal 1:3) hängt von der Größe und Konzentration der beiden Komponenten ab, die mit dem NanoDrop-Photometer bestimmt wurde. Eine Standard-Ligationsmischung wurde nach (Tabelle 19) angesetzt. Die Reaktion wurde entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend muss das Enzym 10 Minuten lang bei 65 °C inaktiviert werden. Nach dem Abkühlen der Ligationsreaktion können 1-5 µl der Reaktion in 50 µl kompetente Zellen transformiert werden.

Tabelle 19: Ligationsansatz

Komponente	Menge
*T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 µl
Vector DNA	Vektor zu Insert etwa 1: 3
Insert DNA	Vektor zu Insert etwa 1: 3
T4 DNA Ligase	1 µl
Dest. H ₂ O	Ad 20 µl
* Der T4-DNA-Ligase-Puffer sollte aufgetaut und bei Raumtemperatur resuspendiert werden.	

2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik (Mullis et al., 1986, Saiki et al., 1985, Saiki et al., 1988) basiert auf den natürlichen Replikationsprinzipien in der Zelle, um schnell und präzise zahlreiche DNA-Kopien zu gewinnen.

Die wesentliche Komponente ist das DNA-Fragment, das als Vorlage dienen kann, und die Sequenz an beiden Enden der interessierenden Region, die sog. Forward- und Reverse-Primer (ca. 18-22 Basenpaare). Zum Aufbau der neuen DNA-Stränge werden auch freie Nukleotide und eine DNA-Polymerase benötigt, die die freien Nukleotide nach der DNA-Vorlage anfügt. Dazu wird in der Regel ein aus drei Schritten PCR-Temperaturprofil mehrmals (ca. 15 - 40-mal) durchlaufen (Tabelle 20). Ein Standard PCR-Temperaturprofil umfasst drei Schritten:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf ca. 95 °C und kurzes Halten der Temperatur (ca. 15-30 sec), was zur Bildung von Einzelsträngen führt.
2. Annealing der Primer durch kurze Haltezeiten (ca. 30 sec, bei 45-68 °C), damit die Primer an ihre komplementären Sequenzen auf der einzelsträngigen DNA-Matrize binden können.
3. Elongation der Primer durch Erhöhen der Temperatur auf etwa 72 °C, um die DNA-Polymerase zu aktivieren und Nukleotide an die Enden der vernetzten Primer anzuhängen, was zur Synthese eines Doppelstrangs der gewünschten DNA-Sequenz führt. Für die Durchführung einer PCR ist die Zusammensetzung einer Standard-PCR in (Tabelle 20 und Tabelle 21) aufgeführt.

Tabelle 20: Standard PCR-Programm

STEP	TEMP [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initial Denaturation	95 – 98	30-600	1
Denaturation	95 – 98	15-30 seconds	
Primer Annealing	*45-68 °C	15-60	30-40
Elongation	72	60 sec./kb	
Final Elongation	72	300-600	1
Kühlphase	4	∞	1

*Temperatur der Primer Anneling hängt von der Primer Schmelztemperatur ab

Tabelle 21: Standard PCR-Ansatz.

Komponente	Menge [µl]	Endkon. im Medium
10 µM Forward Primer	2.5	0.5 µM
10 µM Reverse Primer	2.5	0.5 µM
10 mM dNTPs	1	200 µM
Plasmid-DNA	2	Variable <1,000 ng
Phusion (DNA-Polymerase)	1	1U
DMSO	1.5	(3 %)
5X GC-Puffer	10	1X
Dest. H ₂ O	Ad 50 µl	-

2.4.9 Verdau mit DpnI

Der DpnI-Verdau wurde eingesetzt, um methylierte DNA spezifisch an der Sequenz Gm6ATC zu schneiden. Dieser Schritt diente dazu, die Template-DNA selektiv zu entfernen, während das nicht-methylierte, mutierte PCR-Produkt für die anschließende Klonierung erhalten blieb. Für den Verdau wurde die Reaktionsmischung eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Um die Enzymaktivität zu stoppen und eine stabile Lagerung des Produkts zu ermöglichen, erfolgte abschließend eine 20-minütige Inkubation bei 80 °C.

Tabelle 22: DpnI Verdauansatz

Komponente	Menge
DNA (0,5-1 µg/µl)	1 µl
10x Tango-Puffer	2 µl
DpnI	0,5-2 µl
Dest. H ₂ O	Ad 20 µl

In dieser Arbeit wurden mehrere Punktmutationen erzeugt, indem die entsprechenden Aminosäuren im Plasmid pASG3'-bss-Wt-Strep ersetzt wurden. Anschließend wurde das Plasmid mit den geeigneten Oligonukleotid (Tabelle 3), die die gewünschten Punktmutationen enthalten, durch inverse PCR amplifiziert (2.4.8). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit DpnI verdaut (Tabelle 22) und auf ein Agarosegel aufgetragen, um ihre korrekte Größe zu überprüfen. Zunächst wurde eine Ligation durchgeführt (2.4.7) und die Ligationsansätze in *E. coli DH5α* transferiert.

Die aus *DH5α* isolierten Plasmide wurden einer Restriktions- und Sequenzanalyse unterzogen, um ihre Korrektheit sicherzustellen. Schließlich wurden die verifizierenden Plasmide mit den veränderten Codonen in *A. evansii* konjugiert.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Überexpression von BSS in *A. evansii*

Zur gezielten Überexpression des BSS-Gens auf dem Plasmid in den *A. evansii* Zellen wurde 2 L anaerobe NM-Medium (Tabelle 5) mit *A. evansii* alten Kulturen beimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte (OD) der Kultur bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Bei Erreichen einer OD von 0,7 wurde das zu exprimierende Gen mit 100 µl/l AHT (Tabelle 12) induziert. Anschließend erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation über Nacht bei 30 °C und die Zellen wurden dann geerntet.

2.5.2 Zellernte

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte werden die Zellen unter anaeroben Bedingungen geerntet. Dazu werden die Kulturen in Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 6000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 20 Minuten zentrifugiert, um das Zellpellet zu erhalten. Der Überstand wird verworfen und autoklaviert. Das Zellpellet kann nun entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden, indem die Zellen aufgeschlossen werden.

2.5.3 Zellaufschluss Mittels der French-Pressure-Cell-Press

Der Zellaufschluss mittels French Press ist ein mechanisches Verfahren, mit dem Zellen durch Druckzerstörung der Zellwand aufgeschlossen werden. Ziel des Aufschlusses ist die Gewinnung löslicher Proteine aus den Zellen.

Zunächst werden Das Zellpellet in Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) anaerob resuspendiert. Zu der Zellsuspension werden jeweils einer Spatelspitze DNase und Lysozym zugegeben, um die Zellwand zu zerstören. Die Zellsuspension wird anaerob in eine French-Press-Zelle gefüllt. Die French-Press-Zelle wird mit einem Druck von 1100 psi aufgeschlossen. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt. Der Aufschluss wird in einen Ultrazentrifugenbehälter überführt. Die Zellsuspension wird bei 35000 rpm bei 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand enthält die löslichen Proteine. Der Überstand wird sterilfiltriert und sofort für Aktivitätstests verwendet und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Page trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht basierend auf ihren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten (durch das Trenngel) unter dem Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes (Laemmli, 1970). Die Proteinprobe müssen erst durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (Tabelle 23) und fünfminütiges Aufkochen bei 95 °C denaturiert werden. Der SDS-Probenpuffer enthält β -Mercaptoethanol, das zum Abbau kovalenter Bindungen (z. B. Disulfidbindungen) führt, während des Kochvorgangs werden nicht-kovalente Bindungen, wie zum Beispiel Wasserstoffbindungen, abgebaut. Nach dieser Behandlung haben die Proteinproben eine einheitliche negative Ladung auf der Oberfläche und können ähnlich wie Nukleinsäuren mithilfe eines elektrischen Feldes getrennt werden.

Das SDS-Polyacrylamidgel ist in zwei Gele unterteilt: das Sammelgel und das Trenngel (Tabelle 24). Die Proben wurden nach dem Aufkochen auf die Sammelgel-Taschen übertragen und bei Raumtemperatur in 1 x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Proben wurden so vorbereitet, dass eine ungefähre Menge von 25 μ g Protein auf das Gel aufgetragen wurde (etwa 5 - 8 μ g für gereinigtes Protein). Als Proteinstandard diente die PageRuler Prestained Protein Ladder™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit Proteinfragmenten im Bereich von 170 bis 10 kDa. Die Trennung erfolgte bei 90 V für 10 Minuten, dann bei 120-130 V und wurde kurz bevor die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte, ausgeschaltet. Das Gel wurde dann in Coomassie-Färbelösung gegeben, um die Proteine im Gel zu fixieren. Dann wurde das Gel 20 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Färbe Bad wurde das Gel 1 Minute lang mit dest. Wasser gespült und dann 30 Minuten lang entfärbt. Wenn der Hintergrund immer noch nicht klar genug ist, wurde das Gel erneut über Nacht unter Schütteln entfärbt.

Tabelle 23: Zusammensetzung der SDS-PAGE Puffer

Puffer	Komponente	Kon.
SDS-Probenpuffer	Tris-HCl, pH 6.8	31.5 mM
	Glycerin	10 %
	SDS	1 %
	β -Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0.01 %
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0,25 % (w/v)
	Ethanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Entfärbelösung	Ethanol	10 % (v/v)
	Essigsäure	7 % (v/v)

Tabelle 24: Zusammensetzung des verwendeten SDS-Trenngels und Sammelgels

Komponenten	Trenngel [15 %]	Trenngel [20 %]	Sammelgel [4 %]
H ₂ O	2.2 ml	0.5 ml	3.7 ml
1 M Tris/HCl	2.5 ml pH8,8	2.5 ml pH8,8	650 μ l pH6,8
Acrylamid Mix (30 %)	5 ml	6.7 ml	650 μ l
SDS (10 %)	100 μ l	100 μ l	50 μ l
APS (10 %)	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED (100 %)	5 μ l	5 μ l	5 μ l

2.5.5 Western Blot

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurde ein Protein-Immunoblot (Western Blot) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst auf einem SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt und mit der Blotting-Maschine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Zu diesem Zweck wurde eine Nitrocellulosemembran auf drei Whatman Papiere auf der Anode der Zelle aufgebracht, die mit dem entsprechenden Transferpuffer (Anodenpuffer I und II) eingeweicht worden waren. Das Gel wurde dann auf die Nitrocellulosemembran gelegt und mit drei weiteren Whatman-Papieren abgedeckt, die zuvor mit dem Kathodenpuffer eingeweicht worden waren.

Die Anordnung des Western-Blots (Whatman-Papiere, Nitrocellulosemembran und SDS-PAGE-Gel) ist in (Abbildung 13) dargestellt. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde für etwa 60 bis 90 min bei 55 mA durchgeführt. Nach der Übertragung wurde die Membran 1 Stunde lang bei RT oder über Nacht schüttelnd bei 4 °C in PBS-Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Stellen zu blockieren. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit PBS-Tween Puffer gewaschen. Für den Nachweis von BSS und NMS wurde im nächsten Schritt der Antikörper Strep-Tactin HRP (StrepMAB-Classic HRP Conjugate, Strep-tag® II specific monoclonal antibody, IBA GmbH, Gottingen) hinzugefügt. Der Antikörper wurde zu diesem Zweck 1:10000 verdünnt. So wurden 50 µl des Antikörpers in 50 ml PBS-Puffer aufgelöst und auf die Membran gegeben. Dies wurde 90 Minuten lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal fünf Minuten lang mit PBS-Tween-Puffer gewaschen, gefolgt von zwei Waschungen in PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten. Die Membran wurde dann mit einer Chloronaphtol-Färbelösung für etwa 15 bis 60 Minuten gefärbt. Für die Färbelösung wurden zwei Lösungen hergestellt: 6 mg Chloronaphtol in 200 µg Methanol und 20 µl 30 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in 20 ml PBS-Puffer. Die Membran wurde zunächst in die Suspension aus PBS-Puffer und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gelegt und dann durch Zugabe der Chloronaphtol-Mischung gefärbt.

Nach erfolgreichem Blotting wurden schließlich die entsprechenden Proteinbanden sichtbar. Die Membran wurde dann sofort fotografiert und digital dokumentiert. Alle Pufferzusammensetzungen sind in (Tabelle 25) dargestellt.

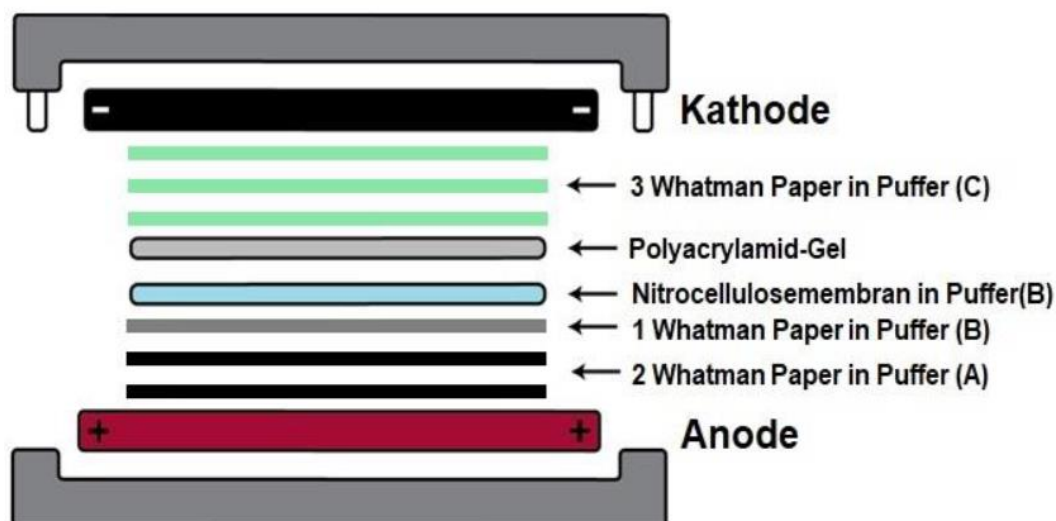


Abbildung 13: Schematische Anordnung des Western Blots

Tabelle 25: Pufferzusammensetzung des Western Blots

Puffer	Komponenten	Menge für 1 L
Anodenpuffer I (Puffer A)	Tris\ HCl	29,2 g/l
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II (Puffer B)	Tris\ HCl	2,43 g/l
	Methanol	20 % (v/v)
Kathodenpuffer (Puffer C)	Aminocaprinsäure	5,2 g/l
	Methanol	20 % (v/v)
PBS Puffer *pH 7.4	NaCl	6,72 g/l
	Na ₂ HPO ₄	2,85 g/l
	KH ₂ PO ₄	544,4 mg/l
	* eingestellt mit NaOH	
PBS-Tween Puffer	PBS-Puffer	998.75 ml/l
	Tween20	1,25 ml/l
*PBS Block Puffer	Magermilch Pulver	50 g/l
	Tween20	5 ml/l
	PBS Puffer	Ad 1 l
	*Für einen Protein Immunoblot wurde nur 50 ml angesetzt.	

2.5.6 Aufreinigung von Proteinen mittels Strep-Tactin

Die Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine erfolgte aerob/anaerob über eine Strep-Tactin-Superflow-Säule, so dass die Bindung über den sogenannten Strep-Tag erfolgt, der zuvor an den N-Terminus der α -Untereinheit (BSS α bzw. NMSA) angefügt wurde. Daher können Proteine mit einem Strep-Tag binden, und unerwünschte Proteine wurden mit einem physiologischen Puffer von der Säule gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit einer niedrigen Konzentration von Desthiobiotin eluiert. Alle Pufferzusammensetzungen sind in (Tabelle 26 & Tabelle 25) dargestellt.

Zu diesem Zweck wurde das Lysat einer 10-Liter-Evansii-Kultur bzw. 4-Liter-*E. coli*-Kultur verwendet. Das Reinigungsverfahren beginnt mit der Äquilibrierung der Chromatographiesäule mit dem Basispuffer A. Zunächst wurde der Zelleextrakt auf die Säule aufgetragen, dann begann die Elution mit

Desthiobiotin-Puffer (Eluationspuffer), der die an die Säule gebundene Proteine aus der Matrix verdrängt. Schließlich wurde die Säule mit Regenerationspuffer regeneriert, um das gebundene D-Desthiobiotin zu entfernen.

Das gereinigte Protein wurde bei -20 °C für spätere Untersuchungen gelagert.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Strep-Tactin-Reinigungspuffers

Puffer	Komponente	Kon.
Grundpuffer A *(pH 7.4)	Tris/HCl	100 mM
	KCl	150 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
Grundpuffer B *(pH 7.4)	Tris/HCl	100 mM
	KCl	150 mM
*pH 7.4 wurde mit Hcl eingestellt und danach sterilfiltriert.		
Eluationspuffer	D-Desthiobiotin (in Grundpuffer B)	2.5 mM
Regenerationspuffer	HABA (in Grundpuffer B)	1 mM

2.5.7 Aktivitätstest der BSS-Enzyme

Die Bestimmung der Enzymaktivität von nativem BSS wurde unter anaeroben Bedingungen mit einem geernteten Rohextrakt aus auf Benzoat *A. evansii*-Zellen in einem diskontinuierlichen Enzymtest durchgeführt. Alle Assay Ansätze wurden unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt und mittels RP-HPLC bzw. LC-MS analysiert. Substrate, Puffer und Stammlösungen wurden ebenfalls anaerobisiert und einige Tage vor Durchführung der Tests in einem anaeroben Zelt überführt. Zur Testvorbereitung wurde der Rohextrakt 1:5 (in 20 mM TEA-Puffer pH 7.8) in verschiedenen Volumina verdünnt und zunächst 2 Minuten lang mit dem Kosubstrat z. B. Fumarat für 2 Minuten gemischt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des aromatischen Substrats z. B. Toluol gestartet. Detaillierte Vorbereitung der verschiedenen Volumina des Aktivitätstests ist in (Tabelle 27) dargestellt. Die Reaktion wurde anschließend nach bestimmten Zeitpunkten (0 min, 15 min, 30 min oder 60 min) durch Zugabe von Schwefelsäure oder Ameisensäure gestoppt. Nach Beendigung der Tests wurden die Proben aus dem anaeroben Zelt entfernt und die säurepräzipitierte Proteine 30 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Zunächst wurde der Überstand zur Extraktion mit Diethylether in ein neues Gefäß überführt, während die Proben mit gereinigtem Protein sofort mittels HPLC bzw. LC-MS analysiert wurden. Alle verwendeten Substrate sind in der (Tabelle 28) dargestellt.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Aktivitätstests der BSS für verschiedene Volumina

Komponenten	1 ml	5 ml	10 ml	20 ml	40 ml
TEA-Puffer 20 mM, pH 7.8	680 µl	3.4 ml	6.8 ml	13.6 ml	27.2 ml
Zellextrakt	200 µl	1 ml	2 ml	4 ml	8 ml
Kosubstrat (Fumarat)	100 µl	500 µl	1 ml	2 ml	4 ml
aromatisches Substrat (Toluol)	20 µl	100 µl	200 µl	400 µl	800 µl
10 % H ₂ SO ₄	100 µl	500µl	1 ml	2 ml	4 ml

Tabelle 28: In dieser Arbeit getestete Substrate des Aktivitätstests

*Komponenten	Formel	Cas.Nr.
Fumarsäure	C ₄ H ₄ O ₄	110-17-8
3-Acetylacrylsäure	C ₅ H ₆ O ₃	4743-82-2
Crotonsäure	C ₄ H ₆ O ₂	107-93-7
3-Pentensäure	C ₅ H ₈ O ₂	5204-64-8
Glutaconsäure	C ₅ H ₆ O ₄	628-48-8
Toluol	C ₇ H ₈	108-88-3
Toluene-d5	C ₆ D ₅ CH ₃	1603-99-2
(Difluoromethyl)Benzene	C ₇ H ₆ F ₂	455-31-2
o-Cresol	C ₇ H ₈ O	95-48-7
m-Cresol	C ₇ H ₈ O	108-39-4
p-Cresol	C ₇ H ₈ O	106-44-5
o-Xylol	C ₈ H ₁₀	95-47-6
m-Xylol	C ₈ H ₁₀	108-38-3
p-Xylol	C ₈ H ₁₀	106-42-3
o-Toluidin	C ₇ H ₉ N	95-53-4
p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	99-87-6
3-Methylindol (Skatol)	C ₉ H ₉ N	83-34-1
5-Methylindoline	C ₉ H ₁₁ N	65826-95-1
5-Methylindole	C ₉ H ₉ N	614-96-0
2,7-Dimethylnaphthalene	C ₁₂ H ₁₂	582-16-1
2-Methylnaphthalin	C ₁₁ H ₁₀	91-57-6

*alle Substrate wurden in einer Konzentration von 100 mM hergestellt und in Iso-Propanol aufgelöst.

2.5.8 Extraktion mit Diethylether

Für die Anreicherung und Trennung der BSS-Aktivitätstest-Produkte wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode verwendet. Die Proben wurden zunächst mit Diethylether im Verhältnis 1:1 gemischt und dann 30 Minuten lang bei 6000 U/min zentrifugiert. Dabei bildeten sich zwei nicht mischbare Phasen, eine obere organische Phase, die das Benzylsuccinat-Syntheseprodukt enthielt, und eine untere wässrige Phase. Zur Analyse wurde die organische Phase der enzymatischen Umsätze gesammelt und in ein neues Gefäß überführt. Für eine effektive Extraktion wurde die wässrige Phase erneut extrahiert und dann die beiden organischen Phasen zusammengeführt. Schließlich wurde die organische Phase über Nacht unter dem Abzug eingedampft. Nachdem der gesamte Diethylether im Gefäß verdampft war, wurden 50 µl Iso-Propanol hinzugefügt, um alle organischen Bestandteile im Gefäß aufzulösen und später mittels HPLC oder LC-MS zu analysieren.

Alle Schritte der Extraktion wurden unter einem Abzug durchgeführt, um zu verhindern, dass Diethyletherdämpfe in die Laborluft gelangen.

2.5.9 Analyse mittels der HPLC/LC-MS

Die Identifizierung der BSS-produkte erfolgte mit dem Agilent HPLC-System (Santa Clara, CA, USA) mit gekoppeltem Dioden-Array-Detektor (UV DAD,) auf einer C18 Säule (Phenomenex, Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, LC Column 100 x 3 mm, Ea) (AG Heider, Fb Biologie, Uni Marburg), während die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit dem UHPLC Agilent 1290 Infinity system gekoppelt mit dem MS Agilent 6460 Triple Quad Detector mass spectrometer auf einer C18 Säule (Zorbax Eclipse Plus 300SB-C18 Agilent column - 2.1 mm x 50 mm, 1.8 µm) in Kooperation mit Prof. Maciej Szalaniec (Institut für Katalyse und Oberflächenchemie, Polnische Akademie der Wissenschaften, Krakau, Polen). Beide Analysen wurden mit einer Gradientenmethode (Elutionspuffer A Wasser mit 0,01 % Ameisensäure und Elutionspuffer B Acetonitril mit 0,01 % Ameisensäure) durchgeführt. Die Methode lief im ersten Schritt mit 35 % Acetonitril und wurde dann auf 70 % erhöht. Alle Messungen wurden bei 30 °C mit einer Flussrate von 0,4 ml/min für 3.2 min durchgeführt.

2.5.10 Produkt Ion Scan

Benzylsuccinat wurde durch ESI (Elektrospray-Ionisierung) im Negativ-Ionen-Produkt-Ionen-Modus identifiziert (Vorläufer-Ion $m/z=207,1$). Als Vernebelungs- und Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet (10 l/min; Verneblerdruck 45 psi). Die Temperaturen des Trocknungsgases und des Schutzgases wurden beide auf 300 °C eingestellt, und die Kapillarspannung betrug 3500 V. Die Kollisionsenergie betrug 10 meV sowohl für Benzylsuccinat als auch für Fumarat.

2.5.11 MRM-Methode (Multiple reaction monitoring)

Die Identifizierung von Benzylsuccinat erfolgte nach ESI (Elektrospray-Ionisierung) im dynamischen Negativ-Ionen-MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring). Als Zerstäubungs- und Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet (10 l/min, Zerstäubedruck 45 psi). Die Temperaturen des Trocknungsgases und des Schutzgases wurden beide auf 300 °C eingestellt, und die Kapillarspannung betrug 3500 V. Zum Beispiel betrug die Kollisionsenergie 10 meV für Benzylsuccinat und Fumarat. Die Fragmentorspannung betrug 135 meV und 75 meV für Benzylsuccinat bzw. Fumarat.

Die Bestimmung der Enzymaktivität von nativem BSS und den Mutanten erfolgte unter anaeroben Bedingungen durch einen diskontinuierlichen Enzymassay mit dem Rohextrakt. Anschließend wurde die Probe mittels LC-MS (Triple-Quad-Massenspektrometern) analysiert. Die Anwendung von Triple-Quad-Massenspektrometern ermöglicht eine präzise und spezifische Detektion der Zielverbindungen.

Nach der Trennung in der Chromatographieeinheit gelangen die Verbindungen in den Massenspektrometer-Teil des Instruments. Im Massenspektrometer erfolgt die Ionisierung der Moleküle, wodurch sie in geladene Teilchen umgewandelt werden. Dieser Prozess erfolgt normalerweise durch Elektronenstoßionisation oder Elektrospray-Ionisation, abhängig von den spezifischen Eigenschaften der Moleküle.

Die ionisierten Moleküle werden dann in der Kollisionskammer des Massenspektrometers durch die Einwirkung von Kollisionsenergie auf verschiedenen Ebenen charakteristische Fragmente erzeugt.

Die detektierten Ionen erzeugen ein Massenspektrum, das ein Diagramm der relativen Intensitäten der verschiedenen Ionen gegen ihre Masse-zu-Ladungsverhältnisse darstellt. Anhand dieses Massenspektrums können die einzelnen Verbindungen in der Probe identifiziert werden, da jedes Molekül ein charakteristisches Massenspektrum aufweist.

Durch das schnelle Umschalten zwischen verschiedenen Übergangs-Ionenpaaren können mehrere Stamm-Ionen → Produkt-Ion-Transitionen für dieselbe Verbindung verfolgt werden. Dieser Ansatz, bekannt als Multiple Reaction Monitoring (MRM), ermöglicht die Selektivität durch die Überwachung mehrerer Transitionen für einen bestimmten Analyten. Diese Transitionen werden zur Bestätigung der Identität der Produkte verwendet.

2.5.12 Metallanalyse durch ICP-OES

Zur Validierung der photometrischen Messung des Eisengehalts von gereinigtem BSS wurde die ICP-OES-Analyse in der Gruppe von Prof. Dr. Seubert (Universität Marburg, Fachbereich Chemie) durchgeführt. Für eine genaue Analyse wurde nur gereinigten Proteine mittels Strep-Tag Reinigung verwendet und daher wurden auch die beiden Strep-Tag Puffers mit gemessen, um die geringe Salzmenge in den Proben zu eliminieren. Die Proben wurden durch Zentrifugation konzentriert und die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivitäts-Assay der rekombinanten Benzylsuccinat-Synthase in

A. evansii & *E. coli*

Es wurde bereits ein homologes Expressionssystem für Benzylsuccinat-Synthase erstellt mit fusioniertem Strep-tag (Seyhan, 2016) und aktive BSS in dem denitrifizierenden β -Proteobakterium *A. evansii* überproduziert (Salii, 2019) (Abbildung 14).

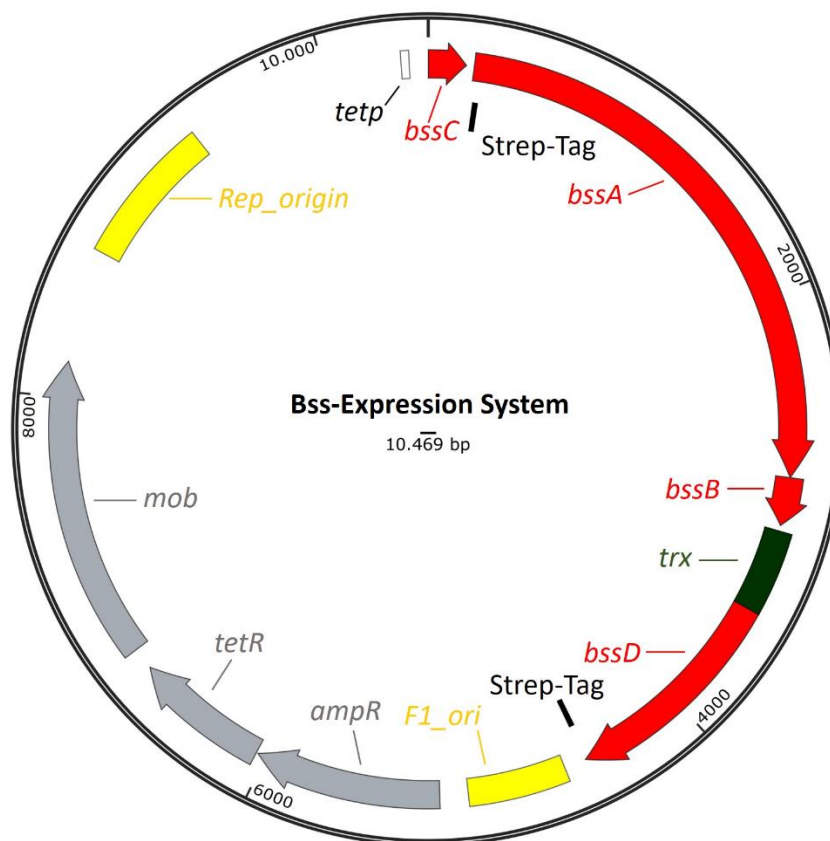


Abbildung 14: BSS-Überexpressionssystem pASG3_Bss_Strep+bssD-Txn-ori, verwendet für die Herstellung von aktiven BSS.

Um die Aktivität der rekombinanten BSS besser zu untersuchen, haben wir die Umsetzung der nativen Substrate Toluol mit Fumarat über die Detektion des Produkts Benzylsuccinat in den Zellextrakten von *A. evansii* und *E. coli* nachgewiesen.

Zur Überproduktion von BSS in *E. coli* haben wir das Plasmid pASG3_Bss_Strep+bssD-Txn-ori in *DH5 α* und *BL21 E. coli*-Zellen transformiert (Methode 2.3.3). Die Überproduktion von BSS in *E. coli* sowie auch die Zellernte und die BSS-Reaktion wurden unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt. Obwohl die Benzylsuccinat-Synthase in allen *E. coli*-Kulturen gut exprimiert wurde, waren alle Proben inaktiv und nicht in der Lage, Benzylsuccinat zu produzieren (Abbildung 15-C).

Auf der anderen Seite wurde zur Überproduktion von BSS in *A. evansii* das Plasmid pASG3_Bss_Strep+bssD-Txn-ori in *WM3064 E. coli*-Zellen transformiert (Methode 2.3.3) und dann in

A. evansii konjugiert (Methode 2.3.6). *A. evansii*-Kulturen mit einer initialen OD von 0,06 wurden über Nacht bei 30 °C unter anoxischen Bedingungen in supplementiertem NM-Medium (Tabelle 5) angezogen. Die Induktion erfolgte ungefähr nach 24 Stunden beim Erreichen einer OD zwischen 0,5 und 0,7 mit 100 µl/l Anhydrotetracyclin (Tabelle 12). Die Kulturen wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit von AHT zunächst über Nacht bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellernte und die BSS-Reaktion wurden dann am nächsten Tag unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt. Im Gegensatz zu *E. coli* Kulturen produzierten die *A. evansii* Zellen wie erwartet aktive Benzylsuccinat-Synthase (Abbildung 15-B).

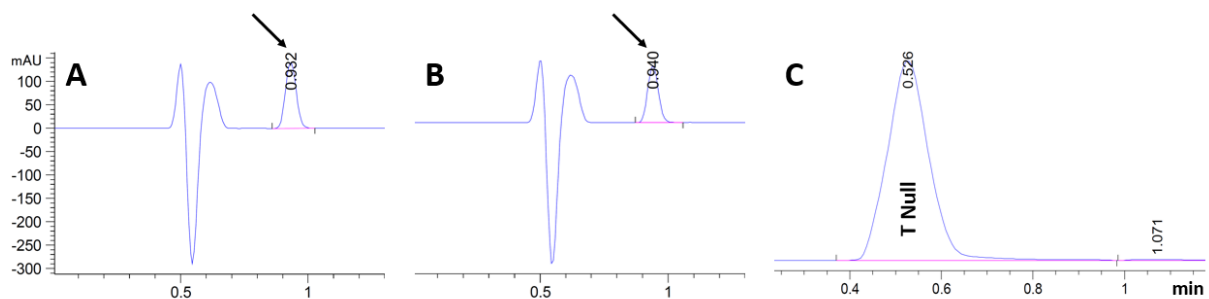


Abbildung 15: RP-HPLC-Chromatogramme der Proben von rekombinantem Wildtyp-BSS mit Toluol und Fumarat. A. Benzylsuccinat-Standard mit einer Retentionszeit von 0,932 min, B. Reaktionsprodukt von rekombinantem Wildtyp-BSS aus *A. evansii*-Zellextrakt nach Extraktion mit Diethylether zeigt Benzylsuccinat bei einer Retentionszeit von 0,942 min, C. Reaktionsprodukt von rekombinantem Wildtyp-BSS aus *E. coli*-Zellextrakt nach Extraktion mit Diethylether zeigt kein Benzylsuccinat, Der Peak bei 0,526 Minuten repräsentiert die Totzeit (T Null) für alle HPLC Messungen.

Allerdings wurde bei anderen Assays auch im Laufe der Zeit ein Rückgang oder Verlust der messbaren Bss Aktivität beobachtet. Um die Stabilität der rekombinanten BSS in *A. evansii* zu untersuchen, haben wir daher die Aktivitäten einer immer weiter überimpften Kultur über fast ein Jahr beobachtet und die Menge des gebildeten Benzylsuccinats im Laufe der Zeit verglichen. Die höchste spezifische Aktivität bzw. die höchste Menge des Benzylsuccinats wurde mit neuen konjugierten Zellen bei etwa (10 nmol*min⁻¹ mg Protein⁻¹ bzw. 0.5 mM Benzylsuccinat) gemessen, was niedriger ist als die zuvor gemessene Aktivität von rekombinanter BSS (12 nmol*min⁻¹ mg Protein⁻¹) und von nativer BSS aus *T. aromatica* K172 (17 nmol*min⁻¹ mg Protein⁻¹) (Salii 2019). Nach und nach wurde ein Rückgang der Aktivität beobachtet, bis sie nach etwa einem Jahr komplett verschwand (Tabelle 29) (Abbildung 16). Die Aktivität wurde nach erneuter Konjugation des Plasmids in *A. evansii* wiederhergestellt.

Tabelle 29: Verschiedene HPLC-Messungen des rekombinanten BSS-Wt innerhalb eines Jahr.

Rekombinanter BSS- Wt	Menge des produzierten Benzylsuccinats (nmol*min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)
Neue Konjugation	10
Messung nach 3 Monate	6,5
Messung nach 9 Monate	1,5
Messung nach ein Jahr	<0.5

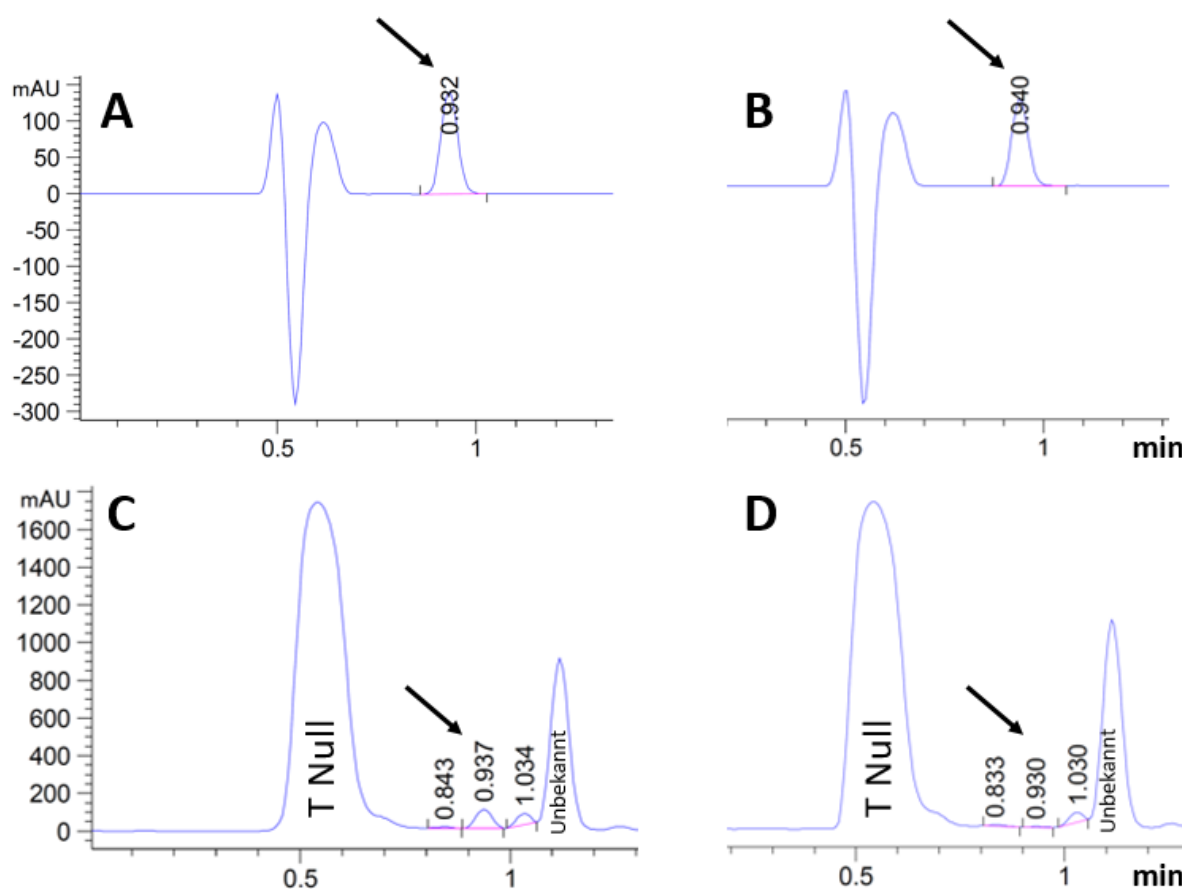


Abbildung 16: Verschiedene HPLC-Messung von (R)-Benzylsuccinat als Produkt der (R)-Benzylsuccinat Synthese (rekombinanter BSS-Wt) innerhalb eines Jahr, A. Benzylsuccinat-Standard mit einer Retentionszeit von 0,932 min, B. frisch konjugierte Zellen mit BSS-Wt (10 nmol*min⁻¹ mg Protein⁻¹) Benzylsuccinat mit einer Retentionszeit von 0,940 min, C. 3 Monate alte Kultur mit BSS-Wt (6,5 nmol*min⁻¹ mg Protein⁻¹) Benzylsuccinat mit einer Retentionszeit von 0,937 min, D. 9 Monate alte Kultur mit BSS-Wt (<0.5 nmol*min⁻¹ mg Protein⁻¹) Benzylsuccinat mit einer Retentionszeit von 0,930 min. Die Peaks bei 0,526 Minuten repräsentieren die Totzeit (T Null).

Zusätzlich haben wir auch das Auftreten der Strep-tags an BSS α durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 17 gezeigt, ist immer eine einzelne Bande der großen α -Untereinheit mit einer Masse von 98 kDa zu sehen (Abbildung 17 Spur 3 bis 6), aber bei den älteren *A. Evansii* BSS-Wt Kulturen sowie den *E. coli* BSS-Wt Kulturen fehlt die charakteristische Doppelbande der radikalhaltigen α -Untereinheit, im Gegensatz zu den frischen konjugierten *A. Evansii* Zellen, die deutlich diese charakteristische Doppelbande zeigen (Abbildung 17 Spur 1 und 2).

Daher konnten wir in den meisten Fällen, in denen die Menge des exprimierten Proteins gering war, weder mithilfe von HPLC die Umsetzung von Toluol und Fumarat noch mithilfe von Western Blot das Auftreten der charakteristische Doppelbande der radikalhaltigen α -Untereinheit nachweisen. Um eine bessere Nachweisgrenze zu erhalten und auch Produkte mit anderen Substraten nachzuweisen, haben wir deshalb alle Messungen in dieser Arbeit mit LC-MS durchgeführt.

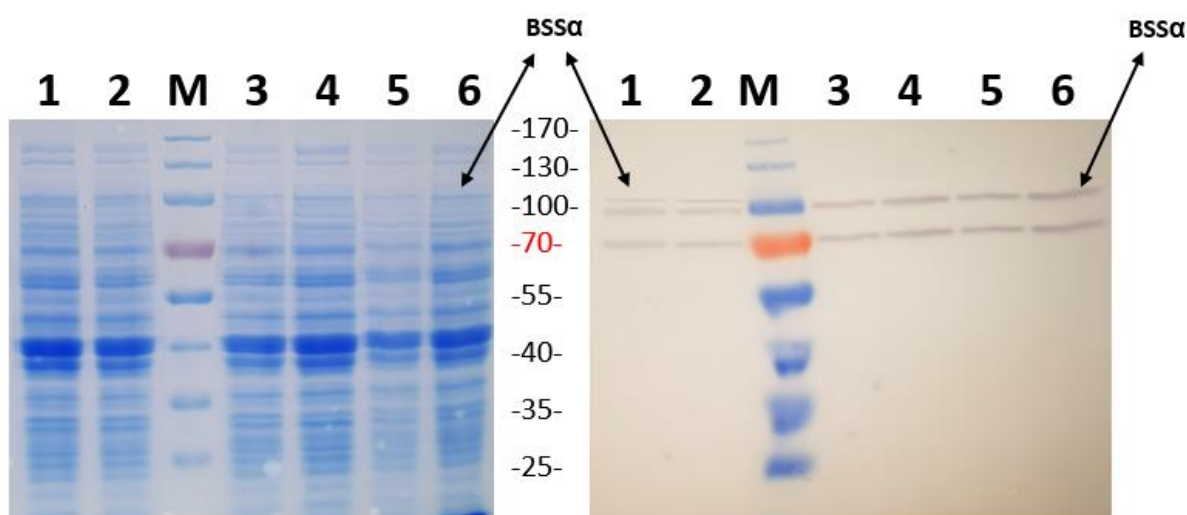


Abbildung 17: (10 %) SDS-PAGE und Western Blot der Strep-markierten α -Untereinheit (110kDa) von BSS-Wt unter Verwendung des α -Strep-Antikörpers. Spur: 1- Überproduktion *A. Evansii* Zellextrakt BSS-Wt neu konjugiert, 2- Überproduktion *A. Evansii* Zellextrakt BSS-Wt 3 Monate alt, M. Protein Standard, 3- Überproduktion *A. Evansii* Zellextrakt BSS WT 9 Monate alt, 4- Überproduktion *A. Evansii* Zellextrakt BSS WT 1 Jahr alt, 5- Überproduktion *E. coli DH5 α* Zellextrakt BSS-Wt, 6- Überproduktion *E. coli B121* Zellextrakt BSS-Wt.

- Mutagenese der Benzylsuccinat-Synthase

Alle Mutationen in dieser Arbeit wurden durch konventionelle PCR hergestellt (Methode 2.4.8).

Wir haben dafür den Klonierungsvektor pASG3bssstrep+ori1 mit entsprechenden mutagenen Oligonukleotidpaaren über inverse PCR amplifiziert (Tabelle 3). Die gewünschte(n) Mutationsstelle(n) wurde(n) in eines der Oligonukleotide eingebaut (entweder For oder Rev). Das PCR-Produkt wurde zunächst mit DpnI behandelt (Methode 2.4.9), um Schnitte in den methylierten Ausgangs-Strang

einzubauen, dann ligiert (Methode 2.4.7). Die Ligationsansätze wurden in *E. coli DH5 α* Zellen transformiert (Methode 2.3.3) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Plasmide wurden am nächsten Tag mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific Fisher) isoliert (Methode 2.4.1.1). Da das pASG3_Bss_Strep+bssD-Txn-ori zwei Schnittstellen für jedes der beiden Restriktionsenzyme (HindIII oder BamHI) enthält, wurden die isolierten Plasmide zunächst mit Restriktionsenzymen (HindIII oder BamHI) verdaut. Die korrekt verdauten Plasmide wurden zunächst durch Sequenzierung identifiziert, und wenn sie die gewünschten Mutationen enthielten, wurden sie im Anschluss in *A. Evansii* KB740 konjugiert (Methode 2.3.6). Um sicherzustellen, dass es sich bei den Konjugaten eindeutig um *A. Evansii* KB740 handelt, wurde schließlich eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt.

3.2 Stereoselektivität Mutagenese der α -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase.

3.2.1 Herstellung der Mutanten

Da die Art der Fumaratbindung wahrscheinlich der Hauptfaktor für die Bestimmung der Stereospezifität der Reaktion ist, haben wir in dieser Arbeit die Aminosäuren Trp613 und Gln707 ausgetauscht, die eventuell basierend auf den Informationen aus MD-Simulationen eventuell die Stereospezifität des Endprodukts bestimmen könnten. Zu diesem Zweck haben wir vier Einfachmutanten erzeugt, zwei mit Trp613 (Abbildung 18-A), bei denen wir die unpolare Aminosäure Tryptophan durch die unpolare Aminosäure Phenylalanin oder die polare Aminosäure Histidin ersetzt haben (Abbildung 18 B&C), und zwei weitere Einfachmutanten für Gln707 (Abbildung 18-D), bei denen wir die polare Aminosäure Glutamin durch die polaren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparagin ersetzt haben (Abbildung 18 E&F).

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssStrepGln707Glu, pASG3bssStrepGln707Asn, pASG3bssStrepTrp613His und pASG3bssStrepTrp613Phe (Tabelle 2) wurde das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren 15/17 (Gln707Glu), 16/17 (Gln707Asn), 18/20 (Trp613His) und 19/20 (Trp613Phe) durch inverse PCR amplifiziert (Methode 2.4.8) und das Produkt wieder ligiert (Methode 2.4.7). Die Plasmide wurden durch Sequenzieren validiert (Methode 2.4.5) und durch Konjugation mit dem Stamm *E. coli WM3064* in *A. Evansii* KB740 übertragen (Methode 2.3.6). Um sicherzustellen, dass es sich bei den Konjugaten eindeutig um *A. Evansii* KB740 handelt, wurde schließlich eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt.

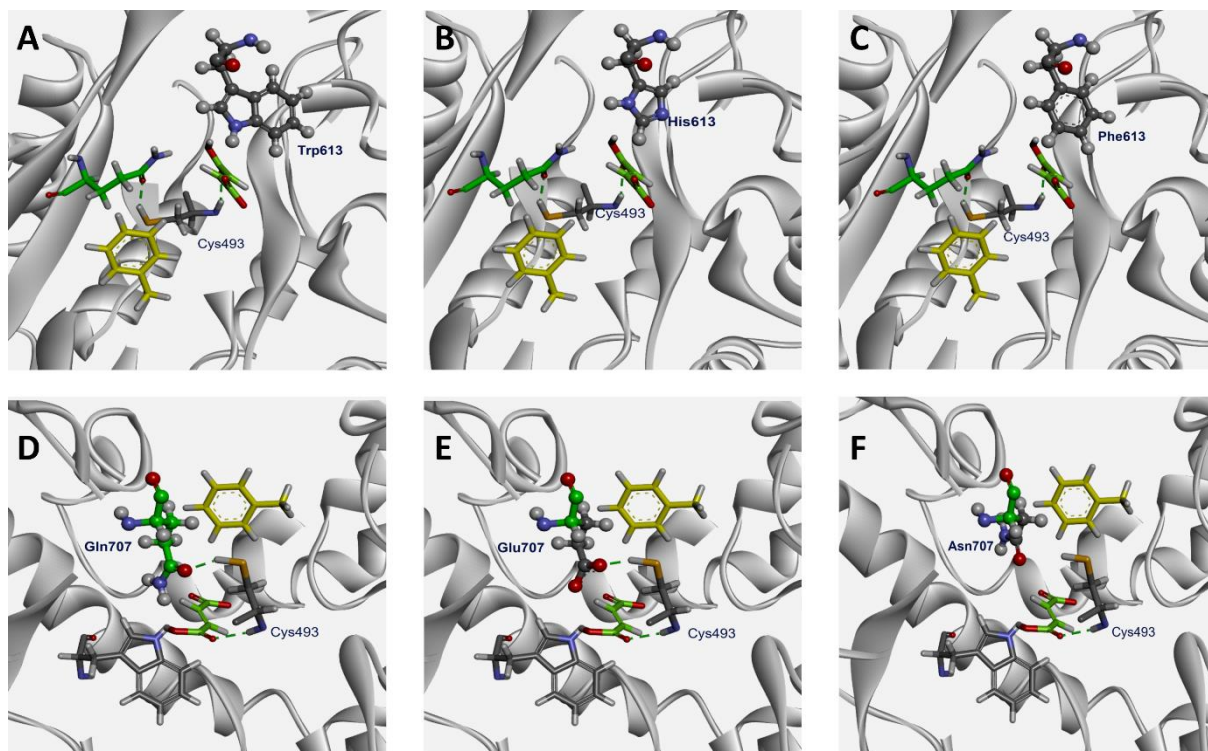


Abbildung 18: Modelle des BSS-aktiven Zentrums in der α -Untereinheit zeigt die Positionierung und Bindung von Fumarat mit dem konservierten Cys493 und den Target-Aminosäuren Trp613 und Gln707. A. Fumarat-Bindung mit Trp613 und Gln707, B. Fumarat-Bindung mit His613 und Gln707, C. Fumarat-Bindung mit Phe613 und Gln707, D. Fumarat-Bindung mit Trp613 und Gln707, E. Fumarat-Bindung mit Trp613 und Glu707, F. Fumarat-Bindung mit Trp613 und Asn707.

3.2.2 Untersuchung der spezifischen Aktivität der Gln707 und Trp613 Mutationen

Zellextrakt für den Aktivitätstest wurde für die jeweiligen Mutationen aus 10 Liter *A. Evansii*-Hauptkultur vorbereitet (Methode 2.5.1). Die Kulturen wurden unter streng anaeroben Bedingungen gezüchtet, und die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen (Methode 2.5.2 & 2.5.3). Die Bestimmung der Enzymaktivität von nativer BSS und den Mutationen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit den Rohextrakten in einem diskontinuierlichen Enzymtest (Methode 2.5.7), mit Diethylether extrahiert (Methode 2.5.8) und anschließend mittels RP-HPLC analysiert (Methode 2.5.9). Die erwartete Aktivität mit Fumarat wurde tatsächlich in einer Mutante nachgewiesen, die eine einzige Mutation von Glutamin 707 zu Glutaminsäure trägt. Die Mutante Gln707Glu hat eine spezifische Aktivität von $10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ (Abbildung 19), die die spezifische Aktivität der neuen konjugierten BSS-Wt-Zellen entspricht, während bei den anderen drei Mutationen keine Aktivität festgestellt wurde (Anh.-Abbildung 1).

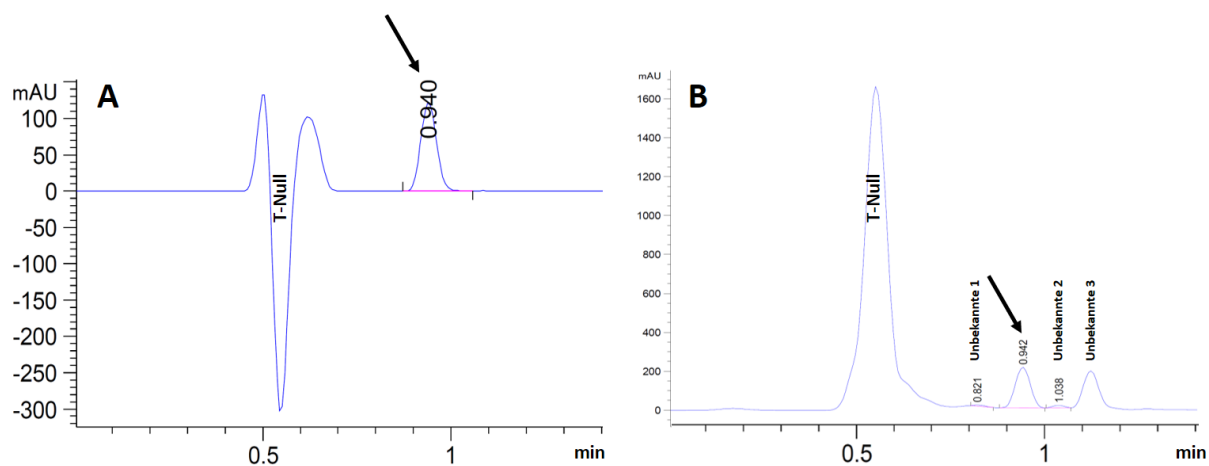


Abbildung 19: A. HPLC-Messung des neuen konjugierten BSS-Wt zeigt Benzylsuccinat bei 0.940 min, B. HPLC-Messung der Gln707Glu zeigt Benzylsuccinat bei 0.942 min. Die beiden Peaks bei 0,55 min repräsentieren T-Null.

Das Auftreten der charakteristischen Doppelbanden der radikalhaltigen α -Untereinheit durch Western Blot ist bei der Mutante Gln707Glu im Vergleich mit Wt sehr schwach zu sehen (Abbildung 20 Spur 1), während bei den anderen drei Mutationen keine Bande der großen α -Untereinheit mit einer Masse von 98 kDa zu sehen ist (Abbildung 20 Spur 2, 3&4).

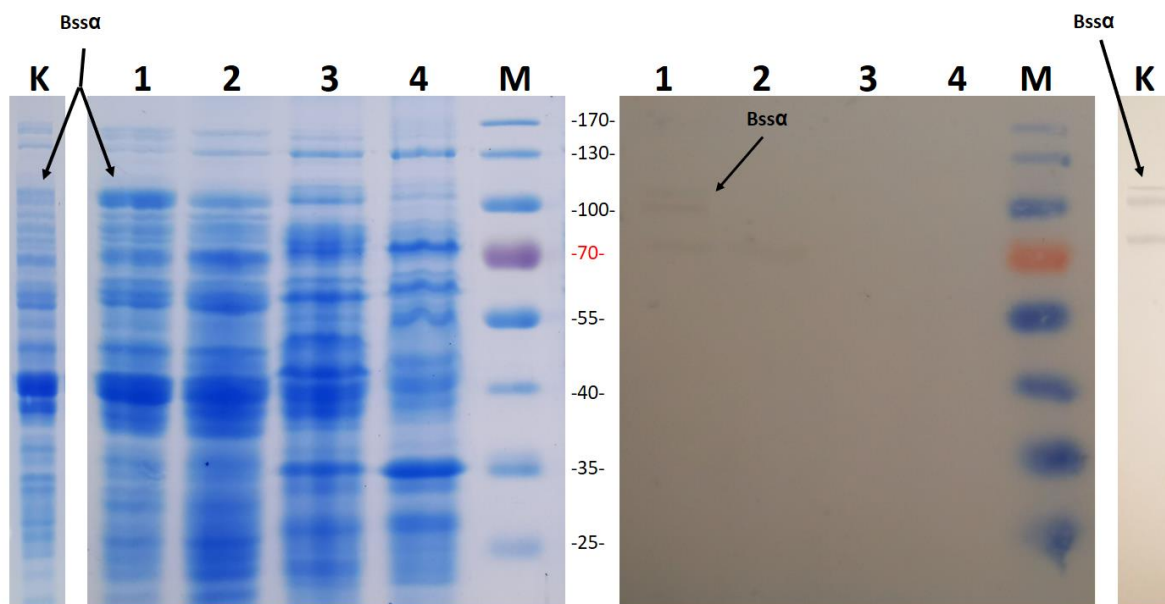


Abbildung 20: (10 %) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot der Mutationen Gln\Trp aus *A. evansii* Zellextrakt . Spur 1. Gln707Glu, 2. Gln707Asn, 3. Trp613His, 4. Trp613Phe, M. Protein Standard. Der Pfeil zeigt die schwachen Doppelbände von BSS α , K. BSS-Wt Zellextrakt aus neuen konjugierten Zellen als Kontrolle.

3.2.3 Der Stereoselektivität Test

Um die Stereospezifität zu bestimmen, haben wir mit der aktiven Mutante Gln707Glu eine chirale Analyse mittels einer Normalphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Methode (NP-HPLC) durchgeführt. Die chromatografische Trennung erfolgte auf einer Lux-cellulose-1.5 μm Säule unter Verwendung eines mobilen Phasensystems mit n-Hexan + 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und Isopropanol + 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) (95:5:0,1 v/v). Die Flussrate der mobilen Phase betrug 1,0 ml/min und Injektionsvolumen 2 μl . Die Wellenlänge des Detektors wurde auf 210 nm und die Temperatur des Säulenofens auf 25 °C eingestellt.

Die racemische Standardlösung lieferte anhand der chirale Analyse zwei unterschiedliche Peaks R(+)-Benzylsuccinat bei einer Retentionszeit von 3,037 Minuten und S(-)-Benzylsuccinat bei einer Retentionszeit von 3,717 Minuten (Abbildung 21-A). Die Gln707Glu-Mutante und der BSS-Wt liefern ebenso einen Peak bei einer ähnlichen Retentionszeit von 3,092 und einen weiteren Peak bei 3,717 Minuten (Abbildung 21 B&C). Um die Identität der Peaks zu bestätigen und sie besser vergleichen zu können, wurden UV-Spektren der einzelnen Peaks mittels "Intelligent Peak Deconvolution Analysis" (i-PDeA) extrahiert und verglichen. Wie erwartet, handelt es sich bei den ersten Peaks mit einer Retentionszeit von 3,092 min im Vergleich zum Standard um R(+)-Benzylsuccinat (Abbildung 21-D), Bei dem zweiten Peak S(-)-Benzylsuccinat ergaben sich Unterschiede in den Spektren und somit konnte belegt werden, dass es sich nicht um S(-)-Benzylsuccinat handelt (Abbildung 21-E).

Daher ist die Mutante Gln707Glu in der Lage nur das Benzylsuccinat in Form vom R(+)-Enantiomer und kein S(-)-Enantiomer zu produzieren.

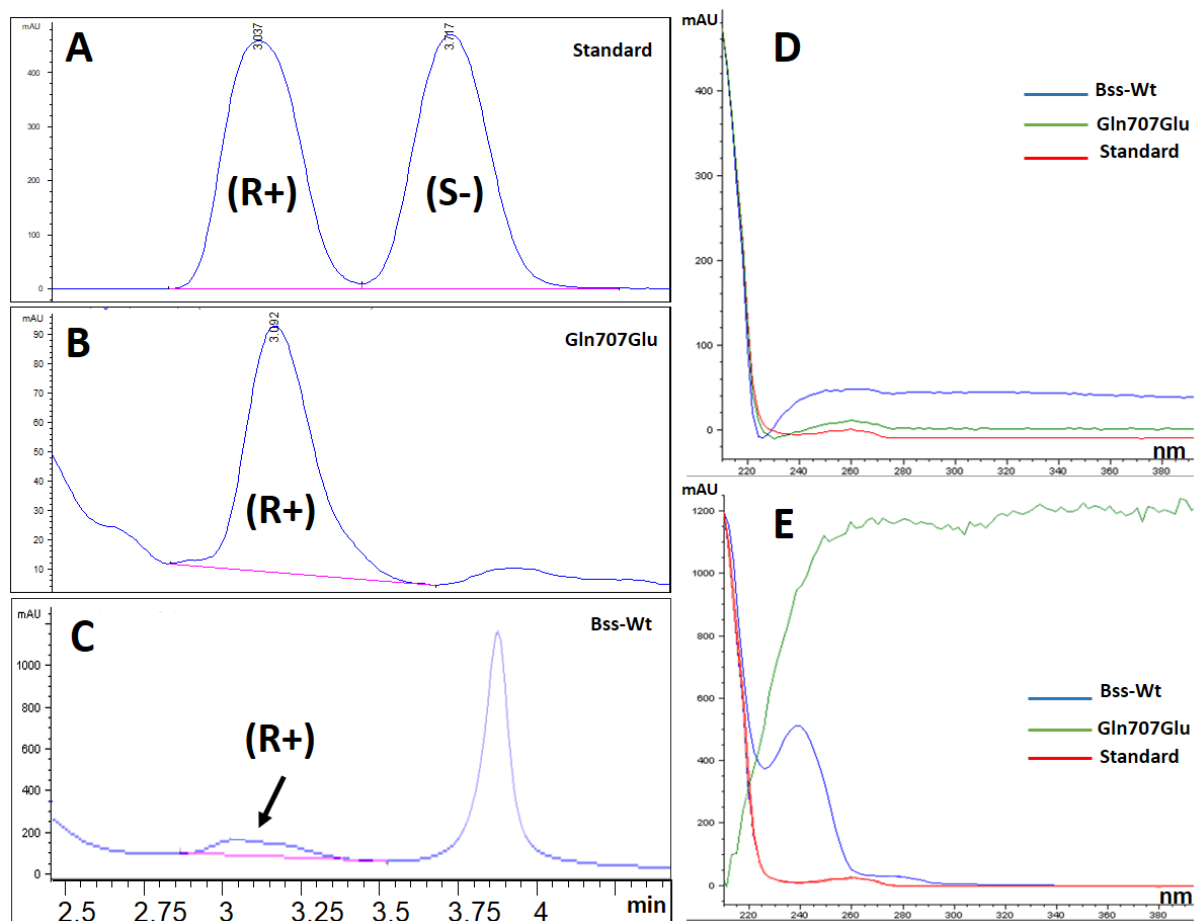


Abbildung 21: NP-HPLC-Analyse und Spektrum von Benzylsuccinat Standard (Racemat), Gln707Glu- und BSS-WT-Reaktionsgemisch. (Links) A. NP-HPLC-Analyse von Benzylsuccinat-Standard (Racemat), der erste Peak bei 3,037 min ist R-Benzylsuccinat und der zweite Peak bei 3,717 min ist S-Benzylsuccinat, B. NP-HPLC-Analyse von BSS-Reaktionsgemisch Gln707Glu, der Peak bei 3,092 min ist R-Benzylsuccinat, C. NP-HPLC-Analyse der BSS-WT-Reaktionsmischung, der Peak bei 3,102 min ist R-Benzylsuccinat, (rechts) D. Spektrum Vergleich aller R(+)-Benzylsuccinat-Peaks (3.037, 3.092 und 3.102 min), E. Spektrum Vergleich mit S(-)-Benzylsuccinat-Peak des Standards (3.717 min). Die beiden Peaks (3.891 und 3.801 min) entsprechen nicht dem Spektrum von S(-)-Benzylsuccinat. Die Farben entsprechen (Rot) dem Benzylsuccinat-Standard, (Grün) dem Produkt der BSS-Gln707Glu-Reaktionsmischung und (Blau) dem Produkt der BSS-WT-Reaktionsmischung.

3.3 Mutagenese der Toluol-Bindungsstelle

3.3.1 Herstellung der Mutationen

Aminosäuren wie Leu-711, Ile-384, Glu-189, Val-709 und Tyr-197 bilden in BSS die Toluol-Bindungsstelle. Eine Substitution einer dieser Aminosäuren könnte potenziell die Aktivität, Substratspezifität oder Stabilität des Enzyms verändern und den Hohlraum erweitern, um größere Substrate aufzunehmen. Insbesondere spielt Tyr197 eine Schlüsselrolle im aktiven Zentrum, indem es mit der Aminosäure Ile/Val617 eine Engstelle bildet. Durch diese Engstelle muss das aromatische Substrat hindurchgehen, um das katalytische Cys493 zu erreichen. Daher haben wir in dieser Arbeit zwei Mutationen an dieser Position hergestellt, Tyr197Phe und Tyr197Ser (Abbildung 22).

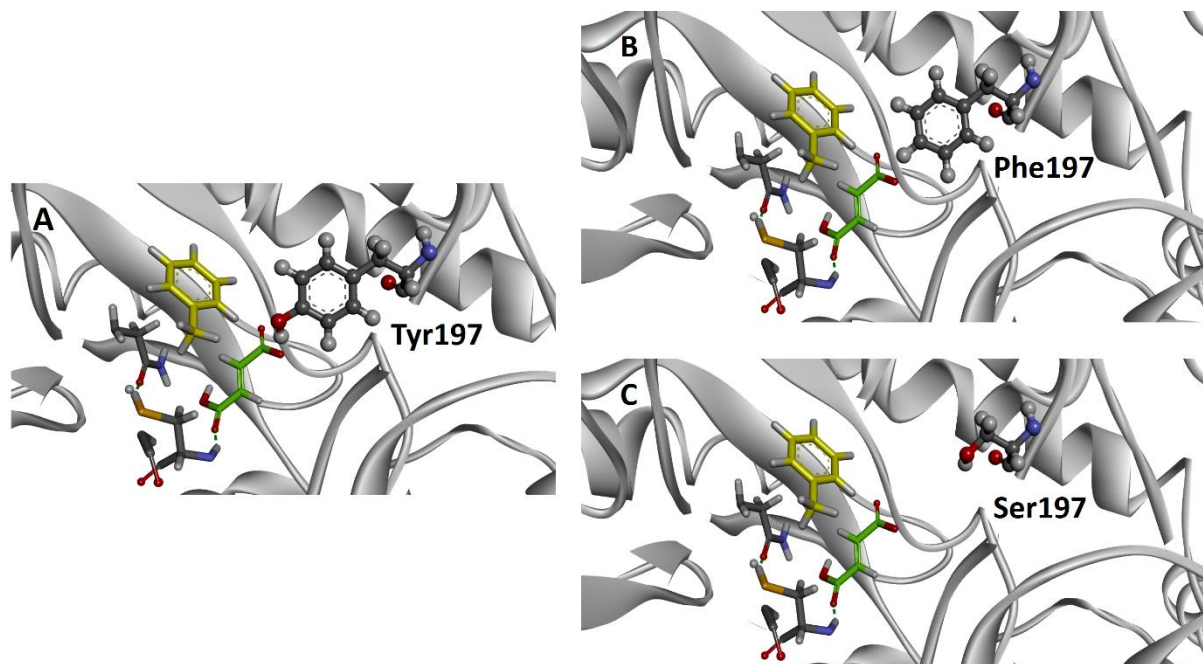


Abbildung 22: Modelle des BSS-aktiven Zentrums in der α -Untereinheit zeigt die Positionierung und Bindung von Fumarat (Grün) und Toluol (Gelb) mit der Target-Aminosäure Tyr197. A. Positionierung der Target-Aminosäure Tyr197 im BSS-aktiven Zentrums, B. Positionierung der mutierten Aminosäure Phe197 und Bindung mit Fumarat (Grün) und Toluol (Gelb), C. Positionierung der mutierten Aminosäure Ser197 und die mögliche Bindung mit Fumarat (Grün) und Toluol (Gelb).

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssStrepTyr197Ser und pASG3bssStrepTyr197Phe (Tabelle 2) wurde das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren 6/8 (Tyr197Ser) und 6/7 (Tyr197Phe) durch inverse PCR amplifiziert (Methode 2.4.8) und das Produkt wieder ligiert (Methode 2.4.7). Die Plasmide wurden durch Sequenzieren validiert (Methode 2.4.5) und durch Konjugation mit dem Stamm *E. coli* WM3064 in *A. Evansii* KB740 übertragen (Methode 2.3.6).

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Konjugaten eindeutig um *A. Evansii* KB740 handelt, wurde schließlich eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt.

3.3.2 Untersuchung der spezifischen Aktivität der Tyr197 Mutationen

Zellextrakt für den Aktivität Test wurde aus 10 Liter *A. Evansii*-Hauptkultur für die jeweilige Mutante vorbereitet (Methode 2.5.1). Die Kulturen wurden unter streng anaeroben Bedingungen gezüchtet, und die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen (Methode 2.5.2 & 2.5.3). Die Bestimmung der Enzymaktivität von nativer BSS und den Mutationen wurde unter anaeroben Bedingungen mit den Rohextrakten in einem diskontinuierlichen Enzymtest (Methode 2.5.7) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit Diethylether extrahiert (Methode 2.5.8) und mittels RP-HPLC und LC-MS analysiert (Methode 2.5.9). Wir haben eine Auswahl verschiedener Substrate (o-Cresol, m-Cresol, p-Cresol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, o-Toluidin, p-Cymen, 3-Methylindol (Skatol), 5-Methylindolin,

5-Methylindol, 2,7-Dimethylnaphthalin und 2-Methylnaphthalin) (Tabelle 28) getroffen, die den nativen Substraten von BSS, HBSS, NMS und PMS ähneln, um eine erweiterte Enzymaktivität zu testen. Der Test wurde im Zellextrakt von BSS-WT bzw. den beiden Mutationen durchgeführt.

3.3.3 LC-MS Untersuchung der spezifischen Aktivität der Tyr197 Mutationen.

Zuerst testeten wir die Umwandlung den nativen Substraten (Toluol & Fumarat) mit BSS-Wt und den mutierten Varianten mit einer Tyr197-Ser- oder Tyr197-Phe-Substitution, um die Veränderung der Aktivität gegenüber den konservierten Substraten Fumarat und Toluol zu bestimmen.

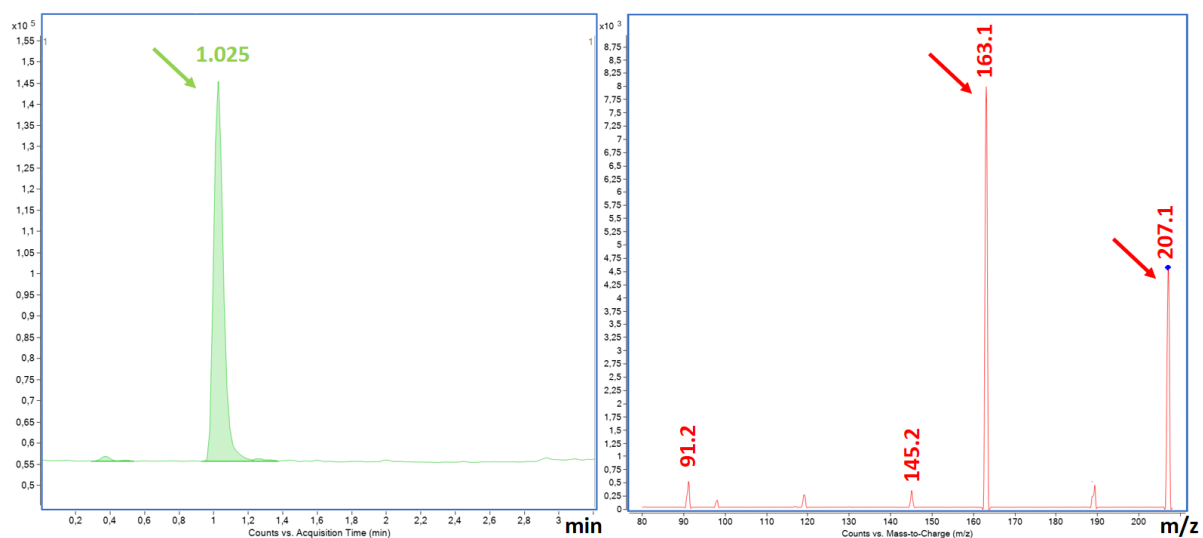


Abbildung 23: Flüssigchromatographie/Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie Chromatogramm (LC-ESI/MS) für den Benzylsuccinat-Standard ($m=208$). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) der Masse 207, wobei der grüne Pfeil den Benzylsuccinat-Peak mit einer Retentionszeit von 1,025 min zeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-transitions des Benzylsuccinats, wobei die roten Pfeile die Benzylsuccinat charakteristischen Ionenpeaks bei 207 m/z und 163 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

Im Vergleich mit dem LC-MS-Chromatogramm des Benzylsuccinat-Standards (Abbildung 23) lieferte der rekombinante Wildtyp-BSS eine sehr geringe spezifische Aktivität mit den nativen Substraten Toluol und Fumarat (Abbildung 24), die durch HPLC nicht eindeutig nachweisbar war.

Auch beobachteten wir eine sehr geringe spezifische Aktivität mit den nativen Substrate Toluol und Fumarat für die beiden Tyrosin-Mutationen (Abbildung 25). Alle drei Proben (Wt, Tyr197Phe und Tyr197Ser) liefern bei LC-MS einen Peak mit einer ähnlichen Retentionszeit wie der Standard von 1,008 und 0,975 min sowie im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) die zwei distinkte Benzylsuccinat Ionenpeaks bei 207 m/z und bei 163 m/z (Abbildung 24 & Abbildung 25).

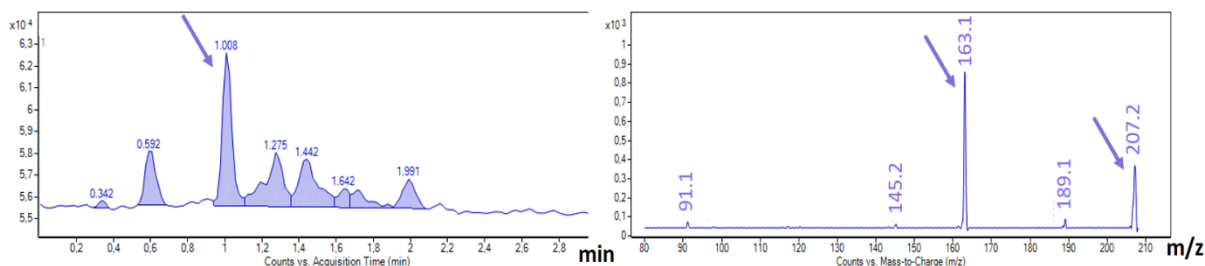


Abbildung 24: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für Benzylsuccinat ($m=208$) von dem rekombinanten Wildtyp-BSS. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) der Masse 207, wobei der blaue Pfeil den Benzylsuccinat-Peak mit einer Retentionszeit von 1,008 min zeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-transitions des Benzylsuccinats, wobei die blauen Pfeile die Benzylsuccinat charakteristischen Ionenpeaks bei 207 m/z und 163 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

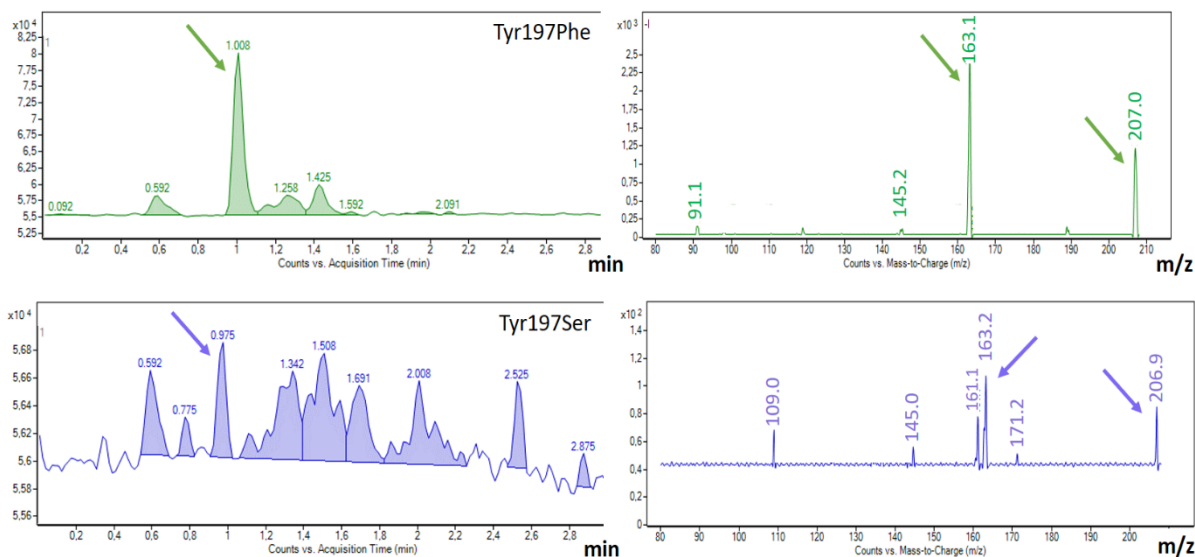


Abbildung 25: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für Benzylsuccinat ($m=208$) aus der Reaktion von Toluol und Fumarat in der Tyr197Phe-Mutante (in Grün) und der Tyr197Ser-Mutante (in Blau). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 207, wobei die grünen und blauen Pfeile den Benzylsuccinat-Peak mit Retentionszeiten von 1,008 min bzw. 0,975 min anzeigen. (Rechts) Die MRM-Ionen-transitions des Benzylsuccinats dargestellt, wobei die grünen und blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von Benzylsuccinat bei 207 m/z und 163 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

Da die spezifische Aktivität der Tyrosin-Mutationen und des rekombinanten Wildtyp-BSS mit den nativen Substraten Toluol und Fumarat äußerst niedrig ist und um die Identifikation des detektierten Produkts als Benzylsuccinat zu gewährleisten, wurde anstelle von Toluol eine Variante mit [Ring-D5] verwendet. Zu diesem Zweck haben wir speziell deuteriertes Toluol (d_5 -Toluol) verwendet, das an jedem der C2-, 3-, 4-, 5- und 6-Atome des Toluolrings ein Deuteriumatom anstelle eines Wasserstoffatoms trägt.

Die BSS-Reaktion wurde unter Verwendung von d5-Toluol durchgeführt, und die Endprodukte wurden mittels LC-MS analysiert. Bei der Verwendung von d5-Toluol zeigen alle drei Proben (Wildtyp, Tyr197Phe und Tyr197Ser) einen Peak mit einer ähnlichen Retentionszeit wie der Standard von 0,967 min. Im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) sind zudem die beiden charakteristischen Benzylsuccinat-Ionenpeaks bei 212 m/z und 168 m/z zu erkennen (Abbildung 26). Demnach sind die Tyr197Phe- und Tyr197Ser-Mutationen in der Lage, Benzylsuccinat in geringen Mengen zu produzieren.

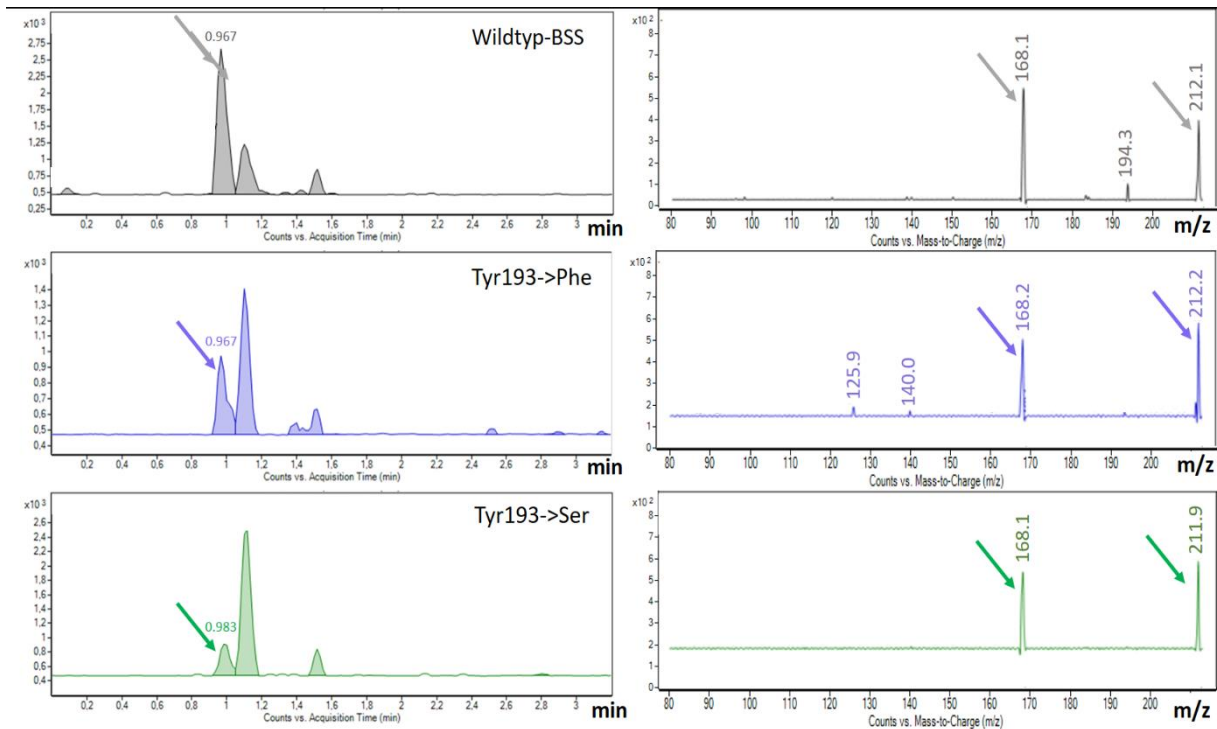


Abbildung 26: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für d5-Benzylsuccinat ($m=213$) aus der Reaktion von d5-Toluol und Fumarat in dem rekombinanten Wildtyp-BSS (in Grau), der Tyr197Phe-Mutante (in Blau) und der Tyr197Ser-Mutante (in Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 212, wobei die grauen, blauen und grünen Pfeile den d5-Benzylsuccinat-Peak mit Retentionszeiten von 0,967 min bzw. 0,983 min anzeigen. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des d5-Benzylsuccinats dargestellt, wobei die grauen, blauen und grünen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von d5-Benzylsuccinat bei 212 m/z und 168 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

Zunächst wurde die Anwesenheit von rekombinanter BSS-Wt und den Mutationen durch SDS-PAGE und Western Blot der α -Untereinheit bestätigt. Allerdings wurde aufgrund der geringen Konzentration der produzierten BSS die Doppelbande der radikalhaltigen α -Untereinheit weder in rekombinante BSS-Wt noch in den Mutationen durch Western Blot nachgewiesen (Abbildung 27).

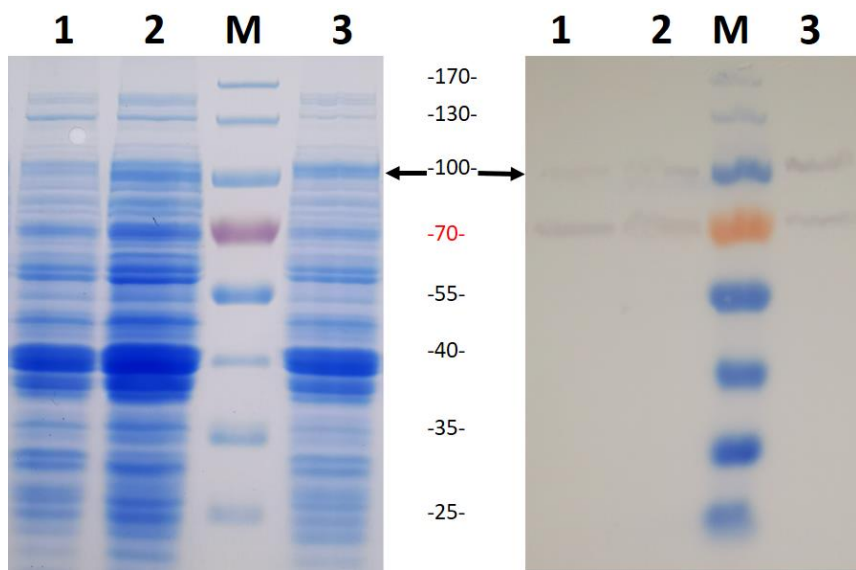


Abbildung 27: (10 %) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot der beiden Mutationen Tyr197Ser & Tyr197Phe und des rekombinanten Wildtyp-BSS aus *A. Evansii* Zellextrakt. Spur 1. Tyr197Ser, 2. Tyr197Phe, M. Protein Standard, 3. BSS-Wt.

3.3.4 Bestimmung des Substratumsatzes von Toluol-Alternativen.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit (81 % Identität) von *Azoarcus sp.* Stamm T und *Thauera aromatica* Stamm K172 wurde die Substratspezifität der Benzylsuccinat-Synthasen in den beiden Stämmen untersucht. Das Enzym von *Azoarcus sp.* Stamm T setzt Toluol, aber auch alle Xylol- und Kresol-Isomere in die entsprechenden Succinat-Addukte um, während das Enzym von *T. aromatica* mit Toluol und allen Kresolen, aber mit keinem Xylol-Isomer aktiv ist ^[5].

Andererseits wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten von rekombinantem BSS in Zellextrakten von *A. Evansii* für Toluol und m-Kresol beobachtet, während o- und p-Kresole in geringeren Mengen umgesetzt wurden und keines der Xylolisomere umgesetzt wurde. In vorheriger Arbeit wurde durch den Austausch von Isoleucin 617 gegen Valin eine Aktivität von $6.0 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ mit m-Xylol, aber nicht mit p- oder o-Xylol nachgewiesen. Dies lässt jedoch die Frage offen, welche Aminosäure tatsächlich für die Umsetzung zwischen Toluol- und Xylolisomeren wesentlich sind.

Es wird vermutet, dass Tyr197 als Schlüssel zum aktiven Zentrum dient, indem es das aromatische Substrat durch die Engstelle an den Resten Ile/Val617 führt.

Da die beiden Mutationen (Tyr197Phe und Tyr197Ser) mit den nativen Substraten (Fumarat & Toluol) aktiv sind, haben wir als Nächstes die Umsetzung aller Kresole (m, o-, p-Kresol, Abbildung 30) und aller Xylole (m-, o-, p-Xylol, Abbildung 31) mit Fumarat in rekombinanter BSS-Wt und den Mutationen (Tyr197Phe und Tyr197Ser) getestet.

Wie erwartet wurde in Wt mit alle Kresole und Fumarat eine sehr geringe spezifische Aktivität beobachtet. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden mit o-Kresol beobachtet, während m- und

p-Kresole in geringeren Mengen umgesetzt wurden. Diese Ergebnisse stehen im Zusammenhang mit dem zuvor ermittelten Muster der Substrattransformation von BSS aus *T. aromatica* K172 [5] und der Substrattransformation von rekombinanter BSS (Sali 2019). Darüber hinaus waren die beiden Mutationen auch in der Lage, alle Kresole umzusetzen. Wie BSS-Wt zeigten auch die beiden Mutationen (Tyr197Phe und Tyr197Ser) eine bessere spezifische Aktivität mit o-Kresol und eine geringere spezifische Aktivität mit m- und p-Kresolen (Abbildung 28).

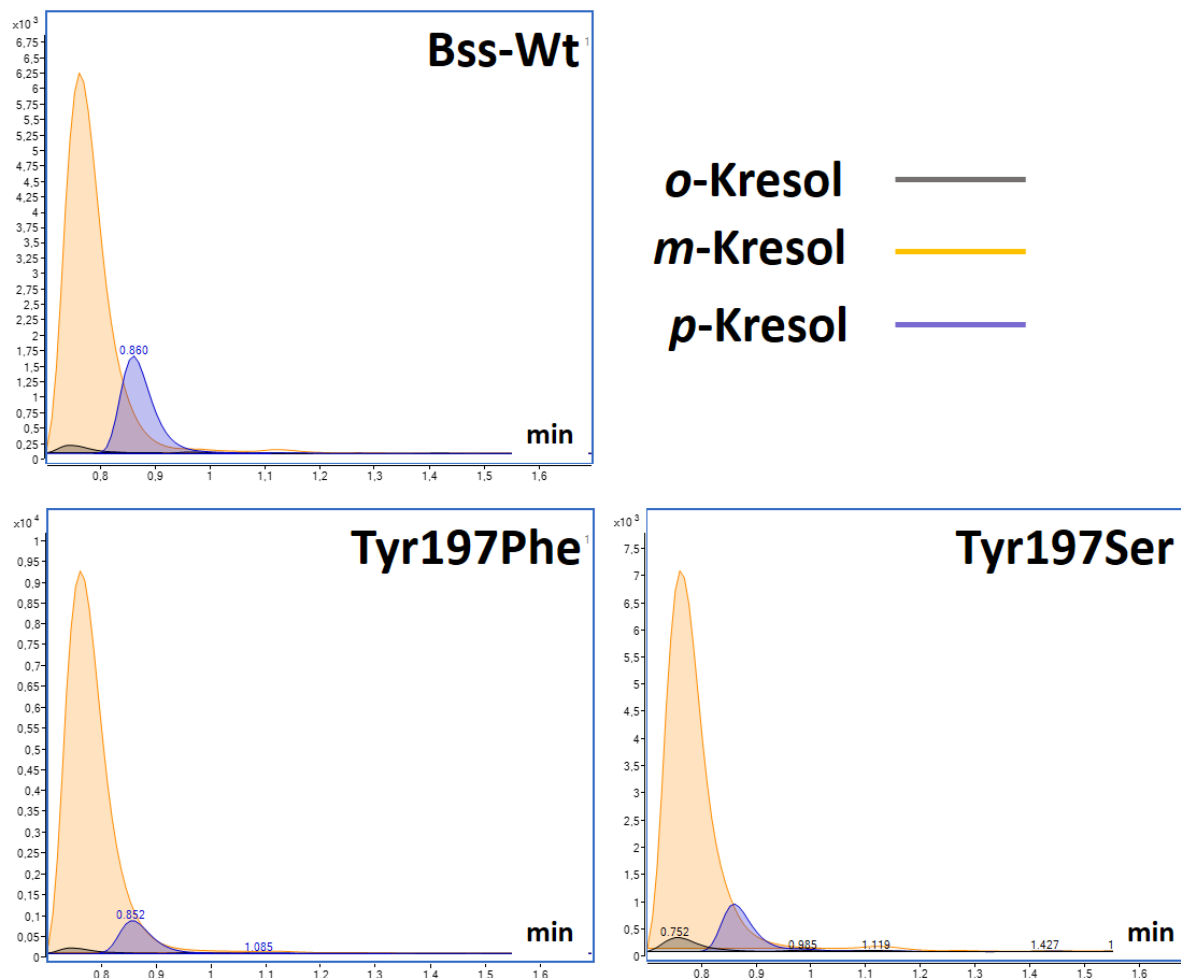


Abbildung 28: Die LC-MS-Chromatogramme zeigen die Signalfrequenz der Produkte aus o-, m-, und p-Kresol im Reaktionsgemisch von rekombinantem BSS.Wt Zellextrakt, Tyr197Phe Zellextrakt und Tyr197Ser Zellextrakt. Die Peaks sind entsprechend der Kresol-Isomere farblich markiert: ortho-Kresol in Schwarz, meta-Kresol in Orange und para-Kresol in Lila. Die Chromatogramme wurden aus separaten Massenspektren extrahiert und für eine bessere Übersicht in einer Grafik kombiniert.

Andererseits beobachteten wir eine spezifische Aktivität bei allen Xylolen und Fumarat nicht nur bei den beiden Mutationen (Tyr197Phe und Tyr197Ser), sondern auch bei BSS-Wt, was in früheren Arbeiten nie nachweisbar war. Die Tyr197Phe-Mutante zeigte eine um etwa 70 % geringere spezifische Aktivität mit m-Xylol und eine um etwa 50 % geringere spezifische Aktivität bei p-Xylol im Vergleich zu

der anderen Mutante und dem Wt, während *o*-Xylol von beiden Mutanten (Tyr197Phe und Tyr197Ser) und Wt gleichermaßen umgesetzt wurde. Die Mutante Tyr197Phe und der Wt zeigten beide eine bessere spezifische Aktivität mit *m*-Xylol, während *o*- und *p*-Xylol in Tyr197Phe und Wt um etwa 50 % weniger als *m*-Xylol umgesetzt wurden (Abbildung 29).

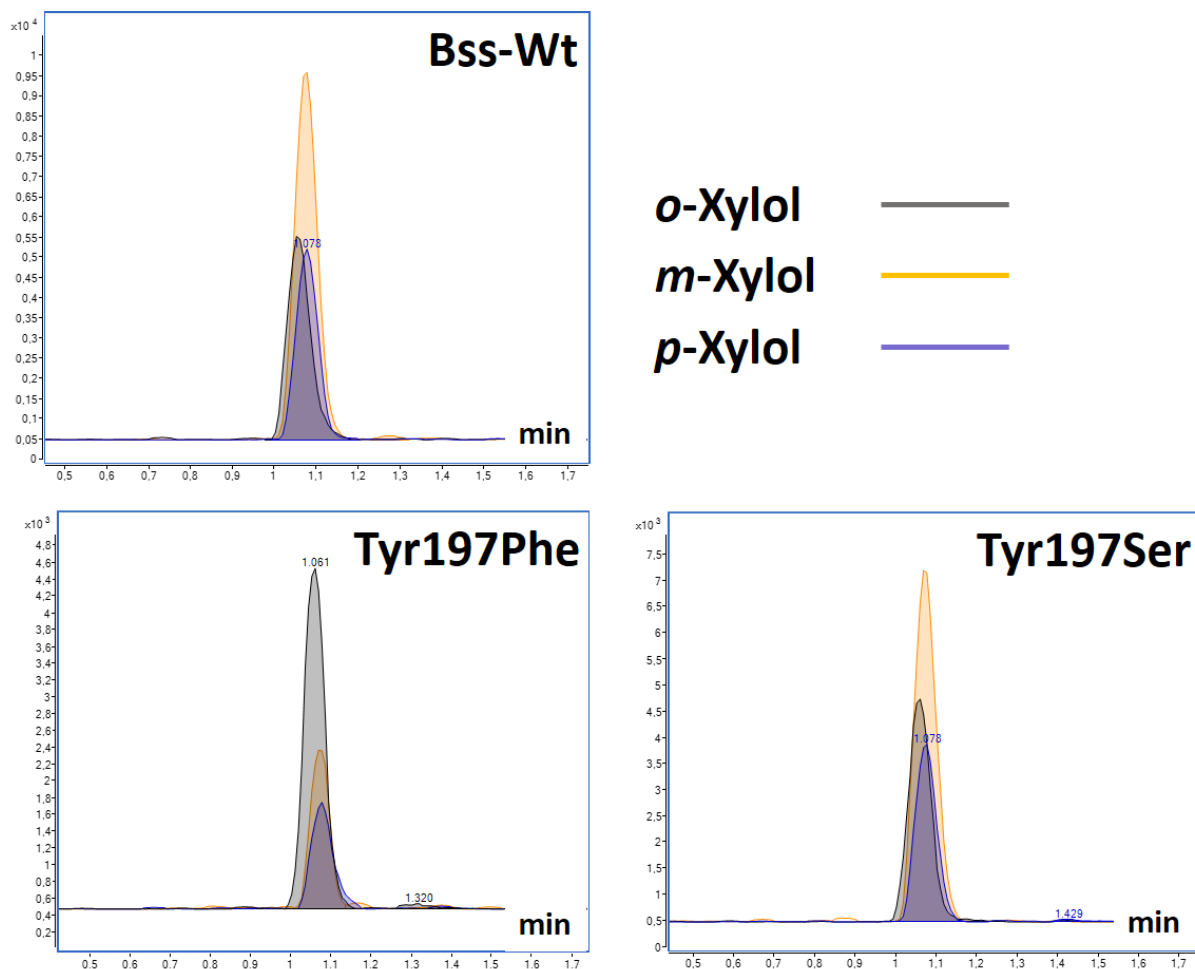


Abbildung 29: Die LC-MS-Chromatogramme zeigen die Signalhäufigkeit der Produkte aus *o*-, *m*- und *p*-Xylol im Reaktionsgemisch von rekombinatem BSS.Wt Zellextrakt, Tyr197Phe Zellextrakt und Tyr197Ser Zellextrakt. Die Peaks sind entsprechend der Xylol-Isomere farblich markiert: ortho-Xylol in Schwarz, meta-Xylol in Orange und para-Xylol in Lila. Die Chromatogramme wurden aus separaten Massenspektren extrahiert und für eine bessere Übersicht in einer Grafik kombiniert.

Anschließend wurden die verbleibenden Substrate (Tabelle 28) umfassend getestet. Leider ergab die Analyse keine nachweisbaren Umsetzungen für diese Substanzen. Eine detaillierte Darstellung sämtlicher Messungen, einschließlich chromatographischer Profile und entsprechender Analysedaten, sind im Anhang aufgeführt (*o*-Toluidin [Anh.-Abbildung 2], *p*-Cymen [Anh.-Abbildung 3], 3 Methylindol (Skatol) [Anh.-Abbildung 4], 5-Methylindolin [Anh.-Abbildung 5], 5-Methylindole [Anh.-Abbildung 6] und 2,7-Dimethylnaphthalin [Anh.-Abbildung 7]).

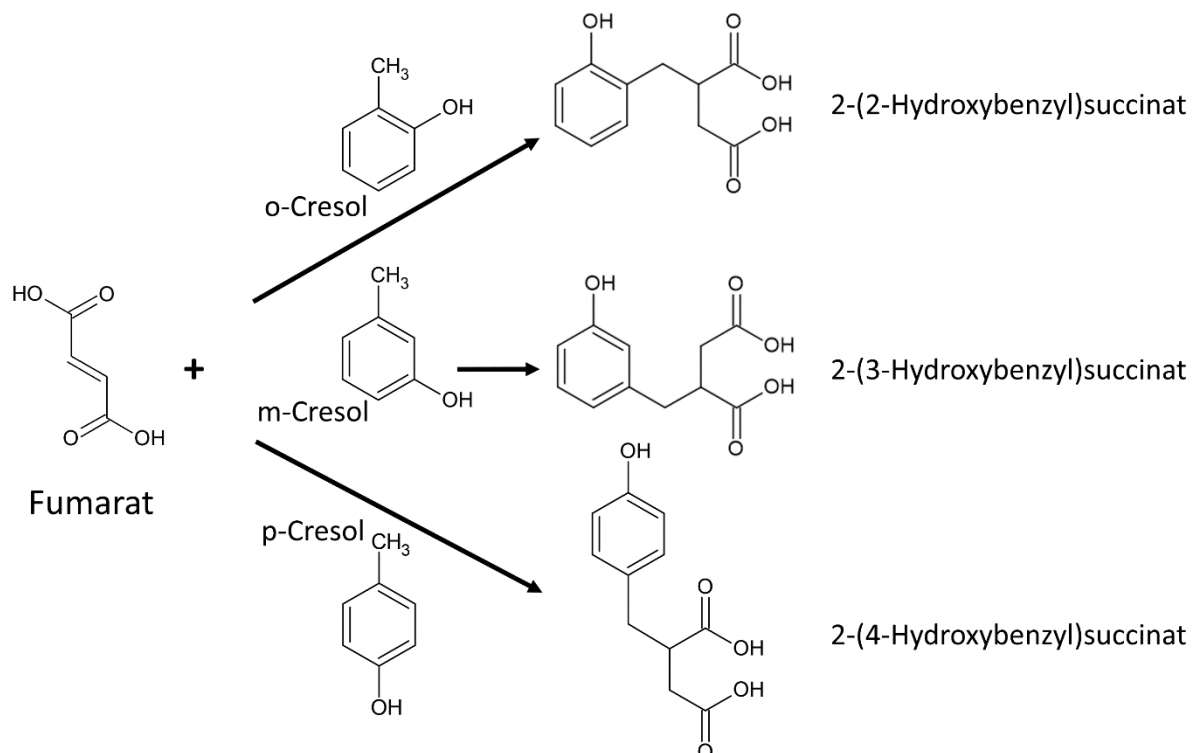


Abbildung 30: Fumarat-Additionsreaktion an die Methylgruppe von Cresol zur Bildung von 2-(4-Hydroxybenzyl)succinat mit o-Cresol, 2-(3-Hydroxybenzyl)succinat mit m-Cresol und 2-(2-Hydroxybenzyl)succinat mit p-Cresol.

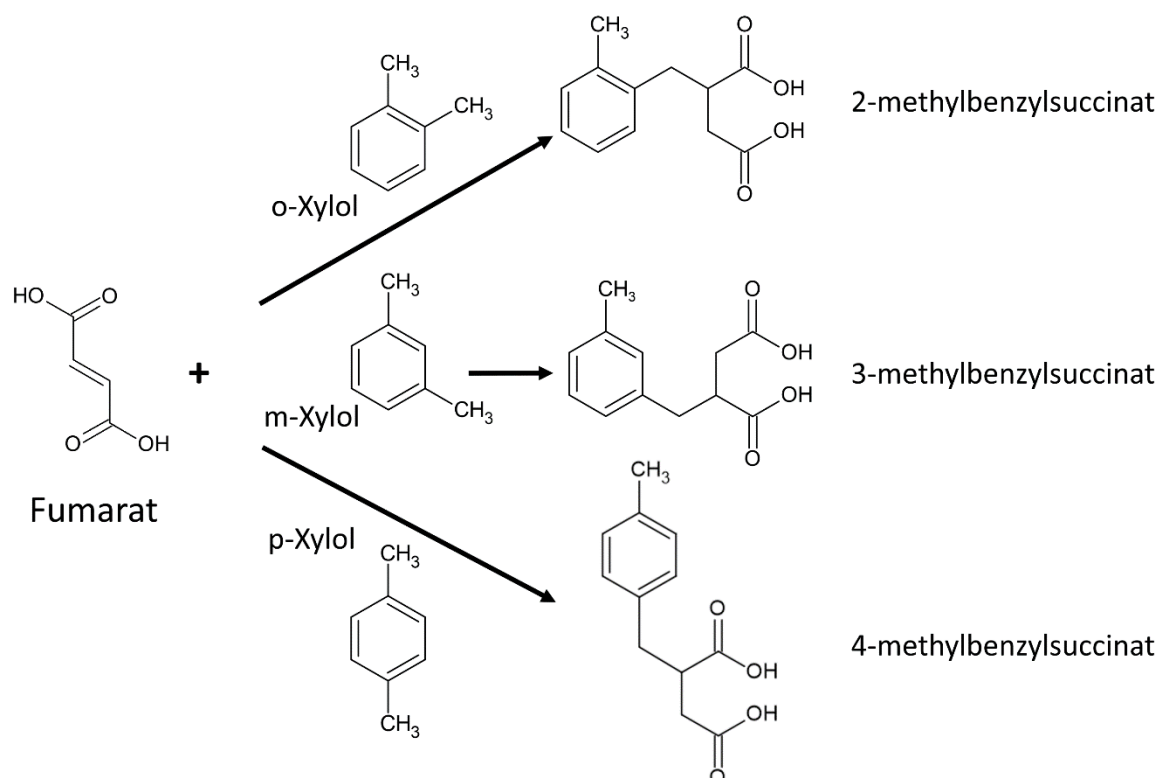


Abbildung 31: Fumarat-Additionsreaktion an die Methylgruppe von Xylol zur Bildung von 2-Methylbenzylsuccinat mit o-Xylol, 3-Methylbenzylsuccinat mit m-Xylol und 4-Methylbenzylsuccinat mit p-Xylol.

3.4 Mutagenese der Fumarat-Bindungsstelle

3.4.1 Herstellung der Arg Mutationen

Arg508 ist in allen X-Succinat-Synthasen konserviert und bindet eine der Carboxylgruppen des Fumarats. In früheren Studien haben wir die katalytische Bedeutung des konservierten Arg508 durch eine einzige Substitution von Arg508 durch Lys nachgewiesen. Die Arg508Lys-Mutante war in der Lage, eine geringe Menge des Produkts 3-Benzyl-4-Ketopentanoat aus Toluol und dem Fumarat-Analogon 3-Acetylacrylat zu synthetisieren ^[30]. Daher haben wir vier neue Mutationen mit ausgetauschtem Arg508 erzeugt und getestet. Arg508 wurde dabei entweder durch Leucin (Arg508Leu, Abbildung 32-B), Isoleucin (Arg508Ile, Abbildung 32-C), Phenylalanin (Arg508Phe, Abbildung 32-D) oder Glutamin (Arg508Gln, Abbildung 32-E) ersetzt. Diese Mutationen wurden eingesetzt, um eine mögliche Ausweitung der Spezifität auf das Fumarat-Analogon 3-Acetylacrylat, Crotonsäure, 3-Pentensäure und Glutaconsäure zu untersuchen, die vom Wildtyp-BSS nicht umgesetzt werden.

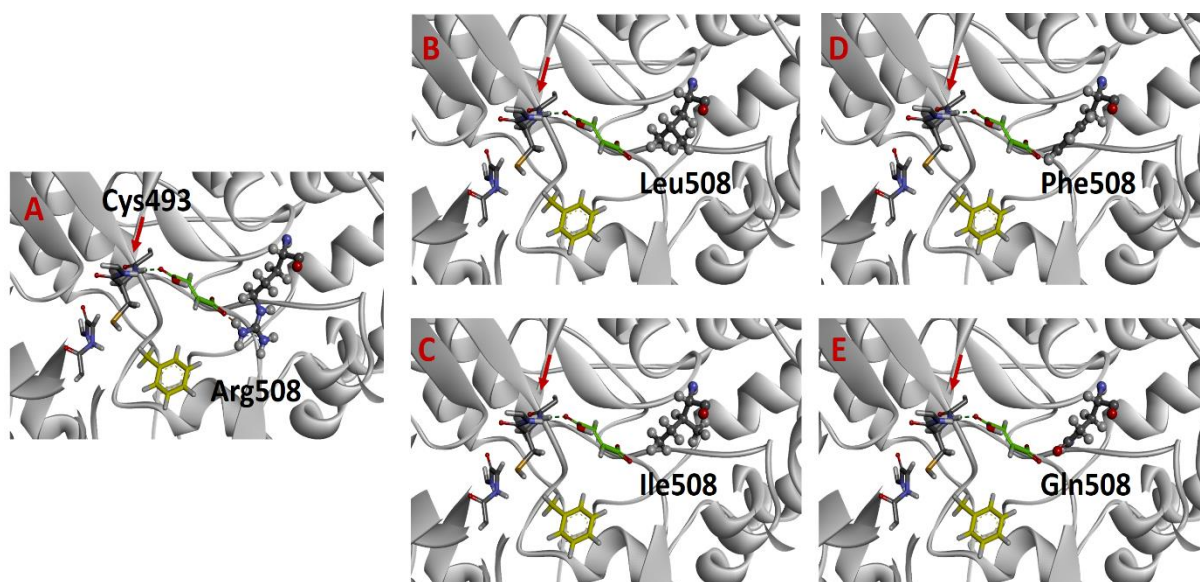


Abbildung 32: Modelle des BSS-aktiven Zentrums in der α -Untereinheit zeigt die Positionierung von Toluol (Gelb) und Bindung von Fumarat (Grün) mit dem konservierten Cys493 (angezeigt durch den roten Pfeil) und den Target-Aminosäuren Arg508, Ile508, Leu508, Phe508 oder Gln508. A. Fumarat-Bindung mit Arg508 und Cys493, B. Fumarat-Bindung mit Leu508 und Cys493, C. Fumarat-Bindung mit Ile508 und Cys493, D. Fumarat-Bindung mit Phe508 und Cys493 und E. Fumarat-Bindung mit Gln508 und Cys493.

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssStrepArg508Ile, pASG3bssStrepArg508Leu, pASG3bssStrepArg508Gln und pASG3bssStrepArg508Phe (Tabelle 2) wurde das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren 1/5 (Arg508Ile), 2/5 (Arg508Leu), 3/5 (Arg508Gln) und 4/5 (Arg508Phe) durch inverse PCR amplifiziert (Methode 2.4.8) und das Produkt wieder ligiert

(Methode 2.4.7). Die Plasmide wurden durch Sequenzieren validiert (Methode 2.4.5) und durch Konjugation mit dem Stamm *E. coli* WM3064 in *A. Evansii* KB740 übertragen (Methode 2.3.6).

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Konjugaten eindeutig um *A. Evansii* KB740 handelt, wurde schließlich eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt.

3.4.2 Untersuchung der spezifischen Aktivität der Arg508 Mutationen

Wie bei den vorherigen Mutationen wurde ein Aktivitätsassay im Zellextrakt durchgeführt.

Die Umwandlung von Toluol und Toluol D5 wurde mit 3-Acetylacrylat, Crotonsäure, 3-Pentensäure oder Glutaconsäure mittels Extrakten mit rekombinantem BSS-Wt und den mutierten Varianten mit Arg508Leu-, Arg508Ile-, Arg508Gln- oder Arg5078Phe-Substitutionen getestet. Die Bestimmung der Enzymaktivität von rekombinanter BSS und den Mutationen wurde unter anaeroben Bedingungen mit dem Rohextrakt in einem diskontinuierlichen Enzymassay durchgeführt und anschließend mittels LC-MS (Triple-Quad-Massenspektrometern) analysiert (Methode 2.5.9 & 2.5.11). Die Analyse mit Triple-Quad-Massenspektrometern ermöglicht einen genauen und spezifischen Nachweis der Zielverbindungen. Durch die Anwendung von Kollisionsenergie auf verschiedenen Ebenen in der Kollisionskammer des Massenspektrometers werden charakteristische Fragmente erzeugt, die zur Bestätigung der Identifizierung von Produkt verwendet werden können. Durch schnelles Umschalten zwischen den verschiedenen Übergangs-Ionenpaaren können mehrere Stamm-Ionen → Produkt-Iontransitionen für dieselbe Verbindung verfolgt werden. Dies wird als Multiple Reaction Monitoring (MRM) bezeichnet und ermöglicht Selektivität durch Überwachung mehrerer Transitionen für einen bestimmten Analyten, die zur Identitätsbestätigung von den Produkten verwendet werden.

-Arg508Phe mit 3-Acetylacrylat

Für die Arg508Phe-Mutante wurde eine sehr geringe spezifische Aktivität mit dem Fumarat-Analogen 3-Acetylacrylat und Toluol oder d5-Toluol beobachtet. Trotz dieser geringen Aktivität war die Mutante in der Lage, das gewünschte Produkt, 3-Benzylpentan-4-onat, in Gegenwart von Toluol und das entsprechende Produkt mit d5-Toluol, d5-3-Benzylpentan-4-onat, zu erzeugen. Obwohl die Menge des exprimierten Proteins relativ niedrig war, konnte das gebildete Produkt mittels LC-MS erfolgreich nachgewiesen werden. Die erwarteten Ionenpeaks für Toluol (205 m/z und 161 m/z) bzw. für d5-Toluol (210 m/z und 166 m/z) wurden in der Abbildung 33 und Abbildung 34 deutlich identifiziert.

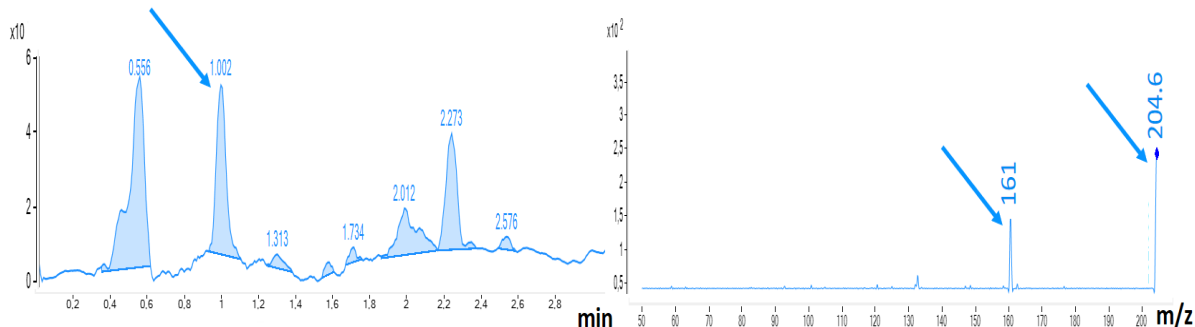


Abbildung 33: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für 3-Benzylpentan-4-onat ($m=206$) aus der Reaktion von Toluol und 3-Acetylacrylat in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 205, wobei der blaue Pfeil den 3-Benzylpentan-4-onat-Peak mit Retentionszeiten von 1,002 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des 3-Benzylpentan-4-onats dargestellt, wobei die blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von 3-Benzylpentan-4-onat bei 205 m/z und 161 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

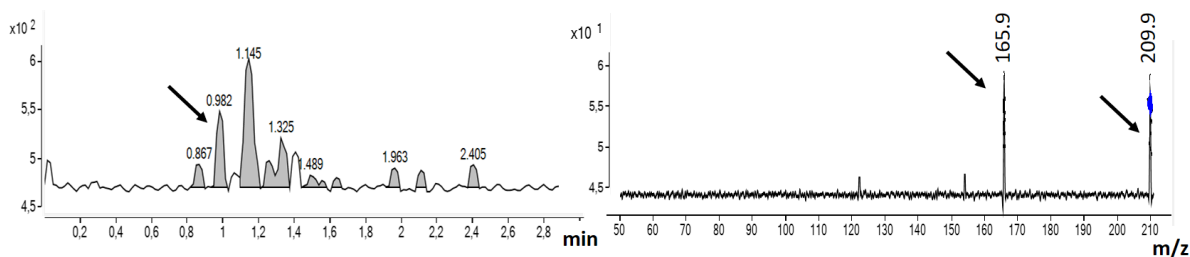


Abbildung 34: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für d_5 -3-Benzylpentan-4-onat ($m=211$) aus der Reaktion von d_5 -Toluol und 3-Acetylacrylat in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 210, wobei der graue Pfeil den d_5 -3-Benzylpentan-4-onat-Peak mit Retentionszeiten von 0,982 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des d_5 -3-Benzylpentan-4-onats dargestellt, wobei die grauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von d_5 -3-Benzylpentan-4-onat bei 210 m/z und 166 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

-Arg508Phe mit Glutaconsäure

Benzylsuccinat-Synthase (BSS) katalysiert die Addition von Toluol an Fumarat. Bei diesem Prozess wird Toluol durch die Doppelbindung von Fumarat hinzugefügt, um (R)-Benzylsuccinat zu erzeugen. Im Falle von Fumarat spielt keine Rolle ob die Addition von Toluol bzw. d_5 -Toluol an C2-Atom oder C3-Atom des Fumarat passiert, da Fumarat symmetrisch ist.

Im Gegensatz dazu führt die Addition von Toluol oder d_5 -Toluol an das C2- oder C3-Atom von Glutaconsäure zu unterschiedlichen Produkten. Die Addition an das C2-Atom erzeugt das Produkt 2-Benzylpentanedioicssäure bzw. das Produkt 2-Benzyl- d_5 -pentanedioicssäure. Hingegen führt die Addition an das C3-Atom von Glutaconsäure zur Bildung des Produkts 3-Benzylpentandisäure bzw. des Produkts 3-Benzyl- d_5 -pentandisäure (Abbildung 35 & Abbildung 36).

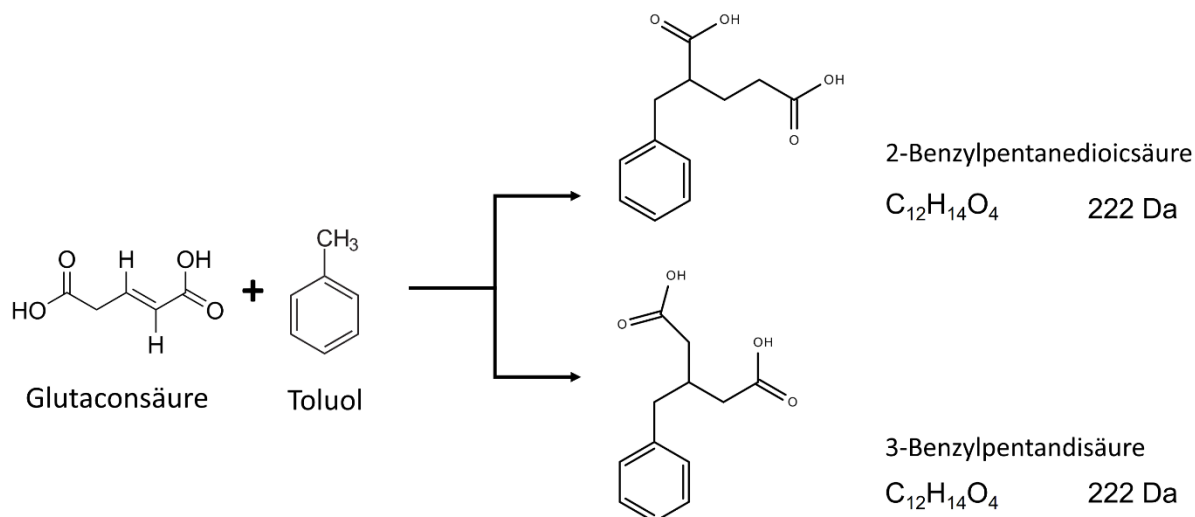


Abbildung 35: Glutaconsäure-Additionsreaktion an die Methylgruppe von Toluol zur Bildung 2-Benzylpentanedioic acid bzw. das Produkt 3-Benzylpentandisäure.

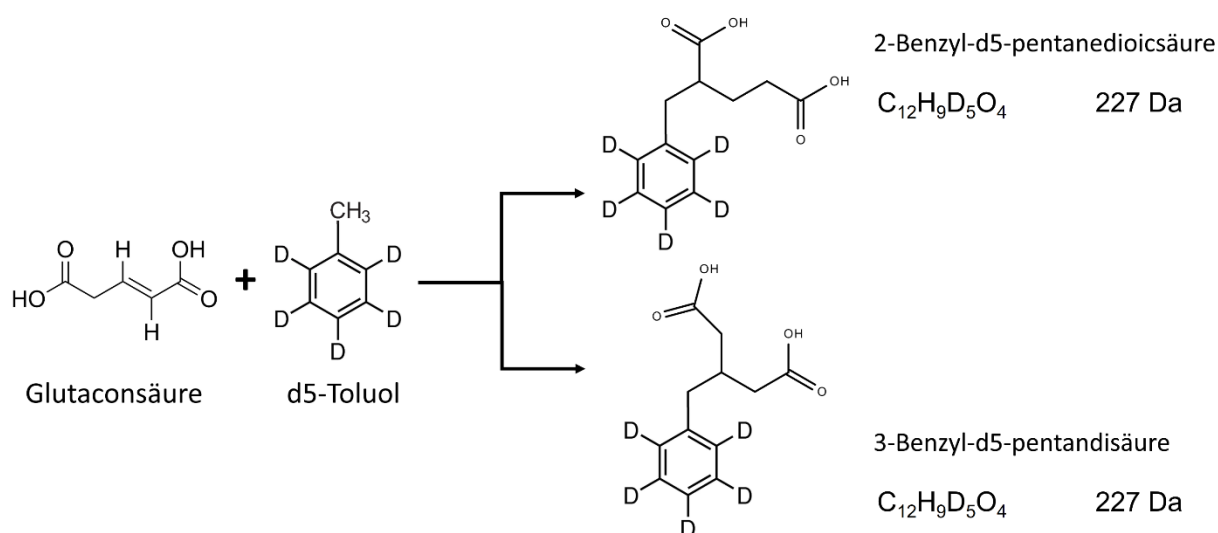


Abbildung 36: Glutaconsäure-Additionsreaktion an die Methylgruppe von d5-Toluol zur Bildung 2-Benzyl-5d-pentanedioic acid bzw. das Produkt 3-Benzyl-5d-pentandisäure.

Da es keine Standards für die verschiedenen Produkte gibt, war es bei der (LC-ESI/MS) -Messung lediglich möglich, die Produkte nachzuweisen, jedoch nicht präzise zu unterscheiden. Sowie diese verschiedenen Produkte, die durch die Addition von Toluol bzw. d5-Toluol an Glutaconsäure entstehen, können zu Abweichungen in den Rotationszeiten bei der (LC-ESI/MS) -Messung führen. Daher wurden in dieser Arbeit die durch die Addition von Toluol bzw. d5-Toluol zu Glutaconsäure entstehenden Produkte als Benzylpentandisäure bzw. Benzyl-d5-pentandisäure bezeichnet.

Die Arg508Phe-Mutante zeigte auch eine sehr geringe spezifische Aktivität mit dem Fumarat-Analogen Glutaconsäure und Toluol oder d5-Toluol.

Trotz dieser geringen Aktivität wurde bei der Mutante Arg508Phe die gewünschte Benzylpentandisäure in Gegenwart von Toluol und die entsprechende Benzyl-d5-pentandisäure mit d5-Toluol erfolgreich erzeugt. Obwohl die Expression des Proteins begrenzt war, konnte das gebildete Benzylpentandisäure erfolgreich durch LC-MS nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Toluol zeigte d5-Toluol eine unklare Aktivität mit Glutaconsäure, wobei die MRM-Messung verschiedene Ionenpeaks mit ähnlicher Intensität wie das erwartete Produkt aufzeigte. Die erwarteten Ionenpeaks für Benzylpentandisäure (221 m/z und 177 m/z) bzw. für Benzyl-d5-pentandisäure (226 m/z und 182 m/z) wurden in der Abbildung 37 & Abbildung 38 eindeutig identifiziert.

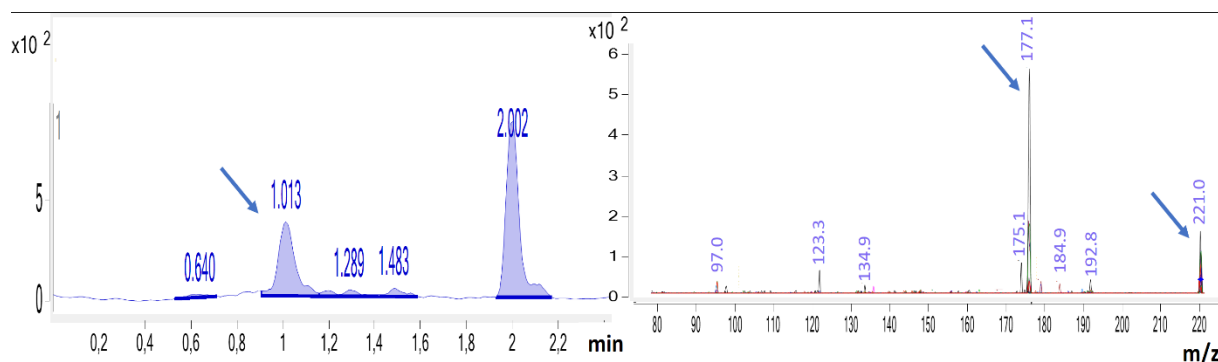


Abbildung 37: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für Benzylpentandisäure ($m=222$) aus der Reaktion von Toluol und Glutaconsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 221, wobei der blaue Pfeil den Benzylpentandisäure-Peak mit Retentionszeiten von 1,013 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der Benzylpentandisäure dargestellt, wobei die blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von Benzylpentandisäure bei 221 m/z und 177 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

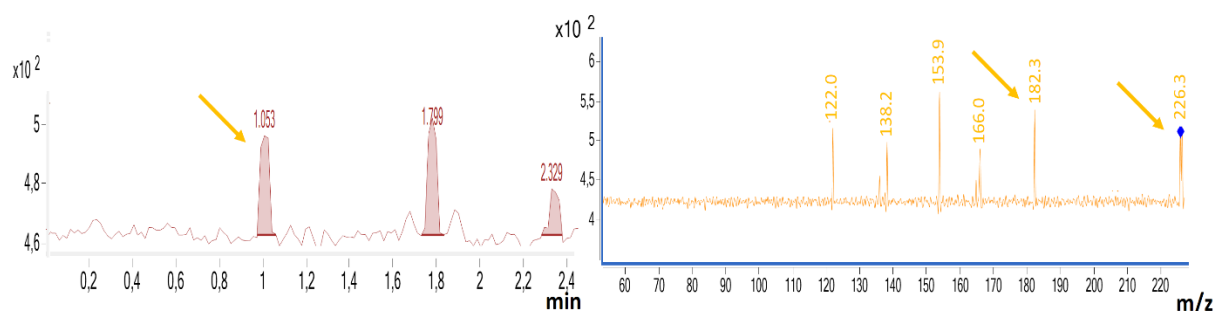


Abbildung 38: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für Benzyl-d5-pentandisäure ($m=227$) aus der Reaktion von d5-Toluol und Glutaconsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 226, wobei der gelbe Pfeil den Benzyl-d5-pentandisäure-Peak mit Retentionszeiten von 1,053 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der Benzyl-d5-pentandisäure dargestellt, wobei die blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von Benzyl-d5-pentandisäure bei 226 m/z und 182 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

-Arg508Phe mit Crotonsäure

Die Benzylsuccinat-Synthase (BSS) ermöglicht vermutlich eine gezielte Addition von Toluol oder d5-Toluol ausschließlich am C2-Atom der Crotonsäure (Abbildung 39). Die Reaktion mit Toluol führt zur Bildung von 2-Benzylbutansäure, deren charakteristische Ionenpeaks bei 177 m/z und 133 m/z liegen. Hingegen führt die Addition von d5-Toluol zur Bildung von 2-Benzyl-d5-butansäure, deren charakteristische Ionenpeaks bei 182 m/z und 138 m/z liegen.

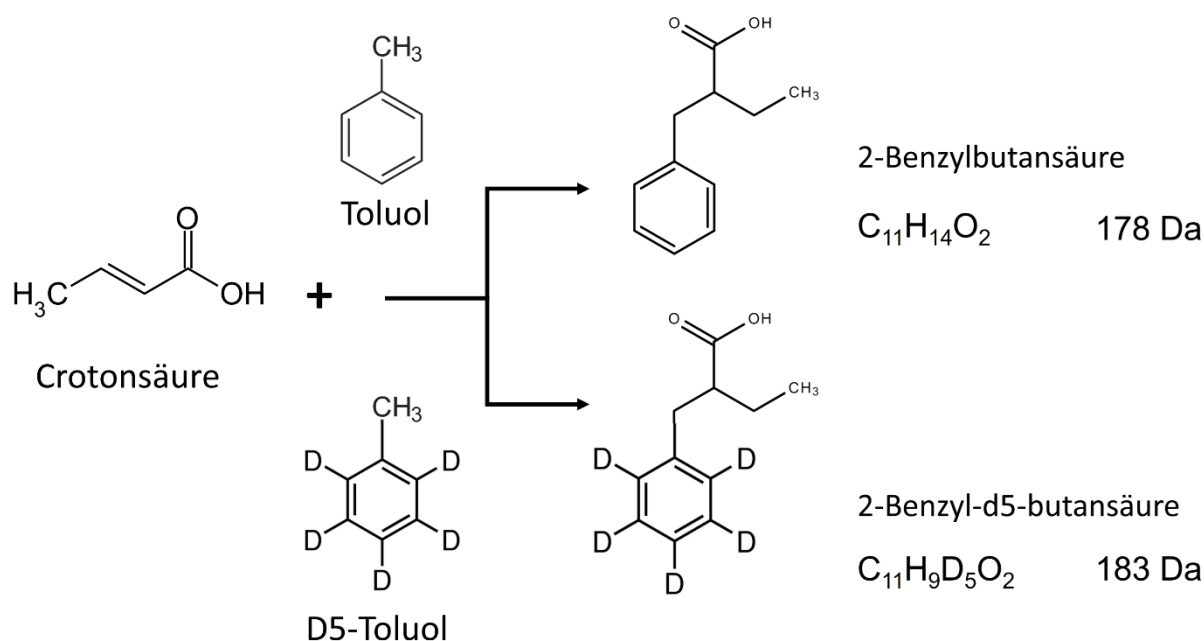


Abbildung 39: Crotonsäure-Additionsreaktion an die Methylgruppe von Toluol zur Bildung 2-Benzylbutansäure bzw. das Produkt 2-Benzyl-d5-butansäure.

Die Arg508Phe-Mutante zeigt möglicherweise auch eine minimale Aktivität mit Crotonsäure und Toluol bzw. d5-Toluol. Das MRM-Chromatogramm der 2-Benzylbutansäure zeigt mehrere Ionenpeaks mit der gleichen Intensität wie die 133 m/z Ionenpeaks des Produkts 2-Benzylbutansäure (Abbildung 40). Aufgrund des starken Hintergrunds ist das Endprodukt jedoch nicht eindeutig als 3-Acetylacrylat nachweisbar. Andererseits weist das MRM-Chromatogramm der 2-Benzyl-d5-butansäure die charakteristischen Ionenpeaks bei 182 m/z und 138 m/z des Produkts 2-Benzyl-d5-butansäure auf. Allerdings haben diese Ionenpeaks die gleiche Intensität wie andere Ionenpeaks im Hintergrund (Abbildung 41). Daher lässt sich nicht eindeutig feststellen, ob es sich um das richtige Produkt handelt oder nicht. Weitere Experimente sind erforderlich, um die beiden Produkte zu bestätigen.

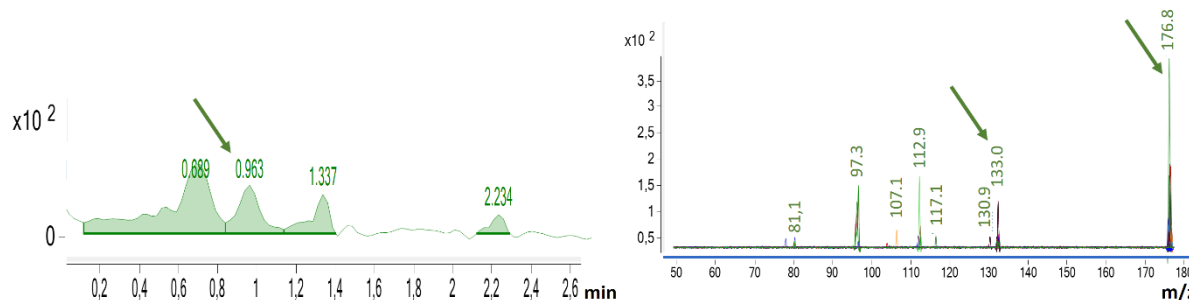


Abbildung 40: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für 2-Benzylbutansäure ($m=178$) aus der Reaktion von Toluol und Crotonsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 177, wobei der grüne Pfeil den 2-Benzylbutansäure-Peak mit Retentionszeiten von 0,963 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der 2-Benzylbutansäure dargestellt, wobei die grünen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von 2-Benzylbutansäure bei 177 m/z und 133 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

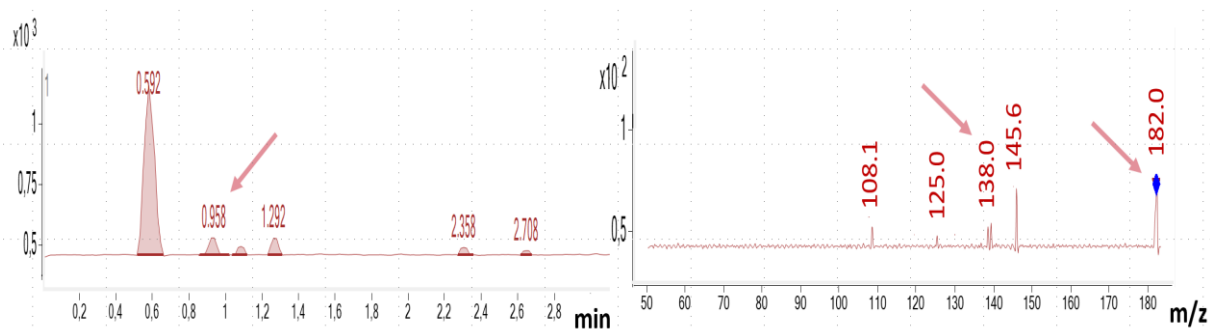


Abbildung 41: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für 2-Benzyl-d5-butansäure ($m=183$) aus der Reaktion von d5-Toluol und Crotonsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 182, wobei der rote Pfeil den 2-Benzyl-d5-butansäure-Peak mit Retentionszeiten von 0,958 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der 2-Benzyl-d5-butansäure dargestellt, wobei die roten Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von 2-Benzyl-d5-butansäure bei 182 m/z und 138 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

-Arg508Phe mit 3-Pentensäure

Die Mutante Arg508Phe zeigte hingegen mit der Fumarat-Analoga 3-Pentensäure keine erkennbare Aktivität.

-Arg508Gln mit Glutaconsäure

Die Arg508Gln-Mutante zeigte auch eine sehr geringe spezifische Aktivität mit den Fumarat-Analogen Glutaconsäure und Toluol bzw. d5-Toluol. Die Arg508Gln-Mutante war in der Lage, das Produkt Benzylpentandisäure zu erzeugen, und trotz der geringen Menge des exprimierten Proteins war das Produkt Benzylpentandisäure bzw. Benzyl-d5-pentandisäure mittels LC-MS nachweisbar (Abbildung 42 & Abbildung 43).

Im Vergleich zum Produkt der Mutante Arg508Phe zeigt das Produkt der Mutante Arg508Gln eine abweichende Retentionszeit. Die Abweichung in der Retentionszeit zwischen dem Produkt der Mutante Arg508Gln und der Mutante Arg508Phe deutet darauf hin, dass diese beiden Varianten unterschiedliche Produkte produzieren. Daher erfordert dies möglicherweise weitere NMR-Spektroskopie-Untersuchungen, um die Struktur der beiden Produkte genau aufzuklären.

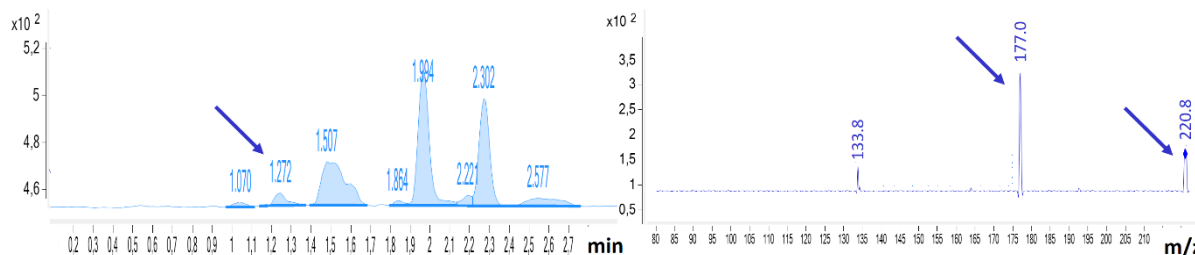


Abbildung 42: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für Benzylpentandisäure ($m=222$) aus der Reaktion von Toluol und Glutaconsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 221, wobei der blaue Pfeil den Benzylpentandisäure-Peak mit Retentionszeiten von 1,272 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der Benzylpentandisäure dargestellt, wobei die blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von Benzylpentandisäure bei 221 m/z und 177 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

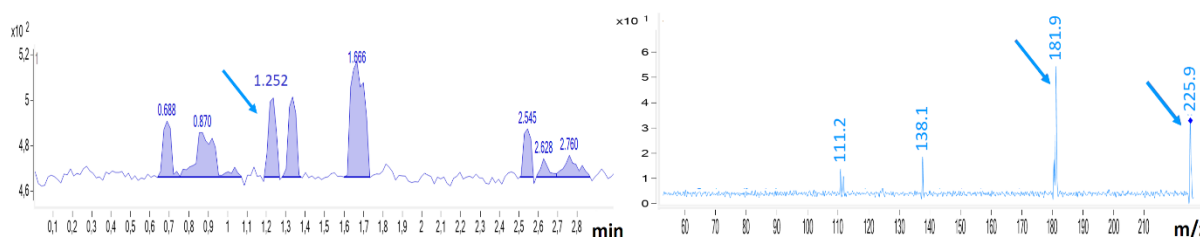


Abbildung 43: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für Benzyl-d5-pentandisäure ($m=227$) aus der Reaktion von d5-Toluol und Glutaconsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 226, wobei der blaue Pfeil den Benzyl-d5-pentandisäure-Peak mit Retentionszeiten von 1,252 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der Benzyl-d5-pentandisäure dargestellt, wobei die blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von Benzyl-d5-pentandisäure bei 226 m/z und 182 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

-Arg508Gln mit Crotonsäure

Die Arg508Phe-Mutante zeigt ebenfalls minimale Aktivität gegenüber Crotonsäure, Toluol und d5-Toluol. Im MRM-Chromatogramm der 2-Benzylbutansäure sind charakteristische Ionenpeaks bei 177 m/z und 133 m/z zu erkennen, die im Vergleich zum Produkt der Mutante Arg508Phe eine höhere Intensität aufweisen. Das MRM-Chromatogramm der 2-Benzyl-d5-butansäure zeigt mehrere Ionenpeaks mit einer ähnlichen Intensität wie der 138 m/z Ionenpeak des 2-Benzyl-d5-butansäure-

Produkts. Im Gegensatz dazu zeigt der 182 m/z Ionenpeak dieses Produkts eine stärkere Intensität im Vergleich zum 138 m/z Ionenpeak sowie zum entsprechenden Ionenpeak der Mutante Arg508Phe. Obwohl die Intensität einiger Peaks nicht sehr hoch war, wurden die erwarteten Ionenpeaks für das Produkt 2-Benzylbutansäure (177 m/z und 133 m/z) bzw. für das Produkt 2-Benzyl-d5-butansäure (182 m/z und 138 m/z) deutlich identifiziert (Abbildung 44 & Abbildung 45).

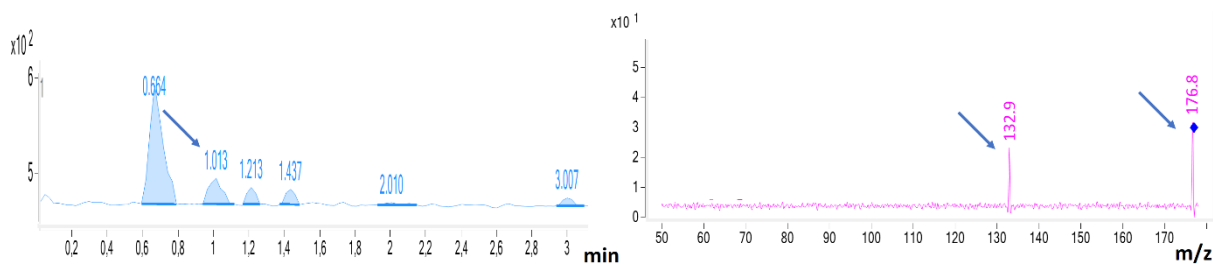


Abbildung 44: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für 2-Benzylbutansäure ($m=178$) aus der Reaktion von Toluol und Crotonsäure in der Arg508Gln-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 177, wobei der blaue Pfeil den 2-Benzylbutansäure-Peak mit Retentionszeiten von 1,013 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der 2-Benzylbutansäure dargestellt, wobei die blauen Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von 2-Benzylbutansäure bei 177 m/z und 133 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

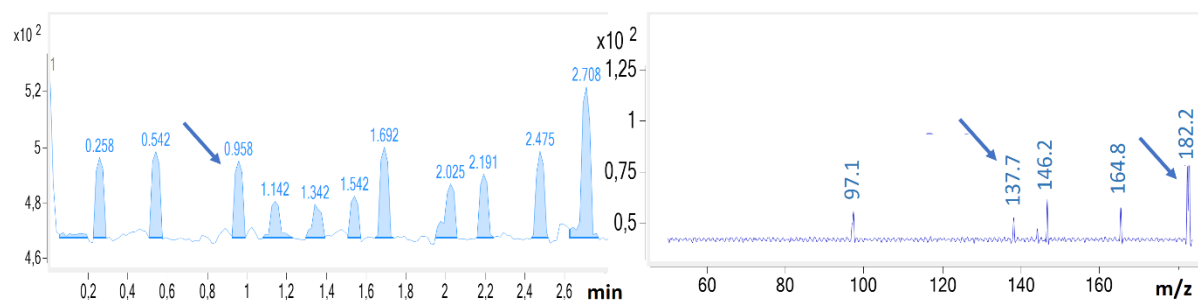


Abbildung 45: (LC-ESI/MS) Chromatogramm für 2-Benzyl-d5-butansäure ($m=183$) aus der Reaktion von d5-Toluol und Crotonsäure in der Arg508Phe-Mutante. (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von 182, wobei der rote Pfeil den 2-Benzyl-d5-butansäure-Peak mit Retentionszeiten von 0,958 min anzeigt. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions der 2-Benzyl-d5-butansäure dargestellt, wobei die roten Pfeile die charakteristischen Ionenpeaks von 2-Benzyl-d5-butansäure bei 182 m/z und 138 m/z zeigen. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladung Ratio, Y-Achse: relative Signalintensität.

Arg508Gln mit 3-Acetylacrylat bzw. 3-Pentensäure

Die Mutante Arg508Gln zeigte hingegen mit den Fumarat-Analoga 3-Acetylacrylat oder 3-Pentensäure keine erkennbare Aktivität.

Gleiches gilt für die Mutationen Arg508Ile und Arg508Leu, die mit sämtlichen Fumarat-Analoga, darunter 3-Acetylacrylat, Crotonsäure, Glutaconsäure und 3-Pentensäure, keine messbare Aktivität aufwiesen.

-Alle Arg-Mutationen mit Fumarat

Außerdem haben wir die Umwandlung von Fumarat und Toluol bzw. Toluol D5 im Zellextrakt sämtlicher Arg-Mutationen (Arg508Leu, Arg508Ile, Arg508Gln oder Arg5078Phe) untersucht.

Wie erwartet wurde bei keiner der Arg-Mutationen eine Aktivität in Verbindung mit Fumarat festgestellt. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung auf die Anwesenheit der α -Untereinheit von BSS mittels SDS-PAGE und Western Blot. Die Alpha-Untereinheit von mutierten BSS war mittels SDS-PAGE in allen Mutationen sichtbar. Jedoch war die Doppelbande der radikalhaltigen α -Untereinheit in den Mutationen durch Western Blot nicht nachweisbar. Die Bestätigung der α -Untereinheit erfolgte durch Western Blot nur bei den Mutationen Arg508Gln und Arg5078Phe, die durch eine Bande in den genannten Mutanten nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu konnte bei den Mutationen Arg508Ile und Arg508Leu keine Bande bestätigt werden (Abbildung 46). Dies lässt auf mögliche Unterschiede in der Proteinexpression oder -stabilität zwischen den verschiedenen Arg-Mutationen schließen.

-rekombinanter BSS-Wt mit allen Fumarat-Analogen

Wir haben die Umwandlung von Toluol bzw. Toluol D5 unter Verwendung von 3-Acetylacrylat, Crotonsäure, 3-Pentensäure und Glutaconsäure im rekombinanten BSS-Wildtyp getestet.

Wie erwartet zeigte der rekombinante BSS-Wildtyp keine Aktivität mit den Fumarat-Analogen. Zusätzlich wurde die α -Untereinheit des rekombinanten BSS-Wildtyps durch SDS-PAGE bestätigt, und die Doppelbande der radikalhaltigen α -Untereinheit wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Aufgrund der niedrigen Konzentration des produzierten Proteins konnte die Doppelbandenbildung der radikalhaltigen Alpha-Untereinheiten nur im BSS-Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 46).

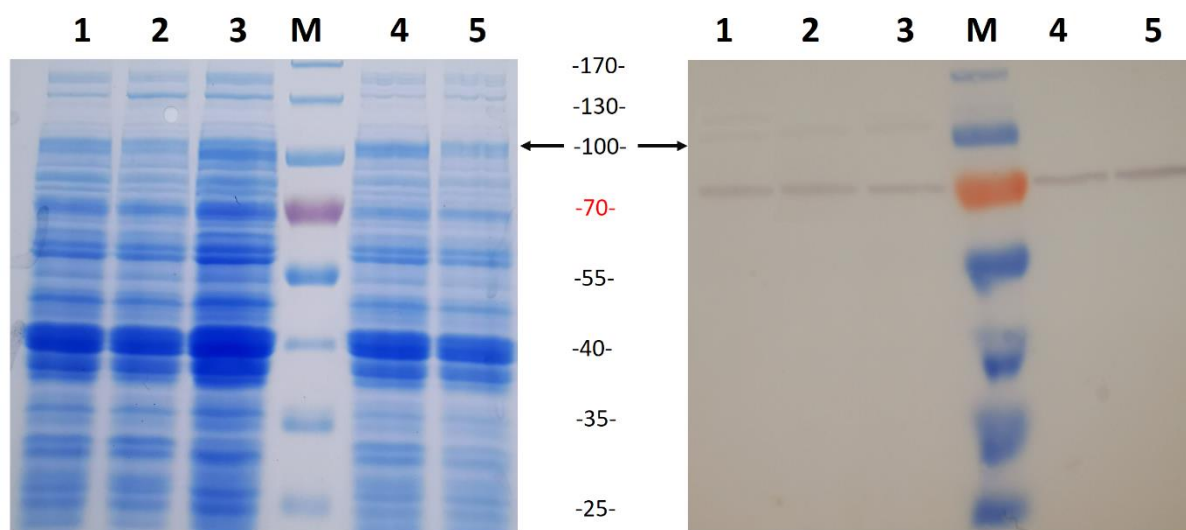


Abbildung 46: (10 %) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot der Arg Mutationen (Arg508Phe, Arg508Gln, Arg508Ile und Arg508Leu) und des rekombinanten Wildtyp-BSS aus *A. evansii* Zellextrakt. Spur 1. BSS-Wt, 2. Arg508Phe, 3. Arg508Gln, M. Protein Standard, 4. Arg508Ile und 5. Arg508Leu.

Tabelle 30: Zusammenfassung der Arg-Mutanten-Ergebnisse. (-) = kein Produkt nachweisbar, (+) = Produkt nachweisbar.

	Fumarat	Acetylacrylat	Glutaconsäure	Crotonsäure	Pentensäure
BSS-Wt	+	-	-	-	-
Arg508Phe	-	+	+	+	-
Arg508Gln	-	-	+	+	-
Arg508Ile/Leu	-	-	-	-	-

3.5 Mutagenese der Cysteinreste der kleinen Untereinheiten (BSS β - BSS γ)

In der Benzylsuccinat-Synthase (BSS) spielen Eisen-Schwefel-Cluster eine zentrale Rolle.

Obwohl ihre Funktion nicht bekannt ist, tragen sie möglicherweise zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur der BSS bei, was für ihre korrekte Funktionalität entscheidend ist.

Die β - und γ -Untereinheiten der BSS binden jeweils ein [4Fe-4S] -Cluster. Die genaue Funktion jedes Clusters in der BSS ist jedoch noch unklar und wird durch biochemische und strukturelle Studien weiter erforscht. Daher wurden in dieser Arbeit drei gezielte Punktmutationen an den beiden Eisen-Schwefel-Clustern der β - und γ -Untereinheiten von BSS durchgeführt. Eine Doppelmutante in der BSS γ -Untereinheit (Cys4Ala Cys7Ala) sowie eine Einfach- (Cys37Ala) und eine Doppelmutante (Cys19Ala Cys22Ala) in der BSS β -Untereinheit wurden erzeugt, um die genaue Funktion dieses Cluster zu erforschen.

3.5.1 Herstellung der Cys Mutationen

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssStrepCys4-7Ala, pASG3bssStrepCys19-22Ala und pASG3bssStrepCys37Ala (Tabelle 2) wurde das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren 9/10 (Cys4Ala Cys7Ala), 11/12 (Cys19Ala Cys22Ala) und 13/14 (Cys37Ala) durch inverse PCR amplifiziert (Methode 2.4.8) und das Produkt wieder ligiert (Methode 2.4.7). Die Plasmide wurden durch Sequenzieren validiert (Methode 2.4.5) und durch Konjugation mit dem Stamm *E. coli* WM3064 in *A. Evansii* KB740 übertragen (Methode 2.3.6). Um sicherzustellen, dass es sich bei den Konjugaten eindeutig um *A. Evansii* KB740 handelt, wurde schließlich eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt.

3.5.2 Reinigung von rekombinanter BSS und der Cys Mutationen durch Strep-Tag-Affinitätschromatographie.

Um die Bedeutung vom Eisen-Schwefel-Cluster der BSS zu bestätigen, führten wir eine Reihe von Enzymreinigungen mit Strep-Tag Affinitätschromatographie in den Zellextrakten von *E. coli* und *A. Evansii* durch, um die Aktivität in Abwesenheit eines des Eisen-Schwefel-Clusters nachzuweisen sowie auch die Menge des produzierten Proteins bei den Mutationen und bei BSS-Wt zu vergleichen. Wir haben erst alle Mutationen in *E. coli DH5 α* und *A. Evansii* KB740 überexprimiert. Für die Reinigung aus den *E. coli*-Kulturen wurden 4 Liter LB-Hauptkultur verwendet.

Da das BSS Protein in *E. coli* nicht aktiv ist (Salii 2019, Seyhan, 2016 und Hilberg 2012), wurden die *E. coli*-Kulturen unter aeroben Bedingungen gezüchtet und geerntet. Die Anreicherung erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels einer Peptid-Modifikation (Strep-Tag) der BSS α Untereinheit.

Für die Anreicherung der BSS in *A. Evansii* wurden 10 Liter *A. Evansii*-Hauptkultur verwendet, die unter streng anaeroben Bedingungen gezüchtet und geerntet. Nach Herstellung des Zellextrakts wurde die BSS mittels Streptavidin-Tactin-Affinitätschromatographie angereichert. Für die Anreicherung mittels Strep-Tag wurden Zellextrakt der pASG3bssStrepWT, pASG3bssStrepCys4-7Ala, pASG3bssStrepCys19-22Ala und pASG3bssStrepCys37Ala *DH5 α* *E. coli* Zellen und der pASG3bssStrepWT, pASG3bssStrepCys4-7Ala, pASG3bssStrepCys19-22Ala und pASG3bssStrepCys37Ala *A. Evansii* Zellen verwendet.

Das BSS eluiert nach etwa 50 ml Laufvolumen. Die Elution von BSS beginnt meistens mit Eluatfraktion 14 (Abbildung 47). Das angereicherte BSS-Protein aus *E. coli* (1,1 mg/ml) ist im Vergleich zum Protein aus *A. Evansii* (0,5 mg/ml) doppelt so hoch konzentriert. Die höchste Protein-Konzentration wurde für BSS-Wt aus *E. coli* (1.1 mg/ml) gemessen, dagegen zeigte die Cys4-7Ala-Mutante der BSS γ in *E. coli* (0,05 mg/ml) und in *A. Evansii* (0,01 mg/ml) extrem niedrige Ausbeuten. Die BSS β - Mutationen (Cys19Ala Cys22Ala, Cys37Ala) konnten sowohl in *E. coli* als auch in *A. Evansii* (0,5- 0,2 mg/ml) gute Ausbeuten erzielen (Tabelle 31).

Tabelle 31: Proteinkonzentration der Eluatfraktionen von BSS-Protein, das durch Strept-avidin-Affinitätschromatographie in *E. coli* und in *A. Evansii* angereichert wurde.

	BSS- Variante in <i>E. coli</i>	Konzentration mg/ml	BSS- Variante in <i>A. Evansii</i>	Konzentration mg/ml
	BSS-Wt	1.1	BSS-Wt	0.5
BSS β	Cys19-22Ala	0.5	Cys19-22Ala	0.2
	Cys37Ala	0.46	Cys37Ala	0.25
BSS γ	Cys4-7Ala	0.05	Cys4-7Ala	0.01

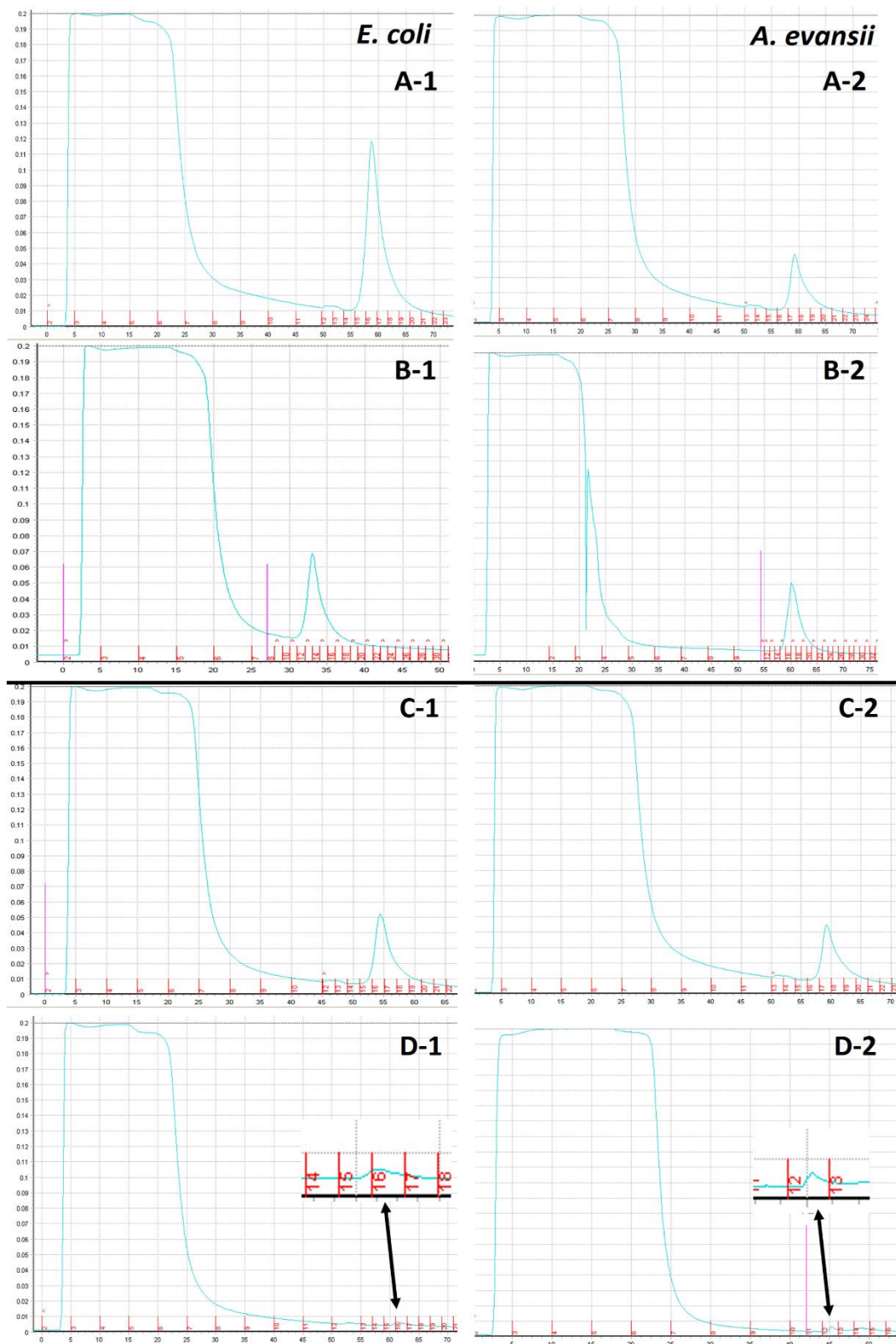


Abbildung 47: Chromatogramm der Aufreinigung von BSS aus Extrakten von *E. coli* DH5 α (Links), A-1. rekombinanter BSS-Wt, B-1. Cys19Ala Cys22Ala, C-1. Cys37Ala, D-1. Cys4Ala Cys7Ala, und *A. Evansii* KB740 (Rechts), A-2. rekombinanter BSS-Wt, B-2. Cys19Ala Cys22Ala, C-2. Cys37Ala, D-2. Cys4Ala Cys7Ala. Die Anreicherung erfolgte durch Streptavidin-Actin-Affinitätschromatographie. Ungefähr nach 50 ml beginnt die Elution der rekombinanten BSS, dessen Eluate anschließend gepoolt wurden. Die Eluate 3-9 sind der Lauf und wurden auch für die SDS-PAGE vorbereitet. Nach Abschluss der Elution (Abfall) wurde die Säule regeneriert.

Außerdem wurden die Eluatfraktionen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und das Auftreten von BSS α durch Western-Blot-Analyse bestätigt. Bei allen Mutationen ist eine einzelne Bande der getaggten großen α -Untereinheit mit einer Masse von 98 kDa zu sehen, aber keine Doppelbande, die die radikalhaltige α -Untereinheit charakteristisch wäre (Abbildung 48). Darüber hinaus konnten wir in keinem der Zellextrakte oder den gereinigten Enzymen der mutierten Varianten aus *A. Evansii* Umsetzung der nativen Substrate (Fumarat+Toluol) nachweisen.

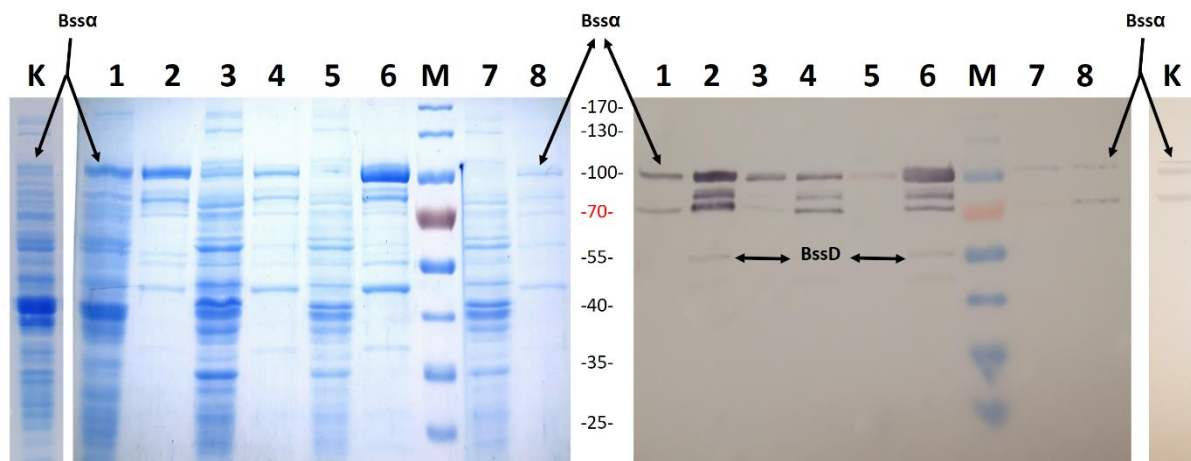


Abbildung 48: (10 %) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot von Zellextrakt und Anreicherung von BSS aus Extrakt von *A. Evansii* KB740. Spur 1. BSS-Wt Zellextrakt, 2. BSS-Wt Eluate, 3. Cys19-22Ala Zellextrakt, 4. Cys19-22Ala Eluate, 5. Cys37Ala Zellextrakt, 6. Cys37Ala Eluate, M. Protein Standard, 7. Cys4-7Ala Zellextrakt, 8. Cys4-7Ala Eluate, K. BSS-Wt Zellextrakt aus neuen konjugierten Zellen als Kontrolle.

3.5.3 Bestimmung des Eisen-Gehalts

Die Mutationen in der γ - oder β -Untereinheit wirken sich auf die Integrität von Eisen-Schwefel-Cluster aus, was dazu führen kann, dass einer der beiden Eisen-Schwefel-Cluster fehlt. Deshalb haben wir in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Andreas Seubert, Philipps-Universität Marburg, den Eisengehalt in gereinigtem BSS sowohl nach Expression in *E. coli* als auch in *A. Evansii* mittels ICP-MS-Metallanalyse analysiert.

Die Mutationen in den β - oder γ -Untereinheiten zeigten durch Metallanalyse einen geringeren Eisengehalt im Vergleich zum Eisengehalt der rekombinanten BSS aus *E. coli* bzw. *A. Evansii*. Der niedrigste Eisengehalt der Mutationen wurde bei der Mutation (Cys4Ala Cys7Ala) in *E. coli* mit 1,4 Fe/Protein gemessen, während der höchste Eisengehalt bei der Mutation (Cys37Ala) in *A. Evansii* mit 2,7 Fe/Protein festgestellt wurde. Die rekombinanten BSS-Wt aus *E. coli* bzw. *A. Evansii* zeigten beide einen gleichmäßigen Gehalt von 3,7 bzw. 3,4 Fe/Protein, was etwa dem Doppelten des Eisengehalts im Vergleich zu den mutierten Varianten entspricht (Tabelle 32).

Trotz der Variation im Eisengehalt zwischen den Mutationen und dem rekombinanten BSS-Wt zeigt die Metallanalyse eindeutig, dass in den Mutationen im Vergleich zum rekombinanten BSS-Wt wesentlich weniger Eisen eingebaut wird, möglicherweise nur zur Hälfte. Dies legt eindeutig nahe, dass die

Mutationen einen klaren Einfluss auf den Aufbau des Eisen-Schwefel-Clusters im Protein haben und entspricht den Erwartungen, wenn jeweils eines der beiden Cluster ausfällt.

Tabelle 32: Die Menge an Eisen im Verhältnis zu BSS-Protein (mol/ mol) der Strep-Tactin aufgereinigten Proben nach ICP-MS Metallanalyse.

	BSS aus <i>E. coli</i>	Fe/Protein mol / mol	BSS aus <i>A. Evansii</i>	Fe/Protein mol / mol
	BSS-Wt	3,7	BSS-Wt	3,4
BSS β	BSS Cys37	1.9	BSS Cys37	2.7
	BSS Cys19-22	1,7	BSS Cys19-22	2.2
BSS γ	BSS Cys4-7	1.4	BSS Cys4-7	1,9

Zusätzlich wurden alle Proben (BSS-Wt und die Varianten mit den Mutationen Cys19Ala Cys22Ala, Cys37Ala und Cys4Ala Cys7Ala) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-PAGE zeigte eine gute Expression und die Anwesenheit der beiden β - und γ -Untereinheiten (11 und 13 kDa) sowohl im rekombinanten BSS-Wildtyp als auch in den Varianten (Cys19Ala Cys22Ala, Cys37Ala, Cys4Ala Cys7Ala) (Abbildung 49).

Aufgrund der geringen Konzentration des Eluats der Variante (Cys4Ala Cys7Ala) wurde der PageSilver™ Silver Staining Kit der Firma Fermentas verwendet, um Banden mit niedriger Konzentration sichtbar zu machen.

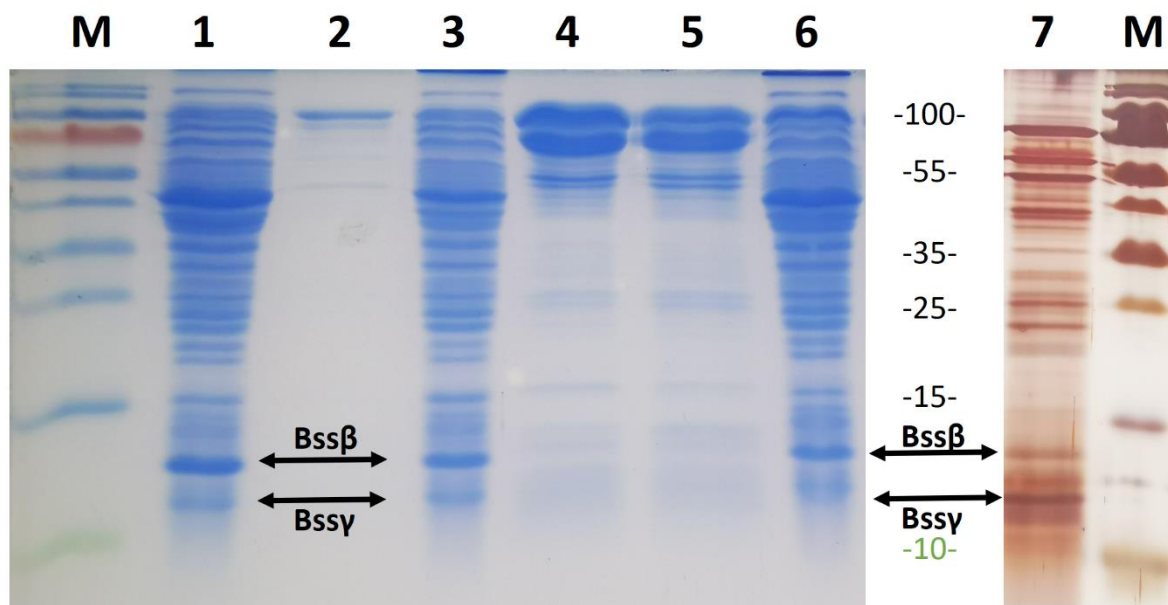


Abbildung 49: (20 %) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Zellextrakt und Anreicherung von BSS aus Extrakt von *A. Evansii* KB740 mittels Strep-Tactin Affinitätschromatographie. M. Protein Standard, Spur 1. Cys19-22Ala Zellextrakt, 2. Cys19-22Ala Eluat, 3. Cys37Ala Zellextrakt, 4. Cys37Ala Eluat, 5. BSS-Wt Eluat, 6. BSS-Wt Zellextrakt, 7. Cys4-7 Ala Eluat gefärbt mit PageSilver™ und M. Protein

Standard. Die Pfeile zeigen die beiden BSS β - und BSS γ - Untereinheiten bei 11 und 13 kDa. Zu sehen auch ist die große α -Untereinheit mit einer Masse von 98 kDa.

3.6 Heterologes Produktionssystem der Naphthyl-2-Methylsuccinat-Synthase in *A. Evansii*

Anaerobe toluolabbauende Bakterien sind in vielen physiologischen Gruppen von Mikroorganismen zu finden, insbesondere in denitrifizierenden Bakterien, Metallionen und Sulfat reduzierenden Arten.

Die meisten der bekannten toluolabbauenden denitrifizierenden Bakterien gehören zu den Gattungen *Thauera*, *Azoarcus*, *Georgfuchsia* und *Aromatoleum* innerhalb der Familie Betaproteobacteria.

Eine zusätzliche Unterfamilie paraloger FAE-Isoenzyme wurde in einer Naphthalin oder 2-Methylnaphthalin-abbauenden sulfatreduzierenden Anreicherungskultur identifiziert [33][47].

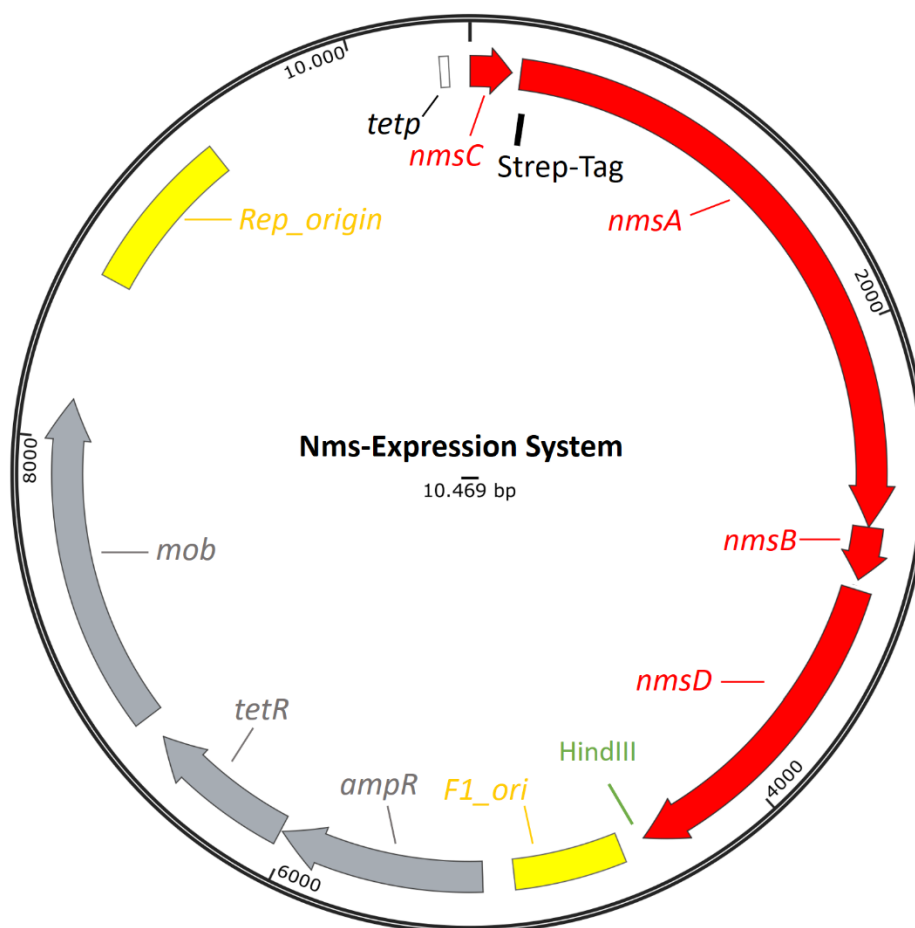


Abbildung 50: Nms-Überexpressionssystem pASG3_Nms_Strep+NmsD-ori, verwendet für die Herstellung von aktiven NMS.

2-Methylnaphthalin wird im vorherrschenden Stamm N47 wahrscheinlich durch Fumarataddition an die Methylgruppe aktiviert, analog zum anaeroben Toluolabbau, weil in der Genomsequenz von

Stamm N47 Gene für ein paralogen Glycylradikal-Enzym entdeckt wurden, die wahrscheinlich für die beteiligte Naphthyl-2-methylsuccinat-Synthase codieren. Nach der Aktivierung des gebildeten Naphthyl-2-methylsuccinats mit Coenzym (Co)A verläuft der Abbauweg über einen β -Oxidationsweg am Methylenkohlenstoff, der ebenfalls durch paraloge Genprodukte mit Ähnlichkeit zu den Bbs Proteinen des anaeroben Toluolabbaus katalysiert wird. Der Abbauweg von 2-Methylnaphthalin endet schließlich zu dem zentralen Metaboliten 2-Naphthoyl-CoA^{[33][10]}.

Um die Naphthyl-2-methylsuccinat-Synthase (NMS) aus Stamm N47 der Sulfat-reduzierenden Anreicherungskultur zu charakterisieren, wurden die Gene (*NmsA*, *B*, *D* und *NmsC*) durch PCR amplifiziert, kloniert und heterolog in *A. evansii* KB740 exprimiert (Abbildung 50).

Die Amplifikation der *nms*-Gene (*NmsA*, *B*, *D*) erfolgte in zwei Schritten unter Verwendung von Oligonukleotidpaaren 31/32, die am N-terminalen Primer ein Strep-Tag und zwei Schnittstellen (NheI & KpnI) und am C-terminalen Primer eine Schnittstelle (HindIII) enthielten. Im Gegensatz dazu wurde die Amplifikation von *NmsC* mit den Oligonukleotidpaaren 33/34 durchgeführt, die in Folge die Schnittstelle (KpnI & NheI) darstellen. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden zunächst vom Gel abgeschnitten und gereinigt. Im zweiten Schritt wurde dann das zuvor etablierte Überexpressionssystem für die Produktion von aktivem BSS das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mit den beiden Enzymen (NheI & HindIII) verdaut und anschließend mit den erhaltenen NMS-Genen (*nmsA*, *B*, *D*) ligiert. Zunächst wurde das Plasmid, das die *nmsA*-, *B*- und *D*-Gene enthält, mit den Enzymen (XbaI und NheI) verdaut, um BSS γ zu entfernen, und mit dem amplifizierten *NmsC* ligiert. Das validierte Plasmid, das alle NMS-Gene (*C*, *A*, *B* und *D*) enthält, wurde durch Konjugation vom Stamm *E. coli* WM3064 in *A. evansii* KB740 übertragen.

Die anschließende Kultivierung erfolgte in 10-Liter-Kulturen anaerob und die Expression der *nms*-Gene wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,7 durch Zugabe mit 100 μ l/l Anhydrotetracyclin (Tabelle 12) induziert. Es folgte eine Inkubation bei 28 °C für 24 Stunden. SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit einem Anti-Streptag-Antikörper wurden durchgeführt, um die mit Streptag markierte α -Untereinheit nachzuweisen.

Eine induzierte Bande wurde nach SDS-PAGE auf der Höhe der 100-kDa-Bande des Proteinstandards nachgewiesen, die der α -Untereinheit der produzierten NMS entspricht und im Western Blot als schwach sichtbare Doppelbande nachgewiesen wurde (Abbildung 51).

Dementsprechend scheint die NMS im *A. evansii* produziert und zum Glycylradikal-Status aktiviert zu werden. Anschließend testeten wir die Umsetzung von Toluol und des vorhergesagten nativen Substrats 2-Methylnaphthalin, von dem man annimmt, dass es von diesem Enzym umgesetzt wird. Rekombinante NMS zeigte nach HPLC-Analyse zunächst keine Produktbildung mit 2-Methylnaphthalin oder D5-Toluol bzw. Toluol, und die Bildung von 2-Naphthylmethylsuccinat war auch durch

LC-MS-Analyse nicht nachweisbar (Abbildung 51). Daher müssen die Bedingungen des Enzymtests für den Nachweis von 2-Naphthylmethylsuccinat-Addukt weiter verbessert werden.

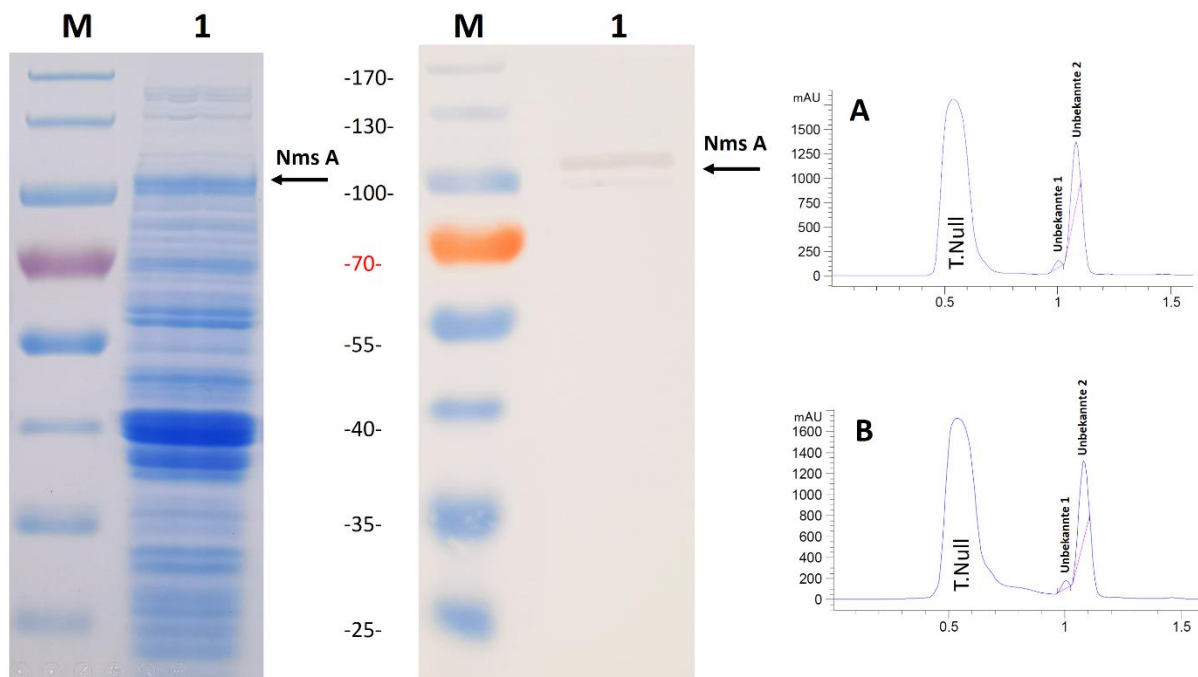


Abbildung 51: (Links) (10 %) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot der Strep-markierten α -Untereinheit (110 kDa) von NMS unter Verwendung des α -Strep-Antikörpers. Eine Doppelbande von NmsA ist bei ungefähr 110 kD zu sehen. Spur 1. NMS Zellextrakt aus *A. evansii*, M. Protein Standard. (Rechts) HPLC-Analyse der Umsetzung von Fumarat mit Toluol bzw. 2-Methylnaphthalin im Zellextrakt von *A. evansii*. Beide Messungen zeigen keine nachweisbare Aktivität. A. HPLC-Analyse der Reaktionsmischung von Fumarat und Toluol, B. HPLC-Analyse der Reaktionsmischung von Fumarat und 2-Methylnaphthalin.

4 Diskussion

4.1 (R)- oder (S)-Benzylsuccinat Synthase

Die quantenmechanische (QM) Modellierung bestätigt, dass der Reaktionsmechanismus von BSS, nämlich die Addition von Toluol an Fumarat und die ausschließliche Bildung von (R)-Benzylsuccinat als Produkt, energetisch günstiger ist als das pro(S)-Äquivalent. Beide Äquivalente wiesen eine große Ähnlichkeit auf, wobei das Fumarat ungefähr denselben Raum in den aktiven Zentren einnahm. Die Gesamtenergie des pro(S)-orientierten Modells war deutlich höher als die des pro(R)-orientierten Modells (Unterschied von 36 kcal/mol), was zur Bildung des R-Stereoisomers führt, jedoch nicht des S-Stereoisomers^[28].

Die BSS-Modelle für das aktive Zentrum zeigen, dass der Hohlraum des aktiven Zentrums zwei unterschiedliche Bindungstaschen aufweist. Eine hydrophobe Bindungstasche, die spezifisch für die Interaktion mit dem Benzolring und der protonierten Carboxylgruppe ist, und eine hydrophile Bindungstasche, die spezifisch für die Bindung der deprotonierten Carboxylgruppe ist^[29].

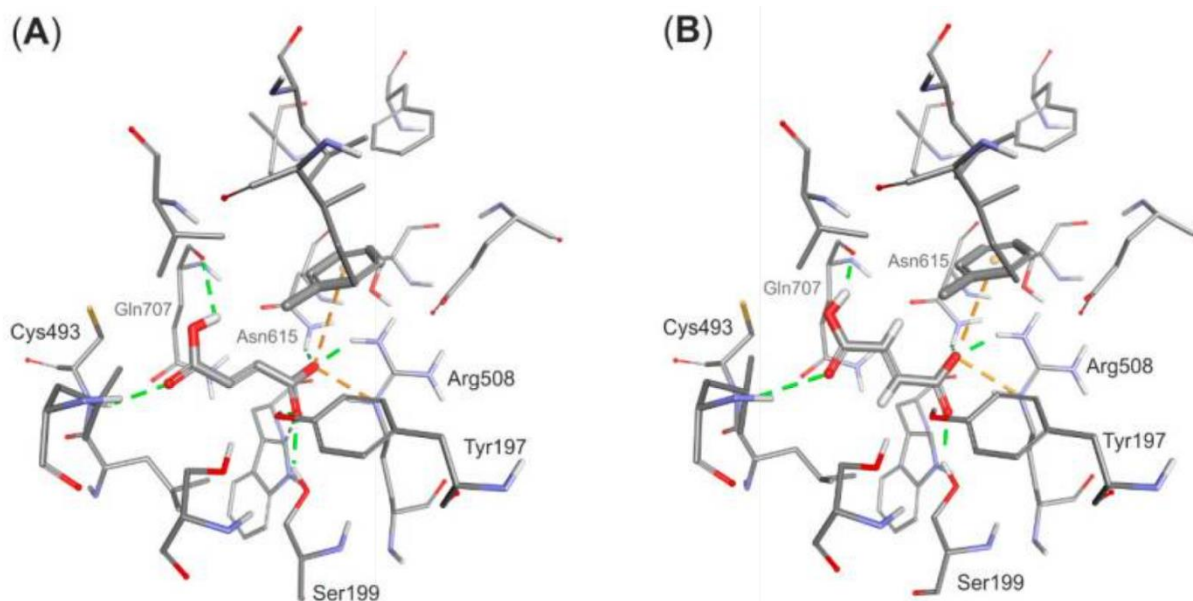


Abbildung 52: Strukturmodell des Enzym-Produkt-Komplexes, A. Bindungsmodus des (R)-Benzylsuccinats und B. Bindungsmodus des (S)-Benzylsuccinats. Die markierten Aminosäuren bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit Fumarat. Entnommen aus (Szaleniec and Heider, 2016)^[28].

Die Fumarat-Bindungstasche (hydrophile Bindungstasche) ist wahrscheinlich der wichtigste Faktor, der die Stereospezifität der Reaktion bzw. die Bildung von (R)-Benzylsuccinat bestimmt.

MD-Simulationen mit (R)-Benzylsuccinat im aktiven Zentrum zeigen eine starke Salzbrücke mit dem bei allen FAEs konservierten Arg508 (11,94 kcal/mol) und auch weitere H-Bindungen mit Tyr197 (3,16 kcal/mol), Trp613 (2,52 kcal/mol), Gln707 (0,85 kcal/mol) und Cys493 (0,25 kcal/mol) (Abbildung 52). Andererseits zeigt auch das (S)-Benzylsuccinat in MD-Simulationen ähnliche Wechselwirkungen

im aktiven Zentrum des Enzyms, nämlich eine starke Salzbrücke mit Arg508 (11,35 kcal/mol), H-Bindungen mit Tyr197 (3,3 kcal/mol), Asn615 (3,18 kcal/mol) und dem konservierten Cys des reaktiven Thiylradikals Cys493 (1,28 kcal/mol) (Abbildung 52) ^[28].

Bisher wurde jedoch *in vivo* keine Produktion von (S)-Benzylsuccinat durch BSS nachgewiesen. Ein möglicher Grund dafür könnte die höhere Gesamtenergie des pro(S)-orientierten im Vergleich zum pro(R)-orientierten Modell (36 kcal/mol Unterschied) sein. Die Schätzung der Bindungsenergien bestätigte auch, dass die Bindung von pro (R)- Benzylsuccinat energetisch günstiger ist als die des pro(S)-Äquivalents (um 9,3 kcal/mol). Daher haben wir in dieser Arbeit versucht, die Bindung des Produkts im aktiven Zentrum zu destabilisieren, indem wir sowohl Trp613 als auch Gln707 austauschten. Damit sollte, die (R)-Benzylsuccinat-Produktion herunterreguliert oder sogar eine alternative (S)-Benzylsuccinat-Synthese ermöglicht werden. Die Enzymassay von Extrakten aus rekombinanten Zellen von *A. Evansii* zeigte nach der chromatographischen Trennung mittels HPLC einige zusätzliche Peaks im Vergleich zu Extrakten aus rekombinantem Wildtyp. Einer dieser Peaks in der Mutante Gln707Glu wurde eindeutig der Benzylsuccinat-Synthase zugeordnet. Die chirale chromatographische Trennung zeigte aber nur Synthese von (R)-Benzylsuccinat. Es sind also weitere Versuche erforderlich, um die Inversion des Chiralitätszentrums zu ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit wäre der Austausch von Asn615, das mit Benzylsuccinat in der (S)-Orientierung eine stärkere H-Bindung bildet eingeht (-3,18 kcal/mol) als in der (R)-Orientierung (-2,2 kcal/mol). Dieser Austausch könnte dazu beitragen, den Energiebarriere-Unterschied für die Bildung der (S) Benzylsuccinat-Synthase zu überwinden und sie thermodynamisch zu ermöglichen. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um die gewünschte Inversion zu erreichen und die vollständigen Potenziale der synthetischen Fähigkeiten der Benzylsuccinat-Synthase zu entfalten.

4.2 Substratspezifität der Toluol-Bindungstasche

Die Toluol-Bindungsstelle besteht aus einem Hohlraum, der vom Enzym auf drei Seiten eingegrenzt wird. Eine dieser Seiten wird hauptsächlich durch aliphatische (Ile-384, Leu-391, Val-709, Leu-711) und aromatische Reste (Phe-385) aufgebaut, die zweite Seite durch einen Ring aus hydrophoben (Tyr-197, Tyr-381, Leu-492, Ile-617) und polaren (Glu-189, Gln-707) Resten, während die letzte Seite der Bindungstasche das gebundene Cosubstrat Fumarat exponiert. Dies erleichtert die Positionierung des Toluols während der Katalyse, da Toluol keine polaren funktionellen Gruppen enthält. Die Geometrie der Bindetasche begünstigt die Positionierung der Methylgruppe des Toluols gegen C2 von Fumarat und des aromatischen Rings von Toluol gegen das C1-Carboxylat von Fumarat.

Die alternativen FAE-Mitglieder HBSS und NMSS liegen in der Sequenzkonservierung nahe bei BSS (54 % Identität bzw. 49 % Identität)^[21] und weisen beide einige Substitutionen am Ende des aktiven

Zentrums auf, durch die die Größe der Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum reduziert wird, so dass die Bindung der Hydroxy-Gruppe von p-Kresol in HBSS und des zweiten Arylrings des Substrats, 2-Methylnaphthalin in NMS verbessert wird. Die Methylphenanthren-Succinat-Synthase (MPS/PMS), ein putatives Glycylradikal-haltiges FAE, das in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, enthält ebenfalls einige Substitutionen, die den Hohlraum erweitern, um größere Substrate zu akzeptieren. Strukturmodelle von HBSS und MNS zeigen eine sehr ähnliche Positionierung von Schlüsselresten analog zu Cys493 und Arg508 von BSS und mehreren anderen Aminosäuren im aktiven Zentrum, was auf sehr ähnliche Funktionen bei der Fumarat-Bindung schließen lässt. Andere Aminosäuren wie Phe380 in NMS, Tyr197 in PMS und Tyr197 in HPSS variieren jedoch ebenfalls in ihrer Position, was sie als mögliche erste Ziele identifiziert, um das Substratspektrum des Enzyms zu erweitern. Dies betrifft insbesondere Tyr197, das als Schlüssel zum aktiven Zentrum dient, indem es mit der Aminosäure Ile/Val617 eine Engstelle bildet, durch die das aromatische Substrat passieren muss, um das katalytische Cys493 zu erreichen. Daher haben wir in dieser Arbeit zwei Mutationen Tyr197Phe und Tyr197Ser hergestellt. Dies ermöglichte eine effiziente Aktivierung aller Kresol- und Xylol-Isomere als Substrat-Alternativen neben Toluol.

BSS wurde mit FAE verglichen, die andere Substrate umsetzen können, wie den BSS-Orthologen der m-Xylol abbauenden Stämme *Azoarcus sp.* CIB und *Azoarcus sp.* T oder dem p-Kresol abbauenden Enzym HBSS, um durch Mutagenese eine effizientere Aktivierung verschiedener Toluol-Alternativen zu ermöglichen.

Die ermittelten Substrat-Diskriminierungsdaten zeigten, dass BSS nur Kresole, aber keine Xylole umwandelt. Durch den Austausch von Ile617Val (Salii 2019) wurde BSS allerdings in die Lage versetzt, auch m-Xylol umzuwandeln. Eine QM-MM Analyse dazu zeigte, dass das Vordringen von m-Xylol zum Thiylradikal von Cys493 im aktiven Zentrum durch sterische Wechselwirkungen zwischen der zusätzlichen Methylgruppen mit Ile617 behindert wird, während nach dem Austausch zu Val617 keine Hinderung mehr stattfindet.

Die Spezifitäten der Benzylsuccinat-Synthasen wurden in früheren Studien an *Azoarcus sp.* Stamm T und *Thauera aromatica* Stamm K172 umfassend untersucht ^[31]. Dabei wurden unterschiedliche enzymatische Aktivitäten hinsichtlich der Umwandlung aromatischer Kohlenwasserstoffe festgestellt. Alle analysierten Enzyme akzeptieren jedoch eine Vielzahl substituerter Toluolderivate, wie zum Beispiel Fluorotoluene, o-Xylol, alle drei Kresolisomere und o-Toluidin. Interessanterweise variiert die Aktivität von BSS-Orthologen aus verschiedenen Stämmen gegenüber den Xylol-Isomeren.

BSS des *T. aromatica* Stammes K172, der Toluol, aber nicht Xylole abbaut, wandelt kein Xylol-Isomer in das entsprechende Succinat-Addukt um. Im Gegensatz dazu akzeptiert BSS des *Azoarcus* Stammes T alle Xylol-Isomere als Substrate ^{[49][50][51][52]}. Dies entspricht den Fähigkeiten von *Azoarcus sp.* Stamm T, auf Toluol oder m-Xylol zu wachsen, und von *T. aromatica*, auf Toluol als

alleinigem Kohlenwasserstoffsubstrat zu wachsen ^{[5][31]}. Hier ist wichtig zu berücksichtigen, dass das Wachstum auf verschiedenen Substraten nicht nur von den betrachteten enzymatischen Aktivitäten abhängt, sondern auch von weiteren determinierenden Faktoren beeinflusst wird.

Trotz der Variation in der Aktivität der BSS-Orthologen weisen die beiden Stämme (*Azoarcus sp.* Stamm T und *Thauera aromatica* Stamm K172) eine hohe Sequenzkonservierung der Bss α -Untereinheit auf, mit einer Identität von 78,28 %. Ebenso zeigt das denitrifizierende Beta-Proteobakterium *Azoarcus sp. CIB*, das in der Lage ist, den anaeroben Abbau von Toluol und m-Xylen durchzuführen ^{[53][54]}, eine enge Sequenzkonservierung der Bss α -Untereinheit mit den beiden Stämmen (*Azoarcus sp.* Stamm T bzw. *Thauera aromatica* Stamm K172) von respektive 99,54 % Identität bzw. 78,40 % Identität. Die Sequenzalignment zeigt, dass auch sämtliche Aminosäurereste, einschließlich Ile-384, Leu-391, Val-709, Leu-711, Phe-385, Tyr-197, Tyr-381, Leu-492, Glu-189, Gln-707, Arg-508, Trp-613, Asn615 und das Cys des reaktiven Thiylradikals Cys493, die die Toluol- und die Fumarat-Bindungsstelle bilden, bei allen untersuchten Stämmen konserviert sind.

Die Sequenzalignment der Bss α -Untereinheiten sowie der Vergleich der Identität sind im Anhang dargestellt Anh.-Abbildung 8.

In dieser Arbeit konnten wir jedoch bereits für rekombinante Wildtyp-BSS mit LC-MS messen, dass neben der bereits bekannten Umsetzung der drei Kresol-isomere auch o-, m- und p-Xylol in sehr geringen Mengen umgesetzt werden. Die mutierten Varianten (Tyr197Ser & Tyr197Phe) wurden in *A. evansii* im gleichen Ausmaß wie das Wildtyp-Enzym produziert und waren ebenfalls in der Lage, alle Kresole und Xylole sowie Toluol und D5-Toluol auf die gleiche Weise wie BSS-Wt in sehr geringen Mengen umzusetzen (Abbildung 28 & Abbildung 29). Allerdings war die Umsetzung von m-Xylol sowohl im rekombinanten Bss-Wt als auch in den Mutationen siebenmal effizienter im Vergleich zur Umsetzung von o- und p-Xylol, bei der nur sehr geringe Mengen des Produkts nachweisbar waren.

Entscheidend für den Erfolg des Experiments war unter anderem die Möglichkeit, alle Messungen mittels der LC-MS Methodik durchzuführen, die im Vergleich zur HPLC eine hochempfindliche, genaue und spezifische Testmethode für die quantitative Analyse darstellt.

Wir haben auch versucht, die Substratspezifität der Benzylsuccinat-Synthase weiter zu erweitern, indem wir zusätzliche bicyclische Substrate wie Methylnaphthalin oder Methyldol getestet haben (Tabelle 28). Allerdings konnte keine Aktivität in Bezug auf diese Substrate festgestellt werden.

Als potenzielles nächstes Ziel für weitere Experimente wäre es hochinteressant, die Optimierung der mutierten Varianten (Tyr197Ser & Tyr197Phe) anzustreben. Dabei könnte die Verbesserung des Überproduktionssystems von Interesse sein, um die Enzymleistung zu steigern. Gleichzeitig könnte eine gezielte Optimierung durch weitere Phe380-Substitutionen erfolgen, die in den bekannten Methylnaphthalin-aktivierenden FAEs (NMS) vorhanden sind und eine Bedeutung für die Akzeptanz

von bicyclischen Substraten haben könnten. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der geringen Löslichkeit von bicyclischen Substraten wie Methyl-naphthalin oder Methylindol im Reaktionspuffer der Großteil des Substrats ausfällt und vom Enzym nicht genutzt wird. Daher ist die Entwicklung eines verbesserten Enzymaktivitätstests von entscheidender Bedeutung für zukünftige Studien.

4.3 Erweiterung der Substrat-Determination durch mutierte BSS-Varianten

In allen XSS-Enzymen (IBSS, HBSS, NMSS, MASS und BSS) ist der Argininrest Arg508 absolut konserviert (Abbildung 53), der direkt mit der geladenen Carboxy--Gruppe des Fumarats in Kontakt steht und so das Co-Substrat im aktiven Zentrum fixiert ^[15].

BSSA	EA . . WV . VLC	MSPG . . GRR .	TQKTR SEGGs	. . FPAKVLEI	522
NMSA	EA . . W . . VLC	M . PGV . . RRG	. QKTR . EGG K . . E .	516
ASSA	EA . . WV C	MSP . . T G	. Q . . R	A . . - AK . . E .	501
HBSA	. A . . W . . VLC	MSPG . TGRRG	TQKTR SEGGs	. . . PAKV . EI	480
IBSA	EAHDW . NVLC	MSPG . . GRR .	TQKTR SEGG .	. IFPAK . . EI	518

Abbildung 53: Alignment der Cys-Schleife und der Alpha-Untereinheit, einschließlich Arg-508 in XSS-Enzymen. Konservierte Reste im aktiven Zentrum von BSS sind in rot. BSSA: Benzylsuccinat-Synthase [I6LHT8 *Azoarcus sp*], NMSA: naphthyl-2-methyl-succinate synthase [D2XBH8 *Bacterium enrichment culture clone N47*], ASSA: Alkylsuccinate synthase [B8FF75 *Desulfatibacillum aliphaticivorans*], HBSA: hydroxybenzylsuccinate synthase [KOND30 *Desulfobacula toluolica Tol2*] und IBSA: 4-isopropylbenzyl-succinate synthase [A0A096ZNX3 *Thauera sp. pCyN2*] ^[15].

In jüngsten durchgeführten Mutagenese-Studien haben die wesentliche Rolle von Arg508 bei der Fumaratbindung bestätigt. Ein Ersatz von Arginin durch Lysin führte zur deutlichen Verringerung der Aktivität mit Fumarat, während das Enzym zugleich in der Lage war, Toluol in sehr geringen Mengen mit 3-Acetylacrylat als Fumarat-Analog umzusetzen (Salii 2019) ^[30]. Daher war der Argininrest ein weiteres wichtiges Ziel der Mutagenese-Studien in dieser Arbeit. Arg508 wurde gegen hydrophobe Aminosäuren mit langen Seitenketten (Ile, Leu oder Phe) oder gegen eine ungeladene Aminosäure (Glu) ausgetauscht, um die Wechselwirkung mit der Ketongruppe von 3-Acetylacrylat zu verbessern oder um die Umwandlung anderer Analoga wie Crotonat, Pentenoat oder Glutaconat zu ermöglichen.

Alle diese Arg-Mutanten zeigten wie erwartet eine vollständige Inaktivierung der Enzymaktivität mit den nativen Substraten Fumarat und Toluol bzw. D5-Toluol, da die ungeladene α -Aminogruppe keine Salzbrücke mit der Carboxylgruppe des Fumarats bildet, so dass keine Fumaratbindung erfolgt.

Andererseits konnten wir in der Phe-Mutante eine eindeutige Reaktion von 3-Acetylacrylsäure mit Toluol und D5-Toluol mittels LC-MS nachweisen (Abbildung 33 und Abbildung 34).

Ebenso wurde bei der Verwendung von Crotonsäure als Fumarat-Analog in den beiden Arg508Trp/Gln-Mutanten eine minimale Aktivität mit Toluol und D5-Toluol mittels LC-MS festgestellt (Abbildung 40, Abbildung 41, Abbildung 44 und Abbildung 45).

Die Arg508Trp/Gln-Mutanten zeigten auch eine eindeutige Umsetzung des Fumarat-Analogs Glutaconsäure mit Toluol bzw. D5-Toluol. Insbesondere bei der Addition von Toluol oder d5-Toluol an das Fumarat-Analog Glutaconsäure wird die Addition an das C2- oder C3-Atom von Glutaconsäure durchgeführt, was eigentlich zu zwei unterschiedlichen Produkten führt (2-Benzylpentandioicsäure oder 3-Benzylpentandisäure) (Abbildung 35). Dies erklärt die unterschiedlichen Retentionszeiten bei der LC-MS-Analyse. Die Arg508Phe-Mutante zeigte einen Peak mit den erwarteten Ionenpeaks nach 1,053 min, während die Arg508Gln-Mutante einen Peak mit den erwarteten Ionenpeaks nach 1,272 min aufwies (Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 42 und Abbildung 43). Aufgrund der Masseähnlichkeit der beiden Produkte (222 Da) sowie des Fehlens eines Standards konnte daher nicht eindeutig festgestellt werden, um welches Produkt es sich bei jeder Mutante handelt.

Im Gegensatz zu den Arg508Trp/Gln-Mutanten zeigten die Mutanten mit einer Arg508Ile- oder Arg508Leu-Substitution überhaupt keine Aktivität, einschließlich keinem Produkt mit dem nativen Substrat Toluol.

Die chromatographische Trennung von Benzylsuccinat wurde gemäß den Arbeiten von Hilberg (2012), Seyhan (2016) und Sali (2019) optimiert. Diese Methode diente als Standard für den qualitativen Nachweis von Benzylsuccinat und 3-Benzylpentan-4-onat. In dieser Arbeit haben wir zudem die Methode in Kombination mit LC-MS für sämtliche von der BSS erzeugten Produkte genutzt, was eine präzise Detektion der Analyten ermöglichte. Dies führte zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode und einer Senkung der Nachweisgrenzen.

Für weitere Experimente wäre es hochinteressant, die Optimierung des Expressionssystems von BSS zu verbessern, da eine höhere Enzymausbeute zu besseren Experimentbedingungen und genaueren Ergebnissen führen könnte. Insbesondere die Expression der Arg508Trp/Gln-Mutanten ist interessant, da diese beiden Mutanten wahrscheinlich in der Lage sind, noch weitere Fumarat-Analoga zu akzeptieren.

4.4 Die Funktion und Lokalisation von Eisen-Schwefel-Cluster

Das Gen *nmsD* kodiert das mutmaßliche Naphthyl-2-methylsuccinat-aktivierende Enzym, ein S-Adenosylmethionin (SAM)-Radikalenzym. Es enthält ein konserviertes, cysteinreiches Sequenzmotiv in der N-terminalen Region, das ein [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, und zwei weitere cysteinreiche Sequenzmotive, die zwei weitere [4Fe-4S]-Clustern in einer Ferredoxin-ähnlichen Domäne

koordinieren ^[32]. Die BSS-ähnlichen Glycyldikalenzyme enthalten zwei kleine Untereinheiten BSS β - und - γ , die jeweils ein Eisen-Schwefel-Cluster enthalten und strukturell ähnlich zu HiPIP-Proteine mit vier konservierten Cysteinen sind ^{[3][20][21]}. Die Bedeutung dieser kleinen Untereinheiten und das enthaltene Fe-S-Cluster ist unklar, da der Mechanismus der von BSS katalysierten Radikalreaktion keinen Redox-Cofaktor erfordert. Die Kristallstruktur von BSS $\alpha\beta\gamma$ aus *Thauera aromatica* T1 zeigt an, dass eine gewisse Umlagerung oder teilweise Dissoziation von BSS β stattfindet, um den Eintritt des Substrats in die Glycyldikalen-Domäne im aktiven Zentrum durch Bewegung der β -Hairpin-Schleife zu ermöglichen. Das Enzym bildet eine Bindungstasche um das Substrat, um es für die Katalyse zu positionieren (Abbildung 54) ^{[3][15]}.

Andererseits spielt BSS γ keine strukturelle Rolle, aber BSS γ ist wichtig für die Expression und Löslichkeit von BSS α . Das Fehlen von BSS γ führte zu einer signifikanten Abnahme der produzierten BSS α -Menge, während das Fehlen von BSS β die BSS α -Expression nicht veränderte ^{[15][20][3]}.

Das rekombinante Enzym BSS wird in *E. coli* inaktiv hergestellt, da es ohne das katalytische Glycyldikalen produziert wird, wodurch ein stabiles Protein entsteht. Mit dieser Form des Proteins wurde auch die Kristallstruktur aufgeklärt. Da das Protein nicht zum Glycyldikalen-Zustand aktiviert war und die γ -Untereinheit nur teilweise sichtbar war, kann man keine Vorhersagen machen, ob die beiden Eisen-Schwefel-Cluster für die Aktivität des Enzyms wichtig oder an der von BSS katalysierten Reaktion beteiligt sind.

Nachdem wir ein homologes Expressionssystem zur Überproduktion von aktiver BSS entwickelt haben, haben wir in dieser Arbeit die Signifikanz der beiden Eisen-Schwefel-Cluster in den β - und γ -Untereinheiten für die BSS-Aktivität getestet. Dazu wurden gezielte Mutationen in BSS β oder BSS γ hergestellt, die zum Verlust der jeweiligen Eisen-Schwefel-Cluster führen.

Die Mutationen sind auf die vier konservierten Cysteine gerichtet, die für die Koordination der Eisen-Schwefel-Cluster verantwortlich sind. Ähnliche Motive mit konservierten Cysteinen finden sich in den kleinen Untereinheiten aller anderen bekannten Enzyme der FAE Familie, die an der Aktivierung von Toluol oder anderen Kohlenwasserstoffen wie Alkanen oder 2-Methylnaphthalin zu den entsprechenden Succinat-Addukten beteiligt sind (Abbildung 55) ^[27].

Untersuchungen zur rekombinanten Produktion von BSS in *E. coli* zeigten bereits vor einigen Jahren, dass die Anwesenheit des *bssC*-Gens für die Produktion und Stabilität von BssA wichtig ist, während das *bssB* Gen deletiert werden kann ^[48]. Diese Ergebnisse wurden später auch durch die Kristallisierung eines Unterkomplexes aus BSS α und BSS γ bestätigt ^[15]. Allerdings kann aus diesen Ergebnissen nichts zu eventuellen Funktionen der kleinen Untereinheiten zur Aktivität der BSS abgeleitet werden. Aus diesem Grund haben wir in unserem Expressionssystem für aktive BSS getestet, inwiefern die kleinen Untereinheiten mit ihren FeS- Clustern für die Funktion von BSS wichtig sind. Anstelle der kompletten Deletion der Gene in den vorherigen Untersuchungen haben wir bei BSS β und BSS γ lediglich

Mutationen erzeugt, die die Bindung des FeS-Clusters verhindern. Dabei haben wir beobachtet, dass die Mutation in BSS γ zur Destabilisierung des kompletten Proteinkomplexes führt, wobei die große Untereinheit BSS α nicht mehr in voller Länge, sondern nur als kürzere Abbauprodukte nachweisbar war und von den kleinen Untereinheiten nur sehr geringe Mengen detektiert wurden (Abbildung 47, Abbildung 48 und Abbildung 49).

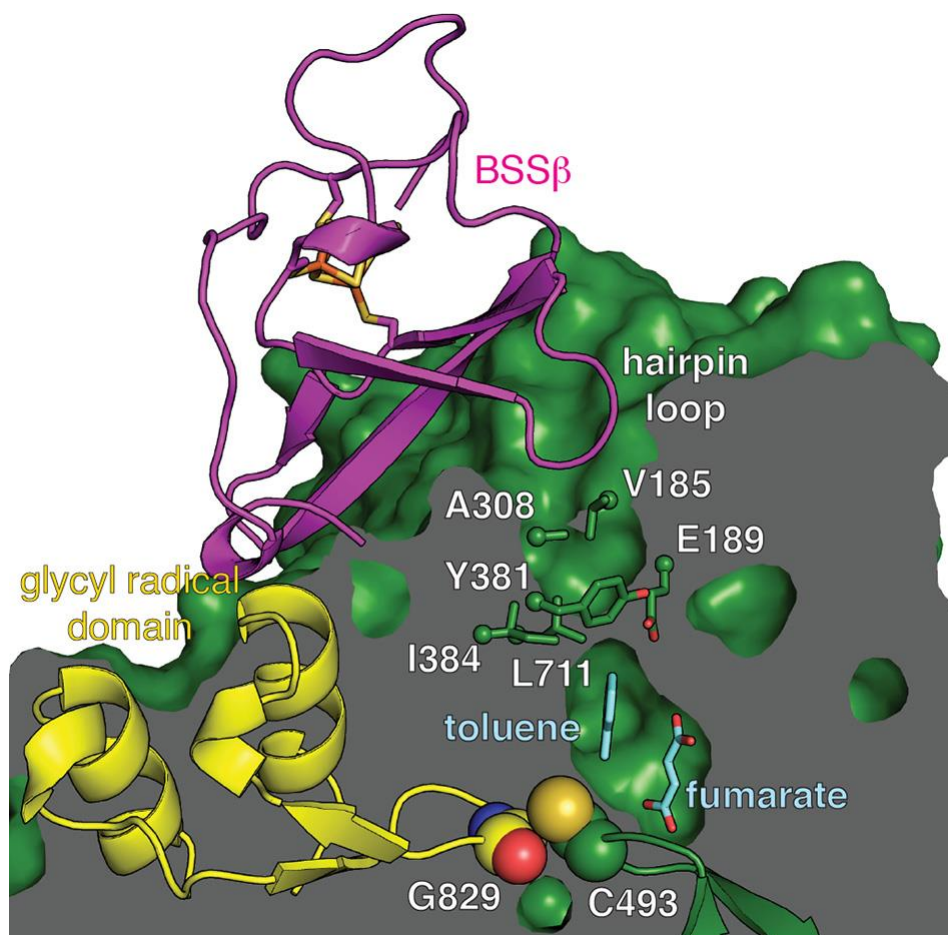


Abbildung 54: der zentrale Hohlraum des aktiven Zentrums von BSS mit den beiden Substraten (blau), die oberhalb der Cys-Schleife (C493) in der Nähe der Glycylradikal-Domäne (G829; gelb) gebunden sind. Zusätzlich zu den Resten von BSS α ist eine Hairpin-Schleife von BSS β in den potenziellen Zugangskanal eingefügt und füllt den Zugang zum aktiven Zentrum vollständig aus. Entnommen aus (A. Funk et al., 2015) ^[15].

Für BSS β wurden zwei verschiedene Mutanten (Cys19Ala Cys22Ala und Cys37Ala) mit inaktiviertem FeS-Cluster produziert. Sie zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf die Produktion des Proteinkomplexes oder die α -Untereinheit. Die Reinigung von BSS-Wt war sowohl in *E. coli* als auch in *A. Evansii* möglich. (Abbildung 47, Abbildung 48 und Abbildung 49).

Obwohl die Protein-Ausbeute der BSSC-Mutante (Cys4Ala Cys7Ala) in *E. coli* und *A. Evansii* um das Hundertfache geringer ist als die Protein-Ausbeute des rekombinanten BSS-Wt und der

BSSB-Mutationen, werden die beiden Untereinheiten BSSC und BSSB mittels SDS-PAGE in *A. Evansii* und *E. coli* nachgewiesen (Abbildung 49). Andererseits, und trotz der vorhandenen mutierten Untereinheiten, zeigen die signifikanten Unterschiede im Eisengehalt im Vergleich zum rekombinanten BSS-Wt auf.

Die Ergebnisse der Metallanalyse zeigen, dass der Eisengehalt von rekombinantem BSS-Wt in *E. coli* und *A. Evansii* etwa doppelt so hoch war (3,7 bzw. 3,4 Fe/Protein mol/ mol) im Vergleich zu der Mutante (Cys4Ala Cys7Ala) der BSS-C in beiden Organismen (1,4 bzw. 1,9 Fe/Protein mol/ mol). Mutanten (Cys19Ala Cys22Ala) und (Cys37Ala) in *E. coli* zeigten ähnliche Eisengehalte, die die Hälfte des BSS-Wt-Eisengehalts entsprachen (1,7 bzw. 1,9 Fe/Protein mol/ mol), während dieselben Mutationen in *A. Evansii* nur einen 30 % niedrigeren Eisengehalt aufwiesen (2,2 bzw. 2,7 Fe/Protein mol/ mol) im Vergleich zum BSS-Wt (3,4 Fe/Protein mol/ mol) (Tabelle 32).

Die β - und γ -Untereinheiten (11 und 13 kDa) wandern ebenfalls als diffuse Banden auf SDS-Gelen. Mögliche Gründe hierfür sind die hohe Ladungsdichte und der hohe Cysteingehalt, der die Bildung von Disulfidbrücken bei Luftexposition ermöglicht.

In Zusammenfassung zeigt unsere Studie wichtige Erkenntnisse bezüglich der Funktion und Bedeutung der kleinen Untereinheiten (BSS β und BSS γ) im BSS-Komplex. Unsere Experimente legen nahe, dass Mutationen, die die Bindung des FeS-Clusters in BSS β und BSS γ beeinträchtigen, signifikante Auswirkungen auf die Stabilität des gesamten Proteinkomplexes haben. Insbesondere führte die Mutation in BSS γ zur Destabilisierung des Proteinkomplexes, wobei die große Untereinheit BSS α in verkürzter Form nachweisbar war und die kleinen Untereinheiten nur in geringen Mengen detektiert wurden.

Diese Befunde verdeutlichen, dass die FeS-Cluster in den kleinen Untereinheiten eine wesentliche Rolle für die Integrität und Funktion des BSS-Komplexes spielen. Die Untersuchung der mutierten Varianten ermöglicht ein tieferes Verständnis der Wechselwirkungen und Mechanismen, die für die Aktivität der BSS von Bedeutung sind.

Es besteht jedoch noch eine offene Frage bezüglich der möglichen Beteiligung der γ -Untereinheit an Redox-Prozessen neben ihrer strukturellen Funktion. Um die Funktion und Lokalisierung der Eisen-Schwefel-Cluster des BSS vollständig zu klären, sind weitere Studien auch erforderlich.

β-Untereinheit

```

Thauera aromatica K172 : -----MSATPHTQVHWEE--NTARPRRK-K-WQTPDPTDPLRGC-T-VN-----RHAMGGVWKRWIRDVEHMTSRHE---EGELSFDRHV----- : 74
Aromatoleum aromaticum EbN1 : -----MSATPHTQVHWEE--NTPSPRK-K-WQTPDPTDPLRGC-T-VN-----RHAMGGVWKRWIRDVEHMTSRHE---EGELSFDRHV----- : 74
Magnetospirillum sp. TS-6 : --MTMTQASTAPANAQPAVQMHREE--GTSRPSIK-K-WQTPDPTDPIRGC-T-VN-----RHANGGVWKRWIRDALNTTSRHE---EGKLSFRDHV----- : 85
Thauera sp. DNT-1 : -----MEGYNMEAEKNLQNPHEV--GTARPRRS-K-WQTPDPTDPPHRCG-T-AN-----RHAMGGVWKRWLRDVENTTSRHE---EGKLSFRDHV----- : 81
Thauera aromatica T1 : -----MEGYNMETGQNLQNPHEV--GTARPRRS-K-WQTPDPTDPPHRCG-T-AN-----RHAMGGVWKRWLRDVENTTSRHE---EGKLSFRDHV----- : 81
Azoarcus sp. T : -----MEAEKSLQNPYTEV--GTAKPRIK-K-WQTPDPTDPPHRCG-T-AN-----RHAMGGVWKRWLRDVENTTSRHE---EGKLSFRDHV----- : 76
Geobacter metallireducens GS-15 : -MSPRGPGQEATVSATSNNGNMHEEP--GTKKPSQSK-K-WQIADPTNPLRGC-T-VN-----RNAMGGVWKRWVTDVNRMTGKHE---VGKLSFREHV----- : 86
Geobacter sp. FRC-32_1 : -----MTATAQENMMHEKK--GTKKPSQSK-K-WQIADPTNPLRGC-T-VN-----RTQMGGVWKRWVSDVYVNTTSRHE---EGKLSFREHV----- : 76
Geobacter sp. FRC-32_2 : -----MSTTVDEYMMHQEA--GTKKPSQSK-K-WQIADPTNPLRGC-T-VN-----RNKMGVWKRWVTDVNTMTAKHE---EGKLSFREHV----- : 75
bacterium_bssa-1_methanogenic_consortium : --MAEDVVSKQRTGREKKGRHQVES--GTTKALKR-WGIEDPTDPSKGCIGGH-----RTGMGGIWKRMIHDIYNTTDHFE---EGEVDFRDHV----- : 85
NaphS2 : -----MAETPRKR-R-WSRVDTGDPTKGAIAEK--REGAVGDTASGTASVIMKGLIKLSDEAELFEPKPSHAQLIREGI----- : 73
Bacterium enrichment culture N47 : -----MADTTRKR-R-WSRVDTGNPMKGVVFFGR--RDGSAGESASGVSTIIKGLVNLSDKAEENFEPKPSHAQQIREGI----- : 73
Desulfatibacillum alkenivorans AK-01 : MSRRSQWKQVANGMLGDVSKARSVEERENVPEKAGFPKNFSEAYASDGRGYK-KLKVGSDIKVNPPVYVMEGQASLTVLFNSDGAGEYFNRQDLIDTDGNEVNDPSYRRVQRQMEKAIK- : 122
Desulfatibacillum alkenivorans AK-02 : MSRRSQWKQVANGMLGDVSKARTVEERENVPEKAGFPKNFSEAYASDGRGYK-KLKVGSDIKAVPPVYVMEGEASLTVLFNSDGGKEHYVRQALIDTSGSEVNDPNYRRAQRQLKK- : 119
Azoarcus sp. HxN1 : MSRRDEWKKLQEEEMTRDGGEIKSLET--VPEQAQGITLNFDTNAYSGDRGSCN-VLKAGSNISLPDVIITRSGENGYITFFNSDAKYLPNFERMKLIDTDGHECADPISRRVQRQLSSIKKS : 120

```

γ-Untereinheit

```

Thauera aromatica K172 : --MTTCKDCAPFFSIPEDADDFEKSKGDIVTQKDEKGRYWLSPVFE--NDQCCGAPHKR----- : 57
Aromatoleum aromaticum Ebn1 : --MTTCKDCFFFSVPEADDDFEKSKGDIVTQKDEKGRYWLTRPVFE--NDQCCGTPHKR----- : 57
Magnetospirillum sp. TS-6 : --MTSCNNEFFPNVPKDDADYEAGKGDIVTEKADEKGRYWLSPVFE--GSASCKSYSKR----- : 57
Thauera sp. DNT-1 : MGTTCCKQCANFFPVPKDDADYEAGKADIVREKEDKGRYWLSPVFE--NSTQCEAFYAKR----- : 60
Thauera aromatica T1 : MGTTCCKQCANFFPVPKDDADYEAGKADIVREKEDKGRYWLSPVFE--NSAQCEAFQTKR----- : 60
Azoarcus sp. T : METTTCCKQCANFFPLPKDDADYEAGKADIVREKEDDKGRYWLSPVFE--NSTRCEAFHAKR----- : 60
Geobacter metallireducens GS-15 : --MTTCKNSFYFVAVPENAGDFEAGKGDIVIEKEDAKGRYWLSPKPTRN--DSPSCKAPKTA----- : 57
Geobacter sp. FRC-32_1 : --MTTCKQDSFYFVAVPENAGDYEPGRGDIVTQKEDAKGRYWLSPKTRVH--ATPSCPTPKKSK----- : 58
Geobacter sp. FRC-32_2 : --MTTCKNSFYFVAVPENAGDYEAGKGDIVVEKQDAKGRYWLSPKPTRT--DSPSCPTPKKA----- : 57
NaphS2 : --MAECKEGRFFFGVAVPENADDFKPGKGDIVTEIRNEKGRYWLSPVFE--DSESGTVPKVKV----- : 58
Bacterium enrichment culture N47 : --MAECKEGRFFFAVPEHADDFKPGKGDIVNERRDERGRYWLSPVFE--NSETCESFVKV----- : 58
Desulfatibacillum alkenivorans AK-01 : --MSTCAEGRSFFLRED----EPGQGDIVRRVVDPRQAFYQSKPVRDNDASGCESPFKK----- : 54
Desulfatibacillum alkenivorans AK-02 : --MSTCSDGRSFFLPRED----EPGKGDIVRRVVDPRQAYYTRPKNPEDDASGCEGFQKR----- : 54
Azoarcus sp. HxN1_1 : --MSTCKEGRNYFPINE----EASRGDIVRRIISDERQSYTARPTTEAAKCEGSDYLENTRTAKAH : 61

```

Abbildung 55: Sequenzalignment der β- und γ-Untereinheit von BSS und BSS-ähnlichen Enzymen (Entnommen aus Hilberg, 2012). Rot markiert sind konservierte Cysteinreste der β- und γ-Untereinheit, die ein Eisen-Schwefel-Cluster pro Untereinheit koordinieren und eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von ringförmigen und nicht ringförmigen Kohlenwasserstoffen wie Toluol, Alkanen und 2-Methylnaphthalin zu den zugehörigen Succinat-Addukten spielen. Im Gegensatz dazu sind die beiden Untereinheiten nicht an der BSS-Reaktion beteiligt und haben keine eindeutige Rolle bei BSS.

4.5 Heterologe Überproduktion der NMS

Die anaerobe Umwandlung von 2-Methylnaphthalin wurde in der sulfatreduzierenden Anreicherungskultur N47 durch Fumarataddition an die Methylgruppe aktiviert, ähnlich wie beim anaeroben Toluolabbau, wobei Sulfat als Elektronenakzeptor dient [32].

Da die anfänglichen Aktivierungsreaktionen beim Toluol- und 2-Methylnaphthalin-Abbau ähnlich sind, können die vorhergesagten Funktionen der entsprechenden Gene mit Enzymen des anaeroben 2-Methylnaphthalin-Abbaus korreliert werden.

Analog zu den Genen für BSS kodieren die *nms*-Gene eine putative große Untereinheit (α = 96 kDa) und zwei putative kleine Untereinheiten (β = 7,9 und γ = 7,8 kDa) von Nms. Die großen Untereinheiten der Nms-Enzyme aus N47 wiesen ein hohes Niveau an Sequenz-Identität auf und waren eng mit denen von BSS-Orthologen verwandt. Daher lässt sich schließen, dass Nms eine neue Untergruppe von Glycinradikal-haltigen FAE Enzymen darstellt (Abbildung 32)^{[39][40][27][41]}.

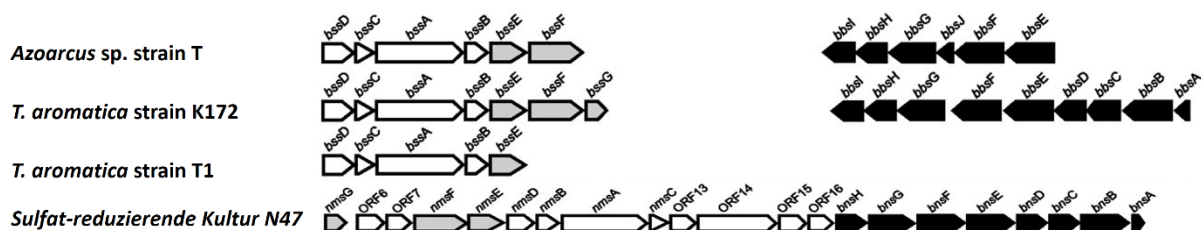


Abbildung 56: Anordnung der *nms*- und *bss*-Gencluster für den anaeroben 2-Methylnaphthalin-Katabolismus in der *sulfatreduzierenden Kultur N47* im Vergleich zu denen der *bss*-Gene für den anaeroben Toluolabbau in *Azoarcus sp.* Stamm T^[36], *T. aromatica* Stamm K172^{[16][17]} und *T. aromatica* Stamm T1^[42]. Die Gene sind als Pfeile dargestellt. Die Gene für den anaeroben Toluolabbau sind wie folgt: *bssABCD*, kodiert für Benzylsuccinat-Synthase und das aktivierende Enzym; *bssE*, kodiert für ein putatives Chaperon; *bssH*, kodiert für einen mutmaßlichen Transporter, *bssF* und *bssG*, codierend für hypothetische Proteine. Modifiziert nach (Selesi et al.,2010)^[47].

Des Weiteren weisen alle bekannten NmsA-Enzyme den charakteristischen Cysteinrest an Position 467 auf, welcher an der Bildung des Radikals beteiligt ist. Das Elektron des Glycin-Radikals wird auf den Cystein-Rest übertragen, und es entsteht ein Thieryl-Radikal. Dieses Radikal dürfte anschließend höchstwahrscheinlich ein Wasserstoffatom aus der Methylgruppe von 2-Methylnaphthalin abstrahieren.

Im Gencluster befindet sich stromaufwärts (upstream) von *nmsA* ein weiteres kodierendes Gen, *nmsB*, das für die β -Untereinheit NmsB steht und eine geringe Sequenzidentität (33 %) mit BSS β aufweist. Stromabwärts (downstream) von *nmsA* liegt das Gen *nmsC* für die γ -Untereinheit. Ähnlich wie BssC von *T. aromatica* ist NmsC aus der Kultur *N47* reich an Cysteinen und geladenen Aminosäuren, die zusammen 47 % der Gesamtaminosäuren ausmachen^[27]. Auch wenn die genauen Funktionen der

beiden kleinen Untereinheiten nicht abschließend beurteilt werden können, gehen wir davon aus, dass NmsB und NmsC wie in Bss für die ordnungsgemäße Aktivität von Nms in der Kultur N47 erforderlich sein könnten ^[47].

Als Teil des *nms*-Genclusters kodiert das *nmsD*-Gen das putative Naphthyl-2-methylsuccinat-aktivierende Enzym, ein S-Adenosylmethionin (SAM)-Radikalenzym, das die Bildung von Glycylradikalen katalysiert, indem es ein Wasserstoffatom vom reaktiven Glycin abzieht ^[35].

Die BSSD-Proteine enthalten drei konservierte cysteinreiche Sequenzen in der N-terminalen Region, die das typische [4Fe-4S]-Cluster des SAM-Radikalenzym koordinieren, die im *bss*-Operon als zwei unterschiedliche Untereinheiten kodiert wird ^[34].

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen BSS und Nms haben wir ein nahezu homologes NMS-Überproduktionssystem entwickelt, um aktives NMS in *A. Evansii* unter benzoatabbauenden Bedingungen zu produzieren. Wir konnten jedoch weder die Bildung von Benzylsuccinat aus Fumarat und Toluol bzw. D5-Toluol noch die Bildung von Naphthyl-2-methylsuccinat aus 2-Methylnaphthalin und Toluol bzw. D5-Toluol nachweisen, obwohl die typische Doppelbande des Glycylradikals aus der Strep-markierten α -Untereinheit der produzierten NMS im Western Blot nachweisbar war (Abbildung 51).

Die Nms- α -Untereinheit (NmsA) der Kultur N47 weist eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 92 % zur vermuteten NmsA des Deltaproteobakteriums NaphS6 auf. Zusätzlich sind NmsA-Sequenzen phylogenetisch mit der α -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase (BssA; <50 % Sequenzidentität) verwandt, welche den ersten Schritt des anaeroben Toluolabbaus katalysiert, sowie mit der 1-Methylalkyl-Succinat-Synthase (MasG/AssA), die n-Alkane durch Fumarat-Addition aktiviert.

Ebenfalls enthält das *nmsA*-Genprodukt der Anreicherungskultur N47 Glycylradikal-Enzyme und den konservierten Cysteinrest an Position 467 ^[33]. Die NmsA-Sequenzen unterscheiden sich von denen von BssA und MasG/AssA dadurch, dass sie einen Isoleucin-Rest (I) anstelle eines Valin-Restes (V) enthalten. Ein solcher Austausch bei Bss ermöglicht den Zugang für andere Substrate wie m-Xylol zum aktiven Zentrum. Dies bietet bei NMS wahrscheinlich mehr Raum im aktiven Zentrum, um größere aromatische und aliphatische Substrate wie p-Cymol, 5-Methylindol oder 2,7-Dimethylnaphthalin umzusetzen, die nicht in der Bss-Tasche passen und daher dort nicht umsetzbar sind.

Möglicherweise liegt der Grund dafür, dass kleine Substrate nicht korrekt in der großen Tasche des NMS platziert werden und daher nicht umgesetzt werden können. Zudem führt die geringe Löslichkeit großer Substrate wie 2-Methylnaphthalin im Reaktionspuffer dazu, dass der Großteil des Substrats ausfällt und vom Enzym nicht verwertet wird, was ebenfalls zu einer Abnahme oder einem Verlust der Aktivität führt. Dies erklärt, warum mit diesen Substraten keine signifikante Bildung der entsprechenden Succinat-Addukte stattfindet, die durch HPLC-MS-Analyse nachweisbar sein sollten.

Um das Substratspektrum und den Reaktionsmechanismus des NMS weiter zu erforschen, ist es daher äußerst wertvoll, stabile radikalische NMS zu identifizieren. Es bietet sich an, andere große Substrate wie p-Cymol oder o-Toluidin in Verbindung mit dem nativen Substrat 2-Methylnaphthalin zu testen, wobei darauf zu achten ist, die Löslichkeit dieser Substrate zu verbessern. Darüber hinaus sind EPR-spektroskopische Experimente erforderlich, um zunächst das Glycylradikalsignal zu identifizieren und potenzielle kompetitive inhibitorische Moleküle zu identifizieren, die für BSS ausführlich charakterisiert wurden.

5 Literaturverzeichnis

1. Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2, Short Communication, Published: December 1995, Volume 164, pages 448–451, (1995).
2. Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdidis*, Original paper, Published: September 1999, Volume 172, pages 204–212, (1999).
3. Structures of benzylsuccinate synthase elucidate roles of accessory subunits in glycyl radical enzyme activation and activity. Michael A. Funk, Evan T. Judd, E. Neil G. Marsh, +1, Sean J. Elliott, and Catherine L. Drennan. PNAS|July 15, 2014|vol. 111|no. 28|10161–10166BIOCHEMISTRY.
4. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons, Johann Heider, Alfred M. Spormann, Harry R. Beller, Friedrich Widdel, FEMS Microbiology Reviews, Volume 22, Issue 5, December 1998, Pages 459–473.
5. Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and m-xylene metabolism. Verfurth, K., A. J. Pierik, C. Leutwein, S. Zorn and J. Heider (2004). Arch Microbiol. 181: 155-162.
6. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. Fuchs, G.; Boll, M.; Heider, J. (2011). Nature Reviews Microbiology. 9: 803-816.
7. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds, Johann Heider, Georg Fuchs, Eur. J. Biochem. 243, 577-596 (1997).
8. Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. Amy V. Callaghan a, Boris Wawrik a, Sinéad M. Ní Chadhain a, Lily Y. Young a b, Gerben J. Zylstra. Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 366, Issue 1, 1 February 2008, Pages 142-148.
9. Biochemistry of the Anaerobic Degradation of Non-Methane Alkanes. F. Widdel, O. Grundmann, F Widdel, F Musat - Energetic and Other Quantitative Aspects of Microbial ..., 2010.

10. Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. E Annweiler, A Materna, M Safinowski... - Applied and ..., 2000 - Am Soc Microbiol.
11. Review Article, New tricks for the glycol radical enzyme family. Lindsey R. F. Backman, Michael A. Funk, Christopher D. Dawson & Catherine. L. Drennan.
12. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. R Rabus, M Boll, J Heider, RU Meckenstock... - Microbial ..., 2016.
13. Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. Matthias Boll, Claudia Löffler, Brandon E. L. Morris, Johannes W. Kung. Volume 16, Issue 3 March 2014. Pages 612-627.
14. Benzylsuccinate Synthase is Post-Transcriptionally Regulated in the Toluene-Degrading Denitrifier *Magnetospirillum* sp. Strain 15-1. Ingrid Meyer-Cifuentes, Sylvie Gruhl, Sven-Bastiaan Haange, Vanessa Lünsmann, Nico Jehmlich, Martin von Bergen, Hermann J. Heipieper and Jochen A. Müller. *Microorganisms* 2020, 8, 681.
15. Substrate-bound Structures of Benzylsuccinate Synthase Reveal How Toluene Is Activated in Anaerobic Hydrocarbon Degradation. Michael A. Funk, ‡ E. Neil G. Marsh, § and Catherine L. Drennan. *J Biol Chem.* 2015 Sep 11; 290(37): 22398–22408. Published online 2015 Jul 29. PMID: PMC4566215.
16. Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. Kerstin Hermuth, Birgitta Leuthner & Johann Heider . Volume 177, pages 132–138, (2002).
17. Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. B Leuthner, J Heider. *J Bacteriol.* 2000 Jan;182(2):272-7. doi: 10.1128/JB.182.2.272-277.2000.
18. Mechanism of Benzylsuccinate Synthase: Stereochemistry of Toluene Addition to Fumarate and Maleate. Chunhua Qiao and E. Neil G. Marsh. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 24, 8608–8609.

19. Mechanism of Benzylsuccinate Synthase Probed by Substrate and Isotope Exchange. Lei Li and E. Neil G. Marsh. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 50, 16056–16057.
20. Subunit structure of benzylsuccinate synthase. L Li, DP Patterson, CC Fox, B Lin, PW Coschigano... - *Biochemistry*, 2009 - ACS Publications.
21. Structure and Function of Benzylsuccinate Synthase and Related Fumarate-Adding Glycyl Radical Enzymes. Johann Heider, Maciej Szaleniec d Berta M. Martins c Deniz Seyhan a Wolfgang Buckel a, b Bernard T. Golding e *J Mol Microbiol Biotechnol* 2016;26:29–44 DOI: 10.1159/000441656.
22. Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. Michael Kube, Johann Heider, Judith Amann, Peter Hufnagel, Simon Kühner, Alfred Beck, Richard Reinhardt & Ralf Rabus. Published: 21 January 2004, Volume 181, pages 182–194, (2004).
23. Anaerobic Toluene Catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs Operon Codes for Enzymes of β Oxidation of the Intermediate Benzylsuccinate. Birgitta Leuthner and Johann Heider. January 2000 *Journal of Bacteriology* 182(2):272-7.
24. Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-coenzyme A (CoA) hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes 2007 Feb;189(3):1055-60. doi: 10.1128/JB.01467-06. Epub 2006 Nov 22.
25. Anaerobic benzene degradation by bacteria. Carsten Vogt, Sabine Kleinsteuber, Hans-Hermann Richnow. First published: 30 March 2011. *Microbial Biotechnology* Volume 4, Issue 6 p. 710-724.
26. Site-directed mutagenesis of the *Thauera aromatica* strain T1 *tutE* *tutFDGH* gene cluster. Reena Bhandare a, Mark Calabro a, Peter W. Coschigano. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 346, Issue 3, 4 August 2006, Pages 992-998.

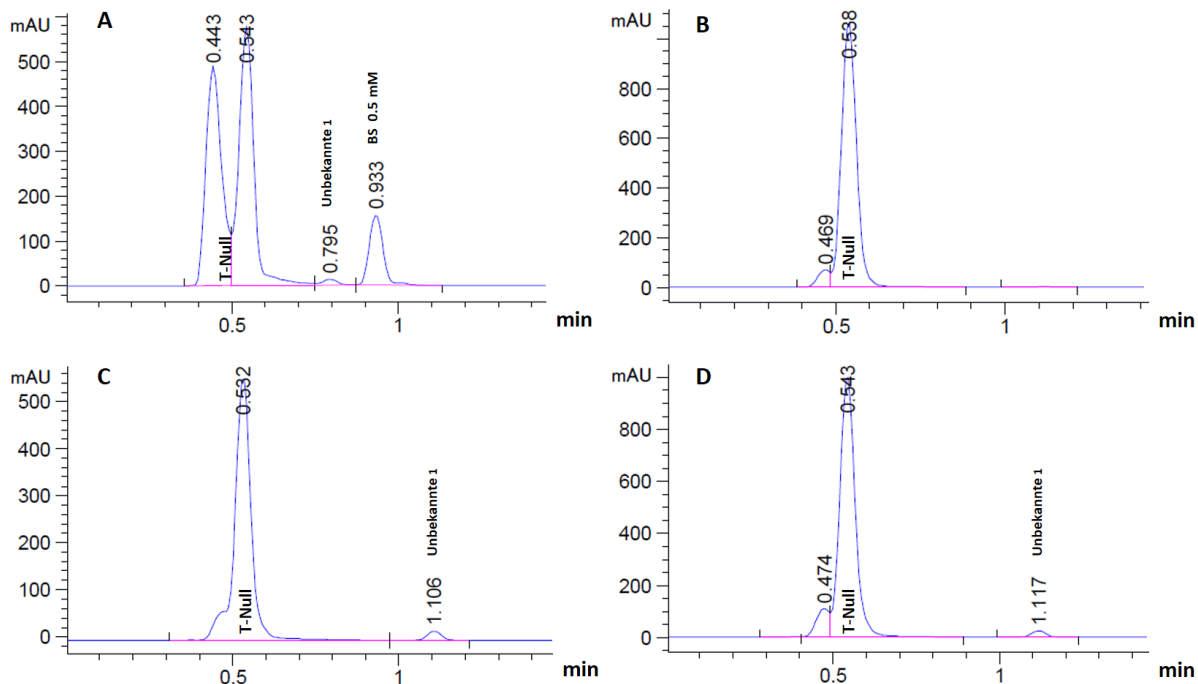
27. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* 28: 615-628.
28. Modeling of the Reaction Mechanism of Enzymatic Radical C–C Coupling by Benzylsuccinate Synthase. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr 7;17(4):514. doi:10.3390/ijms17040514. Maciej Szaleniec 1, Johann Heider.
29. Insights into the Glycyl Radical Enzyme Active Site of Benzylsuccinate Synthase: A Computational Study. Vivek S. Bharadwaj, Anthony M. Dean, and C. Mark Maupin. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 33, 12279–12288.
30. Determinants for Substrate Recognition in the Glycyl Radical Enzyme Benzylsuccinate Synthase Revealed by Targeted Mutagenesis. Iryna Saliı, Maciej Szaleniec, Ammar Alhaj Zein, Deniz Seyhan, Anna Sekuła, Karola Schühle, Ianina Kaplieva-Dudek, Uwe Linne, Rainer U. Meckenstock, and Johann Heider. *ACS Catal.* 2021, 11, 6, 3361–3370.
31. Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. Harry R. Beller, Alfred M. Spormann. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 178, Issue 1, September 1999, Pages 147–153.
32. Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. Michael Safinowski, Rainer U. Meckenstock. *Environmental Microbiology* Volume 8, Issue 2 p. 347-352. 06 September 2005.
33. Combined Genomic and Proteomic Approaches Identify Gene Clusters Involved in Anaerobic 2-Methylnaphthalene Degradation in the Sulfate-Reducing Enrichment Culture N47. Draženka Selesi,¹ Nico Jehmlich,² Martin von Bergen,^{2,3} Frank Schmidt,⁴ Thomas Rattei,⁵ Patrick Tischler,⁵ Tillmann Lueders,¹ and Rainer U. Meckenstock. *J Bacteriol.* 2010 Jan; 192(1): 295–306.
34. New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. Thorsten Selmer 1, Antonio J Pierik, Johann Heider. *iol Chem.* 2005 Oct;386(10):981-8. doi: 10.1515/BC.2005.114.

35. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. H J Sofia 1, G Chen, B G Hetzler, J F Reyes-Spindola, N E Miller. 2001 Mar 1;29(5):1097-106. doi: 10.1093/nar/29.5.1097.
36. Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and m-xylene mineralization. G R Achong 1, A M Rodriguez, A M Spormann. J Bacteriol. 2001 Dec;183(23):6763-70. doi: 10.1128/JB.183.23.6763-6770.2001.
37. Transcriptional analysis of the *tutE* *tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. P W Coschigano. Appl Environ Microbiol. 2000 Mar;66(3):1147-51. doi: 10.1128/AEM.66.3.1147-1151.2000.
38. Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. Cheryl E Washer 1, Elizabeth A Edwards. Appl Environ Microbiol. 2007 Feb;73(4):1367-9. doi: 10.1128/AEM.01904-06. Epub 2006 Dec 1.
39. Enzymatic reactions in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation by the sulphate-reducing enrichment culture N 47. Michael Safinowski 1, Rainer U Meckenstock. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 1;240(1):99-104. doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.014.
40. Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. Florin Musat 1, Alexander Galushko, Jacob Jacob, Friedrich Widdel, Michael Kube, Richard Reinhardt, Heinz Wilkes, Bernhard Schink, Ralf Rabus. Environ Microbiol. 2009 Jan;11(1):209-19. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01756.x.
41. Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. Johann Heider. Curr Opin Chem Biol. 2007 Apr;11(2):188-94. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.02.027.
42. Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. P W Coschigano 1, T S Wehrman, L Y Young. Appl Environ Microbiol. 1998 May;64(5):1650-6. doi: 10.1128/AEM.64.5.1650-1656.1998.

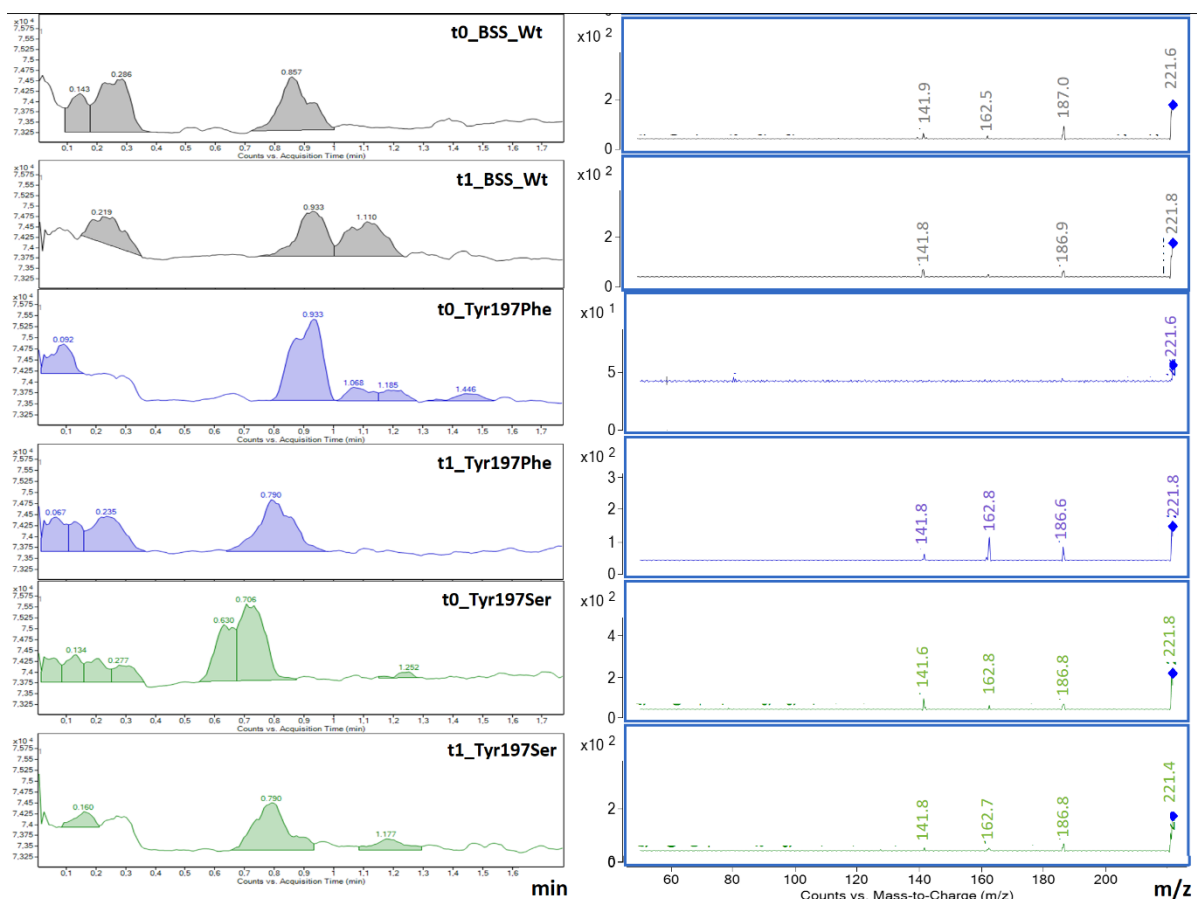
43. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulfate-reducing bacterium. A Galushko 1, D Minz, B Schink, F Widdel. *Environ Microbiol.* 1999 Oct;1(5):415-20. doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00051.x.
44. Anaerobic degradation of 1-methylnaphthalene by a member of the Thermoanaerobacteraceae contained in an iron-reducing enrichment culture. Sviatlana Marozava,¹ Housna Mouttaki,^{1,2} Hubert Müller,³ Nidal Abu Laban,³ Alexander J. Probst,⁴ and Rainer U. Meckenstock corresponding author. *Biodegradation.* 2018; 29(1): 23–39. Published online 2017 Nov 24. doi: 10.1007/s10532-017-9811-z.
45. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Friedrich Widdel, Gert-Wieland Kohring & Frank Mayer. Volume 134, pages 286–294, (1983).
46. Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments Marjorie E Bedessem, Norbert G Swoboda-Colberg, Patricia J.S Colberg *FEMS Microbiology Letters*, Volume 152, Issue 2, July 1997, Pages 213–218.
47. Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate-reducing enrichment culture N47. Franz D. Bergmann, Draženka Selesi & Rainer U. Meckenstock. Original Paper Published: 08 January 2011, Volume 193, pages 241–250, (2011).
48. The Subunit Structure of Benzylsuccinate Synthase, Lei Li,[#] Dustin P. Patterson,[#] Christel C. Fox,[#] Brian Lin,[#] Peter W. Coschigano,[§] and E. Neil G. Marsh. *Biochemistry.* 2009 Feb 17; 48(6): 1284.
49. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate T Biegert 1, G Fuchs, J Heider. *Eur J Biochem.* 1996 Jun 15;238(3):661-8. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0661w.x.
50. Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. Beller HR, Spormann AM. *J Bacteriol* 1997b;179: 670–676.

51. Identification of FeS clusters in the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase via EPR and Mössbauer spectroscopy. Hilberg M, Pierik AJ, Eckhard B, Lippert ML, Heider J: *J Biol Inorg Chem* 2011; 17: 49–56.
52. Initial reactions in anaerobic oxidation of m-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. Krieger CJ, Beller HR, Reinhard M, Spormann. AM.: *J Bacteriol* 1999; 181: 6403–6410.
53. Transcriptional Regulation of the Peripheral Pathway for the Anaerobic Catabolism of Toluene and m-Xylene in *Azoarcus* sp. CIB. Blas Blázquez, Manuel Carmona, Eduardo Díaz. *Front. Microbiol.*, 22 March 2018 Sec. Microbiotechnology, Volume 9 – 2018.
54. The ICEXTD of *Azoarcus* sp. CIB, an integrative and conjugative element with aerobic and anaerobic catabolic properties. María Teresa Zamarro, Zaira Martín-Moldes, Eduardo Díaz. *Applied Microbiology International*. 23 July 2016.

6 Anhang

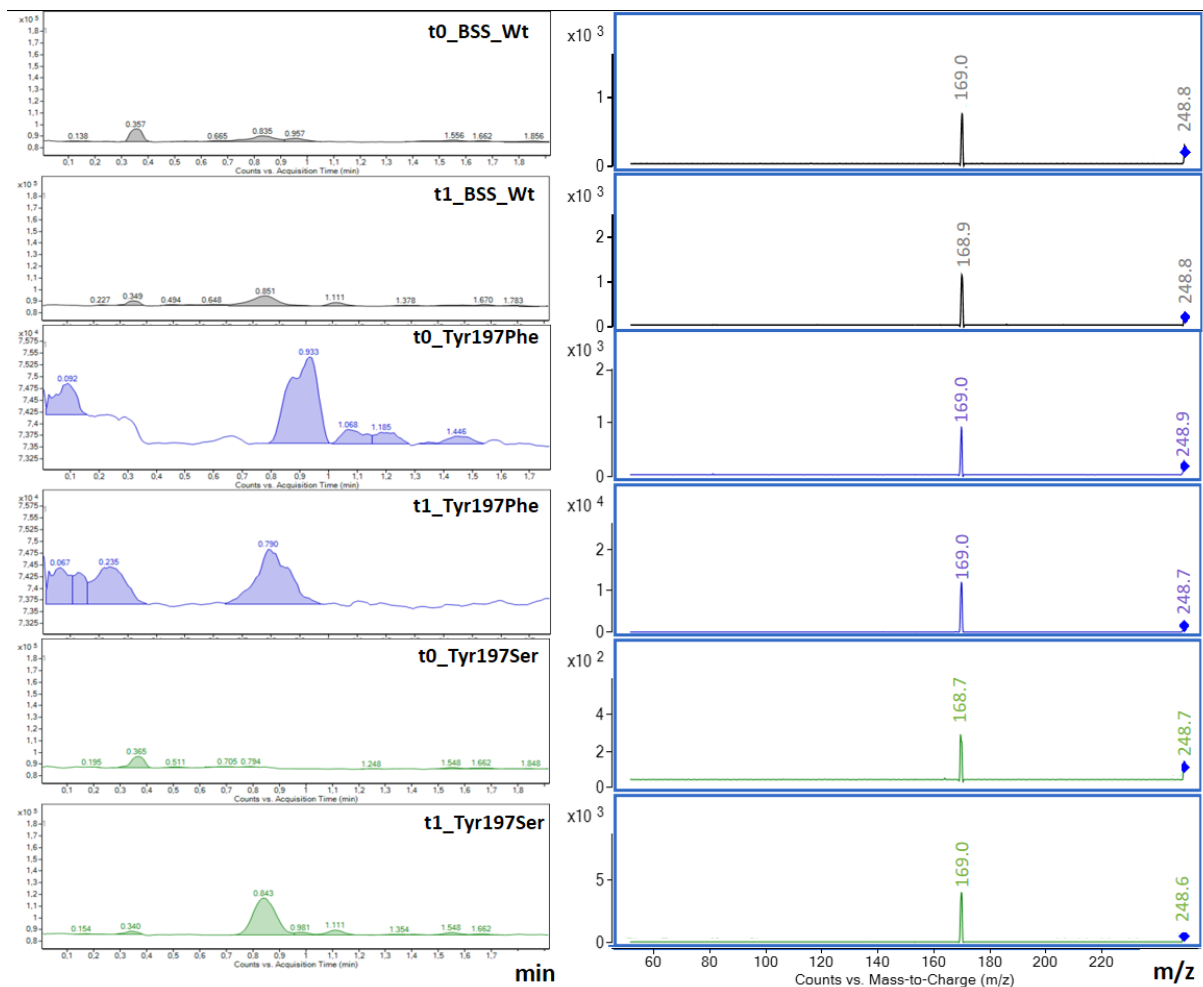


Anh.-Abbildung 1: HPLC-Messungen von Benzylsuccinat der mutierten Varianten (Gln707Asn, Trp613His und Trp613Phe). A. HPLC-Messung des Benzylsuccinat Standards 0,5 mM. Der Peak bei 0,933 min repräsentiert die Retentionszeit von Benzylsuccinat und dient als Referenz für die nachfolgenden Analysen. B. HPLC-Messung der Gln707Asn, C. HPLC-Messung der Trp619His und D. HPLC-Messung der Trp619Phe. Die chromatographische Analyse zeigt kein Nachweis von Benzylsuccinat bei den getesteten mutierten Varianten (Gln707Asn, Trp613His und Trp613Phe). Die Peaks bei 0,54 min repräsentieren T-Null.



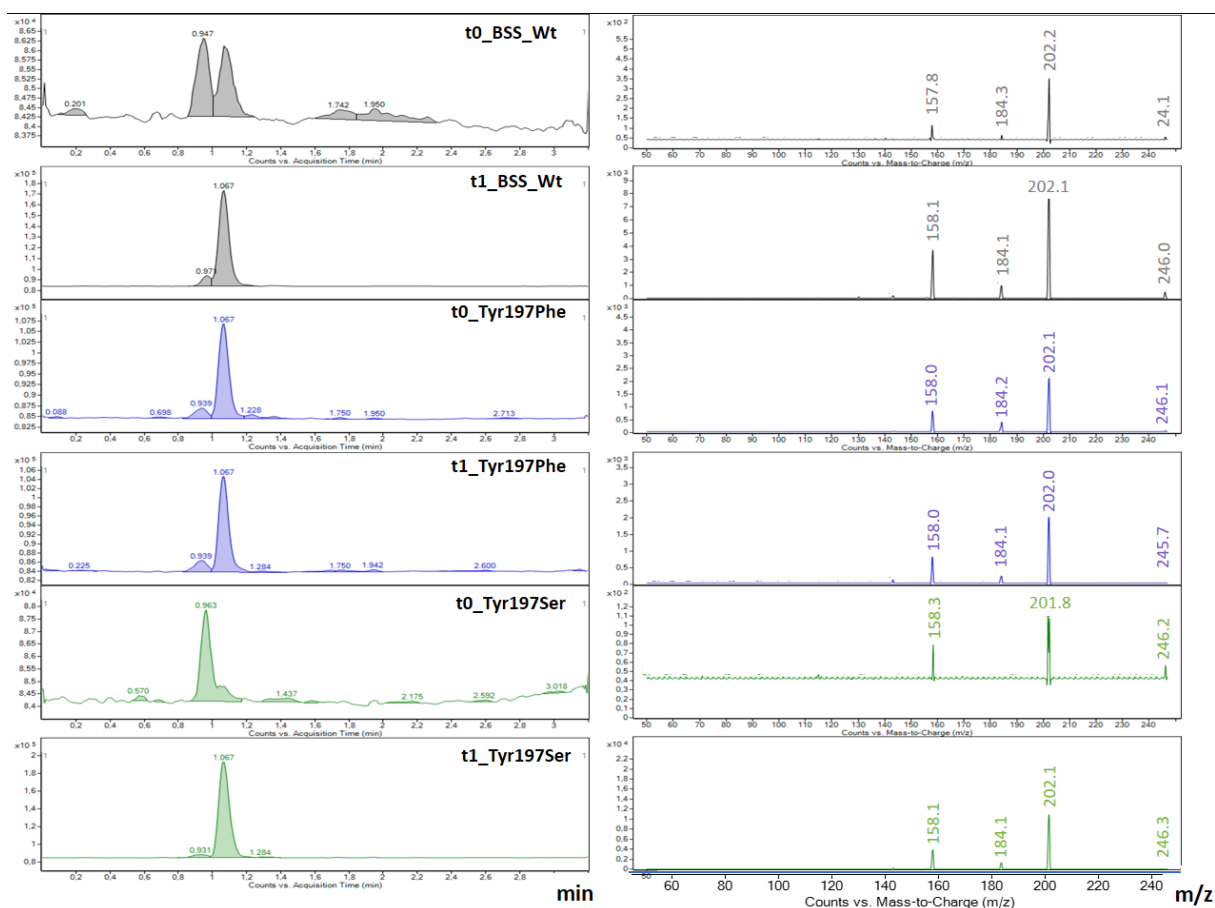
Anh.-Abbildung 2: (LC-ESI/MS) Chromatogramme für das Produkt aus o-Toluidin und Fumarat ($m=223$) im Reaktionsgemisch von rekombinantem BSS.Wt Zellextrakt (Grau), Tyr197Phe Zellextrakt (Blau) und Tyr197Ser Zellextrakt (Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von $m=222$. Die Peaks mit einer Retentionszeit von 0,790 min wurden bei allen Proben extrahiert. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des erwarteten Produkts dargestellt. Die erwarteten charakteristischen Ionenpeaks zeigen sich bei 222 m/z und 174 m/z . Die X-Achse repräsentiert das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z), während die Y-Achse die relative Signalintensität darstellt.

Bei o-Toluidin wurde kein Produkt nachgewiesen, da die t1-Proben im Vergleich zu den t0-Proben keinen Unterschied aufwiesen. Gleichzeitig können nicht alle erwarteten charakteristischen Ionenpeaks (222 m/z und 174 m/z) in den t1-Proben detektiert werden. Unter Verwendung von Zellextrakt wurden bei allen Messungen sowohl t0-Proben als auch t1-Proben hergestellt. In den t0-Proben wurde die Reaktion sofort durch Zugabe von 30 μl 10 % (v/v) H_2SO_4 gestoppt, während in den t1-Proben die Reaktion nach 15 Minuten durch Zugabe von 30 μl 10 % (v/v) H_2SO_4 gestoppt wurde. Die t0-Probe diente dazu, später alle vorhandenen Zellextrakt-Peaks (Störpeaks) auszuschließen.



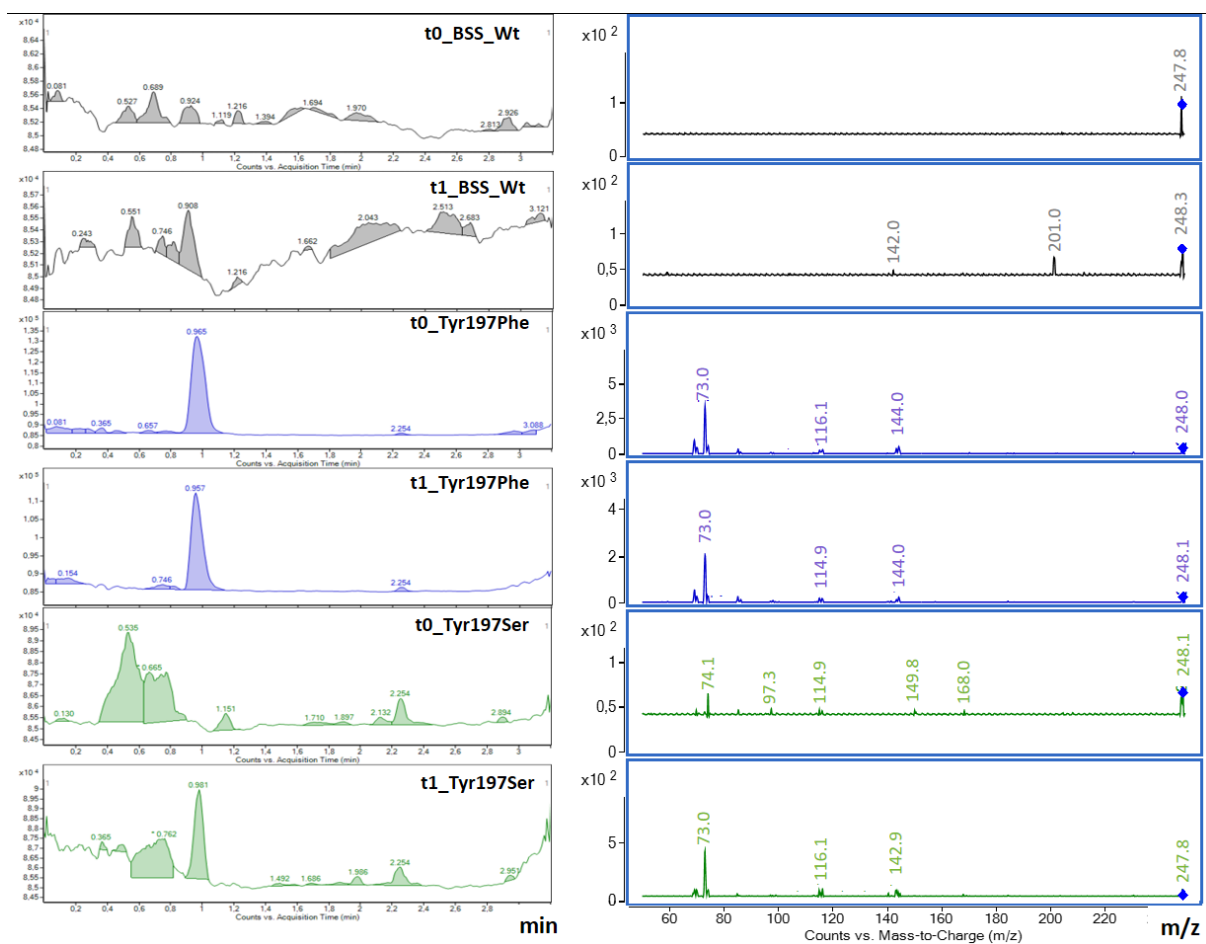
Anh.-Abbildung 3: (LC-ESI/MS) Chromatogramme für das Produkt aus p-Cymene und Fumarat ($m=250$) im Reaktionsgemisch von rekombinantem BSS.Wt Zellextrakt (Grau), Tyr197Phe Zellextrakt (Blau) und Tyr197Ser Zellextrakt (Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M H]^-$) mit einer Masse von $m=249$. Die Peaks mit einer Retentionszeit von 0,845 min wurden bei allen Proben extrahiert. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des erwarteten Produkts dargestellt. Die erwarteten charakteristischen Ionenpeaks sollten sich bei 249 m/z und 205 m/z zeigen. Die X-Achse repräsentiert das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z), während die Y-Achse die relative Signalintensität darstellt.

Bei p-Cymene wurde kein Produkt nachgewiesen, da die t1-Proben im Vergleich zu den t0-Proben keinen Unterschied aufwiesen. Gleichzeitig können nicht alle erwarteten charakteristischen Ionenpeaks (249 m/z und 205 m/z) in den t1-Proben detektiert werden.



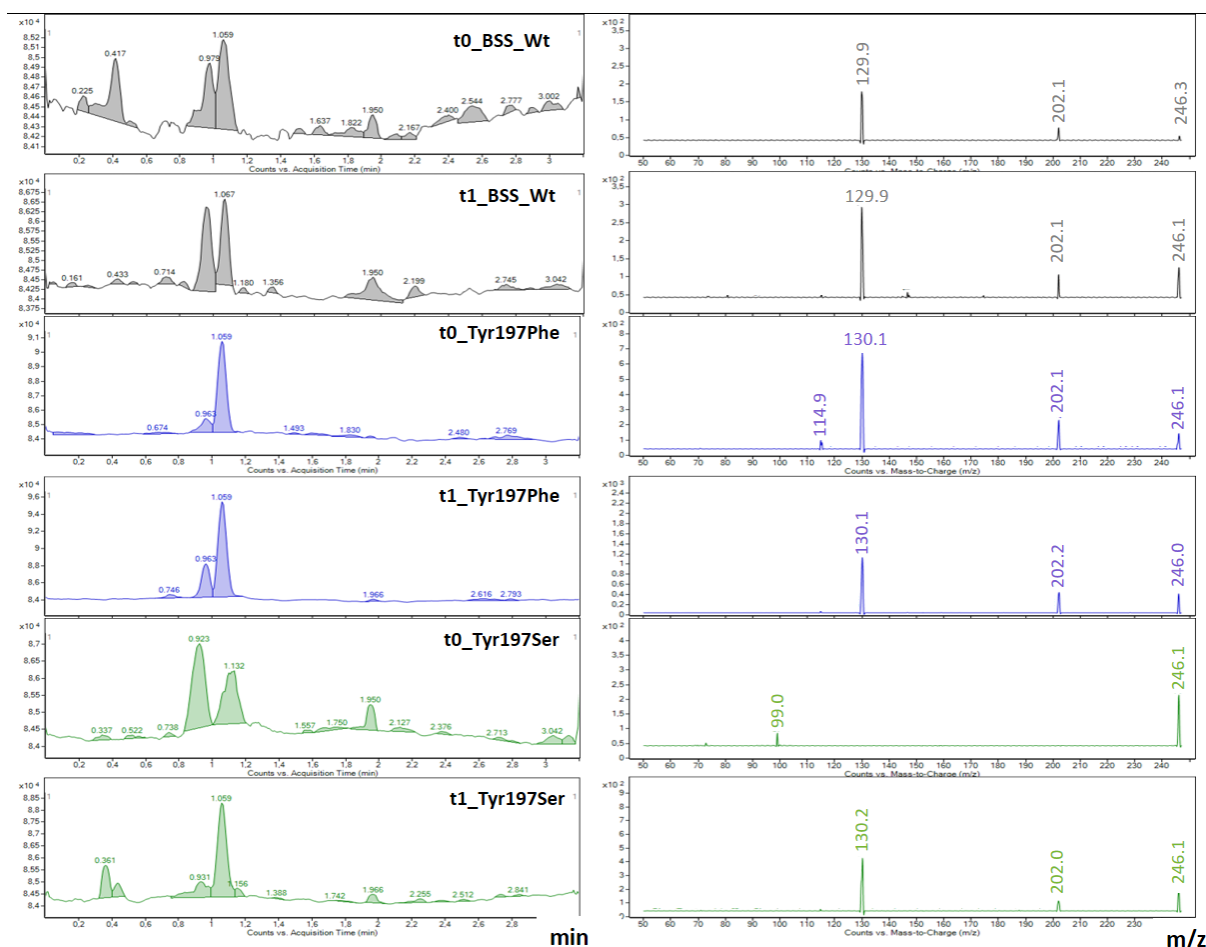
Anh.-Abbildung 4: (LC-ESI/MS) Chromatogramme für das Produkt aus 3-Methylindol (Skatol) und Fumarat ($m=247$) im Reaktionsgemisch von rekombinatem BSS.Wt Zellextrakt (Grau), Tyr197Phe Zellextrakt (Blau) und Tyr197Ser Zellextrakt (Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von $m=246$. Die Peaks mit den Retentionszeiten von 0.963 und 1.067 min wurden bei allen Proben extrahiert. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des erwarteten Produkts dargestellt. Die erwarteten charakteristischen Ionenpeaks sollten sich bei 246 m/z und 202 m/z zeigen. Die X-Achse repräsentiert das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z), während die Y-Achse die relative Signalintensität darstellt.

Bei 3-Methylindol (Skatol) wurde kein Produkt nachgewiesen, da die t1-Proben im Vergleich zu den t0-Proben keinen Unterschied aufwiesen. Gleichzeitig wurden alle erwarteten charakteristischen Ionenpeaks (246 m/z und 202 m/z) sowohl in den t1-Proben als auch in den t0-Proben detektiert.



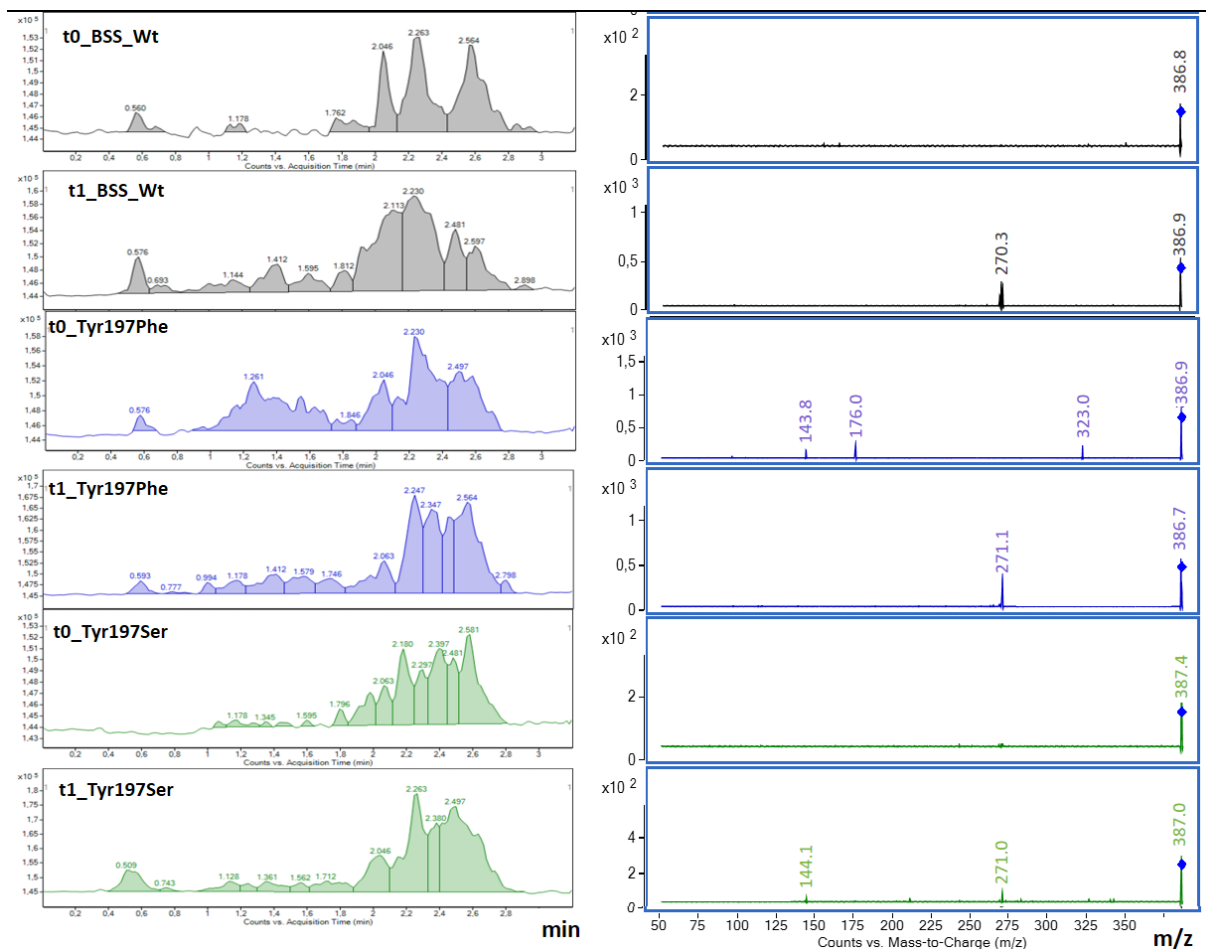
Anh.-Abbildung 5: (LC-ESI/MS) Chromatogramme für das Produkt aus 5-Methylindoline und Fumarat ($m=249$) im Reaktionsgemisch von rekombinantem BSS.Wt Zellextrakt (Grau), Tyr197Phe Zellextrakt (Blau) und Tyr197Ser Zellextrakt (Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M-H]^-$) mit einer Masse von $m=248$. Die Peaks mit der Retentionszeit von 0.965 min wurden bei allen Proben extrahiert. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des erwarteten Produkts dargestellt. Die erwarteten charakteristischen Ionenpeaks sollten sich bei 248 m/z und 204 m/z zeigen. Die X-Achse repräsentiert das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z), während die Y-Achse die relative Signalintensität darstellt.

Bei 5 Methylindoline wurde kein Produkt nachgewiesen, da die t1-Proben im Vergleich zu den t0-Proben keinen Unterschied aufwiesen. Gleichzeitig können nicht alle erwarteten charakteristischen Ionenpeaks (248 m/z und 204 m/z) in den t1-Proben detektiert werden.



Anh.-Abbildung 6: (LC-ESI/MS) Chromatogramme für das Produkt aus 5-Methylindole und Fumarat ($m=247$) im Reaktionsgemisch von rekombinatem BSS.Wt Zellextrakt (Grau), Tyr197Phe Zellextrakt (Blau) und Tyr197Ser Zellextrakt (Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M H]^-$) mit einer Masse von $m=246$. Die Peaks mit den Retentionszeiten von 0.963 und 1.067 min wurden bei allen Proben extrahiert. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des erwarteten Produkts dargestellt. Die erwarteten charakteristischen Ionenpeaks sollten sich bei 246 m/z und 202 m/z zeigen. Die X-Achse repräsentiert das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z), während die Y-Achse die relative Signalintensität darstellt.

Bei 5-Methylindol wurde kein Produkt nachgewiesen, da die Proben zu t1 im Vergleich zu den t0-Proben keine Unterschiede aufwiesen. Gleichzeitig wurden alle erwarteten charakteristischen Ionenpeaks (246 m/z und 202 m/z) sowohl in den t1-Proben als auch in den t0-Proben detektiert. Der Peak bei 0,963 und 1,067 könnte dieselbe Substanz in zwei Ionisationsformen ($-H^+$, $-2 H^+$) repräsentieren – wahrscheinlich dasselbe Rückstandsprodukt aus dem Zellextrakt, wie es auf den Skatol-Chromatogrammen zu erkennen ist (beide Produkte haben die gleiche Masse, daher wurde dieselbe Methode verwendet).



Anh.-Abbildung 7: (LC-ESI/MS) Chromatogramme für die Produkte aus 2,7-Dimethylnaphthalene und Fumarat ($m=272$ und 388) im Reaktionsgemisch von rekombinatem BSS.Wt Zellextrakt (Grau), Tyr197Phe Zellextrakt (Blau) und Tyr197Ser Zellextrakt (Grün). (Links) das gesamte Ionen-Chromatogramm im negativen Ionenmodus ($[M H]^-$) mit den Massen von $m=271$ und 387 . Die Peaks mit der Retentionszeit von 1.412 min wurden bei allen Proben extrahiert. (Rechts) Die MRM-Ionen-Transitions des erwarteten Produkts dargestellt. Die erwarteten charakteristischen Ionenpeaks sollten sich bei ($271 m/z$ & $227 m/z$) oder ($387 m/z$ & $343 m/z$) zeigen. Die X-Achse repräsentiert das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z), während die Y-Achse die relative Signalintensität darstellt.

Bei 2,7-Dimethylnaphthalene wurde kein Produkt nachgewiesen, da die t1-Proben im Vergleich zu den t0-Proben keinen Unterschied aufwiesen. Gleichzeitig können nicht alle erwarteten charakteristischen Ionenpeaks ($271 m/z$ & $227 m/z$) oder ($387 m/z$ & $343 m/z$) in den t1-Proben detektiert werden.

	10	20	30	40	50	
Konsens	MNDIASAKVL	EYKGGTLNFT	PEDPAEAKIP	XDELHEHLQK	PSTARTKRLK	ERCRCWKHASA
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	MNDIASAKVL	EYKGGTLNFT	PEDPAEAKIP	.DELHEHLQK	PSTARTKRLK	ERCRCWKHASA
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	MNDIASAKVL	EYKGGTLNFT	PEDPAEAKIP	.DELHEHLQK	PSTARTKRLK	ERCRCWKHASA
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	---.....L	EYKGG...F.	PE.P.EA.IP	.DELHEHLQ.	PST.RT.RLK	.RCRCWKHA.A
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	MNDI.SAK.L	EYKGGTLNFT	PEDPAEAKIP	.DELHEHLQK	PSTARTKRLK	ERCRCWKHASA
	70	80	90	100	110	
Konsens	GEFIEKSVTA	GIERMRYLTE	AHKASEGQPE	VIRRALGLAN	VLNKSTLVLQ	EDEFIVGYHA
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	GEFIEKSVTA	GIERMRYLTE	AHKASEGQPE	VIRRALGLAN	VLNKSTLVLQ	EDEFIVGYHA
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	GEFIEKSVTA	GIERMRYLTE	AHKASEGQPE	VIRRALGLAN	VLNKSTLVLQ	EDEFIVGYHA
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	GEF.EK.VTA	GIERMR.LTE	.H.A..G.PE	.IRRA.GL.N	.L.KSTLVLQ.	.DEFIVGYHA
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	GEFIEKSVTA	GIERMRYLTE	AHKASEG.PE	.IRRALGLAN	VLNKSTLVLQ	EDEFIVGYHA
	130	140	150	160	170	
Konsens	EDPNMFPLYP	ELSHMAVQDY	LRSDYSPQPA	DEAAAINDYW	KPHSLQSKCQ	PYFDPADLGR
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	EDPNMFPLYP	ELSHMAVQDY	LRSDYSPQPA	DEAAAINDYW	KPHSLQSKCQ	PYFDPADLGR
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	EDPNMFPLYP	ELSHMAVQDY	LRSDYSPQPA	DEAAAINDYW	KPHSLQSKCQ	PYFDPADLGR
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	EDPNMFPLYP	ELS.MAVQDY	L.S.YSPQPA	.EA..I.DYW	KP.SLQ..C.	PYFDP.DL.R
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	EDPNMFPLYP	ELSHMAVQDY	LRSDYSPQPA	DEAAAIN.YW	KPHSLQSKCQ	PYFDPADLGR
	190	200	210	220	230	
Konsens	MYQVSSMEAP	PFASGYSIV	PPYETVLEDG	LLARIKLAEK	HIAEAQADMS	TFPWNGTKGL
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	MYQVSSMEAP	PFASGYSIV	PPYETVLEDG	LLARIKLAEK	HIAEAQADMS	TFPWNGTKGL
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	MYQVSSMEAP	PFASGYSIV	PPYETVLEDG	LLARIKLAEK	HIAEAQADMS	TFPWNGTKGL
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	.YQVS..E.P	.FA.GYNS..	PPYETVLEDG	L.ARI.LAE.	.I..A.A.M.	.FPW...GL
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	MYQVSSMEAP	.FASGYSIV	PPYETVLEDG	LLARIKLAEK	HIAEAQ.DMS	TFPWNGTKGL
	250	260	270	280	290	
Konsens	DNIAKIDXWK	AMVIACKAVI	SWARRQXRLC	RIVAENFETD	PKRQAEELLE	ADICHRVPAE
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	DNIAKID.WK	AMVIACKAVI	SWARRQ.RLC	RIVAENFETD	PKRQAEELLE	ADICHRVPAE
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	DNIAKID.WK	AMVIACKAVI	SWARRQ.RLC	RIVAENFETD	PKRQAEELLE	ADICHRVPAE
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	.I.KID.WK	AMVIACKAVI	.WARR..RLC	.IVAE.FETD	PKR.AELLE	ADIC.R.PAE
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	DNIAKID.WK	AMVIACKAVI	SWARRQ.RLC	RIVAENFETD	PKRQAEELLE	ADICHR.PAE
	310	320	330	340	350	
Konsens	PCKGLKDAMQ	AKFFTFLLICH	AIERYASGYA	QKEDTLLWPY	YKASVIDKFF	QPMDHMGAVE
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	PCKGLKDAMQ	AKFFTFLLICH	AIERYASGYA	QKEDTLLWPY	YKASVIDKFF	QPMDHMGAVE
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	PCKGLKDAMQ	AKFFTFLLICH	AIERYASGYA	QKEDTLLWPY	YKASVIDKFF	QPMDHMGAVE
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	P..GLKDAMQ	.K.FTFLLICH	AIERYASG.A	QKED.LLWPY	YKASVIDK.F	QPM.H..AVE
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	PCKGLKDAMQ	AKFFTFLLICH	AIERYASGYA	QKEDTLLWPY	YKASVIDKFF	QPMDHMGAVE
	370	380	390	400	410	
Konsens	LVEMERLKIS	EHGAGKSRAV	REIFPGSNDL	FILTVGGTNA	KGEDACNDMT	DAILEAXKRI
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	LVEMERLKIS	EHGAGKSRAV	REIFPGSNDL	FILTVGGTNA	KGEDACNDMT	DAILEA.KRI
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	LVEMERLKIS	EHGAGKSRAV	REIFPGSNDL	FILTVGGTNA	KGEDACNDMT	DAILEA.KRI
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	L.EMERLK.S	EHGAGKSRAV	REIFPGSNDL	FILT.GGTN.	.G.DACNDMT	DAILEA.KRI
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	LVEMERLKIS	EHGAGKSRAV	REIFPGSNDL	FILTVGGTNA	.GEDACNDMT	DAILEA.KRI
	430	440	450	460	470	
Konsens	RTAEPSIVFR	YSKKXREKTL	RWVFECIRDG	LGYPYIKHDE	IGTAQMKEYA	KFSLNNGGAT
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	RTAEPSIVFR	YSKK.REKTL	RWVFECIRDG	LGYPYIKHDE	IGTAQMKEYA	KFSLNNGGAT
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	RTAEPSIVFR	YSKK.REKTL	RWVFECIRDG	LGYPYIKHDE	IGTAQMKEYA	KFSLNNGGAT
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	RT.EPSIVFR	YSKK.R.KTL	RWVFECIRDG	LGYPYIKH.E	.G..QM.E.A	K.S.NGGAT
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	RTAEPSIVFR	YSKK.REKTL	RWVFECIRDG	LGYPYIKHDE	IGT.QMKEYA	KFSLNNGGAT
	490	500	510	520	530	
Konsens	DEEAHNWVNV	LCMSPGLHGR	RKTQKTRSEG	GSSXFPKXKL	EITLNDGYDW	SYADMQLGPK
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	DEEAHNWVNV	LCMSPGLHGR	RKTQKTRSEG	GSS.FPAK.L	EITLNDGYDW	SYADMQLGPK
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	DEEAHNWVNV	LCMSPGLHGR	RKTQKTRSEG	GSS.FPAK.L	EITLNDGYDW	SYADMQLGPK
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	.EEAH.WVNV	LCM.PGL.GR	RK.QKTRSEG	GS..FPAK.L	EITLN.GYDW	SYADMQ.GP.
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	DEEAHNWVNV	LCMSPG.HGR	RKTQKTRSEG	G.S.FPAK.L	EITLNDGYDW	SYADMQLGPK
	550	560	570	580	590	
Konsens	TGELSSLKTF	EDIWEAFRRQ	YQYAINLGIS	TKDVSRYFEQ	RXLQXPFVSA	IDDGCMEXGM
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	TGELSSLKTF	EDIWEAFRRQ	YQYAINLGIS	TKDVSRYFEQ	R.LQ.PFVSA	IDDGCM.E.GM
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	TGELSSLKTF	EDIWEAFRRQ	YQYAINLGIS	TKDVSRYFEQ	R.LQ.PFVSA	IDDGCM.E.GM
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	TG.....TF	..WEAFRRQ	YQYAI.L.I.	.KDVSR..E.	R.LQ.PFVSA	.DDGCM.E.GM
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	TG.L.SLKTF	ED.WEAFR.Q	YQYAINL.I.	TKDVSRYFEQ	R.LQ.PFVSA	IDDGCM.E.GM
	610	620	630	640	650	
Konsens	DACALSEQPN	XWHNXXTTXV	AANSLVAIKK	LVFEEKKYTL	EQLSQALKAN	WEGFEEMRVD
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. T)	DACALSEQPN	.WHN...T.V	AANSLVAIKK	LVFEEKKYTL	EQLSQALKAN	WEGFEEMRVD
BSSA (<i>Azoarcus</i> sp. CIB)	DACALSEQPN	.WHN..TT.V	AANSLVAIKK	LVFEEKKYTL	EQLSQALKAN	WEGFEEMRVD
BSSA (<i>Thauera aromatika</i> K172)	DA.ALSEQPN	.WHN..T.V	A.NSLVAIKK	L...EKKYT.	.QL..AL.AN	WEG.EEMR.D
BSSA (<i>Thauera</i> sp. DNT)	DACALSEQPN	.WHN..TT.V	AANSLVAIKK	LVFEEKKYTL	EQLSQALKAN	WEGFEEMRVD

```

        670      680      690      700      710
Konsens      FKRAPKWGND DXYADSIKSR FYEEXIGGEX RKITNYSGGP VLPTGQAVGL YMEVGSRXGP
BSSA(Azoarcus sp. T)      FKRAPKWGND D.YADSI.SR FYEE.IGGE. RKITNYSG.P VLPTGQAVGL YMEVGSR.GP
BSSA(Azoarcus sp. CIB)      FKRAPKWGND D.YADSI.SR FYEE.IGGE. RKITNYSGGP VLPTGQAVGL YMEVGSR.GP
BSSA(Thauera aromatica K172)      FK.APKWGND D..AD..SR FYEE..GGE. .K..NYSGGP V.PTGQAVGL YMEVGSR.GP
BSSA(Thauera sp. DNT)      FKRAPKWGND D.YAD.I..R FYEE.IGGE. RKITNYSGGP V.PTGQAVGL YMEVGSR.GP

        730      740      750      760      770
Konsens      TPDGRFGGEA ADDGGISPYM GTDKKGPTAV LRSVSKVQKN QKANLLNQRL SVPIMRSKHG
BSSA(Azoarcus sp. T)      TPDGRFGGEA ADDGGISPYM GTDKKGPTAV LRSVSKVQKN QKANLLNQRL SVPIMRSKHG
BSSA(Azoarcus sp. CIB)      TPDGRFGGEA ADDGGISPYM GTDKKGPTAV LRSVSKVQKN QKANLLNQRL SVPIMRSKHG
BSSA(Thauera aromatica K172)      TPDGRFGGEA ADDGGISPY. GTDKKGPTAV LRSVSKVQKN QKANLLNQRL SVPIMRSKHG
BSSA(Thauera sp. DNT)      TPDGRFGGEA ADDGGISPYM GTDKKGPTAV LRSVSKVQKN QK.NLLNQRL SVPIMRSKHG

        790      800      810      820      830
Konsens      FEIWNAYMKT WHXLNIDHVQ FNVVSTDEMR AAQREPEKH DLIVRVSGYS ARFVDJPTYG
BSSA(Azoarcus sp. T)      FEIWNAYMKT WH.LNIDHVQ FNVVSTDEMR AAQREPEKH. DLIVRVSGYS ARFVD.PTYG
BSSA(Azoarcus sp. CIB)      FEIWNAYMKT WH.LNIDHVQ FNVVSTDEMR AAQREPEKH. DLIVRVSGYS ARFVD.PTYG
BSSA(Thauera aromatica K172)      F.IW.AYM.T WH.LNIDHVQ FNVVST.EM. AAQREPEKH. DLIVRVG.S ARFVD.PTYG
BSSA(Thauera sp. DNT)      FEIWN.YMKT WH.LNIDHVQ FNVVSTDEMR AAQREPEKH. DLIVRVSGYS ARFVD.PTYG

        850      860
Konsens      QNTIARQEQ DFSASDLEFL NVEI
BSSA(Azoarcus sp. T)      QNTIARQEQ DFSASDLEFL NVEI
BSSA(Azoarcus sp. CIB)      QNTIARQEQ DFSASDLEFL NVEI
BSSA(Thauera aromatica K172)      QNTIAR.EQ .F.A.DLEFL NVE.
BSSA(Thauera sp. DNT)      QNTIARQEQ DFSASDLEFL NVEI

```

	BSSA aus	<i>Azoarcus sp. T</i>	<i>Azoarcus sp. CIB</i>	<i>Thauera aromatica K172</i>	<i>Thauera sp. DNT</i>
BSSA aus					
<i>Azoarcus sp. T</i>			99.54 %	78.28 %	94.44 %
<i>Azoarcus sp. CIB</i>	99.54 %			78.40 %	94.79 %
<i>Thauera aromatica K172</i>	78.28 %	78.40 %			79.91 %
<i>Thauera sp. DNT</i>	94.44 %	94.79 %	79.91 %		

Anh.-Abbildung 8: Das Sequenzalignment der Bssa-Untereinheiten aus *Azoarcus sp. T* ([Q8VPT7](#)), *Azoarcus sp. CIB* ([I6LHT8](#)), *Thauera aromatica K172* ([A0A2R4BRH7](#)) und *Thauera sp. DNT-1* ([Q8L1A3](#)) sowie der Identitätsvergleich zwischen allen Stämmen. Die konservierten Aminosäurereste der Toluol- und Fumarat-Bindungsstelle sind in fettem Rot hervorgehoben.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Micro (10 ⁻⁶)
<i>A. aromaticum</i>	<i>Aromatoleum aromaticum</i>
<i>A. evansii</i>	<i>Aromatoleum evansii</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AHT	Anhydrotetrazyklin
bbs	operon for the β-oxidation of (R)-benzylsuccinate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bla	Gene für β- Laktamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Benzylsuccinat-Synthase
bzw.	beziehungsweise
CoA	Coenzym A
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
DEAE	Diethylaminoethyl
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronenspinresonanz

et al.	et alii, et aliae, et alia; und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAE	fumarate addition enzyme
FMN	Flavin-Mononukleotid
For	forward
g	Gramm
h	Stunden
HABA	2-[4'-Hydroxy-Benzoazo]-Benzoessäure
Hplc	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
l	liter
LB	Luria Bertani
Lc-Ms	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
M	Molarität mol/l
mA	Milli-Ampere
ml	Milliliter
mg	Milligramm
m/z	Masse-zu-Ladung
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Min	Minute
Ms	Massenspektrometrie
NAD	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMS	naphthyl-2(methyl)succinate synthase
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potential des Wasserstoffs
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
Rev	Reverse
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
Strep-Tag	Streptavidin-Bindedomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T. aromatica	Thauera aromatica
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
ÜK	Übernachtskultur
VK	Vorkultur
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Danksagung

Mit großer Freude und Dankbarkeit möchte ich mich anlässlich des Abschlusses meiner Arbeit bei euch allen bedanken. Dieser Meilenstein wäre ohne eure Unterstützung, Ermutigungen und Liebe nicht möglich gewesen.

Zuallererst möchte ich meinen aufrichtigen Dank Prof. Dr. Johann Heider aussprechen. Er hat mich nicht nur in seinen Arbeitskreis aufgenommen, sondern auch für hervorragende Arbeitsbedingungen, die Bereitstellung eines faszinierenden Themas und stetige Hilfsbereitschaft bei Fragen und Diskussionen gesorgt. Seine Weisheit und Unterstützung waren entscheidend für den Erfolg dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Lars Oliver Essen für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Labor-Kollegen (Yvonne, Sarah und Kai) und Studenten (Lena und Alex). Der inspirierende Austausch, gemeinsame Herausforderungen und fruchtbare Zusammenarbeit haben maßgeblich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen.

Iris und Alexandra, ein herzliches Dankeschön für eure großartige Unterstützung. Euer Einsatz und eure Freundlichkeit machen unsere Zusammenarbeit nicht nur effizienter, sondern auch angenehmer.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Dominik für die herausragende Unterstützung bei der Korrektur meiner Abschlussarbeit. Seine präzisen Anmerkungen und Engagement haben die Qualität meiner Arbeit erheblich verbessert.

Gabi, ich möchte mich von Herzen bei dir für deine ständige Hilfe und Unterstützung bedanken. Deine positive Energie hat nicht nur den Arbeitsalltag angenehmer gemacht, sondern auch mich persönlich beeinflusst. Vielen herzlichen Dank für alles, was du für mich getan hast. Deine Unterstützung wird immer in guter Erinnerung bleiben.

I would like to express my gratitude to Gabriela Oleksy for her invaluable support in all LC/MS measurements. Your professional expertise and constant willingness to help have markedly alleviated the challenges of the measurements. It is reassuring to know that I can rely on your competence and support. You have significantly expanded my skills in this field.

Meine Familie hat in dieser Zeit einen unschätzbaren Rückhalt geboten. Eure Liebe, Geduld und ständige Ermutigung haben mir die Kraft gegeben, die Herausforderungen zu meistern. Ihr seid der Grundstein meines Erfolgs. Euer ständiger Rückhalt hat nicht nur meine akademische Reise, sondern auch mein gesamtes Leben bereichert.

An meinen geliebten Vater möchte ich einen ganz besonderen Dank richten. Seine Lebensweisheit, Liebe und Opferbereitschaft haben mich zu dem gemacht, wer ich heute bin.

Seine Unterstützung hat mir die Kraft gegeben, durchzuhalten und meine Ziele zu erreichen.

Diese Abschlussarbeit trage ich in seinem Gedenken und als Tribut an die Werte, die er mir vermittelt hat.

An meine Freunde, die mich in den Höhen und Tiefen begleitet haben, geht ein herzliches Dankeschön. Eure Freundschaft ist für mich eine Quelle der Freude und Inspiration.

Diese Arbeit trägt die Spuren jeder einzelnen Person, die in irgendeiner Form dazu beigetragen hat. Ihr alle habt einen unvergesslichen Eindruck hinterlassen, und für das Vertrauen und die Gemeinschaft bin ich zutiefst dankbar.

Lebenslauf

Name Ammar Alhaj Zein
Geburtsdatum 25.08.1984
Geburtsort Hama/Syrien

Hochschulbildung

Oktober 2005 - März 2010 B.Sc. in Biochemie
Universität von Aleppo Syrien

September 2017 - März 2018 MS in Biochemie Fachbereich Chemie
Philipps-Universität Marburg Deutschland
unter der Leitung von Prof. Dr. Johann Heider
Thema: Reinigung und Untersuchung der Stereospezifität von
Varianten der Ethylbenzol-Dehydrogenase EbdH aus
Aromatoleum aromaticum.

Oktober 2018 - September 2022 Promotion (Dr. rer. nat.) Fachbereich Biologie
Philipps-Universität Marburg Deutschland
unter der Leitung von Prof. Dr. Johann Heider
Thema: Mutagenese der (R)-Benzylsuccinat-Synthase:
Erweiterung des Substratspektrums und Verbesserung der
Enzymaktivität.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)



(Unterschrift)

