

Neue Aminosäureoxidasen aus
Rhodococcus opacus und *Arthrobacter protophormiae*:
Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung, Klonierung und Expression

INAUGURALDISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Birgit Geueke
aus Meschede

Jülich, 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Werner Hummel
1. Korreferent: Prof. Dr. Roland Freudl
2. Korreferent: Prof. Dr. Hanns Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis April 2002 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Herrn PD Dr. W. Hummel durchgeführt.

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und die Degussa unterstützten diese Arbeit im Rahmen des Projekts „Technische Evolution von Enzymen und Synzymen“.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1 Enzyme in der Biotechnologie	1
2 Enzymatische Wege zur Darstellung von D-Aminosäuren.....	1
3 Screening nach neuen Biokatalysatoren.....	4
4 L-Aminosäureoxidasen (L-AAO)	5
4.1 Vorkommen der L-AAOs	6
4.2 Physiologische Funktion der L-AAOs	6
4.3 Biotechnologische Anwendung der L-AAOs.....	7
4.4 Klonierung und Expression der L-AAOs.....	8
5 D-Aminosäureoxidasen (D-AAO).....	8
5.1 Vorkommen der D-AAOs.....	8
5.2 Physiologische Funktion der D-AAOs.....	9
5.3 Biotechnologische Anwendung der D-AAOs	10
5.4 Klonierung und Expression der D-AAOs	11
6 Proteinchemische Eigenschaften der AAOs	12
7 Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der AAOs	13
8 Problemstellung und Zielsetzung.....	14
II Material und Methoden	15
1 Material	15
1.1 Geräte	15
1.2 Chemikalien.....	16
1.3 Vektoren.....	16
1.4 Mikroorganismen.....	16
2 Methoden.....	17
2.1 Screening nach mikrobiellen L-AAO-Bildnern	17
2.1.1 Medien und Lösungen	17
2.1.2 Strategie I: Screening von Bodenproben auf Agarmedium	20
2.1.3 Strategie II: Screening von Bodenproben mittels Anreicherungs- kulturen.....	20
2.1.4 Strategie III: Screening einer Auswahl an DSMZ-Sammlungs- stämmen	21
2.1.5 Strategie IV: Gezieltes Screening nach <i>Rhodococcus</i> - und <i>Nocardia</i> -Arten.....	21
2.2 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen	22
2.2.1 Medien und Lösungen	22
2.2.2 Anzucht von <i>Rhodococcus opacus</i>	23
2.2.3 Medienoptimierung im Schüttelkolben mittels RAMOS.....	23
2.2.4 Fermentation und Ernte von <i>Rhodococcus opacus</i>	24

2.2.5	Anzucht von <i>E. coli</i>	25
2.2.6	Anzucht von <i>Streptomyces lividans</i>	25
2.2.7	Fermentation und Ernte von <i>Streptomyces lividans</i>	25
2.2.8	Anzucht von <i>Arthrobacter protophormiae</i>	25
2.2.9	Bestimmung der Expressionsraten und Wachstumsparameter.....	25
2.2.10	Konservierung.....	26
2.3	Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung.....	27
2.3.1	Für analytische Zwecke.....	27
2.3.2	Für präparative Zwecke.....	27
2.4	Reinigung der L-AAO.....	28
2.4.1	Protokoll –1-.....	28
2.4.2	Protokoll –2-.....	29
2.5	Reinigung der D-AAO.....	29
2.6	Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinproben.....	30
2.6.1	Rührzelle.....	30
2.6.2	Gelfiltration (PD-10).....	30
2.7	Proteinanalytik.....	30
2.7.1	Bestimmung der L-AAO-Aktivität.....	30
2.7.2	Bestimmung der D-AAO-Aktivität.....	31
2.7.3	Bestimmung der Katalase-Aktivität.....	31
2.7.4	Proteinbestimmung.....	31
2.7.5	Gelfiltrationschromatographie.....	31
2.7.6	MALDI/TOF-MS.....	31
2.7.7	Proteolytische Spaltung und Trennung der Peptide über HPLC.....	32
2.7.8	N-terminale Sequenzierung.....	32
2.7.9	Herstellung des Apoenzyms.....	32
2.8	Elektrophoretische Methoden und Proteinfärbungen.....	33
2.8.1	SDS-PAGE.....	33
2.8.2	Native PAGE und Aktivitätsfärbung.....	33
2.8.3	Isoelektrische Fokussierung.....	33
2.8.4	Diskontinuierliches Blotting von Proteinen.....	33
2.8.5	Färbung von Proteinen mit Coomassie-Blau and Amidoschwarz....	34
2.8.6	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen.....	34
2.9	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.9.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>Rhodococcus opacus</i>	34
2.9.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	35
2.9.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	35
2.9.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR- Produkten.....	35
2.9.5	Aufkonzentrieren von DNA-Proben.....	35
2.9.6	DNA-Restriktion.....	36

2.9.7	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	36
2.9.8	Ligation mittels T4-Ligase	36
2.9.9	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	36
2.9.10	Herstellung von Protoplasten aus <i>Streptomyces lividans</i>	36
2.9.11	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	37
2.9.12	Transformation von Plasmiden in <i>Streptomyces lividans</i>	37
2.9.13	Herstellung der Primer	37
2.9.14	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
2.9.15	Southern Hybridisierung	38
2.9.16	Sequenzierung	40
2.9.17	Renaturierung von Inclusion Bodies	40
2.10	Kristallisation der L-AAO	40
2.10.1	Enzympräparation und Vorbereitung der Probe	40
2.10.2	Kristallisationsbedingungen	41
2.10.3	Impfkristallisation	41
2.11	Modellierung der dreidimensionalen Struktur der L-AAO	41
2.12	Präparation von D-Aminosäuren	41
2.12.1	Enzymimmobilisierung	42
2.12.2	Herstellung von quervernetzten Enzymkristallen (CLECs)	42
2.12.3	Einsatz ganzer Zellen	42
2.12.4	Einsatz freier L-AAO	43
2.12.5	Einsatz von Immobilisat	43
2.12.6	Einsatz der CLECs	43
2.12.7	Enzym-Membran-Reaktor (EMR)	43
2.12.8	Aminosäureanalytik mittels HPLC	43

III Ergebnisse **45**

1	Screening nach L-AAO-Bildnern	45
2	L-AAO aus <i>Rhodococcus opacus</i> (Wildtyp L-AAO)	48
2.1	Expression der L-AAO in <i>Rhodococcus opacus</i>	48
2.1.1	Medienoptimierung im Schüttelkolben	48
2.1.2	Fermentation	52
2.2	Reinigung der L-AAO aus <i>Rhodococcus opacus</i>	53
2.2.1	Isolierung aus 15-25 g Zellfeuchtmasse	53
2.2.2	Isolierung aus 50 g Zellfeuchtmasse	56
2.3	Biochemische Charakterisierung	57
2.3.1	Temperaturstabilität	57
2.3.2	Lagerstabilität	59
2.3.3	pH-Stabilität	59
2.3.4	pH-Optimum	60
2.3.5	Substratspektrum	61

2.3.6	Kinetische Daten	63
2.3.7	Inhibitions- und Inaktivierungsstudien.....	66
2.4	Proteinchemische Charakterisierung	68
2.4.1	Molekulargewicht.....	68
2.4.2	Native PAGE	69
2.4.3	Isoelektrischer Punkt	70
2.4.4	Spektroskopische Eigenschaften.....	70
2.4.5	N-Terminale und interne Sequenzdaten.....	71
3	Klonierung des <i>laao</i> -Gens	72
3.1	Bestimmung einer Teilsequenz des <i>laao</i> -Gens.....	72
3.2	Herstellung und Screening der partiellen Genbank.....	72
3.3	Die Signalsequenz der L-AAO	73
3.4	Bestimmung der <i>laao</i> -Gensequenz.....	74
3.5	Klassifizierung und Alignment der L-AAO	77
3.6	Strukturalignment der L-AAO	78
4	Heterologe Expression der L-AAO	80
4.1	<i>E. coli</i> als Expressionssystem	80
4.1.1	Klonierung des <i>laao</i> -Gens in <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren	80
4.1.2	Untersuchung der Expressionsbedingungen in <i>E. coli</i>	82
4.1.3	Renaturierung von Inclusion Bodies	82
4.2	<i>Streptomyces lividans</i> als Expressionssystem.....	83
4.2.1	Klonierung des <i>laao</i> -Gens in <i>Streptomyces</i> -Expressionsvektoren ..	83
4.2.2	Optimierung der Expressionsbedingungen in <i>Streptomyces lividans</i>	84
4.2.3	Fermentation des rekombinanten <i>Streptomyces lividans</i> -Stammes	86
5	Vergleich der rec-L-AAO mit der Wildtyp L-AAO	87
5.1	Expressionsraten und spezifische Aktivität im Rohextrakt	87
5.2	Reinigung der rec-L-AAO	88
5.3	N-Terminale Sequenzdaten	89
5.4	Kinetische Konstanten	89
5.5	Spektroskopische Eigenschaften	90
6	Kristallisation	90
7	Präparation von D-Aminosäuren durch die L-AAO	94
7.1	Ganzzellbiotransformation.....	94
7.2	Partiell gereinigte L-AAO.....	95
7.2.1	Umsatz von DL-Phenylalanin	95
7.2.2	Umsatz von DL-Serin	96
7.3	Immobilisierte L-AAO	97
7.3.1	Optimierung der Immobilisierungsbedingungen	98
7.3.2	Recycling des Immobilisats	99
7.3.3	Stabilität des Immobilisats	99

7.4	Herstellung und Anwendung von Cross-linked enzyme crystals (CLECs) ..	100
7.5	Enzym-Membran-Reaktor (EMR)	101
8	D-AAO aus <i>Arthrobacter protophormiae</i>	102
8.1	Expression der D-AAO in <i>Arthrobacter protophormiae</i>	102
8.2	Reinigung	102
8.3	Biochemische Charakterisierung	104
8.3.1	pH-Optimum	104
8.3.2	Partielles Substratspektrum	105
8.4	Proteinchemische Charakterisierung	105
8.4.1	Molekulargewicht	105
8.4.2	N-Terminale & interne Sequenzdaten der D-AAO	106
8.4.3	Alignment des N-Terminus der D-AAO	106
IV	Diskussion	108
1	Screening nach neuen L-AAO-Bildnern	108
2	Reinigung und biochemische Charakterisierung der <i>Rhodococcus opacus</i> L-AAO	110
3	Sequenzauswertung und Strukturaufklärung der <i>Rhodococcus opacus</i> L-AAO ..	115
4	Lokalisierung und Prozessierung der L-AAO	116
5	Mögliche Funktion der L-AAO in <i>Rhodococcus opacus</i>	118
6	Heterologe Expression der L-AAO	118
7	Biotechnologischer Einsatz der L-AAO	121
8	Reinigung und biochemische Charakterisierung der <i>Arthrobacter protophormiae</i> D-AAO	123
9	Zusammenfassender Vergleich der neuen, bakteriellen mit literaturbekannten L-AAOs	124
V	Zusammenfassung	126
VI	Ausblick	128
VII	Literaturverzeichnis	129
VIII	Anhang	141
1	Wachstumskurven	141
2	Primer	146
2.1	<i>laao</i> -Sonde	146
2.2	Klonierungsprimer	146
2.2.1	Für <i>E. coli</i> -Vektoren	146
2.2.2	Für <i>Streptomyces</i> -Vektoren	146
3	Codon Usage	147

Abkürzungen

7-ACA	7-Aminocephalosporansäure
AAO	Aminosäureoxidase
ABTS	Diammonium-2,2'-azinobis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulphonat)
BSA	Rinderserumalbumin
CBZ	Carbobenzoxy-
CLEC	Quervernetzter Enzymkristall (<i>cross-linked enzyme crystal</i>)
CSPD	Disodium-3-(4-methoxysprio{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo(3.3.1.1 ^{3.7})decan}-4-yl)phenyl phosphate
CTR	Kohlendioxidtransferrate
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
D-AAO	D-Aminosäureoxidase
D-AAT	D-Aminosäuretransaminase
D-Hyd	D-Hydantoinase
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
FDH	Formiat-Dehydrogenase
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GluRA	Glutamatracemase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
kb	Kilobasen
Kpi	Kaliumphosphat
L-AAO	L-Aminosäureoxidase
LB	Luria-Bertani
MALDI/TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorptions/ionisations-time of flight mass spectrometry</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
N-Car	N-Carbamyolase
OPA	o-Phthaldialdehyd
OTR	Sauerstofftransferrate
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pl	Isoelektrischer Punkt

POX	Peroxidase
rep	repetitive
RQ	Respiratorischer Quotient
SDS	Natriumdodecylsulfat
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAT	<i>twin-arginine translocation</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
YEME	Hefeextrakt-Malzextrakt (<i>yeast extract-malt extract</i>)
ZFM	Zellfeuchtmasse
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartat

I Einleitung

1 Enzyme in der Biotechnologie

Enzyme sind Biokatalysatoren, die für sämtliche Stoffwechselwege in allen Lebewesen verantwortlich sind. Durch Absenkung der Aktivierungsenergie der biochemischen Reaktionen beschleunigen sie deren Geschwindigkeit. Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren sind Enzyme hochspezifisch bezüglich der Reaktion und der Substrate. Meist laufen die Reaktionen mit nahezu vollständiger Regio- und Stereospezifität ab. Die milden Bedingungen, die für enzymatische Umsetzungen im Gegensatz zu vielen chemisch katalysierten Reaktionen ausreichend sind, steigern die Umweltverträglichkeit dieser Prozesse.

Traditionelle Anwendungsgebiete für Enzyme liegen in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie. Einsatz finden hauptsächlich Hydrolasen, beispielsweise in der Herstellung von Invertzucker aus Saccharose durch Invertase oder bei der Bearbeitung von Fruchtsäften durch pektinolytische Enzyme. Doch auch die Nutzung von Enzymen in der Synthese von Feinchemikalien, Pharmazeutika und Lebensmittelzusätzen gewann in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Beschleunigt wurde diese Entwicklung durch die Etablierung der DNA-Rekombinationstechnik. Der Einsatz dieser Verfahren ermöglicht die rekombinante Herstellung vieler Enzyme und senkt somit die Produktionskosten drastisch. Außerdem werden Forscher in die Lage versetzt, Enzyme nach ihren Vorstellungen zu verändern, so dass die Stabilität oder Spezifität verbessert werden kann.

2 Enzymatische Wege zur Darstellung von D-Aminosäuren

Aminosäuren sind wichtige Grundstoffe in der chemischen Industrie und bei der Lebens- und Futtermittelherstellung. Die chemische Synthese optisch reiner Aminosäuren ist nur begrenzt möglich. Viele der proteinogenen L-Aminosäuren werden nach Optimierung der mikrobiellen Produktionsstämme und der Anzuchtbedingungen fermentativ hergestellt [1,2]. D-Aminosäuren lassen sich nicht auf diese Weise produzieren.

Das Interesse an D-Aminosäuren ist jedoch hoch, da sie als Bausteine für halbsynthetische Antibiotika, Peptidhormone und Pestizide verwendet werden. Beispielsweise wird D-Phenylglycin als Seitenkette in den β -Lactamantibiotika Ampicillin und Amoxicillin eingebaut, D-Valin ist Bestandteil des Insektizids Fluvalinate. Weitere D-Aminosäuren sind in den Peptidhormonen Gonadorelin, Leuprorelin und Buserelin enthalten, die bei Hypophysen- oder gonadalen Dysfunktionen verabreicht werden [3].

Aufgrund der oft hohen Anforderungen bezüglich der Enantiomerenreinheit sind enzymatische Prozesse zur Darstellung von D-Aminosäuren besonders geeignet. Durch die Vielfalt an verfügbaren Biokatalysatoren und deren Kombinationsmöglichkeiten sind

bisher schon unterschiedlichste Methoden zur enzymatischen Produktion von D-Aminosäuren entwickelt worden. Allerdings muss die technische Anwendbarkeit gerade bei Multienzysystemen gründlich überprüft werden, da hier die Optimierung der Reaktionsbedingungen von sehr vielen Parametern abhängig ist und die Kosten für die Enzympräparation oft hoch sind. Im Folgenden sind einige Beispiele zur enzymatischen Synthese von D-Aminosäuren aufgeführt.

- Eine Möglichkeit zur Darstellung von D-Aminosäuren ist die Anwendung eines Multi-Enzym-Prozesses bestehend aus einer D-Hydantoinase, einer *N*-Carbamoylase und einer Hydantoinracemase [4-7]. Als Substrat wird dazu racemisches, 5'-monosubstituiertes Hydantoin eingesetzt. Die D-Hydantoinase setzt D-Hydantoin zur entsprechenden *N*-Carbamoyl-D-aminosäure um. Die Racemisierung des Hydantoins läuft bei pH-Werten über 8 spontan ab, kann aber durch Einsatz der Hydantoinracemase beschleunigt werden. Die Decarbamoylierung kann sowohl chemisch [8] als auch enzymkatalysiert [9] durchgeführt werden (Abb. 1). Mit diesem Verfahren ist es möglich, ein racemisches Hydantoinderivat komplett in die entsprechende D-Aminosäure umzusetzen.

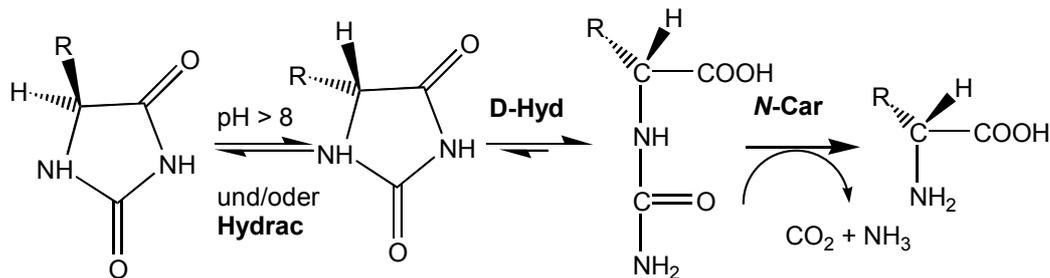


Abb. 1: Darstellung von D-Aminosäuren aus 5'-monosubstituiertem Hydantoin durch eine D-Hydantoinase (D-Hyd) und eine *N*-Carbamoylase (*N*-Car). Der Einsatz von Hydantoinracemasen (Hydrac) ist optional.

- Galkin et al. klonierten die Gene der D-Alanin-Dehydrogenase, der D-Aminosäuretransferase, der Alaninracemase und der Formiat-Dehydrogenase in einen *E. coli*-Stamm [10]. Ausgehend von der Ketosäure konnten mit diesen Zellen dann die entsprechenden D-Aminosäuren enantiomerenrein hergestellt werden. Nach dem gleichen Prinzip produzierten Bae et al. mit einem Multienzysystem aromatische D-Aminosäuren (Abb. 2), jedoch präparierten sie die Enzyme getrennt voneinander und mischten sie erst in der Reaktionslösung. Dieses Verfahren macht den externen Zusatz von NADH notwendig [11].

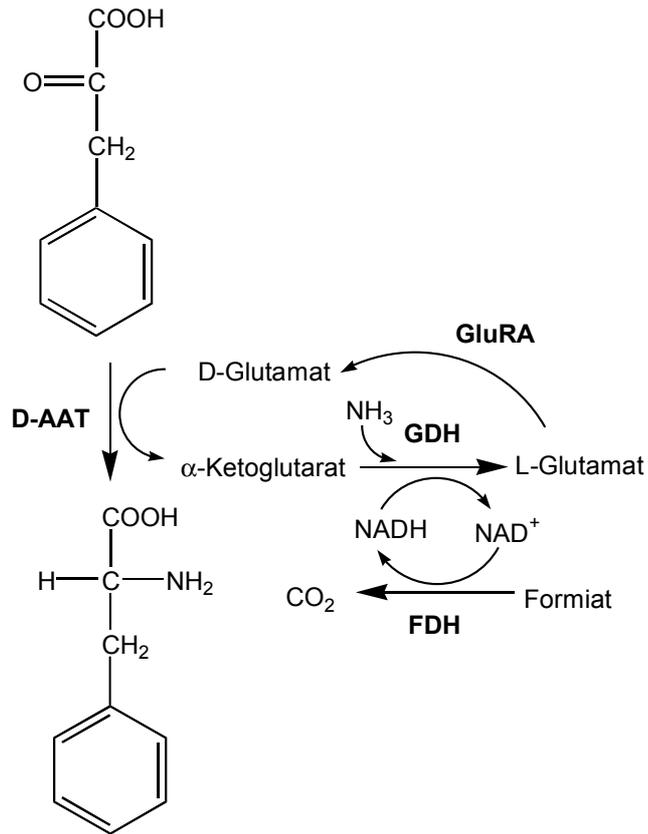


Abb. 2: Darstellung von aromatischen D-Aminosäuren durch ein Multienzymsystem bestehend aus D-Aminosäuretransaminase (D-AAT), Glutamat-Dehydrogenase (GDH), Glutamatracemase (GluRA) und Formiat-Dehydrogenase (FDH).

- Der Einsatz von L- und D-Aminopeptidasen ermöglicht die Darstellung von D- und L-Aminosäuren aus DL-Aminosäureamiden [3]. Die im ersten Reaktionsschritt entstehende L-Aminosäure kann chemisch durch Zugabe von Methanol und Schwefelsäure abgetrennt werden. In diesem Beispiel stammt die L-Aminosäurepeptidase aus *Pseudomonase putida* und *Rhodococcus erythropolis*-Zellen stellen die Quelle für die D-Aminopeptidase dar (Abb. 3).

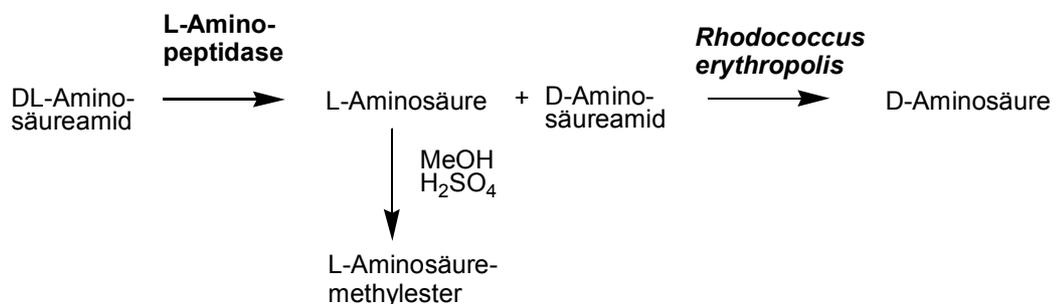


Abb. 3: Darstellung von L- und D-Aminosäuren durch Aminopeptidasen.

- D-Aminoacylasen katalysieren die stereospezifische Deacylierung von *N*-Acetyl-D-aminosäuren [12,13]. In Kombination mit *N*-Acylaminosäureracemasen [14] lassen sich *N*-Acetyl-DL-aminosäuren vollständig in die gewünschte D-Aminosäure umsetzen (Abb. 4).

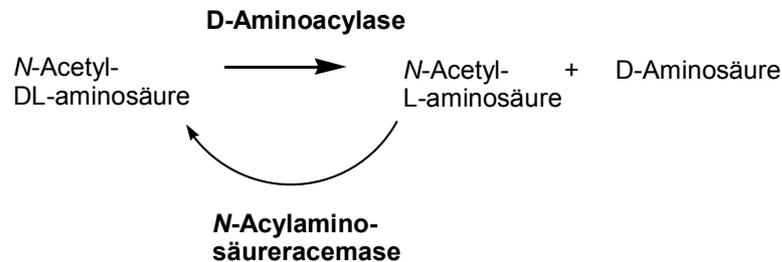


Abb. 4: Darstellung von D-Aminosäuren aus *N*-Acetyl-DL-aminosäuren durch die D-Aminoacylase und *N*-Acylaminosäureracemase.

- Verschiedene *Proteus*-Arten wurden zur Racematspaltung von DL-Aminosäuren eingesetzt und lieferten als Produkt enantiomerenreine D-Aminosäure [15,16]. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym ist eine membranständige D-Aminosäuredeaminase (Abb. 5).

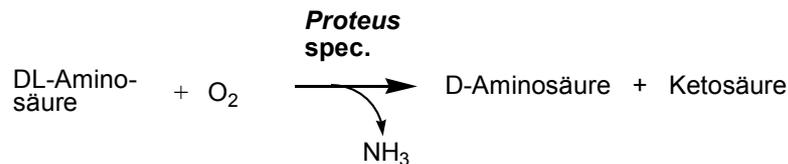


Abb. 5: Racemattrennung von DL-Aminosäuren durch L-Aminosäuredeaminasen aus verschiedenen *Proteus*-Arten.

- Eine direkte reduktive Aminierung von Ketosäuren zu D-Aminosäuren wäre durch D-Aminosäure-Dehydrogenasen vorstellbar, aber bisher sind keine Enzyme bekannt, die diese Reaktion katalysieren.

3 Screening nach neuen Biokatalysatoren

Bodenproben bieten eine fast unbegrenzte Quelle für die Isolation neuer Biokatalysatoren. In einem Gramm Erde sind 100.000.000 Mikroorganismen enthalten, die einer hohen Anzahl verschiedener Arten angehören [17]. Diese Organismen sind in der Lage, eine sehr große Vielfalt an mehr oder weniger komplexen organischen Materialien abzubauen.

Verschiedene Verfahren werden bei der Suche nach neuen Enzymen angewandt, um das Spektrum industriell nutzbarer Biokatalysatoren zu erweitern. Die klassische Screeningvariante besteht in der Entwicklung eines geeigneten, möglichst empfindlichen Testsystems, das in der Lage ist, das gesuchte Enzym zu identifizieren. Dazu

werden Bodenisolate oder Sammlungsstämmen in einem zur Induktion des gewünschten Biokatalysators geeigneten Medium kultiviert und anschließend mit Hilfe des Testsystems untersucht [18]. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass das Zielprotein bei einem positiven Ergebnis direkt verfügbar ist und dass Informationen über den Enzymproduzenten gewonnen werden können. Jedoch können Störreaktionen oder nicht-optimale Wachstumsbedingungen dazu führen, dass potentielle Enzymbildner übersehen werden. Um diese Nachteile auszuschließen, bietet sich ein genetisches Screening über PCR und Southern Hybridisierung an [14,19]. Die Ziel-DNA kann alternativ aus Sammlungsstämmen oder direkt aus Bodenproben gereinigt werden. Diese Methode erlaubt die unmittelbare Isolierung des gewünschten Gens. Aber auch hier gibt es Einschränkungen, da über ein Screening mit einer DNA-Sonde oder über PCR oft nur relativ nah verwandte Enzyme detektiert werden. Zusätzlich sind die Arbeitsschritte meist aufwendiger als beim direkten Enzymnachweis im Wildtyp. Proteine, die sich (noch) nicht heterolog exprimieren lassen, werden mit diesem Verfahren nicht zugänglich gemacht. Bei einem erfolgreichen Screening ist die direkte Verfügbarkeit des gewünschten Gens in rekombinanter Form jedoch ein erheblicher Vorteil dieser Strategie.

Eine weitere Methode ist das immunologische Screening mittels polyklonaler Antikörper [20]. Auch für dieses Verfahren ist die Expression des gewünschten Enzyms im Wildtyp notwendig, aber durch die Detektion im Western Blot können Störaktivitäten ausgeschlossen und die Nachweisgrenze herabgesetzt werden.

4 L-Aminosäureoxidasen (L-AAO)

L-AAOs (EC 1.4.3.2) katalysieren die oxidative Desaminierung von L-Aminosäuren zu Ketosäuren unter Freisetzung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid (Abb. 6). Sowohl der erste Reaktionsschritt, die Oxidation der L-Aminosäure zur Iminosäure, als auch die Hydrolyse der Imino- zur Ketosäure werden durch die L-AAO katalysiert [21]. Der Cofaktor FAD wird durch molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid regeneriert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt vollständig auf der Seite der Ketosäure.

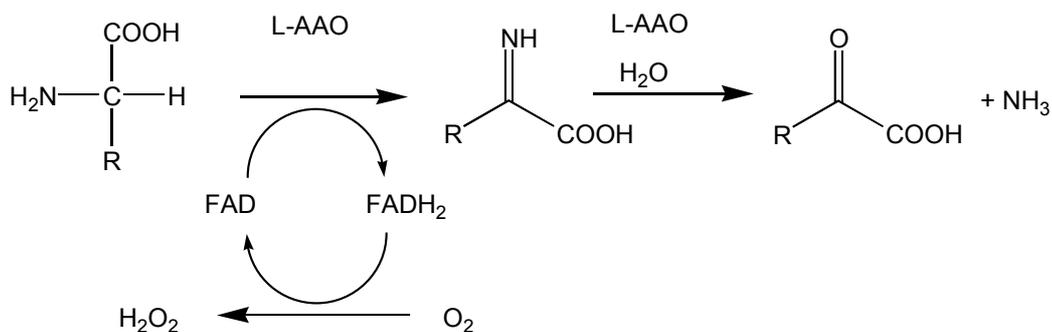


Abb. 6: Reaktionsschema der L-AAO.

4.1 Vorkommen der L-AAOs

L-AAOs sind in der Natur weit verbreitet. Die ersten L-AAOs wurden in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts von Zeller beschrieben und stammten aus Schlangengift [22]. Bis heute sind die L-AAOs aus Schlangengift die am Besten untersuchten Vertreter dieser Enzymklasse [23-28]. Weitere Quellen für L-AAOs sind Schimmelpilze [29,30], Algen [31], Bakterien [32-34], Miesmuscheln [35], Truthahnleber [36], Organextrakte nematodeninfizierter Makrelen [37], verschiedene Insektengifte [38], Mäusemilch [39] und Mäusehirn [40]. Die meisten der hier aufgeführten L-AAOs akzeptieren eine Vielzahl an L-Aminosäuren als Substrate. Einige L-AAOs werden aufgrund ihres eingeschränkten Substratspektrums unter einem Namen geführt, der ihre Funktion genauer spezifiziert. Beispielsweise bilden verschiedene *Streptomyces*-Arten L-Glutamat-oxidasen, die fast ausschließlich Glutamat als Substrat akzeptieren [41-43]. Die L-Phenylalaninoxidase aus *Pseudomonas spec.* oxidiert neben L-Phenylalanin nur noch L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Methionin mit deutlich geringeren Aktivitäten [44].

Eine Sonderstellung nehmen die L-AAOs aus der Familie der Enterobacteriaceae ein, denn sie sind membranständig und bilden bei der Regenerierung des FADs Wasser anstelle von Wasserstoffperoxid [16]. Die Nomenklatur ist in der Literatur nicht eindeutig, oft werden diese Enzyme auch als L-Aminosäure-desaminasen bezeichnet. Dieser Name wird zur besseren Unterscheidung in dieser Arbeit beibehalten. Gebildet werden die L-Aminosäure-desaminasen von *Proteus*-, *Providencia*- und *Morganella*-Arten [45-47].

4.2 Physiologische Funktion der L-AAOs

Die physiologische Funktion bakterieller L-AAOs ist noch ungeklärt. Die L-AAO aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* wird bei Mangel an frei verfügbarem Stickstoff in Anwesenheit bestimmter L-Aminosäuren wie L-Arginin oder L-Phenylalanin induziert [48]. Durch eine Kohlenstofflimitierung wird die Bildung dieser L-AAO verhindert [49]. Die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* induziert ebenfalls eine L-AAO, wenn L-Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle im Medium vorhanden sind. Das bei der Oxidation der L-Aminosäuren entstehende Ammonium wird von den Zellen aufgenommen, während die Ketoverbindungen im Überstand verbleiben [50]. Die Zugabe von Ammonium reprimiert die Bildung dieses Enzyms. Vermutlich spielen diese induzierbaren L-AAOs bei der Stickstoffversorgung der Zellen eine Rolle.

Die von den membrangebundenen L-Aminosäure-desaminasen produzierten Keto-säuren dienen möglicherweise als Siderophore [46,51]. Da die Gattungen *Proteus*, *Providencia* und *Morganella* keine klassischen Siderophore wie Enterobactine oder Ferrichrome aufnehmen, könnten diese Enzyme eine Aufgabe in der Regulierung des Eisenhaushaltes übernehmen.

Der Erforschung der physiologischen Funktion der L-AAOs aus Schlangengift gilt besondere Aufmerksamkeit. Eine viel diskutierte Frage ist, ob und in welchem Maße

dieses Enzym zur toxischen Wirkung von Schlangengift beiträgt. Eine große Anzahl verschiedener L-AAOs wurde bisher zur Klärung dieses Problems untersucht und die Ergebnisse deuten eindeutig darauf hin, dass diese Enzyme an der Toxizität von Schlangengift beteiligt sind. Die Effekte, die durch L-AAOs ausgelöst werden, sind Apoptose [23,24,52], Ödeme [53], Hämolyse [54] und Störungen der Thrombozytenaggregation [55]. Strittig ist jedoch, ob diese Reaktionen durch das von der L-AAO gebildete H_2O_2 hervorgerufen werden oder ob weitere Faktoren eine Rolle spielen. In einem Großteil der Untersuchungen wird berichtet, dass die toxische Wirkung der L-AAO durch Katalasezugabe komplett unterdrückt wird [24,56]. Suhr und Kim hingegen schildern, dass eine Bindung der L-AAO an der Zelloberfläche stattfand und auf diesem Wege die H_2O_2 -Konzentration lokal so sehr anstieg, dass auch Katalasezusatz die Wirkung nicht komplett unterdrücken konnte [52].

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen zur physiologischen Funktion der L-AAO aus Makrele. Dieses Enzym wird nach einer Infektion des Fisches durch Nematoden exprimiert und induziert durch zwei verschiedene Mechanismen ebenfalls Apoptose in einer Vielzahl verschiedener Zellkulturen [37,57]. Der sogenannte schnelle Mechanismus wird durch die direkte Bildung von H_2O_2 ausgelöst, der verzögerte durch die Oxidation von L-Lysin aus der Umgebung. Beide Apoptose-induzierenden Aktivitäten sorgen für das Herauslösen des Cytochrom C aus den Mitochondrien und aktivieren anschließend die Caspase-Kaskade.

Die L-AAOs aus Insektengift haben ebenfalls eine toxische Wirkung. Jedoch ist nicht immer ein klarer Zusammenhang zwischen Cytotoxizität und L-AAO-Aktivität der verschiedenen Gifte herzustellen [38].

Zusammenfassend wird deutlich, dass die L-AAOs in den verschiedenen Organismen sehr unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Während die mikrobiellen L-AAOs vermutlich eine Rolle im Stickstoffhaushalt und im L-Aminosäurekatabolismus spielen, dienen die tierischen L-AAOs offensichtlich der Abwehr von Feinden und Parasiten oder der Beschaffung von Beute.

4.3 Biotechnologische Anwendung der L-AAOs

L-AAOs fanden bisher kaum Anwendung in der Darstellung von D-Aminosäuren oder Ketosäuren. Die L-Aminosäuredesaminase aus *Providencia alcalifaciens* wurde bei der Synthese von Carbobenzoxy(CBZ)-L-oxylisin aus $N\epsilon$ -CBZ-L-Lysin eingesetzt [58]. Weitere L-Aminosäuredesaminasen wurden zur Racemattrennung von DL-Aminosäuren verwendet [15,16]. L-AAOs sind gut für den Einsatz in der Biosensorik geeignet und finden Anwendung im Aminosäurenachweis in Lebensmitteln [59,60] und in der Proteinbestimmung [61]. In diesem Zusammenhang wurden auch erste Untersuchungen zur Immobilisierung der L-AAO durchgeführt [62].

4.4 Klonierung und Expression der L-AAOs

Für die technische Anwendung von Enzymen muss ein Herstellungsverfahren entwickelt werden, das die kostengünstige Produktion des Biokatalysators ermöglicht. Durch heterologe Expression kann diese Aufgabe im Allgemeinen gelöst werden. Trotz der Veröffentlichung mehrerer neuer *laao*-Gene in den letzten Jahren [63-65] wurden kürzlich erst drei dieser L-AAOs aktiv in Zellkultur exprimiert [39,57,66], mikrobielle Expressionssysteme wurden bisher noch nicht beschrieben. Da die eukaryotischen L-AAOs prozessiert und glycosyliert vorliegen [53,56,67], ist die funktionelle Expression dieser Enzyme in Bakterien sehr unwahrscheinlich. Die membranständigen L-Aminosäuredesaminasen aus *Proteus* ließen sich jedoch erfolgreich in *E. coli* exprimieren [16,46,68].

5 D-Aminosäureoxidasen (D-AAO)

D-AAOs (EC 1.4.3.3) oxidieren D-Aminosäuren enantioselektiv zu den entsprechenden Iminosäuren (Abb. 7). Im Unterschied zur Reaktion der L-AAO läuft die Hydrolyse der Iminosäure zur Ketosäure und zu Ammoniak spontan ab [21]. Die Regeneration der Cofaktors FAD erfolgt durch molekularen Sauerstoff unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid.

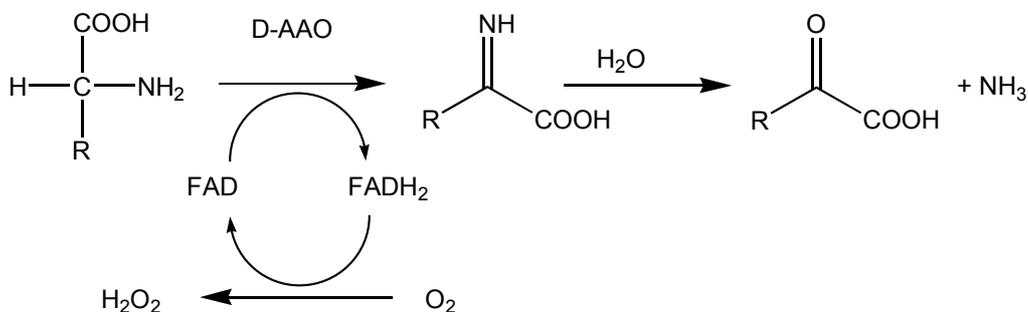


Abb. 7: Reaktionsschema der D-AAO.

5.1 Vorkommen der D-AAOs

D-AAO-Aktivität wurde erstmals 1935 in Säugetiergewebe detektiert [69]. In den folgenden Jahrzehnten wurden D-AAOs aus Fischen, Vögeln, Reptilien und verschiedenen Säugetiergeweben nachgewiesen [70-73]. Mikrobielle D-AAOs sind bisher nur aus Eukaryoten charakterisiert worden. So gehören die Hefen *Rhodotorula gracilis* [74], *Trigonopsis variabilis* [75] und mehrere *Candida*-Arten [76] und die Schimmelpilze *Neurospora crassa* [49], *Verticillium luteoalbo* und verschiedene *Fusarium*-Arten [76,77] zu den D-AAO-Produzenten. Als eine Sondergruppe können die

D-Aspartat- und D-Glutamatoxidasen bezeichnet werden, da diese Enzyme ausschließlich saure D-Aminosäuren und deren Derivate oxidieren [78,79].

Bei der Sequenzierung verschiedener bakterieller Genome wurden Bereiche identifiziert, die Homologien zu eukaryotischen D-AAOs aufweisen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch bakterielle D-AAOs existieren, jedoch wurde noch keines dieser Enzyme charakterisiert.

5.2 Physiologische Funktion der D-AAOs

D-Aminosäuren wurden bisher in Bakterien, marinen Evertebraten, Pflanzen und in Säugern nachgewiesen [80]. Der Ursprung, die Funktion und die Verwertbarkeit dieser Substanzen in den unterschiedlichen Organismen ist noch nicht komplett geklärt.

Ein Großteil der in Säugern gemessenen D-Aminosäuren wird wahrscheinlich mit der Nahrung aufgenommen [80]. Zwei unterschiedliche Wege des D-Aminosäureabbaus sind vorstellbar [81]: D-Aminosäuren können über Racemasen oder Epimerasen in die L-Form überführt werden oder sie werden durch D-AAOs oxidativ desaminiert.

Die meisten der bisher durchgeführten Untersuchungen weisen auf einen Abbau der D-Aminosäuren durch D-AAOs hin. D'Aniello et al. zeigten, dass D-Aminosäuren in der Leber und Niere von Säugern durch D-AAOs metabolisiert werden [82]. In Mäusen und Ratten wurde in Abhängigkeit vom Alter ein reziprokes Verhältnis zwischen der D-Aminosäure- und der D-AAO-Konzentration festgestellt. So enthalten Leber und Niere junger Tiere eine hohe Konzentration an D-Aminosäuren und geringe Mengen an D-AAO, während dieses Verhältnis bei erwachsenen Tieren genau umgekehrt ist.

Auffälligerweise werden die Aminosäuren D-Lysin und D-Threonin von Hühnern, Mäusen, Ratten und Menschen nicht verwertet, während D-Methionin in vielen Tieren das Wachstum deutlich fördert [80]. Diese Effekte können ebenfalls auf die D-AAO zurückgeführt werden, da D-Lysin und D-Threonin von diesem Enzym nicht oxidiert werden, D-Methionin jedoch ein sehr gutes Substrat ist [76].

Die einzige Aminosäureracemase, die bisher in Säugern nachgewiesen wurde, akzeptiert so gut wie ausschließlich Serin als Substrat und wurde aus Rattenhirn isoliert [83]. Dieses Enzym kontrolliert im Zusammenspiel mit der D-AAO die D-Serinkonzentration im Gehirn von Ratten [84,85]. D-Serin aktiviert Glutamat/NMDA-Rezeptoren indem es mit der Glycin-Bindungsstelle interagiert und trägt somit zur Signalübertragung im Gehirn bei [83].

Obwohl schon einige Untersuchungen zur Induktion mikrobieller D-AAOs veröffentlicht wurden, bleibt deren physiologische Funktion weiterhin ungeklärt [86-90].

5.3 Biotechnologische Anwendung der D-AAOs

Das wichtigste Anwendungsgebiet der D-AAOs ist die Synthese von 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA), einer Ausgangssubstanz für halbsynthetische β -Lactamantibiotika [91,92]. Bei diesem Zwei-Stufen-Prozess wird die Aminogruppe der D-Aminoadipylseitenkette des Cephalosporin C durch die D-AAO oxidiert und es entsteht Ketoadipyl-7-aminocephalosporansäure (Abb. 8). Diese Substanz wird durch H_2O_2 spontan zu Glutaryl-7-aminocephalosporansäure decarboxyliert, welches durch die Glutaryl-7-ACA-acylase zu 7-ACA umgesetzt wird.

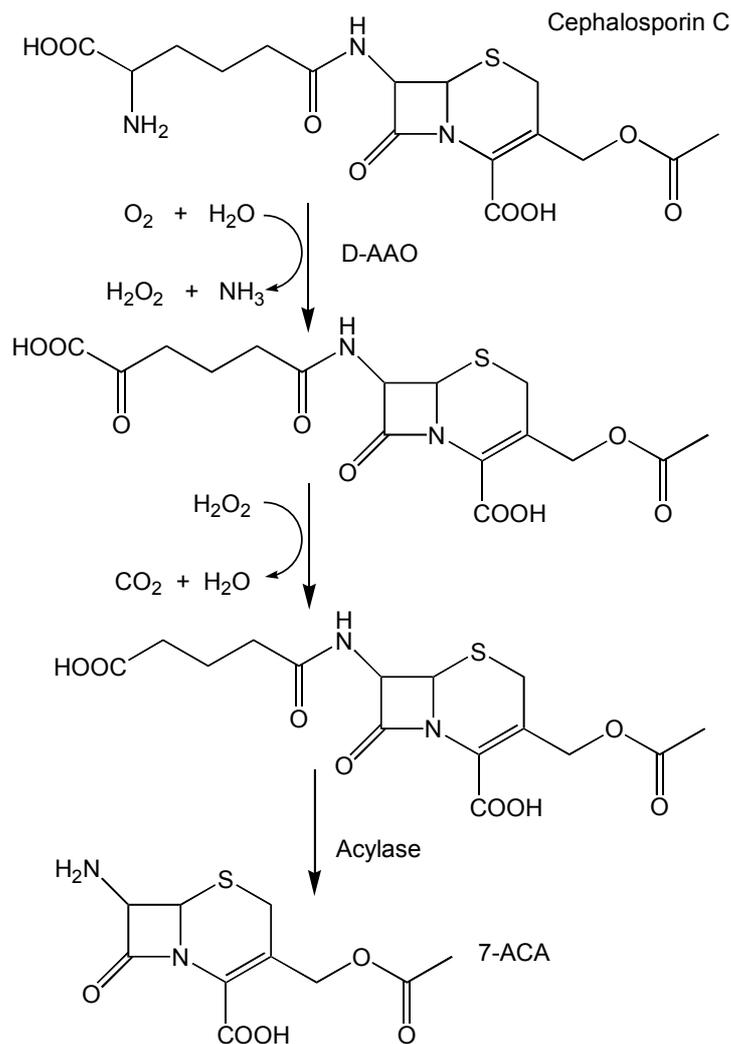


Abb. 8: Enzymatische Umsetzung von Cephalosporin C zu 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA).

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für die D-AAO ist die Darstellung von L-6-Hydroxynorleucin, einem Intermediat für das blutdrucksenkende Mittel Omapatrilat, aus dem entsprechenden Racemat [93,94].

In Kombination mit den chemischen Reduktionsmitteln NaCNBH_3 und NaBH_4 wurde die D-AAO aus Schweineniere erfolgreich zur Deracemisierung und zur Stereo inversion von Aminosäuren eingesetzt [95].

Es existieren mittlerweile mehrere Studien zur Immobilisierung von D-AAOs. Hauptziele dieser Untersuchungen sind die Erhöhung der Stabilität im Prozess und die Verbesserung der Trennbarkeit von Produkt und Katalysator. Die D-AAOs aus *Rhodotorula gracilis* und aus *Trigonopsis variabilis* wurden unter verschiedenen Bedingungen und mit unterschiedlichen Anwendungszielen immobilisiert. Durch die Auswahl geeigneter Immobilisierungsbedingungen wird die Stabilität der D-AAOs aus diesen beiden Organismen gegenüber H_2O_2 gesteigert [96]. Diese Verbesserung der Oxidationsstabilität ist besonders bei der Desaminierung von Cephalosporin C nützlich, da das entstehende H_2O_2 für die Decarboxylierung der Keto adipyl-7-aminocephalosporansäure notwendig ist und somit keine Katalase zugesetzt werden darf (Abb. 8) [97].

Bei der Herstellung von Ketosäuren aus D-Aminosäuren durch D-AAOs wird ein genau entgegengesetztes Ziel verfolgt. Das Reaktionsprodukt muss vor dem entstehenden H_2O_2 geschützt werden, um eine Decarboxylierung zu verhindern. Die Coimmobilisierung von Katalase verhindert gleichzeitig die Oxidation der D-AAO und die Decarboxylierung der Ketosäure durch H_2O_2 [98,99]. Die Immobilisierung ganzer Zellen wurde ebenfalls untersucht und zeigte, dass auf diese Weise der Arbeitsaufwand bei der Enzympräparation gesenkt werden kann und die Zellen in mehreren Reaktionszyklen einsetzbar sind [100,101].

D-AAOs werden, oft in Kombination mit L-AAOs, auch als Signalgeber in Biosensoren genutzt [62,102].

5.4 Klonierung und Expression der D-AAOs

Die Sequenzen verschiedener D-AAOs sind bekannt und die heterologe Expression wurde in den letzten Jahren für die Enzyme aus Schweineniere [103], *Trigonopsis variabilis* [104-106], *Rhodotorula gracilis* [107,108] und *Fusarium solani* [77] beschrieben. Auf diesem Wege wurde die Produktion der D-AAO deutlich vereinfacht. Durch die Expression der *Trigonopsis variabilis* D-AAO in *E. coli* kann die spezifische Aktivität im Rohextrakt um den Faktor 23 gesteigert werden [104], die rekombinante D-AAO aus *Fusarium solani* macht bis zu 8% der löslichen *E. coli*-Proteine aus [77]. Modifikationen, wie das Einfügen eines His-Tags, wurden erfolgreich für die *Rhodotorula gracilis* D-AAO durchgeführt und erlauben eine einstufige Reinigung mit sehr guten Ausbeuten [108]. Weiterhin ermöglicht die Existenz funktioneller Expressionssysteme Mutationsstudien. So wurde beispielsweise die Oxidationsstabilität der *Trigonopsis variabilis* D-AAO über Austausch von Methionin-Resten gegen Leucin-Reste verbessert [109]. Die Rolle einiger konservierter Aminosäurereste der

Trigonopsis variabilis und der *Rhodotorula gracilis* D-AAOs konnte ebenfalls über gezielte Mutagenese geklärt werden [110-112].

6 Proteinchemische Eigenschaften der AAOs

Eine Zusammenfassung der proteinchemischen Charakteristika einiger AAOs ist in Tab. 1 dargestellt. L-AAOs und D-AAOs sind in der Regel Homodimere und enthalten je ein FAD pro Untereinheit. Während die Molekulargewichte der D-AAO-Monomere zwischen 37 und 40 kDa liegen, sind die L-AAO-Untereinheiten mit 50-66 kDa wesentlich größer.

Tab. 1: Proteinchemische Daten einiger AAOs.

	Organismus	Größe	pI	Posttransl. Prozessierung	Konservierte Sequenzbereiche	Lit.
L-AAO	<i>Synechococcus spec.</i>	2 x 49 kDa		N-terminal	GxGxxG RxGGR	[113]
	<i>Neurospora crassa</i>	? x 64 kDa		N-terminal	GxGxxG RxGGR	[64]
	<i>Crotalus atrox</i>	2 x 55 kDa	6,0- 6,5	N-terminal, glycosyliert	GxGxxG RxGGR	[24]
	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	2 x 66 kDa	4,4	N-terminal, glycosyliert	GxGxxG RxGGR	[25]
	<i>Ophiophagus hannah</i>	2 x 65 kDa	4,5	N-terminal, glycosyliert	GxGxxG RxGGR	[53,114]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8 x 60 k Da		N-terminal	GxGxxG RxGGR	[31]
	<i>Scomber japonicus</i>	2 x 62/64 kDa		N-terminal	GxGxxG RxGGR	[37]
	<i>Mus musculus</i>	2 x 60 kDa		N-terminal	GxGxxG RxGGR	[39]
D-AAO	<i>Rhodotorula gracilis</i>	2 x 40 kDa	7,2		I-VI *	[115]
	<i>Trigonopsis variabilis</i>	2 x 38 kDa	5,1		I-V *	[115]
	<i>Fusarium solani</i>	2 x 40 kDa			I-VI *	[77,115]
	Schweineniere	2 x 37 kDa	7,0+ 7,2		I-VI *	[115]

* I: Consensus Sequenz GxGxxG; III: Coenzymbindung; II, IV, V: aktives Zentrum;
VI: Typ 1 Peroxisomal targeting signal [115]

In beiden Enzymgruppen findet sich N-terminal die Consensus-Sequenz GxGxxG, die zur Coenzymbindung beiträgt. Für D-AAOs wurden darüber hinaus 5 weitere konservierte Sequenzbereiche definiert, die für Coenzym- und Substratbindung verantwortlich sind und die das Enzym zu den Peroxisomen steuern [115]. Die L-AAOs enthalten neben der oben erwähnten Consensus-Sequenz noch ein zweites hochkonserviertes Motiv, das zur FAD-Bindung beiträgt (RxGGR) [116]. Die Glycosylierungen an vielen eukaryotischen L-AAOs und die Signalsequenzen unterscheiden diese Enzyme außerdem von den D-AAOs.

7 Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der AAOs

Die Aufklärung der Kristallstrukturen der D-AAO aus Schweineleiere [117,118], der D-AAO aus *Rhodotorula gracilis* [119] und der L-AAO aus *Calloselasma rhodostoma* [21] erbrachte viele wertvolle Hinweise zum Reaktionsmechanismus der Aminosäureoxidasen.

Im Jahre 1996 wurde die Struktur der D-AAO aus Schweineleiere von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen veröffentlicht und mögliche Reaktionsmechanismen wurden postuliert. Miura et al. schlugen einen Elektron-Proton-Elektron Mechanismus vor, bei dem zwei Elektronen der Aminogruppe und das α -Proton nacheinander auf das Flavin übertragen werden [120]. Mattevi et al. hingegen schlossen aufgrund der Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum auf einen Hydridtransfer (Abb. 9) [121]. Beide Gruppen widerlegten den sogenannten Carbanionmechanismus, der über viele Jahre favorisiert wurde [122], da in keiner der beiden Strukturen eine Base im aktiven Zentrum gefunden wurde, die die Abstraktion des α -Protons ermöglichen kann.

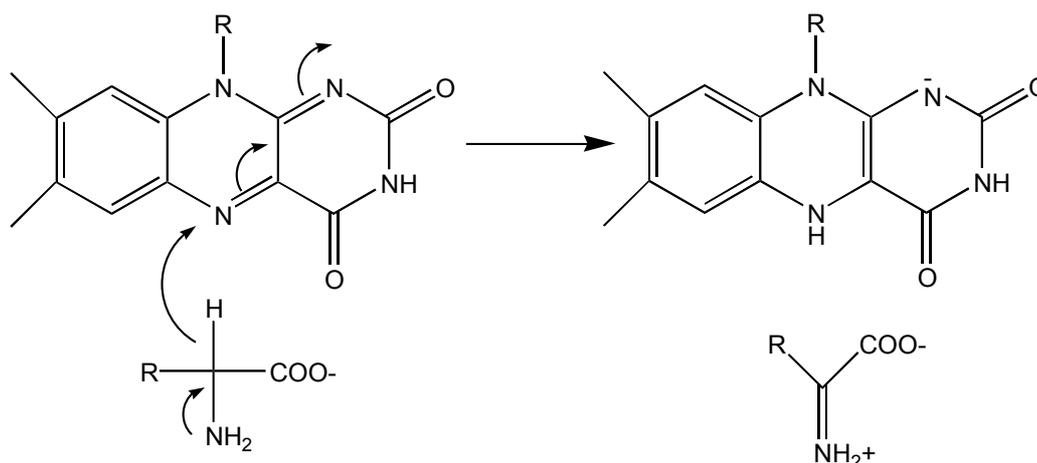


Abb. 9: Hydridtransfer vom α -H-Atom des Substrats auf das N5-Atom des Flavins. Die Aminosäure ist in der anionischen Form gezeichnet, vom FAD ist nur der Isoalloxazinring dargestellt.

Die Struktur der D-AAO aus *Rhodotorula gracilis* wurde mit einer sehr hohen Auflösung von bis zu 1,2 Å bestimmt [119]. Auch Umhau et al. kamen zu der Schlussfolgerung,

dass der Reaktionsmechanismus nach dem Prinzip des Hydridtransfers abläuft. Als Besonderheit dieses Mechanismus wird hervorgehoben, dass die funktionellen Gruppen der proteineigenen Aminosäuren nicht an der Katalyse beteiligt sind, sondern nur zur Substraterkennung und –bindung beitragen.

Die Röntgenstruktur der L-AAO aus *Calloselasma rhodostoma* wurde im Jahre 2000 veröffentlicht [21]. Aufgrund der räumlichen Anordnung des Inhibitors Aminobenzoat im aktiven Zentrum wurde auch für die L-AAO der Mechanismus des Hydridtransfers angenommen. Die basische Aminosäure His223 unterstützt eventuell die Bindung des Substrats als Zwitterion. Die Base könnte ein Proton von der geladenen Aminogruppe abstrahieren und so den Hydridtransfer erst ermöglichen. Alternativ dazu wurde überlegt, dass die Substrate nur in der anionischen Form gebunden und umgesetzt werden können.

8 Problemstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Suche nach neuen mikrobiellen L-AAOs, die alternative Wege zur Synthese von D-Aminosäuren ermöglichen sollten. Nach einem Screening von Bodenisolaten und Sammlungsstämmen sollte ein geeignetes Enzym ausgewählt, bis zur Homogenität gereinigt und umfassend biochemisch und proteinchemisch charakterisiert werden. Die Klonierung und Sequenzierung des *laao*-Gens sollte die Grundlage für die heterologe Expression des Enzyms in einem bakteriellen System schaffen. Diese Technik bietet außerdem die Möglichkeit, Mutationen in das Protein einzuführen, die die Proteineigenschaften verändern, oder die helfen, den Mechanismus aufzuklären.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Universität Köln sollte die Kristallisation und die Röntgenstrukturaufklärung der L-AAO durchgeführt werden. Für die Untersuchung der L-AAO in der Racematspaltung von Aminosäuren sollten verschiedene Enzympräparationen und Verfahrensweisen getestet werden. Ganze Zellen, freies oder auf unterschiedliche Weise immobilisiertes Enzym sollten in batch, repetitive-batch, fed-batch oder kontinuierlichen Versuchen eingesetzt werden.

Als Nebenaspekt sollte die bakterielle D-AAO, die beim Screening nach L-AAOs entdeckt wurde, aufgereinigt und partiell charakterisiert werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Analytik

Spektralphotometer UV-VIS 160A & UV-1602

Shimadzu

SpektraMaxPlus

Molecular Devices

HPLC (Gina 50, M 480, UVD 170S, DG 1310)

Gynkotek

AminoQuant 1090AX

Hewlett Packard

Protein-Sequencer 477A

Applied Biosystems

Online HPLC 120A

Hewlett Packard

Biflex III MALDI/TOF-MS

Bruker

Chromatographie

Biocad-Sprint Perfusion Chromatography System

Applied Biosystems

FPLC

Amersham-Pharmacia Biotech

Disintegration

Schwingkugelmühle MM2

Retsch

Sonoplus HD60

Bandelin Electronic

SCP-Disintegrator

Innomed-Konsult AB

Elektrophorese-Einheiten

EI9001-Xcell™, Mini Cell

Novex

Protean II

Biorad

Prep Cell 491

Biorad

Bromma Multiphor II Novablot 2117

LKB

Flatbed Isoelectric Focussing

Serva

Subcell Systems

Biorad

Fermentation

Techfors, 20L-Fermenter

Infors

RAMOS

Hitec Zang

PCR-Geräte

Personal Cyclor

Biometra

Primus 96^{plus}

MWG-Biotech

Zentrifugen

Sorvall RC-5B

Du Pont

Rotina 35R

Hettich

Mikro 22R

Hettich

Zentrifuge 5415D

Eppendorf

Univapo 150H + Unicryo MC2L

Uniequip

Sonstige

Eagle-Eye II	Stratagene
Rührzelle 8050, 8010	Amicon
UV-Transilluminator	Stratagene

1.2 Chemikalien

Alle nicht näher spezifizierten Chemikalien wurden von Sigma, Fluka, Aldrich, Merck oder Roth bezogen und waren mindestens von p.a.-Qualität. Die Chemikalien für den Southern Blot stammten von Roche. Die Restriktionsenzyme waren von Roche oder New England Biolabs, alle weiteren Enzyme ausschließlich von Roche. Die Chemikalien für elektrophoretische und molekularbiologische Untersuchungen waren von höchster Qualität.

Die Medienbestandteile stammten von Merck, Difco oder Oxoid. Die Aminosäuren, die für das Screening eingesetzt wurden, und L-2-Amino-4,4-dimethylvaleriansäure, L-2-Amino-3,3-dimethylbuttersäure und L-2-Amino-5,5-dimethylhexansäure wurden von der Degussa, Eupergit C[®] und Eupergit C 250L[®] von der Firma Röhm zur Verfügung gestellt. Cymal-5[®] wurde von der Firma Anatrace bezogen.

1.3 Vektoren

pUC18	Amersham-Pharmacia Biotech
pKK223-3	Amersham-Pharmacia Biotech
pET32a	Novagen
pJOE4036	J. Altenbuchner, Inst. für Industrielle Mikrobiologie, Universität Stuttgart
pUWL201	U. Wehmeier, Inst. für Chemische Mikrobiologie, Universität Wuppertal
pIJ6021	S. Verseck, Degussa, Hanau

1.4 Mikroorganismen

DSMZ-Sammlungsstämmen	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Bodenisolat
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	Bodenisolat
<i>E. coli</i> HB101	Boehringer
<i>E. coli</i> JM105	Amersham-Pharmacia Biotech
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1blue	Stratagene
<i>E. coli</i> Origami(DE3α)pLysS	Novagen
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	S. Verseck, Degussa, Hanau

2 Methoden

2.1 Screening nach mikrobiellen L-AAO-Bildnern

Zur Isolierung neuer mikrobieller L-AAO-Bildner wurden vier verschiedene Screeningstrategien angewandt. Eine schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte ist in Abb. 10 verdeutlicht.

2.1.1 Medien und Lösungen

Für die verschiedenen Screeningstrategien wurden die folgenden Medien verwendet. Alle Medien wurden für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wie Enzyme, Vitamine und Antibiotika wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 L.

2.1.1.1 Strategie I

AS 1a-Agarmedium (Isolierung)

Je 5 g	L-Leu, L-Val, L-Phe, L-His, L-Ser, L-Glu, L-Asp, L-Pro
0,5 g	Hefeextrakt
0,5 g	o-Dianisidin
17 g	Agar
20 mL	HVK-Spurenelementlösung
2000 U	Peroxidase
pH 5,5 und pH 8,0	

AS 1b-Agarmedium (Stammhaltung)

Je 5 g	L-Leu, L-Val, L-Phe, L-His, L-Ser, L-Glu, L-Asp, L-Pro
3 g	Hefeextrakt
3 g	Fleischextrakt
17 g	Agar
20 mL	HVK-Spurenelementlösung
pH 5,5 und pH 8,0	

AS 1c-Flüssigmedium (Anzucht)

Je 5 g	L-Leu, L-Val, L-Phe, L-His, L-Ser, L-Glu, L-Asp, L-Pro
1,5 g	Hefeextrakt
0,5 g	Malzextrakt
20 mL	HVK-Spurenelementlösung
pH 5,5 und pH 8,0	

AS 2a-Agarmedium (Isolierung)

Je 5 g	L-Leu, L-Val, L-Ser, L-Glu, L-Asp, L-Pro
0,5 g	Hefeextrakt
0,5 g	o-Dianisidin
17 g	Agar

20 mL	HVK-Spurenelementlösung
2000 U	Peroxidase
pH 6,5	

AS 2b-Agarmedium (Stammhaltung)

Je 5 g	L-Leu, L-Val, L-Ser, L-Glu, L-Asp, L-Pro
3 g	Hefeextrakt
3 g	Fleischextrakt
17 g	Agar
20 mL	HVK-Spurenelementlösung
pH 6,5	

AS 2c-Flüssigmedium (Anzucht)

Je 5 g	L-Leu, L-Val, L-Ser, L-Glu, L-Asp, L-Pro
0,5 g	Hefeextrakt
20 mL	HVK-Spurenelementlösung
pH 6,5	

2.1.1.2 Strategie II

Anreicherungsmedium, flüssig

Je 5 g	L-Leu, L-Phe, L-Glu
1,5 g	Hefeextrakt
je 1 g	KH_2PO_4 und K_2HPO_4
0,5 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,01 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
pH 7,0	

Anreicherungsmedium, mit Agar und Indikatorsystem

Je 5 g	L-Leu, L-Phe, L-Glu
1,5 g	Hefeextrakt
Je 1 g	KH_2PO_4 und K_2HPO_4
0,5 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,01 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15 g	Agar
2000 U	Peroxidase
0,5 g	o-Dianisidin
pH 7,0	

2.1.1.3 Strategie III

Die Anzucht der Mikroorganismen aus der Stammsammlung erfolgte in den von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfohlenen Flüssigmedien.

2.1.1.4 Strategie IV

Na-Propionat-Medium

0,2 g	Na-Propionat
0,01 g	KNO ₃
0,1 g	KH ₂ PO ₄
0,25 g	NaCl
100 mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O
20 mg	CaCO ₃
20 mL	HVK-Spurenelementlösung
1 mL	Vitamin-Lösung (nach Schlegel)
50 mg	Cycloheximid
20 g	Agar
pH 7,0	

M65-Agarmedium mit Indikatorsystem

4 g	Glucose
4 g	Hefeextrakt
10 g	Malzextrakt
0,5 g	o-Dianisidin
2000 U	Peroxidase
12 g	Agar
pH 7,2	

M65-Flüssigmedium

4 g	Glucose
4 g	Hefeextrakt
10 g	Malzextrakt
pH 7,2	

2.1.1.5 Vitamin- und Spurenelementlösungen

Vitaminlösung nach Schlegel

2 mg	Biotin
20 mg	Nicotinsäureamid
10 mg	Thiamin
10 mg	4-Aminobenzoat
5 mg	Pantothenat
50 mg	Pyridoxamin
20 mg	Cyanocobalamin

HVK-Spurenelementlösung

10 g	Titriplex I
14,5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
3,3 g	CaCl ₂ ·H ₂ O
9,3 mg	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
50 mL	Metall-Lösung

Metall-Lösung

250 mg	Titriplex II
4,2 mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
2,5 mg	FeSO ₄ ·7H ₂ O
4,0 mg	MnSO ₄ ·H ₂ O
39,2 mg	CuSO ₄ ·5H ₂ O
244 mg	Co(NO ₃) ₆ ·6H ₂ O
171 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O
mit 6 N H ₂ SO ₄ pH 1,5-2,0 einstellen	

2.1.2 Strategie I: Screening von Bodenproben auf Agarmedium

An unterschiedlichen Standorten wurden Bodenproben gesammelt. Etwa 1 g jeder Bodenprobe wurde mit 3 mL steriler Saline gut durchmischt. Aus diesen Suspensionen wurden Verdünnungsreihen von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ hergestellt. Von den Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻³ und 10⁻⁵ wurden jeweils 100 µL auf AS 1a-Medium (pH 5,5 und 8,0) und AS 2a-Medium (pH 6,5) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden für maximal 14 Tage bei 30°C inkubiert.

Kolonien, die sich rot-braun färbten und/oder bei denen eine Färbung des umliegenden Mediums zu beobachten war, wurden durch mehrfaches Ausstreichen isoliert. Zur vorläufigen Stammhaltung wurden Reinkulturen auf einem etwas reichhaltigeren Medium kultiviert (AS 1b, pH 5,5 oder pH 8,0/ AS 2b, pH 6,5). Die Anzucht der Isolate erfolgte in den entsprechenden Flüssigmedien (AS 1c, pH 5,5 oder pH 8,0 / AS 2c, pH 6,5). Die Vorkulturen wurden bei 30°C und 130 Upm in 100 mL-Kolben mit 20 mL Medium angezogen. Die Hauptkulturen wurden in 1 L-Kolben mit 100 mL Medium ebenfalls bei 30°C und 130 Upm inkubiert. Die Ernte erfolgte nach 2 bis 7 Tagen.

2.1.3 Strategie II: Screening von Bodenproben mittels Anreicherungskulturen

Bei dieser Methode wurden Bodenproben direkt in 20 mL Anreicherungsmedium gegeben und bei 30°C und 130 Upm inkubiert bis eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen war. Nach ein bis zwei Tagen wurden die Zellen in neues Flüssigmedium überimpft. Dieser Schritt wurde jeweils 4-5 mal wiederholt, danach wurden Isolationsausstriche auf Agarplatten mit Indikatorsystem durchgeführt, um die Reinheit der Kulturen zu überprüfen. Im Bedarfsfall wurden weitere Isolationsausstriche

angefertigt. Die Reinkulturen wurden erneut in 20 mL Flüssigmedium angezogen und nach 2-3 Tagen geerntet.

2.1.4 Strategie III: Screening einer Auswahl an DSMZ-Sammlungsstämmen

Stämme folgender Gattungen wurden in dem von der DSMZ empfohlenen Flüssigmedium und bei der empfohlenen Temperatur in 20 ml Kulturvolumen angezogen: *Lactobacillus* (18 Stämme), *Streptomyces* (20), *Rhodococcus* (10), *Nocardia* (7), *Corynebacterium* (3), *Brevibacterium* (3), *Trichoderma* (2), *Neurospora* (1), *Pseudomonas* (15), *Mycobacterium* (1), *Bacillus* (10), *Micrococcus* (4), *Cellulomonas* (1). Nach der Kultivierung in Flüssigmedium wurden die Stämme auf AS 2a-Agarplatten ausgestrichen und inkubiert.

Aufgrund der positiven Farbreaktionen einiger Proben wurden insgesamt 69 Sammlungsstämmen der Gattungen *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* und *Gordona* im empfohlenen DSMZ-Flüssigmedium kultiviert, nach 2-5 Tagen geerntet und auf L-AAO-Aktivität untersucht.

2.1.5 Strategie IV: Gezieltes Screening nach *Rhodococcus*- und *Nocardia*-Arten

Um gezielt Nocardien und Rhodococcen aus Bodenproben zu isolieren, wurden Bodenproben in gleicher Weise wie bei Strategie I (2.1.1.1) vorbereitet. Von den Verdünnungsstufen 10^{-3} , 10^{-5} und 10^{-6} wurden jeweils 100 μ L auf Na-Propionat-Medium ausplattiert. Alle Kolonien wurden auf M65-Agar mit Indikatorsystem übertragen. Organismen, die eine positive Farbreaktion auslösten, wurden durch Isolationsausstriche auf Reinheit überprüft und in 100 mL M65-Medium angezogen. Die Ernte erfolgte nach 2-3 Tagen.

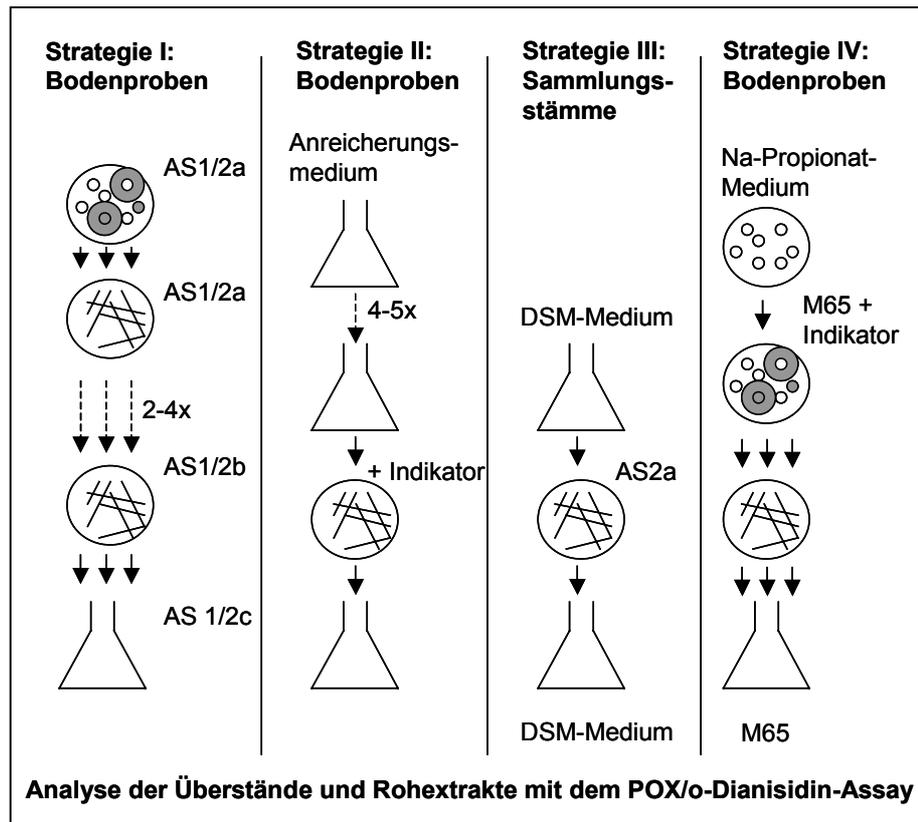


Abb. 10: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte während des Screenings nach neuen L-AAO-Bildnern.

2.2 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen

2.2.1 Medien und Lösungen

Alle Medien wurden für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 L.

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Luria-Bertani-Medium (LB), low salt

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
(15 g Agar)
pH 7,5

Luria-Bertani-Medium (LB)

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
(15 g Agar)
pH 7,5

2.2.1.2 Kultivierung von *Streptomyces lividans*

ISP-Agarmedium 2 (Difco)

38 g

Yeast-Extract-Malt-Extract Medium (YEME), low sugar / high sugar

3 g	Hefeextrakt
5 g	Bactopepton
3 g	Malzextrakt
10 g	Glucose
50 / 340 g	Saccharose

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 5 mM MgCl₂.

R2Y2-Agarmedium

103 g	Saccharose
0,25 g	K ₂ SO ₄
10 g	MgCl ₂
10 g	Glucose
0,1 g	Casaminoacids
22 g	Agar

Nach dem Autoklavieren und vor dem Gießen Zugabe von

0,05 g	KH ₂ PO ₄
2,9 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O
3 g	L-Prolin
5,7 g	TES, pH 7,2
2 mL	Spurenelementlösung für <i>Streptomyces</i>
0,2 g	NaOH

Spurenelementlösung f. *Streptomyces*

40 mg	ZnCl ₂
200 mg	FeCl ₃ ·6H ₂ O
10 mg	CuCl ₂ ·2H ₂ O
10 mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O
10 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O
10 mg	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O

Vor Gebrauch sterilfiltrieren.

2.2.2 Anzucht von *Rhodococcus opacus*

Die Kultivierung von *Rhodococcus opacus* erfolgte standardmäßig in M65-Medium in Schüttelkolben ohne Schikanen bei 28°C und 150-200 Upm. Das Medienvolumen betrug max. 20% des Kolbenvolumens.

2.2.3 Medienoptimierung im Schüttelkolben mittels RAMOS

Der Einfluss des Mediums und des Erntezeitpunkts auf die L-AAO-Expression in *Rhodococcus opacus* wurde untersucht. Diese Versuchsreihe wurde am Institut für Bioverfahrenstechnik der RWTH-Aachen in einer Anlage durchgeführt, die die gleichzeitige Messung der Sauerstofftransferaten (OTR) und der Kohlendioxid-

transferraten (CTR) in 6 Schüttelkolben ermöglicht (RAMOS = Respiration Activity Monitoring System) [123].

Zur Bestimmung der Transferraten wurde jede Messeinheit in eine Spülphase (25 min) und eine Messphase (10 min) unterteilt. Aus der Abnahme des p_{O_2} und der Zunahme des p_{CO_2} in der Gasphase während der Messphase wurden der OTR und der CTR berechnet (Gl. 1-Gl. 2).

$$\text{OTR} = \frac{n_{O_2}}{V_l * t} = \frac{\Delta p_{O_2}}{\Delta t} * \frac{V_g}{R * T * V_l} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} * \text{h}} \right]$$

Gl. 1: OTR = Sauerstofftransferrate, n_{O_2} = Stoffmenge d. Sauerstoffs, p_{O_2} = Partialdruck d. Sauerstoffs, V_l = Volumen d. Flüssigkeit, V_g = Volumen d. Gasphase, t = Zeit, T = absolute Temperatur, R = allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

$$\text{CTR} = \frac{n_{CO_2}}{V_l * t} = \frac{\Delta p_{CO_2}}{\Delta t} * \frac{V_g}{R * T * V_l} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} * \text{h}} \right]$$

Gl. 2: CTR = Kohlendioxidtransferrate, n_{CO_2} = Stoffmenge d. Kohlendioxids, p_{CO_2} = Partialdruck d. Kohlendioxids

Die Vorkultur wurde in M65-Medium angezogen. Für sämtliche Ansätze wurden 250 mL-Schüttelkolben ohne Schikanen benutzt. Das Medienvolumen betrug 30 mL. Die Kolben wurden bei 28°C und 200 Upm mit einer Amplitude von 5 cm geschüttelt. Um eine zeitabhängige Probennahme zu ermöglichen, wurden weitere Schüttelkolben gleichzeitig mit dem Hauptversuch aus derselben Vorkultur angeimpft und in einem zweiten Schüttler unter den gleichen Bedingungen, aber ohne online-Analytik inkubiert. Diese Kolben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und beides wurde getrennt voneinander analysiert.

2.2.4 Fermentation und Ernte von *Rhodococcus opacus*

Rhodococcus opacus wurde im 10 L-Maßstab in einem 20 L-Techfors Bioreaktor bei 28°C kultiviert. Die Vorkultur wurde für 15 h in 500 mL-Schüttelkolben ohne Schikanen in 100 mL M65-Medium bei 150 Upm und 28°C inkubiert. Die Fermentation wurde durch Zugabe von 2% Vorkultur gestartet. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 7,2 eingestellt und während der Fermentation nicht reguliert. Das untere p_{O_2} -Limit von 40% wurde durch Erhöhung der Rührerdrehzahl von 300 auf 400 Upm eingehalten. Die Begasung wurde bei 10 vvm konstant gehalten. Es wurden regelmäßig unter sterilen Bedingungen Proben entnommen und analysiert. Nach 23 h wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 8000 x g und 4°C geerntet und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.5 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde in Luria-Bertani-Medium (LB), low salt kultiviert. Standardmäßig wurden 20 mL Medium einprozentig aus einer 5 mL Vorkultur angeimpft und bei 150 Upm und 37°C geschüttelt. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurden dem Medium die dazu notwendigen Antibiotika sterilfiltriert hinzugefügt (Ampicillin 100 µg·mL⁻¹, Chloramphenicol 35 µg·mL⁻¹).

2.2.6 Anzucht von *Streptomyces lividans*

Streptomyces lividans wurde aus den Sporensuspensionen (2.2.10) in 10-20 mL YEME-Medium, low sugar angeimpft. Standardmäßig erfolgte die Kultivierung in 100 mL-Kolben mit 4 Schikanen bei 30°C und 200 Upm. Unter diesen Bedingungen war gewährleistet, dass die Mycelpellets möglichst klein blieben. Selektionsdruck wurde in Abhängigkeit vom Vektor durch Zugabe von 5 µg·mL⁻¹ Thiostrepton oder 5 µg·mL⁻¹ Kanamycin ausgeübt.

2.2.7 Fermentation und Ernte von *Streptomyces lividans*

Streptomyces lividans wurde in 10 L YEME-Medium, low sugar mit 5 µg·mL⁻¹ Kanamycin in einem 20 L-Techfors Bioreaktor bei 30°C kultiviert. Die erste Vorkultur wurde für 2 Tage in 20 mL Medium inkubiert, die zweite Vorkultur wurde 1%ig in zwei 1 L-Kolben mit jeweils 100 mL Medium angeimpft und für 3 Tage kultiviert. Die Fermentation wurde durch Zugabe der gesamten zweiten Vorkultur (2% des Gesamtvolumens) gestartet. Der pH-Wert wurde nicht geregelt und der pO₂ wurde durch Anpassung der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl auf einen minimalen Wert von 40% eingestellt. Nach 10 h wurden die Zellen durch Zugabe von 5 µg·mL⁻¹ Thiostrepton induziert. Während der gesamten Fermentationsdauer wurden regelmäßig Proben entnommen und analysiert. Die Fermentation wurde nach 36 h beendet, die Zellen wurden durch Filtration über Zellulosefilter (25G, Type 11106, 0,45 µm, Sartorius) vom Überstand getrennt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.8 Anzucht von *Arthrobacter protophormiae*

Die Kultivierung von *Arthrobacter protophormiae* erfolgte standardmäßig in M65-Medium, das zusätzlich 30 mM L-Alanin enthält. 1,2 L Medium wurden in 5 L-Kolben mit 2 Schikanen 5%ig aus der Vorkultur angeimpft und bei 30°C und 120 Upm geschüttelt. Nach 24-28 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert.

2.2.9 Bestimmung der Expressionsraten und Wachstumsparameter

In Tab. 2 sind alle Parameter aufgeführt, die während der einzelnen Versuche zur Optimierung der Wachstums- und Expressionsbedingungen von *Rhodococcus opacus*, *E. coli* und *Streptomyces lividans* analysiert wurden.

Tab. 2: Parameter, die bei der Kultivierung von *Rhodococcus opacus*, *E. coli* und *Streptomyces lividans* bestimmt wurden.

	<i>Rhodococcus opacus</i>			<i>E. coli</i>	<i>Streptomyces lividans</i>	
	Schüttelkolben	RAMOS-Anlage	Fermenter	Schüttelkolben	Schüttelkolben	Fermenter
Wachstumsparameter						
OD ₅₅₀				+		
OD ₆₀₀	+		+			
ZFM		+	+	+	+	+
Analyse der Rohextrakte						
L-AAO (POX/o-Dianisidin)	+	+	+	+	+	+
Katalase, quantitativ			+	+		
Katalase, qualitativ	+				+	
Protein	+	+	+	+	+	+
SDS-PAGE			+	+	+	
Analyse der Überstände						
pH		+				+
Glucosekonzentration		+	+			
Maltosekonzentration		+				
Aminosäureanalytik		+				
Online-Analytik						
pH			+			
pO ₂		+	+			+
pCO ₂		+				
OTR		+				
CTR		+				
Temperatur		+	+			+

2.2.9.1 Bestimmung der Glucose- und Maltosekonzentration

Die Messung des Glucose- und Maltosegehalts in den Überständen wurde photometrisch mit dem UV-Test für Maltose/Saccharose/D-Glucose (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.9.2 Aminosäureanalytik

Die Messung der Aminosäurekonzentrationen in den Überständen wurde mit dem Aminosäureanalysator AminoQuant 1090XA nach automatischer Derivatisierung mit OPA am Institut für Biotechnologie 2 (FZ-Jülich) durchgeführt. Als Säule wurde eine Hypersil ODS (5 µm, 125 x 4 mm, CS-Chromatographie, Langerwehe) eingesetzt, das Laufmittel bestand aus Methanol und Natriumacetatpuffer und die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung (Ex. 230 nm, Em. 445 nm). Die Aminosäuren Prolin und Cystein konnten mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

2.2.10 **Konservierung**

E. coli-Stämme wurden bis zur log-Phase in LB-Medium kultiviert. 0,7 mL-Aliquots wurden entnommen und nach Zugabe von 0,3 mL Glycerin bei –80°C gelagert.

Streptomyces lividans wurden als Sporensuspension konserviert. Zur Isolierung der Sporen wurden die Zellen flächendeckend auf einer gut getrockneten R2YE- oder ISP2-Agarplatte ausgestrichen und für 4-10 Tage bei 30°C inkubiert. Nachdem die Sporenbildung durch Verfärbung der Kolonien ins weißliche deutlich zu erkennen war, wurden die Agarplatten mit 7 mL einer 20%igen Glycerinlösung überschichtet. Die Sporen wurden mit Hilfe einer Impföse in der Petrischale suspendiert und durch eine sterile, mit Watte gefüllte Spritze filtriert. Das Filtrat wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Konservierung aller anderen Mikroorganismen erfolgte durch Zugabe von 50 µL DMSO zu 950 µL der Flüssigkultur und mit anschließender Lagerung bei -80°C.

2.3 Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung

2.3.1 Für analytische Zwecke

2.3.1.1 Zellaufschluss mit der Schwingkugelmühle MM2

Während des Screenings wurden alle Zellen durch Nassvermahlung in der Kugelmühle aufgeschlossen. Diese Methode wurde ebenfalls bei der Untersuchung der Wachstumsbedingungen von *Rhodococcus opacus* angewandt.

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen wurden in 1,5 mL-Eppendorfgefäßen in den gekühlten Halterungen einer Schwingkugelmühle aufgeschlossen. Dazu wurde mit 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 eine 25-40%ige Zellsuspension hergestellt und 700-800 µL dieser Suspension wurden mit 1,2 mL Glasperlen (Ø 0,3 mm) gemischt. Die Zellen wurden für 10 min bei einer Amplitude von 100% geschüttelt. Die Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die geklärten Überstände wurden gekühlt aufbewahrt.

2.3.1.2 Zellaufschluss durch Ultraschall

Die rekombinanten *E. coli*- und *Streptomyces lividans*-Stämme wurden alle durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die aus einer 20 mL-Kultur geernteten Zellen in 1-2 mL 100 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,6 suspendiert und für 2 min bei *E. coli* und für 3 min bei *Streptomyces lividans* auf Eis mit Ultraschall behandelt (power 80%, cycles 80). Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer abgetrennt und das Pellet wurde getrennt vom geklärten Rohextrakt bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

2.3.2 Für präparative Zwecke

2.3.2.1 Zellaufschluss von *Rhodococcus opacus* und *Arthrobacter protophormiae*

15-25 g Bakterienzellen wurden in 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 in einem Verhältnis von 1 g Zellen (Nassgewicht) zu 3 mL Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde mit Glasperlen (Ø 0.3 mm) in einem Volumenverhältnis von 1:1,6-2,0 gemischt und in den Disintegrator gefüllt. Die Zellen wurden unter Eiskühlung durch Rühren bei 3000 Upm für 20 min aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei

12500 x g für 10 min bei 4°C entfernt und der geklärte Rohextrakt wurde für die Aufreinigung eingesetzt.

2.3.2.2 Zellaufschluss von *Streptomyces lividans*

15 g Bakterienzellen wurden mit 45 mL 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 resuspendiert und nach Zugabe von 60 mg Lysozym 10 min auf Eis inkubiert. Der weitere Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall für 3 x 5 min (power 80%, cycles 80). Dabei wurde die Zellsuspension ständig auf Eis gekühlt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 15000 x g für 15 min bei 4°C. Der zellfreie Überstand wurde für die Aufreinigung eingesetzt.

2.4 Reinigung der L-AAO

Alle im Folgenden beschriebenen Chromatographieschritte wurden bei Raumtemperatur unter Nutzung des Biocad Chromatography Systems ausgeführt.

2.4.1 Protokoll –1-

Das erste, dreistufige Reinigungsprotokoll wurde für die Aufreinigung der L-AAO aus 15-25 g Zellen verwendet. Die L-AAO wurde nach diesem Verfahren sowohl aus dem Wildtyp *Rhodococcus opacus* als auch aus dem rekombinanten Stamm *Streptomyces lividans* aufgereinigt.

2.4.1.1 Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt wurde auf eine mit MacroPrep High Q Support Material (Biorad) oder alternativ mit Q-Sepharose FF gepackte Säule (h 5,5 x Ø 5 cm) mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL·min⁻¹ aufgetragen. Der Ionenaustauscher war zuvor mit 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 equilibriert worden. Nach der Beladung wurde die Säule mit diesem Puffer gewaschen und anschließend wurde das Enzym in einem Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in Startpuffer eluiert. Zu Beginn der Elution wurde die Flussrate auf 4 mL·min⁻¹ erhöht. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit 3,5 M (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration an Ammoniumsulfat 0,75 M betrug.

2.4.1.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Der Pool wurde auf eine Phenylsepharose FF-Säule (h 4,2 x Ø 2,6 cm) aufgetragen, die mit 50 mM TEA/HCl, 0,75 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,0 equilibriert war. Die Flussgeschwindigkeit betrug 2 mL·min⁻¹. Das Enzym eluierte innerhalb des stufenweisen Gradienten von 0,75 bis 0 M (NH₄)₂SO₄ in Startpuffer bei 0,38-0,50 M (NH₄)₂SO₄. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration in einer Rührzelle (2.6.1) wurde ein Pufferwechsel nach 10 mM Kpi, 250 mM NaCl, pH 6,5 durchgeführt.

2.4.1.3 Hydroxylapatitchromatographie

Eine mit keramischem MacroPrep Hydroxylapatit, Typ I (Biorad) gefüllte Säule (h 8,3 x Ø 1,6 cm) wurde mit Startpuffer (10 mM Kpi, 250 mM NaCl, pH 6,5) equilibriert. Nach dem Aufpumpen der Probe mit einer Flussrate von 1,5 mL·min⁻¹ wurde die Säule gewaschen und das Enzym durch stufenweise Erhöhung der Kpi-Konzentration auf 50 mM eluiert. Die NaCl-Konzentration wurde während der gesamten Chromatographie konstant gehalten.

2.4.2 **Protokoll –2-**

Das zweite, vereinfachte Reinigungsprotokoll wurde für die Isolierung der L-AAO aus 50 g *Rhodococcus opacus*-Zellen angewandt.

2.4.2.1 Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Q-Sepharose FF gepackte Säule (h 15 x Ø 5 cm) geladen. Es wurden die gleichen Puffer wie bei (2.4.1.1) verwendet. Der Verlauf des Elutionsgradienten wurde ebenfalls von (2.4.1.2) übertragen und dabei dem Volumen dieser Säule angepasst. Die Flussrate betrug während des gesamten Säulenlaufs 5 mL·min⁻¹. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit 3,5 M (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration an Ammoniumsulfat 0,75 M betrug.

2.4.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Als zweiter Reinigungsschritt wurde der Pool auf eine Phenylsepharose FF Säule (h 7 x Ø 2,6 cm) aufgetragen, die mit 50 mM TEA/HCl, 0,75 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,0 equilibriert war. Nach dem Waschschrift wurde die L-AAO durch Senkung der (NH₄)₂SO₄-Konzentration auf 0,5 M eluiert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 3 mL·min⁻¹.

2.5 **Reinigung der D-AAO**

Die D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* wurde mit Hilfe eines dreistufigen Reinigungsprotokolls isoliert.

2.5.1.1 Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt wurde auf eine Säule (h 2,6 x Ø 10 cm) aufgetragen, die mit Q-Sepharose FF gepackt und mit 10 mM Kpi-Puffer pH 7,0 equilibriert war. Die Flussrate betrug 2 mL·min⁻¹. Nach einem Waschschrift mit 0,2 M NaCl in 10 mM Kpi-Puffer pH 7,0 wurde die D-AAO durch eine weitere stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,35 M NaCl eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

2.5.1.2 Hydroxylapatitchromatographie

Die Hydroxylapatitsäule (2.4.1.3) wurde mit 10 mM Kpi, 150 mM NaCl, pH 6,8 equilibriert und die Probe wurde mit einer Flussrate von 2 mL·min⁻¹ aufgetragen. Die D-AAO-Aktivität wurde im Durchlauf detektiert, während ein Großteil der Fremdproteine durch eine lineare Erhöhung der Kpi-Konzentration auf 400 mM eluierte. Zur Auf-

konzentrierung der Probe und zum Pufferwechsel wurden die D-AAO-haltigen Fraktionen über Nacht gegen 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 mit 20% PEG 20000 dialysiert.

2.5.1.3 Präparative Gelelektrophorese

Ein 10%iges, natives Polyacrylamidgel wurde für die präparative Elektrophorese in der 491 Prep Cell nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, die Proteine wurden mit 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 eluiert und in 5 mL-Fractionen gesammelt.

2.6 Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinproben

2.6.1 Rührzelle

Proteinlösungen wurden in Rührzellen verschiedener Größe mit YM10-Membranen (Amicon) aufkonzentriert und/oder umgepuffert.

2.6.2 Gelfiltration (PD-10)

Proteinlösungen wurden mit PD-10-Säulen (Amersham-Pharmacia Biotech) nach dem Prinzip einer Gelfiltration umgepuffert und/oder entsalzt. Die Säulen wurden mit 20 mL Puffer equilibriert und 2,5 mL der Probe wurden aufgetragen. Proteine eluierten in 3,5 mL des gewünschten Puffers.

2.7 Proteinanalytik

2.7.1 Bestimmung der L-AAO-Aktivität

2.7.1.1 POX/o-Dianisidin-Assay

Die L-AAO-Aktivität wurde über die H_2O_2 -Bildung mit einem gekoppelten Enzymtest gemessen. Die durch Meerrettich Peroxidase (POX) katalysierte Farbstoffbildung aus H_2O_2 und o-Dianisidin wurde photometrisch bei 436 nm und 30°C nachgewiesen ($\epsilon = 8,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ein Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die den Abbau von $1 \mu\text{mol}$ Substrat pro min katalysiert. Wenn nicht anders erwähnt, enthielt der Standardtest 10 mM L-Alanin, 0,2 M TEA/HCl-Puffer pH 7,6, $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ o-Dianisidin, 10 U POX und L-AAO in limitierender Menge.

Dieser Test wurde sowohl in Küvetten in einem Gesamtvolumen von 1 mL als auch in Mikrotiterplatten in einem Gesamtvolumen von 0,2 mL durchgeführt. Die Schichtdicke betrug in der Mikrotiterplatte 0,52 cm, die Wellenlänge wurde auf 450 nm eingestellt.

2.7.1.2 LDH-gekoppelter Enzymtest

Alternativ wurde die L-AAO-Aktivität mit einem zweiten gekoppelten Enzymtest, der Lactat-Dehydrogenase enthielt, gemessen. Hierbei konnte ausschließlich L-Alanin als Substrat eingesetzt werden. Die Produktion von Lactat aus NADH und dem gebildeten

Pyruvat wurde photometrisch bei 340 nm und 30°C verfolgt ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für NADH). Der Testansatz enthielt 10 mM L-Alanin, 0,2 M TEA/HCl-Puffer pH 7,6, 20 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ Katalase, 0,2 mM NADH, 9 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ LDH und L-AAO in limitierenden Mengen.

2.7.2 Bestimmung der D-AAO-Aktivität

D-AAO-Aktivität wurde analog zu dem POX/o-Dianisidin-abhängigen Enzymtest für die L-AAO gemessen (2.7.1.1). Als Standardsubstrat wurden 10 mM D-Methionin eingesetzt.

2.7.3 Bestimmung der Katalase-Aktivität

2.7.3.1 Quantitativ

Der Wasserstoffperoxidabbau durch Katalase wurde in einer Quarzküvette photometrisch bei 240 nm und 30°C gemessen ($\epsilon = 0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für H_2O_2). Der Testansatz enthielt 0,12 M Kpi-Puffer pH 6,5, 0,3% H_2O_2 und Katalase in limitierenden Mengen. Die Extinktion des Testpuffers bei 240 nm lag vor Zugabe des Enzyms bei $0,500 \pm 0,010$.

2.7.3.2 Qualitativ

Frische Kolonien wurden qualitativ auf Katalase-Aktivität untersucht, indem 200 μL 10%iges Wasserstoffperoxid und die Zellen mit einer Impföse auf einem Objektträger vermischt wurden. Bei deutlicher und schnell eintretender Schaumbildung auf dem Objektträger war der Test positiv.

2.7.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford mit BSA als Standard bestimmt [124]. Während der Chromatographien wurde der Proteingehalt über Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt.

2.7.5 Gelfiltrationschromatographie

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Enzyms wurde die homogen aufgereinigte L-AAO auf eine mit Superdex 200 PG gefüllte Säule (h 61,5 cm x \varnothing 1,6 cm) geladen. Als Laufpuffer wurde 50 mM Kpi pH 6,5 mit 150 mM KCl verwendet, die Flussgeschwindigkeit betrug $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Säule wurde mit folgenden Proteinen geeicht: Ribonuclease A (13.7 kDa), Chymotrypsinogen (25.0 kDa), Ovalbumin (43.0 kDa), BSA (67.0 kDa), Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa), Thyroglobulin (669 kDa).

2.7.6 MALDI/TOF-MS

MALDI/TOF-Massenspektroskopie wurde mit einer Bruker BIFLEX III Anlage unter Nutzung von 3,5-Dimethoxy-4-hydroxizimtsäure als Matrix durchgeführt. Als Eichprotein wurde BSA verwendet. Die Messungen wurden im Institut für Biochemie der Universität Köln (AG Prof. Schomburg) durchgeführt.

2.7.7 Proteolytische Spaltung und Trennung der Peptide über HPLC

200 µg homogene, lyophilisierte L-AAO wurde in 50 µL 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,5 mit 8 M Guanidiniumchlorid und 0,2% EDTA gelöst und zur Denaturierung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde DTT bis zu einer Endkonzentration von 10 mM hinzugegeben und die Lösung wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Carboxymethylierung der Probe wurde eine Endkonzentration von 30 mM Iodessigsäure eingestellt und die Probe erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,8 µL β-Mercaptoethanol abgestoppt. Direkt vor dem Start der proteolytischen Spaltung durch die Zugabe von 3 µg Endoproteinase Lys-C (Roche) wurde der Probenpuffer mittels Gelfiltration gewechselt. Die Säule (h 0,5 x Ø 0,45 cm) enthielt Sephadex G-25M (Amersham-Pharmacia Biotech) und war mit 50 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, 20 mM Methylaminhydrochlorid, 1 mM EDTA, pH 8,0 equilibriert. Die Spaltungsreaktion lief für 15 h bei 37°C ab und wurde durch Zugabe von 10 µL TFA gestoppt. Die Fragmente wurden über HPLC mit einer RP-Säule (ET250/4 Nucleosil 100-5 C8, Macherey-Nagel) getrennt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 mL·min⁻¹. Die Peptide wurden bei 215 nm detektiert. Die Elution erfolgte durch einen Gradient aus den beiden Laufpuffer (A: 0,1% TFA, B: 0,085% TFA, 84% Acetonitril). Die Peptidfraktionen wurden manuell gesammelt.

Die partiell gereinigte D-AAO wurde in einem 10%igen SDS-Gel von kontaminierenden Proteinen getrennt, die D-AAO-Bande wurde ausgeschnitten und zur proteolytischen Spaltung an die Firma Toplab (Martinsried, Deutschland) geschickt. Der Verdau erfolgte durch die Endoproteinase LysC im Gelstück. Die Peptide wurden anschließend über HPLC getrennt und manuell gesammelt.

2.7.8 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden durch schrittweise Edman-Degradierung mit einem Sequenzierautomaten 477A bestimmt, der an einen 120A PTH Analysierer angeschlossen war.

Die aus der proteolytischen Spaltung der D-AAO erhaltenen Peptide wurden von der Firma Toplab (Martinsried, Deutschland) N-terminal sequenziert, da die Empfindlichkeit des institutseigenen Sequenzierautomaten 477A für die Peptidmenge (ca. 10-15 pmol) nicht ausreichend war.

2.7.9 Herstellung des Apoenzyms

Von der homogenen L-AAO wurde im Bereich 300-550 nm photometrisch ein Spektrum aufgenommen und die Aktivität bestimmt. Anschließend wurde das Enzym über PD-10-Säulen in KBr-Puffer (250 mM Kpi, 2 M KBr, 20% Glycerin, 0,3 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,5) umgepuffert [125]. Nach 4 Tagen Lagerung bei 4°C wurde die Probe erneut umgepuffert (250 mM Kpi, 20% Glycerin, 0,3 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,5), um das KBr zu entfernen. Nach 2 weiteren Tagen Lagerung bei 4°C

wurde wieder ein Spektrum aufgenommen und die Restaktivität in Abhängigkeit von der FAD-Konzentration (0-20 μM) gemessen.

2.8 Elektrophoretische Methoden und Proteinfärbungen

2.8.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE diente zur Reinheitskontrolle, zur Bestimmung des Molekulargewichts und zur Kontrolle der Expressionsleistung. Die Elektrophorese wurde entweder mit selbstangefertigten 10%igen Acrylamidgelen nach der Methode von Lämmli [126] oder mit 4-12%igen Bis/Tris-Gelen des NuPAGE-Systems (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.2 Native PAGE und Aktivitätsfärbung

Die native PAGE wurde nach dem Protokoll von Lämmli durchgeführt. Sämtliche Gele und Puffer wurden ohne SDS hergestellt. Zur Färbung wurde das Gel nach dem Lauf mit Wasser gewaschen und anschließend in den Färbepuffer bestehend aus 0,2 M TEA/HCl, 10 mM L-Alanin, 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ o-Dianisidin, 10 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Peroxidase, pH 7,6 gegeben. Die Inkubationszeit betrug in Abhängigkeit von der Aktivität der Probe bei Raumtemperatur 5-20 min.

2.8.3 Isoelektrische Fokussierung

Der pI der homogenen L-AAO wurde durch isoelektrische Fokussierung in Agarosegelen mit Trägerampholyten bestimmt. Durch Aufkochen wurden 0,125 g Agarose, 0,8 g Sorbitol, 0,3 g Glycerin und 5 mg EDTA in 10 mL Wasser gelöst, direkt danach wurden 625 μL Ampholytlösung (40%, pH 4-6, Servalyt) hinzugegeben. Die 70°C-warme Lösung wurde mit Hilfe einer Spritze in eine vortemperierte Kassette gegossen, in der sich eine Trägerfolie (Gel-Fix, Serva) befand. Nach dem Polymerisieren wurde das Agarosegel mit Hilfe der Trägerfolie auf die vorgekühlte Elektrophoreseeinheit gelegt. Parallel zu den Elektroden wurden Filterpapierstreifen angelegt, die an der Kathode mit 0,1 M Natronlauge und an der Anode mit 0,5 M Phosphorsäure getränkt waren. Die Proben und Standards wurden mittels quadratischer Filterplättchen auf das Gel aufgetragen. Als Standardproteine wurden Carboanhydrase (pI 6,0), β -Lactoglobulin (pI 5,3/5,15), Trypsininhibitor (pI 4,5) verwendet. Während des 50-minütigen Elektrophoreselaufs wurde die Leistung mit 4 W konstant gehalten. Das Gel wurde anschließend in 20%iger TCA fixiert, zweimal für 5 min mit Wasser gewaschen und eine Stunde bei 60°C getrocknet.

2.8.4 Diskontinuierliches Blotting von Proteinen

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Membranen wurde nach der Methode von Kyhse-Andersen durchgeführt [127]. Dazu wurden drei Puffer vorbereitet: Anodenpuffer I (0,3 M Tris, 10% Methanol, pH 10,4), Anodenpuffer II (25 mM Tris, 10%

Methanol, pH 10,4), Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM ϵ -Aminohexansäure, 10% Methanol, pH 9,4). Das SDS-Gel wurde in dest. Wasser gewaschen und in Kathodenpuffer equilibriert. Nitrocellulosemembranen (0,2 μ m, Schleicher und Schüll) wurden direkt in Anodenpuffer II equilibriert, beim Einsatz von PVDF-Membranen (PVM Biosupport Membranes, Pall) wurden diese vorher zusätzlich in Methanol gelegt und mit Wasser gewaschen. Die Blot-Kammer wurde in folgender Reihenfolge zusammgebaut: Anode - 2 Lagen Filterpapier, in Anodenpuffer I – 1 Lage Filterpapier, in Anodenpuffer II – Membran – SDS-Gel – 3 Lagen Filterpapier, in Kathodenpuffer - Kathode. Während des 30-40 minütigen Transfers wurde die Stromstärke mit 1,5 mA pro cm² Gelfläche konstant gehalten.

2.8.5 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Blau and Amidoschwarz

SDS- und IEF-Gele wurden standardmäßig mit Coomassie-Blau gefärbt. Das Gel wurde nach dem Elektrophoreselauf für 20-40 min in der Färbelösung (0,1% Coomassie Blue R-250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure) geschüttelt. Die Proteinbanden wurden durch mehrfaches Wechseln des Entfärbers (40% Ethanol, 10% Essigsäure) sichtbar gemacht.

Blotmembranen wurden mit Amidoschwarzlösung (0,1% Amidoschwarz, 40% Ethanol, 10% Essigsäure) für 5-10 min gefärbt und der Hintergrund wurde auf die gleiche Weise wie bei Coomassie-Blau-gefärbten SDS-Gelen wieder entfärbt.

2.8.6 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen

SDS-Gele, die aufgrund geringer Proteinkonzentrationen eine empfindliche Färbemethode erforderten, wurden mit Silber gefärbt [128].

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Präparation von genomischer DNA aus *Rhodococcus opacus*

Die Anzucht von *Rhodococcus opacus* erfolgte in 200 mL Medium M65 in einem 1 L-Schüttelkolben ohne Schikanen. Die Zellen wurden bei 28°C und 200 Upm für 15 h inkubiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurde der Kolben für 30 min auf 80°C erhitzt. Die Zellen wurden bei 5000 x g für 20 min unter Kühlung zentrifugiert und das Pellet wurde in 20 mL 25 mM Tris/HCl-Puffer, 10 mM EDTA, pH 8,0 suspendiert. Nach Zugabe von 4 mL Lysozym-Lösung (10 mg·mL⁻¹) wurde die Suspension für 3 h bei 37°C inkubiert. 0,2 mL Protease K (Qiagen) und 3 mL SDS-Lösung (10%) sorgten bei 65°C und einer Inkubationsdauer von 15 min für die proteolytische Spaltung der zelleigenen Proteine. Im Anschluss daran wurden 2 mL NaCl (5 M) und 3 mL CTAB/NaCl-Lösung (10% CTAB, 4,1% NaCl) hinzugegeben und weitere 20 min inkubiert. Zu dieser Suspension wurde ein Volumenanteil einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (24:1) gegeben. Das Zwei-Phasen-System wurde einige Minuten vorsichtig geschwenkt und für 30 min bei 17000 x g zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen,

erneut mit einem Volumenanteil der Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung gemischt und zentrifugiert. Die zweite Oberphase wurde vorsichtig abpipettiert, mit 0,6 Volumenanteilen kaltem Isopropanol versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert. Ausgefallene DNA wurde aufgewickelt, in ein Eppendorf-Cap überführt und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet, danach in Wasser gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

2.9.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *Streptomyces lividans* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers unter Nutzung einer Mikrozentrifuge. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Streptomyces lividans* wurde der erste Arbeitsschritt des Protokolls leicht modifiziert. Dem Puffer P1 wurden $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lysozym zugesetzt und die suspendierten Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert, um den Aufschluss zu erleichtern. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA wurde standardmäßig mit 50 μL zehnfach verdünntem Elutionspuffer (EB) durchgeführt.

2.9.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Doppelsträngige DNA wurde zur Analyse und für präparative Zwecke über 0,6-1,5%ige Agarosegele aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in der gewünschten Prozentigkeit in 1x TAE-Puffer (50x TAE-Puffer: 2 M Tris, 50 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt) gelöst, nach dem Abkühlen der Lösung auf 50°C wurde sie unter Zugabe von 0,05% Ethidiumbromid in die Gelkammern gegossen. Laufpuffer in den Elektrophoresekammern war 1x TAE-Puffer. DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (6x DNA-Probenpuffer: 6x TAE, 50% (v/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt, so dass dessen Endkonzentration 1x war. Die Trennung erfolgte typischerweise bei 80-100 Volt. Marker IV und XVI von Roche und die DNA-Leiter von Gibco wurden als interne Größenstandards benutzt. Die DNA-Gele wurden mit dem Eagle-Eye II Videosystem bei 312 nm dokumentiert.

2.9.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers unter Nutzung einer Mikrozentrifuge. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder über Agarosegele mit anschließender Elution aus dem Gel oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit. Die Elution der DNA von den Anionentauschersäulen beider Kits erfolgte standardmäßig mit 30 μL zehnfach verdünntem Elutionspuffer (EB).

2.9.5 Aufkonzentrieren von DNA-Proben

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde durch Einengen des Volumens in der Vakuumzentrifuge erhöht.

2.9.6 DNA-Restriktion

Für analytische und präparative Anwendungen wurde die DNA in 10-30 µL Gesamtvolumen mit 1-5 U Restriktionsenzym pro 0,5-1 µg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 0,5-2 h verdaut.

Für den Southern Blot wurde *Rhodococcus opacus* genomische DNA in parallelen Ansätzen für 16 h mit 7 verschiedenen Restriktionsendonucleasen (HindIII, PstI, EcoRI, XbaI, EcoRV, XhoI, SmaI) verdaut. Zusätzlich wurde DNase-freie RNase zu den Ansätzen gegeben. Das Volumen dieser Ansätze entsprach 80 µL.

2.9.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Zur Dephosphorylierung wurde 1 U Shrimp Alkalische Phosphatase (Roche) zur geschnittenen Vektor-DNA gegeben und der Ansatz wurde für 10-20 min bei 37°C inkubiert.

2.9.8 Ligation mittels T4-Ligase

Ligationen wurden standardmäßig mit dem Rapid Ligation Kit (Roche) durchgeführt. Dazu wurden 2 µL DNA-Verdünnungspuffer, Plasmid-DNA und Insert in einem Gesamtvolumen von 10 µL gemischt, mit 10 µL Ligationspuffer und 1 µL T4-Ligase versetzt. Ligationen mit überhängenden Enden wurden 5-15 min und Ligationen mit glatten Enden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.9.9 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Hanahan hergestellt [129]. *E. coli*-Stämme wurden über Nacht in einer 5 mL-Vorkultur bei 37°C in LB-Medium angezogen. Die Hauptkultur wurde 0,1%ig in 25 mL LB-Medium in einem 100 mL-Schüttelkolben angeimpft und bis zu einem OD₅₅₀ von 0,3-0,5 bei 37°C kultiviert. Danach wurde die Kultur in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, einige Minuten auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8,3 mL einer Lösung bestehend aus 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 11 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8, resuspendiert und anschließend für 1-2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 2 mL Puffer bestehend aus 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 85 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 6,8, resuspendiert. Aliquots von 100 µL wurden in vorgekühlte Eppendorf-Caps gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erzeugten kompetenten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.9.10 Herstellung von Protoplasten aus *Streptomyces lividans*

Die Kultivierung von *Streptomyces lividans* erfolgte in 10 mL YEME-Medium, high sugar mit 0,5% Glycin in 100 mL-Schüttelkolben mit 2 Schikanen. Die Kolben wurden mit 20 µL einer Sporensuspension angeimpft und für 3 Tage bei 200 Upm und 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4500 x g für 15 min und bei 4°C geerntet, der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde zweimal mit 15 mL einer

10,3%igen Saccharoselösung gewaschen und jeweils durch Zentrifugation bei 2200 x g für 10 min und 4°C wieder separiert. Die Zellen wurden anschließend mit 4 mL Lysozymlösung (1 mg·mL⁻¹ in P-Puffer) versetzt und für 15 min bei 30°C inkubiert. Nach vorsichtigem Mischen wurden weitere 5 mL P-Puffer (10,3% Saccharose, 1,4 mM K₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 2 mL·L⁻¹ Spurenelementlösung für *Streptomyces* (2.2.1.2), 0,4 mM KH₂PO₄, 25 mM CaCl₂, 2,5 mM TES, pH 7,2) zugesetzt. Die Suspension wurde nun zur Abtrennung des Mycels durch eine sterile, mit Watte gefüllte Spritze filtriert. Das Filtrat wurde für 7 min bei 1600 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 10 mL P-Puffer suspendiert. 0,5 mL-Aliquots wurden auf Eis bei -80°C eingefroren.

2.9.11 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Kompetente Zellen (100 µL) wurden auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz oder die Plasmid-DNA wurde hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 60 s auf 42°C erhitzt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen sofort auf Eis gekühlt. 300 µL LB-Medium wurden hinzugegeben und der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C für 16-18 h inkubiert. Je nach Plasmid enthielten die Agarplatten Antibiotika wie Ampicillin (100 µg·mL⁻¹) und Chloramphenicol (35 µg·mL⁻¹), um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

2.9.12 Transformation von Plasmiden in *Streptomyces lividans*

Ein Aliquot der Protoplastensuspension wurden unter fließendem, handwarmen Wasser aufgetaut und für 7 min bei 1600 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in dem verbleibenden Tropfen durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert. Der gesamte Ligationsansatz oder Plasmid-DNA (max. 20 µL) wurde zu den Protoplasten gegeben und durch sofortige Zugabe von 0,5 mL einer 25%igen PEG 1000-Lösung in P-Puffer gemischt. Zu diesem Ansatz wurden direkt darauf weitere 4,5 mL P-Puffer gegeben und es wurde für 15 min bei 1600 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 mL P-Puffer aufgenommen und verschiedene Volumina (20, 50, 100, 200 µL) dieser Suspension wurden auf gut getrockneten R2YE-Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion der positiven Klone wurden die Agarplatten nach einem Tag Inkubation bei 30°C mit Antibiotikum überschichtet. Kanamycin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg·mL⁻¹ und Thiostrepton von 25 µg·mL⁻¹ eingesetzt.

2.9.13 Herstellung der Primer

Sämtliche benutzte Primer wurden von der Firma metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt und in lyophilisierter Form geliefert.

2.9.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Erstellung der genspezifischen Sonde für die Southern Hybridisierung, zur Detektion positiver Klone aus der partiellen genomischen Bank, zur Amplifizierung des *laao*-Gens aus genomischer DNA und zum Austausch der Signalsequenz verwendet. Für die Herstellung der Sonde wurde die Taq-Polymerase von Qiagen eingesetzt, für alle anderen Reaktionen die Herculase von Stratagene. Die Konzentrationen der Komponenten im Reaktionsansatz waren, wenn nicht anders erwähnt, 0,2 mM pro dNTP, 1 µM pro Primer und 1x Polymerase-Puffer. PCRs wurden standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Denaturierung	98°C	3 min	
2. Denaturierung	98°C	40 s	
3. Annealing	x °C	30 s	- T abhängig vom Tm der Primer
4. Elongation	72°C	90 s	19-29x zurück zu 2.
5. Elongation	72°C	10 min	

Der Reaktionsansatz (100 µL) zur Herstellung der Sonde enthielt 2 µg *Rhodococcus opacus* genomische DNA und die Oligonucleotide P1for und P2rev (VIII.2.1). 10% DMSO wurden hinzugegeben, um die Zugänglichkeit der DNA zu erleichtern. Der Ansatz wurde mit leichtem Mineralöl überschichtet und folgendes Touch-Down PCR-Programm wurde gestartet:

1. Denaturierung	98°C	3 min	
2.	95°C		Zugabe von 2,5 U Taq-Polymerase
3. Denaturierung	95°C	1 min	
4. Annealing	70-60°C	45 s	
5. Elongation	72°C	1 min	5x zurück zu 3.
6. Denaturierung	95°C	1 min	
7. Annealing	70°C	45 s	
8. Elongation	72°C	1 min	29x zurück zu 6.
9. Elongation	72°C	2 min	

Die gleiche Reaktion wurde auch zur Detektion positiver Klone aus der partiellen genomischen Bank angewandt. In diesem Fall diente Plasmid-DNA als Templat.

2.9.15 Southern Hybridisierung

2.9.15.1 Markierung der Sonde

Die Digoxigenin-Markierung der genspezifische Sonde wurde mit dem DNA-DIG-Labeling Kit durchgeführt. 200 ng des aufgereinigten PCR-Produkts (2.9.14) wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend mit 2 µL Hexanucleotid-Mix, 2 µL dNTP-Markierungsmix (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-

11-dUTP, pH 7,5) und 2 U Klenow-Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µL über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9.15.2 Southern Blot

Die 7 verschiedenen Restriktionsansätze wurden zur Trennung der DNA-Fragmente auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurde digoxigeninmarkierter Standard verwendet. Das Gel wurde nach dem Lauf für 2 x 15 min in 0,5 M NaOH-1,5 M NaCl-Lösung langsam geschüttelt, um die DNA zu denaturieren. Nach einem Spülschritt mit Wasser wurde es 2 x 15 min in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit 1,5 M NaCl neutralisiert. Anschließend wurde die DNA mittels Kapillartransfer in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) über Nacht aus dem Gel auf eine Nylon66-Membran (45 µm, Serva) gebロットet. Die DNA wurde nach dem Transfer durch Bestrahlung mit einem UV-Transilluminator auf der Membran quervernetzt.

2.9.15.3 Prähybridisierung und Hybridisierung

In einer Glasröhre wurde die Nylonmembran mit 20 mL Standardhybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,1% N-Laurylsarcosin, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz, 10 mM Maleinsäure, pH 7,0) für 4 h bei 68°C unter langsamen Drehen prähybridisiert. Danach wurden 8 mL Standardhybridisierungspuffer und 60 µL der durch Erhitzen denaturierten Sonde zur Membran in die Glasröhre gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 68°C statt. Die Membran wurde anschließend für 2 x 5 min mit 2 x SSC-Puffer mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgten zwei weitere jeweils 15-minütige Waschschrirte mit 0,5 x SSC-Puffer mit 0,1% SDS bei 68°C.

2.9.15.4 Detektion mittels Chemolumineszenz

Nach dem Waschen wurde die Membran nach folgendem Schema bei Raumtemperatur in den verschiedenen Lösungen inkubiert: 1 min in Waschpuffer (100 mM Maleinsäurepuffer, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3% Tween 20), 45 min in Blocking Lösung (100 mM Maleinsäurepuffer, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% (w/v) Blocking Reagenz), 30 min in Antikörperlösung (30 mL Blocking Lösung + 3 µL Anti-Digoxigenin-Antikörper), 2 x 15 min in Waschpuffer (s.o.) und 2 min in Detektionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl). Auf der gesamten Membranoberfläche wurde nun gleichmäßig 1 mL CSPD-Substratlösung verteilt, die Membran wurde anschließend zwischen zwei Lagen Frischhaltefolie gelegt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Ein Hyperfilm ECL (Amersham-Pharmacia Biotech) wurde mit einer Belichtungszeit von 7 min auf die substratbedeckte Membran gelegt und danach sofort entwickelt.

2.9.15.5 Erstellen einer partiellen genomischen Bank

Rhodococcus opacus genomische DNA wurde mit Smal verdaut und in einem 0,8%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA, die einer Größe von ca. 3,1-3,4 kb entsprach, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Diese DNA wurde in Smal-geschnittenen, dephosphorylierten pUC18 ligiert und in *E. coli* XL1blue transformiert.

2.9.15.6 Detektion positiver Klone

Mischkulturen von jeweils 5 Klonen aus der partiellen genomischen Bank wurden über Nacht im 5 mL-Maßstab angezogen und die Plasmid-DNA isoliert. Die Detektion positiver Klone erfolgte mittels PCR (2.9.14) mit den Primern P1for und P2rev und mit 1 µL der zehnfach verdünnten Plasmid-DNA als Templat. Im Falle eines PCR-Produkts in der erwarteten Größe wurden die 5 Klone der entsprechenden Mischkultur noch einmal vereinzelt angezogen und deren Plasmid-DNA isoliert. Die Detektion erfolgte wiederum durch PCR.

2.9.16 Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) mit ABI-Nucleinsäure-Sequenzierautomaten durchgeführt.

2.9.17 Renaturierung von Inclusion Bodies

Das Zellpellet wurde 25%ig in Aufschlusspuffer (20 mM Tris/HCl, 2 M KCl, 2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 1 mg·mL⁻¹ Lysozym pH 8,0) suspendiert und für 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein Ultraschallaufschluss durchgeführt (2.3.1.2) und für 15 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, 2 M KCl, 2 mM EDTA pH 8,0) gewaschen, in Solubilisierungspuffer (8 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA pH 8,0) gelöst und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Erneut wurde für 15 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert, um nicht gelöste Zellbestandteile abzutrennen. Die Renaturierung erfolgte durch Zugabe von Renaturierungspuffer A (20 mM Tris/HCl, 2 M KCl, 20 mM Glycin, 2 mM EDTA, 20 µM FAD, pH 8,0) oder B (wie A, nur 200 µM FAD). Dazu wurde die Probe schrittweise über mehrere Stunden um den Faktor 20 verdünnt.

2.10 Kristallisation der L-AAO

2.10.1 Enzympräparation und Vorbereitung der Probe

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* wurde nach dem dreistufigen Standard-Reinigungsprotokoll aufgereinigt (2.4.1). Die Sauberkeit der Probe wurde mittels SDS-Gel und MALDI/TOF-MS überprüft. Nach der Reinigung wurde die Probe mittels Ultrafiltration in einer Rührzelle in 20 mM Glycin/NaOH pH 8,6 umgepuffert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration unter Nutzung einer 6 mL-Vivaspin Ultrafiltrationseinheit (Vivascience) auf 22 mg·mL⁻¹ erhöht. Zur Beseitigung von Staub und anderen Partikeln wurde die konzentrierte Proteinlösung durch Microfiltrationseinheiten für die Zentrifuge (0,5 mL Volumen, 0,2 µm; Amicon) filtriert. Unter diesen Bedingungen war die Lösung für mehrere Wochen bei 4°C lagerbar.

2.10.2 Kristallisationsbedingungen

Alle Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen in Kristallisationsplatten mit jeweils 24 Reservoirs durchgeführt. Das Volumen der eingesetzten Reservoirlösungen betrug jeweils 500 μL . Auf dem Steg wurden 2 μL der Probe mit 2 μL der Reservoirlösung vorsichtig vermischt. Die Platten wurden mit durchsichtigem Klebeband luftdicht verschlossen und bei Temperaturen zwischen 12 und 25°C inkubiert. Bei Bedarf wurden 0,5 μL einer Detergenzienlösung zu dem Tropfen pipettiert.

Die eingesetzten Reservoir- und Detergenzienlösungen wurden entweder verschiedenen Screening Kits von Hampton Research entnommen oder unter Zusatz von 1 mM Natriumazid aus hochkonzentrierten Stammlösungen hergestellt.

2.10.3 Impfkristallisation

Aus einem Kristallisationstropfen, in dem Kristallstrukturen entstanden waren, wurden mit der Reservoirlösung des gleichen Ansatzes vier Verdünnungen (1:50, 1:200, 1:500, 1:1000) hergestellt. Diese Suspensionen wurden für einige Minuten auf höchster Stufe gevortext, um möglichst kleine Kristallbruchstücke zu erzeugen.

Zwei Tage zuvor war eine Kristallisationsplatte (2.10.2) vorbereitet und zur Equilibrierung bei 12°C inkubiert worden. Die Präzipitantkonzentration wurde so niedrig ausgewählt, dass sich innerhalb dieser Zeit keine Kristalle bildeten. Von den vier Kristallverdünnungen wurden jeweils 0,5 μL zu den sitzenden Tropfen pipettiert und die Platte erneut bei 12°C inkubiert.

2.11 Modellierung der dreidimensionalen Struktur der L-AAO

Versuche zur Homologiemodellierung der dreidimensionalen Struktur der *Rhodococcus opacus* L-AAO wurden mit Hilfe des Programms Swiss-Model (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) durchgeführt. Die Strukturen wurden mit dem Programm Swiss-Pdb Viewer (Version 3.7b1) bearbeitet.

2.12 Präparation von D-Aminosäuren

Bei den präparativen Ansätzen wurden die verwendeten Puffer und Lösungen und der Luftraum von verschlossenen Reaktionsgefäßen vor Versuchsbeginn mit O_2 begast. Um bei kleinen Reaktionsvolumina eine schonende Durchmischung und eine möglichst große Oberfläche für den Gasaustausch zu gewährleisten, wurden einige Ansätze in 15 mL-Reagenzgläser gegeben und nach folgendem Prinzip auf einem Schütteltisch inkubiert (Abb. 11).

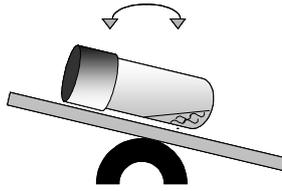


Abb. 11: Schematische Darstellung der Wippe für Ansätze mit ganzen Zellen und freier L-AAO. Das Volumen der Reaktionsgefäße betrug 15 mL und das der Flüssigkeit 1-5 mL.

2.12.1 Enzymimmobilisierung

Die L-AAO wurde auf die Trägermaterialien Eupergit C[®] und Eupergit C 250L[®] immobilisiert. Das Enzym lag während der Immobilisierung in Kpi-Puffer pH 8,0 vor. 0,2 g Trägermaterial wurden mit 1,2 mL L-AAO-Lösung für 1-4 Tage bei 7°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trägermaterial wurde anschließend auf einem Filter mit 5 x 10 mL Wasser gewaschen. Vor jeder Einwaage wurde das Immobilisat auf die gleiche Weise filtriert, so dass die Bestimmung des Feuchtgewichts möglichst reproduzierbar war. Nach der Immobilisierung wurde der Träger in 50 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 8,6 mit 1 mM Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

2.12.2 Herstellung von quervernetzten Enzymkristallen (CLECs)

2.12.2.1 Kristallisation

Homogen aufgereinigte L-AAO wurde in 0,1 M HEPES pH 7,8 in 50 µL-Ansätzen kristallisiert. Als Präzipitant wurden PEG 4000 und Isopropanol, als Kristallisationshilfe Cymal-5[®] eingesetzt. Die Kristallisationsansätze wurden bei 7°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen mikroskopiert.

2.12.2.2 Quervernetzung

Die Kristallisationsansätze wurden bei 100 x g für 1 h zentrifugiert und die Überstände wurden vorsichtig abgenommen. Die Quervernetzung erfolgte durch Zugabe von Glutardialdehyd in Gegenwart von 20% PEG 4000 in 0,1 M HEPES pH 7,8 in einem Gesamtvolumen von 50 µL. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur. Die quervernetzten Kristalle wurden zweimal mit 50 µL 0,1 M HEPES pH 7,8 gewaschen und in 20 µL Puffer bei 4°C aufbewahrt.

2.12.3 Einsatz ganzer Zellen

Tiefgefrorene *Rhodococcus opacus* Zellen wurden aufgetaut und zweimal mit 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,0 gewaschen. 0,2 g Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 5 mL suspendiert. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM DL-Phenylalanin in 50 mM Puffer. In einer Versuchsreihe wurden die Reaktionstemperatur, der Puffer, der pH-Wert und die Art der Durchmischung variiert.

2.12.4 Einsatz freier L-AAO

Partiell aufgereinigte L-AAO wurde zur Racematspaltung von DL-Phenylalanin und DL-Serin eingesetzt. Vorversuche wurden im 1 mL-Maßstab durchgeführt. Präparative Ansätze mit DL-Serin erfolgten in einem temperierbaren Titrimetro-Reaktionsgefäß im 200 mL-Maßstab. Das Enzym wurde in vier aufeinanderfolgenden Zyklen eingesetzt und über Ultrafiltration zurückgewonnen.

2.12.5 Einsatz von Immobilisat

Sämtliche Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 1,5 mL in 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Ansätze enthielten jeweils 0,2 g feuchtes Immobilisat, 5 mM DL-Phenylalanin, 444 U Katalase in 0,4 M TEA/HCl-Puffer pH 7,8. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 1200 Upm auf einem Eppendorf-Schüttler.

2.12.6 Einsatz der CLECs

Die Ansätze enthielten 5 µL der jeweiligen L-AAO-Kristallsuspension, 10 mM DL-Phenylalanin, 260 U Katalase in 0,1 M HEPES pH 7,8. Das Gesamtvolumen betrug 50 µL. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 1200 Upm auf einem Eppendorf-Schüttler.

2.12.7 Enzym-Membran-Reaktor (EMR)

Das Volumen des Reaktors betrug 4 mL. Die Anlage wurde vor Versuchsbeginn mit 0,3% Peressigsäure sterilisiert und mit 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,6 neutralisiert. Die Membran (YM 10) wurde mit 3 mL BSA-Lösung (0,5 mg·mL⁻¹) benetzt, um die Adsorption der L-AAO zu verhindern. Mit einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ wurde der Reaktor kontinuierlich mit einer 1 mM DL-Phenylalaninlösung in 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,6 gespült. Diese Lösung wurde direkt vor Versuchsbeginn mit O₂ begast, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Die Reaktion wurde durch Injektion von 20 µL L-AAO-Lösung (1,1 U) gestartet. Die Verweilzeit betrug 4 min. Der Durchlauf wurde mit einem Fraktionssammler aufgefangen und analysiert.

2.12.8 Aminosäureanalytik mittels HPLC

Die Trennung und quantitative Analyse der Aminosäurenantimere erfolgte über HPLC. Direkt nach der Probenahme wurde die Reaktion durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt und die Probe durch Zentrifugation geklärt. 20 µL einer geeignet verdünnten Probe wurden mit 180 µL 100 mM Natriumborat-Puffer pH 10,4 gemischt. Die Probe wurde durch Zugabe von 20 µL Derivatisierungslösung (260 mM *N*-Isobutyryl-L-cystein und 170 mM *o*-Phthaldialdehyd in 100 mM Natriumborat-Puffer pH 10,4) modifiziert (Abb. 12).

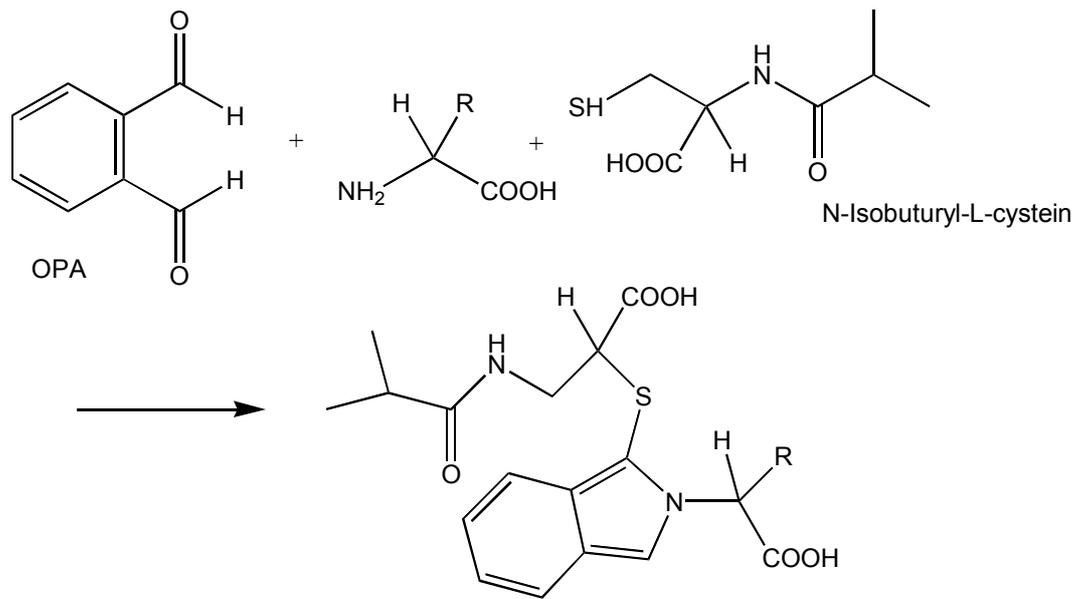


Abb. 12: Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA und *N*-Isobuturyl-L-Cystein.

Die Analyse erfolgte unter Nutzung einer RP-18-Säule (h 250 x Ø 4 mm), die mit Kromasil, 5 µm, gepackt war (Phenomenex). Folgende Laufpuffer wurden zur Trennung der derivatisierten Aminosäuren eingesetzt: A – 23 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,5, B – Acetonitril:Wasser (10:1,5). Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung (Ex. 340 nm, Em. 440 nm).

III Ergebnisse

1 Screening nach L-AAO-Bildnern

Die meisten der bisher beschriebenen L-AAOs stammen aus Schlangengift. Die präparative Anwendung dieser Enzyme ist aufgrund ihrer Herkunft umstritten. Zusätzlich ist die Verfügbarkeit verschiedenster, auch bakterieller L-AAOs für die technische Anwendung limitiert, da noch keine mikrobiellen, heterologen Expressionssysteme bekannt sind. Aus diesen Gründen sollten neue mikrobielle L-AAOs aus Bodenisolaten und Sammlungsstämmen isoliert und ausführlich charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Screeningverfahren eingesetzt, das durch die Integration eines Farbstofftests bestehend aus Peroxidase und o-Dianisidin in das Agarmedium eine Vorselektion L-AAO-positiver Stämme erleichtern sollte (Abb. 13).

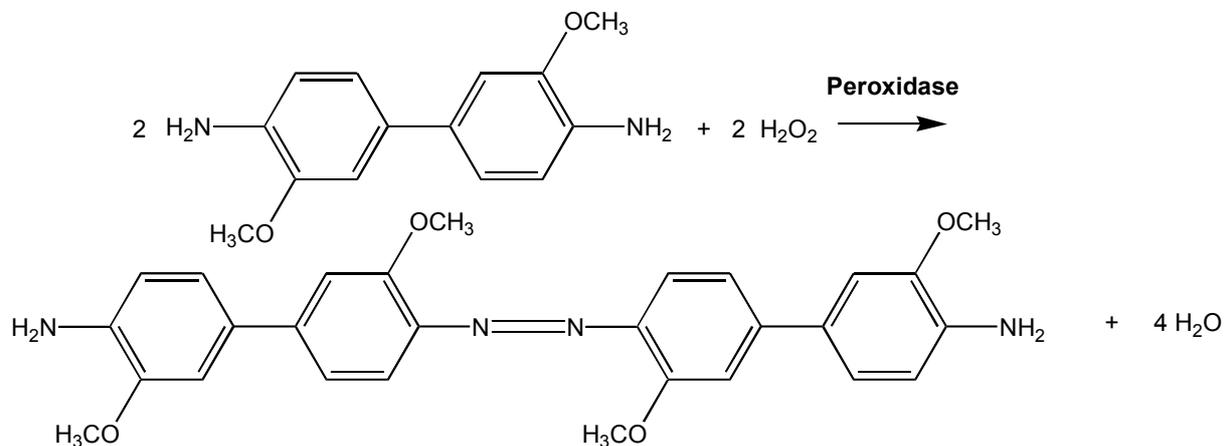


Abb. 13: Oxidation von o-Dianisidin zu einem rot-braun gefärbten Bisazobiphenyl-Produkt [130].

Die untere Nachweisgrenze dieses Testsystems wurde mit einer H_2O_2 -Verdünnungsreihe bestimmt. Dabei erzeugt 1 nmol H_2O_2 einen stabilen, gut sichtbaren Farbumschlag im Agarmedium.

Eine große Anzahl an Bodenisolaten und Sammlungsstämmen wurde nach der Anzucht in Flüssigmedium mit dem POX/o-Dianisidin-Assay auf L-AAO-Aktivität untersucht. Der Standardenzymtest wurde mit jeweils elf Substraten durchgeführt (L-Phe, D-Phe, L-Leu, L-Val, L-Glu, L-Pro, D-Pro, L-tert-Leu, DL-tert-Leu, L-Ala und L-Lys). Die Konzentration der Substrate im Test betrug 10 mM, mit Ausnahme von tert-Leu, das in einer Konzentration von 30 mM eingesetzt wurde. Die Nutzung von Mikrotiterplatten ermöglichte die gleichzeitige Messung von elf potentiellen Substraten und acht Enzymquellen (Abb. 14) und senkte das notwendige Probenvolumen auf ein Minimum.

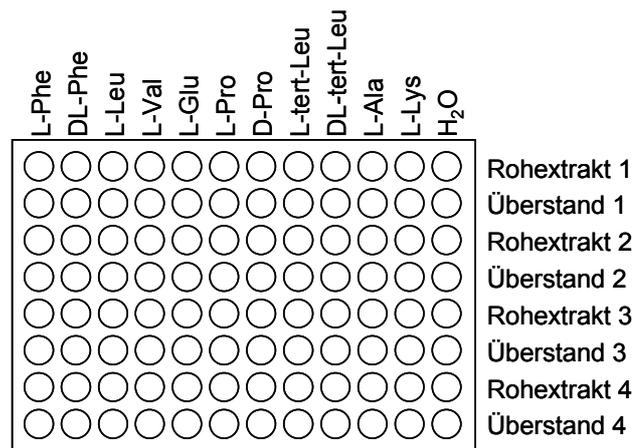


Abb. 14: Pipettierschema einer Mikrotiterplatte zur Untersuchung verschiedener Mikroorganismen auf L-AAO-Aktivität.

Bei Strategie I wurden 125 Bodenproben auf das Medium AS 1a (8 Aminosäuren als C- & N-Quelle, pH 5,5 und pH 8,0) ausplattiert und inkubiert. Bei sehr vielen Kolonien war nach bis zu 14 Tagen eine Rotbraunfärbung des Mediums und/oder der Organismen zu beobachten. 117 Stämme wurden nach Anlegen der Reinkulturen in Flüssigmedium AS 1c (pH 5,5) angezogen, 99 Stämme in Flüssigmedium AS 1c (pH 8,0). Enzymtests mit den Rohextrakten und Überständen dieser Stämme ergaben keine signifikanten Aktivitäten. Das Wachstum der Organismen war vor allem bei pH 8,0 oft sehr schlecht. Zudem wurde häufig eine Dunkelbraunfärbung des Flüssigmediums beobachtet.

46 Bodenproben wurden auf das Medium AS 2a (pH 6,5) ausplattiert, das im Gegensatz zu AS 1a keine aromatischen Aminosäuren enthielt. In dem Flüssigmedium AS 2c (pH 6,5) wurden 9 Stämme angezogen. In diesem Medium trat keine Braunfärbung auf. Auch unter diesen Bedingungen wurden keine L-AAO Bildner detektiert.

Eine weniger zeitaufwendige Screeningmethode ist die Anreicherung von Mikroorganismen in Flüssigmedium (Strategie II). 72 Bodenproben wurden für dieses Verfahren eingesetzt, nach der Reinheitskontrolle wurde von 56 Stämmen eine Flüssigkultur angelegt. Das Isolat No. 14A zeigte deutlich messbare L-AAO-Aktivität im Rohextrakt ($12 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ für L-Leu) bei sehr hoher Katalase-Aktivität ($490 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). L-Lys, L-Phe und L-Ala wurden mit etwas niedrigeren Aktivitäten umgesetzt. Die L-AAO-Aktivität konnte nach drei weiteren Kultivierungsschritten in dem gleichen Medium jedoch nicht mehr reproduziert werden. Das Isolat 14A wurde durch 16SrRNA-Analyse von der DSMZ charakterisiert und als *Alcaligenes faecalis* (Risikogruppe 2) identifiziert.

Das Screening der Stammsammlung wurde in zwei Abschnitte unterteilt. Nach Ausplattieren der verschiedenen Mikroorganismen auf Agarmedium mit Indikatorsystem (AS 2a) wurde die Farbstoffentwicklung beobachtet. Stämme der Gattungen

Rhodococcus, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* und *Lactobacillus* zeigten die stärksten Reaktionen.

Auffälligerweise gehörte ein Großteil der in diesem Farbstofftest positiven Stämme zur Unterordnung Corynebacterianae, die in drei Familien unterteilt wird (Abb. 15). Um Vertreter aus allen Familien testen zu können, wurden im nächsten Arbeitsschritt auch noch Stämme der Gattung *Gordona* einbezogen.

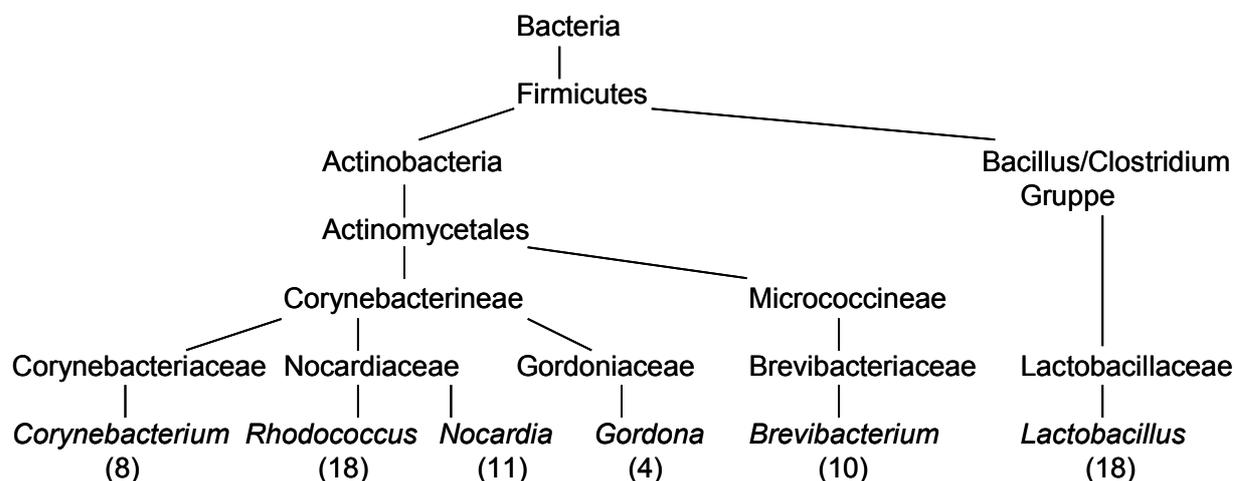


Abb. 15: Taxonomische Einordnung der Stämme, die photometrisch auf L-AAO-Aktivität im Rohextrakt und Medienüberstand untersucht wurden. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Stämme pro Gattung angegeben.

Insgesamt 69 Stämme der in Abb. 15 gezeigten Gattungen wurden in Flüssigmedium kultiviert und auf L-AAO-Aktivität im Rohextrakt und im Überstand untersucht. Acht Stämme zeigten im Rohextrakt L-AAO-Aktivität (Tab. 3). *Rhodococcus opacus* DSM 43250 war der einzige Stamm, bei dem die Aktivität quantifizierbar war. Bei der Analyse der anderen Rohextrakte mit dem POX/o-Dianisidin-Assay trat ein Farbumschlag in Anwesenheit von L-Aminosäuren erst nach einem längeren Zeitraum (bis zu mehreren Stunden) auf.

Tab. 3: Mikroorganismen mit L-AAO-Aktivität.

Stamm	DSM No.	L-AAO (10 mM L-Leu)		Katalase		Protein mg·mL ⁻¹
		+/-	mU·mL ⁻¹	+/-	U·mL ⁻¹	
<i>Rhodococcus opacus</i>	43250	+	38	+	1430	20,5
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	743	+		+	n.d.	14,5
<i>Rhodococcus corallinus</i>	43248	+		+	n.d.	6,92
<i>Nocardia restricta</i>	43199	+		+	4840	15,7
<i>Nocardia calcarea</i>	43188	+		+	n.d.	11,7
<i>Brevibacterium linens</i>	20425	+		+	n.d.	15,0
<i>Brevibacterium spec.</i>	20165	+		+	n.d.	11,0
<i>Brevibacterium epidermis</i>	20660	+		+	146	n.d.

Aufgrund der Ergebnisse aus dem Screening der Stammsammlung wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, um gezielt Stämme der Gattungen *Rhodococcus* und *Nocardia* aus Bodenproben zu isolieren. Dazu wurden 99 Bodenproben auf Selektivmedium ausplattiert und die Kolonien anschließend auf M65 mit Indikatorsystem übertragen. 20 Isolate wurden nach der Reinheitskontrolle in M65-Flüssigmedium angezogen. Von diesen Organismen zeigten 4 Stämme D-AAO- und ein Stamm sehr schwache L-AAO-Aktivität. Das Isolat 217 zeigte im Rohextrakt die höchsten D-AAO-Aktivitäten. Der Stamm wurde durch 16SrRNA-Analyse von der DSMZ charakterisiert und als *Arthrobacter protophormiae* (Risikogruppe 1) identifiziert.

Nur zwei Stämme zeigten nach diesem umfangreichen Screening deutlich messbare L-AAO-Aktivitäten: das Isolat 14A, das später als *Alcaligenes faecalis* identifiziert wurde, und der Sammlungsstamm *Rhodococcus opacus* DSM 43250. Aufgrund der gut reproduzierbaren Enzymexpression in *Rhodococcus opacus*, der höheren Aktivitäten im Rohextrakt und der Zuordnung dieses Stammes zur Risikogruppe 1 wurde die L-AAO aus diesem Organismus weiter bearbeitet. Beim Screening nach L-AAOs wurde als Nebenprodukt auch ein neuer D-AAO-Bildner identifiziert (*Arthrobacter protophormiae*). D-AAOs kommen ubiquitär in Eukaryoten vor. Die Vermutung, dass auch Bakterien diese Enzyme bilden können, wurde durch diverse Sequenzanalysen gestützt, jedoch wurde bisher keine bakterielle D-AAO charakterisiert. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit auch versucht, die D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* aufzureinigen, um erste biochemische Informationen über eine bakterielle D-AAO zu erhalten.

2 L-AAO aus *Rhodococcus opacus* (Wildtyp L-AAO)

2.1 Expression der L-AAO in *Rhodococcus opacus*

2.1.1 Medienoptimierung im Schüttelkolben

Verschiedene Medien wurden zur Optimierung der Expressions- und Wachstumsbedingungen in *Rhodococcus opacus* untersucht.

Die L-AAO ließ sich reproduzierbar in M65 exprimieren. Zum besseren Verständnis wurde *Rhodococcus opacus* in diesem Medium in der RAMOS-Anlage kultiviert. Über die gesamte Wachstumsdauer wurden Proben genommen und analysiert. In Abb. 16 sind die Sauerstofftransferrate (OTR), die Zellfeuchtmassen, die spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt und die Zuckerkonzentrationen im Überstand in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer dargestellt. Die L-AAO-Aktivität wurde photometrisch mit dem POX/o-Dianisidin-Assay bestimmt.

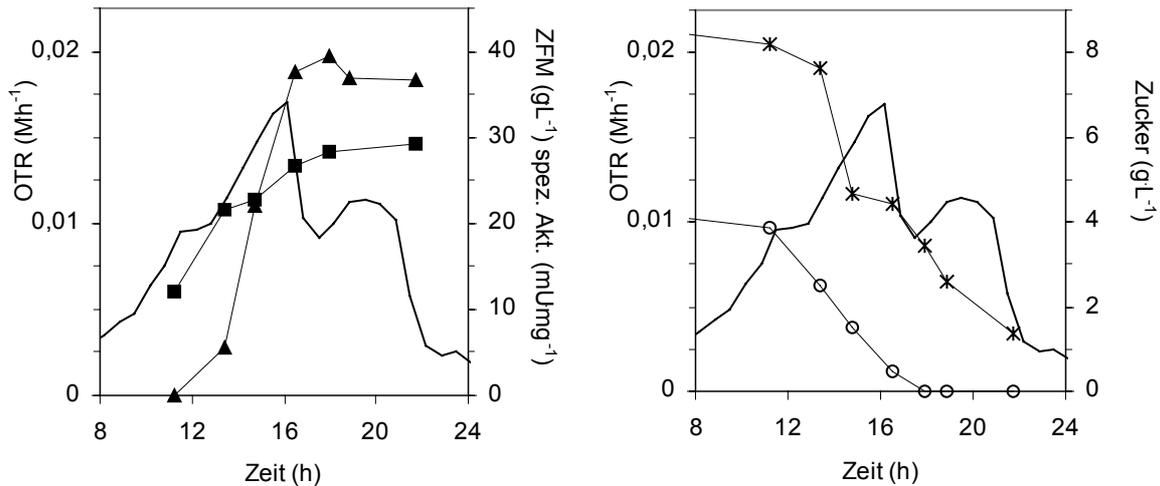


Abb. 16: Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in M65: OTR-Verlauf (-), ZFM (■), spez. L-AAO-Aktivität (▲), Glucose- (O) und Maltosekonzentration (*) in Abhängigkeit von der Zeit.

Bei Betrachtung des OTR-Verlaufs fällt auf, dass die Kurve nach 17 h Kultivierungsdauer scharf einknickt. Zu diesem Zeitpunkt war im Überstand keine Glucose mehr nachweisbar. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der plötzlich sinkende Sauerstoffverbrauch durch den kompletten Abbau der Glucose begründet war. Jedoch sank auch die Maltosekonzentration im Überstand während der ersten 17 h. Dieses Phänomen spricht gegen eine klassische Diauxie, in der die zweite, weniger gut verwertbare Kohlenstoffquelle erst nach komplettem Abbau der ersten verstoffwechselt wird.

Das Wachstum der Zellen verlangsamte sich nach Verbrauch der Glucose, die Zellfeuchtmasse nahm nur noch geringfügig zu. Ebenso blieb die spezifische L-AAO-Aktivität auf einem konstanten Wert (36-40 mU·mg⁻¹).

Interessante Zusammenhänge zeigten sich beim Vergleich der Abbauraten verschiedener L-Aminosäuren aus dem Überstand mit der L-AAO-Aktivität (Abb. 17). L-Alanin wurde während der ersten 11 h mit einer Abbauraten von 0,09 mM·h⁻¹ verwertet. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine L-AAO detektiert wurde, muss der Abbau von L-Alanin in *Rhodococcus opacus* zu Beginn der Wachstumsphase über alternative enzymatische Wege wie zum Beispiel über Transaminasen ablaufen.

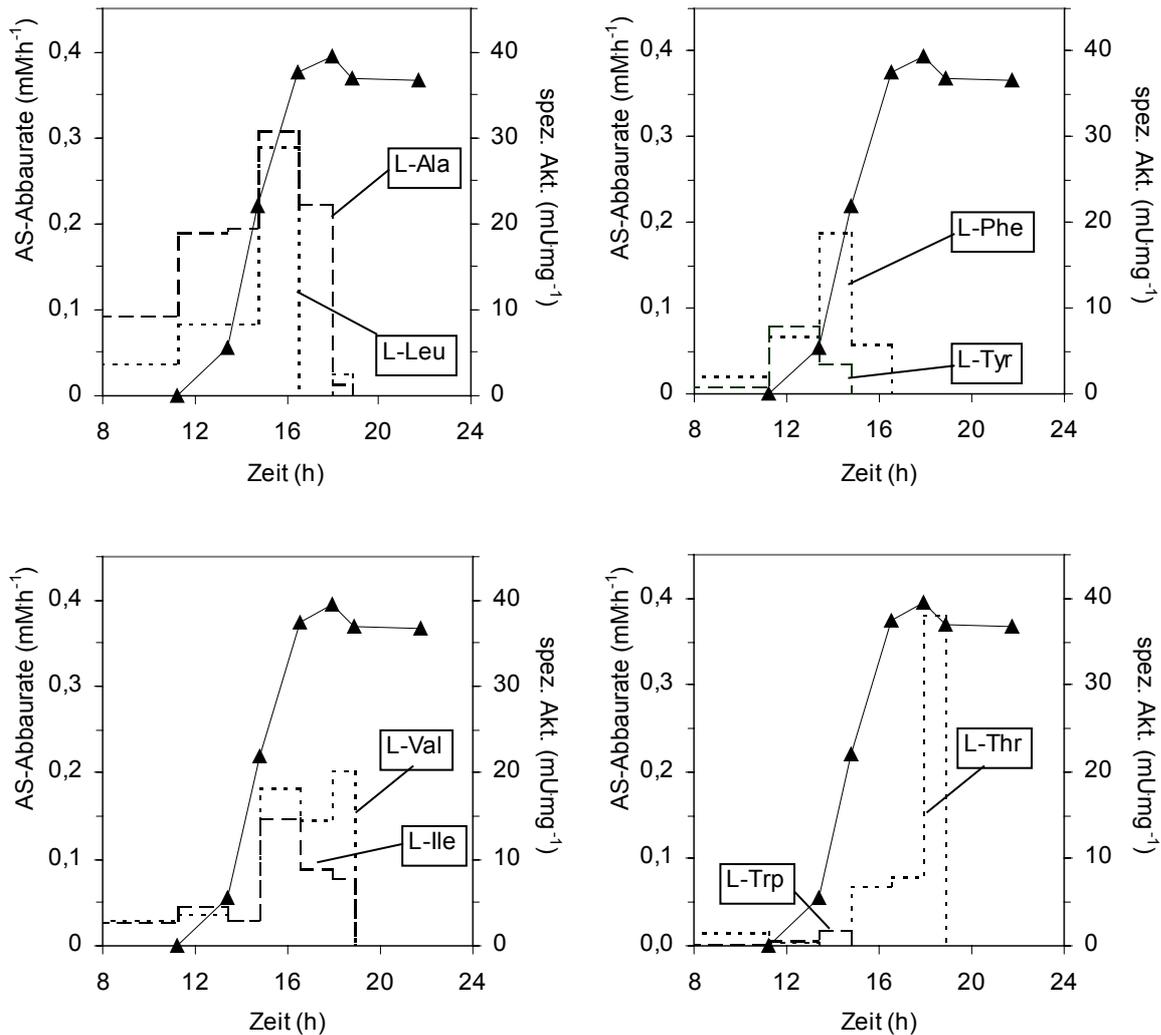


Abb. 17: Die Abbauraten von 8 verschiedenen Aminosäuren aus dem Medienüberstand in Abhängigkeit von der Zeit und der spez. L-AAO-Aktivität im Rohextrakt (▲).

Bei allen anderen L-Aminosäuren stieg die Abbaureate deutlich mit zunehmender L-AAO-Aktivität an. Dies lässt vermuten, dass ein Großteil der im Medium vorhandenen L-Aminosäuren durch die L-AAO oxidiert wurde. In Abb. 18 ist der Abbau von acht L-Aminosäuren zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ($t_1 = 14,8$ h; $t_2 = 17,9$ h) und die Selektivitätskonstante ($k_{cat} \cdot K_M^{-1}$) für die jeweiligen Aminosäuren aufgetragen. Die Wechselzahl k_{cat} wurde nach Gl. 3 bestimmt. In der Berechnung wurde das Molekulargewicht 106,7 kDa für die dimere Form der L-AAO eingesetzt.

$$k_{cat} = \frac{n_{\text{Substrat}}}{n_{\text{L-AAO}} \cdot t} \left[\text{s}^{-1} \right]$$

Gl. 3: k_{cat} = Wechselzahl, t = Zeit, n_{Substrat} = Stoffmenge des Substrats, $n_{\text{L-AAO}}$ = Stoffmenge der L-AAO

Die L-Aminosäuren, die einen hohen $k_{cat}K_M^{-1}$ -Wert aufweisen (L-Tyr, L-Phe, L-Trp), wurden schneller abgebaut als solche mit einem niedrigen (L-Ile, L-Val) oder L-Aminosäuren, die von der L-AAO gar nicht als Substrat akzeptiert werden (L-Thr).

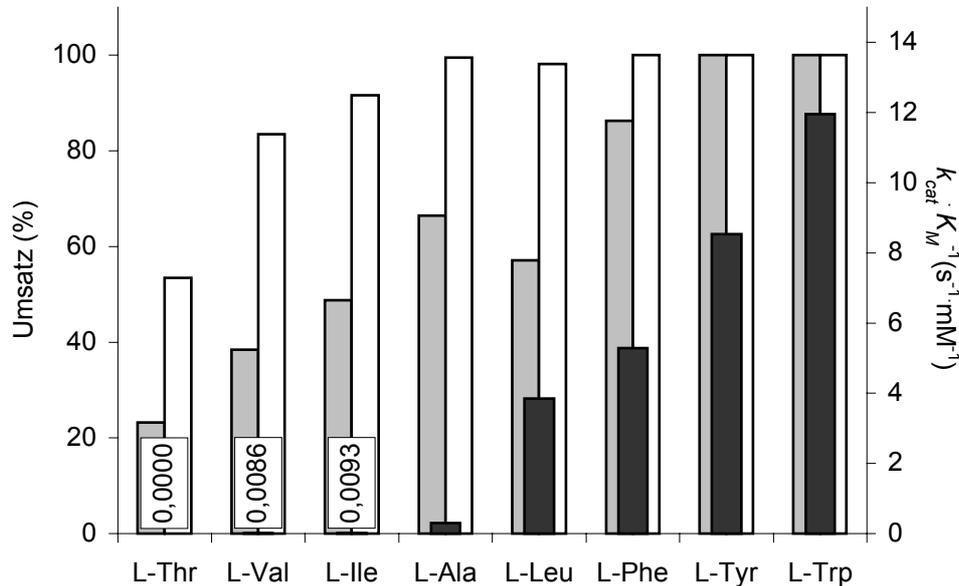


Abb. 18: Zusammenhang zwischen der Aminosäureabbau im Medienüberstand zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung (14,7 h - grauer Balken, 17,9 h - weißer Balken) und der Spezifitätskonstanten ($k_{cat}K_M^{-1}$ - schwarzer Balken) der jeweiligen Aminosäure.

Eine Überschlagsrechnung ergab, dass zum Zeitpunkt 16,5 h die gemessene L-AAO-Aktivität (21 nmol/(min·mL Medium)) in der gleichen Größenordnung lag wie die Summe der Abbauraten aller analysierten L-Aminosäuren (28 nmol/(min·mL Medium)). Auch unter der Annahme, dass die photometrisch für L-Alanin bestimmten Aktivitätswerte der L-AAO nicht mit den Aktivitäten unter physiologischen Bedingungen übereinstimmen und dass vermutlich noch andere Enzyme am Aminosäureabbau beteiligt sind, zeigte diese Abschätzung eine erstaunlich gute Übereinstimmung.

Die Zusammensetzung des M65-Mediums wurde in einer weiteren Versuchsreihe variiert. Entweder wurde eine L-Aminosäure zugesetzt oder die Konzentration eines der ursprünglichen Medienbestandteile erhöht. Die Aminosäuren L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Arginin wurden ausgewählt, da sie zu den gut verwertbaren Substraten der L-AAO gehören.

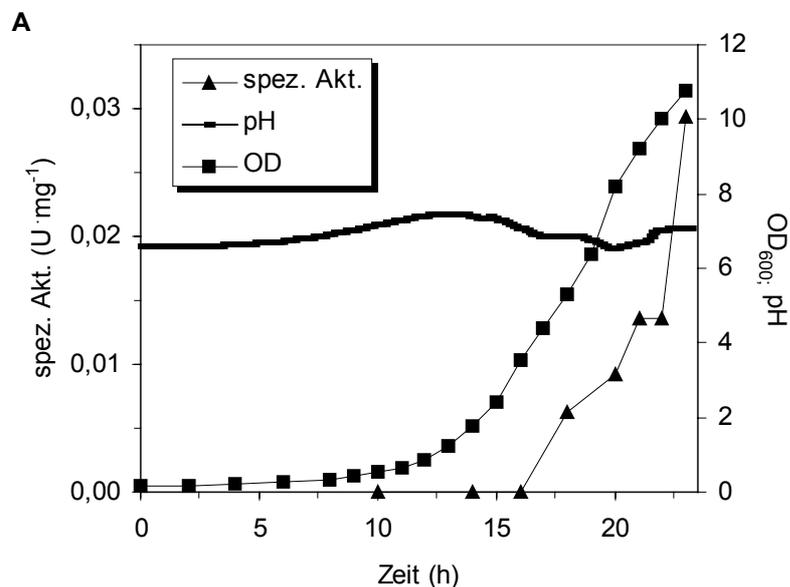
- M65 + L-Leu: + 6 g·L⁻¹ L-Leucin
- M65 + L-Phe: + 6 g·L⁻¹ L-Phenylalanin
- M65 + L-Arg: + 6 g·L⁻¹ L-Arginin
- M65 + Hefeextrakt: + 2 g·L⁻¹ Hefeextrakt
- M65 + Glucose: + 2 g·L⁻¹ Glucose

Die Kurvenverläufe dieser Kultivierungen sind im Anhang (VIII1) aufgelistet (Abb. 72 - Abb. 76). In diesem Versuch wurde neben dem OTR auch noch der CTR bestimmt und aus diesen Daten der Respiratorische Quotient (RQ) ausgerechnet. Einen besonderen Einfluss auf die L-AAO-Expression hatte der Zusatz von L-Arginin. Die lag-Phase wurde verkürzt, der OTR stieg unter diesen Bedingungen bis auf $0,22 \text{ M}\cdot\text{h}^{-1}$. Die L-AAO-Bildung wurde in Gegenwart von L-Arginin jedoch komplett unterdrückt.

Der Zusatz von L-Leucin und L-Phenylalanin sowie die Erhöhung der Glucose- und Hefeextraktkonzentration hatten geringe Auswirkungen auf die Expression der L-AAO. Die maximalen spezifischen Aktivitäten lagen mit $36 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung wie zuvor. Das Enzym wurde unter diesen Bedingungen schneller wieder abgebaut als in M65 ohne Zusätze. Aus diesem Grund wurde M65-Medium für die Fermentation von *Rhodococcus opacus* zur Produktion der L-AAO ausgewählt.

2.1.2 Fermentation

Rhodococcus opacus wurde zur Produktion der L-AAO in M65-Medium im 10 L-Maßstab fermentiert. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 19 dargestellt.



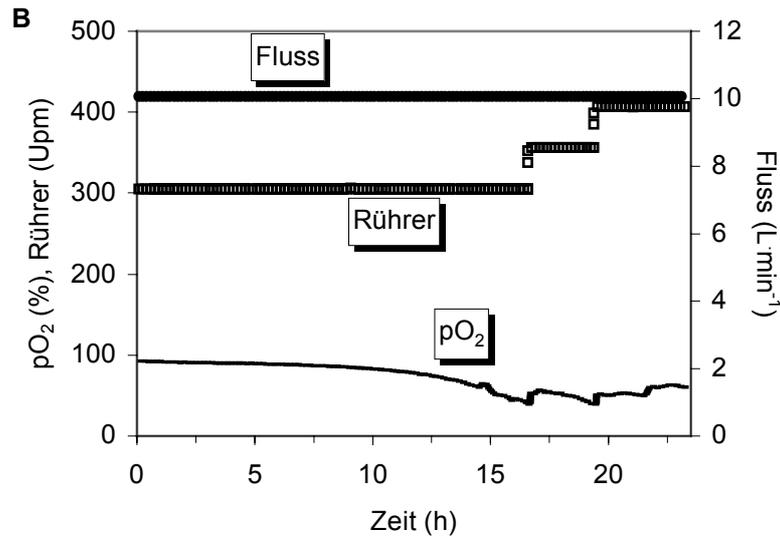


Abb. 19: Ergebnisse der Fermentation von *Rhodococcus opacus* im 10 L-Maßstab. **A** zeigt die optische Dichte, die spezifische Aktivität und den pH-Verlauf. Die L-AAO-Aktivität wurde mit dem POX/o-Dianisidin-Assay bestimmt. In **B** ist der pO₂, die Rührergeschwindigkeit und die Begasungsrate in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer dargestellt.

Die lag-Phase dauerte bei der Fermentation etwas länger als im Schüttelkolben. In der exponentiellen Phase (zwischen 12 und 17 h) vermehrte sich *Rhodococcus opacus* mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$. Nach 20 h war keine Glucose im Überstand mehr nachzuweisen. Die Zellen erreichten nach 23 h Fermentationsdauer eine spezifische Aktivität von $30 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. *Rhodococcus opacus* bildete unter diesen Bedingungen keine Säuren, der pH-Wert blieb während der gesamten Fermentation bei $\text{pH } 7 \pm 0,5$. Aus 10 L Medium wurden durch Zentrifugation 150 g Zellen geerntet.

2.2 Reinigung der L-AAO aus *Rhodococcus opacus*

Für die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* wurden zwei Aufreinigungsprotokolle im Labormaßstab entwickelt.

2.2.1 Isolierung aus 15-25 g Zellfeuchtmasse

Die L-AAO wurde durch drei verschiedene säulenchromatographische Trennverfahren gereinigt. Die Chromatogramme dieser einzelnen Reinigungsschritte sind in den Abb. 20 - Abb. 22 dargestellt.

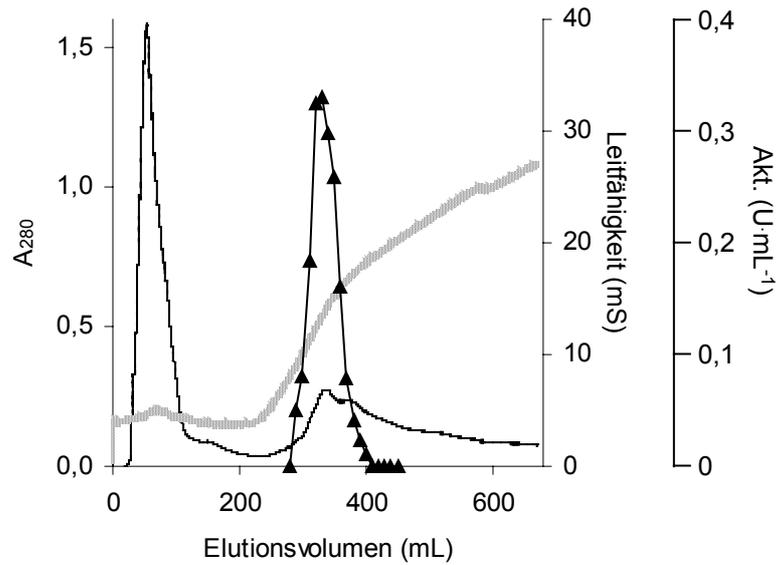


Abb. 20: Elutionsprofil der L-AAO (▲) und des Gesamtproteins (—) im NaCl-Gradienten (—) während der IEC an MacroPrep High Q Support. Der Gradient wurde über die Zunahme der Leitfähigkeit verfolgt.

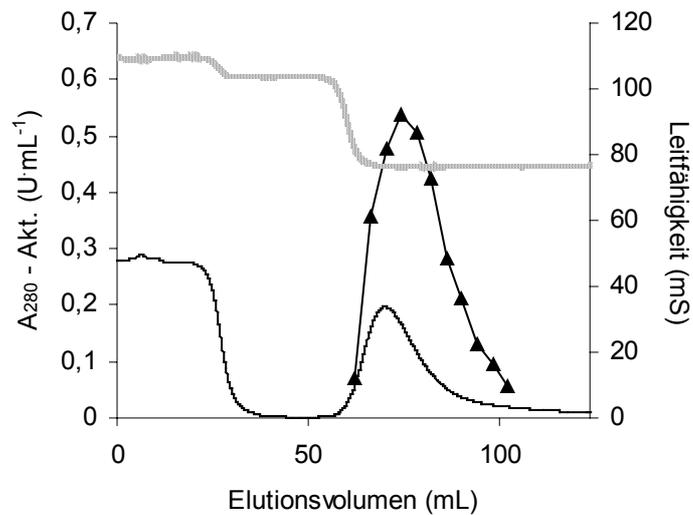


Abb. 21: Elutionsprofil der L-AAO (▲) und des Gesamtproteins (—) im $(NH_4)_2SO_4$ -Gradienten (—) während der HIC an Phenylsepharose FF. Der Gradient wurde über die Abnahme der Leitfähigkeit verfolgt.

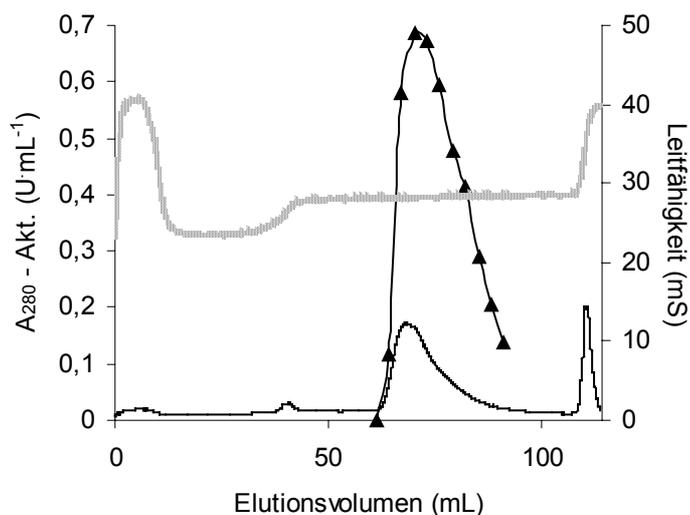


Abb. 22: Elutionsprofil der L-AAO (\blacktriangle) und des Gesamtproteins (—) im Kpi-Gradienten (---) während der Hydroxylapatitchromatographie. Der Gradient wurde über die Zunahme der Leitfähigkeit verfolgt.

Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tab. 4 zusammengefasst. Die spezifische Aktivität für L-Alanin betrug $4,6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, die Ausbeute lag bei 68% und der Reinigungsfaktor bei 144. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abb. 23). Die erhöhte Ausbeute von 131% nach der Anionenaustauschchromatographie lässt sich durch die Abtrennung der zelleigenen Katalase erklären, die Aktivitäten von bis zu $100 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ im Rohextrakt erreichte. Ein Teil des gebildeten Wasserstoffperoxids wurde in Anwesenheit von Katalase von diesem Enzym zersetzt, bevor es durch den POX/o-Dianisidin-Assay nachgewiesen werden konnte. Somit senkte Katalase die messbare L-AAO-Aktivität.

Tab. 4: Reinigungsschema der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* (15 g ZFM).

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (mL)	Spez. Aktivität ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	9,6	262	28	0,032	1	100
MacroQ	12,6	17	110	0,74	23	131
Phenylsepharose	8,2	2,9	35	2,8	88	85
Hydroxylapatit	6,5	1,4	26	4,6	144	68

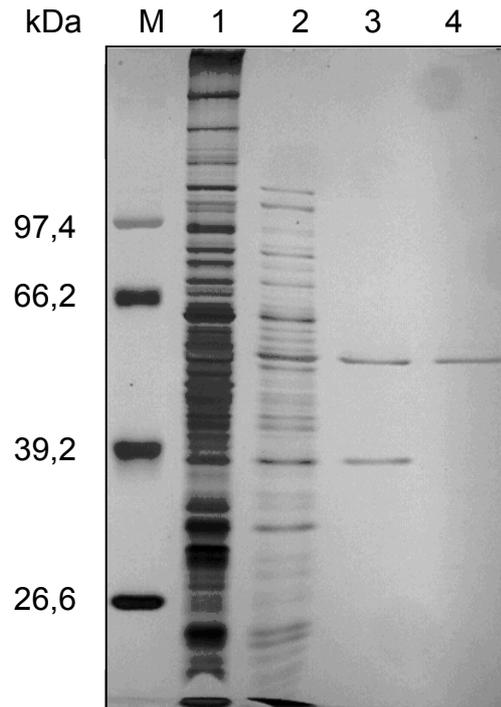


Abb. 23: Silbergefärbte SDS/PAGE der L-AAO-haltigen Proben nach den jeweiligen Reinigungsschritten (Tab. 4). Spur M: Marker, Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Pool nach IEC, Spur 3: Pool nach HIC, Spur 4: Eluat nach Hydroxylapatitchromatographie.

2.2.2 Isolierung aus 50 g Zellfeuchtmasse

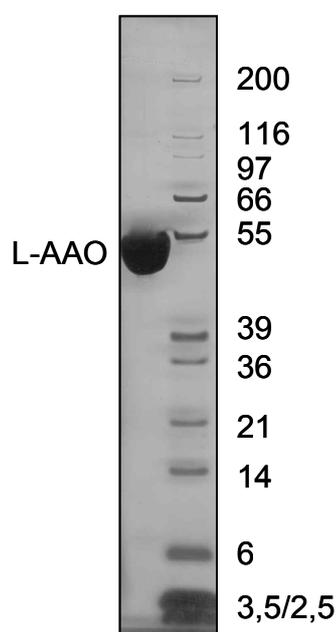
Das bestehende Reinigungsprotokoll wurde modifiziert, um für die Kristallisation und für die präparative Anwendung mehrere Milligramm L-AAO zur Verfügung stellen zu können. Die Säulenvolumina wurden vergrößert, die Wasch- und Elutionsschritte wurden diesen neuen Volumina angepasst und die Flussraten wurden ebenfalls erhöht (II.2.4.2). Als Säulenmaterial für die Anionenaustauschchromatographie wurde Q-Sepharose FF verwendet.

Beim Einsatz von 50 g Zellfeuchtmasse und ausgehend von einer höheren spezifischen Aktivität im Rohextrakt reichten unter diesen Bedingungen zwei säulenchromatographische Trennschritte aus, um eine homogene L-AAO-Fraktion zu erhalten. In Tab. 5 sind die Ergebnisse dieser Reinigung dargestellt. Aufgrund des leicht veränderten Elutionsverhaltens der L-AAO während der Anionenaustauschchromatographie wurde die Katalase erst im zweiten Reinigungsschritt abgetrennt. Dies erklärt den Anstieg der Gesamtaktivität und somit auch der Ausbeute nach der HIC. Die spezifische Aktivität der L-AAO für L-Alanin betrug $5,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Tab. 5: Reinigungsschema der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* (50 g ZFM).

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (mL)	Spez. Aktivität (U·mg ⁻¹)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	77,7	1087	220	0,071	1	100
Q-Sepharose	67,3	56	290	1,2	17	87
Phenylsepharose	74,0	14	60	5,4	76	95

Die Reinheitskontrolle in einem überladenen, silbergefärbten SDS-Gel zeigte eine homogene L-AAO-Präparation (Abb. 24).

**Abb. 24:** SDS/PAGE der L-AAO nach der Reinigung an Q-Sepharose und Phenylsepharose.

2.3 Biochemische Charakterisierung

2.3.1 Temperaturstabilität

Die Temperaturstabilität der homogen aufgereinigten L-AAO wurde bei Temperaturen zwischen 25 und 50°C und in drei verschiedenen Puffern gemessen. Die Inaktivierungsraten des Enzyms in 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,6 und in 50 mM Kpi-Puffer pH 6,6 waren vergleichbar, jedoch wurde eine verbesserte Stabilität bei erhöhten Temperaturen in Glycin/NaOH-Puffer pH 8,6 beobachtet (Abb. 25). Ein Vergleich der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ bei 37°C zeigt diesen Einfluss besonders deutlich. In Glycin/NaOH-

Puffer lag $t_{1/2}$ bei 938 min, während dieser Wert in TEA/HCl-Puffer ($t_{1/2} = 35$ min) und in Kpi-Puffer ($t_{1/2} = 44$ min) um mehr als das 20-fache reduziert war.

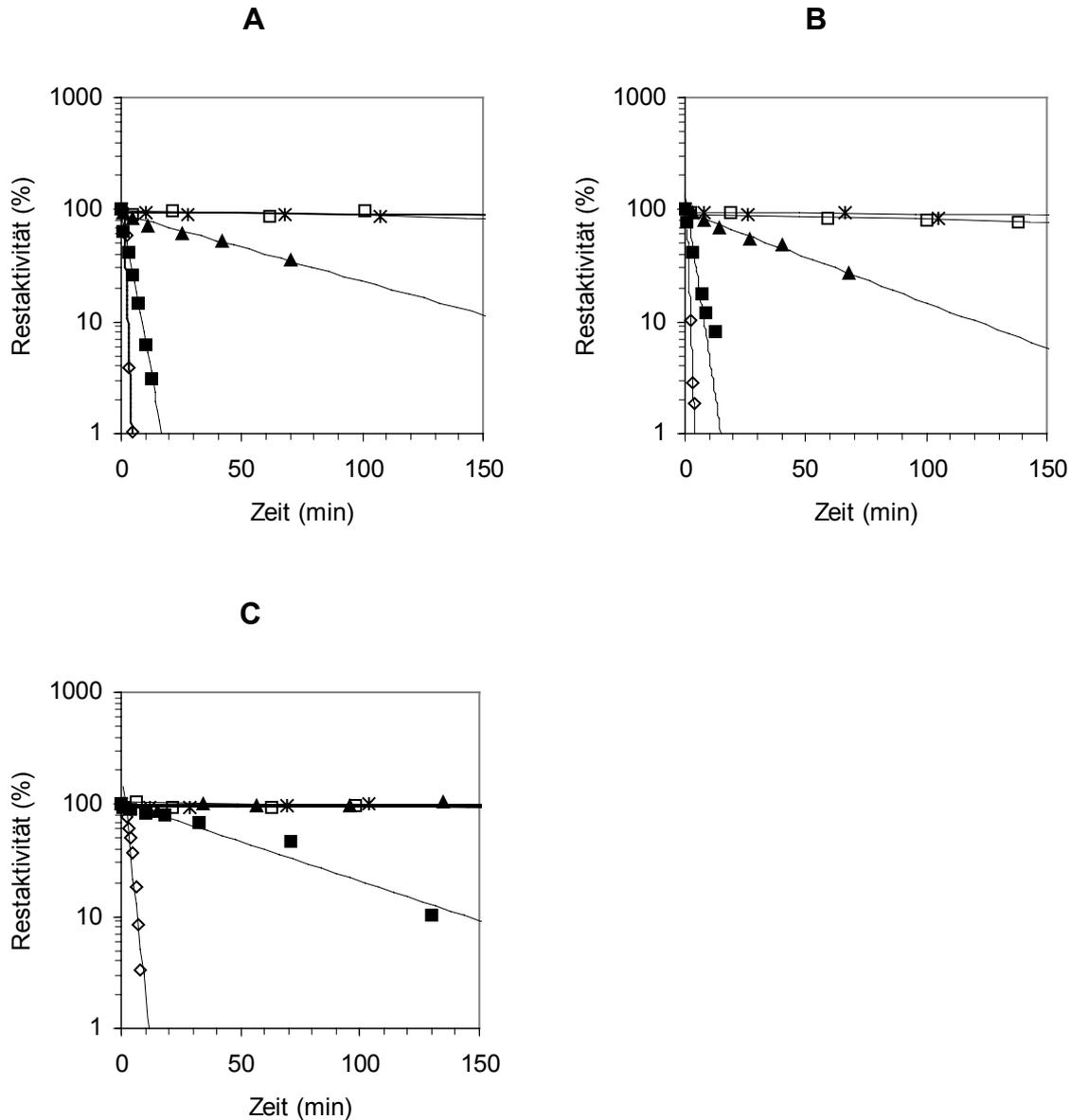


Abb. 25: Temperaturstabilität der L-AAO. Homogene L-AAO (Proteinkonzentration zwischen $0,14$ und $0,23 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde in drei verschiedenen Puffern (A: Kpi pH 6,6; B: 50 TEA/HCl pH 7,6; C: 50 mM Glycin/NaOH pH 8,6) und bei 5 verschiedenen Temperaturen inkubiert (\diamond 50°C , \blacksquare 45°C , \blacktriangle 37°C , \square 30°C , $*$ 25°C). Die Restaktivität wurde mit dem POX/o-Dianisidin-Assay gemessen.

Zusätzlich wurde geprüft, welchen Einfluss verschiedene Zusätze auf die Thermostabilität der L-AAO haben. Das partiell gereinigte Enzym wurde dazu bei 30°C und 37°C inkubiert und die Restaktivität wurde photometrisch gemessen.

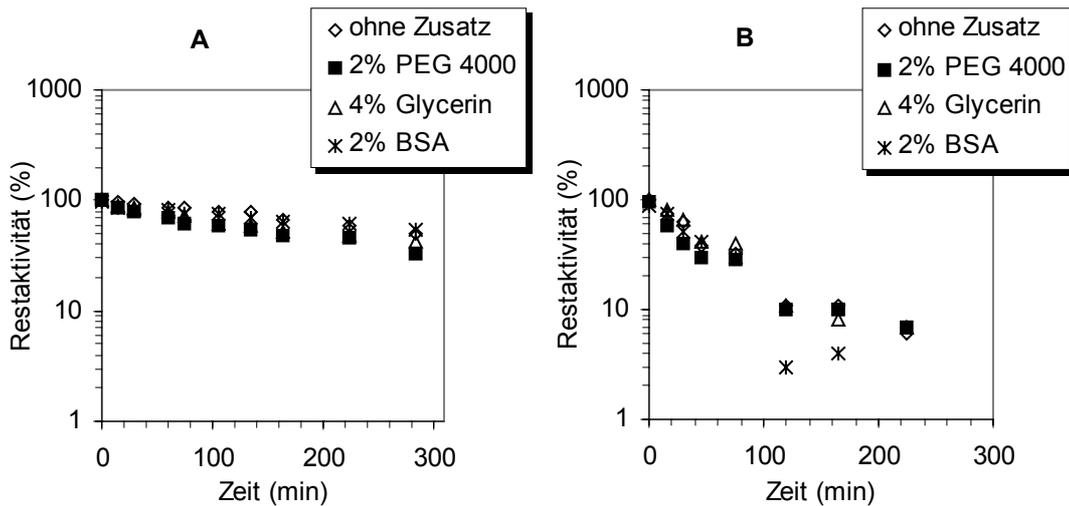


Abb. 26: Temperaturstabilität der partiell gereinigten L-AAO (spez. Akt. $1,50 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). Das Enzym wurde in $0,5 \text{ M TEA/HCl}$ -Puffer pH 7,8 mit verschiedenen Zusätzen bei 30°C (A) und 37°C (B) inkubiert. Die Restaktivität wurde mit dem POX/o-Dianisidin-Assay gemessen.

Die partiell gereinigte Enzympräparation zeigte eine ähnliche Thermostabilität wie die homogene L-AAO. Bei 37°C lag die Halbwertszeit der L-AAO ohne Zusätze bei $t_{1/2} = 40 \text{ min}$ (Abb. 26). Die Inkubation mit PEG 4000, BSA oder Glycerin stabilisierte das Enzym nicht.

2.3.2 Lagerstabilität

Die L-AAO ließ sich über mehrere Monate bei 4°C in $50 \text{ mM Glycin/NaOH}$ -Puffer pH 8,6 ohne Aktivitätsverlust lagern. Die Lagerung bei -18°C erforderte den Zusatz von 50% Glycerin, in reinem Puffer wurde das Enzym durch das Einfrieren inaktiviert.

2.3.3 pH-Stabilität

Die Restaktivität der L-AAO nach 100-stündiger Inkubation in verschiedenen 180 mM Puffern (Citronensäure-Natriumphosphat pH 4-7, TEA/HCl pH 7,0-8,5, Glycin/NaOH pH 8,5-11) bei Raumtemperatur ist in Abb. 27 aufgetragen. Auch in diesem Versuch zeigte sich der stabilisierende Effekt des Glycin/NaOH-Puffers, besonders bei pH-Werten von 10-10,5 blieben über 90% der ursprünglichen Aktivität erhalten. TEA/HCl-Puffer schien nicht als Lagerpuffer geeignet, da die Aktivitätsverluste nach 100 h trotz der neutralen pH-Werte zwischen 40-65% lagen. In Citronensäure-Phosphat-Puffer ließ sich die L-AAO gut lagern, die Restaktivitäten im pH-Bereich 5-7 lagen zwischen 70-75%. Generell wurde deutlich, dass pH-Werte im Sauren unter 5 und im Basischen über 10,5 zu einer beschleunigten Aktivitätsabnahme führten.

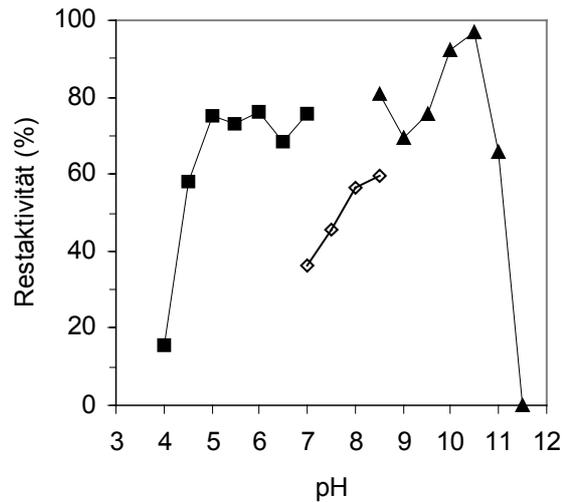


Abb. 27: pH-Stabilität der L-AAO. Die L-AAO wurde in drei verschiedenen Puffern bei Raumtemperatur inkubiert (■ Citronensäure-Natriumphosphat, pH 4-7; ◇ TEA/HCl, pH 7-8.5; ▲ Glycin/NaOH, pH 8.5-10.5) und die Restaktivität wurde nach 100 h mit dem POX/o-Dianisidin-Puffer bestimmt.

2.3.4 pH-Optimum

Die Abhängigkeit zwischen pH-Wert und Aktivität der L-AAO wurde photometrisch für die Substrate L-Alanin, L-Leucin und L-Phenylalanin in drei verschiedenen 80 mM Puffern bestimmt (Citronensäure-Natriumphosphat pH 4-7, TEA/HCl pH 7,0-8,5, Glycin/NaOH pH 8,5-11). Das pH-Optimum der L-AAO lag für alle drei Substrate bei pH 8-9 (Abb. 28). Die Enzymaktivität für L-Alanin war in Glycin/NaOH-Puffer im Vergleich zu L-Leucin und L-Phenylalanin deutlich abgeschwächt. Dieses Phänomen lässt sich durch eine inhibitorische Wirkung des Glycins erklären (2.3.7.1).

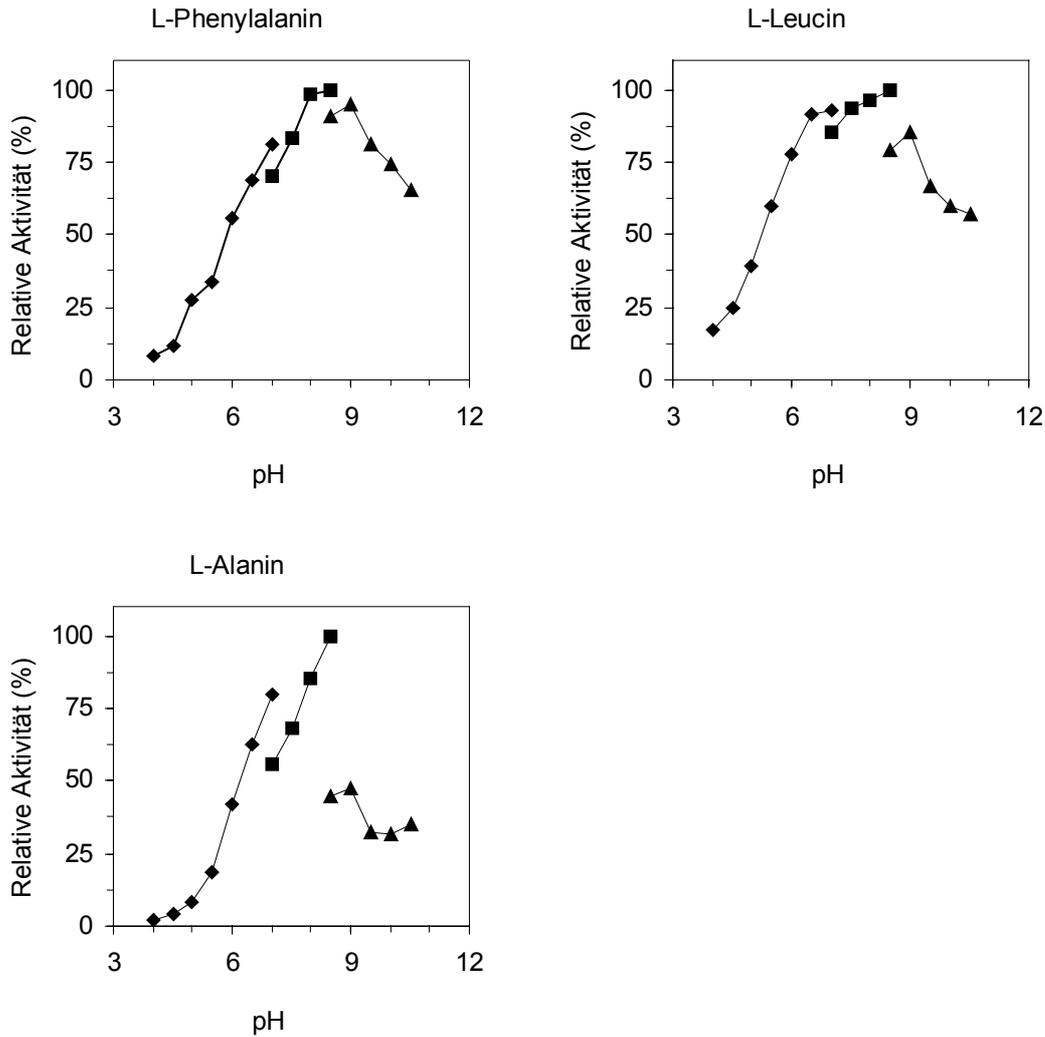


Abb. 28: Effekt des pH-Wertes auf die L-AAO-Aktivität. Die Enzymaktivität wurde mit drei verschiedenen Substraten in den folgenden 80 mM Puffern gemessen: ◆ Citronensäure-Natriumphosphat, pH 4-7; ■ TEA/HCl, pH 7-8.5; ▲ Glycin/NaOH, pH 8.5-10.5. Jede getestete L-Aminosäure wurde in einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt.

2.3.5 Substratspektrum

44 natürliche und unnatürliche L-Aminosäuren und 10 L-Aminosäurederivate wurden als Substrate für die L-AAO getestet (Tab. 6). 39 dieser L-Aminosäuren wurden umgesetzt, aber eine Derivatisierung an der α -Amino- oder α -Carboxygruppe der Aminosäure machte das Substrat unzugänglich für die Oxidation durch die L-AAO. Basische, aromatische und einige der aliphatischen L-Aminosäuren zeigten im Allgemeinen hohe Aktivitäten. L-Threonin, L-Prolin und Glycin waren die einzigen proteinogenen Aminosäuren, die nicht als Substrat akzeptiert wurden.

Keine der 18 untersuchten D-Aminosäuren wurde oxidiert, die L-AAO zeigte somit eine absolute Enantioselektivität für L-Aminosäuren.

Tab. 6: Substratspezifität der L-AAO. Die Substratkonzentration betrug 10 mM, die Aktivität wurde mit dem POX/o-Dianisidin-Assay bestimmt. Wenn aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit der L-Aminosäure das Racemat eingesetzt wurde, wurde die Konzentration auf 20 mM erhöht (#). Für Aminosäuren mit geringer Löslichkeit wurden 100 µL des Überstandes einer gesättigten Substratlösung in 1 mL Testansatz eingesetzt (*).

	L-Aminosäure	Relative Aktivität (%)
Aliphatische Aminosäuren	L-Alanin	100
	L-Leucin	68
	L-Valin	32
	L-Isoleucin	45
	DL-Norleucin [#]	73
	L-2-Amino-4,4-dimethylvaleriansäure	46
	L-2-Amino-3,3-dimethylbuttersäure (= L-tert-Leucin)	0
	L-2-Amino-5,5-dimethylhexansäure	44
Aromatische Aminosäuren	L-Phenylalanin	53
	L-Tyrosin [*]	54
	L-Histidin	36
	L-Tryptophan	12
	DL-Homophenylalanin ^{*#}	50
	L-Phenylglycin [*]	5
	L-2-Chlorophenylalanin	24
	L-4-Chlorophenylalanin	9
	DL-4-Fluorophenylalanin [#]	25
	L-4-Nitrophenylalanin [*]	30
	L-4-Aminophenylalanin	16
L-3-(1-Naphthyl)alanin [*]	109	
DL-3-(1-Pyridyl)alanin [#]	24	
Basische Aminosäuren	L-Arginin	70
	L-Lysin	55
	L-Glutamin	52
	L-Asparagin	97
	L-Ornithin	117
	L-Citrullin	74
	N ϵ -Acetyl-L-lysin	46
	L-2,3-Diaminopropionsäure	71
L-2,4-Diaminobuttersäure	100	
Cyclische Aminosäuren	L-Homocysteinthiolacton	23
	L-Homoserinlactone	66
	L-Prolin	0
	L- <i>cis</i> -4-Hydroxyprolin	0
S/O-enthaltende Aminosäuren	L-Serin	72
	L-Methionin	72
	L-Threonin	0
	L-Cystin [*]	104
	L-Cysteinsäure	34
	DL-O-Methylserin [#]	99
DL- β -Phenylserin [#]	8	

L-Aminosäure		Relative Aktivität (%)
Saure Aminosäuren	L-Glutaminsäure	52
	L-Asparaginsäure	11
	Glycin	0
Aminosäure-Derivate	L-Phenylalaninethylester	0
	L-Phenylalaninmethylester	0
	L-Tyrosinethylester	0
	L-Leucinamid	0
	L-Phenylalaninamid	0
	N-Methyl-L-phenylalanin	0
	L-β-Phenylmilchsäure	0
	L-Leucin-L-Alanin	0
	β-Phenylethylamin	0
	L-4-Alaninnitroanilid	0

2.3.6 Kinetische Daten

Die kinetischen Daten von 22 L-Aminosäuren wurden bestimmt (Tab. 7). Bei vielen Substraten wurde eine Substratüberschussinhibierung beobachtet. Die L-AAO zeigte für einen Großteil der untersuchten Substrate eine hohe Affinität, sichtbar an den niedrigen K_M -Werten im unteren zweistelligen μM -Bereich.

In der Modellierung wurde die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 4) oder die Erweiterung dieser Gleichung für eine Substratüberschussinhibierung (Gl. 5) eingesetzt.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_M}$$

Gl. 4: v = Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, S = Substratkonzentration, K_M = Michaelis-Menten-Konstante

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{\left(S + K_M + \frac{S^2}{K_{SI}} \right)}$$

Gl. 5: K_{SI} = Inhibitionskonstante des Substrats

Tab. 7: Kinetische Daten der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* für 22 L-Aminosäuren. Die L-AAO-Aktivität wurde für variierende Substratkonzentrationen mit dem POX/o-Diansidin-Assays bestimmt.

Substrat	v_{\max} (U·mg⁻¹)	K_M (mM)	K_{SI} (mM)
L-Tryptophan	11,5	0,016	1,2
4-Chloro-L-phenylalanin	11,1	0,029	1,2
L-Tyrosin	9,69	0,019	1,1
4-Fluoro-L-phenylalanin	9,07	0,026	5,1
L-Arginin	8,12	0,070	5,4
L-Norleucin	7,55	0,026	2,9
L-Ornithin	7,48	0,034	12,5
4-Amino-L-phenylalanin	7,40	0,011	5,9
4-Methyl-L-phenylalanin	7,36	0,023	2,6
L-Phenylalanin	6,97	0,022	2,3
L-Leucin	6,45	0,028	5,7
L-Methionin	6,43	0,039	6,8
L-Alanin	5,74	0,31	-
L-Citrullin	5,47	0,026	20,6
L-Asparagin	5,37	0,028	-
L-Glutamin	5,06	0,085	-
4-Nitro-L-phenylalanin	5 *	0,090 *	*
L-Serin	4,36	1,36	192
L-Lysin	3,56	0,015	63,7
L-Isoleucin	2,84	5,11	-
L-Glutaminsäure	2,32	0,411	-
L-Valin	1,93	3,73	-

* Die Kinetik von 4-Nitro-L-phenylalanin ließ sich nicht mit Gl. 5 modellieren. Die kinetischen Werte v_{\max} und K_M wurden aus der graphischen Auftragung abgeschätzt. Es wurde eine ausgeprägte Substratüberschussinhibierung beobachtet, die nicht quantifiziert werden konnte.

Bei der Auswertung der kinetischen Daten der untersuchten Leucinisomere wurde deutlich, dass die Reste am β -C-Atom des Substrats einen großen Einfluss auf v_{\max} und K_M haben (Abb. 29). Ein höherer Verzweigungsgrad am β -C-Atom senkte v_{\max} und erhöhte K_M für das entsprechende Substrat. Dieser Effekt ging so weit, dass für L-tert-Leucin überhaupt keine Aktivität mehr detektiert werden konnte. Hingegen ist der Einfluss einer Verzweigung am γ -C-Atoms deutlich geringer, wie der Vergleich der kinetischen Daten von L-Leucin und L-Norleucin zeigt.

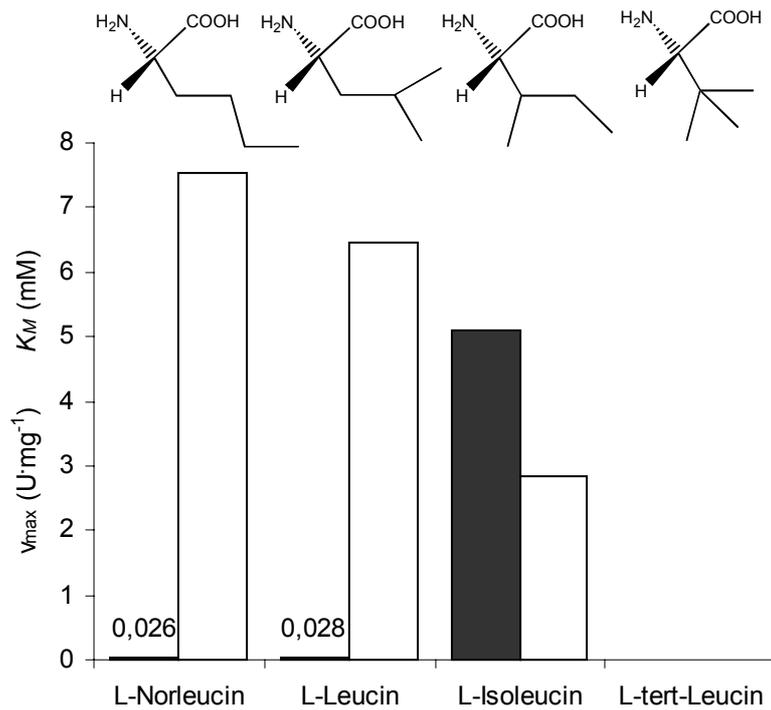


Abb. 29: Die kinetischen Daten der 4 untersuchten Leucin-Derivate (schwarz: K_M , weiß: v_{max}). L-tert-Leucin wurde nicht umgesetzt.

Es existierte ein Zusammenhang zwischen den K_M -Werten der sieben untersuchten p-substituierten L-Phenylalanin-Derivate und dem jeweiligen Sigmafaktor σ_p [131] dieser Substanzen (Abb. 30). Diese Abhängigkeit zeigt, dass Substituenten, die die Elektronendichte im Aromaten erhöhen, die Affinität des Substrats positiv beeinflussen.

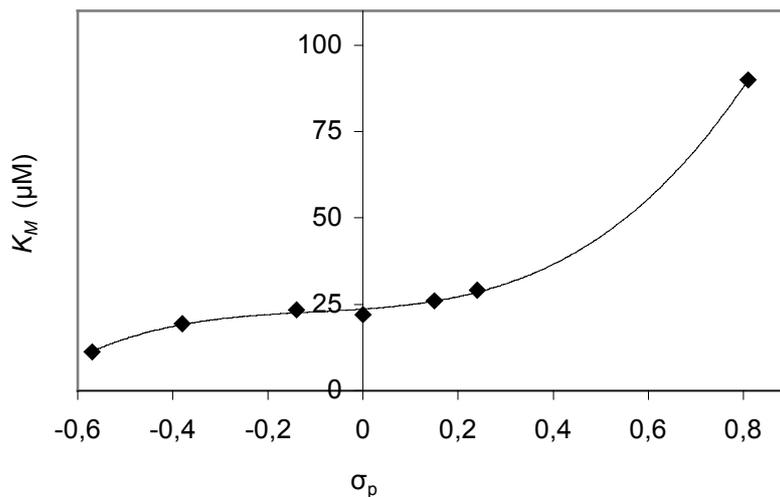


Abb. 30: K_M -Werte für p-substituierte L-Phenylalaninderivate in Abhängigkeit vom Sigmafaktor σ_p .

2.3.7 Inhibitions- und Inaktivierungsstudien

2.3.7.1 Glycin

Die Abhängigkeit der Aktivität der L-AAO vom Puffersystem (2.3.4) ließ auf eine Inhibierung des Enzyms durch Glycin schließen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Einfluss von Glycin (0-800 mM) auf die L-AAO-Aktivität für die Substrate L-Alanin und L-Phenylalanin untersucht.

Bei Verwendung von L-Alanin als Substrat wurde eine kompetitive Inhibierung durch Glycin deutlich, die sich durch Gl. 6 gut modellieren ließ. Der K_i für Glycin betrug $4,46 \pm 0,27$ mM. Dieser Wert bedeutete beispielsweise, dass beim Einsatz von 10 mM L-Alanin die Enzymaktivität durch die Anwesenheit von 400 mM Glycin um 70% gesenkt wurde.

$$v = v_{\max} * \frac{S}{\left(S + K_M + \frac{K_M * I}{K_i} \right)}$$

Gl. 6: v = Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, S = Substratkonzentration, K_M = Michaelis-Menten-Konstante, I = Konzentration des Inhibitors, K_i = Inhibitionskonstante

Die L-AAO-Aktivität für L-Phenylalanin wurde durch Glycin ebenfalls negativ beeinflusst (Abb. 31). Dieser Effekt ließ sich aufgrund der stark ausgeprägten Substratüberschussinhibierung auch durch die Kombination der Gleichungen für kompetitive Inhibierung und für Substratüberschussinhibierung nicht modellieren. Im Bereich der L-Phenylalaninkonzentrationen, in denen die Substratüberschussinhibierung schon sehr deutlich vorliegt (ab ca. 3 mM), wurde der inhibierende Einfluss des Glycins abgeschwächt. Jedoch senkte Glycin bei Substratkonzentrationen unterhalb von 3 mM die Aktivität deutlich. 400 mM Glycin reduzierte die L-AAO-Aktivität bei 10 mM L-Phenylalanin um lediglich 7%, während bei 0,32 mM L-Phenylalanin eine Aktivitätsabnahme von 55% beobachtet wurde.

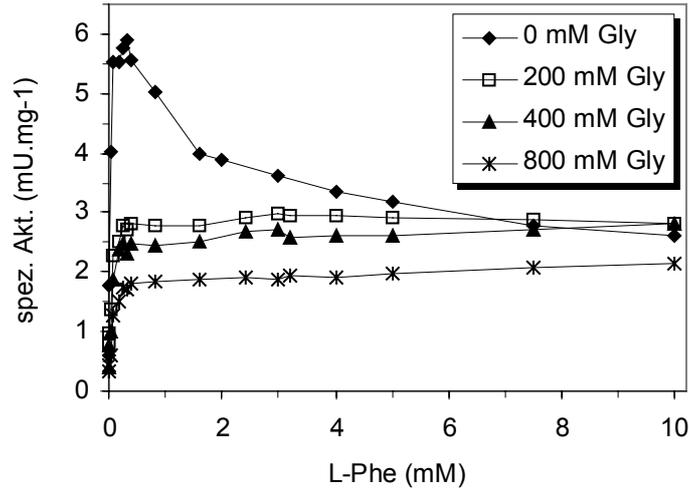


Abb. 31: Einfluss verschiedener Glycinkonzentrationen auf die L-AAO-Aktivität für L-Phenylalanin.

2.3.7.2 Wasserstoffperoxid

Da bei der Reaktion von L-Aminosäuren zu Ketosäuren im äquimolaren Verhältnis H_2O_2 freigesetzt wird, war es von Interesse, die Empfindlichkeit der L-AAO gegenüber dieser stark oxidierenden Substanz zu messen. Homogene L-AAO ($0,025 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde für 30 min bei 30°C mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen inkubiert. Das H_2O_2 wurde dann durch Zugabe von Katalase komplett zerstört, bevor die Restaktivität der L-AAO mit dem LDH-gekoppelten Assay bestimmt wurde (Abb. 32). Unter den gewählten Bedingungen wurden 50% des Enzyms in Anwesenheit von $0,28 \text{ M}$ H_2O_2 inaktiviert, das heißt die L-AAO reagiert nicht empfindlich auf stark oxidierende Substanzen. Vermutlich sind keine frei zugänglichen SH-Gruppen im Enzym vorhanden, die für die Aktivität oder Konformation verantwortlich sind.

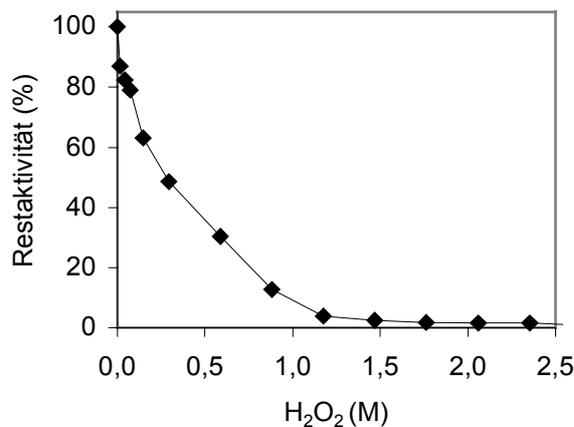


Abb. 32: Inaktivierung der L-AAO nach 30-minütiger Inkubation in Wasserstoffperoxid bei 30°C .

2.4 Proteinchemische Charakterisierung

2.4.1 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der nativen L-AAO wurde unter anderem mittels Gelfiltration bestimmt und lag nach dieser Methode bei 99 kDa (Abb. 33).

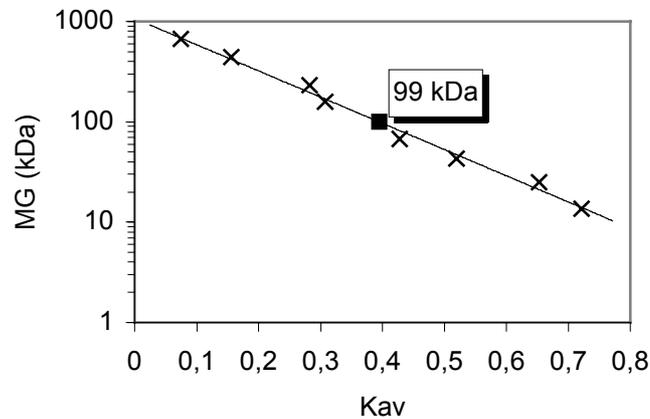


Abb. 33: Bestimmung des Molekulargewichts der L-AAO über Gelfiltration mit Superdex 200 PG (x: Eichproteine, ■ L-AAO).

Nach Analyse der SDS-PAGE mit homogen aufgereinigter L-AAO wurde deutlich, dass das Enzym als Dimer aus zwei gleichen, 53 kDa großen Untereinheiten vorlag (Abb. 34).

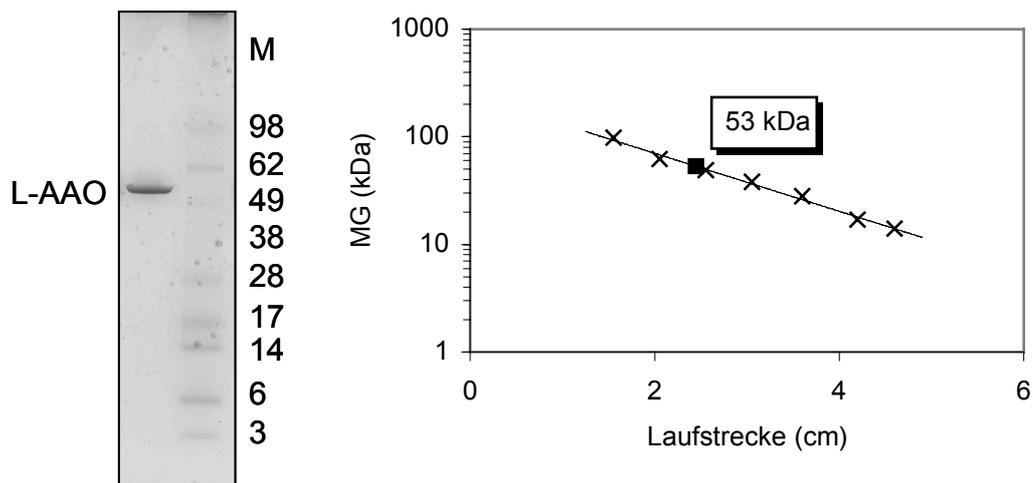


Abb. 34: SDS-PAGE der aufgereinigten L-AAO und Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheit (x: Markerproteine, ■ L-AAO).

Diese Beobachtung wurde durch die Vermessung des Enzyms mittels MALDI/TOF-MS bestätigt. Mit dieser Methode wurde ein Molekulargewicht von 108476 Da für das Dimer und von 54233 Da für das Monomer gemessen (Abb. 35). Offensichtlich war das Dimer

unter den Messbedingungen nur wenig stabil, der größte Anteil der L-AAO lag als Monomer vor. Die Peaks bei ca. 7000-25000 Da wurden durch eine Verunreinigung der Probe und durch das zweifach geladene Monomer der L-AAO verursacht.

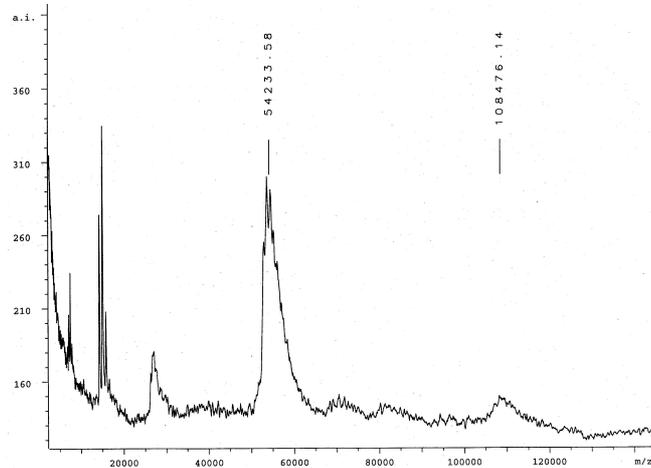


Abb. 35: MALDI/TOF-MS der L-AAO.

2.4.2 Native PAGE

Die L-AAO zeigte nach der Aktivitätsfärbung im nativen Polyacrylamidgel ein klares Signal (Abb. 36). Diese Tatsache war während der Entwicklung der Aufreinigungsstrategie nützlich und half zusätzlich die Existenz von Isoenzymen auszuschließen.

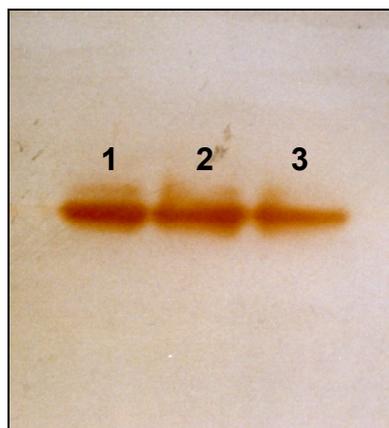


Abb. 36: Native PAGE der L-AAO mit partiell gereinigten Proben (Spur 1-3: unterschiedliche Fraktionen nach hydrophober Interaktionschromatographie, Proteinmenge: je 25 μg). Die Aktivitätsfärbung wurde nach dem Prinzip des POX/o-Dianisidin-Assays durchgeführt.

2.4.3 Isoelektrischer Punkt

Für die L-AAO wurde experimentell ein pI von 4,8 bestimmt (Abb. 37). Das Enzym zeigte in der isoelektrischen Fokussierung eine gewisse Mikroheterogenität. Ein Grund für dieses Verhalten kann das Vorliegen verschiedener Oxidationszustände sein [132].

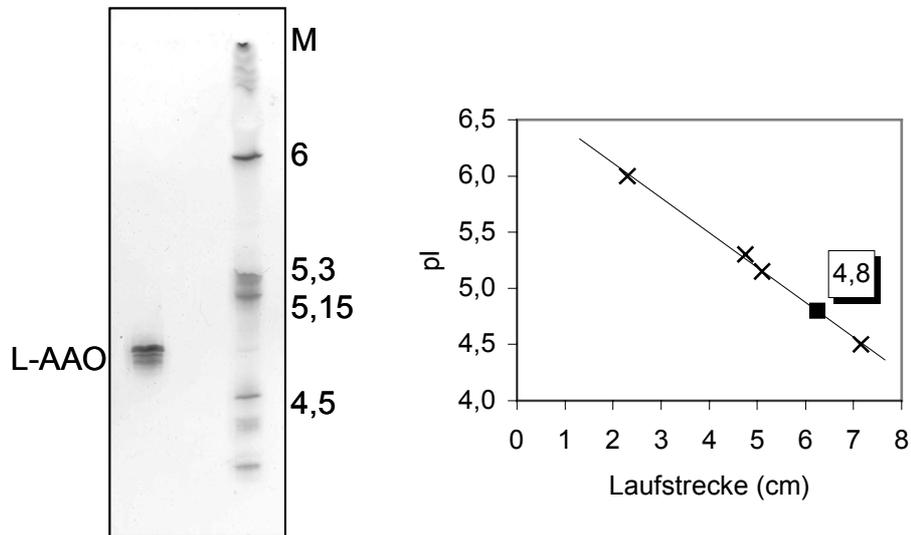


Abb. 37: IEF-Gelelektrophorese und Bestimmung des isoelektrischen Punkts der aufgereinigten L-AAO (x: Markerproteine, ■ L-AAO).

Die Berechnung des isoelektrischen Punktes aus der Primärsequenz ergab einen pI von 5,8 (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>), der deutlich über dem gemessenen Wert liegt. Ein Grund für diese Beobachtung könnte die Anordnung saurer Aminosäurereste an der Oberfläche des Proteins sein, die das Laufverhalten im Agarosegel beeinflussen.

2.4.4 Spektroskopische Eigenschaften

Bei Vorliegen der L-AAO in der Holoform zeigte das Enzym ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit zwei Maxima bei $\lambda = 402,5 \text{ nm}$ und 436 nm (Abb. 38 A).

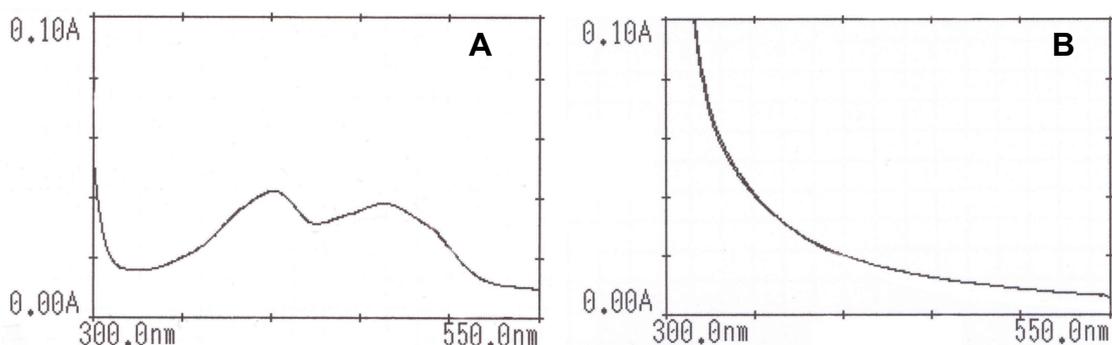


Abb. 38: Absorptionsspektrum des Holo- (A) und des Apoproteins (B) der L-AAO. Das Apoprotein wurde durch viertägige Lagerung in 2 M KBr erhalten.

Nach der viertägigen Lagerung der L-AAO in KBr-Puffer und erneutem Umpuffern, wurde ein weiteres Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 38 B). Die zwei charakteristischen Maxima waren nicht mehr messbar. Bei der Aktivitätsbestimmung der Probe waren nur noch 3% der ursprünglichen Aktivität detektierbar. Dieser Wert konnte auch durch die Zugabe von bis zu 20 μM FAD nicht gesteigert werden. Das bedeutet, dass der Cofaktor FAD durch Lagerung der L-AAO in 2 M KBr fast vollständig herausgelöst wurde und somit keine kovalente Bindung zwischen Cofaktor und Enzym vorlag. Die Rekonstitution des Holoenzym durch FAD-Zugabe zum Apoenzym war nicht möglich.

2.4.5 N-Terminale und interne Sequenzdaten

Die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus der homogen aufgereinigten und auf eine PVDF-Membran übertragenen L-AAO wurden durch automatisierten Edman-Abbau bestimmt.

N-Terminus: AGDLIGKVKGSHSVVVLGGGPAGLCSAFEL

Nach der proteolytischen Spaltung der L-AAO und Trennung der Peptide wurden 16 weitere, interne Teilsequenzen bestimmt. Die Sequenzbereiche, die mit Hilfe dieser Methode identifiziert wurden, sind in Abb. 42 hervorgehoben. Folgende vier Sequenzen wurden ausgesucht, um Primer für die PCR zu konstruieren.

Spaltstück 21: LLEPVDK

Spaltstück 24: AFESLTHRQLAK

Spaltstück 35: LGIEYSRRWW

3 Klonierung des *laao*-Gens

3.1 Bestimmung einer Teilsequenz des *laao*-Gens

Auf Grundlage der Aminosäure-Sequenzinformationen der *Rhodococcus opacus* L-AAO (2.4.5) wurden vier verschiedene Primer konstruiert, um mittels PCR eine partielle Gensequenz zu erhalten. Unter Beachtung der Codon usage für *Rhodococcus opacus* (VIII3) wurden 13 Aminosäuren des N-Terminus in die entsprechende DNA-Sequenz übersetzt. Für die Herstellung der Gegenprimer wurden die Aminosäuresequenzen von drei N-terminal sequenzierten Spaltstücken in die DNA-Sequenz übersetzt. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang aufgeführt (VIII2.1).

Mit dem Primer-Paar P1for und P2rev gelang es, ein 1,1 kb langes DNA-Fragment zu amplifizieren. Der Vergleich der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Primärsequenz mit den aus der proteolytischen Spaltung erhaltenen Sequenzdaten zeigte eindeutig, dass das Fragment einen Teil des *laao*-Gens darstellte.

3.2 Herstellung und Screening der partiellen Genbank

Ausgehend von dem durch PCR erhaltenen *laao*-Fragment wurde eine digoxigenin-markierte Sonde präpariert und für die Hybridisierung im Southern Blot eingesetzt. Nach der Detektion mittels Chemolumineszenz wurden mehrere deutliche Signale sichtbar (Abb. 39). Die 3,4 kb-große *Sma*I-geschnittene DNA wurde zur Herstellung der partiellen genomischen Bank eingesetzt. Drei Gründe waren für diese Entscheidung ausschlaggebend: (1) Die *Sma*I-verdaute DNA zeigte nur ein einziges, starkes Signal. (2) DNA dieser Größe lässt sich noch sehr gut in pUC18 klonieren. (3) Die Möglichkeit, dass das komplette Gen auf diesem Fragment liegt, war gegeben.

Der *Sma*I-Restriktionsansatz wurde wiederholt und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Die DNA der Größe 3,1-3,4 kb wurde ausgeschnitten und eluiert, blunt-end in pUC18 kloniert und in *E. coli* XL1 blue transformiert. Die Plasmid-DNA von 42 Klonen wurde isoliert und durch PCR auf das Vorhandensein des *laao*-Gens untersucht. Die PCR mit der Plasmid-DNA von Klon No. 15 als Templat ergab ein Produkt in der erwarteten Größe von 1,1 kb. Die inserierte DNA dieses Klons wurde vollständig sequenziert. Die Gensonde stimmte mit einem Teil dieser Sequenz überein. Im Anschluss wurde die gesamte neugewonnene Nucleotidsequenz analysiert.

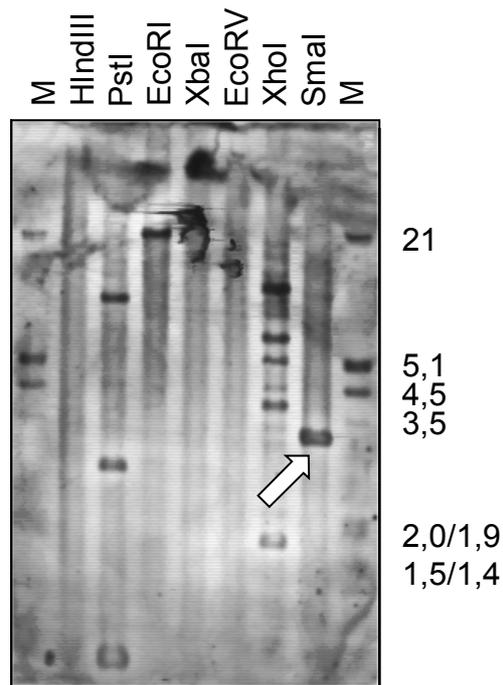


Abb. 39: Southern Blot mit *Rhodococcus opacus* genomischer DNA nach Hybridisierung mit der *laao*-Sonde. Der Pfeil markiert das in der Klonierung eingesetzte DNA-Fragment.

3.3 Die Signalsequenz der L-AAO

Da direkt vor dem N-Terminus der L-AAO in der Gensequenz kein Startcodon zu erkennen war, lag die Vermutung nahe, dass die L-AAO prozessiert vorliegt und ein Signalpeptid besitzt. Drei mögliche Startcodons wurden strangaufwärts gefunden (Abb. 40) und die Peptide zwischen den jeweiligen Startcodons und dem N-Terminus des Proteins wurden mit Hilfe eines Signalpeptid-Erkennungsprogramms analysiert (<http://psort.nibb.ac.jp>).

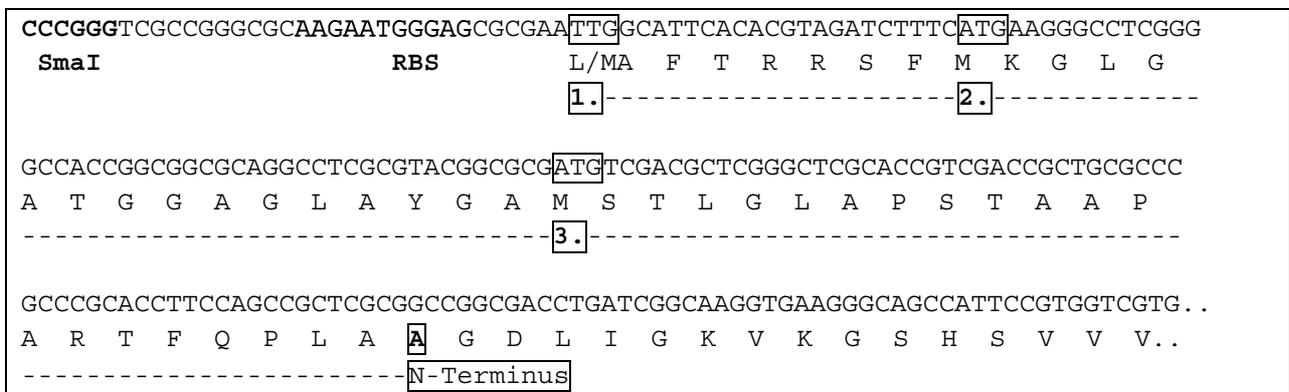


Abb. 40: Analyse der strangaufwärts vom N-Terminus der L-AAO liegenden DNA- und Aminosäuresequenz. Die putative ribosomale Bindungsstelle (RBS) ist hervorgehoben, ebenso die *SmaI*-Schnittstelle des Fragments.

Nur die bei **1.** beginnende Sequenz wurde durch das Programm als Signalpeptid erkannt. Der sechs Nucleotide strangaufwärts von **1.** liegende, purinreiche DNA-Bereich entspricht dem Motiv einer ribosomale Bindungsstelle. Strangaufwärts von **2.** und **3.** gab es keine vergleichbaren Sequenzabschnitte. Diese beiden Hinweise bestätigten die Vermutung, dass das TTG (**1.**) als Startcodon des *lao*-Gens dient, welches in diesem Fall für Methionin und nicht für Leucin codiert. 10% aller bakteriellen Gene enthalten TTG anstelle von ATG als Startcodon.

Die Signalsequenz der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* zeigte im Vergleich einen hohen Homologiegrad zur Signalsequenz der L-AAO aus *Synechococcus spec.* (41% identische Aminosäuren) (Abb. 41). Über die *Synechococcus* L-AAO ist bekannt, dass sie extrazellulär vorliegt und ein Signalpeptid trägt, jedoch konnte der N-Terminus des prozessierten Enzyms nicht bestimmt werden [133]. In beiden Sequenzen liegt ein Twin-Arginine Motiv vor, das für viele sekretierte, bakterielle, cofaktorabhängige Proteine charakteristisch ist. Der tatsächliche N-Terminus der prozessierten L-AAO aus *Rhodococcus opacus* (2.4.5) stimmte nicht mit der vorhergesagten Schnittstelle (<http://psort.nibb.ac.jp>) überein.

		V ⁽¹⁾	V ⁽²⁾	
<i>Rh. opacus</i>	1 MAF TRRSFM KG-LGATGGAGLAYGAMSTLGLAPSTAAPARTFQPLAAGDLIGKVKGSHS			58
<i>Sy. spec.</i>	1 MRF SRRRFL QSSLGAAATTGLA-GTLAAGGQAQTRSTPVR-----KRS			41
	* *:*** *::: . ***: . :*** *::: : * * : :*:.*			. :*

Abb. 41: Sequenzalignment der unprozessierten L-AAOs aus *Rhodococcus opacus* und *Synechococcus spec.* Der in beiden Sequenzen konservierte Twin-Arginine-Bereich ist durch Einrahmung hervorgehoben. Der Pfeil V(1) zeigt die theoretische Schnittstelle der *Rhodococcus opacus* L-AAO nach Analyse durch das Programm Psort C-terminal vom Sequenzmotiv APA an, V(2) den durch Sequenzierung bestimmten N-Terminus der aufgereinigten L-AAO.

3.4 Bestimmung der *lao*-Gensequenz

Nachdem das 5'-Ende des *lao*-Gens bestimmt und der N-Terminus der unprozessierten L-AAO abgeleitet worden waren, ließ sich die Gesamtsequenz (Abb. 42) näher analysieren.

Das *lao*-Gen besteht aus 1605 Basen und hat einen GC-Gehalt von 66,2%. Die unprozessierte L-AAO ist 534 Aminosäuren lang, das entspricht einem Molekulargewicht von 57805 Da. Das Signalpeptid aus 45 Aminosäuren verringert nach seiner Abspaltung das Molekulargewicht der prozessierten L-AAO auf 53348 Da. Unter Berücksichtigung eines Moleküls FAD pro Untereinheit lässt sich ein Molekulargewicht von 54178 Da berechnen. Dieser Wert zeigt nur 0,1% Abweichung von dem durch MALDI/TOF-MS erhaltenen Molekulargewicht von 54233 Da (2.4.1).

```

- CCCGGGTCGCCGGGCGCAAGAATGGGAGCGCGAAT - 1
- SmaI RBS M - -45

- TGGCATTACACGTTAGATCTTTTCATGAAGGGCCTCGGGGCCACCGGCGGCGCAGGCCTCG - 61
- A F T R R S F M K G L G A T G G A G L A - -25

- CGTACGGGCGGATGTGACGCTCGGGCTCGCACCGTTCGACCGCTGCGCCCCCGCCACCT - 121
- Y G A M S T L G L A P S T A A P A R T F - -5

- TCCAGCCGCTCGCGGCCGGCGACCTGATCGGCAAGGTGAAGGGCAGCCATTCCGTGGTTCG - 181
- Q P L A A G D L I G K V K G S H S V V V - +16

- TGCTCGGCGGCGGCCCGCCGGTCTGTGTTTCGGCATTTCGAACTGCAGAAGGCCGGGTACA - 241
- L G G G P A G L C S A F E L Q K A G Y K - +36

- AGGTGACGGTCTCTGAGGCCCGCACCCGGCCCGGTGGCCGCGTCTGGACCGCACGGGGCG - 301
- V T V L E A R T R P G G R V W T A R G G - +56

- GCAGCGAGGAGACCGACCTGAGCGGCGAGACGCAGAAGTGCACGTTCTCGGAGGGCCACT - 361
- S E E T D L S G E T Q K C T F S E G H F - +76

- TCTACAACGTTCGGCGCCACCCGCATCCCGCAGAGCCACATCACGCTCGACTACTGCCGCG - 421
- Y N V G A T R I P Q S H I T L D Y C R E - +96

- AACTCGGCGTTCGAGATCCAGGGATTTCGGAACCCAGAACGCCAACACGTTTCGTGAACTACC - 481
- L G V E I Q G F G N Q N A N T F V N Y Q - +116

- AGAGCGACACGTTCGCTGTCTGGCCAGTCCGTCACCTACCGGGCCGGAAGGCCGACACGT - 541
- S D T S L S G Q S V T Y R A A K A D T F - +136

- TCGGCTACATGTTCGGAACCTGCTGAAGAAGGCCACCGATCAGGGTGCCCTGGATCAGGTAC - 601
- G Y M S E L L K K A T D Q G A L D Q V L - +156

- TGAGCCGGGAGGACAAGGATGCGCTGTTCGGAGTTCCTCAGCGACTTCGGTGACCTGTCCG - 661
- S R E D K D A L S E F L S D F G D L S D - +176

- ACGACGGCCGCTACCTCGGATCCTCGCGTTCGGGTTACGATTCCGAGCCCGGAGCCGGCC - 721
- D G R Y L G S S R R G Y D S E P G A G L - +196

- TGAACTTCGGCACCGAGAAGAAGCCGTTTCGCGATGCAGGAAGTATCCGCAGCGGCATCG - 781
- N F G T E K K P F A M Q E V I R S G I G - +216

- GCCGCAACTTCAGCTTCGACTTCGGCTACGACCAGGCGATGATGATGTTACCCCGGTCG - 841
- R N F S F D F G Y D Q A M M M F T P V G - +236

- GCGGCATGGACCGGATCTACTACGCGTTCAGGACAGGATCGGCACCGACAACATCGTCT - 901
- G M D R I Y Y A F Q D R I G T D N I V F - +256

- TCGGCGCCGAGGTGACGTTCGATGAAGAACGTGTTCGAGGGCGTCACCGTCGAATACACCG - 961
- G A E V T S M K N V S E G V T V E Y T A - +276

```

```

- CCGGCGGCTCGAAGAAGTCGATCACCGCCGACTACGCGATCTGCACGATCCCGCCGACC - 1021
- G G S K K S I T A D Y A I C T I P P H L - +296

- TCGTCGGACGACTGCAGAACAATCTGCCCCGGCGACGTGCTCACCGCGCTGAAGGCGGCCA - 1081
- V G R L Q N N L P G D V L T A L K A A K - +316

- AGCCGTCGTCGTCCGGAAAGCTCGGCATCGAGTACTCGCGCCGGTGGTGGGAGACGGAGG - 1141
- P S S S G K L G I E Y S R R W W E T E D - +336

- ACCGCATCTACGGCGGCGCGTCCAACACCGACAAGGACATCTCGCAGATCATGTTCCCGT - 1201
- R I Y G G A S N T D K D I S Q I M F P Y - +356

- ACGACCACTACAACCTCCGATCGCGGTGTGGTTCGTCGCTACTACAGCAGCGGCAAGCGTC - 1261
- D H Y N S D R G V V V A Y Y S S G K R Q - +376

- AGGAGGCGTTCGAGTCCCTCACGCACCGCCAGCGGCTCGCCAAGGCGATCGCGGAGGGCT - 1321
- E A F E S L T H R Q R L A K A I A E G S - +396

- CGGAGATCCACGGCGAGAAGTACACCCGCGACATCTCGTCGTCGTTCTCGGGCAGCTGGC - 1381
- E I H G E K Y T R D I S S S F S G S W R - +416

- GCGGCACCAAGTACTCCGAGAGTGCCTGGGCCAACTGGGCGGGCAGTGGCGGATCGCACG - 1441
- R T K Y S E S A W A N W A G S G G S H G - +436

- GCGGGGCGGCCACTCCCGAGTACGAGAAGCTGCTCGAACCCGTGACACAAGATCTATTTTCG - 1501
- G A A T P E Y E K L L E P V D K I Y F A - +456

- CCGGCGACCACCTGTCCAACGCCATCGCCTGGCAGCACGGCGCCCTGACGTCCGCCCGCG - 1561
- G D H L S N A I A W Q H G A L T S A R D - +476

- ACGTCGTCACCCACATCCACGAGCGCGTGGCCCAGGAAGCCTGA - 1605
- V V T H I H E R V A Q E A * - +489

```

Abb. 42: Die *laao*-Gensequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Nummerierung des Gens beginnt mit dem Startcodon (TTG), die Nummerierung des Proteins mit der ersten Aminosäure (A) der prozessierten Form. Peptide aus dem Lys-C-Verdau sind unterstrichen dargestellt. Die Small-Schnittstelle strangaufwärts des Startcodons und die ribosomale Bindungsstelle sind hervorgehoben.

Die *laao*-Gensequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz wurden im Laufe dieser Arbeit bei der GenBank eingereicht und erhielten die Nummer AY053450 (GI: 18026226) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Eine Datenbankrecherche mit dem gesamten Insert aus Klon 15 (3143 bp) ergab Homologien zu einer Transmembrankomponente des ABC-Transportersystems und zu Proteinen, die zum Sec-unabhängigen Proteintransport gehören (TatA/E) (Abb. 43).

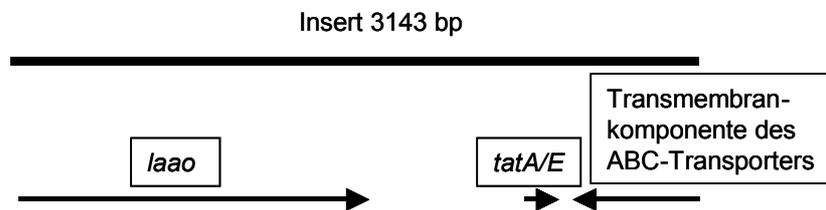


Abb. 43: Lage des *laao*-Gens im Insert. Homologe Bereiche zu bereits bekannten Proteinen.

3.5 Klassifizierung und Alignment der L-AAO

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der *Rhodococcus opacus* L-AAO mit der PFAM-HMM-Datenbank, die die Alignments und Modelle von 3735 Proteinfamilien enthält (April 2002) (<http://pfam.wustl.edu>), ergab die Klassifizierung zur Familie der flavin-haltigen Aminoxygenasen (PF01593). Vertreter dieser Familie sind: Polyaminoxidasen, L-Aminosäureoxidasen, Monoaminoxidasen, Tryptophan-2-monooxygenasen, Phytoen-Dehydrogenasen, Putrescinoxidasen, Corticosteroid-bindende Proteine und antibakterielle Glycoproteine. Die Zuordnung des Enzyms zu dieser Familie war anhand einiger hochkonservierter Sequenzmotive der FAD-/NAD(P)⁺-bindenden Proteine möglich. Ein partielles Alignment zwischen der *Rhodococcus opacus* L-AAO, 8 weiteren L-AAOs und 2 L-Aminosäuredesaminasen wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt und zeigt zwei dieser konservierten Bereiche (Abb. 44). Sämtliche Sequenzen enthalten das hochkonservierte Dinucleotid-Bindungsmotiv (DBM):

ohhhhGxGxxGxxxhxxL

(o = polarer Rest, h = hydrophober Rest, x = beliebiger Rest)

Alle H₂O₂-produzierenden L-AAOs weisen im Gegensatz zu den L-Aminosäuredesaminasen auch ein zweites, charakteristisches Sequenzmotiv auf, das 6-9 Aminosäuren strangabwärts des DBM liegt:

hxxhExxxRxGGRhxo

Consensus		ohhhhGxGxxGLxxhxxL	hxxhExxxRxGGRhxo
<i>Rhodococcus opacus</i> *	12	..HSVVVLGGGPAGLXSAFELQKAGYK---VTVLEARTRPGGRVWT..	
<i>Scomber japonicus</i> *	30	..HHVVIVGAGMAGLTAAKLLQDAGHT---VTILEANDRVGGRVET..	
<i>Crotalus adamanteus</i> *	13	..KRVVIVGAGMAGLSAAYVLAGAGHQ---VTVLEASERVGGRVRT..	
<i>Calloselasma rhodostoma</i> *	13	..KHVVIVGAGMAGLSAAYVLAGAGHQ---VTVLEASERPGRVRT..	
<i>Neurospora crassa</i> *	47	..KNIAIVGAGMSGLMTYLCLTQAGMTN---VSIIEGGNRLGGRVHT..	
<i>Synechococcus spec.</i> *		..RSVLVLGAGMAGLTAALSLLRRGHQ---VTVIEYQNRIGGRLLS..	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> *	28	..CDVVVVGGGCGGIYSAYRLLSGTTLKPS-VCTFEATNRVGGRIFS..	
<i>Streptomyces platensis</i> *	43	..KRILIVGAGIAGLVAGDLLTRAGHE---VTILEANANRVGGRIKT..	
<i>Mus musculus</i> *	32	..KRVVVVGGAGMAGLVAAKTLLQDAGHE---VTILEASNHIIGGRVVT..	
Consensus		ohhhhGxGxxGhxxhxxL	hxxhE
<i>Proteus mirabilis</i>	55	..ADVVIIGAGIQGIMTAINLAERGMS---VTILEKGQIAGEQSGR..	
<i>Proteus vulgaris</i>	55	..ADVVVVGGAGILGIMTAINLVERGLS---VVIVEKGNIAGEQSSR..	

Abb. 44: Partielles Sequenzalignment der *Rhodococcus opacus* L-AAO mit 8 weiteren L-AAOs und 2 Aminosäuresaminasen (*Proteus mirabilis* und *vulgaris*). Die Sequenzinformationen stammen aus der NCBI-Datenbank. Proteine, die posttranslational am N-Terminus modifiziert werden, sind markiert (*). Die Nummerierung beginnt mit der ersten Aminosäure der prozessierten Form, bei der L-AAO aus *Synechococcus spec.* ist die Prozessierungsstelle nicht bekannt. In der ersten Zeile ist die Consensus-Sequenz der FAD-bindenden Proteine dargestellt [116].

3.6 Strukturalignment der L-AAO

Das Programm SWISS-MODELL vergleicht die Sequenz eines Zielmoleküls mit den Sequenzen von Proteinen, deren dreidimensionale Struktur schon bekannt ist. Homologe Bereiche werden dann automatisch in iterativen Schritten unter Verwendung der bereits bekannten Struktur(en) als Templat modelliert [134-136].

Die Struktur der *Calloselasma rhodostoma* L-AAO wurde aufgrund der Ähnlichkeiten zu der Primärstruktur der *Rhodococcus opacus* L-AAO durch das Programm als Templat ausgewählt. Jedoch war die Homologie nur im Bereich der konservierten Teilsequenz K9-E59 hoch genug, um eine Modellierung durchführen zu können. In Abb. 45 ist die Lage dieses Sequenzbereichs in Bezug auf die Gesamtstruktur einer *Calloselasma rhodostoma* L-AAO-Untereinheit dargestellt.

Bei der Vergrößerung der Teilsequenz K9-E59 aus der Gesamtstruktur wurde deutlich, dass einige Aminosäurereste an der Bindung des FAD beteiligt sind (Abb. 46). Nur der nicht-reaktive Teil des FAD, hauptsächlich die AMP-Einheit, wird durch diese hochkonservierte Aminosäuresequenz gebunden, der Isoalloxazinring, der vermutlich im aktiven Zentrum liegt, ragt aus dem $\beta\alpha\beta$ -Strukturmotiv heraus.

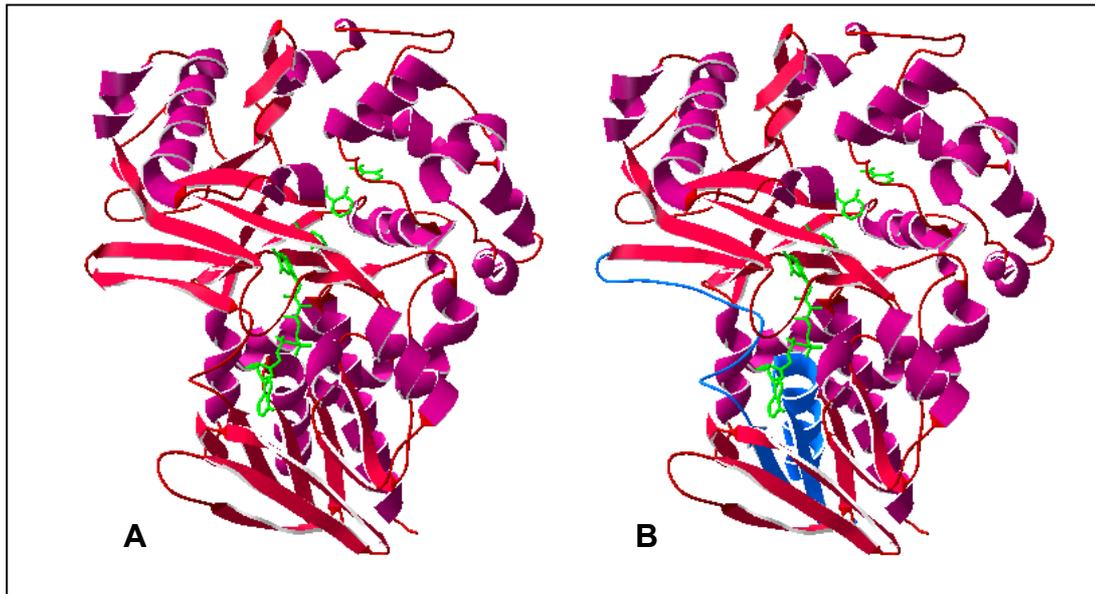


Abb. 45: (A) Dreidimensionale Struktur der *Calloselasma rhodostoma* L-AAO (1F8S). Gezeigt ist eine Untereinheit des Holoenzym. Die α -Helices sind violett, die β -Faltblätter rot und die Inhibitormoleküle (Aminobenzoat) sowie das FAD grün dargestellt. (B) Partielle Modellierung der dreidimensionalen Struktur der *Rhodococcus opacus* L-AAO. Als Templat wurde die Struktur der *Calloselasma rhodostoma* L-AAO eingesetzt (rote und violette Bereiche), die blauen Markierungen entsprechen dem modellierten Sequenzbereich K9 bis E59 der *Rhodococcus opacus* L-AAO.

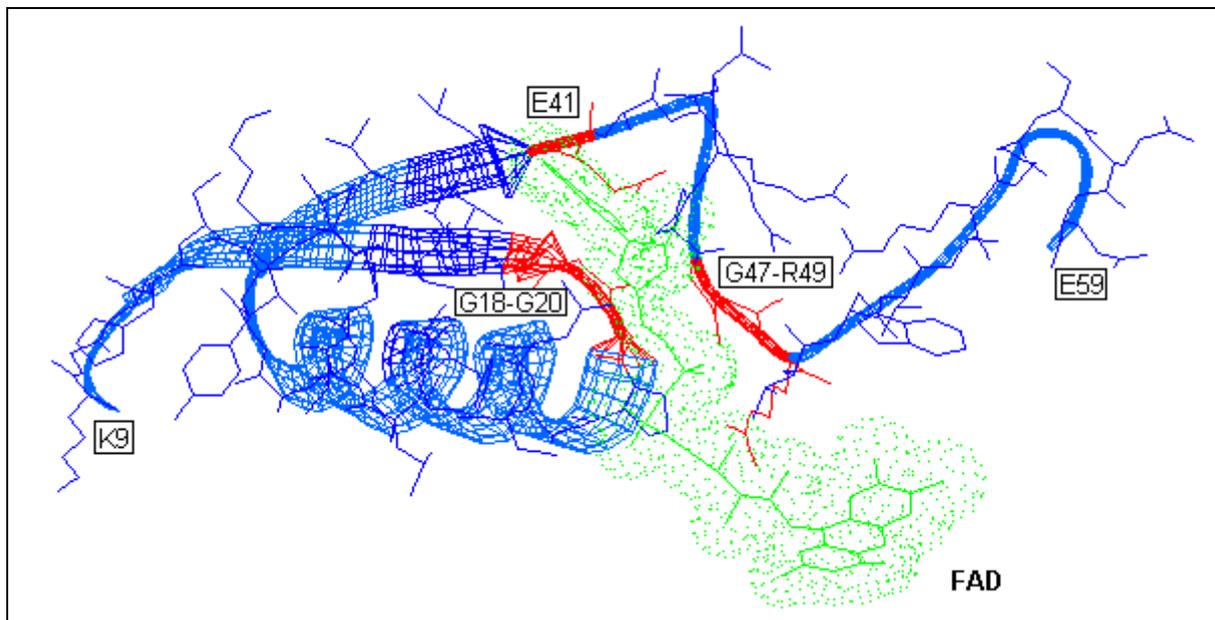


Abb. 46: Dreidimensionale Modellierung des Sequenzbereichs K9 bis E59 der *Rhodococcus opacus* L-AAO mit Cofaktor FAD (grün). Der Sequenzabschnitt H12-G18 liegt demnach als β -Faltblatt, P21-A33 als α -Helix und Q35-L39 erneut als β -Faltblatt vor. Die Reste, die aufgrund ihrer räumlichen Anordnung das FAD binden könnten, sind rot dargestellt.

Aufgrund der niedrigen Homologien zwischen den Primärstrukturen des Zielproteins und des Templats konnte nur ein Sequenzabschnitt von 51 Aminosäuren modelliert werden, Vorhersagen über das aktive Zentrum waren überhaupt nicht möglich. Die Limitierungen dieser Methode zeigten deutlich, dass erst über die Aufklärung der Kristallstruktur der *Rhodococcus opacus* L-AAO ein komplettes Verständnis des Enzyms möglich sein wird.

4 Heterologe Expression der L-AAO

Die Restriktionskarte des *laao*-Gens wurde erstellt, um die Auswahl geeigneter Schnittstellen für die Klonierung des Gens in verschiedene Expressionsvektoren zu ermöglichen (Abb. 47).

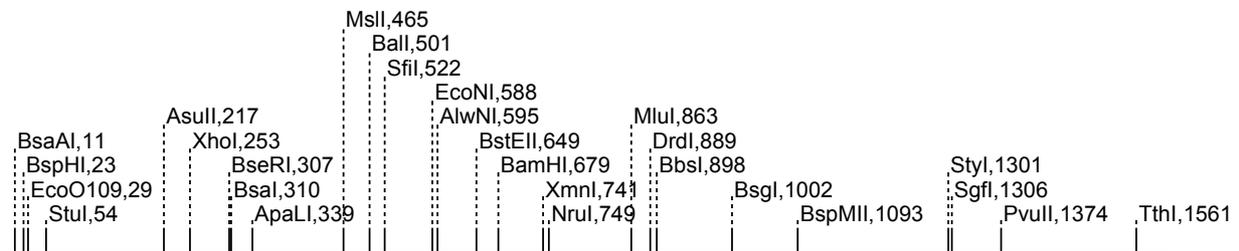


Abb. 47: Schematische Restriktionskarte des *laao*-Gens. Die Zahlen markieren den Ort der jeweiligen Schnittstelle im Gen.

4.1 *E. coli* als Expressionssystem

4.1.1 Klonierung des *laao*-Gens in *E. coli*-Expressionsvektoren

Über PCR wurden Restriktionsschnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *laao*-Gens eingefügt. Das Startcodon TTG des *laao*-Gens wurde für alle folgenden Klonierungen mittels PCR gegen ATG ausgetauscht. Die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors wurde jeweils so ausgesucht, dass die Entfernung zwischen dem Startcodon des Gens und der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors 6 bis 8 Basen betrug. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sind in Abb. 48 dargestellt.

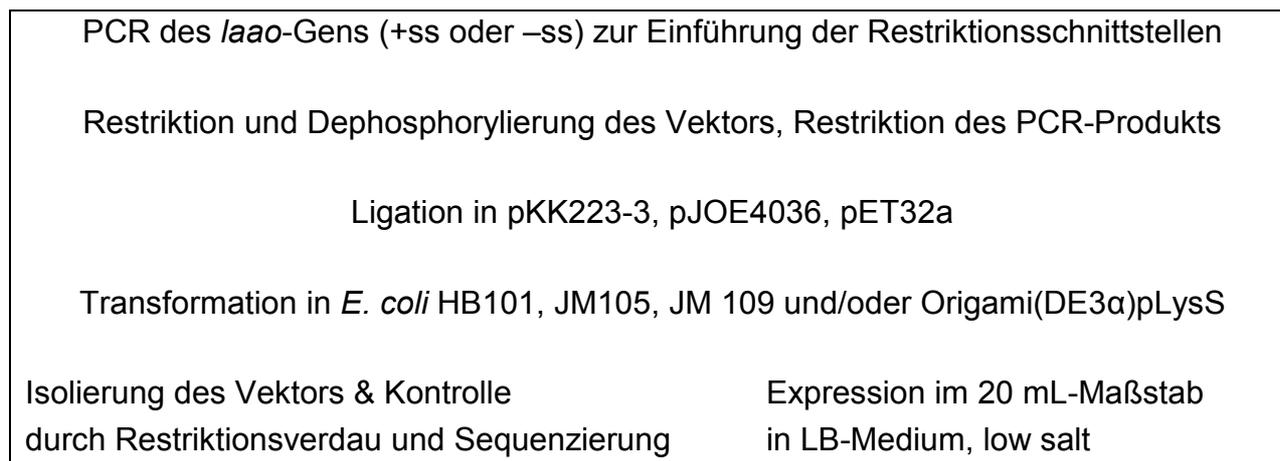


Abb. 48: Fließschema zur Klonierung der *laao* in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren (ss = Signalsequenz).

Zur Expression der L-AAO wurde das Gen jeweils mit und ohne Signalsequenz (*laao*+ss, *laao*-ss) in die *E. coli* Expressionsvektoren pKK223-3 und pJOE4036 kloniert (Tab. 8).

Der Vektor pKK223-3 enthält den IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor, die *lacZ*-Ribosomenbindungsstelle, eine 'multiple cloning site' mit 5 Schnittstellen innerhalb des *lacZ*-Gens, die eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht, den Transkriptionsterminator *rrnB* und eine Ampicillin-Resistenz.

Der Expressionsvektor pJOE4036 enthält den $rhaP_{BAD}$ -Promotor, der durch Rhamnose induziert wird. Die Ribosomenbindungsstelle stammt aus dem Capsidgen des Phagen T7. Weiterhin sind der Transkriptionsterminator *rrnB*, eine Ampicillin-Resistenz und eine 'multiple cloning site' mit 9 Schnittstellen Bestandteil des Vektors. Um eine Expression in *Rec*⁺-Stämmen zu ermöglichen, wurde die *cer*-Region aus dem Plasmid ColE1 eingefügt [137]. Das Expressionsprodukt kann C-terminal mit einem His-Tag versehen werden.

Das *laao*-Gen wurde mit Signalsequenz in den Vektor pET32a kloniert (Tab. 8). Dieser Vektor enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Ampicillin-Resistenz, eine Ribosomenbindungsstelle für das Capsid-Gen des Phagen T7 und eine 'multiple cloning site' mit 11 Schnittstellen [138]. Über eine geeignete Auswahl der Restriktionsschnittstellen kann das Zielprotein N-terminal mit Thioredoxin fusioniert werden. Das Fusionsprotein lässt sich aufgrund einer internen Enterokinase-Schnittstelle wieder spalten. Die Fusion mit Thioredoxin und die Expression in *trxB*- und *gor*-defizienten *E. coli* Origami-Stämmen soll die Löslichkeit von Proteinen erhöhen, die möglicherweise Disulfidbrücken enthalten und unter allgemeinen Expressionsbedingungen hauptsächlich als Inclusion Bodies vorliegen [139].

Tab. 8: Zusammenfassung der neuerstellten *E. coli*-Vektoren.

Name	Vektor	Insert	Restriktion		Primer	
			5'	3'	5'	3'
pKlaao+	pKK223-3	<i>laao</i> +ss	EcoRI	HindIII	EcoRI+ssfor	HindIIIrev
pKlaao-	pKK223-3	<i>laao</i> -ss	EcoRI	HindIII	EcoRI-ssfor	HindIIIrev
pJlaao+	pJOE4036	<i>laao</i> +ss	NdeI	HindIII	NdeI+ssfor	HindIIIrev
pJlaao-	pJOE4036	<i>laao</i> -ss	NdeI	HindIII	NdeI-ssfor	HindIIIrev
pElao+	pET32a	<i>laao</i> +ss	NcoI	HindIII	NcoI+ssfor	HindIIIrev

4.1.2 Untersuchung der Expressionsbedingungen in *E. coli*

Umfassende Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen für die L-AAO in *E. coli* wurden durchgeführt. Der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, die Induktionstemperatur und -dauer wurden dabei variiert. Unterschiedliche *E. coli*-Stämme und Expressionsvektoren wurden eingesetzt. In keinem der zellfreien Rohextrakte wurde L-AAO-Aktivität gemessen, bei einigen Ansätzen konnte die L-AAO jedoch als deutliche Bande im SDS-Gel in der unlöslichen Fraktion sichtbar gemacht werden (Abb. 49). Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tab. 9 zu sehen.

Tab. 9: Variation der Induktions- und Kultivierungsbedingungen für verschiedene Vektor-Wirt-Systeme.

Plasmid	<i>E. coli</i>	Induktor		Induktions-			Akti- vität	Inclusion Bodies
			Konz.	Dauer (h)	Zeitpunkt OD ₅₅₀	Temp. (°C)		
pKlaao+	HB101	IPTG	0,01-1mM	4	0,6-0,7	25-37	-	-
pKlaao+	JM105	IPTG	0,5-1 mM	4-14	0,3-0,4	25-37	-	+
pKlaao-	HB101	IPTG	1 mM	4-14	0,3-0,4	37	-	-
pKlaao-	JM105	IPTG	0,5-1 mM	4	0,3-0,4	30-37	-	-
pJlaao+	JM109	Rha	0,2%	2-4	0,5-0,7	20-30	-	+
pJlaao-	JM109	Rha	0,2%	2-4	0,5-0,7	20-30	-	-
pElao+	Origami	IPTG	1 mM	4-5	0,4-0,6	37	-	+

4.1.3 Renaturierung von Inclusion Bodies

Die L-AAO ließ sich trotz Variation der Expressionsbedingungen nicht löslich in *E. coli* exprimieren. Da die L-AAO nach der Kultivierung einiger Vektor-Wirt-Systeme in der unlöslichen Zellfraktion detektiert wurde (Tab. 9), wurden Versuche unternommen, diese Inclusion Bodies zu renaturieren. pJlaao+ in *E. coli* JM109 und pElao+ in *E. coli* Origami (DE3 α)pLysS wurden bei 37°C für 4 h mit 0,2% Rha bzw. 1 mM IPTG induziert, um möglichst hohe Mengen an Inclusion Bodies zu erhalten. Die nach dem Zellaufschluss unlöslichen Fraktionen wurden in harnstoffhaltigem Solubilisierungspuffer gelöst.

Beim Versuch, den Solubilisierungspuffer durch Dialyse gegen den Renaturierungspuffer auszutauschen, fielen die Proteine sofort im Dialyseschlauch aus. Als Alternative wurden die solubilisierten Proben durch langsame Zugabe von FAD-haltigem Renaturierungspuffer so weit verdünnt, dass die Harnstoffkonzentration nur noch bei 0,4 M lag. Bei diesem Verfahren wurden keine Proteinpräzipitate beobachtet. Jedoch wurde die L-AAO offensichtlich nicht in ihre aktive Form zurückgefaltet, da keine Aktivität gemessen werden konnte.

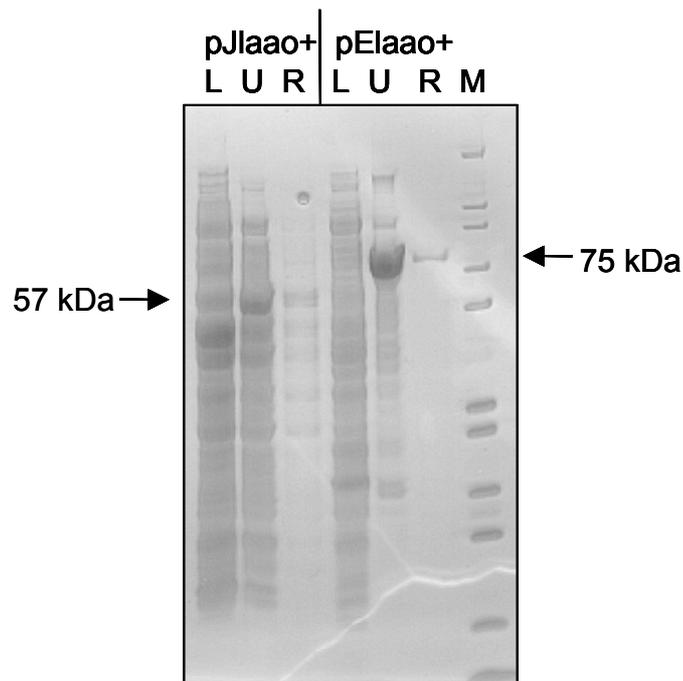


Abb. 49: Renaturierung der L-AAO-Inclusion Bodies aus *E. coli* JM109 (pJlao+) und *E. coli* Origami (DE3 α)pLysS (pElao+). In den mit L markierten Spuren wurde der lösliche Überstand aufgetragen, in den mit U bezeichneten Spuren die durch Harnstoffzugabe solubilisierten Pellets. R markiert die Proben nach Verdünnung mit Renaturierungspuffer (mit 20 μ M FAD) und M den Größenstandard. Die Pfeile zeigen die Laufhöhe der L-AAO (57 kDa) und des Fusionsproteins aus Thioredoxin und L-AAO (75 kDa) an.

Aus Abb. 49 wird deutlich, dass sich die Inclusion Bodies in beiden Fällen lösen ließen und auch nach Senkung der Harnstoffkonzentration in Lösung blieben. Jedoch konnte mit dieser Methode die L-AAO-Aktivität nicht wiederhergestellt werden.

4.2 *Streptomyces lividans* als Expressionssystem

4.2.1 Klonierung des *lao*-Gens in *Streptomyces*-Expressionsvektoren

Die Klonierung des *lao*-Gens in *Streptomyces*-Expressionsvektoren erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie Klonierungen in *E. coli*-Vektoren (4.1.1). Ein Hauptunterschied bei der Arbeit mit *Streptomyces* als Expressionssystem lag in der Herstellung der

kompetenten Zellen und der Transformation. Die Abfolge der Arbeitsschritte ist in Abb. 50 schematisch dargestellt.

Das *laao*-Gen wurde mit Signalsequenz in die *Streptomyces*-Expressionsvektoren pIJ6021 und pUWL201 kloniert (Tab. 10).

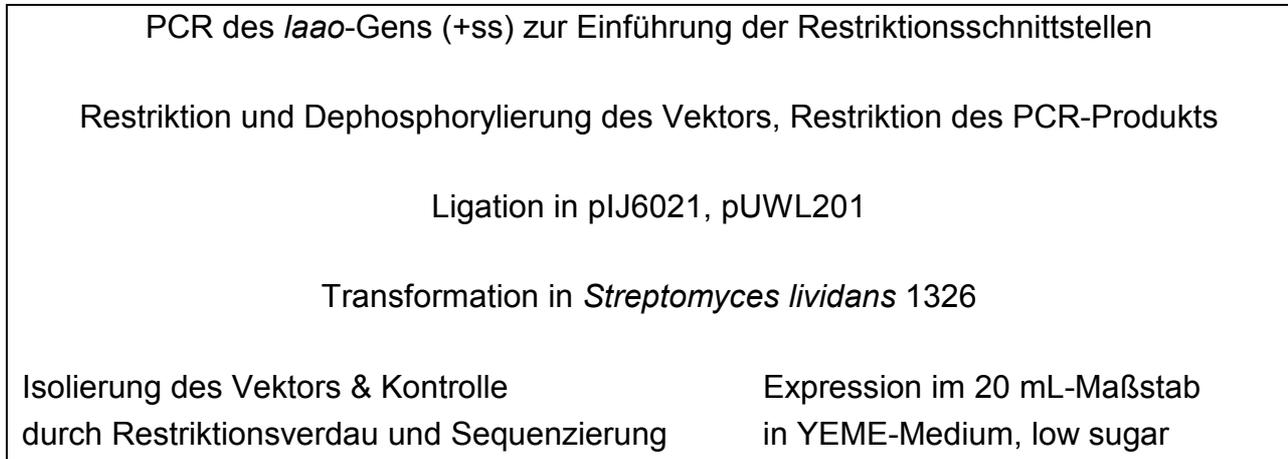


Abb. 50: Fließschema zur Klonierung der *laao* in verschiedene *Streptomyces*-Expressionsvektoren.

Der Expressionsvektor pIJ6021 enthält den durch Thiostrepton induzierbaren p_{tipA} -Promotor und die *tipA* ribosomale Bindungsstelle, eine 'multiple cloning site', ein Kanamycin- und ein Thiostrepton-Resistenzgen (*kan* und *tsr*) und zwei Transkriptionsterminatoren (t_o und t_{fd}). Die Kanamycinresistenz dient zur Selektion positiver Klone. Ohne die Thiostreptonresistenz wäre eine Induktion durch dieses Antibiotikum nicht möglich [140].

Der Vektor pUWL201 ist ein Shuttle-Vektor und kann in *E. coli* und *Streptomyces* amplifiziert werden. Strangaufwärts der 'multiple cloning site' liegt der konstitutive Promotor *ermEp**, strangabwärts der Transkriptionsterminator t_{fd} . Soll der Vektor für die Expression in *Streptomyces* eingesetzt werden, muss eine ribosomale Bindungsstelle am 5'-Ende des Gens eingefügt werden, da der Vektor solch einen Sequenzabschnitt nicht enthält [141].

Tab. 10: Zusammenfassung der neuerstellten *Streptomyces*-Vektoren.

Name	Vektor	Insert	Restriktion		Primer	
			5'	3'	5'	3'
pIIaao+	pIJ6021	<i>laao</i> +ss	NdeI	HindIII	NdeI+ssfor	HindIIIrev
pUIaao+	pUWL201	<i>laao</i> +ss	HindIII	EcoRI	HindIII+ssRBSfor	EcoRIrev

4.2.2 Optimierung der Expressionsbedingungen in *Streptomyces lividans*

Die beschriebenen *Streptomyces*-Expressionssysteme wurden bezüglich ihrer spezifischen L-AAO-Aktivitäten im zellfreien Rohextrakt untersucht.

Streptomyces lividans (p_{llao+}) wurde als erstes mit zwei verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Medium (YEME, high sugar: 34%; YEME, low sugar: 5%) angezogen. Der Einsatz von 34% Saccharose wurde empfohlen, um die *Streptomyces*-Zellpellets möglichst klein zu halten. In diesen Untersuchungen beeinflusste die Saccharosekonzentration die Mycelbildung jedoch nicht, das Wachstum der Zellen wurde durch den hohen osmotischen Druck aber deutlich verlangsamt. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Experimente ausschließlich in YEME, low sugar durchgeführt.

Im Folgenden wurden der Induktionszeitpunkt und die Induktionsdauer von *Streptomyces lividans* (p_{llao+}) variiert. Der Induktionszeitpunkt hatte einen großen Einfluss auf die Expression der L-AAO (Abb. 51). Wurden die Zellen nach 10 h induziert, lag die spezifische Aktivität im zellfreien Rohextrakt nach weiteren 23 h bei 180 mU·mg⁻¹. Bei Induktion zum Animpfzeitpunkt oder nach 5 h verlangsamte sich das Wachstum deutlich und die spezifischen Aktivitäten erreichten Werte von maximal 70 mU·mg⁻¹.

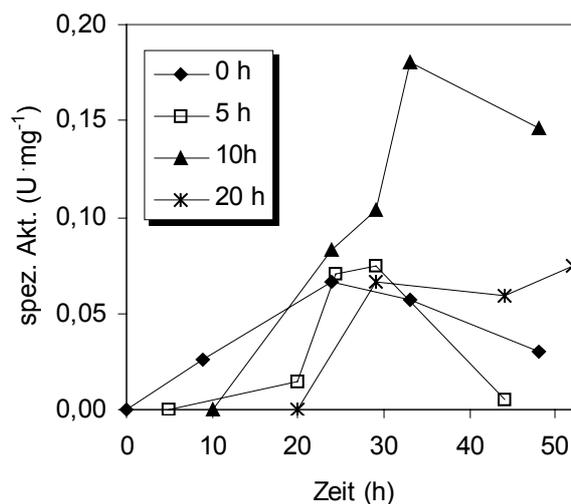


Abb. 51: Spezifische Aktivität der L-AAO im zellfreien Rohextrakt in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt und der Induktionsdauer; Medium: YEME, low sugar.

Streptomyces lividans (p_{Ulao+}) wurde in YEME, low sugar kultiviert, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und auf L-AAO-Aktivität untersucht. Im Vergleich zu *Streptomyces lividans* (p_{llao+}) wuchsen diese Zellen deutlich langsamer. Die höchste spezifische Aktivität wurde nach 53 h Kultivierungsdauer erreicht und lag bei 55 mU·mg⁻¹.

Die Vorteile eines induzierbaren Expressionssystems zeigten sich im Vergleich der zwei getesteten Plasmide. Während durch die konstitutive Expression der L-AAO in *Streptomyces lividans* (p_{Ulao+}) das Wachstum verlangsamt wurde und die Enzymausbeute relativ niedrig war, lag die spezifische L-AAO-Aktivität im Rohextrakt von *Streptomyces lividans* (p_{llao+}) nach einer vorläufigen Optimierung des Induktionszeitpunktes und der –dauer um den Faktor 3 höher.

4.2.3 Fermentation des rekombinanten *Streptomyces lividans*-Stammes

Der rekombinante *Streptomyces lividans* 1326-Stamm mit dem Plasmid pllaao+ wurde zur Produktion der rec-L-AAO im 10 L-Maßstab fermentiert. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 52 dargestellt.

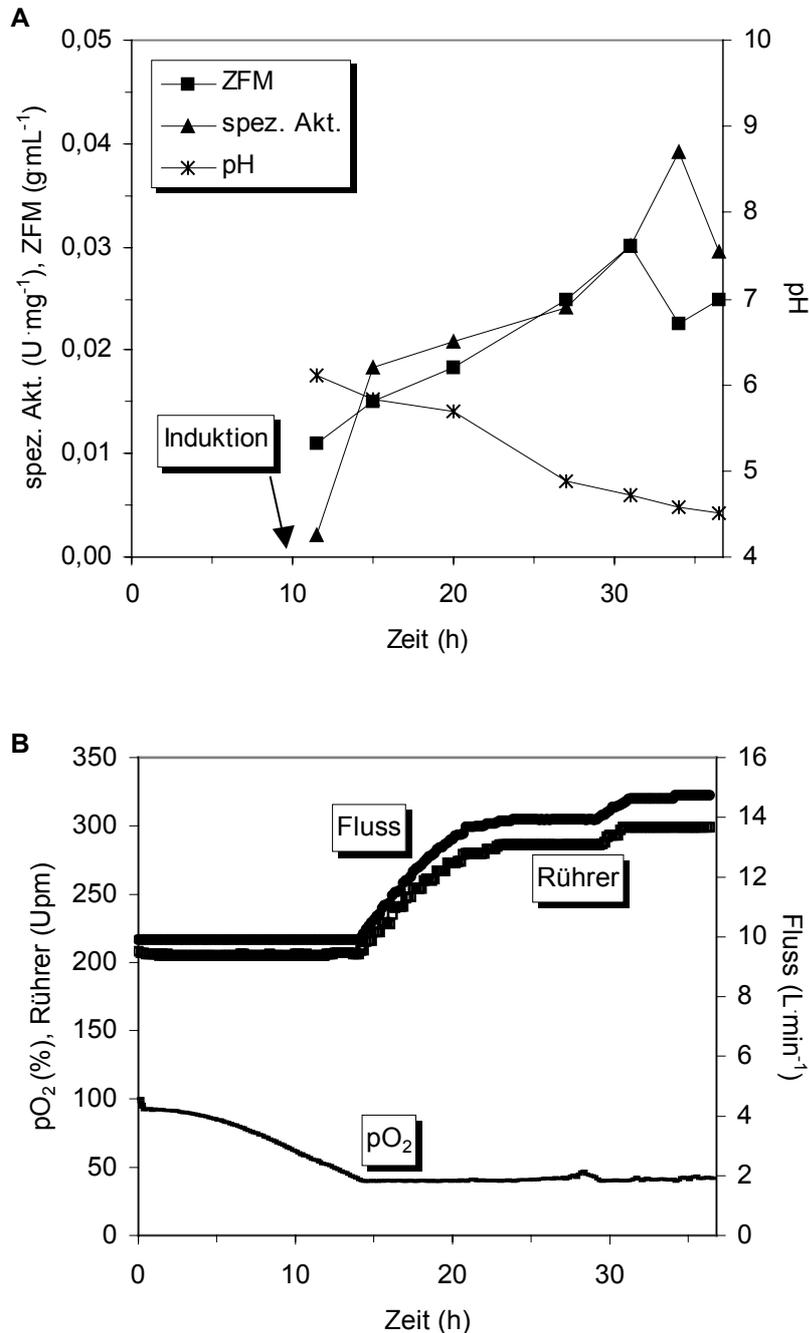


Abb. 52: Ergebnisse der Fermentation von *Streptomyces lividans* 1326 (pllaao+) im 10 L-Maßstab. **A** zeigt die Zellfeuchtmasse, die spezifische Aktivität und den pH-Verlauf, in **B** ist der pO₂, die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer dargestellt.

Die Zellen wurden nach 10 h Fermentationsdauer mit Thiostrepton induziert, in den darauf folgenden Stunden wurde ein deutlicher Anstieg der L-AAO-Aktivität bis auf $40 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ beobachtet. Die Zellmasse nahm während der Induktionsphase weiter zu, direkt nach der Induktion wurde auch der $p\text{O}_2$ nicht signifikant beeinflusst. Da *Streptomyces lividans* während des Wachstums Mycelpellets bildet, die sich sehr schlecht durch Zentrifugation vom Medienüberstand separieren ließen, wurden die Zellen durch Filtration geerntet. Die Mycelbildung erschwerte ebenfalls die Messung der optischen Dichte während der Fermentation.

5 Vergleich der rec-L-AAO mit der Wildtyp L-AAO

5.1 Expressionsraten und spezifische Aktivität im Rohextrakt

Die L-AAO wurde in *Streptomyces lividans* löslich exprimiert. Bei der Analyse der löslichen und unlöslichen Zellfraktionen mittels SDS-PAGE wurde in keiner Fraktion eine überexprimierte Bande sichtbar. Bei Kultivierung des rekombinanten *Streptomyces*-Stammes im Schüttelkolben wurden bis zu dreimal höhere L-AAO-Ausbeuten erzielt als im Wildtyp. Während der Fermentationen von *Rhodococcus opacus* und *Streptomyces lividans* im 10 L-Maßstab wurden vergleichbare Enzymmengen produziert (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich der L-AAO-Expressionsausbeuten in *Rhodococcus opacus* und *Streptomyces lividans* (p_{llaa0+}) (ZFM = Zellfeuchtmasse, Akt./Vol. = volumetrische Aktivitätsausbeute, RZA = Raum-Zeit-Ausbeute)

	<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>Streptomyces lividans</i>	
	(Wildtyp) Fermenter	Schüttelkolben	Fermenter
Max. spez. Akt. im Rohextrakt ($\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$)	20-70	180	40
Dauer (h)	24	33	35
ZFM ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	15	15	30/8*
Akt./ZFM ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,8	3	0,6
Akt./Vol. ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	12	45	18
RZA ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,5	1,4	0,5

* Zellen wurden durch Filtration geerntet und waren deutlich trockener als nach der Zentrifugation.

5.2 Reinigung der rec-L-AAO

Die rec-L-AAO wurde in drei Chromatographieschritten aufgereinigt. Dazu wurde das für die Wildtyp L-AAO entwickelte Reinigungsprotokoll leicht modifiziert. Die *Streptomyces lividans*-Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss daran folgte eine Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF. Im zweiten Aufreinigungsschritt, der hydrophoben Interaktionschromatographie, eluierte die L-AAO durch Senkung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration auf 0,38 M. Nach der dritten Chromatographie an Hydroxylapatit lag die rec-L-AAO homogen vor (Abb. 53). Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tab. 12 wiedergegeben. Die L-AAO wurde um den Faktor 186 angereichert, die Ausbeute lag nach dem dritten Reinigungsschritt bei 27%. Die spezifische Aktivität der rec-L-AAO für L-Alanin lag bei $5,4 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem der Wildtyp L-AAO nach der zweistufigen Reinigung.

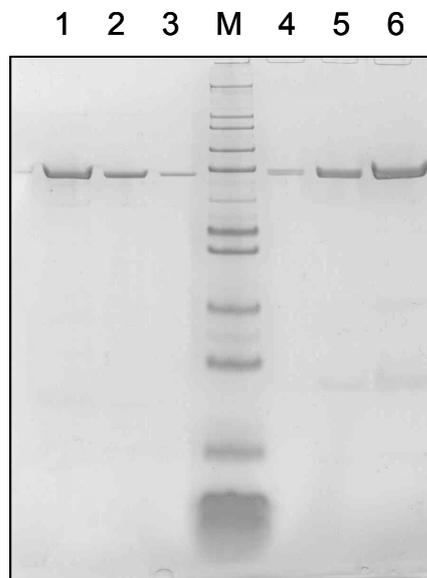


Abb. 53: SDS/PAGE der homogenen Wildtyp L-AAO (Spur 1-3) und rec-L-AAO (Spur 4-6); Spur M: Marker.

Tab. 12: Reinigungsschema der rec-L-AAO aus *Streptomyces lividans* (15 g ZFM, durch Filtration geerntet).

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (mL)	Spez. Aktivität (U·mg ⁻¹)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	16,1	555	55	0,029	1	100
Q-Sepharose	13,9	26	90	0,53	18	86
Phenylsepharose	7,0	4,3	54	1,6	57	43
Hydroxylapatit	4,4	0,8	15	5,4	186	27

5.3 N-Terminale Sequenzdaten

Die rec-L-AAO wurde N-terminal sequenziert, um zu überprüfen, ob das Enzym in *Streptomyces lividans* und *Rhodococcus opacus* auf die gleiche Weise prozessiert wurde. Der N-Terminus der rec-L-AAO wies zwei Hauptsequenzen auf. Aufgrund der Kenntnis dieses Sequenzbereichs wurden zwei eindeutige Sequenzen zugeordnet (Abb. 54). Dieses Phänomen erklärt die im SDS-Gel schwach sichtbare Doppelbande. Die Prozessierung der rec-L-AAO trat zum einen an der vorhergesagten Schnittstelle auf (Sequenz 1) (Abb. 41), zum zweiten wurde die Signalsequenz im Vergleich zum Wildtyp-Enzym nur um eine Aminosäure versetzt abgespalten (Sequenz 2).

. . APARTFQPLAAGDLIGKVKG . . .		Sequenz der unprozessierten L-AAO
AGDLIGKVKG . . .		Wildtyp L-AAO
RTFQPLAAGDL . . .		rec-L-AAO, Sequenz 1
AAGDLIGKVKG . . .		rec-L-AAO, Sequenz 2



Abb. 54: Vergleich der N-terminalen Sequenzen der aufgereinigten Wildtyp L-AAO und der rec-L-AAO. Die Bande aus Spur 4 (Abb. 53) ist vergrößert dargestellt.

5.4 Kinetische Konstanten

Die kinetischen Konstanten der rec-L-AAO und der Wildtyp L-AAO wurden für das Standardsubstrat L-Alanin gemessen. Im Vergleich wurde deutlich, dass die rec-L-AAO eine leicht veränderte Kinetik zur Wildtyp L-AAO zeigt (Abb. 55). Folgende kinetische Parameter wurden modelliert:

$$\begin{array}{ll}
 \text{rec-L-AAO} & K_M = 0,45 \pm 0,03 \text{ mM} \quad v_{\max} = 6,17 \pm 0,11 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \quad K_{S_I} = 221 \pm 40 \text{ mM} \\
 \text{Wildtyp L-AAO} & K_M = 0,31 \pm 0,03 \text{ mM} \quad v_{\max} = 5,74 \pm 0,07 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}
 \end{array}$$

Die rec-L-AAO zeigte für L-Alanin eine schwache Substratüberschussinhibierung, während die Wildtyp L-AAO durch hohe L-Alanin-Konzentrationen nicht inhibiert wurde.

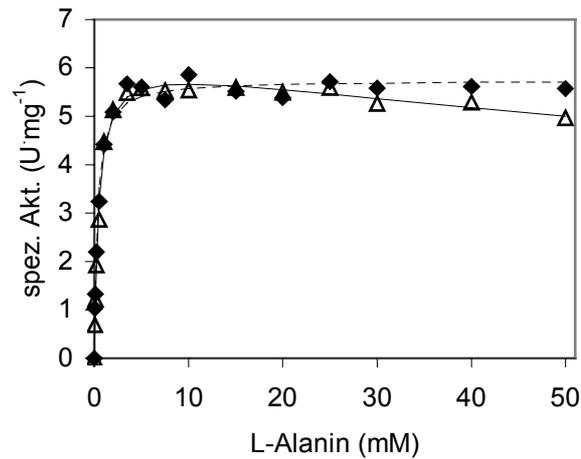


Abb. 55: Spezifische Aktivität der Wildtyp L-AAO (◆) und der rec-L-AAO (△) in Abhängigkeit von der L-Alanin-Konzentration.

5.5 Spektroskopische Eigenschaften

Die rec-L-AAO ließ sich durch Zugabe von 2 M Kaliumbromid ebenso wie die Wildtyp L-AAO in ihre Apoforn überführen (2.4.4). Die spektroskopischen Eigenschaften des Apo- und des Holoenzym waren mit denen des Wildtypenzym vergleichbar (Abb. 38, Abb. 56), die Absorptionsmaxima der Holoform waren nur leicht verschoben ($\lambda = 389,0$ und $449,5$ nm). Die Rekonstitution der Aktivität durch FAD-Zugabe war auch bei der rec-L-AAO nicht erfolgreich.

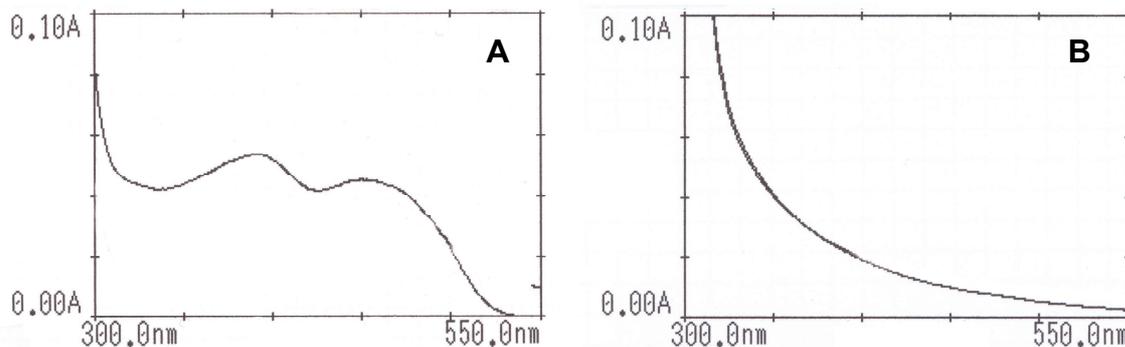


Abb. 56: Absorptionsspektrum des Holo- (A) und des Apoproteins (B) der rec-L-AAO.

6 Kristallisation

Proteine müssen zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse kristallisiert werden. Oft müssen viele verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet werden, um Einkristalle zu erhalten, die für die Diffraktionsmessungen geeignet sind.

22 mg L-AAO wurden homogen aufgereinigt und für Kristallisationsversuche verwendet. Die drei Kristallisationskits Crystal Screen, Crystal Screen 2 und Ammoniumsulfat Screen (Hampton Research) wurden bei 20°C eingesetzt, um geeignete Kristallisationsbedingungen für die L-AAO zu finden. In vielen der 124 Ansätze bildete die L-AAO ein Präzipitat, in wenigen Tropfen waren sehr kleine, nadelförmige Kristalle zu sehen und einige Ansätze blieben über Wochen klar.

Unter zwei Kristallisationsbedingungen entstanden auffällige Kristalle:

- Crystal Screen, Lösung 41
(10% v/v Isopropanol, 20% PEG 4000, 0,1 M HEPES, pH 7,5):
sehr kleine Kristalle, unregelmäßig, zwei verschiedene Formen
- Crystal Screen 2, Lösung 38
(20% PEG 10000, 0,1 M HEPES, pH 7,5):
ein sehr großer, relativ unregelmäßiger, gelber Kristall (> 1 mm)

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden folgende Parameter zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen variiert:

- das Molekulargewicht des PEGs (4000 und 10000),
- die PEG-Konzentration (10-40%),
- der pH-Wert (7,0-8,6),
- die Isopropanolkonzentration (0 oder 10%)
- der Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M HEPES) und
- die Temperatur (12°C, 20°C, 25°C)

Die L-AAO bildete in 10 bis 20% PEG kristalline Strukturen aus, bei höheren PEG-Konzentrationen präzipitierte das Enzym. Der pH-Wert beeinflusst die Kristallisationseigenschaften der L-AAO (Abb. 57). Die meisten der in diesen Versuchsreihen erhaltenen Kristalle wuchsen als flächige Cluster (Abb. 57 A-E) oder waren zu klein (Abb. 57 F), um Diffraktionsmessungen durchführen zu können.

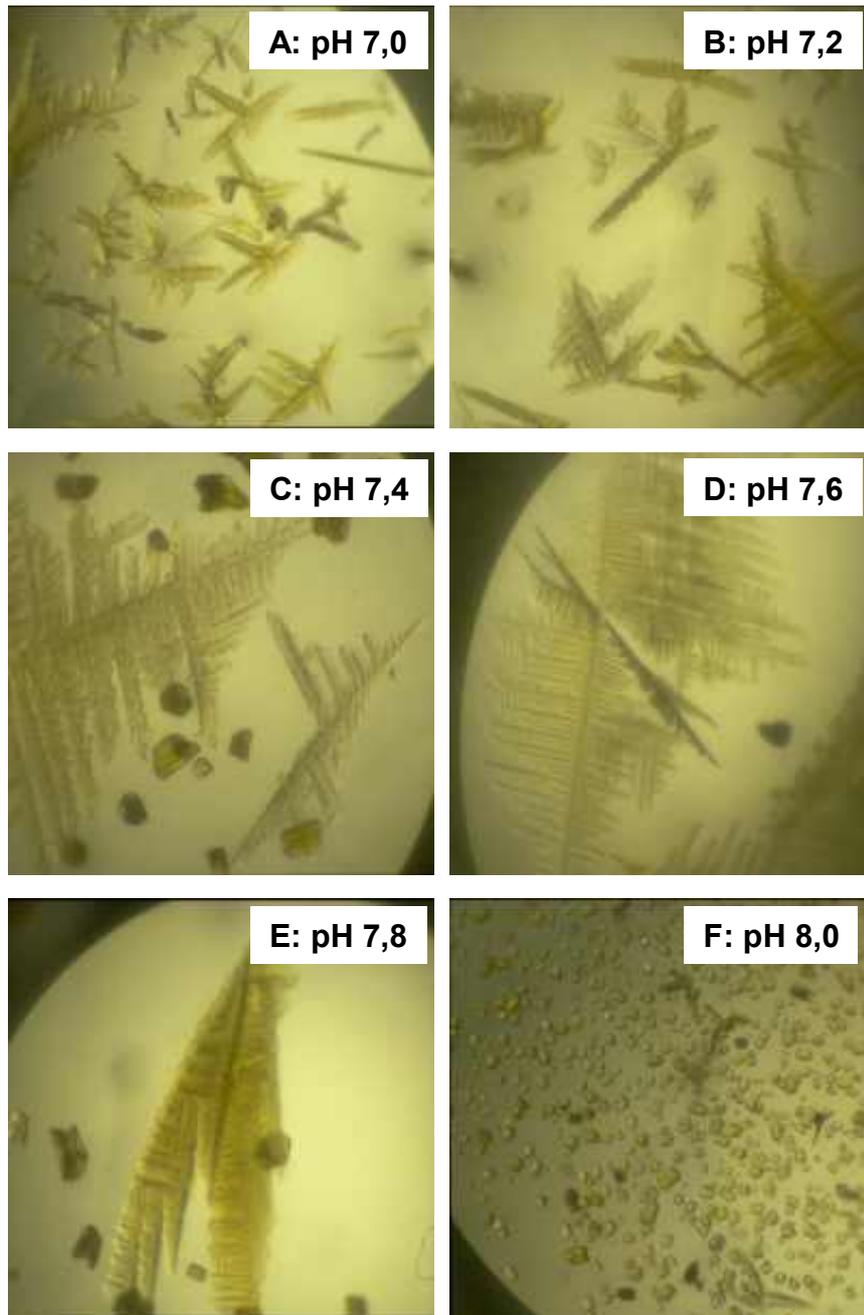


Abb. 57: L-AAO-Kristalle, Bedingungen: 0.1 M Hepes, 10% Isopropanol, 20% PEG 4000; 20°C.

Der Kristallisationstropfen, der in Abb. 57 F dokumentiert ist, wurde für die Impfkristallisation verwendet. Die vorbereitete Kristallisationsplatte enthielt eine Reservoirlösung mit 9 bis 13% PEG 4000, 10% Isopropanol und 0,1 M Hepes, pH 7,8 und im Tropfen $11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ L-AAO. Erneut bildeten sich orthorhombische Kristalle, je nach Animpfkonzentration in unterschiedlicher Größe und Anzahl. Durch mehrfache, sequentielle Wiederholung der Impfkristallisation und durch Senkung der L-AAO-Konzentration im Tropfen auf $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ wurden die Eigenschaften der Kristalle hinsichtlich ihrer Handhabbarkeit, Größe und ihres Diffraktionsvermögens optimiert (Abb. 58).

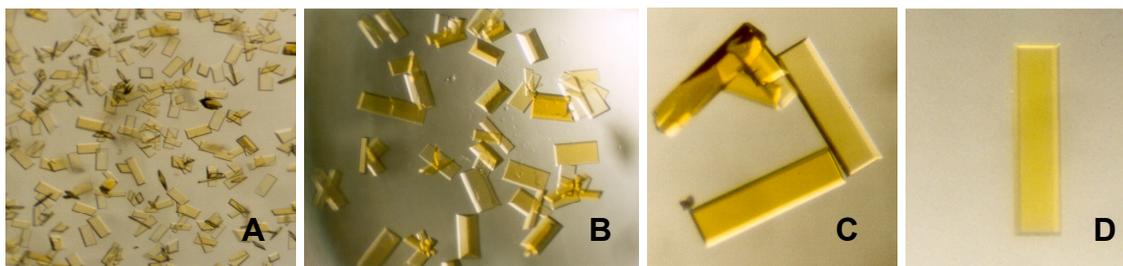


Abb. 58: L-AAO-Kristalle. A: Kleine Kristalle nach einmaliger Impfkristallisation, B: kleine Einkristalle mit Fehlbildungen ($> 0,2$ mm), C & D: Einkristalle nach mehrmaliger Impfkristallisation (> 1 mm).

Der Einfluss von Detergenzien auf die Kristallisation wurde ebenfalls untersucht. Durch Zugabe von $0,5 \mu\text{L}$ Cymal-5[®] zum Kristallisationstropfen entstanden mit 13% PEG 4000, 10% Isopropanol, 0,1 M HEPES pH 7,8 bei 12°C vermutlich hexagonale Kristalle (Abb. 59). Diese Kristalle waren aufgrund ihres hohen Lösungsmittelanteils sehr fragil und somit schwer zu handhaben.

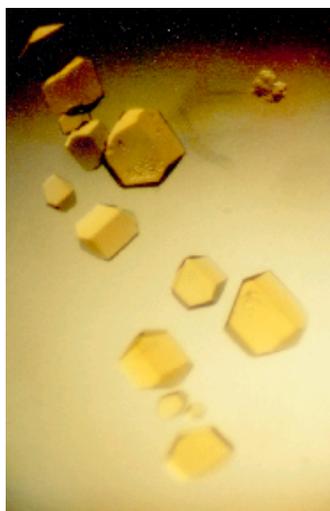


Abb. 59: L-AAO-Kristalle mit Zusatz von Cymal-5[®] (ca. $0,2$ mm).

Sowohl durch die sequentielle Impfkristallisation als auch durch Zugabe des Detergenz Cymal-5[®] konnten reproduzierbar innerhalb weniger Tage Einkristalle der L-AAO hergestellt werden, die vermutlich zwei verschiedenen Raumgruppen zuzuordnen sind. Mit den Kristallen wurden von Dipl.-Chemikerin Annette Faust (Institut für Biochemie, Universität Köln) Röntgendiffraktionsexperimente durchgeführt. Die Diffraktionseigenschaften der orthorhombischen Kristalle (Abb. 58, C & D) waren schon bei Raumtemperatur sehr gut (Auflösungsgrenze $< 1,7 \text{ \AA}$). Die vermutlich hexagonalen Kristalle (Abb. 59) zeigten bislang ein nur unzureichendes Diffraktionsverhalten.

Der bei den Diffraktionsmessungen mit Synchrotronstrahlung eingesetzte Tieftemperaturpuffer enthielt 20% MPD. Von zwei orthorhombischen Kristallen wurde an der ID29-Beamline der JSBG in der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble ein Röntgenbeugungsdatensatz bis zu einer Auflösung von unter $1,4 \text{ \AA}$ ($\lambda = 0,915 \text{ \AA}$) vermessen. Aufgrund der Qualität dieses Datensatzes könnte die Struktur der L-AAO in Zukunft bis zur atomaren Auflösung geklärt werden.

7 Präparation von D-Aminosäuren durch die L-AAO

7.1 Ganzzellbiotransformation

Rhodococcus opacus-Zellen wurden zur Racemattrennung von DL-Aminosäuren eingesetzt. Vorteile solch einer Ganzzellbiotransformation sind im Allgemeinen der geringe Arbeitsaufwand, da kein Enzym präpariert werden muss, und die Möglichkeit, den Katalysator nach der Umsetzung einfach abzutrennen und erneut zu verwenden. Jedoch ist die volumetrische Aktivität begrenzt und die Reaktionsgeschwindigkeit kann aufgrund von Transportprozessen ebenfalls limitiert sein. Folgende Reaktionsbedingungen wurden zur Racemattrennung von DL-Phenylalanin untersucht:

Enzymquelle	0,2 g <i>Rhodococcus opacus</i> -Zellen
Substrat	5 mM DL-Phe
Ansatzvolumen	5 mL
Reaktionsgefäß	Reagenzglas mit Schraubdeckel
Volumen d. Reaktionsgefäßes	15 mL
Puffer	50 mM TEA/HCl pH 7,6 50 mM Kpi pH 7,6 50 mM Glycin/NaOH pH 8,6 50 mM Tris/HCl pH 8,6
Katalase	+/-
Art der Durchmischung	Magnetrührer 1000 Upm Schüttler 135 Upm Wippe 60 Upm
Temperatur	25°C, 30°C, 37°C

In allen Ansätzen konnte nach maximal 2 h kompletter Umsatz der L-Komponente beobachtet werden, so dass ee-Werte für D-Phenylalanin von über 99% erreicht wurden. Generell schien eine Erhöhung der Temperatur bis 37°C die Reaktionsgeschwindigkeit zu beschleunigen, ohne eine deutliche Inaktivierung des Enzyms während der Messzeit hervorzurufen. Die bevorzugten Puffer waren Tris/HCl pH 8,6 und TEA/HCl pH 7,6. Ein externer Zusatz von Katalase hatte keine Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Begründet werden kann dieses Phänomen mit der hohen zelleigenen Katalasekonzentration in *Rhodococcus opacus* und der Tatsache, dass die zugesetzte Katalase gar nicht mit dem möglicherweise intrazellulär produzierten H₂O₂ in Kontakt kommen kann.

Die Stabilität der Zellen während der Reaktion wurde durch Messung des Proteingehalts und der L-AAO-Aktivität im Überstand verfolgt. Während des gesamten Reaktionsverlaufes stieg die Proteinkonzentration an, nach spätestens 3 h war auch in allen untersuchten Ansätzen L-AAO-Aktivität im Überstand nachweisbar. Nach 5 h Reaktionsdauer betrug der Lysegrad der Zellen 50-60%. Die schlechte Stabilität der

Rhodococcus opacus-Zellen während der Umsetzung ist damit ein erheblicher Nachteil für deren Einsatz in der Racemattrennung.

7.2 Partiiell gereinigte L-AAO

Bei der Verwendung partiell gereinigter L-AAO zur Racematspaltung kann aufgrund der hohen Löslichkeit des Enzyms die Katalysatorkonzentration besser angepasst werden als beim Einsatz ganzer Zellen oder immobilisierten Enzyms. Die Möglichkeit zur Rückgewinnung der L-AAO über Ultrafiltration muss besonders bezüglich der Enzymausbeuten untersucht werden.

7.2.1 Umsatz von DL-Phenylalanin

DL-Phenylalanin wurde im 1 mL-Maßstab durch die L-AAO umgesetzt und der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Phenylalanin:

Enzymquelle	0,49 U L-AAO
Substrat	50 mM DL-Phe
Ansatzvolumen	1 mL
Reaktionsgefäß	Reagenzglas mit Deckel
Volumen Reaktionsgefäß	15 mL
Puffer	50 mM TEA/HCl pH 7,6
Katalase	2600 U·mL ⁻¹
Art der Durchmischung	Wippe 60 Upm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde die L-Komponente zu 99,6% umgesetzt und ein ee-Wert von 99,2% für D-Phenylalanin erreicht (Abb. 60).

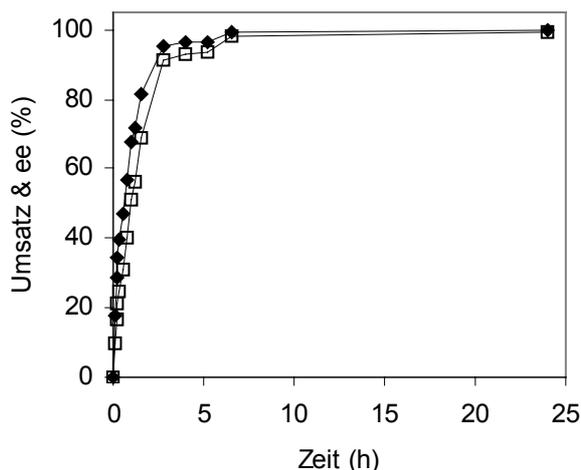


Abb. 60: Umsatz von L-Phenylalanin (◆) und ee-Wert für D-Phenylalanin (□) während der Racemattrennung von DL-Phenylalanin durch die L-AAO in Abhängigkeit von der Zeit.

7.2.2 Umsatz von DL-Serin

Der Umsatz von DL-Serin wurde im 1 mL-Maßstab in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer gemessen. Anschließend wurde das Reaktionsvolumen auf 200 mL erhöht und die Enzymaktivität und –stabilität wurden über vier Zyklen beobachtet. Dazu wurde die Umsetzung nach jeweils 3 h abgebrochen, die L-AAO über Ultrafiltration vom Reaktionsgemisch abgetrennt und erneut eingesetzt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Serin:

Enzym	0,12 U L-AAO	31 U L-AAO
Substrat	7 mM DL-Ser	7 mM DL-Ser
Ansatzvolumen	1 mL	200 mL
Reaktionsgefäß	Reagenzglas mit Deckel	Titrimo-Reaktionsgefäß
Volumen Reaktionsgefäß	15 mL	500 mL
Puffer	66 mM TEA/HCl pH 7,0	0,25 M TEA/HCl pH 7,6
Katalase	2600 U·mL ⁻¹	2600 U·mL ⁻¹
Art der Durchmischung	Wippe 60 Upm	Rührer
Temperatur	30°C	30°C
Zyklen	-	4
Dauer pro Zyklus	-	3 h

Im 1 mL-Ansatz wurde für L-Serin nur während der ersten 1,5 h ein konstanter Anstieg des Umsatzes beobachtet (Abb. 61). Das Substrat wurde zu 98,8% oxidiert, der ee-Wert lag nach 24 h bei 97,7%. Die verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit bei sinkenden Substratkonzentrationen konnte mit der relativ schlechten Affinität der L-AAO für L-Serin ($K_M = 1,36$ mM) erklärt werden.

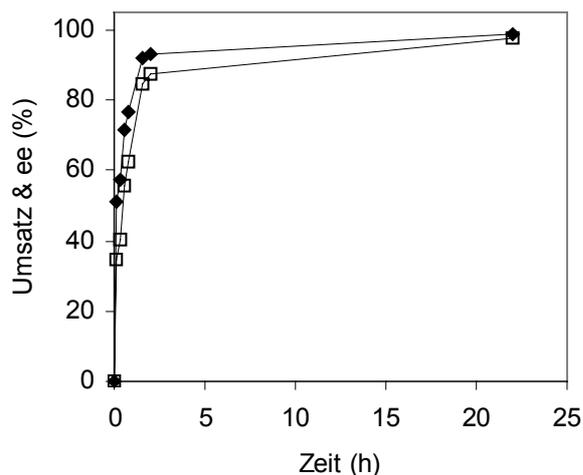


Abb. 61: Umsatz von L-Serin (◆) und ee-Wert für D-Serin (□) während der Racemattrennung von DL-Serin durch die L-AAO in Abhängigkeit von der Zeit im 1 mL-Ansatz.

Im 200 mL-Ansatz wurde im ersten Zyklus nach 3 h ein ee-Wert von 96,7% erreicht. Dies zeigt, dass ein Up-Scale des Reaktionsvolumens von 1 mL auf 200 mL problemlos möglich war, die Reaktion lief unter diesen Bedingungen geringfügig schneller ab. Nach dem ersten Zyklus wurde ein Aktivitätsverlust von 54% beobachtet. Vermutlich adsorbierte das Enzym während des ersten Ultrafiltrationsschrittes an der Membran, die daraufhin mit Protein abgesättigt war. Die photometrisch messbare Aktivität der L-AAO blieb während der Zyklen 2-4 erhalten, der Umsatz und der ee-Wert sanken allerdings um 11,4 bzw. 13,6% (Tab. 13).

Tab. 13: Enzymrecycling mit DL-Serin als Substrat.

Zyklus	Aktivität (%) [*]	ee (%)	Umsatz (%)
1	100	96,7	98,3
2	46	29,0	44,9
3	45	20,5	34,1
4	49	17,6	31,3

^{*} Die Aktivität wurde nach der dreistündigen Reaktion und vor der Ultrafiltration mit dem LDH-gekoppelten Enzymtest bestimmt.

7.3 Immobilisierte L-AAO

Durch Immobilisierung auf festen Trägermaterialien wird die Abtrennung des Katalysators vom Reaktionsgemisch deutlich erleichtert und die Stabilität von Enzymen wird oft verbessert. Diese Vorteile rechtfertigen dann den Einsatz der relativ teuren

Trägermaterialien und den erhöhten Arbeitsaufwand bei der Optimierung der Immobilisierungs- und Reaktionsbedingungen.

7.3.1 Optimierung der Immobilisierungsbedingungen

Partiell gereinigte L-AAO wurde unter Variation der Kpi-Pufferkonzentration, der Immobilisierungsdauer und der Temperatur bei pH 8,0 auf Eupergit C[®] und Eupergit C 250L[®] immobilisiert.

Tab. 14: Variation der Immobilisierungsbedingungen. Nach 7 h Reaktionsdauer unter Standardbedingungen wurde der ee-Wert (%) bestimmt.

	Eupergit C [®]						Eupergit C 250L [®]					
	0,25 M Kpi		0,5 M Kpi		1 M Kpi		0,25 M Kpi		0,5 M Kpi		1 M Kpi	
	7°C	RT	7°C	RT	7°C	RT	7°C	RT	7°C	RT	7°C	RT
1 d	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0
2 d	0	> 99	0	45	0	0	50	> 99	50	78	0	0
3 d	98	> 99	98	> 99	0	0	98	> 99	98	99	0	0

Aus Tab. 14 wird deutlich, dass die Immobilisierungsreaktion mit Eupergit C 250L[®] schneller ablief als mit Eupergit C[®] und dass bei 7°C deutlich schlechtere Ausbeuten erzielt wurden als bei Raumtemperatur. Entgegen den Angaben des Herstellers verschlechterte eine steigende Kpi-Konzentration die Immobilisierungsausbeuten der L-AAO drastisch. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Immobilisierungen bei Raumtemperatur in 0,25 M Kpi-Puffer durchgeführt.

Aus der Analyse der Kinetiken der Umsatzreaktionen ließ sich die L-AAO-Aktivität für L-Phenylalanin errechnen (Abb. 62). Die höchsten Aktivitäten wurden für Eupergit C 250 L[®] nach 4 Tagen Immobilisierungsdauer mit einem Wert von 0,77 U pro g Träger erzielt.

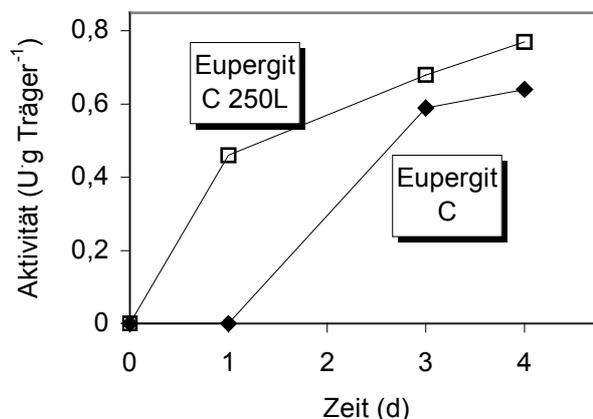


Abb. 62: Aktivität des Immobilisats für L-Phenylalanin in Abhängigkeit von der Immobilisierungsdauer. Immobilisierungsbedingungen: 0,25 M Kpi, RT, pH 8,0; Standardreaktionsbedingungen.

Aus diesen Aktivitätswerten konnten die Immobilisierungsausbeuten abgeschätzt werden. Pro Immobilisierungsansatz wurden 0,64 U L-AAO (Akt. für L-Ala) pro 0,2 g trockenem Trägermaterial eingesetzt, das in etwa 0,8 g gequollenem Eupergit entspricht. Wird eine vollständige Immobilisierung angenommen, lässt sich eine maximale, theoretische Aktivität von 0,80 U·g Träger⁻¹ für L-Alanin oder von 0,96 U·g Träger⁻¹ für L-Phenylalanin errechnen, da die L-AAO für L-Phenylalanin eine 1,2-fach höhere spezifische Aktivität hat als für L-Alanin (Tab. 7).

Nach 4 Tagen Immobilisierungsdauer wurde für Eupergit C[®] (0,64 U·g Träger⁻¹) eine Ausbeute von 67% und für Eupergit C 250L[®] (0,77 U·g Träger⁻¹) von 80% erhalten.

7.3.2 Recycling des Immobilisats

L-AAO auf Eupergit C[®] wurde in mehreren Zyklen unter Standardbedingungen eingesetzt, um die Stabilität des Immobilisats unter Reaktionsbedingungen zu testen (Abb. 63). Nach jeweils einer Stunde wurde zentrifugiert, der Überstand entnommen und eine neue Reaktion durch Zugabe von Substrat, Katalase und Puffer gestartet (II.2.12.5). L-AAO auf Eupergit C 250L[®] wurde in diesem Versuch nicht eingesetzt, da dieser Träger sich aufgrund der geringen Dichte von 0,3 g·mL⁻¹ nicht durch Zentrifugation vom Reaktionsgemisch abtrennen ließ. Der Umsatz sank während der sechs Zyklen von 53 auf 38%. Bei der Annahme eines linearen Reaktionsverlaufs entspricht dies einem Aktivitätsverlust von 28% im Verlauf der sechs Zyklen.

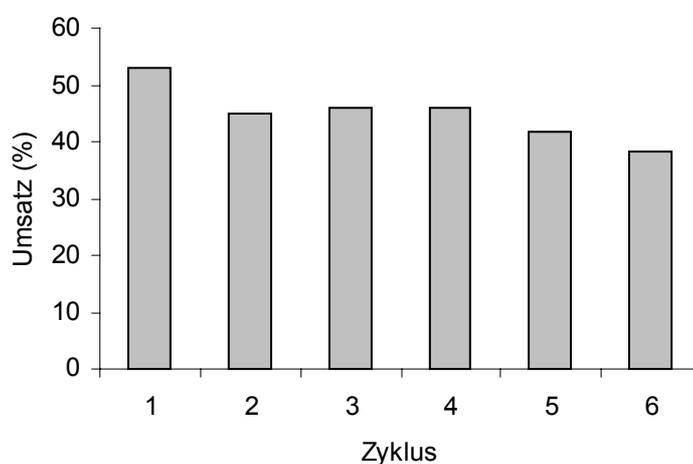


Abb. 63: Wiederholter Einsatz von Eupergit C[®] mit DL-Phenylalanin als Substrat. Nach 1 h Reaktionsdauer unter Standardbedingungen wurde der Umsatz für L-Phenylalanin bestimmt.

7.3.3 Stabilität des Immobilisats

Die auf Eupergit C[®] und Eupergit C 250L[®] immobilisierte L-AAO wurde bei 7°C und bei 30°C inkubiert und die Restaktivität wurde verfolgt. Bei 7°C war nach 8 Wochen Lagerung für beide Immobilisate noch jeweils 50% Restaktivität detektierbar. Bei 30°C lag die Halbwertszeit der L-AAO auf Eupergit C[®] bei 2,2 d, auf Eupergit C 250L[®] bei 0,75 d (Abb. 64).

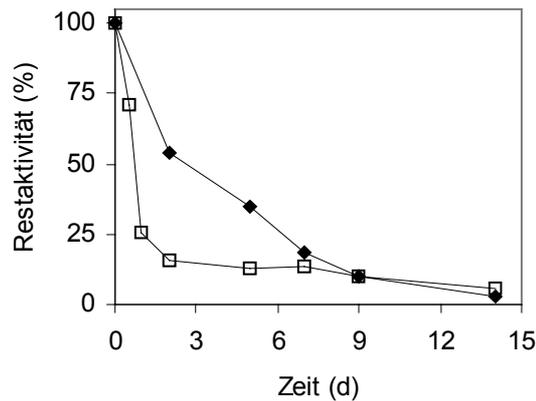


Abb. 64: Temperaturstabilität der L-AAO auf Eupergit C® (□) und Eupergit C 250L® (◆) bei 30°C.

7.4 Herstellung und Anwendung von Cross-linked enzyme crystals (CLECs)

CLECs sind durch kovalente Quervernetzung stabilisierte Proteinkristalle, die vermehrt in der technischen Anwendung eingesetzt werden. Die hohe Katalysatordichte im Kristall, die meist deutlich erhöhte Stabilität der Enzyme und die gute Separierbarkeit vom Reaktionsansatz sind die Vorteile dieser relativ neuen Methode [142-146].

Die L-AAO kristallisierte reproduzierbar und in kurzer Zeit in einem Konzentrationsbereich von 6-10 mg·mL⁻¹ mit 8-20% PEG 4000 in 0,1 M Hepes pH 7,8. Der Einfluss von 10% Isopropanol und/oder von 2,7 mM Cymal-5® auf das Kristallisationsverhalten wurde untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die L-AAO unter relativ variablen Bedingungen und reproduzierbar Kristalle formte (Abb. 65).



Abb. 65: L-AAO-Kristalle vor der Quervernetzung (A: 0,3 x 0,1 mm, - Isopropanol, - Cymal-5®; B: 0,05 x 0,05 mm, + Isopropanol, + Cymal-5®; C: 0,2 x 0,2 mm, + Isopropanol, - Cymal-5®)

Während der Quervernetzung mit Glutardialdehyd musste darauf geachtet werden, dass sich die Kristalle nicht wieder auflösen. Aus diesem Grund wurde die Reaktion in Gegenwart von 20% PEG 4000 durchgeführt. Der zweite kritische Faktor war die Optimierung der Glutardialdehydkonzentration. Wurde die Quervernetzung in Gegenwart von 0,5% Glutardialdehyd durchgeführt, lösten sich die Kristalle während des

ersten Waschschrilles auf. Erst der Einsatz von mind. 1% Glutardialdehyd überführte die Kristalle in eine Form, die auch in Puffer stabil blieb. Die Reaktionsdauer betrug zwischen 30 und 90 min. Es gelang unter diesen Bedingungen, stabile quervernetzte Enzymkristalle zu erzeugen, die bei 4°C in Puffer lagerbar waren und sich durch Zentrifugation separieren ließen.

Beim Einsatz der CLECs für die Racematspaltung von DL-Phenylalanin wurde deutlich, dass bei der Quervernetzung mit Glutardialdehyd sehr hohe Aktivitätsverluste (> 99,9%) auftraten. Trotz der geringen Restaktivität war es möglich, durch Verlängerung der Reaktionszeiten Umsätze von 99,6% und ee-Werte von 99,2% zu erzielen.

7.5 Enzym-Membran-Reaktor (EMR)

Der Einsatz von Enzymen in einem EMR ermöglicht die kontinuierliche Herstellung des gewünschten Produkts bei gleichzeitiger Zurückhaltung des Katalysators durch die Membran. Eine Voraussetzung für stabile Betriebsbedingungen sind relativ geringe Aktivitätsverluste des Enzyms während der Prozesszeiten.

Der Umsatz von L-Phenylalanin durch die L-AAO und der ee-Wert für D-Phenylalanin im Durchlauf des EMR sind in Abb. 66 dargestellt.

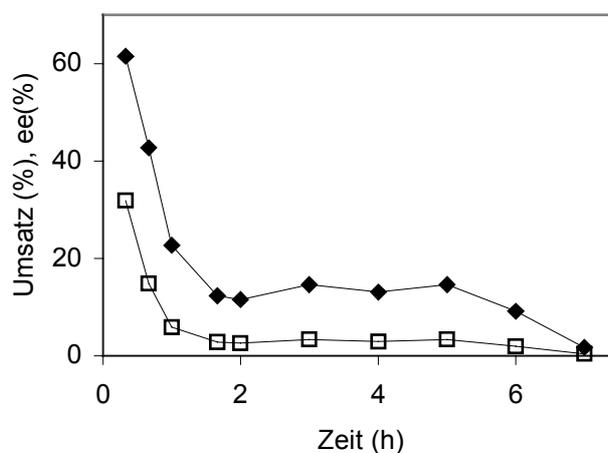


Abb. 66: Umsatz von L-Phenylalanin (◆) und ee-Wert für D-Phenylalanin (□) in Abhängigkeit von der Zeit im EMR.

Innerhalb der ersten Stunde sank der L-Phenylalaninumsatz von 32% (nach 20 min) auf 6% (nach 60 min). Die L-AAO verlor ihre katalytische Aktivität, bevor konstante Reaktionsbedingungen erreicht werden konnten. Aufgrund dieser offensichtlichen Instabilität des Enzyms im EMR wurde der Versuch nach 7 h abgebrochen.

8 D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae*

Mikroskopische Untersuchungen des Bodenisolats mit den höchsten D-AAO-Aktivitäten und die anschließende Identifizierung durch die DSMZ zeigten, dass innerhalb des Screenings nach L-AAO-Bildnern auch ein bakterieller D-AAO-Produzent isoliert worden war. Die 16SrRNA-Analyse ergab, dass es sich um den Stamm *Arthrobacter protophormiae* handelt, ein coryneformes, gram-positives, strikt aerobes Bakterium. Die Reinigung und Charakterisierung der D-AAO sollte zeigen, inwieweit sich dieses Enzym von den gut untersuchten eukaryotischen D-AAOs unterscheidet.

8.1 Expression der D-AAO in *Arthrobacter protophormiae*

Unter den gegebenen Wachstumsbedingungen erreichten die Zellen nach 24-28 h eine optische Dichte (OD_{600}) von 15-16, die Ausbeute aus 7 L Medium lag bei 130 g Zellfeuchtmasse. Nicht bei jeder Zellcharge ließ sich nach dem Zellaufschluss im Rohextrakt mit dem POX/o-Dianisidin-Assay Aktivität bestimmen. Ein Grund hierfür könnte die zelleigene Katalase gewesen sein, die in Kombination mit der niedrigen volumetrischen Aktivität der D-AAO den Enzymtest störte. Die höchste spezifische D-AAO-Aktivität, die im Rohextrakt gemessen wurde, lag bei $3 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$.

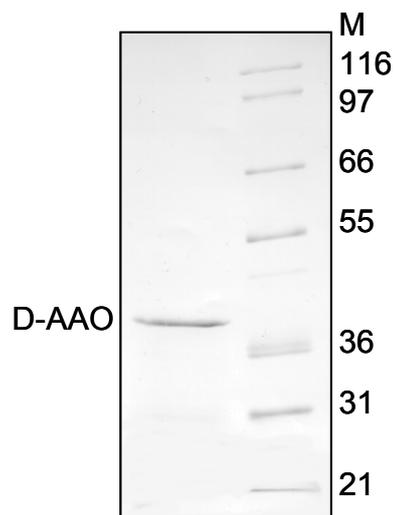
8.2 Reinigung

Die D-AAO machte nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtproteingehalt von *Arthrobacter protophormiae* aus. Trotzdem gelang es mit einem dreistufigen Reinigungsprotokoll, die D-AAO zu isolieren. Die ersten zwei Chromatographieschritte wurden jeweils zweimal durchgeführt, anschließend wurden die aktiven Fraktionen beider Ansätze vereinigt, gemeinsam dialysiert und für die präparative, native Gelelektrophorese eingesetzt (Tab. 15). Da im Rohextrakt keine D-AAO-Aktivität zu messen war, wurden der Reinigungsfaktor und die Ausbeute in Bezug auf die Enzympräparation nach der Anionenaustauschchromatographie berechnet. Die Ausbeute lag danach bei 8,5% und die D-AAO wurde 62-fach angereichert. In Abb. 67 ist die Reinheit der D-AAO nach der nativen, präparativen Gelelektrophorese dargestellt.

Tab. 15: Reinigungsschema der D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* (2 x 25 g ZFM).

	Gesamtaktivität (U)	Gesamtprotein (mg)	Volumen (mL)	Spez. Akt. (U·mg ⁻¹)	Reinigungsfaktor (-fach)	Ausbeute (%)	Gesamtaktivität (U)	Gesamtprotein (mg)	Volumen (mL)	Spez. Akt. (U·mg ⁻¹)	Reinigungsfaktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	n.d.	748	110	n.d.			n.d.	840	120	n.d.		
Q-Sepharose	3,5	103	41	0,03	1	100	4,9	132	49	0,03	1	100
Hydroxylapatit	2,9	3,4	12	0,85	25	82	2,3	3,2	12	0,71	27	47

	Gesamtaktivität (U)	Gesamtprotein (mg)	Volumen (mL)	Spez. Akt. (U·mg ⁻¹)	Reinigungsfaktor (-fach)	Ausbeute (%)
Dialyse	2,2	6,2	0,6	0,35	12	26
Präp. nat. PAGE	0,72	0,39	30	1,9	62	8,5

**Abb. 67:** SDS/PAGE der D-AAO nach der präparativen, nativen Gelelektrophorese.

8.3 Biochemische Charakterisierung

8.3.1 pH-Optimum

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der D-AAO gegenüber den Substraten L-Lysin, L-Phenylalanin und L-Methionin wurde in drei verschiedenen Puffern untersucht (Citronensäure-Natriumphosphat pH 4-7, TEA/HCl pH 7,0-8,5, Glycin/NaOH pH 8,5-11). Das pH-Optimum lag für alle drei Substrate im schwach basischen Bereich zwischen pH 7,5-8,5 (Abb. 68). Die eingesetzten Puffer beeinflussten die Enzymaktivität nicht wesentlich.

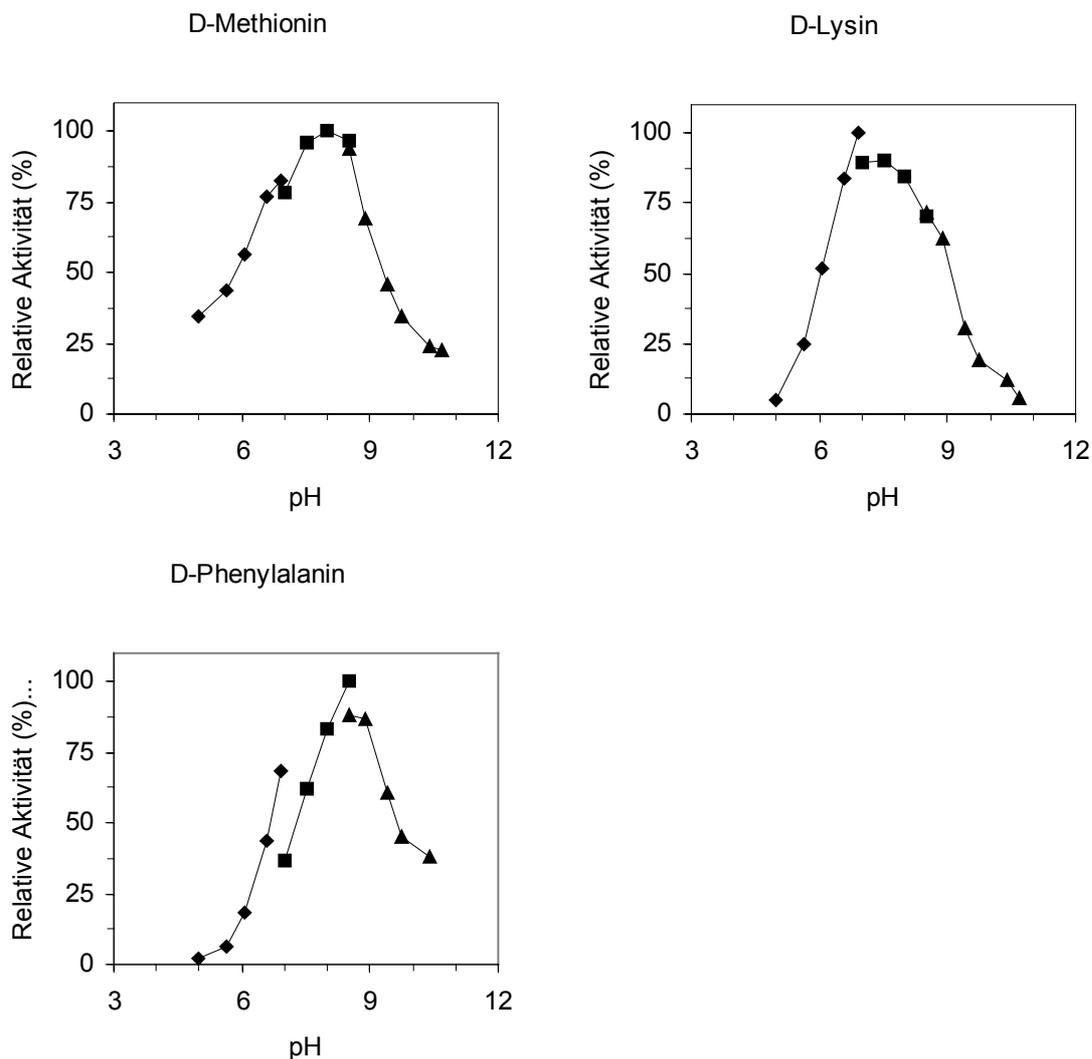


Abb. 68: Effekt des pH-Wertes auf die D-AAO-Aktivität. Die Enzymaktivität wurde mit drei verschiedenen Substraten in den folgenden 80 mM Puffern gemessen: ◆ Citronensäure-Natriumphosphat, pH 5-7; ■ TEA/HCl, pH 7-8.5; ▲ Glycin/NaOH, pH 8.5-11. Jede getestete D-Aminosäure wurde in einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt.

8.3.2 Partielles Substratspektrum

Für die D-AAO wurde ein partielles Substratspektrum aufgenommen (Tab. 16). Neben D-Methionin als bestem Substrat wurden besonders die basischen D-Aminosäuren oxidiert. Von den hydrophoben D-Aminosäuren wurden nur D-Leucin und D-Phenylalanin umgesetzt, das kurzkettige D-Alanin und die am β -C-Atom verzweigten Substrate D-Isoleucin und D-Valin zeigten keine Aktivität.

Tab. 16: Substratspezifität der D-AAO. Die Substratkonzentration betrug 10 mM, die Aktivität wurde mit dem POX/o-Dianisidin-Assay bestimmt.

D-Aminosäure	Relative Aktivität (%)
D-Methionin	100
D-Lysin	60
D-Arginin	55
D-Phenylalanin	54
D-Ornithin	24
D-Leucin	15
D-Histidin	5
D-Alanin	0
D-Isoleucin	0
D-Valin	0
Glycin	0
Cephalosporin	11

Mit partiell gereinigter D-AAO wurden die kinetischen Konstanten für die Substrate D-Methionin und D-Phenylalanin bestimmt (Gl. 4-Gl. 5). D-Methionin wies mit einem K_M -Wert von 0,90 mM eine deutlich höhere Affinität zur D-AAO auf als D-Phenylalanin, dessen K_M -Wert bei 16 mM lag. Für D-Phenylalanin wurde außerdem eine Substratüberschussinhibierung beobachtet ($K_I = 55$ mM).

Die Aminosäuren L-Leucin, L-Methionin und L-Lysin wurden durch die D-AAO nicht oxidiert, somit konnte auf eine absolute Enantioselektivität des Enzyms für D-Aminosäuren geschlossen werden.

8.4 Proteinchemische Charakterisierung

8.4.1 Molekulargewicht

Anhand des SDS-Gels der homogenen D-AAO ließ sich ein Molekulargewicht von 40 kDa für eine Untereinheit bestimmen (Abb. 69).

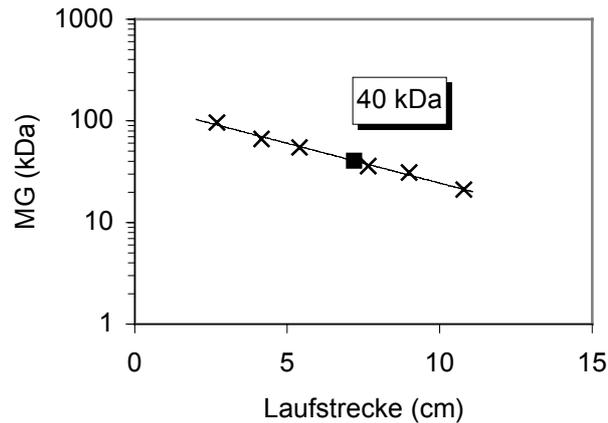


Abb. 69: Bestimmung des Molekulargewichts der D-AAO-Untereinheit (x: Markerproteine, ■ D-AAO).

8.4.2 N-Terminale & interne Sequenzdaten der D-AAO

Durch automatisierten Edman-Abbau des N-Terminus der aufgereinigten und auf eine PVDF-Membran übertragenen D-AAO wurden die ersten 20 Aminosäuren des Proteins bestimmt.

N-Terminus: PTAPLRITVIGSGVIGLSAA

Zwei weitere, interne Sequenzen wurden nach der proteolytischen Spaltung des Proteins und Trennung der Peptide identifiziert:

Interne Sequenz 1: LVPELEGLEVLEHK

Interne Sequenz 2: MAAVGEQNPVLK

8.4.3 Alignment des N-Terminus der D-AAO

Die N-terminale Sequenz der D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* wurde durch ClustalW mit weiteren D-AAO-Primärstrukturen verglichen (Abb. 70). Dabei fiel auf, dass trotz der unterschiedlichen Enzymquellen sehr hohe Ähnlichkeiten vorhanden waren. Diese Homologien können damit erklärt werden, dass die hochkonservierte Dinucleotid-Bindungstelle direkt am N-Terminus der Proteine lokalisiert ist. Vergleiche der beiden internen Sequenzen mit diesen sechs D-AAO-Primärstrukturen ergaben keine erkennbaren Homologien.

Consensus	ohhVhGxGVxGLxxA
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	PTAPLRITVIGSGVIGLSAA 20
Mensch	MRVVVIGAGVIGLSTA 16
Schwein	MRVVVIGAGVIGLSTA 16
Maus	MRVAVIGAGVIGLSTA 16
<i>Rhodotorula gracilis</i>	MHSQKRVVVLGSGVIGLSSA 20
<i>Fusarium solani</i>	MSNTIVVVGAGVIGLSTA 18
<i>Trigonopsis variabilis</i>	MAKIVVIGAGVAGLTTA 17
	.*:*.** **:.*

Abb. 70: Alignment der N-terminalen Proteinsequenz der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO mit 6 weiteren D-AAOs. Die Sequenzinformationen stammen aus [115]. In der ersten Zeile ist die Consensus-Sequenz dargestellt; o = polarer Rest, h = hydrophober Rest, x = beliebiger Rest. * identische Aminosäuren, : hohe Ähnlichkeit, . geringe Ähnlichkeit.

IV Diskussion

Eine Vielzahl biotechnologischer Verfahren wurde in den letzten Jahren zur Produktion von Aminosäuren entwickelt. Natürliche L-Aminosäuren werden häufig fermentativ mit genetisch veränderten Hochleistungsstämmen hergestellt, unnatürliche L-Aminosäuren können beispielsweise durch die reduktive Aminierung einer Ketosäure durch eine L-Aminosäure-Dehydrogenase enantiomerenrein synthetisiert werden [147]. Diese Methoden können nicht zur Herstellung von D-Aminosäuren eingesetzt werden. Obwohl schon einige enzymatische Prozesse zur Produktion von D-Aminosäuren beschrieben wurden (12), schien die Verwendung von L-AAOs eine interessante, bisher kaum beachtete Alternative zu sein. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Screening nach L-AAOs durchgeführt, bei dem sowohl neue, bakterielle L-AAO- als auch D-AAO-Bildner identifiziert werden konnten.

Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte der neuentdeckten AAOs diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihres Anwendungspotentials untersucht wurden.

1 Screening nach neuen L-AAO-Bildnern

Das klassische Verfahren zum Screening neuer Enzyme ist die Untersuchung einer Vielzahl an Mikroorganismen mit einem möglichst einfachen Testsystem. Ein Screening von Bodenproben eröffnet den Zugang zu einer hohen Anzahl verschiedener Mikroorganismen, die möglicherweise Produzenten der gesuchten Substanzen sind. Unterschiedliche Verfahren wie Anreicherungskulturen [33] und Farbstofftests [148] wurden bisher bei der Suche nach neuen mikrobiellen L-AAO-Bildnern aus Bodenproben angewandt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit führte ein Screening von Bodenproben und Sammlungsstämmen zu neuen mikrobiellen L-AAO-Produzenten. Die Integration des aus Peroxidase und o-Dianisidin bestehenden Indikatorsystems in das Agarmedium sollte die Auswahl oxidasepositiver Organismen erleichtern. Aus 69 Sammlungsstämmen wurden im Screening 8 L-AAO-Bildner gefunden, die alle zur Ordnung der Actinomycetales gehören. Aus 197 Bodenisolaten wurde nur ein Mikroorganismus mit deutlich messbarer L-AAO-Aktivität identifiziert. Möglicherweise lag diese relativ niedrige Anzahl L-AAO-positiver Stämme an der Störanfälligkeit des Indikatorsystems.

Negative Störreaktionen:

Als Schutz vor Oxidation zelleigener Proteine enthalten Oxidasebildner meist Katalase in hohen Konzentrationen. Katalase könnte den Peroxidase-katalysierten Farbumschlag auch bei L-AAO-positiven Stämmen verhindern, da sie das bei der Reaktion entstehende H_2O_2 abfängt.

Dieses Problem ist beim Screening nach neuen D-AAOs aus Bodenproben erkannt und durch eine starke Erhöhung der Peroxidase-Konzentration auf $7500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ im Enzymtest umgangen worden [76]. Unter den getesteten Bedingungen hatte die Anwesenheit von bis zu $30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Katalase im Enzymtest keine Auswirkung auf die messbare D-AAO-Aktivität.

Jedoch sind nicht nur die absoluten Aktivitäten der zwei konkurrierenden Enzyme Peroxidase und Katalase wichtig, sondern auch deren K_M -Werte für H_2O_2 , da das Peroxid während der Reaktion kontinuierlich gebildet und umgesetzt wird und somit nur in geringen Konzentrationen vorliegt. In Tab. 17 wird deutlich, dass die Peroxidase aus Meerrettich sehr kleine K_M -Werte für o-Dianisidin und H_2O_2 besitzt und den meisten Katalasen bezüglich der Affinität überlegen ist.

Trotz all dieser Überlegungen werden jedoch im Einzelfall immer die zelleigene Katalase des neu gescreenten Organismus, ihre Konzentration und ihre kinetischen Eigenschaften über das Ergebnis des Farbstofftests entscheiden.

Tab. 17: Affinität verschiedener Katalasen und der Peroxidase aus Meerrettich zu H_2O_2 .

Enzym	Enzymquelle	Substrat	K_M (M)	Lit.
Katalase	Rinderleber	H_2O_2	0,33	[149]
Katalase	<i>Candida boidinii</i>	H_2O_2	0,23	[149]
Katalase	<i>Comamonas compransoris</i>	H_2O_2	$1,93 \cdot 10^{-3}$	[150]
Katalase	<i>Penicillium chrysogenum</i>	H_2O_2	$59 \cdot 10^{-6}$	[151]
Peroxidase	Meerrettich	H_2O_2	$16 \cdot 10^{-6}$	[152]
		o-Dianisidin	$5,5 \cdot 10^{-6}$	[153]

Positive Störreaktionen:

Laccasen (E.C. 1.10.3.2) katalysieren die Oxidation von phenolischen Substraten oder aromatischen Aminen und können im Gegensatz zu Peroxidasen ohne Anwesenheit von Wasserstoffperoxid o-Dianisidin oxidieren und eine Verfärbung des Mediums hervorrufen. Laccasen werden sowohl von Pilzen [154] als auch von Bakterien [155] gebildet. Ihre natürlichen Funktionen sind der Ligninabbau und der Schutz vor UV-Strahlung durch die Synthese melaninartiger Pigmente [156]. Tyrosinasen (E.C. 1.14.18.1) können ebenfalls durch die Bildung braungefärbter Pigmente eine falsch-positive Reaktion hervorrufen. Tyrosinasen sind Schlüsselenzyme in der Biosynthese von Melanin und melaninartiger Substanzen. Weiterhin kann der Farbstofftest durch andere Oxidasen gestört werden. So konnte z. B. der bei Stämmen der Gattung *Lactobacillus* hervorgerufene Farbstoffumschlag durch wasserstoffperoxidbildende NADH-Oxidasen in Abwesenheit von Katalase erklärt werden [157].

2 Reinigung und biochemische Charakterisierung der *Rhodococcus opacus* L-AAO

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* ließ sich in nur zwei Chromatographieschritten mit sehr guter Ausbeute bis zur Homogenität aufreinigen. Die genaue Quantifizierung der L-AAO-Aktivität war während des ersten Reinigungsschrittes noch problematisch, da die Katalase zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett von der L-AAO abgetrennt war und somit der POX/o-Dianisidin-Enzymtest gestört wurde.

Aufgrund der weiten Verbreitung von L-AAOs in Schlangengift und aufgrund des großen Interesses an der Erforschung der Toxine hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Wirkung sind schon einige dieser Enzyme isoliert worden. Die zur Reinigung am häufigsten verwendeten Techniken sind Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie [23,25-27,158]. Aber auch Verfahren wie Affinitätschromatographie an Heparinsepharose, hydrophobe Interaktionschromatographie [55] und präparative isoelektrische Fokussierung [24] wurden zur Reinigung von L-AAOs aus Schlangengift angewandt. Obwohl Schlangengifte aus deutlich weniger Komponenten zusammengesetzt sind als bakterielle Rohextrakte, waren bei sämtlichen Protokollen mindestens zwei Chromatographieschritte für die Reinigung der L-AAO nötig. Ein einstufiges Protokoll existiert nur für die bakterielle, extrazelluläre L-AAO aus *Cellulomonas cellulans* [32], die in einem Reinigungsschritt durch Chromatographie an Phenylsepharose isoliert wurde.

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* machte bis zu 1,3% des löslichen Zellproteins aus. Der Cofaktor FAD blieb während aller Chromatographie- und Filtrationsschritte gebunden. Die Aktivität der L-AAO ließ sich zu keinem Zeitpunkt der Reinigung durch FAD-Zugabe steigern. Dieses Phänomen wurde für andere Flavoproteine beobachtet. Beispielsweise blutete das FAD der NADH-Oxidase aus *Sporolactobacillus inulinus* während der Reinigung aus [159]. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die L-AAO durch Inkubation in 2 M Kaliumbromid in ihre Apoform überführt wurde. Das FAD lag somit nicht kovalent gebunden vor, wie es bei vielen anderen Oxidasen der Fall ist [160-163].

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* liegt als Dimer vor. Das Molekulargewicht von 108 kDa nach MALDI/TOF-MS und nach der Berechnung aus den Sequenzdaten ist vergleichbar mit den Molekulargewichten von L-AAOs aus Bakterien, Algen und Schlangengift. Auch der isoelektrische Punkt von 4,8 stimmt gut mit den pIs von anderen bakteriellen [164] und Schlangengift [26-28,158] L-AAOs überein, die häufig zwischen 4,5 und 5,5 liegen.

Die Lager- und Temperaturstabilität der L-AAO wurde stark vom eingesetzten Puffer beeinflusst. Die Halbwertszeit wurde durch Inkubation in Glycin/NaOH-Puffer erhöht. Jedoch sind die Mechanismen der Stabilisierung noch nicht geklärt. Zum einen hat Glycin in seiner Funktion als neutraler Osmolyt generell eine stabilisierende Wirkung auf Proteine [165], alternativ könnte Glycin die L-AAO aber auch durch seine Eigenschaft als kompetitiver Inhibitor stabilisieren. Die gute pH-Stabilität der L-AAO in schwach

saurem Citrat-Puffer könnte ebenfalls durch eine Bindung des Citratmoleküls im aktiven Zentrum begründet werden [21].

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* zeigte eine hohe Stereoselektivität für L-Aminosäuren, da keine der 16 untersuchten D-Aminosäuren oxidiert wurde. 39 der 44 getesteten L-Aminosäuren wurden hingegen umgesetzt. L-Prolin, L-cis-4-Hydroxyprolin, L-Threonin, Glycin und die an der α -Carboxy- und α -Aminogruppe derivatisierten L-Aminosäuren wurden von der L-AAO nicht als Substrate akzeptiert. Dies weist darauf hin, dass die Substrate eine freie α -Carboxy- und eine freie α -Aminogruppe benötigen, um von der L-AAO oxidiert zu werden. L-Homoserinlacton und L-Homocysteinthiolacton scheinen bisher die einzigen Ausnahmen zu sein. Im Unterschied zu Prolin ist bei den Lactonen die α -Carboxy- und nicht die α -Aminogruppe an der Ringbildung beteiligt.

Der POX/o-Dianisidin-Assay war nicht anwendbar, wenn SH-haltige Substanzen im Ansatz vorlagen, da das entstehende H_2O_2 sofort die Sulfhydrylgruppen oxidierte und nicht für die Nachweisreaktion zur Verfügung stand. Aus diesem Grund war die Oxidation von L-Cystein und L-Homocystein mit diesem Enzymtest nicht messbar. Da außerdem bekannt ist, dass SH-haltige Aminosäuren nach der oxidativen Desaminierung ein sehr komplexes Produktgemisch ergeben [166], wurde die Oxidation von L-Cystein und L-Homocystein durch die L-AAO nicht weiter untersucht.

Die *Rhodococcus opacus* L-AAO erreichte unter den Testbedingungen spezifische Aktivitäten von bis zu $10 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ für die besten Substrate. Besonders bei Substraten mit hoher Affinität zur L-AAO wurde häufig eine Substratüberschussinhibierung festgestellt. Der direkte Vergleich der spezifischen Aktivitäten literaturbekannter L-AAOs mit der *Rhodococcus opacus* L-AAO gestaltete sich als schwierig, da unterschiedliche Testmethoden, Temperaturen, pH-Werte, Puffersalze und Substrate eingesetzt wurden. Aus diesem Grund sind die spezifischen Aktivitäten einiger L-AAOs unter Angabe der Testbedingungen in Tab. 18 wiedergegeben.

Die höchste spezifische Aktivität wurde mit $120 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ für die L-AAO aus dem Cyanobakterium *Synechococcus spec.* (vormals *Anacystis nidulans*) gemessen. Dieses Enzym oxidiert hauptsächlich basische L-Aminosäuren. Die spezifischen Aktivitäten der L-AAOs aus den Giftsekreten von *Lachesis muta muta*, *Ophiophagus hannah* und *Eristocophis macmahoni* für L-Leucin lagen zwischen $37,6$ und $73,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Somit gehörten diese Enzyme, ebenso wie die *Neurospora crassa* L-AAO, zu den L-AAOs mit hohen spezifischen Aktivitäten. Sämtliche anderen in Tab. 18 aufgeführten Enzyme zeigten unter den jeweiligen Testbedingungen spezifische Aktivitäten unter $20 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Tab. 18: Spezifische Aktivitäten für L-AAOs aus Bakterien, Pilzen, Schlangengift und Algen unter Angabe der Testbedingungen (TBHBA = 2,4,6-Tribromo-3-hydroxybenzoesäure, DCHBS = 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzoesulfonsäure, OPD = o-Phenylendiamin).

	Organismus	Spez. Akt. (U·mg ⁻¹)	Substrat	Enzymtest	Bedingungen	Lit.
BAKTERIEN	<i>Cellulomonas cellulans</i>	19,1	L-Phe	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + TBHBA + 4-Aminoantipyrin	90 mM Kpi pH 7,0, 25°C	[32]
	<i>Bacillus carotatum</i>	4,46	L-Phe (250 µM)	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + DCHBS + 4-Aminoantipyrin	0,1 M Kpi pH 7,5, 30°C	[164]
	<i>Synechococcus spec.</i>	120	L-Arg (32 mM)	O ₂ -Verbrauch: polarographisch	0,2 M Hepes, pH 7,0, 20°C	[113]
PILZ	<i>Neurospora crassa</i>	45	L-Phe	Phenylpyruvat- Nachweis	30°C	[64]
SCHLANGENGIFT	<i>Lachesis muta muta</i>	44,4	L-Leu (7,5 mM)	H ₂ O ₂ -Nachweis	pH 7,0, 25°C	[27]
	<i>Crotalus atrox</i>	0,20	L-Leu (10 µM)	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + o-Dianisidin	0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 25°C	[24]
	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	0,54	L-Leu	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + o-Dianisidin	90 mM Tris/HCl pH 8,5, 25°C	[25]
	<i>Naja naja kaouthia</i>	4,6	L-Leu	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + o-Dianisidin	0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 25°C	[26]
	<i>Bothrops moojeni</i>	2,6	L-Leu (3 mM)	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + OPD	0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 25°C	[158]
	<i>Eristocophis macmahoni</i>	73,5	L-Leu (20 µM)	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + o-Dianisidin	0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 25°C	[54]
	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	5	L-Leu	H ₂ O ₂ -Nachweis: POX + o-Dianisidin	0,2 M TEA/HCl pH 7,6, 30°C	[56]
	<i>Ophiophagus hannah</i>	37,6	L-Leu	NH ₄ ⁺ -Nachweis: Glu-DH + 2-Oxoglutarat	0,1 M Glycylglycin, pH 8,5, 37°C	[53]
ALGE	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,17	L-Ala (2 mM)	Ketosäure-Nachweis: 2,4-Dinitro- phenylhydrazin	20 mM Tris/HCl pH 8,2, 44°C	[31]

Beim Vergleich der K_M -Werte von drei bakteriellen und drei Schlangengift L-AAOs wurden einige Gemeinsamkeiten deutlich (Tab. 19). Die sechs Enzyme wiesen alle ein breites Substratspektrum auf und ein Großteil der proteinogenen L-Aminosäuren wurde von allen L-AAOs oxidiert. Generell fiel auf, dass die bakteriellen Enzyme kleinere K_M -Werte aufwiesen als die L-AAOs aus Schlangengift. Die aromatischen L-Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan hatten für alle untersuchten L-AAOs die höchsten Affinitäten mit K_M -Werten zwischen 0,004 und 0,29 mM. Die bakteriellen L-AAOs wiesen für L-Lysin und L-Arginin ebenfalls niedrige K_M -Werte auf. Die sauren Aminosäuren L-Aspartat und L-Glutamat hingegen wurden nur schlecht oder gar nicht umgesetzt. L-Threonin, L-Prolin und Glycin wurden von allen aufgeführten L-AAOs nicht als Substrate akzeptiert. In allen eingesetzten Enzymtests wurde das gebildete H_2O_2 über einen gekoppelten Farbstofftest mit Peroxidase nachgewiesen. Wie oben erwähnt lässt sich dieser Test nicht in Anwesenheit freier SH-Gruppen anwenden. Aus diesem Grund wurden bisher eventuell einige Ergebnisse falsch interpretiert [25,26,28,32,164].

Tab. 19: K_M -Werte verschiedener bakterieller und Schlangengift L-AAOs für die proteinogenen Aminosäuren (in mM).

Substrat	Bakterielle L-AAOs			Schlangengift L-AAOs		
	<i>Rhodococcus opacus</i> ¹	<i>Bacillus carotatum</i> ²	<i>Cellulomonas cellulans</i> ³	<i>Calloselasma rhodostoma</i> ⁴	<i>Ophiophagus hannah</i> ⁵	<i>Naja naja kouthia</i> ⁶
L-Ala	0,31	-	1,17	12,5	12,5	61,4
L-Arg	0,070	0,037	0,071	2,0	0,15	1,69
L-Asn	0,027	0,259	0,248	2,5	22,2	11,6
L-Asp	n.d.	-	2,69	-	-	-
L-Cys	*	-*	0,007*	-*	-*	2,86*
L-Cystin	n.d.	n.d.	0,002	n.d.	0,83	n.d.
L-Gln	0,085	0,340	0,309	8,0	20,0	18,6
L-Glu	0,41	-	0,395	-	7,8	-
Gly	-	-	-	-	31,0/-**	-
L-His	n.d.	0,067	0,122	2,5	3,0	5,49
L-Ile	5,11	-	5,20	0,8	1,3	5,00
L-Leu	0,028	0,025	0,043	0,63	0,20	0,66
L-Lys	0,015	0,043	0,115	10,0	0,14	26,7
L-Met	n.d.	0,031	0,035	0,24	0,63	0,63
L-Phe	0,022	0,004	0,039	0,05	0,10	0,06
L-Pro	-	-	-	-	5,0/-**	-
L-Ser	1,36	-	4,20	-	28,6	-
L-Thr	-	-	-	-	-	-
L-Trp	0,016	0,005	0,018	0,08	0,10	0,29
L-Tyr	0,019	0,006	0,018	-	0,01	0,023
L-Val	3,73	-	7,10	-	7,1	16,7

Bei der Oxidation von L-Phenylalanin durch die L-AAO ist die reaktive Gruppe durch eine Methylengruppe vom Benzolring getrennt, aber auch für diese Reaktion war der Einfluss des Substituenten immer noch messbar. Die Auswertung der kinetischen Konstanten ergab, dass p-substituierte L-Phenylalaninderivate, die eine erhöhte Elektronendichte im aromatischen Ring aufwiesen, auch eine höhere Affinität zur L-AAO hatten. Elektronenziehende p-Substituenten hatten hingegen im Vergleich zu L-Phenylalanin eine niedrigere Affinität zur L-AAO (Abb. 30).

Durch diese Abhängigkeit zwischen K_M und σ_p wurde der vielfach diskutierte Reaktionsmechanismus des Hydridtransfers weiter belegt (17), da die Abspaltung eines Hydrids erleichtert wird, wenn durch den Substituenten in p-Stellung die Elektronendichte an der reaktiven Gruppe steigt.

Es wäre weiterhin interessant zu überprüfen, ob dieser Effekt beim Einsatz von L-Phenylglycinderivaten verstärkt wird. Durch die direkte Bindung des α -C-Atoms an den Benzolring kann erwartet werden, dass der Einfluss des p-Substituenten größer wird als bei L-Phenylalaninderivaten. Aufgrund der mangelnden kommerziellen Verfügbarkeit geeigneter p-substituierter L-Phenylglycine konnte diese Messreihe jedoch bislang nicht durchgeführt werden.

3 Sequenzauswertung und Strukturaufklärung der *Rhodococcus opacus* L-AAO

Die Sequenzhomologien zwischen der *Rhodococcus opacus* L-AAO und L-AAOs aus Schlangengift, Pilzen, Algen oder anderen bakteriellen Quellen beschränken sich auf die hochkonservierte FAD-Bindungsstelle, die restlichen Sequenzbereiche zeigen nur geringe Ähnlichkeiten. Macheroux et al. zeigten, dass die Primärstrukturen der verschiedenen Schlangengift-L-AAOs trotz geographischer Trennung dieser Arten vor vermutlich 20 Millionen Jahren zu 83% identisch sind [167]. Jedoch ließen sie keine offensichtliche Verwandtschaft zu den L-AAOs aus *Neurospora crassa*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Synechococcus* erkennen. Schlussfolgernd wurde deshalb angenommen, dass ein mögliches „Urprotein“ sehr früh in der Entwicklung der L-AAOs auftrat. Das in allen bisher bekannten L-AAOs auftretende Motiv hxxhExxxRxGGRhxo (Abb. 44) findet sich auch in Monoaminoxidasen, in Tryptophan-2-monooxygenasen, in einer Putrescin- und einer Polyaminoxidase und in einzelnen weniger gut charakterisierten Proteinen [116,167]. Dieses Motiv ist ein Indikator für eine FAD-Bindung, andererseits ist es jedoch für die Cofaktor-Bindung nicht zwingend erforderlich, da beispielsweise D-AAOs, Cholesteroloxidasen und membranständige L-Aminosäuresaminasen diesen Sequenzabschnitt nicht enthalten.

Im Rahmen der Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Universität Köln sind bisher sehr gute Voraussetzungen geschaffen worden, um die Kristallstruktur der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* zu lösen. Das sehr gute Streuverhalten der Kristalle ist äußerst vorteilhaft und konnte bei den bisherigen Messungen noch nicht voll

ausgeschöpft werden. Bislang existiert mit der D-AAO aus *Rhodotorula gracilis* nur eine Struktur einer FAD-abhängigen Oxidase mit einer höheren Auflösung (1,2 Å) [119] als die des vorhandenen Datensatzes der L-AAO aus *Rhodococcus opacus*. Die Struktur der L-AAO aus *Calloselasma rhodostoma* wurde bis zu einer Auflösung von 2,0 Å gelöst [21]. Die niedrige Homologie zwischen der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* und der aus *Calloselasma rhodostoma* mit 24,7% identischen und weiteren 14,7% ähnlichen Aminosäuren erschwert die Strukturaufklärung über den molekularen Ersatz (MR). Zur Bestimmung der Phase ist somit die Herstellung von Schwermetallderivaten eine Alternative. Entweder lässt sich damit über multiplen isomorphen Ersatz (MID) mit verschiedenen Derivaten die Phase berechnen oder ein Schwermetallderivat kann bei unterschiedlichen Wellenlängen am Synchrotron über multiple anomale Dispersion (MAD) die gewünschte Information zur Phase liefern.

4 Lokalisierung und Prozessierung der L-AAO

Der Vergleich der Nucleotidsequenz der L-AAO mit dem N-Terminus des aufgereinigten Wildtyp-Enzyms zeigte, dass die L-AAO als Präprotein synthetisiert wird und ein Signalpeptid aus 45 Aminosäuren besitzt. Fast alle bisher sequenzierten L-AAOs enthalten eine Signalsequenz und werden nach der Translation prozessiert (Abb. 44). Die Aminosäuresequenz TRRSFMK am N-Terminus der *Rhodococcus opacus* L-AAO-Signalsequenz weist eindeutig auf die Zugehörigkeit zu den Twin-Arginine Signalpeptiden hin. Das Twin-Arginine Translocation (TAT)-System wurde 1996 erstmals von Berks als Alternative zum Sec-abhängigen, bakteriellen Proteintransport beschrieben [168]. Viele Proteine, die Redoxcofaktoren binden, besitzen den konservierten Sequenzbereich (S/T)RRxFxK und werden in gefalteter Form samt Cofaktor über die Cytoplasmamembran transportiert [169-172]. Ein zweites, charakteristisches Merkmal der meisten Twin-Arginine Signalpeptide ist das sogenannte Sec-Avoidance Signal [173], das aus einem oder mehreren positiv geladenen Aminosäureresten besteht, die C-terminal der Erkennungsregion für die Signalpeptidasen liegen. Die L-AAO erfüllt auch dieses Kriterium, da ein Argininrest in Position -7 vorliegt.

In den Positionen -3 und -1 strangaufwärts der Schnittstelle findet man sowohl bei Twin-Arginine als auch bei Sec-Signalsequenzen mit der höchsten Häufigkeit Alanin, gefolgt von weiteren kleinen, ungeladenen Aminosäuren wie Serin, Valin und Glycin [173]. Die Signalpeptidasen scheinen somit bei beiden Transportsystemen ähnliche Erkennungssequenzen zu besitzen. Die vorhergesagte Prozessierungsstelle der L-AAO entsprach diesen Vorgaben, jedoch lag der tatsächliche N-Terminus des aufgereinigten Enzyms sieben Aminosäuren weiter strangabwärts (Abb. 41).

Der genaue Mechanismus des TAT-abhängigen Proteintransports ist noch nicht geklärt, obwohl schon mehrere Proteine identifiziert wurden (TatA/B/C/D/E), die Bestandteile des Transportsystems sind [174]. Wu et al. nahmen an, dass TatC die Membranpore ausbildet, deren Größe auf 5 bis 9 nm geschätzt wird [169]. Für den Transport der

Proteine wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen. Die erste Hypothese besagt, dass die Proteine TatA/B/E als Multimere im Cytoplasma vorliegen, die Substratproteine binden und zur Pore steuern. Durch Integration von TatA/B/E in den Kanal wird die Pore erweitert und so die Translocation des Substratproteins ermöglicht. Alternativ könnten TatA/B/E als Membranproteine Bestandteile des Kanals sein und die amphipatischen Domänen dieser Proteine könnten die Pore in Abwesenheit von Substratproteinen verschließen [169]. Interessanterweise befindet sich in *Rhodococcus opacus* strang-abwärts des *laao*-Gens ein Sequenzabschnitt, der Homologien zu Proteinen aufweist, die vermutlich ein Bestandteil des TAT-Systems sind (TatA/E).

Gesichert ist, dass zusätzlich zum Twin-Arginine Motiv in der Signalsequenz ein strukturelles Exportsignal notwendig ist, das durch die Cofaktorbindung induziert wird [171]. Eine weitere Eigenschaft des TAT-Systems ist, dass Proteine, die Twin-Arginine Signalsequenzen tragen, auch vor der Prozessierung schon enzymatisch aktiv sein können. Beispielsweise wurde die unprozessierte Form der Glucose-Fructose-Oxidoreductase aus *Zymomonas mobilis*, die ein typisches Twin-Arginine Signalpeptid enthält, bei der Expression in *E. coli* aktiv im Cytosol nachgewiesen [172].

Unter den in dieser Arbeit untersuchten Wachstums- und Induktionsbedingungen wurde die L-AAO nicht im Medienüberstand detektiert, lag aber nach dem Zellaufschluss und der Reinigung in der prozessierten Form im zellfreien Rohextrakt vor. Dieses Phänomen wurde sowohl im Wildtyp *Rhodococcus opacus* als auch bei der heterologen Expression in *Streptomyces lividans* beobachtet. Da das aktive Zentrum von Signalpeptidasen auf der extracytosolischen Seite der Plasmamembran liegt und die Abspaltung des Signalpeptids erst in einem späten Stadium des Transportprozesses erfolgt [168], war diese Beobachtung erstaunlich.

Aufgrund der Charakteristika des Transportmechanismus und der Funktionsweise von Signalpeptidasen war zu erwarten, dass die L-AAO sowohl vom Wildtyp *Rhodococcus opacus* als auch von *Streptomyces lividans* ins Medium sekretiert wird [175]. Folgende Überlegungen mögen erklären, weshalb das Enzym entgegen den Erwartungen im zellfreien Rohextrakt und nicht im Medienüberstand detektiert wurde.

- Die L-AAO lag vor dem Zellaufschluss in unprozessierter Form im Cytoplasma vor und kam während des Aufschlusses mit einer Signalpeptidase oder anderen Protease in Kontakt, so dass die Signalsequenz abgespalten werden konnte.
- Die L-AAO war vor dem Zellaufschluss schon über die Cytoplasmamembran transportiert und dabei prozessiert worden, lag danach aber noch mehr oder weniger fest assoziiert an Zellwand oder Zellmembran vor. Gerade bei gram-positiven Bakterien scheint diese Lokalisierung von Proteinen ungewöhnlich, da sie keine äußere Membran besitzen, die bei gram-negativen Stämmen Proteine im periplasmatischen Raum zurückhält. Jedoch wurde dieses Phänomen auch schon für die FAD-abhängige Cholesteroxidase aus *Rhodococcus erythropolis*

beschrieben, die vermutlich durch eine Kohlenhydratschicht an der Zelloberfläche zurückgehalten wird [176,177].

Eindeutig wird sich dieses Phänomen und die genaue Lokalisierung der L-AAO erst durch die Verfügbarkeit polyklonaler Antikörper durch Pulse-Chase Experimente klären lassen.

5 Mögliche Funktion der L-AAO in *Rhodococcus opacus*

Bisher wurden Bakterien zur Induktion der L-AAOs unter sehr variierenden Bedingungen kultiviert. Die L-AAOs aus *Bacillus carotatum* und *Corynebacterium* wurden durch Zugabe von L-Aminosäuren zu einem Minimalmedium induziert [33,34]. *Cellulomonas cellulans* wurde zur L-AAO-Produktion in Komplexmedium mit Hefeextrakt als N-Quelle und Glycerin als C-Quelle angezogen [32]. Auch bei *Rhodococcus opacus* schien Hefeextrakt für die Induktion der L-AAO sehr gut geeignet. Der Zusatz von L-Aminosäuren zu dem Komplexmedium M65 brachte keine Erhöhung der Aktivität, L-Arginin unterdrückte die Bildung der L-AAO sogar vollständig. Bei der Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in Minimalmedium mit L-Aminosäuren als alleinige N- und C-Quelle (L-Leucin, L-Lysin oder L-Phenylalanin) sank die L-AAO-Aktivität drastisch.

Die Reihenfolge des L-Aminosäureabbaus durch *Rhodococcus opacus* aus dem Medium M65 ließ darauf schließen, dass die L-AAO für diesen Prozess verantwortlich war (III.2.1.1). Vermutlich katalysiert das Enzym die Desaminierung der meisten in Abb. 17 aufgeführten L-Aminosäuren und versorgt die Zelle mit Stickstoff und mit Ketoverbindungen, die im Folgenden in Glucose umgewandelt oder im Citratzyklus oxidiert werden können. Somit ist es wahrscheinlich, dass die L-AAO in *Rhodococcus opacus* eine Funktion im Aminosäure-Katabolismus übernimmt.

6 Heterologe Expression der L-AAO

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* ist die erste H₂O₂-bildende L-AAO, die aktiv in einem bakteriellen System exprimiert wurde. Trotz der Kenntnis einer relativ hohen Anzahl an L-AAO-Sequenzen aus den verschiedenen Eukaryoten wurden bisher erst drei dieser Enzyme heterolog in Zellkultur exprimiert, die L-AAOs aus dem Giftsekret von *Crotalus atrox*, aus Mäusmilch und aus dem Fisch *Scomber japonicus* [39,57,66]. Viele der eukaryotischen L-AAOs sind glykosyliert [27,52,53,66,67,178]. Aus diesem Grund sind prokaryotische Systeme für die Expression dieser Proteine nicht geeignet.

Die Gensequenzen der bisher beschriebenen bakteriellen L-AAOs sind mit Ausnahme der L-AAO aus dem Cyanobakterium *Synechococcus spec.* (GI:3341475) noch nicht bekannt. Zur heterologen Expression prokaryotischer L-AAOs existieren bislang noch keine Angaben.

Bei den Versuchen zur Expression der *Rhodococcus opacus* L-AAO in *E. coli* traten Schwierigkeiten auf. Die L-AAO wurde trotz umfangreicher Variation der Vektoren, Wirtsstämme, Kultivierungs- und Induktionsbedingungen ausschließlich als unlösliches Protein exprimiert. Mögliche Ursachen für dieses Problem sind im Folgenden aufgelistet.

- Die Existenz von Disulfidbrücken, die bisher für die L-AAO weder ausgeschlossen noch nachgewiesen wurde, hätte die korrekte Faltung im Cytoplasma verhindern können. Das Enzym enthält 4 Cysteine pro Untereinheit und kann somit theoretisch Disulfidbindungen ausbilden. Der *E. coli*-Stamm Origami, der Mutationen in der Glutathion- und der Thioredoxinreductase trägt, unterstützt die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma [179] ebenso wie die Fusion des Zielproteins mit Thioredoxin [138]. Jedoch wurde die L-AAO auch in diesem Wirtsorganismus nur unlöslich exprimiert.
- Die Vermutung, dass die L-AAO toxisch für *E. coli* ist, liegt nahe [180]. Die Zellen hätten bei der Expression aktiver L-AAO aber mit Einstellung des Wachstums und nicht mit der Bildung von Inclusion Bodies reagiert.
- Ein Grund für die Inclusion Bodies kann das Fehlen geeigneter Chaperone in *E. coli* sein, so dass die Faltung zu schnell und damit fehlerhaft ablief. Durch Senkung der Induktionstemperatur und Induktorkonzentration wurde dieses Problem nicht gelöst. Eine Alternative wäre die Coexpression von Chaperonen [181].
- Es besteht die Möglichkeit, dass die L-AAO von *E. coli* nicht über die Cytoplasmamembran transportiert werden und anschließend prozessiert werden konnte, da die Twin-Arginine Signalsequenzen nicht universell von verschiedenen TAT-Systemen erkannt werden können [172].
- Weitgehend ausschließen kann man die Überlegung, dass die L-AAO nur in der Apoform exprimiert wurde, weil *E. coli* nicht genügend FAD zur Verfügung stellen konnte. Da jedoch eine Reihe FAD-abhängiger Enzyme in *E. coli* aktiv exprimierbar sind [107,182,183] und zumindest ein Anteil als Holoenzym gebildet wird, erklärt diese Überlegung nicht das Fehlen jeglicher L-AAO-Aktivität.

Da bei dieser Anzahl möglicher Erklärungen das Auffinden der eigentlichen Ursache schwer fiel und auch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren denkbar war, wurden zwei weitere Alternativen verfolgt, um rekombinante, aktive L-AAO zu erhalten. Zum einen wurde versucht, die in *E. coli* exprimierte, unlösliche L-AAO wieder zu lösen und zu renaturieren. Da dieses Verfahren bisher auch schon für die bakterielle, FAD-

abhängige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase erfolgreich war, wurde die L-AAO in naher Anlehnung an dieses Protokoll gelöst und renaturiert [184]. Die Aktivität konnte nach einer vorläufigen Optimierung auf diese Weise bisher nicht wiederhergestellt werden. Nachdem die Expression der L-AAO in *E. coli* nicht erfolgreich war, wurde nach einem alternativen System gesucht. Die Entscheidung fiel aus folgenden Gründen auf *Streptomyces lividans* als Wirtsstamm:

- Die Verwandtschaft zwischen den Gattungen *Rhodococcus* und *Streptomyces* ist deutlich höher als zwischen *Rhodococcus* und *Escherichia* (Abb. 71). Die Gattungen *Rhodococcus* und *Streptomyces* gehören zur Ordnung der Actinomyetales, sind gram-positiv und die DNA hat jeweils einen hohen GC-Gehalt (*Rhodococcus* 66%, *Streptomyces* 72%).

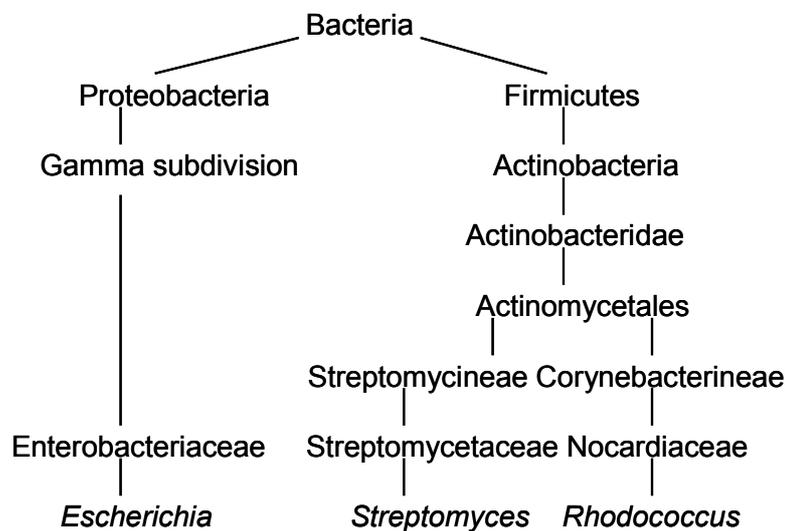


Abb. 71: Taxonomische Einordnung der Gattungen *Escherichia*, *Streptomyces* und *Rhodococcus*.

- Die Fähigkeit Twin-Arginine Signalpeptide zu erkennen ist in vielen Fällen artenübergreifend, jedoch gibt es auch Beispiele dafür, dass die Signalerkennung nicht unbegrenzt zwischen verschiedenen Arten funktioniert [172]. Möglicherweise war das *E. coli* TAT-System nicht in der Lage, das Signalpeptid der *Rhodococcus opacus* L-AAO zu erkennen. Durch Mutationsstudien wurde kürzlich auch die Existenz eines funktionellen TAT-Systems in *Streptomyces lividans* nachgewiesen [175]. Diese Tatsache unterstützte die Annahme, dass *Streptomyces lividans* als sinnvolle Alternative für die heterologe Expression der L-AAO eingesetzt werden könnte.
- Die Expression einer Alkenmonooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* war in *E. coli* nicht erfolgreich, jedoch ließ sich dieses Drei-Komponenten-Enzymsystem aktiv in *Streptomyces lividans* exprimieren [185].

Diese Hinweise legten die Vermutung nahe, dass *Streptomyces lividans* eher für die Expression der L-AAO aus *Rhodococcus opacus* geeignet sein könnte als *E. coli*. Erwartungsgemäß gelang es auch, die L-AAO in aktiver Form zu exprimieren. Unter den bisher getesteten Bedingungen wurden in *Streptomyces lividans* bis zu dreimal höhere spezifische Aktivitäten als im Wildtyp erreicht.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit das erste bakterielle Expressionssystem für eine L-AAO etabliert werden. Durch weitere Optimierung der heterologen Expression kann in Zukunft die Verfügbarkeit des Enzyms für technische Anwendungen verbessert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt besteht aber schon die Möglichkeit, Mutationen in das *laao*-Gen einzuführen, die eine Erweiterung des Substratspektrums, eine Optimierung der biochemischen Eigenschaften oder die Aufklärung des Reaktionsmechanismus ermöglichen.

7 Biotechnologischer Einsatz der L-AAO

Das Screening nach neuen L-AAOs wurde durchgeführt, um alternative Wege zur Synthese von D-Aminosäuren und Ketosäuren zu eröffnen. L-AAOs sind aufgrund ihrer Gleichgewichtslage auf Seiten des Oxidationsprodukts sowohl für die Racemattrennung als auch für die direkte Desaminierung von L-Aminosäuren zu Ketosäuren sehr gut geeignet. Als weiterer Vorteil ist zu erwähnen, dass in diesen Prozessen nur maximal zwei Enzyme erforderlich sind, die L-AAO und bei oxidationsempfindlichen Substraten und Produkten auch Katalase. Möglicherweise können die umfangreichen verfahrenstechnischen und kinetischen Erkenntnisse über die D-AAOs gut auf die L-AAOs übertragen werden und so eine Prozessentwicklung erleichtern [186].

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* versprach aufgrund der hohen Affinität für eine hohe Anzahl an L-Aminosäuren, der absoluten Enantioselektivität und aufgrund ihres breiten Substratspektrums ein guter Katalysator für die präparative Anwendung zu sein. Ein vermeintlicher Nachteil war die Substratüberschussinhibierung für einen Großteil der untersuchten L-Aminosäuren. Dieses Problem kann aber verfahrenstechnisch sehr einfach durch Substratdosierung während der Umsetzung umgangen werden.

Bei der Entwicklung eines technischen Prozesses wird auch die Sauerstoffversorgung besondere Beachtung finden müssen, da sich der Sauerstoffübergang beim Scale-Up häufig verschlechtert und der Einsatz höherer Substratkonzentrationen wünschenswert sein wird. Falls die L-AAO eine hohe Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Belastungen aufweisen wird, gibt es schonende Möglichkeiten der Sauerstoffversorgung wie beispielsweise die blasenfreie Begasung. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde keine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Sauerstofflimitierung beobachtet.

Für die präparative Anwendung der L-AAO wurden verschiedene Enzympräparationen und Verfahrensweisen untersucht: freies oder auf unterschiedliche Weisen immobilisiertes Enzym oder auch *Rhodococcus opacus*-Zellen wurden in batch, repetitive-

batch oder kontinuierlichen Verfahren eingesetzt. Eine vergleichende Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tab. 20 wiedergegeben.

Sämtliche Enzympräparationen erzielten im batch-Ansatz mit DL-Phenylalanin als Substrat Umsatz- und ee-Werte von über 99%. Im Enzym-Membran-Reaktor wurden hingegen keine stabilen Betriebsbedingungen erreicht, da die L-AAO schon innerhalb der ersten zwei Stunden einen Großteil der Aktivität verlor.

Bei näherer Betrachtung zeigten sich die Qualitätsunterschiede der unterschiedlichen L-AAO-Präparationen. So konnten die *Rhodococcus opacus*-Zellen nicht über mehrere Zyklen eingesetzt werden, da sie relativ schnell lysierten. Die freie L-AAO hingegen ließ sich über mehrere Zyklen durch Ultrafiltration wiedergewinnen.

Die L-AAO ließ sich mit hervorragenden Ausbeuten auf Eupergit immobilisieren. Gleichzeitig wurde durch dieses Verfahren die Stabilität bei 30°C im Vergleich zum freien Enzym um den Faktor 5-10 erhöht (Eupergit C $t_{1/2} = 52$ h; Eupergit C 250L $t_{1/2} = 18$ h; freie L-AAO $t_{1/2} = 5$ h). Bisher wurden L-AAOs aus unterschiedlichen Quellen nur für den Einsatz als Biosensor immobilisiert [59-62,102], eine Immobilisierung für präparative Einsätze wurde bisher noch nicht beschrieben.

Auch die Verwendung FAD-abhängiger Oxidasen in der Form quervernetzter Enzymkristalle wurde noch nicht untersucht. Es existieren bislang Studien über diverse Hydrolasen [145,187] und weitere technisch interessante Enzyme wie Glucose-Isomerase [188], Penicillinacylase [189] und Alcohol-Dehydrogenase [143]. Die guten Kristallisationseigenschaften der L-AAO wurden zur Herstellung von CLECs ausgenutzt. Jedoch verloren die L-AAO-Kristalle 99,9% ihrer ursprünglichen Aktivität während der Quervernetzung mit Glutardialdehyd. Bei dieser Reaktion reagieren die freien Aminogruppen des Proteins mit Glutardialdehyd zu Schiff'schen Basen.

Aus der Struktur der *Callosetasma rhodostoma* L-AAO ist bekannt, dass das Enzym ein katalytisch aktives Lysin (Lys326) besitzt, das für die Hydrolyse der Imino- zur Ketosäure verantwortlich ist [21]. Aus dem Alignment der Primärstrukturen der *Callosetasma rhodostoma* und der *Rhodococcus opacus* L-AAOs wurde deutlich, dass sich auch in der Sequenz des bakteriellen Enzyms in diesem Bereich ein Lysin befindet (Lys321). Möglicherweise inaktivierte das Glutardialdehyd die L-AAO durch Reaktion an dieser Aminosäure. Die Aktivitätsausbeuten könnten vielleicht durch die Zugabe von Substanzen, die keine freien Aminogruppen besitzen und die reversibel im aktiven Zentrum des Enzyms binden, oder durch Schutzreagenzien wie Chitosan erhöht werden. Alternativ könnten weitere Reagenzien zur Quervernetzung getestet werden, die nicht mit den freien Aminogruppen des Proteins reagieren, sondern die aromatischen [190] oder sauren [142,191] Reste angreifen. Die Immobilisierung an Eupergit inaktivierte die L-AAO nicht, obwohl auch bei dieser Reaktion kovalente Bindungen zwischen Amino- und Sulfhydrylgruppen des Proteins und Epoxygruppen des Trägers entstehen. Ein Grund für diese Beobachtung mag die Partikelgröße des Eupergits (200 μm) in Kombination mit der geringen Spacerlänge der reaktiven Gruppe

(6 Å) sein, die eine Reaktion zwischen Resten im aktiven Zentrum und den Epoxygruppen verhindert.

Tab. 20: Vergleich der verschiedenen Enzympräparationen, die für die Racemattrennung von DL-Phenylalanin eingesetzt wurden.

Enzympräparation	Verfahren	Umsatz (%)	ee (%)	Vorteile	Nachteile
<i>Rhodococcus opacus</i> -Zellen	batch	> 99	> 99	• Einfache Handhabung	• Zellen lysieren
Freie L-AAO	batch & rep. batch	> 99	> 99	• Einfache Handhabung • Enzym mittels UF recyclebar	
L-AAO auf Eupergit	batch & rep. batch	> 99	> 99	• Sehr gute Ausbeuten bei Immobilisierung • Katalysator gut separierbar • Erhöhte Stabilität	• Kosten des Trägermaterials • O ₂ -Versorgung beim Scale-Up?
L-AAO als CLEC	batch	> 99	> 99	• Katalysator gut separierbar • Erhöhte Stabilität	• 99,9% Aktivitätsverlust während der Quervernetzung
Freie L-AAO	EMR: kontinuierlich	62	32		• Keine stabilen Betriebsbedingungen

8 Reinigung und biochemische Charakterisierung der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO

Innerhalb dieser Arbeit gelang es, eine neue bakterielle D-AAO aufzureinigen und erste Untersuchungen zur Charakterisierung des Enzyms durchzuführen. Die Aufreinigung gestaltete sich aufgrund der Empfindlichkeit der D-AAO gegenüber verschiedensten Ultrafiltrationsmembranen und der Inaktivierung des Enzyms durch hohe Ammoniumsulfatkonzentrationen schwierig. Denn aus diesem Grunde konnten gängige Techniken wie hydrophobe Interaktionschromatographie oder das Aufkonzentrieren einer Proteinprobe in der Rührzelle nicht oder nur mit sehr hohen Aktivitätsverlusten eingesetzt werden. Zusätzlich erschwerte der mit < 0,3% geringe Anteil der D-AAO am Gesamtproteingehalt der Zelle die Aufreinigung. Der Cofaktor blieb während aller

Reinigungsschritte am Protein gebunden, somit war der externe Zusatz von FAD nicht notwendig.

Die proteinchemischen Daten der D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* wiesen Ähnlichkeiten zu den bisher beschriebenen D-AAOs aus Pilzen und Schweineniere auf. Diese Enzyme liegen als Homodimer mit einer Größe von 79-90 kDa vor [192-194] und auch die N-terminalen Sequenzen weisen hohe Homologien auf (Abb. 70).

Trotz dieser vergleichbaren Proteineigenschaften unterscheidet sich die D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* in ihrem Substratspektrum von vielen literaturbekannten Enzymen, da sie einige aliphatische Substrate wie D-Valin und D-Alanin gar nicht umsetzt, aber basische D-Aminosäuren wie D-Arginin und D-Lysin offensichtlich gut oxidieren kann. Gerade die letzte Beobachtung steht im Kontrast zu den Substratspektren der D-AAOs aus *Rhodotorula gracilis* [74], Schweineniere und *Fusarium oxysporum* [76], da diese Enzyme mit basischen D-Aminosäuren gar nicht oder nur sehr langsam reagieren.

Es wäre von Interesse, in Zukunft das gesamte *daao*-Gen zu isolieren, um über diesen Schritt weitere Informationen über das Protein zu erhalten und um die D-AAO heterolog exprimieren zu können. Die Expression verschiedenster, eukaryotischer D-AAOs in *E. coli* wurde schon berichtet [77,103,104,106-108].

Die Primärstruktur aus *Arthrobacter protophormiae* würde auch einen Vergleich mit den putativen, bakteriellen D-AAO-Sequenzen ermöglichen (GI: 16126568, *Caulobacter vibrioides*; GI: 17544831, *Ralstonia solanacearum*; GI: 15677890, *Neisseria meningitidis*; GI: 15828089, *Mycobacterium leprae*; GI: 15889607, *Agrobacterium tumefaciens*).

9 Zusammenfassender Vergleich der neuen, bakteriellen mit literaturbekannten L-AAOs

Sowohl L-AAOs als auch D-AAOs gehören zu den Flavoproteinen, die schon seit vielen Jahrzehnten bekannt sind. Anhand der Veröffentlichungen über diese Enzyme wird deutlich, dass in der Erforschung der L-AAOs und D-AAOs unterschiedliche Schwerpunkte eine Rolle spielten.

Ein Großteil der Artikel über die L-AAOs befassen sich mit der Isolierung, biochemischen Charakterisierung und Untersuchung zur toxischen Wirkung der Schlangengiftenzyme. Der Einsatz von L-AAOs in der Synthese wurde bisher kaum erforscht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal über die heterologe Expression einer L-AAO in einem bakteriellen System berichtet werden. Zusätzlich zeigten Untersuchungen zur präparativen Anwendung der *Rhodococcus opacus* L-AAO, dass dieses Enzym als Katalysator bei der Präparation von D-Aminosäuren eingesetzt werden kann.

Die D-AAOs aus den Hefen *Trigonopsis variabilis* und *Rhodotorula gracilis* wurden besonders hinsichtlich ihres Synthesepotentials erforscht. Dazu gehören Studien zur Expressionsoptimierung, zur Immobilisierung und Stabilisierung dieser Enzyme. Durch

die Aufklärung der Kristallstrukturen von zwei D-AAOs und Mutageneseuntersuchungen konnte der Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden. Zur physiologischen Funktion mikrobieller D-AAOs gibt es hingegen kaum Informationen. Ebenso wurden bisher nur eukaryotische D-AAOs charakterisiert. Somit konnte innerhalb dieser Arbeit mit der D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* das erste bakterielle Enzym dieser Gruppe isoliert werden.

V Zusammenfassung

Screening nach mikrobiellen L-AAOs

Nach der Kultivierung von 69 DSMZ-Sammlungsstämmen und 301 Isolaten aus Bodenproben wurden mehrere L-AAO-Bildner detektiert. Aufgrund der reproduzierbaren und gut quantifizierbaren L-AAO-Expression in *Rhodococcus opacus* DSM 43250 wurde dieses Enzym für die fortführenden Arbeiten ausgewählt.

Reinigung und Charakterisierung der L-AAO aus *Rhodococcus opacus*

Für die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* wurde ein Reinigungsprotokoll entwickelt, mit dem es gelang, in zwei Chromatographieschritten und mit guten Ausbeuten homogenes Enzym zu isolieren. Die spezifische Aktivität der L-AAO für das Standardsubstrat L-Alanin lag bei 5,4 U·mg. Die proteinchemische Charakterisierung der L-AAO mittels Gelfiltration, SDS-PAGE und MALDI/TOF-MS zeigte, dass das Enzym als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 53 kDa pro Untereinheit vorliegt. Der isoelektrische Punkt lag bei 4,8. Der Cofaktor FAD war fest, aber nicht kovalent am Enzym gebunden. Die L-AAO wies ein breites Substratspektrum auf, 39 von 44 getesteten L-Aminosäuren wurden oxidiert. D-Aminosäuren wurden nicht als Substrate akzeptiert, das Enzym ist somit hoch enantioselektiv. Bevorzugt wurden basische, aromatische und die am β -C-Atom unverzweigten aliphatischen L-Aminosäuren umgesetzt. Viele der getesteten Substrate hatten eine hohe Affinität zur L-AAO mit niedrigen K_M -Werten im mikromolaren Bereich. Für die meisten L-Aminosäuren wurde eine relativ stark ausgeprägte Substratüberschussinhibierung festgestellt.

Das pH-Optimum der L-AAO lag für ungeladene Substrate im schwach basischen Bereich (pH 8-9). Die Halbwertszeiten der L-AAO lagen nach Inkubation bei 37°C in Abhängigkeit vom Puffer zwischen 35 und 938 min. Die Oxidationsempfindlichkeit der L-AAO wurde in Anwesenheit von H₂O₂ gemessen und es zeigte sich, dass das Enzym eine hohe Stabilität gegenüber diesem Reaktionsprodukt aufwies.

Klonierung des *laao*-Gens und heterologe Expression der L-AAO

Die homogene L-AAO wurde enzymatisch gespalten, die Peptidbruchstücke wurden isoliert und N-terminal sequenziert. Unter Beachtung der Codon Usage für *Rhodococcus opacus* wurden aus den Proteinsequenzdaten der L-AAO Primer abgeleitet. Über PCR wurde ein 1,1 kb-großes DNA-Fragment amplifiziert, das einem Teil des *laao*-Gens entsprach und das als Sonde im Southern Blot eingesetzt wurde. Eine partielle genomische Bank wurde erstellt und mittels PCR gescreent. Das gesamte *laao*-Gen wurde auf diese Weise isoliert und anschließend sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten zeigte, dass die L-AAO eine Signalsequenz aus 45 Aminosäuren besitzt, die das hochkonservierte Twin-Arginine Motiv enthält. Im Alignment mit 8 weiteren L-AAOs wurde deutlich, dass auch die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* die beiden hochkonservierten Dinucleotid-Bindungsstellen besitzt (GxGxxG und RxGGR), die für diese Enzymklasse charakteristisch sind. Im restlichen Sequenzbereich waren die Ähnlichkeiten zu anderen L-AAOs sehr gering.

Die heterologe Expression der L-AAO in *E. coli* war trotz umfangreicher Variation der Bedingungen nicht erfolgreich. Das Enzym ließ sich jedoch aktiv in *Streptomyces lividans* exprimieren. Nach einer vorläufigen Optimierung der Expressionsbedingungen wurde die L-AAO mit einer spezifischen Aktivität von $180 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ im Rohextrakt exprimiert. Dieser Wert lag etwa um den Faktor 3 höher als die spezifische Aktivität im Rohextrakt von *Rhodococcus opacus*. Die rekombinante L-AAO ließ sich nach dem für die Wildtyp L-AAO entwickelten Reinigungsprotokoll isolieren. Die spezifische Aktivität der homogenen Enzympräparation war mit dem Wert der Wildtyp L-AAO vergleichbar. Nach Analyse der N-Termini wurde deutlich, dass die L-AAO in *Streptomyces lividans* an einer etwas anderen Stelle prozessiert wird als in *Rhodococcus opacus*.

Kristallisation der L-AAO

Die native L-AAO formte unter zwei verschiedenen Bedingungen reproduzierbar hexagonale und orthorhombische Einkristalle. Bei Diffraktionsmessungen der orthorhombischen L-AAO-Kristalle konnte ein Röntgenbeugungsdatensatz bis zu einer Auflösung von unter $1,4 \text{ \AA}$ erhalten werden (Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie, Universität Köln). Aufgrund dieser Ergebnisse kann mit einer zeitnahen Aufklärung der dreidimensionalen Struktur gerechnet werden.

Anwendung in der Synthese von D-Aminosäuren

Die L-AAO wurde zur Racemattrennung von DL-Aminosäuren auf verschiedene Weisen präpariert und vergleichende Umsetzungen wurden durchgeführt. Eingesetzt wurden ganze *Rhodococcus opacus*-Zellen, freie, partiell gereinigte L-AAO, auf Eupergit immobilisierte L-AAO, quervernetzte Enzymkristalle (CLECs) und freies Enzym im Enzym-Membran-Reaktor (EMR). Abgesehen vom EMR wurden die L-Aminosäuren mit allen Enzympräparationen vollständig umgesetzt und für die D-Aminosäuren wurden ee-Werte von über 99% erzielt. Das Eupergit-Immobilisat brachte aufgrund der guten Immobilisierungsausbeuten, der verbesserten Stabilität und der guten Wiederverwendbarkeit des Enzyms die meisten Vorteile für die technische Anwendung mit sich.

Reinigung und Charakterisierung der D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae*

Beim Screening nach L-AAOs wurde aus Bodenproben auch ein neuer D-AAO-Bildner isoliert. Die D-AAO wurde als erstes bakterielles Enzym dieser Gruppe bis zur Homogenität gereinigt. Erste proteinchemische Untersuchungen zeigten bezüglich der Größe und der N-terminalen Sequenz Ähnlichkeiten zu eukaryotischen D-AAOs.

VI Ausblick

Folgende Themenschwerpunkte bieten sich für weiterführende Arbeiten an:

Optimierung der heterologen Expression der L-AAO

Die Möglichkeit zur rekombinanten Herstellung der L-AAO eröffnet viele Optimierungsmöglichkeiten bezüglich der Expressionsleistung. So können weitere *Streptomyces*-Vektoren untersucht werden oder komplett andere, ebenfalls nah verwandte Expressionsstämme wie *Corynebacterium* eingesetzt werden. Gerade für die heterologe Proteinexpression in *Streptomyces* existieren kaum Untersuchungen zur Medien- und Fermentationsoptimierung. Auf diesem Weg könnte aber durch Steigerung der Wachstumsraten und der Zelldichte auch die Raum-Zeit-Ausbeute deutlich verbessert werden.

Aufklärung der Kristallstruktur der L-AAO

Die Kristallstruktur der L-AAO soll aufgeklärt werden. Die bisher noch fehlende Phaseninformation soll über molekularen Ersatz, multiplen isomorphen Ersatz oder multiple anomale Dispersion mit Schwermetallderivaten berechnet werden. Da im Rahmen dieser Arbeit ein heterologes Expressionssystem für die L-AAO etabliert wurde, besteht jetzt auch die Möglichkeit Mutanten herzustellen, die zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus und der Substratbindung beitragen können.

Erweiterung des Substratspektrums der L-AAO

Über Methoden wie gezielte Mutagenese oder gerichtete Evolution kann versucht werden, das Substratspektrum der L-AAO zu verändern. Aus technischer Sicht sind die am β -C-Atom verzweigten L-Aminosäuren als Substrate von Interesse, sie werden von der L-AAO aber nicht umgesetzt. Durch den Austausch raumfüllender Aminosäurereste im Substratkanal könnte dieses Problem gelöst werden.

Optimierung der enzymatischen D-Aminosäureproduktion durch die L-AAO

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Enzympräparationen hergestellt und vergleichend in der Racematspaltung von DL-Aminosäuren eingesetzt. Für den technischen Einsatz müssen aber noch Faktoren wie das Scale-Up, die Sauerstoffversorgung, die optimale Substrat- und Enzymkonzentration und die Stabilität des Enzyms unter Prozessbedingungen untersucht werden.

Klonierung und Expression der D-AAO

Da die D-AAO nur in relativ geringen Mengen in *Arthrobacter protophormiae* gebildet wird, ist es von Interesse, das *daao*-Gen zu isolieren und zu exprimieren. Auf diesem Wege können größere Mengen des Enzyms produziert werden, die eine umfassende biochemische Charakterisierung ermöglichen.

VII Literaturverzeichnis

- [1] Kusumoto I (2001) Industrial production of L-glutamine, *J Nutr* 131, 2552S-5S.
- [2] de Graaf AA, Eggeling L and Sahm H (2001) Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73, 9-29.
- [3] Kamphuis J, Meijer EM, Boesten WH, Sonke T, van den Tweel WJ and Schoemaker HE (1992) New developments in the synthesis of natural and unnatural amino acids, *Ann N Y Acad Sci* 672, 510-27.
- [4] Sylđatk C, May O, Altenbuchner J, Mattes R and Siemann M (1999) Microbial hydantoinases-- industrial enzymes from the origin of life?, *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 293-309.
- [5] Wilms B, Wiese A, Sylđatk C, Mattes R and Altenbuchner J (2001) Development of an *Escherichia coli* whole cell biocatalyst for the production of L-amino acids, *J Biotechnol* 86, 19-30.
- [6] Park HJ, Kim GJ and Kim HS (2000) Production of D-amino acids using whole cells of recombinant *Escherichia coli* with separately and coexpressed D-Hydantoinase and N-Carbamoylase, *Biotechnol Prog* 16, 564-70.
- [7] Kim GJ, Lee DE and Kim HS (2000) Construction and evaluation of a novel bifunctional N-carbamylase-D-hydantoinase fusion enzyme, *Appl Environ Microbiol* 2000, 2133-8.
- [8] Bommarius A, Schwarm M, Stingl K, Kottenhahn M, Huthmacher K and Drauz K (1995) Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine, *Tetrahedron* 6, 2851-88.
- [9] Altenbuchner J, Siemann-Herzberg M and Sylđatk C (2001) Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids, *Curr Opin Biotechnol* 12, 559-63.
- [10] Galkin A, Kulakova L, Yoshimura T, Soda K and Esaki N (1997) Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes, *Appl Environ Microbiol* 63, 4651-6.
- [11] Bae HS, Lee SG, Hong SP, Kwak MS, Esaki N, Soda K and Sung MH (1999) Production of aromatic D-amino acids from alpha-keto acids and ammonia by coupling of four enzyme reactions, *J Mol Catal B: Enzymatic* 6, 241-47.
- [12] Tsai YC, Lin CS, Tseng TH, Lee H and Wang YJ (1992) Production and immobilization of D-aminoacylase of *Alcaligenes faecalis* DA1 for optical resolution of N-acyl-DL-amino acids, *Enzyme Microb Technol* 14, 384-9.
- [13] Yang YB, Hsiao KM, Li H, Yano H, Tsugita A and Tsai YC (1992) Characterization of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* DA181., *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 1392-5.
- [14] Verseck S, Bommarius A and Kula MR (2001) Screening, overexpression and characterization of an N-acylamino acid racemase from *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida*, *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 354-61.
- [15] Takahashi E, Furui M, Seko H and Shibatani T (1997) D-methionine preparation from racemic methionines by *Proteus vulgaris* IAM 12003 with asymmetric degrading activity, *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 173-9.
- [16] Pantaleone DP, Geller AM and Taylor PP (2001) Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids, *J Mol Catal B: Enzymatic* 11, 795-803.

- [17] Ogawa J and Shimizu S (1999) Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods, *Trends Biotechnol* 17, 13-21.
- [18] Shimizu S, Ogawa J, Kataoka M and Kobayashi M (1997) Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58, 45-87.
- [19] Precigou S, Goulas P and Duran R (2001) Rapid and specific identification of nitrile hydratase (NHase)-encoding genes in soil samples by polymerase chain reaction, *FEMS Microbiol Lett* 24, 155-61.
- [20] Riebel B and Hummel W (2001) Antibody-supported screening of alcohol dehydrogenases, *Biotechnology Letters* 23, 231-4.
- [21] Pawelek PD, Cheah J, Coulombe R, Macheroux P, Ghisla S and Vrielink A (2000) The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site, *EMBO J* 19, 4204-15.
- [22] Zeller A (1948) in: *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, Vol. 8, pp. 459-95 (Nord, F.F., Ed.) Interscience, New York.
- [23] Souza DH, Eugenio LM, Fletcher JE, Jiang MS, Garratt RC, Oliva G and Selistre-de-Araujo HS (1999) Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data, *Arch Biochem Biophys* 368, 285-90.
- [24] Torii S, Naito M and Tsuruo T (1997) Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom, *J Biol Chem* 272, 9539-42.
- [25] Ponnudurai G, Chung MC and Tan NH (1994) Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom, *Arch Biochem Biophys* 313, 373-8.
- [26] Tan NH and Swaminathan S (1992) Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom, *Int J Biochem* 24, 967-73.
- [27] Sanchez EO and Magalhaes A (1991) Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (Surucucu Pico de Jaca) *Lachesis muta muta* venom, *Braz J Med Biol Res* 24, 249-60.
- [28] Tan NH and Saifuddin MN (1991) Substrate specificity of king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase, *Int. J Biochem* 23, 323-7.
- [29] Le KH and Villanueva VR (1978) Purification and characterization of epsilon-N-trimethyllysine L-amino oxidase from *Neurospora crassa*, *Biochim Biophys Acta* 524, 288-96.
- [30] Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, Yoshino H, Misono H and Soda K (1980) A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties, *J Biol Chem* 255, 976-81.
- [31] Piedras P, Pineda M, Munoz J and Cardenas J (1992) Purification and characterization of an L-amino-acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Planta* 188, 13-8.
- [32] Braun M, Kim JM and Schmid RD (1992) Purification and some properties of an extracellular L-amino acid oxidase from *Cellulomonas cellulans* AM8 isolated from soil, *Appl Microbiol Biotechnol* 37, 594-98.

-
- [33] Brearley GM and Price CP (1994) Isolation, identification and characterisation of a soil bacterium producing an enzyme with L-phenylalanine oxidase activity, *Arch Microbiol* 161, 409-13.
- [34] Coudert M (1975) Characterization and physiological function of a soluble L-amino acid oxidase in *Corynebacterium*, *Arch Microbiol* 102, 151-3.
- [35] Blaschko H and Hope DB (1955) The oxidation of L-amino acids by *Mytilus edulis*, 62, 335-9.
- [36] Boulanger P and Osteux R (1956) Action de la L-aminoacide-deshydrogenase du foie de dindon (*Meleagris gallopavo* L.) sur les acides amines basiques, *Biochim Biophys Acta* 21, 552-61.
- [37] Jung SK, Mai A, Iwamoto M, Arizono N, Fujimoto D, Sakamaki K and Yonehara S (2000) Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis, *J Immunol* 165, 1491-7.
- [38] Ahn MY, Ryu KS, Lee YW and Kim YS (2000) Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs, *Arch Pharm Res* 23, 477-81.
- [39] Sun Y, Nonobe E, Kobayashi Y, Kuraishi T, Aoki F, Yamamoto K and Sakai S (2002) Characterization and expression of L-amino acid oxidase of mouse milk, *J Biol Chem* 20.
- [40] Murthy SN and Janardanasarma MK (1999) Identification of L-amino acid/L-lysine alpha amino acid oxidase in mouse brain, *Mol Cell Biochem* 197, 13-23.
- [41] Böhmer A, Müller A, Passarge M, Liebs P, Honeck H and H.G. M (1989) A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*, *Eur J Biochem* 182, 327-32.
- [42] Kamei T, Asano K, Suzuki H, Matsuzaki M and Nakamura S (1983) L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* I Production, isolation and some properties, *Chem Pharm Bull* 31, 1307-14.
- [43] Kamei T, Asano K, Kondo H, Matsuzaki M and Nakamura S (1983) L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* II Properties, *Chem Pharm Bull* 31, 3609-16.
- [44] Koyama H (1983) Further characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501, *J Biochem (Tokyo)* 93, 1313-9.
- [45] Cioaca C and Ivanof A (1974) Bacterial amino acid oxidases. I. L-amino acid oxidase and its distribution in bacteria, *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 33, 211-22.
- [46] Massad G, Zhao H and Mobley HL (1995) *Proteus mirabilis* amino acid deaminase: cloning, nucleotide sequence, and characterization of aad, *J Bacteriol* 177, 5878-83.
- [47] Bouvrette P and Luong JHT (1994) Isolation, purification, and further characterization of an L-phenylalanine oxidase from *Morganella morganii*, *Appl Biochem Biotechnol* 48, 61-74.
- [48] DeBusk RM and Ogilvie S (1984) Participation of an extracellular deaminase in amino acid utilization by *Neurospora crassa*, *J Bacteriol* 159, 583-9.
- [49] Sikora L and Marzluf GA (1982) Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*, *Mol Gen Genet* 186, 33-9.
- [50] Munoz-Blanco J, Hidalgo-Martinez J and Cardenas J (1990) Extracellular deamination of L-amino acids by *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Planta* 182, 194-8.

- [51] Drechsel H, Thieken A, Reissbrodt R, Jung G and Winkelmann G (1993) Alpha-keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases, *J Bacteriol* 175, 2727-33.
- [52] Suhr SM and Kim DS (1996) Identification of the snake venom substance that induces apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 224, 134-9.
- [53] Ahn MY, Lee BM and Kim YS (1997) Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*), *Int J Biochem Cell Biol* 29, 911-9.
- [54] Ali SA, Stoeva S, Abbasi A, Alam JM, Kayed R, Faigle M, Neumeister B and Voelter W (2000) Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom, *Arch Biochem Biophys* 384, 216-26.
- [55] Sakurai Y, Takatsuka H, Yoshioka A, Matsui T, Suzuki M, Titani K and Fujimura Y (2001) Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom, *Toxicon* 39, 1827-33.
- [56] Takatsuka H et al. (2001) Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation, *Biochim Biophys Acta* 1544, 267-77.
- [57] Murakawa M, Jung SK, Iijima K and Yonehara S (2001) Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms, *Cell Death Differ* 8, 298-307.
- [58] Hanson RL, Bembenek KS, Patel RN and Szarka LJ (1992) Transformation of N-epsilon-CBZ-L-lysine to CBZ-L-oxylsine using L-amino acid oxidase from *Providencia alcalifaciens* and L-2-hydroxy-isocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*, *Appl Microbiol Biotechnol* 37, 599-603.
- [59] Lee YC and Huh MH (1998) Development of a biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids, *Journal of Food Biochemistry* 1999, 173-185.
- [60] Liu J and Wang J (1999) Remarkable thermostability of bioelectrodes based on enzymes immobilized within hydrophobic semi-solid matrices, *Biotechnol Appl Biochem* 30, 177-83.
- [61] Setford SJ, White SF and Bolbot JA (2002) Measurement of protein using an electrochemical bi-enzyme sensor, *Biosens Bioelectron* 17, 79-86.
- [62] Sarkar P, Tothill IE, Setford SJ and Turner APF (1999) Screen-printed amperometric biosensors for the rapid measurement of L- and D-amino acids, *The Analyst* 124, 865-70.
- [63] Vallon O and Wollman FA (1997) cDNA sequence of M(alpha), the catalytic subunit of the *Chlamydomonas reinhardtii* L-amino acid oxidase (Accession No. U78797). A new sequence motif shared by a wide variety of flavoproteins (PGR 97-171)., *Plant Physiol* 115, 1729.
- [64] Niedermann DM and Lerch K (1990) Molecular cloning of the L-amino-acid oxidase gene from *Neurospora crassa*, *J Biol Chem* 265, 17246-51.
- [65] Raibekas AA and Massey V (1998) Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein, *Biochem Biophys Res Commun* 248, 476-8.
- [66] Torii S, Yamane K, Mashima T, Haga N, Yamamoto K, Fox JW, Naito M and Tsuruo T (2000) Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity, *Biochemistry* 39, 3197-205.

- [67] Geyer A, Fitzpatrick TB, Pawelek PD, Kitzing K, Vrieling A, Ghisla S and Macheroux P (2001) Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*, *Eur J Biochem* 268, 4044-53.
- [68] Takahashi E, Ito K and Yoshimoto T (1999) Cloning of L-amino acid deaminase gene from *Proteus vulgaris*, *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 2244-7.
- [69] Krebs HA (1935) Metabolism of amino acids. Deamination of amino acids, *Biochem J* 29, 77-93.
- [70] Konno R, Kurabayashi A, Tsuchiya M and Niwa A (1999) Guinea pig D-amino-acid oxidase cDNA and phylogenetic position, *DNA Seq* 10, 85-91.
- [71] Konno R (1998) Rat D-amino-acid oxidase cDNA: rat D-amino-acid oxidase as an intermediate form between mouse and other mammalian D-amino-acid oxidases, *Biochim Biophys Acta* 1395, 165-70.
- [72] Koibuchi N, Konno R, Matsuzaki S, Ohtake H, Niwa A and Yamaoka S (1995) Localization of D-amino acid oxidase mRNA in the mouse kidney and the effect of testosterone treatment, *Histochem Cell Biol* 104, 349-55.
- [73] Konno R and Yasumura Y (1981) Activity and substrate specificity of D-amino acid oxidase in kidneys of various animals, *Zool Mag (Tokyo)* 90, 368-73.
- [74] Pilone SM, Vanoni A and Casalin P (1987) Purification and properties of D-amino acid oxidase, an inducible flavoenzyme from *Rhodotorula gracilis*, *Biochim Biophys Acta* 914, 136-42.
- [75] Berg CP and Rodden FA (1976) Purification of D-amino oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *Anal Biochem* 71, 214-22.
- [76] Gabler M, Hensel M and Fischer L (2000) Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases, *Enzyme Microbial Technol* 27, 605-11.
- [77] Isogai T, Ono H, Ishitani Y, Kojo H, Ueda Y and Kohsaka M (1990) Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*, *J Biochem (Tokyo)* 108, 1063-9.
- [78] Fukunaga S, Yuno S, Takahashi M, Taguchi S, Kera Y, Odani S and Yamada R (1998) Purification and properties of D-glutamate oxidase from *Candida boidinii* 2201, *J Ferment Bioengineer* 85, 579-83.
- [79] Wakayama M, Nakashima S, Sakai K and Moriguchi M (1994) Isolation, enzyme production and characterization of D-aspartate oxidase from *Fusarium sacchari* var. *elongatum* Y-105, *J Ferment Bioengineer* 5, 377-9.
- [80] Friedman M (1999) Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids, *J Agric Food Chem* 47, 3757-79.
- [81] Konno R and Yasumura Y (1992) D-amino-acid oxidase and its physiological function, *Int J Biochem* 24, 519-24.
- [82] D'Aniello A, D'Onofrio G, Pischetola M, D'Aniello G, Vetere A, Petrucelli L and Fisher GH (1993) Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids, *J Biol Chem* 268, 26941-9.
- [83] Wolosker H, Blackshaw S and Snyder SH (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13409-14.

- [84] Nagata Y (1992) Involvement of D-amino acid oxidase in elimination of D-serine in mouse brain, *Experientia* 48, 753-5.
- [85] Snyder SH and Kim PM (2000) D-Amino acids as putative neurotransmitters: focus on D-serine, 2000 25, 553-60.
- [86] Pilone SM, Verga R, Fretta A and Hanozet GH (1989) Induction of D-amino acid oxidase by D-alanine in *Rhodotorula gracilis* grown in defined medium, *J Gen Microbiol* 135, 593-600.
- [87] Perotti ME, Pollegioni L and Pilone MS (1991) Expression of D-amino acid oxidase in *Rhodotorula gracilis* under induction conditions: a biochemical and cytochemical study, *Eur J Cell Biol* 55, 104-13.
- [88] Hörner R, Wagner F and Fischer L (1996) Induction of the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *Appl Environ Microbiol* 62, 2106-10.
- [89] Gabler M and Fischer L (1999) Production of a new D-amino acid oxidase from the fungus *Fusarium oxysporum*, *Appl Environ Microbiol* 65, 3750-3.
- [90] Mujawar SK and Shewale JG (1997) Production of D-amino acid oxidase by *Aspergillus* sp. strain O20 active on cephalosporin, *Can J Microbiol* 43, 292-5.
- [91] Justiz OH, Fernandez-Lafuente R and Guisan JM (1997) One-pot chemoenzymatic synthesis of 3'-functionalized cephalosporines (cefazolin) by three consecutive biotransformations in fully aqueous medium, *J Org Chem* 62, 9099-106.
- [92] Diez B, Mellado E, Rodriguez M, Fouces R and Barredo JL (1996) Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics, *Biotechnol Bioeng* 55, 216-26.
- [93] Hanson RL et al. (1999) Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine, *Bioorg Med Chem* 7, 2247-52.
- [94] Patel RN (2001) Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug, *Biomol Eng* 17, 167-82.
- [95] Beard TM and Turner NJ (2002) Deracemization and stereoinversion of alpha-amino acids using D-amino acid oxidase and hydride reducing agents, *Chem Commun*, 246-7.
- [96] Fernandez-Lafuente R, Rodriguez V, Mateo C, Fernandez-Lorente G, Arminsen P, Sabuquillo P and Guisan JM (1999) Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization of and post-immobilization techniques, *J Mol Catal B: Enzymatic* 7, 173-9.
- [97] Golini P, Bianchi D, Battistel E, Cesti P and Tassinari R (1995) Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeasts: characterization and application in the deamination of cephalosporin C, *Enzyme Microbial Technol* 17, 324-329.
- [98] Buto S, Pollegioni L, D'Angiuro L and Pilone MS (1994) Evaluation of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of alpha-keto acids: a reactor system, *Biotechnol Bioeng* 44, 1288-1294.
- [99] Fernandez-Lafuente R, Rodriguez V and Guisan JM (1998) The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into alpha-keto acids (phenylpyruvic acid), *Enzyme Microbial Technol* 23, 28-33.

- [100] Brodelius P, Nilsson K and Mosbach K (1981) Production of alpha-keto acids Part I. Immobilized cells of *Trigonopsis variabilis* containing D-amino acid oxidase, *Appl Biochem Biotechnol* 6, 293-308.
- [101] Upadhyaya R, Nagajyothi H and Bhat SG (1999) D-Amino acid oxidase and catalase of detergent permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its potential use for the synthesis of alpha-keto acids, *Process Biochem* 35, 7-13.
- [102] Varadi M, Adanyi N, Szabo EE and Trummer N (1999) Determination of the ratio of D- and L-amino acids in brewing by an immobilised amino acid oxidase enzyme reactor coupled to amperometric detection, *Biosens Bioelectron* 14, 335-40.
- [103] Ciccarelli E, Massaer M, Guillaume JP, Herzog A, Loriau R, Cravador A, Jacobs P and Bollen A (1989) Porcine D-amino acid oxidase: production of the biologically active enzyme in *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun* 161, 865-72.
- [104] Lin LL, Chien HR, Wang WC, Hwang TS, Fu HM and Hsu WH (2000) Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants, *Enzyme Microb Technol* 27, 482-91.
- [105] Gonzalez FJ, Montes J, Martin F, Lopez MC, Ferminam E, Catalan J, Galan MA and Dominuez A (1997) Molecular cloning of *TvDAO1*, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, *Yeast* 13, 1399-408.
- [106] Alonso J, Barredo JL, Armisen P, Diez B, Salto F, Guisan JM, Garcia JL and Cortes E (1999) Engineering the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* to facilitate its overproduction in *Escherichia coli* and its downstream processing by tailor-made metal chelate supports, *Enzyme Microb Technol* 25, 88-95.
- [107] Molla G, Vegezzi C, Pilone MS and Pollegioni L (1998) Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Protein Expr Purif* 14, 289-94.
- [108] Faninato S, Pollegioni L and S.M. P (2001) Engineering, expression and purification of a His-tagged chimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *Enzyme Microb Technol* 29, 407-12.
- [109] Ju SS, Lin LL, Chien HR and Hsu WH (2000) Substitution of the critical methionine residues in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide, *FEMS Microbiol Lett* 186, 215-9.
- [110] Lin LL, Wang WC, Ju SS, Chien HR and Hsu WH (1999) The role of a conserved histidine residue, His324, in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase, *FEMS Microbiol Lett* 176, 443-8.
- [111] Pollegioni L, Harris CM, Molla G, Pilone MS and Ghisla S (2001) Identification and role of ionizing functional groups at the active center of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *FEBS Lett* 507, 323-6.
- [112] Harris CM, Molla G, Pilone MS and Pollegioni L (1999) Studies on the reaction mechanism of *Rhodotorula gracilis* D-amino-acid oxidase. Role Of the highly conserved tyr-223 on substrate binding and catalysis, *J Biol Chem* 274, 36233-40.
- [113] Pistorius EK and Voss H (1980) Some properties of a basic L-amino-acid oxidase from *Anacystis nidulans*, *Biochim Biophys Acta* 611, 227-40.

- [114] Li ZY, Yu TF and Lian EC (1994) Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation, *Toxicon* 32, 1349-58.
- [115] Pilone MS (2000) D-Amino acid oxidase: new findings, *Cell Mol Life Sci* 57, 1732-47.
- [116] Vallon O (2000) New sequence motifs in flavoproteins: Evidence for common ancestry and tools to predict structure, *Proteins* 38, 95-114.
- [117] Mizutani H, Miyahara I, Hirotsu K, Nishina Y, Shiga K, Setoyama C and Miura R (1996) Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution, *J Biochem (Tokyo)* 120, 14-7.
- [118] Mattevi A, Vanoni MA, Todone F, Rizzi M, Teplyakov A, Coda A, Bolognesi M and Curti B (1996) Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7496-501.
- [119] Umhau S, Pollegioni L, Molla G, Diederichs K, Welte W, Pilone MS and Ghisla S (2000) The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12463-8.
- [120] Miura R, Setoyama C, Nishina Y, Shiga K, Mizutani H, Miyahara I and Hirotsu K (1997) Structural and mechanistic studies on D-amino acid oxidase x substrate complex: implications of the crystal structure of enzyme x substrate analog complex, *J Biochem (Tokyo)* 122, 825-33.
- [121] Mattevi A, Vanoni MA and Curti B (1997) Structure of D-amino acid oxidase: new insights from an old enzyme, *Curr Opin Struct Biol* 7, 804-10.
- [122] Ghisla S and Massey V (1989) Mechanism of flavoprotein-catalyzed reactions, *Eur J Biochem* 181, 1-17.
- [123] Anderlei T and Büchs J (2001) Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks, *Biochem Eng J* 7, 157-62.
- [124] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-54.
- [125] Casalin P, Pollegioni L, Curti B and Pilone Simonetta M (1991) A study on apoenzyme from *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Eur J Biochem* 197, 513-7.
- [126] Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-5.
- [127] Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-9.
- [128] Blum H, Beier H and Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8, 93-9.
- [129] Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166.
- [130] Claiborne A and Fridovich I (1979) Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase. 1. Spectral properties of the products of dianisidine oxidation, *Biochemistry* 18, 2324-9.

- [131] March J (1992) in: *Advanced Organic Chemistry*, pp. 273-86 (Sons, J.W., Ed.) Wiley-Interscience, New York.
- [132] Westermeier R (1990), pp. 236 VCH Verlags GmbH, Weinheim.
- [133] Bockholt R, Masepohl B, Kruft V, Wittmann-Liebold B and Pistorius EK (1995) Partial amino acid sequence of an L-amino acid oxidase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301, cloning and DNA sequence analysis of the *aoxA* gene, *Biochim Biophys Acta* 1264, 289-93.
- [134] Guex N and Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling, *Electrophoresis* 18, 2714-23.
- [135] Peitsch MC (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling, *Biochem Soc Trans* 24, 247-9.
- [136] Peitsch MC (1995) Protein modelling by E-mail, *Bio/Technology* 13, 658-60.
- [137] Stumpp T, Wilms B and Altenbuchner J (1999) Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*, *Biospektrum* 1.00, 33-6.
- [138] LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF and McCoy JM (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm, *Bio/Technology* (N Y) 11, 187-93.
- [139] Stewart EJ, Aslund R and Beckwith J (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for thioredoxins, *EMBO J.* 17, 5543-50.
- [140] Takano E, White J, Thompson CJ and Bibb MJ (1995) Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp., *Gene* 166, 133-7.
- [141] Doumith M et al. (2000) Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*, *Mol Gen Genet* 264, 477-85.
- [142] Margolin AL and Navia MA (2001) Protein Crystals as Novel Catalytic Materials, *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 2204-22.
- [143] St Clair N, Wang YF and Margolin AL (2000) Cofactor-Bound Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of Alcohol Dehydrogenase, *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 380-3.
- [144] Lee TS, Turner MK and Lye GJ (2002) Mechanical stability of immobilized biocatalysts (CLECs) in dilute agitated suspensions, *Biotechnol Prog* 18, 43-50.
- [145] Lee TS, Vaghjani JD, Lye GJ and Turner MK (2000) A systematic approach to the large-scale production of protein crystals, *Enzyme Microbial Technol* 26, 582-92.
- [146] Collins MC, Maslin C and Davies RJ (1998) Scale-Up of a Chiral Resolution Using Cross-Linked Enzyme Crystals, *Organic Process Research & Development* 2, 400-6.
- [147] Ansorge MB and Kula MR (2000) Investigating expression systems for the stable large-scale production of recombinant L-leucine-dehydrogenase from *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 668-73.
- [148] Qingshan L, Lijun W and Yourong L (1996) Color development with rational screening method for improved L-glutamate oxidase-producing strains, *Enzyme Microbial Technol* 18, 7-9.
- [149] Metelitzka DI, Eryomin AN, Artzukevich IM and Chernikevich IP (1997) Comparative kinetic characterization of catalases from *Candida boidinii* yeast and bovine liver, *Biochemistry (Mosc)* 62, 377-85.

- [150] Nies D and Schlegel HG (1982) Catalase from *Comamonas compransoris*, J Gen Appl Microbiol 28, 311-9.
- [151] Chaga GS, Medin AS, Chaga SG and Porath JO (1992) Isolation and characterization of catalase from *Penicillium chrysogenum*, J Chromatogr 604, 177-83.
- [152] Kedderis GL and Hollenberg PF (1983) Characterization of the N-demethylation reactions catalyzed by horseradish peroxidase, J Biol Chem 258, 8129-38.
- [153] Lebedeva OV, Ugarova NN and Berezin IV (1977) [Kinetic study of o-dianisidine oxidation by hydrogen peroxide in the presence of horseradish peroxidase], Biokhimiia 42, 1372-9.
- [154] Edens WA, Goins TQ, Dooley D and Henson JM (1999) Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, Appl Environ Microbiol 65, 3071-4.
- [155] Alexandre G and Zhulin IB (2000) Laccases are widespread in bacteria, Trends Biotechnol 18, 41-2.
- [156] Hatakka A (1998) Lignin-modifying enzymes from select white-rot fungi: production and role in lignin degradation, FEMS Microbiol Rev 13, 125-35.
- [157] Sakamoto M and Komagata K (1996) Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria, J Ferment Bioeng 82, 210-6.
- [158] Tempone AG, Andrade HF, Jr., Spencer PJ, Lourenco CO, Rogero JR and Nascimento N (2001) *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase, Biochem Biophys Res Commun 280, 620-4.
- [159] Sakamoto M, Uchimura T and Komagata K (1996) Comparison of H₂O-forming NADH oxidase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541^T and H₂O₂-forming NADH oxidase from *Sporolactobacillus inulinus* NRIC 1133^T, J Ferment Bioeng 82, 531-7.
- [160] Zhou BP, Wu B, Kwan SW and Abell CW (1998) Characterization of a highly conserved FAD-binding site in human monoamine oxidase B, J Biol Chem 273, 14862-8.
- [161] Fraaije MW, van Den Heuvel RH, van Berkel WJ and Mattevi A (2000) Structural analysis of flavinylation in vanillyl-alcohol oxidase, J Biol Chem 275, 38654-8.
- [162] Wu X, Takahashi M, Chen SG and Monnier VM (2000) Cloning of amadoriase I isoenzyme from *Aspergillus* sp.: evidence of FAD covalently linked to Cys342, Biochemistry 39, 1515-21.
- [163] Motteran L, Pilone MS, Molla G, Ghisla S and Pollegioni L (2001) Cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum*, J Biol Chem 276, 18024-30.
- [164] Brearley GM, Price CP, Atkinson T and Hammond PM (1994) Purification and partial characterisation of a broad-range L-amino acid oxidase from *Bacillus carotarum* 2Pfa isolated from soil, Appl Microbiol Biotechnol 41, 670-76.
- [165] Arakawa T and Timasheff SN (1985) The stabilization of proteins by osmolytes, Biophys J 47, 411-4.
- [166] Cooper AJ and Meister A (1985) Enzymatic oxidation of L-homocysteine, Arch Biochem Biophys 239, 556-66.
- [167] MacHeroux P, Seth O, Bollschweiler C, Schwarz M, Kurfurst M, Au LC and Ghisla S (2001) L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma* Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme, Eur J Biochem 268, 1679-86.

- [168] Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?, *Mol Microbiol* 22, 393-404.
- [169] Wu LF, Ize B, Chanal A, Quentin Y and Fichant G (2000) Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism, *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 179-89.
- [170] Robinson C (2000) The twin-arginine translocation system: a novel means of transporting folded proteins in chloroplasts and bacteria, *Biol Chem* 381, 89-93.
- [171] Halbig D, Wiegert T, Blaudeck N, Freudl R and Sprenger GA (1999) The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding, *Eur J Biochem* 263, 543-51.
- [172] Blaudeck N, Sprenger GA, Freudl R and Wiegert T (2001) Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation, *J Bacteriol* 183, 604-10.
- [173] Cristobal S, de Gier JW, Nielsen H and von Heijne G (1999) Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*, *EMBO J* 18, 2982-90.
- [174] Sargent F, Gohlke U, De Leeuw E, Stanley NR, Palmer T, Saibil HR and Berks BC (2001) Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure., *Eur J Biochem* 268, 3361-7.
- [175] Schaerlaekens K, Schierova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J and Van Mellaert L (2001) Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*, *J Bacteriol* 183, 6727-32.
- [176] Atrat PG, Wagner B and Schumann G (1992) Localization of the cholesterol oxidase in *Rhodococcus erythropolis* IMET 7185 studied by immunoelectron microscopy, *J Steroid Biochem Molec Biol* 42, 193-200.
- [177] Sojo M, Bru R, Lopez-Molina D, Garcia-Carmona F and Argüelles JC (1997) Cell-linked and extracellular cholesterol-oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis*. Isolation and physiological characterization, *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 583-9.
- [178] Vallon O, Bulte L, Kuras R, Olive J and Wollman FA (1993) Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur J Biochem* 215, 351-60.
- [179] Prinz WA, Aslund F, Holmgren A and Beckwith J (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *J Biol Chem* 272, 15661-7.
- [180] Skarnes RC (1970) L-amino-acid oxidase, a bactericidal system, *Nature* 225, 1072-3.
- [181] Thomas JG, Ayling A and Baneyx F (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold, *Appl Biochem Biotechnol* 66, 197-238.
- [182] Waters S and Neujahr HY (1994) A fermentor culture for production of recombinant phenol hydroxylase, *Protein Expr Purif* 5, 534-40.
- [183] Ishizuka H, Horinouchi S and Beppu T (1993) Putrescine oxidase of *Micrococcus rubens*: primary structure and *Escherichia coli*, *J Gen Microbiol* 139, 425-32.

- [184] Connaris H, Chaudhuri JB, Danson MJ and Hough DW (1999) Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng* 64, 38-45.
- [185] Smith TJ, Lloyd JS, Gallagher SC, Fosdike WL, Murrell JC and Dalton H (1999) Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* B-276, *Eur J Biochem* 260, 446-52.
- [186] Pilone MS and Pollegioni L (2002) D-Amino acid oxidase as an industrial biocatalyst, *Biocatalysis and Biotransformation* 20, 145-59.
- [187] Shenoy B, Wang Y, Shan W and Margolin AL (2001) Stability of crystalline proteins, *Biotechnol Bioeng* 73, 358-69.
- [188] Visuri K, Pastinen O, Wu X, Makinen K and Leisola M (1999) Stability of native and cross-linked crystalline glucose isomerase, *Biotechnol Bioeng* 64, 377-80.
- [189] Baust-Timpson M and Seuffer-Wasserthal P (1998) CLECs: robust and efficient biocatalysts for fine chemicals and pharmaceutical manufacturing, *Specialty Chemicals* 18, 248-51.
- [190] Brown KC, Yang SH and Kodadek T (1995) Highly specific oxidative crosslinking of proteins mediated by a nickel-peptide complex., *Biochemistry* 1995, 4733-39.
- [191] Wong SS and Wong LJ (1992) Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes, *Enzyme Microbial Technol* 14, 866-74.
- [192] Pilone MS, Pollegioni L, Casalin P, Curti B and Ronchi S (1989) Properties of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *Eur J Biochem* 180, 199-204.
- [193] Swzajcer E and Mosbach K (1985) Isolation and partial characterization of a D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from the yeast *Trigonopsis variabilis*, *Biotechnol Lett* 7, 1-7.
- [194] Curti B, Ronchi S, Branzoli U, Ferri G and Williams CH (1973) Improved purification, amino acid analysis and molecular weight of homogenous D-amino acid oxidase from pig kidney, *Biochim Biophys Acta* 327, 266-73.

VIII Anhang

1 Wachstumskurven

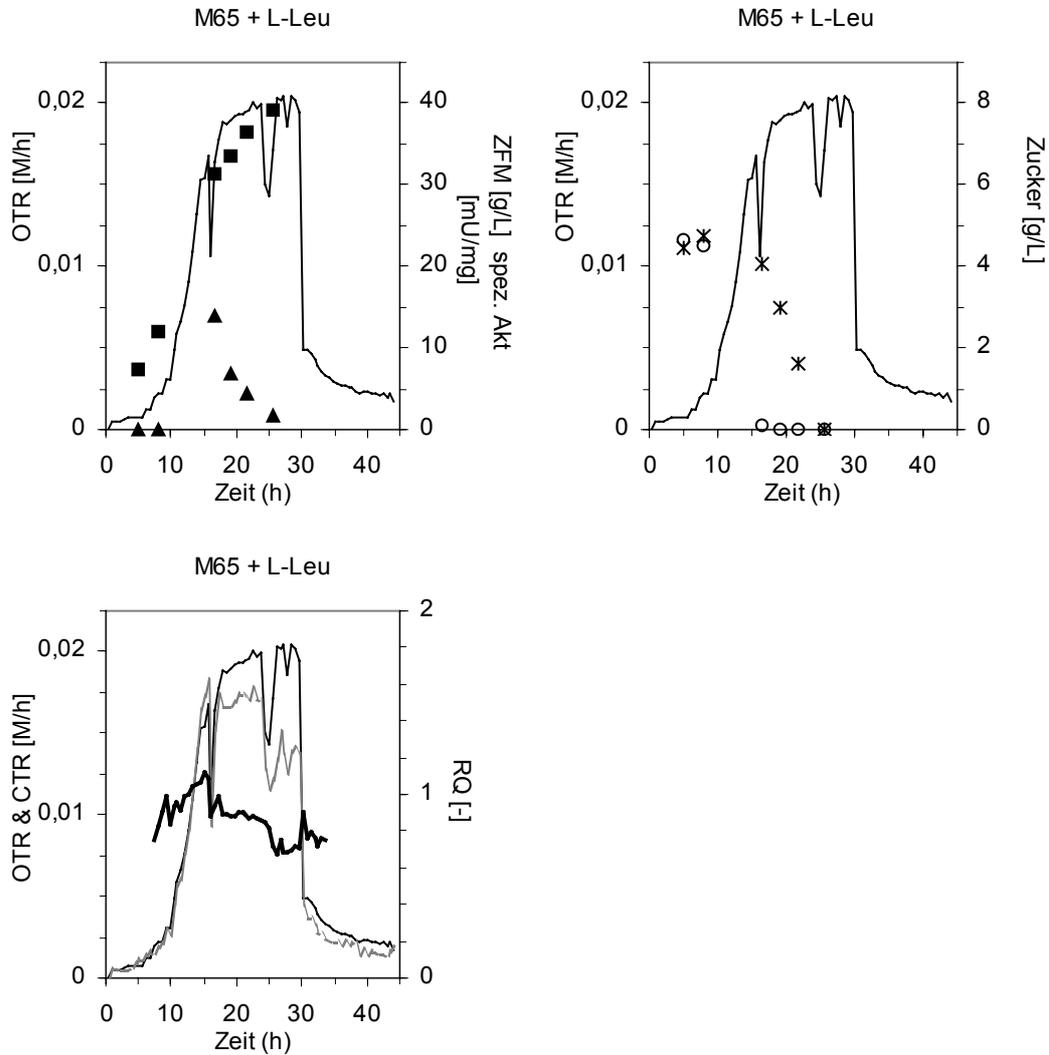


Abb. 72: Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in M65 + L-Leu: OTR-Verlauf (-), ZFM (■), spez. L-AAO-Aktivität (▲), Glucose- (O) und Maltosekonzentration (*), CTR-Verlauf (—), RQ (—) in Abhängigkeit von der Zeit.

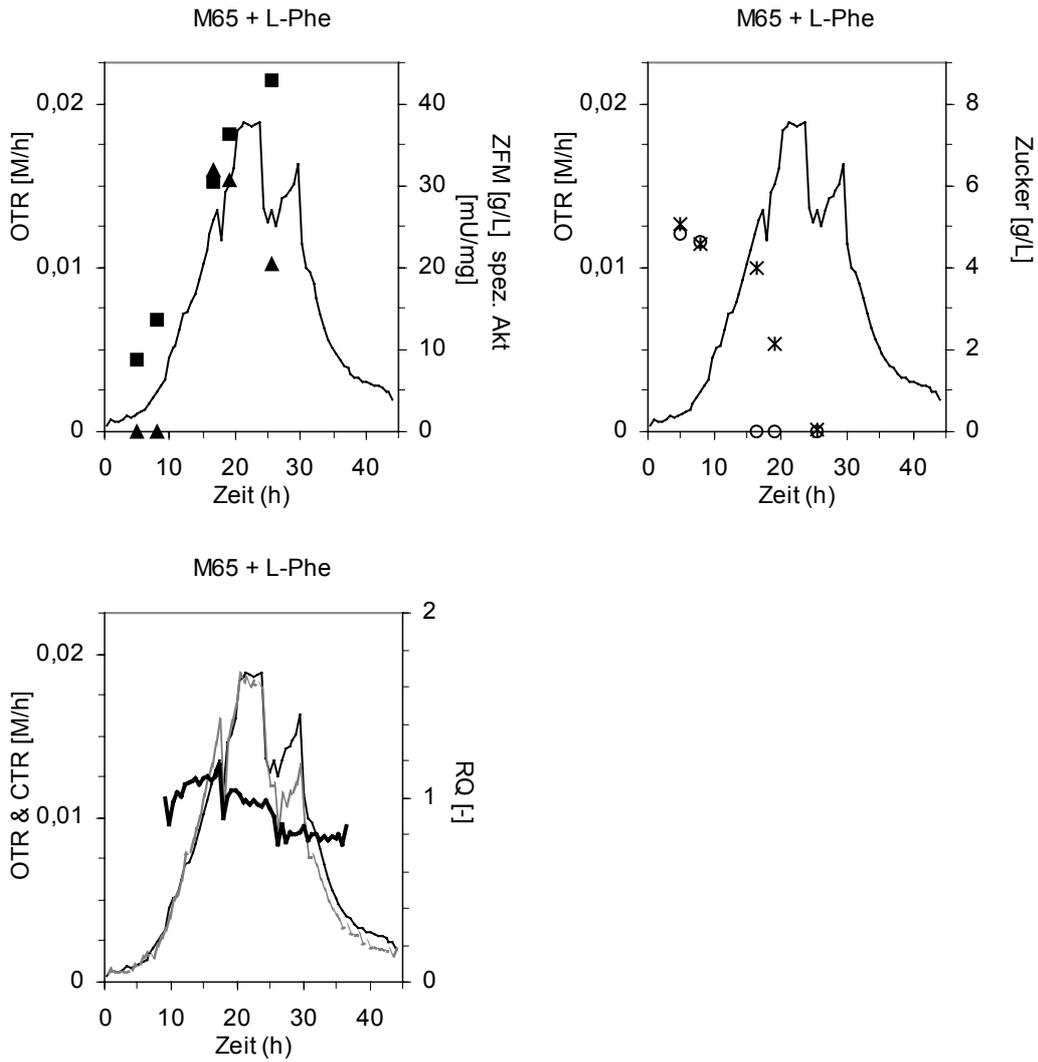


Abb. 73: Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in M65 + L-Phe: OTR-Verlauf (-), ZFM (■), spez. L-AAO-Aktivität (▲), Glucose- (○) und Maltosekonzentration (*), CTR-Verlauf (---), RQ (—) in Abhängigkeit von der Zeit.

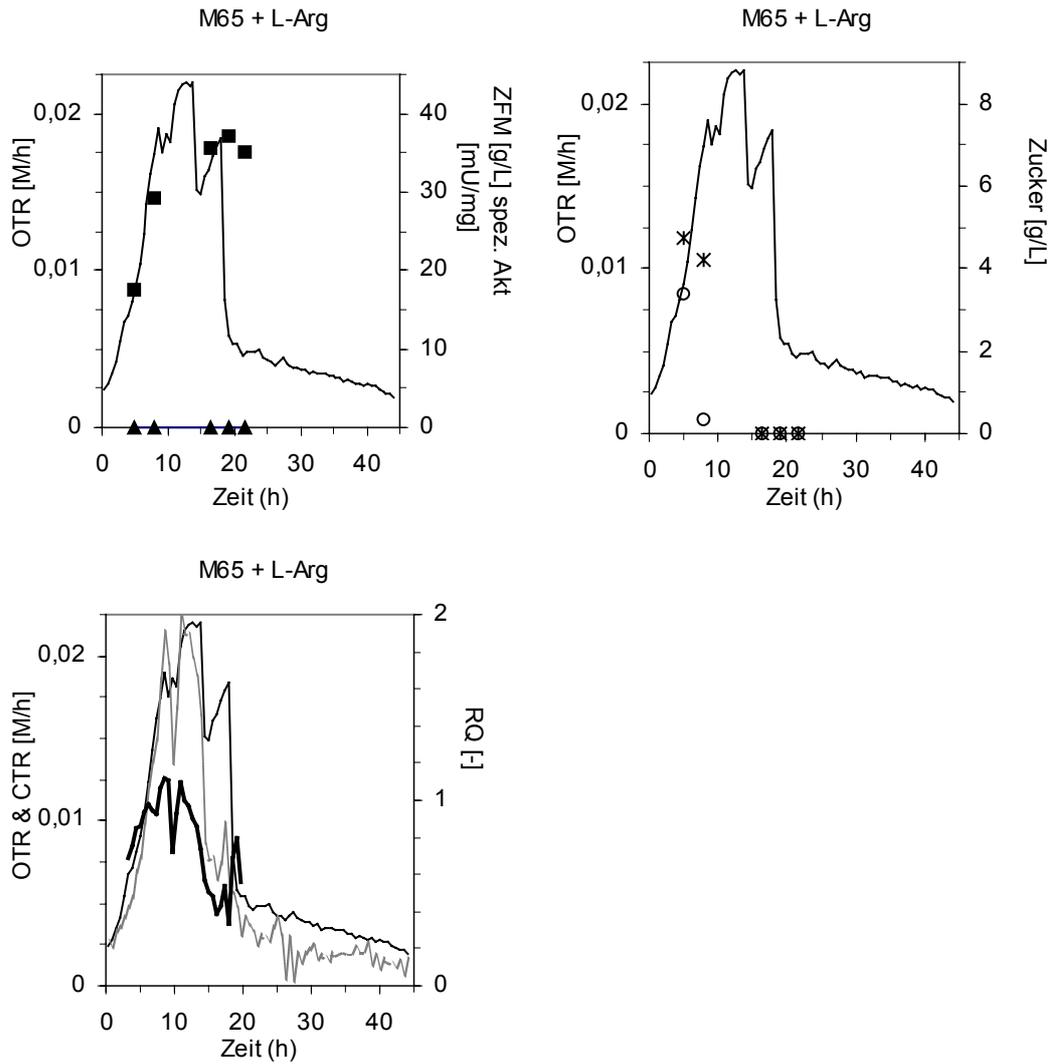


Abb. 74: Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in M65 + L-Arg: OTR-Verlauf (-), ZFM (■), spez. L-AAO-Aktivität (▲), Glucose- (○) und Maltosekonzentration (*), CTR-Verlauf (---), RQ (—) in Abhängigkeit von der Zeit.

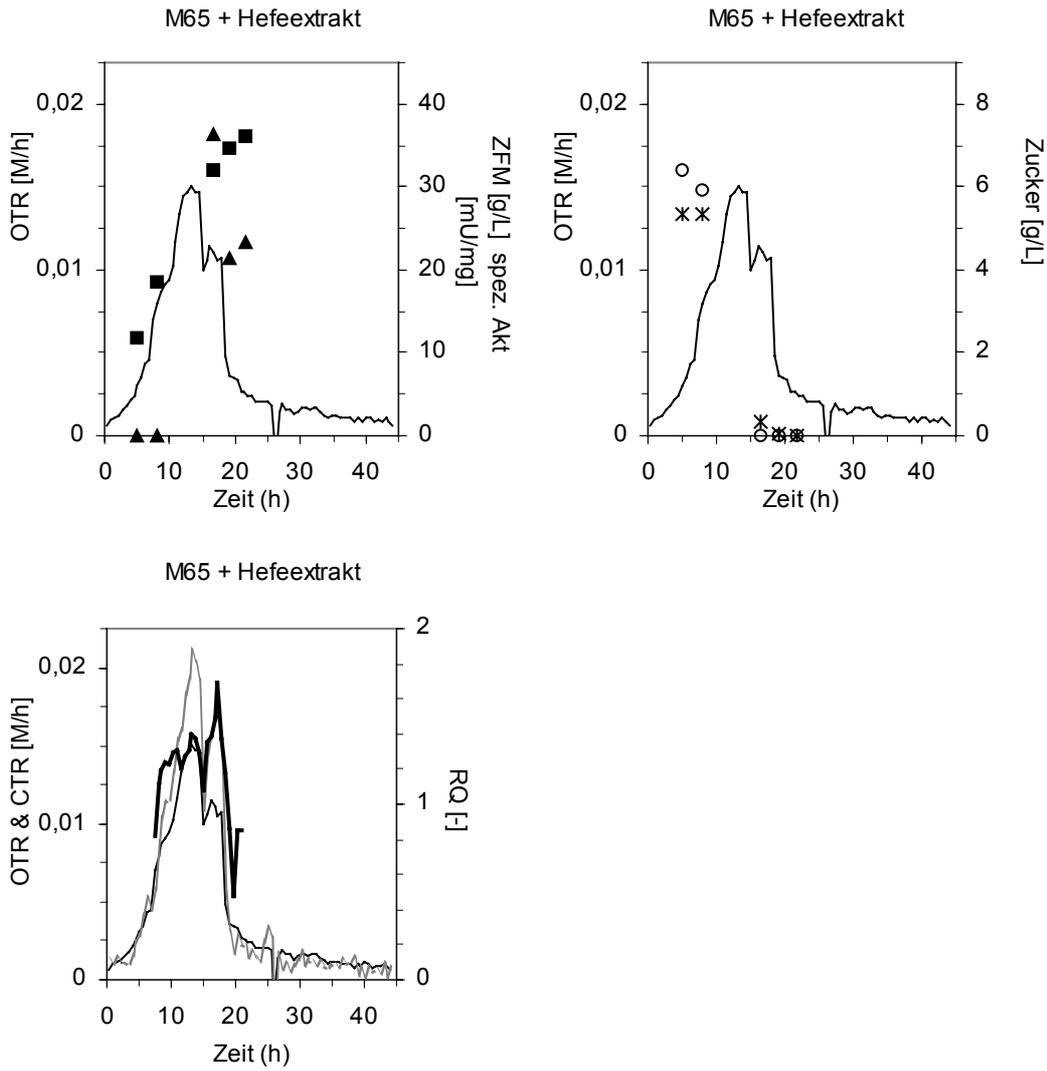


Abb. 75: Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in M65 + Hefeextrakt: OTR-Verlauf (-), ZFM (■), spez. L-AAO-Aktivität (▲), Glucose- (O) und Maltosekonzentration (*), CTR-Verlauf (—), RQ (—) in Abhängigkeit von der Zeit.

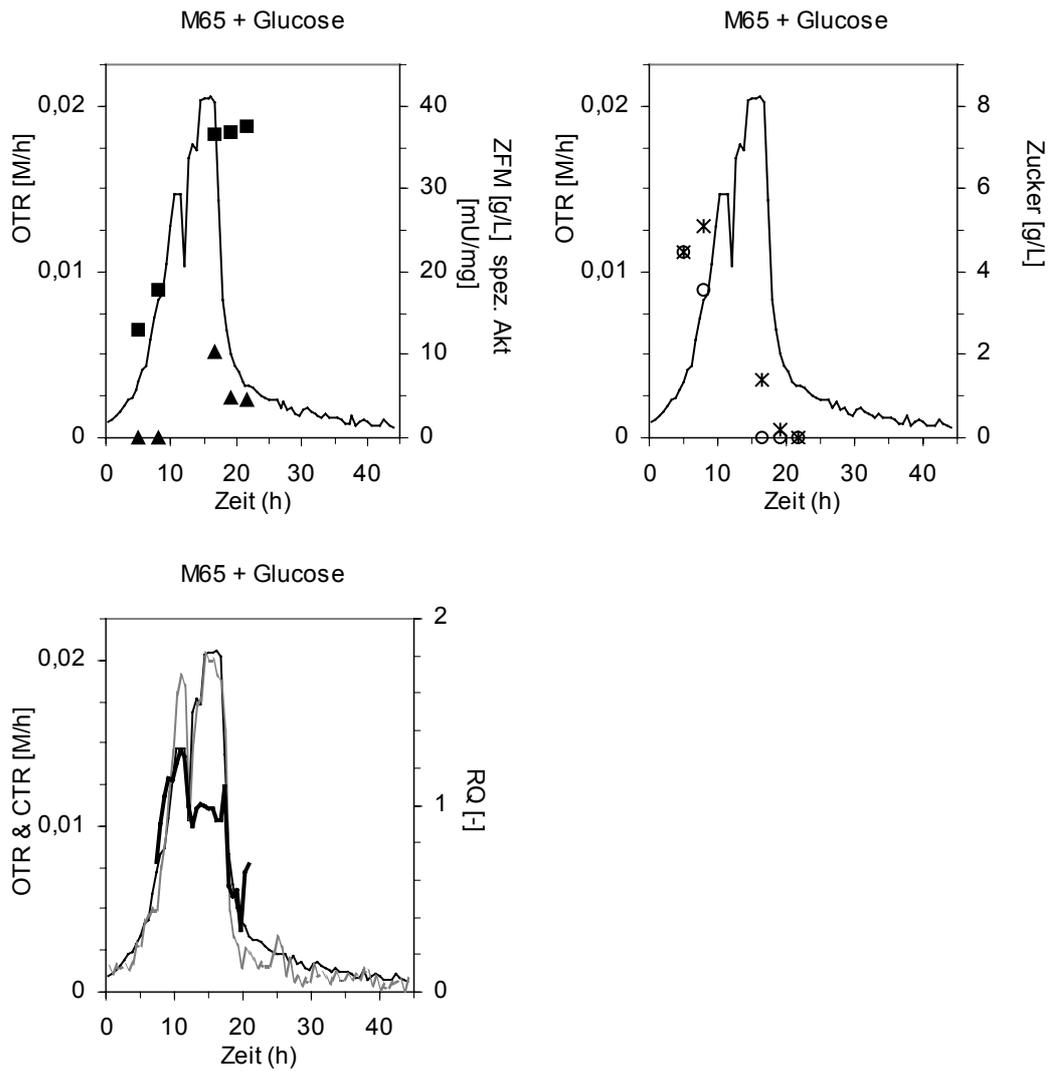


Abb. 76: Kultivierung von *Rhodococcus opacus* in M65 + Glucose: OTR-Verlauf (-), ZFM (■), spez. L-AAO-Aktivität (▲), Glucose- (O) und Maltosekonzentration (*), CTR-Verlauf (---), RQ (—) in Abhängigkeit von der Zeit.

2 Primer

2.1 *laao*-Sonde

P1for 5' ATG GCC GGC GAC CTC ATC GGC AAG GTC AAG GGC TCG CAC 3'
P2rev 5' CTT GGC GAG GCG CTG GCG GTG GGT GAG CGA CTC TAA GGC 3'
P3rev 5' CTT GTC GAC CGG CTC GAG GAG 3'
P4rev 5' CCA CCA GCG GCG CGA GTA CTC GAT GCC GAG 3'

2.2 Klonierungsprimers

2.2.1 Für *E. coli*-Vektoren

EcoRI+ssfor 5' GCG CGA ATT CAT GGC ATT CAC ACG TAG ATC TTT CA 3'
EcoRI-ssfor 5' GCG CGA ATT CAT GGC CGG CGA CCT GAT CGG C 3'
NdeI+ssfor 5' GCG CCA TAT GGC ATT CAC ACG TAG ATC TTT CA 3'
NdeI-ssfor 5' GCG CCA TAT GGC CGG CGA CCT GAT CGG C 3'
NcoI+ssfor 5' GCG CCC ATG GCA TT C ACA CGT AGA TCT TT CA 3'
HindIIIrev 5' GCG CAA GCT TTC AGG CTT CCT GG CCA CG 3'

2.2.2 Für *Streptomyces*-Vektoren

NdeI+ssfor 5' GCG CCA TAT GGC ATT CAC ACG TAG ATC TTT CA 3'
HindIII+ssRBSfor
5' GCG CAA GCT TAG GAG CGC GAA ATG GCA TTC ACA CGT 3'
HindIIIrev 5' GCG CAA GCT TTC AGG CTT CCT GGG CCA CG 3'
EcoRIrev 5' GCG CGA ATT CTC AGG CTT CCT GGG CCA CG 3'

3 Codon Usage

Tabelle 17: Codon usage von *Rhodococcus opacus*, 28 codierende Sequenzen (8395 Codons)

Codon – Häufigkeit pro Tausend Triplets – Absolute Häufigkeit – Aminosäure

TTT 3,6 (30) F	TCT 2,4 (20) S	TAT 3,5 (29) Y	TGT 3,0 (25) C
TTC 27,2 (228) F	TCC 13,9 (117) S	TAC 17,3 (145) Y	TGC 10,2 (86) C
TTA 1,5 (13) L	TCA 3,3 (28) S	TAA 0,7 (6) *	TGA 2,4 (20) *
TTG 9,6 (81) L	TCG 19,3 (162) S	TAG 0,2 (2) *	TGG 13,6 (114) W
CTT 6,3 (53) L	CCT 4,1 (34) P	CAT 6,2 (52) H	CGT 8,1 (68) R
CTC 35,9 (301) L	CCC 18,7 (157) P	CAC 19,8 (166) H	CGC 29,8 (250) R
CTA 3,2 (27) L	CCA 3,8 (32) P	CAA 6,0 (50) Q	CGA 8,8 (74) R
CTG 35,9 (301) L	CCG 26,8 (225) P	CAG 22,8 (191) Q	CGG 17,4 (146) R
ATT 6,9 (58) I	ACT 6,2 (52) T	AAT 7,0 (59) N	AGT 4,2 (35) S
ATC 40,9 (343) I	ACC 31,9 (268) T	AAC 17,4 (146) N	AGC 13,5 (113) S
ATA 2,3 (19) I	ACA 5,6 (47) T	AAA 6,1 (51) K	AGA 2,0 (17) R
ATG 18,7 (157) M	ACG 17,0 (143) T	AAG 20,3 (170) K	AGG 3,7 (31) R
GTT 8,1 (68) V	GCT 8,7 (73) A	GAT 17,6 (148) D	GGT 18,0 (151) G
GTC 40,7 (342) V	GCC 50,1 (421) A	GAC 44,3 (372) D	GGC 39,0 (327) G
GTA 4,8 (40) V	GCA 15,2 (128) A	GAA 25,0 (210) E	GGA 14,5 (122) G
GTG 31,6 (265) V	GCG 41,6 (349) A	GAG 38,4 (322) E	GGG 13,7 (115) G

[http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Rhodococcus+opacus+\[gbtct\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Rhodococcus+opacus+[gbtct])

Stand: Mai 2000

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn PD Dr. Werner Hummel für die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft, viele konstruktive Anregungen und die immer freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Roland Freudl und Herrn Prof. Dr. Hanns Weiss für die freundliche Übernahme der Korreferate.

Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula für die Möglichkeit, an ihrem Institut unter hervorragenden Bedingungen diese Arbeit durchführen zu können.

Frau Dipl.-Ing. Stefanie Kattenbach und Frau. Dipl.-Chem. Andrea Weckbecker für die sehr gute thematische Zusammenarbeit und den Spaß darüber hinaus.

Frau Bea Paschold und Frau Truc Pham für die technische Unterstützung und die schöne Zusammenarbeit im Labor 212.

Frau Dipl.-Ing. Birgit Henßen für die Durchführung der Proteinsequenzierung und Herrn Dipl.-Ing. Holger Gieren für die Unterstützung bei den Fermentationen.

Frau Dr. Bettina Bommarius, Herrn Dr. Stefan Verseck und Herrn Prof. Dr. Andreas Bommarius für die hilfreiche Diskussionen und das stete Interesse.

Frau Dipl.-Chem. Annette Faust, Herrn Dr. Karsten Niefind, Frau Sabine Lohmar und Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für die gute Zusammenarbeit bei der Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der L-AAO.

Herrn Dr. Tibor Anderlei für die Möglichkeit, die neuentwickelte RAMOS-Anlage zu nutzen und für die Hilfestellung dabei.

Meinen Eltern und meinem Mann Wolfram für das unerschütterliche Vertrauen, das sie mir stets entgegenbringen.