

**Screening und Charakterisierung neuer  
Aminosäure-Amidasen zur Racematspaltung  
Klonierung und Expression einer D-Amidase  
aus *Variovorax paradoxus* in *E. coli***

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von  
Lutz Krieg  
aus Stuttgart

Jülich, 2002

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

Referentin: Frau Prof. Dr. M.-R. Kula

Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Juli 2001 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula durchgeführt.

Die Arbeit wurde durch die Degussa AG unterstützt und in weiten Teilen von der Hermann-Schlosser-Stiftung finanziell gefördert.



In Liebe und Dankbarkeit,  
meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

## I. Einleitung

<b>1. Enzyme – Biokatalysatoren für chemische Synthesen</b> .....	<b>1</b>
1.1. Screening-Verfahren nach Enzymen .....	2
<b>2. Aminosäuren</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Tertiär-Leucin (Tle)</b> .....	<b>5</b>
3.1. Synthesen von tertiär-Leucin.....	7
<b>4. Amidasen</b> .....	<b>9</b>
4.1. Gruppe der aliphatischen Amidasen .....	10
4.2. Die "Amidase Signature"-Familie .....	10
4.3. Nitrilhydratasen .....	13
4.4. Amidasen zur Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren.....	15
4.4.1. Enzyme mit D-spezifischer Aminosäureamid-Aktivität.....	16
<b>5. Motivation und Zielsetzung</b> .....	<b>17</b>

## II. Ergebnisse und Diskussion

<b>1. Screening mit DL-tert-Leucinamid</b> .....	<b>20</b>
1.1. Anreicherungsverfahren .....	20
1.1.1. Auswahl eines geeigneten Stammes als Enzymquelle.....	22
1.1.2. Stämme mit einer D-Amidase-Aktivität .....	22
1.1.3. Stämme mit einer L-Amidase-Aktivität.....	23
1.2. Zusammenfassende Diskussion des Screening-Verfahrens .....	26
<b>2. D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i></b> .....	<b>30</b>
2.1. Zellkultivierungen von <i>Variovorax paradoxus</i> .....	30
2.1.1. Wachstum und Enzymaktivität im Minimalmedium M-2.....	30
2.1.2. Wachstum und Enzymaktivität in den DSMZ-Medien-Nr 1 und 81 .....	31
2.1.3. Optimierung des Wachstums von <i>Variovorax paradoxus</i> .....	32
2.1.4. Fermentation von <i>Variovorax paradoxus</i> im Minimalmedium M-2.....	33
2.1.5. Zusammenfassende Diskussion der Zellkultivierungen von <i>Variovorax paradoxus</i> .....	34

2.2. Reinigung der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> .....	35
2.2.1. Grundlage für eine Reinigungsstrategie .....	35
2.2.2. Anionenaustausch-Chromatographie .....	36
2.2.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	38
2.2.4. Gelfiltration .....	41
2.2.5. Aufkonzentrierung der D-Amidase durch Ultrafiltration.....	41
2.2.6. Zusammenfassung und Diskussion der Reinigung.....	42
2.3. Biochemische Charakterisierung der D-Amidase.....	44
2.3.1. Aktivierung und Inhibierung der D-Amidase .....	44
2.3.2. Substratspektrum .....	46
2.3.3. Bestimmung der $K_M$ -Werte für DL-Tle-NH <sub>2</sub> , D-Leu-NH <sub>2</sub> und D-Phe-NH <sub>2</sub> .....	50
2.3.4. Bestimmung der Enantioselektivität für ausgewählte Substrate und Berechnung der E-Werte .....	51
2.3.5. Bestimmung des Temperaturoptimums und der Aktivierungsenergie ...	55
2.3.6. Bestimmung des pH-Optimums.....	56
2.3.7. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz .....	57
2.3.8. Zusammenfassung der biochemischen Charakterisierung.....	58
2.3.9. Vergleichende Charakterisierung mit bekannten D-Amidasen und D-Aminopeptidasen .....	60
2.4. Klonierung und Expression der D-Amidase.....	63
2.4.1. Sequenzvergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz.....	63
2.4.2. Präparation genomischer DNA.....	65
2.4.3. Amplifizierung und Identifizierung eines Fragments des D-Amidase-Gens .....	65
2.4.4. Identifizierung der Gesamtsequenz mittels Universal- GenomeWalker™-System.....	66
2.4.5. Klonierung des D-Amidase-Gens .....	70
2.4.6. Gen- und Aminosäuresequenz der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> .....	72
2.4.7. Expression des D-Amidase-Gens in <i>E. coli</i> JM101 .....	74
2.4.8. Fermentation der rekombinanten D-Amidase in <i>E. coli</i> JM101.....	76
2.4.9. Zusammenfassende Diskussion der Klonierung, Sequenzhomologie und Expression der D-Amidase .....	79
2.4.9.1. Identifizierung und Klonierung des D-Amidase-Gens .....	79
2.4.9.2. Sequenzvergleich der D-Amidase .....	80
2.4.9.3. Analyse der vorliegenden DNA-Sequenz in <i>Variovorax paradoxus</i> ...	85
2.4.9.4. Expression der D-Amidase .....	86

<b>3. L-Amidase aus <i>Rhizobium huautlense</i></b> .....	<b>88</b>
3.1. Optimierung des Enzymtests für die Aktivitätsbestimmung.....	88
3.1.1. Abschätzung des $K_M$ -Wertes für DL-Tle-NH <sub>2</sub> .....	90
3.2. Wachstum und Enzymaktivität in Minimalmedium M-2 und DSMZ-Medium 1 .....	91
3.3. Reinigung der L-Amidase aus <i>Rhizobium huautlense</i> .....	91
3.3.1. Hitzefällung als 1. Reinigungsschritt.....	91
3.3.2. Anionenaustausch-Chromatographie .....	92
3.3.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	94
3.3.4. Zusammenfassung der Reinigung der L-Amidase .....	97
3.4. Biochemische Charakterisierung der L-Amidase .....	98
3.4.1. Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der L-Amidase .....	98
3.4.2. Substratspektrum der L-Amidase .....	100
3.4.3. Bestimmung der Enantioselektivität für ausgewählte Substrate und Berechnung der E-Werte .....	101
3.4.4. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz .....	102
3.5. Zusammenfassende Diskussion der L-Amidase .....	104

## **III. Zusammenfassung..... 106**

## **IV. Ausblick ..... 109**

## **V. Material und Methoden**

<b>1. Material</b> .....	<b>111</b>
1.1. Verwendete Geräte .....	111
1.2. Chemikalien .....	112
1.3. Verwendete Mikroorganismen.....	112
1.4. Verwendete Vektoren.....	112
<b>2. Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>113</b>
2.1. Nährmedien.....	113
2.2. Screening mit Anreicherungskulturen .....	115
2.3. Kulturführung.....	115
2.3.1. Plattenkulturen .....	115
2.3.2. Schüttelkolbenkulturen .....	115
2.3.3. Fermentationen .....	115
2.4. Konservierung und Stammhaltung .....	116

<b>3. Biochemische Methoden .....</b>	<b>116</b>
3.1. Gewinnung von Rohextrakten .....	116
3.1.1. Zellaufschluss im analytischen Maßstab .....	117
3.1.2. Aufschluss für Volumina bis 20 ml .....	117
3.1.3. Aufschluss für Volumina bis 200 ml .....	117
3.2. Chromatographische Methoden .....	117
3.2.1. Anionenaustausch-Chromatographie .....	118
3.2.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	118
3.2.3. Gelfiltration .....	119
3.2.4. Entsalzung, Konzentrierung und Lagerung von Enzymlösungen .....	121
3.2.5. Reinigung der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> .....	122
3.2.6. Reinigung der L-Amidase aus <i>Rhizobium huautlense</i> .....	123
3.3. Analytische Methoden .....	124
3.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford .....	124
3.3.2. Bestimmung der Amidase-Aktivität .....	124
3.3.3. Bestimmung der Ammonium-Konzentration mittels der Glutamat-Dehydrogenase (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Assay) .....	126
3.3.4. Nachweis von D- und L- <i>tert</i> -Leucin mittels chiraler Dünnschichtchromatographie (ChiralPlate) .....	128
3.3.5. OPA/IBC-Derivatisierung zur Bestimmung von D- und L-Aminosäuren mittels HPLC .....	129
3.3.6. Bestimmung des Enantiomerenüberschusses und der Enantioselektivität anhand des E-Wertes .....	132
3.3.7. Bestimmung der Aktivierungsenergie .....	133
3.3.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	134
3.3.9. Färbungen von Proteinen nach einer PAGE .....	135
3.3.10. Elektrophoretische Auftrennung nach Khyse-Andersen [1984] .....	137
3.3.11. Bestimmung der N-terminalen-Aminosäuresequenz .....	137
<b>4. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>138</b>
4.1. Präparation von genomischer DNA aus <i>Variovorax paradoxus</i> .....	138
4.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	138
4.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAquick Gel Extraction Kit [Qiagen] .....	139
4.4. Herstellung von synthetischen Oligonukleotiden und Berechnung der Schmelztemperatur .....	139
4.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	139
4.6. Universal-GenomeWalker™-System [Clontech] .....	142
4.7. Ligationen .....	145
4.8. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	145
4.9. Transformation von <i>E. coli</i> .....	145
4.10. Expression rekombinanter Gene .....	146
4.11. Präparation von Plasmid-DNA .....	146
4.12. DNA-Restriktion .....	147

<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>148</b>
<b>VII.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>160</b>
<b>VIII.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>162</b>
<b>IX.</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>164</b>
<b>X.</b>	<b>Anhang</b>	
1.	Verwendete Primer.....	166
2.	Codon Usage in <i>Variovorax paradoxus</i> .....	167
3.	HPLC-Gradientenprogramme für Ala, Gln und His .....	168



# I. Einleitung

## 1. Enzyme – Biokatalysatoren für chemische Synthesen

Eine bedeutende Entwicklung ist die Nutzung von Enzymen als Biokatalysatoren für organische Synthesen, die in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie zahlreich verwendet werden, aber auch zur Produktion von Feinchemikalien in der chemischen Industrie zunehmend eingesetzt werden. Beispiele sind die Verwendung der Glucose Isomerase zur Herstellung von Fructose oder die Penicillin Amidase zur Synthese semisynthetischer Penicilline. Die auch als Biotransformationen bezeichneten Synthesen werden durch zelluläre Enzyme mittels ganzer Mikroorganismen oder isolierter Enzyme katalysiert (Schmid et al., 2001).

Enzyme sind höchst effektive Katalysatoren, die Reaktionen um den Faktor  $10^7$  bis  $10^{14}$  beschleunigen können und unterscheiden sich von den herkömmlichen chemischen Katalysatoren durch:

- hohe Aktivität unter milden Reaktionsbedingungen wie atmosphärischem Druck, Temperaturen zwischen 20°C und 40°C sowie neutralen pH-Werten
- hohe Substratspezifität
- hohe Chemoselektivität – keine Nebenreaktionen
- hohe Regio- und Stereoselektivität, insbesondere Enantioselektivität

Meist können sie neben ihren natürlichen Substraten auch strukturverwandte Substanzen umsetzen, ohne dabei an Regio- oder Enantioselektivität zu verlieren, eine Eigenschaft, die sie für ein breites Spektrum synthetischer Reaktionen nutzbar macht (Yamada und Shimizu, 1988). Die geringe Löslichkeit mancher Substrate in wässriger Lösung, sowie die Instabilität gegenüber Änderung des Reaktionsmilieus, wie Temperatur und pH-Wert, und die mögliche Inhibierung durch Substrate und Produkte erweisen sich oft als Nachteil (Faber, 1997).

Die Klassifizierung und Nomenklatur der Enzyme erfolgt anhand der "Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry", die auf einer vierstelligen Enzymnummer (E.C.) basiert (Tab. 1). Von den sechs Enzymklassen sind die Hydrolasen mit Abstand am besten untersucht und am häufigsten für Biotransformationen eingesetzt. Sie benötigen keine Coenzyme, sind einfach zu handhaben und besitzen in vielen Fällen ein breites Substratspektrum und eine hohe Stabilität. Vor allem Lipasen, Esterasen und Proteasen sind durch ihre Stereoselektivität zu etablierten Werkzeugen in der organischen Synthese geworden, sowohl was ihren Einsatz im Labor als auch im industriellen Maßstab betrifft (Drauz und Waldmann, 1995).

Tab. 1: Klassifizierung der Enzyme (Faber, 1997)

Enzymklasse	Anzahl		Reaktionstyp	Verwendung
	klassifiziert	erhältlich		
<b>1. Oxidoreduktasen</b>	650	90	<b>Oxidation-Reduktion:</b> Oxidation von Alkoholen, von C-H- und C-C-Bindungen, Reduktion von Carbonylverbindungen	25%
<b>2. Transferasen</b>	720	90	<b>Übertragung funkt. Gruppen:</b> Carboxyl-, Acyl-, Glykosyl-, Phosphatyl-, Methyl-Gruppen	~ 5%
<b>3. Hydrolasen</b>	636	125	<b>Hydrolyse:</b> Spaltung und Bildung von Estern, Amiden, Epoxiden, Nitrilen, Glykosiden, Anhydriden	65%
<b>4. Lyasen</b>	255	35	<b>Addition-Eliminierung</b> an C-C-, C-N-, C-O-Mehrfachbindungen	~ 5%
<b>5. Isomerasen</b>	120	6	<b>Isomerisierung:</b> Racemisierung, Epimerisierung	~ 1%
<b>6. Ligasen</b>	80	5	<b>Bildung und Spaltung</b> von C-O-, C-S-, C-N-, C-C-Bindungen unter Energieverbrauch	~ 1%

## 1.1. Screening-Verfahren nach Enzymen

Die Suche eines für eine bestimmte Reaktion benötigten Enzyms erfolgt in der Regel durch ein Screening nach Mikroorganismen oder die Untersuchung kommerziell erhältlicher, in ihrer Aktivität verwandter Enzyme. Während die Zahl der verfügbaren Enzyme meist klein und begrenzt ist, ergibt sich aus der Vielfalt und Variabilität der Mikroorganismen eine überragende Enzymquelle (Ogawa und Shimizu, 1999). So wurde gezeigt, dass ein Gramm Erde bis zu  $10^9$  mikrobielle Zellen enthalten kann, von denen schätzungsweise 99,99% nicht charakterisiert sind (Asano, 1998).

Eine klassische Methode unter Ausnutzung der biologischen Vielfalt von Mikroorganismen (microbial diversity) ist das Anreicherungsverfahren. So wurde bereits 1901 von dem niederländischen Mikrobiologen M. Beijerinck aus einer Bodenprobe mit einem Kulturmedium, das Mineralsalze und Mannitol aber keine verwertbare Stickstoffquelle enthielt, unter aeroben Bedingungen das luftstickstofffixierende Bakterium *Azotobacter* isoliert (Madigan et al., 2000). Unter Verwendung selektiver Kulturbedingungen können aus Proben natürlicher Standorte, wie Böden, Schlämme und Gewässer, zahllose Organismen angereichert und isoliert werden. Dieses Verfahren wird bis heute für viele Enzymreaktionen zur Isolierung von geeigneten

Mikroorganismen angewendet. Hierzu wird meist das Substrat oder eine verwandte Substanz als Stickstoff- oder Kohlenstoff-Quelle in einem selektivem Kulturmedium zur Anreicherung eingesetzt.

Im Unterschied dazu wird das "Anpassungsverfahren" (acclimation culture technique) mit unnatürlichen oder toxischen Substraten über meist lange Inkubationszeiten zur Isolierung von Mikroorganismen genutzt, die nicht durch Anreicherung zugänglich sind. Durch die Adaptation an das Substrat werden in den Organismen genetische Veränderungen angenommen. Mit beiden Verfahren ließen sich eine Vielzahl von Mikroorganismen mit interessanten Enzymen isolieren, unter anderem die nitrilabbauenden Enzyme, Nitrilasen, Nitrilhydratasen und Amidasen (Asano, 1998; Ogawa und Shimizu, 1997; 1999).

**Tab. 2: Auswahl isolierter Enzyme durch Anreicherungs- und Anpassungsverfahren**

Enzym	Literatur	Enzym	Literatur
Nitrilase	[13, 76, 135]	Decarbamoylase	[92]
Nitrilhydratase	[4, 39, 76]	Dioxygenase	[83]
L-Carnitin-Amidase	[58]	Lactonase	[61]
D-Amidase	[7]	Phenylalanin Dehydrogenase	[6, 55]
D-Aminopeptidase	[8]	Coffein Demethylase	[10]
Hydantoinase	[84, 92]	Maleat Isomerase	[62]

Mit den neuen Techniken der Molekularbiologie haben sich verschiedene Screening-Verfahren auf DNA-Ebene etabliert. Zum Beispiel können anhand von Homologien in ähnlichen Enzymen oder Enzymfamilien spezifische DNA-Sonden erhalten werden, mit denen Mikroorganismen auf die gesuchten Gene untersucht werden. So gelang es in einem genetischem Screening von Actinomyceten-Stämmen mittels PCR und Southern Blot Hybridisierung eine seltene N-Acyl-Aminosäure Racemase aus *Amycolatopsis orientalis* zu isolieren (Verseck et al., 2001).

Ebenso lässt sich in neuerer Zeit aus Proben natürlicher Standorte die DNA isolieren und die direkte Klonierung und Expression der Gene realisieren. Eine führende Firma auf diesem Gebiet ist Diversa (San Diego, USA). Durch das Anlegen von sogenannten DNA-Bibliotheken ist ein bemerkenswerter Zugang der mikrobiellen Vielfalt möglich, insbesondere Mikroorganismen, die sich auf herkömmliche Weise nicht kultivieren lassen (Short, 1997).

Im weitesten Sinne können auch die Screening-Verfahren zu den verschiedenen Methoden der gerichteten Evolution als eine Suche nach einem neuen Enzym betrachtet werden. Insgesamt sind diese Methoden jedoch als Optimierungsverfahren anzusehen, die von einem vorhandenen Biokatalysator ausgehen (Zhao und Arnold, 1997; Arnold, 2001; Powell et al., 2001).

## 2. Aminosäuren

Aminosäuren sind die Grundbausteine aller Proteine und Peptide und sind für die Regulation des Stoffwechsels von großer Bedeutung. Von den über 300 bekannten Aminosäuren werden 20 verschiedene für die Proteinsynthese genutzt, die als proteinogene Aminosäuren bezeichnet werden. Außer Glycin enthalten alle Aminosäuren mindestens ein stereogenes Zentrum und kommen in zwei enantiomeren Formen (D- und L-) vor. Mit Ausnahme der im Sekundärstoffwechsel und in der Zellwand zahlreicher Mikroorganismen auftretenden D-Aminosäuren sind die in der Natur vorkommenden Aminosäuren überwiegend in der L-Form.

Die Aminosäuren und ihre Derivate sind in ganz verschiedenen Anwendungsbereichen wie Humanernährung, Tierernährung, Pharmazie, Kosmetik und Agrochemie von Interesse. Dabei werden sie z. B. als Geschmacksverstärker, Süßstoff, Futtermittelzusatz und als Baustein in Pharmazeutika und Pestiziden eingesetzt. Ausgewählte Aminosäuren, bei denen es sich häufig um nicht proteinogene oder unnatürliche Vertreter sterisch anspruchsvoller Strukturen handelt, werden insbesondere in der Synthese pharmakologischer Wirkstoffe genutzt (Kottenhahn und Drauz, 1994).

In einem klassischen Verfahren können die proteinogenen Aminosäuren durch Extraktion aus Proteinhydrolysaten gewonnen werden. Andererseits haben sich zur Herstellung einiger proteinogener Aminosäuren, wie Glutaminsäure, Lysin, Phenylalanin, Threonin und Tryptophan fermentative Verfahren mittels Mikroorganismen etabliert, von denen besonders *Corynebacterium glutamicum* hervorzuheben ist (Fotheringham, 2000; Graaf et al., 2001).

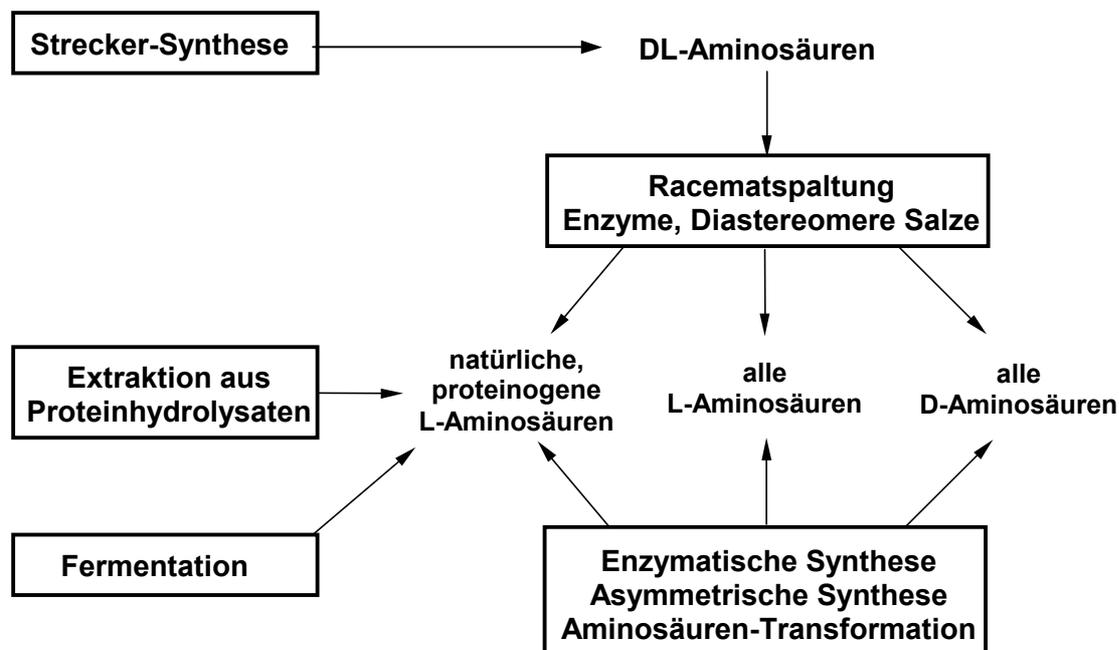


Abb. 1: Mögliche Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren (Kottenhahn und Drauz, 1994)

Nicht proteinogene und ebenso nicht natürliche Aminosäuren können chemisch z. B. durch Strecker-Synthese hergestellt werden, wobei jedoch das Racemat erhalten wird. Neuere asymmetrische Synthesen sind mit Ausnahme der L-Dopa-Synthese bisher nur bedingt für technische Anwendungen geeignet (Yet, 2001). Demgegenüber werden bereits zahlreiche Enzymreaktionen zur Produktion enantiomerenreiner Aminosäuren eingesetzt (Yamada und Shimizu, 1988).

Ein bemerkenswertes Beispiel für eine nicht proteinogene Aminosäure ist tertiär-Leucin, das im folgenden Kapitel näher beschrieben wird und Grundlage für die vorliegende Arbeit ist.

### 3. Tertiär-Leucin (Tle)

Tertiär-Leucin (Tle; 2-Amino-3,3-dimethyl-butansäure) ist eine seltene, nicht proteinogene  $\alpha$ -Aminosäure. Sie zeichnet sich durch ihren anspruchsvollen tertiär-Butylrest am stereogenen Zentrum aus und ist isomer zu den Aminosäuren Leucin und Isoleucin (Abb. 2).

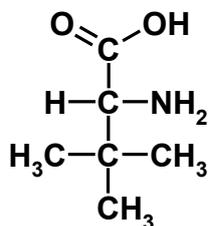


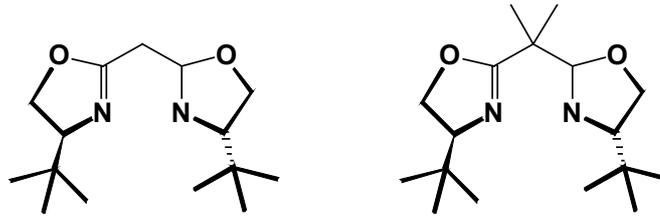
Abb. 2: Tertiär-Leucin (Tle)

Aufgrund dessen ist Tle als chirales Auxiliar in einer Reihe von Synthesen, als Bestandteil pharmakologischer Wirkstoffe (Bommarius et al., 1995) sowie bei der Charakterisierung von Proteinstrukturen (Cornish et al., 1995) nützlich.

#### Anwendungen von Tle

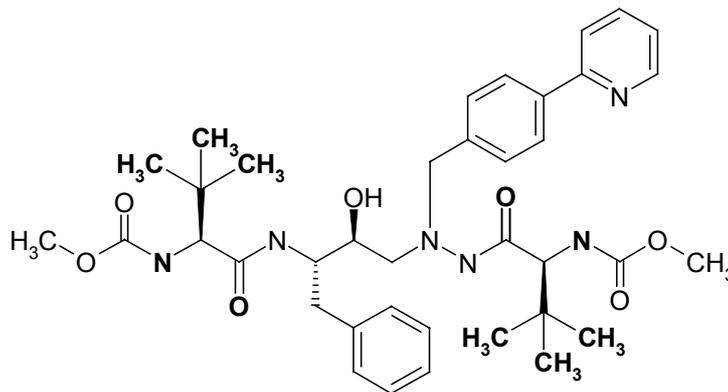
Die Bislactimether-Methode zur asymmetrischen Synthese von D- und L-Aminosäuren ist ein Beispiel, in dem L-Tle stöchiometrisch als chirales Auxiliar eingesetzt wurde (Schöllkopf und Neubauer, 1982; Duthaler, 1994).

Weiterhin ist Tle besonders in der reduzierten Form als tertiär-Leucinol (2-Amino-3,3-dimethyl-1-butanol) in der asymmetrischen Synthese von Bedeutung. Dieser Aminoalkohol ist aus Tle mit gängigen Reduktionsmitteln verfügbar (Bommarius et al., 1995) und z. B. ein wichtiger chiraler Baustein verschiedener Bis(Oxazolin)-Liganden, die in einer Reihe von metallkatalysierten enantioselektiven Reaktionen eingesetzt werden (Abb. 3; Johnson und Evans, 2000; Pfaltz, 1999; Ager et al., 1996).



**Abb. 3: L-tertiär-Leucinol als Baustein in Bis(Oxazolin)-Liganden (Johnson und Evans, 2000; Pfaltz, 1999; Ager et al., 1996)**

Als Bestandteil zahlreicher potenzieller pharmakologischer Wirkstoffe zur Bekämpfung von HIV-Infektionen, Arteriosklerose, Bindegewebserkrankungen und Krebs ist Tle von Bedeutung (Bommarius et al., 1995). Als Beispiel sei der in Abbildung 4 dargestellte HIV-Protease-Inhibitor von Bristol-Myers Squibb genannt, der sich in der klinischen Erprobungsphase befindet (Rabasseda et al., 1999).



**Abb. 4: L-Tle als Baustein in einem HIV-Protease-Inhibitor (Rabasseda et al., 1999)**

### Vorkommen von Tle

Das natürliche Vorkommen von Tle beschränkt sich, soweit bisher bekannt, auf einige antimikrobiell wirkende Substanzen mariner Schwämme (Fusetani und Matsunaga, 1993) sowie das Peptidantibiotikum Bottromycin A, das dem Bodenbakterium *Streptomyces bottropensis* entstammt (Schipper, 1983). Eine extraktive Gewinnung von Tle aus natürlichen Ressourcen ist daher nicht möglich; gleiches gilt für die fermentative Herstellung mittels Mikroorganismen.

### 3.1. Synthesen von tertiär-Leucin

Bereits im Jahre 1914 wurde die erste Synthese ausgehend von Pinakolon zu racemischem Tle beschrieben (Knoop und Landmann, 1914). Grundsätzlich kann Tle auch durch eine Vielzahl der zur Verfügung stehenden Aminosäuresynthesen, wie z. B. der Strecker-Methode, dargestellt werden.

Ein Beispiel einer neueren katalytisch-asymmetrischen Strecker-Reaktion für D-Tle wurde von Sigman und Mitarbeitern entwickelt (Sigman et al., 2000). Ausgehend von einem Aldimin führt die enantioselektive Synthese mit Cyanwasserstoff und einem immobilisierten polyfunktionellen Salicylaldimin als Katalysator zum  $\alpha$ -Aminonitril. Da die N-Benzyl-Aminonitrile für die weitere Hydrolyse zu instabil waren, wurden die Produkte anschließend in die Formamide überführt.

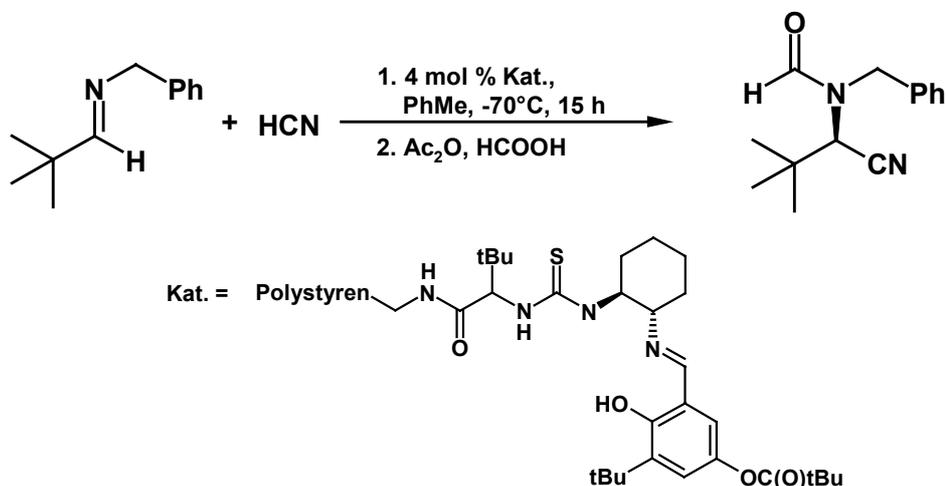


Abb. 5: Katalytisch-asymmetrische Strecker-Reaktion für D-Tle (Sigman et al., 2000)

Nach Hydrolyse und entschützen der Aminofunktion in zwei weiteren Reaktionsschritten wurde im Labormaßstab enantiomerenreines D-Tle (> 99% ee) mit einer Ausbeute von 84% erhalten. Inwieweit diese neue asymmetrische Strecker-Reaktion für einen industriellen Maßstab geeignet ist, wird unter anderem von der Verfügbarkeit des Katalysators und der Überführung der substituierten  $\alpha$ -Aminonitrile in die freien Aminosäuren abhängen (Yet, 2001).

Demgegenüber werden bereits verschiedene enzymatische Verfahren zur industriellen Produktion enantiomerenreiner Aminosäuren eingesetzt (Bommarius et al., 2001). So wird auch L-Tle durch ein chemoenzymatisches Verfahren von der Degussa AG hergestellt. Dieses nutzt das Enzym Leucin-Dehydrogenase zur reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat mit Ammoniumionen zu L-Tle. Die Regenerierung des Cofaktors erfolgt in einem kontinuierlichen Prozess mittels der Formiat-Dehydrogenase, wobei aus Formiat Kohlendioxid entsteht (Abb. 6; Wichmann et al., 1981).

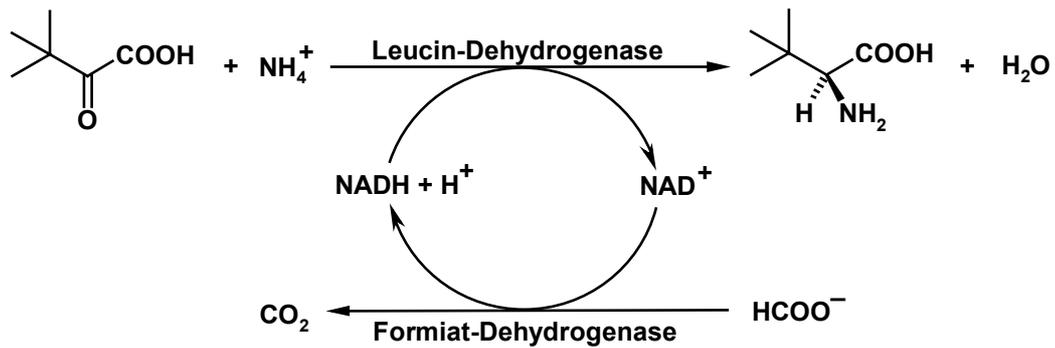


Abb. 6: Dehydrogenase-Verfahren zur Synthese von L-Tle (Wichmann et al., 1981)

Dieses Verfahren kann auch für weitere sterisch anspruchsvolle Aminosäuren genutzt werden (Krix et al., 1997). Das zugehörige D-Enantiomer ist über diesen Syntheseweg nicht zugänglich, da bislang keine D-spezifische Dehydrogenase charakterisiert werden konnte.

In neuerer Zeit wurde von der Degussa AG eine Synthese entwickelt, mittels derer racemisches (*RS*)-5-*tert*-Butylhydantoin unter Katalyse einer (*R*)-spezifischen Hydantoinase zu *N*-Carbamoyl-(*R*)-*tert*-Leucin hydrolysiert wird. Dieses kann durch Reaktion mit Nitrit oder einer (*R*)-Carbamoylase zu D-Tle umgesetzt werden (Abb. 7; Bommarius et al., 1995).

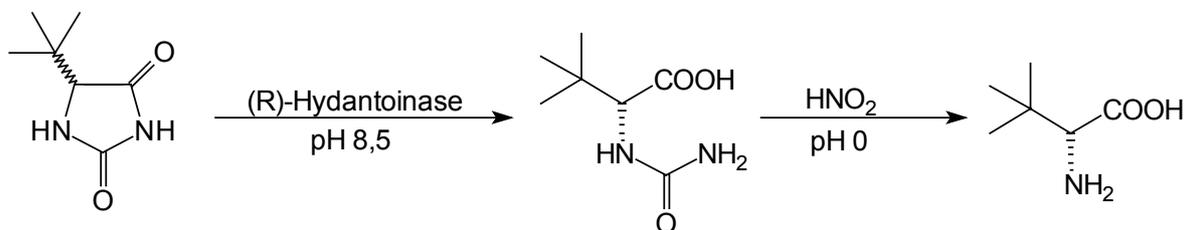


Abb. 7: Hydantoinase-Verfahren zur Synthese von D-Tle (Bommarius et al., 1995)

Da das verwendete Hydantoin unter den enzymatischen Reaktionsbedingungen racemisiert, konnte durch Nitrit-Decarbamoylierung eine Ausbeute von 85,5% erzielt werden. Abhängig vom 5'-Rest des Hydantoins und den Reaktionsbedingungen verläuft jedoch die Racemisierung im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse sehr langsam, sodass meistens eine Hydantoin-Racemase eingesetzt wird (Pietzsch et al., 1992; Wiese et al., 2000). Grundsätzlich kann dieses Verfahren zur Gewinnung von D-Tle eingesetzt werden. Die lange Reaktionsdauer aufgrund der geringen Reaktivität der Hydantoinase mit dem Substrat und der notwendige Einsatz von  $\text{Mn}^{2+}$ -Salzen, der eine Entsorgung erfordert, sind jedoch von Nachteil.

Zur technischen Synthese von enantiomerenreinen Aminosäuren durch eine enzymatische Racematspaltung kommen aus der Gruppe der Hydrolasen bevorzugt Acylasen und Amidasen zum Einsatz.

Von der Firma Hoechst wurde eine Synthese entwickelt, die unter Katalyse der Penicillin G Acylase (E.C. 3.5.1.4) aus *N*-Phenacetyl-(*RS*)-Tle zu *L*-*tert*-Leucin führt (EP 0141223, 1987). Die gängigen Acylasen, wie Aminoacylase I (E.C. 3.5.1.14) aus *Aspergillus oryzae* oder Schweineleiere, setzen jedoch *N*-Acetyl-Tle nur äußerst langsam oder gar nicht um (Bommarius et al., 1995) und lassen ein ungünstiges Gleichgewicht erwarten (Wandrey und Flaschel, 1979).

Amidasen dagegen zeigen eine hohe Enantioselektivität und günstige Reaktionsparameter, die eine nahezu vollständige Umsetzung des Substrats bei einer Racematspaltung ermöglichen (Stelkes-Ritter et al., 1997). Im folgenden Kapitel soll somit diese Enzymklasse sowie ihre Verwendung zur Racematspaltung von Aminosäureamiden vorgestellt werden.

## 4. Amidasen

Amidasen bzw. Amidohydrolasen werden nach dem E.C.-System in zwei Unterklassen, E.C. 3.5.1.1 bis 3.5.1.77 und E.C. 3.5.2.1 bis 3.5.2.14 eingeteilt. Vertreter der ersten Unterklasse sind z. B. die Asparaginase (E.C. 3.5.1.1), Urease (E.C. 3.5.1.5) und die hier näher betrachtete Acylamid Amidohydrolase (E.C. 3.5.1.4), die im folgenden und in der Literatur meist nur als Amidase bezeichnet wird.



Abb. 8: Reaktionsschema der Amidase

Innerhalb der Mikroorganismen ist die Amidase weit verbreitet und kommt unter anderem in den Gattungen von *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus* und *Alcaligenes* vor. Es sind meist induzierbare Enzyme, deren Spezifität von Organismus zu Organismus stark variiert (Martinkova und Kren, 2002; Maestracci et al., 1988).

Ein Vergleich der Amidasen erfolgte früher meist durch Inhibierungsexperimente und eine mögliche Einteilung in Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metall-Amidohydrolasen, wie sie bei Proteasen üblich ist. In neuerer Zeit können diese Enzyme anhand ihrer Aminosäuresequenz in die Gruppe der sogenannten aliphatischen Amidasen oder der "Amidase Signature"-Familie klassifiziert werden (Nastopoulos et al., 2001).

## 4.1. Gruppe der aliphatischen Amidasen

Der Prototyp dieser Gruppe ist die induzierbare aliphatische Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Ambler et al., 1987), sodass sie auch als "*Pseudomonas aeruginosa* Amidase Gruppe" bezeichnet wird. Dieses Enzym hydrolysiert bevorzugt kleine aliphatische Substrate wie Acetamid und Propionamid.

Zu dieser Amidase zeigen mit 80% bzw. 75% Identität die "wide-substrat Amidase" aus *Rhodococcus* sp. R312 (früher: *Brevibacterium* sp. R312; Soubrier et al., 1992) und eine Amidase aus *Helicobacter pylori* (Skouloubris et al., 2001) eine hohe Homologie. Weitere Amidasen dieser Gruppe sind in *Arthrobacter* sp. J-1 (Asano et al., 1982) und in *Methylophilus methylotrophus* (Silman et al., 1991) beschrieben.

Anhand mehrerer konservierter Sequenzmotive werden die aliphatischen Amidasen als eine von sechs Gruppen innerhalb einer Kohlenstoff-Stickstoff-Hydrolase-Familie eingeordnet und eine Verwandtschaft zu Nitrilasen und Cyanid Hydratase beschrieben (Bork und Koonin, 1994). Ein invarianter Cystein-Rest wird in dieser Enzym-Familie als die entscheidende Aminosäure im Aktivitätszentrum vorgeschlagen, die ebenso für den Katalysemechanismus in Nitrilasen verantwortlich ist (Bork und Koonin, 1994; Novo et al., 1995).

Trotz dieser Gemeinsamkeiten werden für die aliphatischen Amidasen aus *Rhodococcus*, *Pseudomonas* und *Arthrobacter* jeweils eine tetramere, hexamere und octamere Struktur beschrieben.

## 4.2. Die "Amidase Signature"-Familie

Diese Enzymfamilie ist ursprünglich durch mehrere konservierte Bereiche in der Aminosäuresequenz verschiedener Amidasen charakterisiert worden; insbesondere einer Glycin-, Serin- und Alanin-reichen Region mit einem hochkonservierten GGSS-Sequenz-Motiv, das als die "Amidase Signature Sequence" bezeichnet wird (Abb. 9; Mayaux et al., 1990; Chebrou et al., 1996b).

Zu den ersten bekannten Mitgliedern dieser Familie gehören eine Reihe von Amidasen, die mit Nitrilhydratase gekoppelt sind, z. B. die enantioselektive Amidase aus *Rhodococcus* sp. R312 (Mayaux et al., 1990), aber auch Indolacetamid Hydrolasen, wie in *Pseudomonas savastanoi* (Yamada et al., 1985) oder eukaryontische Enzyme, wie die Acetamidase aus *Aspergillus oryzae* (Gomi et al., 1991). Diese Enzyme sind meist Homodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa für das Monomer. Anhand neuerer Homologie-Untersuchungen werden auch die in Säugetieren vorkommende Fettsäureamid Hydrolase und die A-Untereinheit der Glu-tRNA<sup>Gln</sup> Amidotransferasen dieser Familie zugeordnet (Patricelli und Cravatt, 2000).



Für die katalytische Aktivität der Amidase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 wurde durch ortsgerichtete Mutagenese ein Aspartat<sup>191</sup> und Serin<sup>195</sup> vorgeschlagen und eine mögliche Verwandtschaft zu Aspartat-Proteasen diskutiert (Kobayashi et al., 1997). Neuere umfangreiche Untersuchungen an der Fettsäureamid Hydrolase deuten jedoch darauf hin, dass mit dem analogen Serin<sup>241</sup> in diesem Enzym zwar die katalytisch angreifende nucleophile Gruppe vorliegt, jedoch Lysin<sup>142</sup> und nicht Aspartat<sup>237</sup> die Säure/Base-Funktion einer katalytischen Diade bereitstellt (Patricelli und Cravatt, 2000).

Mit den Kristallisationen zweier "Amidase Signature" Enzyme, der rekombinanten thermophilen Amidase aus *Sulfolobus solfataricus* MT4 (Nastopoulos et al., 2001) und der rekombinanten Peptidamidase aus *Stenotrophomonas maltophilia* (Neumann et al., 2002) ist mit den folgenden Röntgenstrukturanalysen eine weitere Aufklärung des Katalysemechanismus zu erwarten (Labahn et al., submitted).

Bemerkenswert ist auch die häufige Koppelung dieser Amidasen mit einer Nitrilhydratase, wie sie für den enzymatischen Abbau von Nitrilen in der zweistufigen Reaktion benötigt wird (Abb. 10 und Abb. 11).

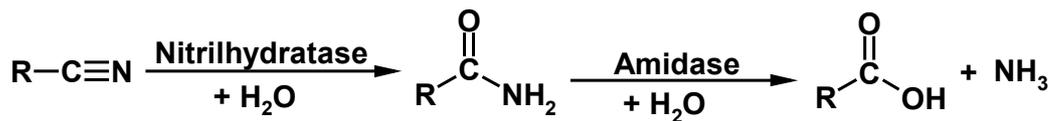


Abb. 10: Reaktionsschema der zweistufigen Hydrolyse von Nitrilen mit einem Nitrilhydratase/Amidase-System

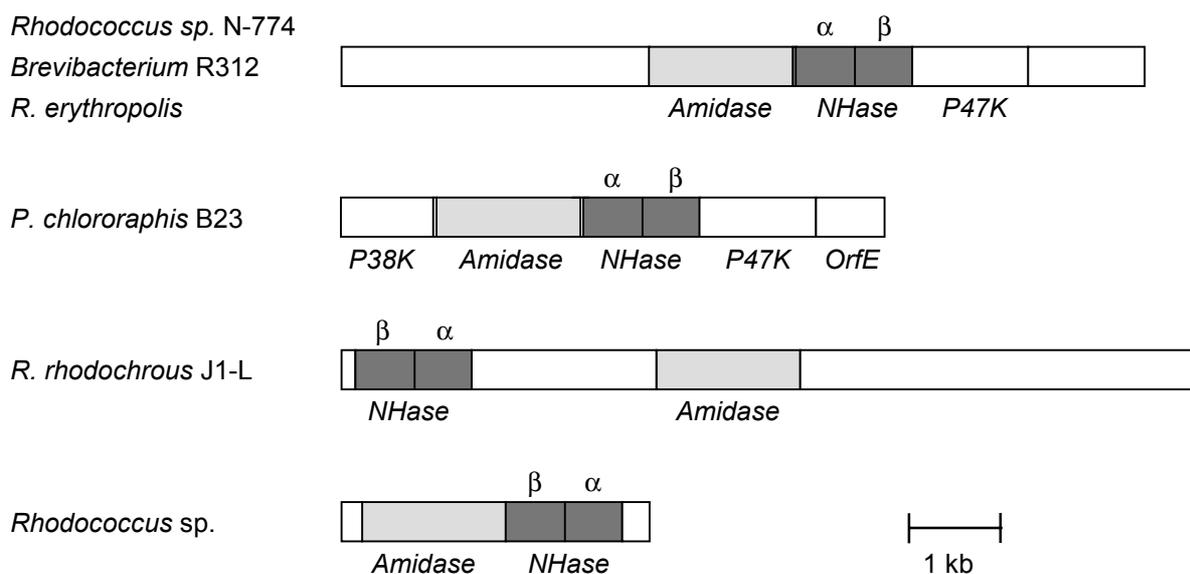


Abb. 11: Genstruktur verschiedener Nitrilhydratase/Amidase-Systeme

So sind die Gene der Amidase und Nitrilhydratase verschiedener Organismen ähnlich oder sogar identisch in einem Operon organisiert (Shimizu et al., 1997). Das Protein, das in *Pseudomonas chlororaphis* B23 vom Gen P47K codiert wird, ist in ähnlicher Form in weiteren Stämmen nach den Nitrilhydratase-Genen vorhanden und scheint von entscheidender Bedeutung für die heterologe Expression der Nitrilhydratase zu sein. In der Literatur wird es als Nitrilhydratase-Aktivator-Protein bezeichnet, wobei dessen Funktion noch unklar ist (Endo et al., 2001).

Aufgrund dieser Beziehung zwischen Amidasen und Nitrilhydratase soll eine kurze Übersicht dieser Enzyme folgen.

### 4.3. Nitrilhydratase

Bei fast allen beschriebenen Nitrilhydratase handelt es sich um Heterodimere, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten mit relativ ähnlichen oder identischen Molekulargewichten bestehen ( $\alpha\beta$ -Struktur). Die Untereinheiten besitzen meist ein Molekulargewicht zwischen 23 und 29 kDa und können als Dimere oder höhere Aggregate (Holoenzyme) mit Molekulargewichten zwischen 54 und 505 kDa vorliegen (Cowan et al., 1998). Anhand des involvierten Metallions lassen sich die Nitrilhydratase in den Eisen- oder Cobalt-Typ einteilen.

Die eisenhaltigen Nitrilhydratase in *Pseudomonas chlororaphis* B23 (Sugiura et al., 1987), *Rhodococcus* sp. R312 (früher: *Brevibacterium* sp. R312) (Nagasawa et al., 1986) und *Rhodococcus* sp. N771 (Honda et al., 1992) wurden eingehend untersucht. Die zwei letztgenannten Enzyme besitzen mit der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* sp. N-774 (Endo und Watanabe, 1989) eine identische Aminosäuresequenz und eine ungewöhnliche lichtabhängige Regulation der Aktivität durch Stickstoffmonoxid (Kobayashi und Shimizu, 1998). Im Dunkeln wird ein NO-Molekül am  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion gebunden, wodurch das Enzym inaktiv vorliegt. Bei Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Bereich dissoziiert der Fe-NO-Komplex, und die Aktivität erreicht wieder nahezu den Ausgangswert.

Die Strukturaufklärung des Enzyms aus *Rhodococcus* sp. N-771 zeigt für das Eisenion eine oktaedrische Koordination von zwei Stickstoffatomen des Peptidrückgrades, drei Schwefelatomen von Cystein-Seitenketten und Stickstoffmonoxid. Weiterhin liegen zwei der drei Cystein-Reste in oxidierter Form als Anion der Sulfen- bzw. Sulfinsäure vor (Nagashima et al., 1998).

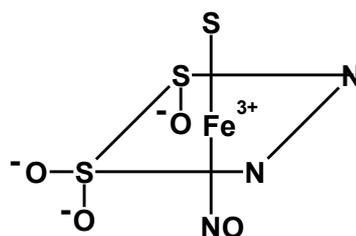
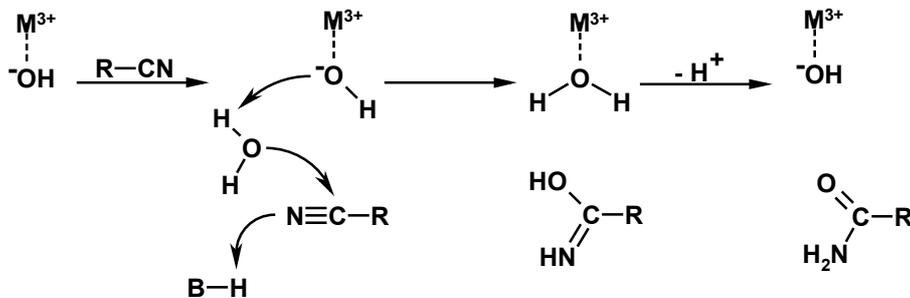


Abb. 12: Koordination des Eisenions einer Fe-Typ Nitrilhydratase in inaktiver Form

Für die aktive Form dieser Nitrilhydratase wird anstelle des NO-Moleküls ein Hydroxid-Ion oder ein Wasser-Molekül angenommen. Mit der Strukturaufklärung der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus sp.* R312 wurden mehrere Katalysemechanismen vorgeschlagen, in denen das  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion jeweils als Lewis-Säure fungiert und direkt oder indirekt das Nitril zur Hydratisierung aktiviert. Aufgrund des relativ langsamen Ligandenaustausches für dreiwertige Metallionen wird eine indirekte Aktivierung des Nitrils durch das  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion favorisiert (Huang et al., 1997).



**Abb. 13:** Für Nitrilhydratasen vorgeschlagener Katalysemechanismus

Der Cobalt-Typ wurde in *Rhodococcus rhodochrous* J1 gefunden. Dieser Organismus besitzt zwei cobalthaltige Nitrilhydratasen, die anhand ihres Molekulargewichtes mit 520 kDa und 130 kDa als high-molecular-mass (H-NHase) und low-molecular-mass Nitrilhydratase (L-NHase) bezeichnet werden (Nagasawa et al., 1991; Kobayashi et al., 1991). Sie lassen sich mit Harnstoff oder Cyclohexansäureamid selektiv induzieren und unterscheiden sich in ihrem Substratspektrum (Kobayashi und Shimizu, 1998).

Die H-NHase wird in einer Ganzzellbiotransformation seit 1991 zur technischen Produktion von Acrylamid aus Acrylnitril eingesetzt. Die Firma Nitto produziert mit *Rhodococcus rhodochrous* J1 über 30 000 Tonnen Acrylamid im Jahr, wobei zuvor die Stämme *Pseudomonas chlororaphis* B23 (seit 1985) und *Rhodococcus sp.* N-774 (seit 1988) zum Einsatz kamen (Kobayashi et al., 1992). Im Vergleich zur konventionellen chemischen Herstellung führt die Biotransformation unter milden Bedingungen zu einem fast nebenproduktfreien Acrylamid ohne Bildung von Acrylsäure. Außerdem entfällt die notwendige Regenerierung, der als Katalysator eingesetzten Kupfersalze, sowie die Rückführung von nicht umgesetztem Acrylnitril (Yamada und Kobayashi, 1996). Diese Biotransformation ist bisher das einzige etablierte Verfahren zur Herstellung einer Grundchemikalie. Darüber hinaus wird mit *Rhodococcus rhodochrous* J1 auch die industrielle Herstellung des Tierfuttermittelzusatzes Nicotinamid realisiert (Yamada und Kobayashi, 1996).

Unabhängig vom benötigten Metallion zeigt ein Vergleich der Aminosäuresequenz beider Untereinheiten verschiedener Nitrilhydratasen mehrere homologe Bereiche (Huang et al., 1997; Nakasako et al., 1999). Besonders in der  $\alpha$ -Untereinheit ist das Sequenzmotiv CXLCS (X = S oder T), welches die drei Cystein-Reste zur Bindung des  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions in *Rhodococcus sp.* N-771 bereitstellt, hoch konserviert und ebenso in Thiocyanat Hydrolasen vorhanden (Endo et al., 2001).

#### 4.4. Amidasen zur Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren

Ein wichtiges Anwendungsgebiet von Amidasen ist die kinetische Racematspaltung von Aminosäureamiden (Whitesides und Wong, 1985). Ein bekanntes Beispiel ist die stereospezifische Spaltung eines D,L-Phenylglycinamid-Gemisches in D-Phenylglycinamid und L-Phenylglycin durch eine L-Amino peptidase (E.C. 3.4.11.1) in *Pseudomonas putida* ATCC 12633. Ein durch die Firma DSM entwickelter Prozess nutzt ganze Zellen von *Pseudomonas putida* zur Herstellung reiner D- und L-Aminosäuren aus D,L-Aminosäureamiden (Abb. 14; Kamphuis et al., 1990).

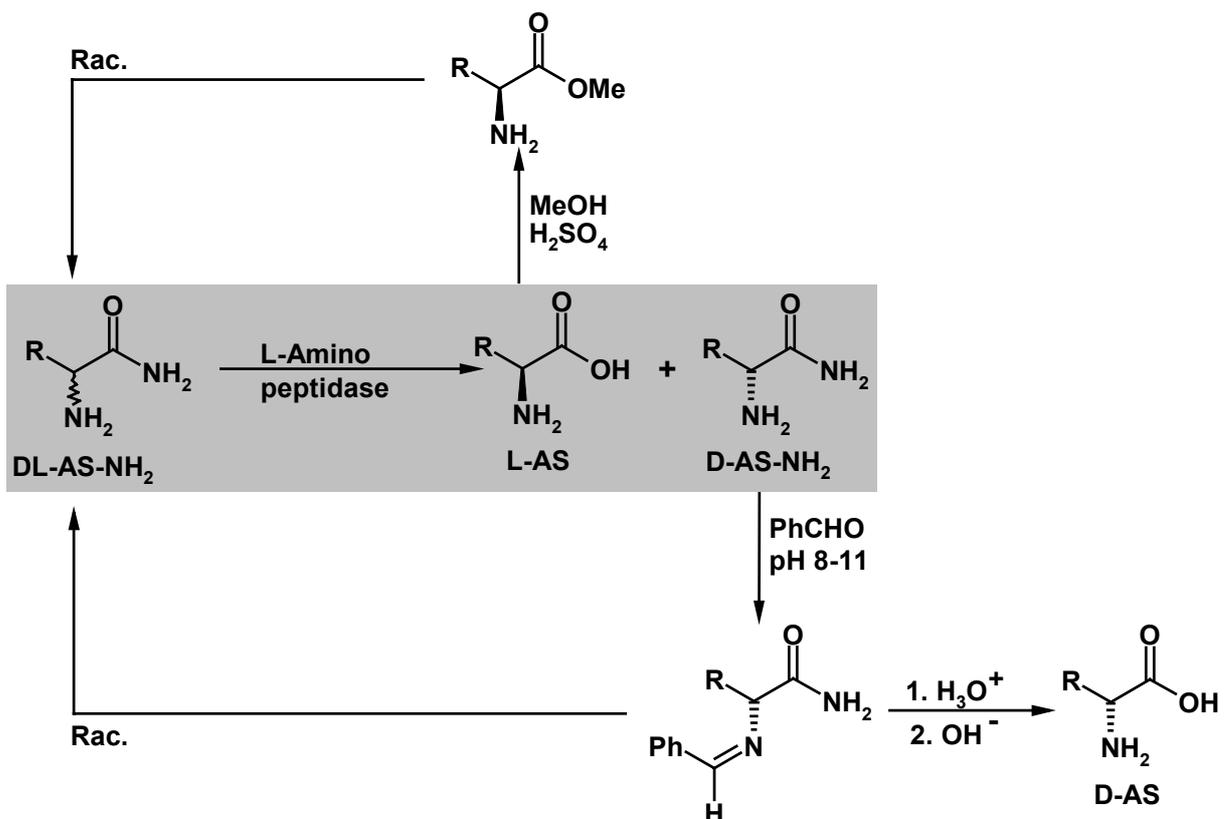


Abb. 14: DSM-Verfahren zur Gewinnung enantiomerenreiner Aminosäuren, Racematspaltung grau hervorgehoben (Kamphuis et al., 1990)

Zur Trennung von L-AS und D-Aminosäureamid wird Benzaldehyd zugegeben, wobei selektiv das D-Aminosäureamid die Schiff'sche Base bildet, die im wässrigen System unlöslich ist.

Durch chemische Rückführung des unerwünschten Nebenprodukts kann das Verfahren zur Gewinnung der reinen L- oder D-Form genutzt werden. So wird zur Herstellung der reinen L-AS die Schiff'sche Base des D-AS-NH<sub>2</sub> racemisiert, anschließend der Aldehyd abgespalten und das DL-AS-NH<sub>2</sub> wieder der enzymatischen Hydrolyse zugeführt. Alternativ kann zur Gewinnung der reinen D-AS die L-AS nach Veresterung mit Ammoniak amidiert, anschließend mit Benzaldehyd racemisiert und ebenso zurückgeführt werden.

Das Substratspektrum der L-Aminopeptidase aus *Pseudomonas putida* ist breit und enthält auch eine Reihe nicht natürlicher, ungesättigter Aminosäureamide (Wolf et al., 2001). Aufgrund der höheren Affinität zu Dipeptiden und einer Sequenzhomologie wird das Enzym in die Klasse der Leucin-Aminopeptidasen (E.C. 3.4.11.1) klassifiziert (Hermes et al., 1993; Sonke et al., 2000).

#### 4.4.1. Enzyme mit D-spezifischer Aminosäureamid-Aktivität

Amidasen mit einer selten vorkommenden D-Spezifität bezüglich Aminosäureamiden sind in *Arthrobacter sp.* NJ-26, in zwei Stämmen von *Ochrobactrum anthropi*, SCRC C1-38 und SCRC-SV3 und in *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 beschrieben (Tab. 26). Alle vier Organismen wurden durch ein Anreicherungs- oder Adaptionsverfahren überwiegend aus Bodenproben isoliert.

Die Enzyme in *Arthrobacter sp.* NJ-26 (Ozaki et al., 1992; Yagasaki und Osaki, 1998) und *Ochrobactrum* SCRC C1-38 (Asano et al., 1989b) hydrolysieren spezifisch D-Alaninamid; Aminosäureamide mit größeren Resten werden nur äußerst langsam oder gar nicht umgesetzt. Mit der höheren Aktivität für D-Ala-Peptide wurde das Enzym aus *Ochrobactrum* SCRC C1-38 als eine D-Aminopeptidase klassifiziert und anhand der Aminosäuresequenz eine Verwandtschaft zur Carboxypeptidase DD aus *Streptomyces* R61 und zu  $\beta$ -Lactamasen beschrieben (Asano et al., 1992).

Mit der stereospezifischen D-Aminosäure-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* SCRC-SV3 konnten Asano und Mitarbeiter ein Enzym isolieren, welches bevorzugt aromatische D-Aminosäureamide sowie D-Leucin- und D-Alaninamid hydrolysiert (Asano et al., 1989a). Die Klonierung in *Escherichia coli* führte zu einer 350-fachen Steigerung der Aktivität im Rohextrakt im Vergleich zum Wildtyp und damit zu einer einfachen Verfügbarkeit des Enzyms. Die D-Amidase besitzt ein Molekulargewicht von 40 kDa und eine Homologie zu Peptidasen aus *Bacillus cereus* DF4-B, *Streptomyces* R61 und der obigen Aminopeptidase aus *Ochrobactrum* SCRC C1-38 (Komeda und Asano, 2000).

Die enantioselektive Amidase aus *Comamonas acidovorans* setzt insbesondere R-Ketoprofenamid um und akzeptiert bevorzugt die D-Form von Leucin- und Phenylalaninamid. Mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und der Aminosäuresequenz, die zu 39% homolog zur enantioselektiven Amidase aus *Rhodococcus sp.* R312 ist, kann es zur "Amidase Signature"-Familie zugeordnet werden, obwohl das native Enzym in monomerer Form vorliegt, im Unterschied zur dimeren Form der meisten anderen Enzyme dieser Familie (Hayashi et al., 1997).

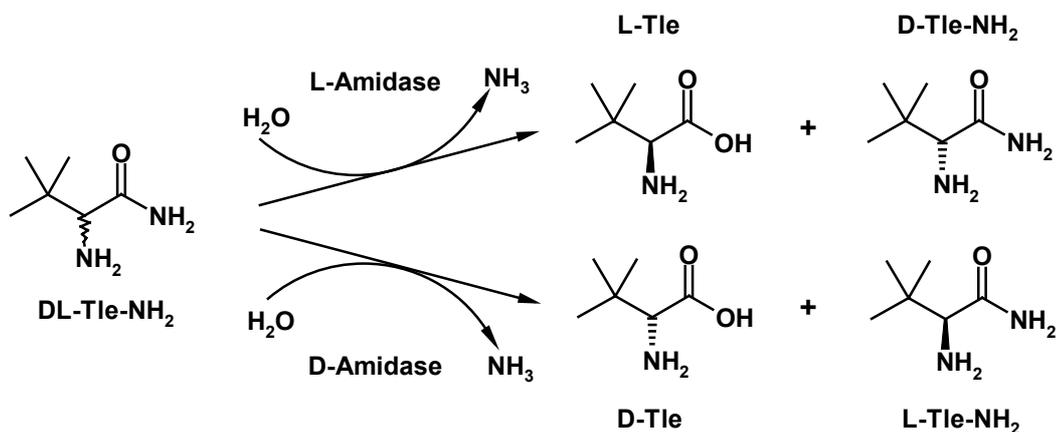
Ein Nachteil des Amidase-Verfahrens ist, dass nur 50% des Racemats im ersten Schritt umgesetzt werden. Neben der chemischen Racemisierung wäre der Einsatz einer Aminosäureamid-Racemase eine interessante Alternative.

Durch die Entdeckung dieser Enzyme in *Pseudomonas putida* und *Rhodococcus sp.* konnte für Novo Industri A/S, Dänemark, und Stamicarbon B.V., Niederlande, ein Verfahren zur Racemisierung von Aminosäureamiden und Hydrolyse durch eine L- oder D-Amidase zur entsprechenden Aminosäure patentiert werden (Godfredsen et al., 1988). Ebenso wurde eine D-Amidase-Aktivität in *Pseudomonas putida* NCIB 40042 und *Rhodococcus sp.* NCIB 40041 beschrieben, jedoch wurden keine Angaben zur Charakteristika der Enzyme dargestellt.

Weitere Aminosäureamid-Racemasen wurden in *Arthrobacter sp.* ATCC 31652, *Corynebacterium sp.* ATCC 31662 (Klages, 1988) und in *Klebsiella oxytoca* patentiert (Hermes et al., 1990).

## 5. Motivation und Zielsetzung

Ein vielversprechender Ansatz zur Gewinnung enantiomerenreinen D-tertiär-Leucins (D-Tle), das wie L-tertiär-Leucin als chirales Auxiliar oder Bestandteil pharmakologischer Wirkstoffe Bedeutung erlangen könnte, ist die enzymatische Racematspaltung des chemisch zugänglichen tertiiär-Leucinamids (DL-Tle-NH<sub>2</sub>) mittels einer enantioselektiven Amidase.



**Abb. 15: Mögliche Racematspaltungen von DL-Tle-NH<sub>2</sub> mit einer enantioselektiven D- oder L-Amidase**

Im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde die Suche und Bewertung von Aminosäuren-Amidasen bearbeitet, die stereospezifisch D- oder L-tert-Leucinamid zur entsprechenden freien Aminosäure hydrolysieren können. Die Suche nach dieser Enzymaktivität erfolgte durch ein Screening von Mikroorganismen, für das eine geeignete Nachweisanalytik etabliert wurde (Krieg, 1997).

In einem limitierten Screening wurden 110 charakterisierte Stämme der instituts-eigenen Stammsammlung unter verschiedenen Bedingungen auf eine Amidase-Aktivität untersucht. Dabei konnte nur für einen Stamm, *Streptomyces antibioticus*, eine geringe spez. Akt. von 5 mU/mg für L-Tle-NH<sub>2</sub> gefunden werden.

Es zeigte sich, dass in einem Anreicherungsverfahren die Verwendung von D,L-*tert*-Leucinamid als einzige Stickstoff-Quelle in einem Minimalmedium die besten Bedingungen für eine Isolierung von Organismen mit einer Amidase-Aktivität bietet. Für das beste Isolat wurde eine spez. Akt. von 32 mU/mg bezgl. L-Tle-NH<sub>2</sub> bestimmt. Aufgrund der bisherigen kleinen Anzahl an Anreicherungskulturen erschien es erfolgversprechend, das Screening auszuweiten und weitere Proben aus natürlichen Standorten zu untersuchen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit beinhaltete zunächst die Fortsetzung des Screenings mit dem Anreicherungsverfahren. Dabei bestand die Möglichkeit, höhere Enzymaktivitäten und eventuell eine bevorzugte D-spezifische Aminosäure-Amidase zu finden, da diese direkt zu D-*tert*-Leucin führt. Die Bewertung der Enzymaktivität und die Identifizierung geeigneter Isolate sollte zur Auswahl eines geeigneten Mikroorganismus als Enzymquelle führen (Abb. 16).

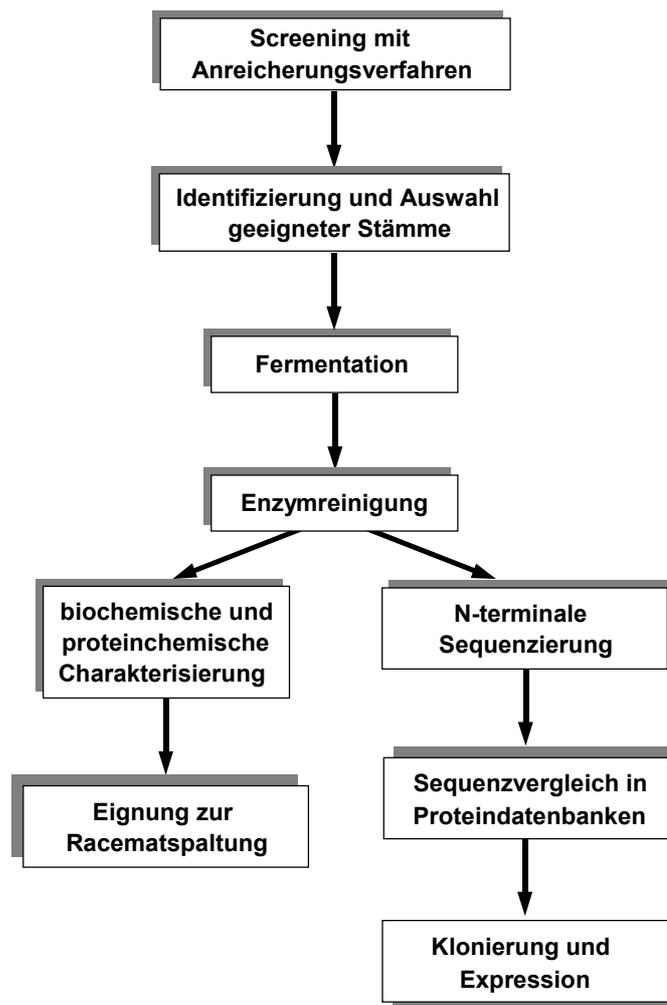


Abb. 16: Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mit dem ausgewählten Stamm sollte mittels Fermentation eine größeren Menge des Mikroorganismus für die weiteren Arbeiten bereitgestellt werden. Damit kann die Etablierung eines Reinigungsverfahrens erfolgen, das schließlich zu homogen gereinigtem Enzym führen sollte.

Mit der gereinigten Amidase kann darauf eine umfassende biochemische und proteinchemische Charakterisierung erfolgen und insbesondere die Eignung zur Herstellung von *D-tert*-Leucin durch eine Racematspaltung von DL-Tle-NH<sub>2</sub> untersucht werden.

Darüber hinaus kann die N-terminale Sequenzierung des Enzyms einen Einstieg zur Bestimmung der Gensequenz und Klonierung der Amidase ermöglichen. Durch einen Vergleich der N-terminalen Proteinsequenz in Proteindatenbanken können Homologien mit anderen bekannten Amidasen ermittelt werden und möglicherweise weitere Proteininformationen für die Klonierung zugänglich werden. Durch die Klonierung und heterologe Expression in einem geeigneten Organismus kann meistens eine verbesserte Bereitstellung des Biokatalysators für den technischen Maßstab erzielt werden.

## II. Ergebnisse und Diskussion

### 1. Screening mit DL-*tert*-Leucinamid

#### 1.1. Anreicherungsverfahren

Es wurden 81 Proben, überwiegend Bodenproben, einer Anreicherung im Minimalmedium M-2 mit DL-*tert*-Leucinamid als einzige Stickstoffquelle unterzogen. Aus diesen Anreicherungskulturen ergaben sich durch Vereinzeln 224 Isolate, die erneut im Minimalmedium kultiviert und auf eine Amidase-Aktivität und deren Enantioselektivität untersucht wurden. Der Nachweis der Amidase-Aktivität erfolgte in einem Enzymtest (siehe V.3.3.2) mit anschließender Bestimmung der Ammoniumzunahme ( $\text{NH}_4^+$ -Test; siehe V.3.3.3). Die Enantioselektivität des Enzyms wurde zunächst qualitativ mittels chiraler Dünnschichtchromatographie (chirale DC; siehe V.3.3.4) ermittelt.

Ein Kriterium zur Beurteilung der Amidase-Aktivität war die Enantioselektivität. Im Hinblick auf eine Racematspaltung zu D-Tle wurde eine D-Amidase gegenüber einer L-Amidase bevorzugt. Im Vergleich zu den bisher gefundenen L-Amidase-Aktivitäten wurde als weiteres Kriterium eine geeignete Enzymaktivität von mindestens 30 mU/ml betrachtet (Krieg, 1997).

Von den 224 Reinkulturen zeigten 62 Isolate bei einer erneuten Kultivierung im Minimalmedium ein zu geringes Wachstum, sodass eine weitere Untersuchung nicht möglich war. Aus den verbleibenden 162 Isolaten wurden überwiegend L-Amidasen gefunden und nur drei Isolate mit einer D-Amidase-Aktivität. Der Großteil der getesteten Kulturen (123 Isolate) zeigte mit OD-Werten zumeist über 1,0 und Proteingehalten von 0,5 bis 2,7 mg/ml eine relativ gute Wachstumsaktivität, jedoch zu geringe Enzymaktivitäten unterhalb von 30 mU/ml.

Aus den übrigen 36 Isolaten mit einer L-Amidase-Aktivität größer als 30 mU/ml wurden die besten fünf Stämme durch erneute Überprüfung der Aktivität anhand der Tle-Bestimmung mittels HPLC (siehe V.3.3.5) ausgewählt. Weiterhin wurde ihre Eignung zur Racematspaltung durch Bestimmung der Enantioselektivität bei nahezu vollständiger Umsetzung von L-Tle- $\text{NH}_2$  ermittelt. Für diese fünf besten L-Amidase-Isolate erfolgte anschließend die Stammidentifizierung durch die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-Braunschweig).

Ebenso wurden die erwähnten drei Stämme mit der bevorzugten D-Amidase-Aktivität mittels der Tle-Bestimmung durch HPLC überprüft, die Eignung zur Racematspaltung untersucht und durch die DSMZ identifiziert. Der Verlauf des Screenings mit Anreicherungskulturen ist im folgendem Flussdiagramm dargestellt.

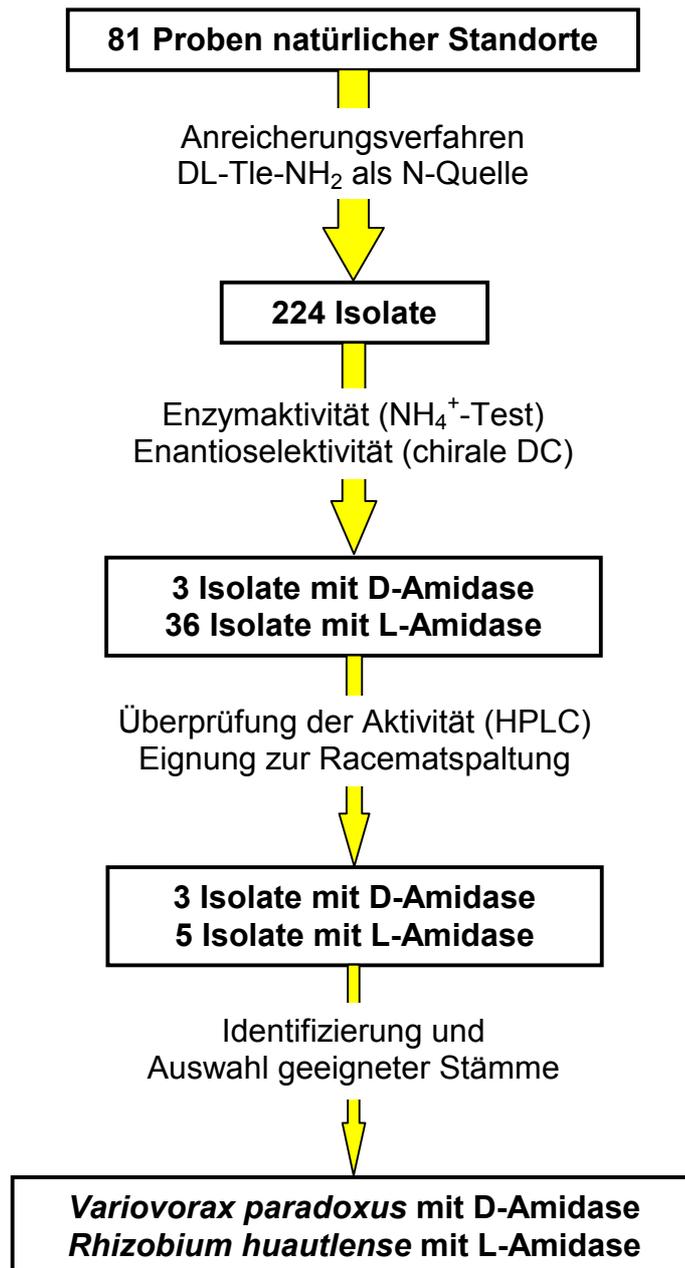


Abb. 17: Flussdiagramm des Screenings mit Anreicherungskulturen

### 1.1.1. Auswahl eines geeigneten Stammes als Enzymquelle

Im Hinblick auf eine Racematspaltung von DL-Tle-NH<sub>2</sub> zur Produktion von D-Tle sollte die Arbeit mit einem Stamm weitergeführt werden, der möglichst über eine hohe Amidase-Aktivität verfügt. Eine D-Amidase wurde bevorzugt, da diese direkt zu D-Tle führt und in Kombination mit einer Aminosäureamid-Racemase eine dynamische Racematspaltung möglich wäre.

Als zweites Kriterium wurde die Enantioselektivität herangezogen, um eine nahezu vollständige Umsetzung des Substrats in einem technischen Prozess zu ermöglichen. Weiterhin sollte der Stamm als Enzymquelle einfach zu kultivieren sein, keine pathogenen Eigenschaften besitzen und nach Möglichkeit noch patentrechtlich geschützt werden können.

### 1.1.2. Stämme mit einer D-Amidase-Aktivität

Für zwei Stämme, 19-3 und 34-4, wurde mittels HPLC eine D-Amidase-Aktivität von 64 mU/ml und 38 mU/ml bzw. spez. Akt. von 33 U/mg und 19 mU/mg ermittelt. Das dritte Isolat 47-4 zeigte nur eine geringe Aktivität, kleiner als 5 mU/ml. Die Aktivitäten sowie die Ergebnisse der Stammidentifizierung durch die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-Braunschweig) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 3: Ergebnis der Identifizierung und Aktivitäten der D-Isolate**

D-Isolate	Identifizierung	Akt. [mU/ml]	Proteingehalt [mg/ml]	spez. Akt. [mU/mg]
19-3	<i>Variovorax paradoxus</i>	64	1,9	33
34-4	<i>Variovorax paradoxus</i>	38	2,0	19
47-4	<i>Klebsiella sp.</i>	< 5	0,3	-

Die Isolate 19-3 und 34-4 wurden der Gattung *Variovorax paradoxus* zugeordnet. Der Stamm 47-4, *Klebsiella sp.*, gehört möglicherweise der Risikogruppe 2 an und ist deshalb als Enzymquelle nicht ohne weiteres einsetzbar. Weiterhin konnte für die Isolate 34-4 und 47-4 bei der Kultivierung im verwendeten Minimalmedium eine ausgeprägte Schleimbildung beobachtet werden, die die Zellernte und die Herstellung des Rohextrakts erschwerten.

Das Isolat 19-3 mit der größten Aktivität wurde auf eine Eignung zur Racematspaltung untersucht. Hierzu wurde bei einem Umsatz von 33% für das racemische Tle-NH<sub>2</sub> eine Enantioselektivität von 98,8% für D-Tle bestimmt.

Innerhalb dieser drei Organismen wurde somit der Stamm 19-3, *Variovorax paradoxus* als aussichtsreichstes Isolat mit einer D-Amidase und als geeignete Enzymquelle für die Isolierung einer D-Amidase zur Racematspaltung ermittelt. *Variovorax paradoxus* (früher: *Alcaligenes paradoxus*) gehört wie *Alcaligenes eutrophus* zu den wasserstoffoxidierenden Bakterien, auch Knallgasbakterien genannt. Der Typstamm *Variovorax paradoxus* ATCC 17713 wurde 1969 von Davis aus einer Bodenprobe unter einem Gasgemisch von H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> isoliert (Davis et al., 1969; Willems et al., 1991).

### 1.1.3. Stämme mit einer L-Amidase-Aktivität

Im Vergleich zu den Stämmen mit einer D-Amidase wurden für die besten Isolate mit einer L-Amidase-Aktivität deutlich größere Aktivitäten bis zu 550 mU/ml bzw. spez. Akt. bis zu 160 mU/mg ermittelt.

Zur Darstellung von D-Tle eignet sich eine L-spezifische Amidase für die Racematspaltung nur dann, wenn eine nahezu vollständige Umsetzung des L-Tle-NH<sub>2</sub> vorliegt. Durch Verlängerung der Inkubationszeit ließen sich für die besten Isolate bei einem Umsatz größer 48% Enantioselektivitäten bezüglich L-Tle von größer 99,2% bestimmen.

Die Aktivitäten, Enantioselektivitäten sowie die Identifizierung der fünf besten Stämme durch die DSMZ sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 4: Identifizierung, Aktivitäten und Enantioselektivitäten der besten L-Isolate**

L-Isolate	Identifizierung	Akt. [mU/ml]	spez. Akt. [mU/mg]	ee-Wert [%]
38-2	<i>Rhizobium huautlense</i>	550	91	99,2
4-2	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	250	68	99,2
L-4/3	<i>Pseudomonas sp.</i>	180	160	99,3
18-3	<i>Pseudomonas sp.</i>	140	38	> 99,5
41-4	<i>Pseudomonas sp.</i>	120	23	> 99,5

Trotz der Bevorzugung einer D-Amidase wurde aufgrund der höheren Enzymaktivitäten und vielversprechenden Enantioselektivitäten der obigen Isolate ein weiterer Organismus mit einer L-Amidase als mögliche Enzymquelle ausgewählt.

Der Stamm 4-2, *Pseudomonas alcaligenes*, gehört innerhalb dieser fünf Isolate als einziger der Risikogruppe 2 an und ist deshalb als Enzymquelle im technischen Maßstab nicht ohne weiteres einsetzbar. Anhand der Identifizierung wurde für die Stämme L-4/3 und 41-4 eine sehr hohe Übereinstimmung festgestellt, sodass möglicherweise das gleiche Isolat vorliegt.

Zur Auswahl eines geeigneten Organismus mit einer L-Amidase wurden die Enzymaktivitäten der Stämme 38-2, L-4/3 und 18-3 näher untersucht.

### **Aktivierung der L-Amidasen mit zweiwertigen Metallionen**

Für alle drei Stämme wurde eine Aktivierung bzw. Steigerung der Aktivität durch Zugabe von zweiwertigen Metallionen festgestellt. Hierzu wurden zur Abtrennung von niedermolekularen Substanzen im Rohextrakt diese zunächst über eine PD-10-Gelfiltrations-Säule (Amersham Biosciences) umgepuffert. Mit dem erhaltenen PD-10-Eluat wurde die Aktivität in Anwesenheit von jeweils 5 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Co^{2+}$  im Enzymtest bestimmt. Im Vergleich zur Restaktivität im entsalzten PD-10-Eluat ergaben sich folgende relative Aktivitäten.

**Tab. 5: Relative Aktivitäten der L-Isolate 38-2, L-4/3 und 18-3 im Rohextrakt und im PD-10-Eluat mit  $Me^{2+}$ -Ionen im Vergleich zur Restaktivität im PD-10-Eluat ohne Zusätze**

<b>L-Isolate</b>	<b>38-2</b>	<b>L-4/3</b>	<b>18-3</b>
Akt. im Rohextrakt	4	5	7
Akt. im PD-10-Eluat	1,0	1,0	1,0
Akt. mit $Mg^{2+}$	8	7	9
Akt. mit $Ca^{2+}$	0,5	0,5	0,5
Akt. mit $Zn^{2+}$	28	17	35
Akt. mit $Mn^{2+}$	5	9	12
Akt. mit $Ni^{2+}$	4	20	24
Akt. mit $Co^{2+}$	7	34	40

Im Vergleich zum Rohextrakt wurde für die drei Stämme im PD-10-Eluat eine deutliche Erniedrigung der Aktivität um das 4- bzw. 7-fache ermittelt. Bezogen auf die Aktivität im Rohextrakt entsprach dies einer Restaktivität im PD-10-Eluat zwischen 25 und 14%. Ausgehend von dieser Restaktivität konnte durch Zugabe der jeweiligen  $Me^{2+}$ -Ionen, außer für  $Ca^{2+}$ , im Enzymtest eine deutliche Steigerung der Aktivität festgestellt werden.

Für das Isolat 38-2 ergab sich die größte Steigerung um das 28-fache mit  $Zn^{2+}$ . Mit  $Mg^{2+}$  und  $Co^{2+}$  waren Steigerungen um das 7- bis 8-fache zu beobachten. Ähnlich waren die relativen Aktivitäten für L-4/3 und 18-3 mit der größten Zunahme um das 34- bzw. 40-fache mit  $Co^{2+}$ . Ebenso lagen für beide Isolate in Anwesenheit von  $Zn^{2+}$

oder  $\text{Ni}^{2+}$  um das 17- bis 35-fache höhere Aktivitäten vor. Interessanterweise führte die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  bei allen drei Isolaten zu einer weiteren Erniedrigung der Restaktivität auf etwa 50%, bezogen auf die Aktivität im PD-10-Eluat ohne Zusätze.

### **L-Amidase-Aktivität mit geeigneter $\text{Me}^{2+}$ -Konzentration**

Anhand dieser Ergebnisse und einer beobachteten Niederschlagsbildung im Enzymtest mit 5 mM  $\text{Me}^{2+}$  wurde die Aktivität für die Konzentrationen 5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  der geeigneten  $\text{Me}^{2+}$ -Ionen im Enzymtest näher untersucht. Als Puffer kam anstelle des Kaliumphosphat-Puffers ein 100 mM MES-Puffer (pH 7,5) zum Einsatz.

Anhand der Aktivitäten wurde für die drei Enzyme ein geeigneter  $\text{Me}^{2+}$ -Konzentrationsbereich ermittelt. Dieser Bereich variierte für das jeweilige Isolat und  $\text{Me}^{2+}$ -Ion. Zusammenfassend ergaben sich die größten Aktivitäten bei den angegebenen  $\text{Me}^{2+}$ -Konzentration (Tab. 6).

**Tab. 6: Spez. Akt. von 38-2, L-4/3 und 18-3 im PD-10-Eluat bei der geeignetsten  $\text{Me}^{2+}$ -Konzentration**

<b>38-2</b>			
[ $\text{Me}^{2+}$ ]	0,1 mM $\text{Zn}^{2+}$	10 $\mu\text{M}$ $\text{Co}^{2+}$	5 mM $\text{Mg}^{2+}$
sp. Akt. [U/mg]	0,43	0,25	0,33
<b>L-4/3</b>			
[ $\text{Me}^{2+}$ ]	0,5 mM $\text{Zn}^{2+}$	0,1 mM $\text{Co}^{2+}$	0,5 mM $\text{Mg}^{2+}$
sp. Akt. [U/mg]	0,35	0,38	0,027
<b>18-3</b>			
[ $\text{Me}^{2+}$ ]	0,5 mM $\text{Zn}^{2+}$	0,1 mM $\text{Co}^{2+}$	0,5 mM $\text{Mg}^{2+}$
sp. Akt. [U/mg]	0,21	0,14	0,018

### **Enantioselektivität der L-Amidasen mit geeigneter $\text{Me}^{2+}$ -Konzentration**

Für eine Beurteilung dieser drei Isolate zur Racematspaltung wurde unter den optimierten Bedingungen im Enzymtest erneut die Enantioselektivität bei nahezu vollständiger Umsetzung des Substrats untersucht. Hierzu wurde 4 mM Substrat DL-Tle- $\text{NH}_2$  im Enzymtest verwendet und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Umsatz und der ee-Wert des Produktes L-Tle bestimmt (Tab. 7).

Für die Stämme 38-2 und L-4/3 wurden erneut bei Umsätzen größer 48% Enantioselektivitäten für L-Tle zwischen 99,2 und 98,4% bestimmt. Der Stamm 18-3 zeigte bei gleichen Umsätzen ee-Werte von größer 99,5%.

Tab. 7: Enantioselektivitäten der L-Isolate 38-2, L-4/3 und 18-3 im PD-10 Eluat

<b>38-2, 0,1 mM Zn<sup>2+</sup></b>	
Umsatz [%]	ee-Wert [%]
48	99,2
49	98,4
<b>L-4/3, 0,1 mM Co<sup>2+</sup></b>	
Umsatz [%]	ee-Wert [%]
48	98,6
49	98,6
<b>18-3, 0,5 mM Zn<sup>2+</sup></b>	
Umsatz [%]	ee-Wert [%]
48	> 99,5
49	> 99,5

Innerhalb dieser drei Organismen wurde schließlich mit der größten Enzymaktivität und einer hohen Enantioselektivität der Stamm 38-2, *Rhizobium huautlense*, als aussichtsreichstes Isolat mit einer L-Amidase und geeignete Enzymquelle ermittelt. Die Bakterienart *Rhizobium huautlense* wurde erst kürzlich aus einer Bodenprobe in der Sierra de Huautla, Mexiko, isoliert und eine Verwandtschaft zu *Rhizobium galegae* beschrieben (Wang et al., 1998).

## 1.2. Zusammenfassende Diskussion des Screening-Verfahrens

### Analytische Methoden

Für eine einfache und relativ schnelle Beurteilung der Aktivität im Rahmen des Screenings haben sich die enzymatische NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Bestimmung (siehe V.3.3.3) und die qualitative Bestimmung der Enantioselektivität mittels chiraler Dünnschichtchromatographie (siehe V.3.3.4) bewährt.

Die ermittelten Aktivitäten und Enantioselektivitäten ließen sich durch Nachweis von D- und L-Tle mittels HPLC (siehe V.3.3.5) bestätigen. Ein Vergleich der ermittelten NH<sub>4</sub><sup>+</sup>- und Tle-Konzentrationen für die jeweiligen Ansätze ergab Abweichungen bis zu 20% und die damit verbundenen Unsicherheiten in der Aktivitätsberechnung. Ein Grund dafür waren die hohen Blindwerte der Proben an NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen und Tle und die daraus resultierenden Ungenauigkeiten in der Differenz zweier großer Größen. Eine systematische Abweichung zwischen enzymatischer NH<sub>4</sub><sup>+</sup>- und Tle-Bestimmung mittels HPLC war nicht erkennbar.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Screening-Verfahrens, z. B. für eine gerichtete Evolution einer Amidase, wären diese Methoden für einen Einsatz im Mikrotiterplatten-Format nicht geeignet. Hierfür werden bevorzugt einfache Testverfahren für die Enzymreaktion eingesetzt, wie die Freisetzung eines Chromophors, der photometrisch bestimmt werden kann, oder eine mögliche pH-Änderung. So wurde zum Beispiel für eine gerichtete Evolution einer Hydantoinase in Kombination mit einer Racemase und L-Carbamoylase für das Screening-Verfahren die pH-Änderung bei der Hydrolyse des Hydantoins zur Aktivitätsbestimmung benutzt (May et al., 2000).

Ebenso könnten für ein Screening-Verfahren zur Bestimmung der Amidase-Aktivität neben der pH-Änderung möglicherweise eine chemische  $\text{NH}_4^+$ -Bestimmung, wie die Indophenolreaktion (Wagner, 1969) oder der Einsatz einer ammoniumsensitiven Elektrode geeignet sein. Die Bestimmung der Enantioselektivität wäre durch den Einsatz der enantiomerenreinen Substrate D- oder L-Tle- $\text{NH}_2$  im Enzymtest und anschließendem Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten denkbar.

### **Anreicherungsverfahren mit DL-Tle- $\text{NH}_2$**

Wie bereits eine vorangegangene Diplomarbeit vermuten ließ, bietet ein Anreicherungsverfahren mit Proben aus natürlichen Standorten und DL-*tert*-Leucinamid als einzige Stickstoffquelle im Minimalmedium M-2 sehr gute Bedingungen für die Isolierung von Organismen mit der gesuchten Amidase-Aktivität. Im Vergleich dazu führte ein limitiertes Screening, bei dem 110 charakterisierte Stämme, unter anderem auch mit Minimalmedium M-2, auf eine Amidase-Aktivität untersucht wurden, zu keinen geeigneten Isolaten (Krieg, 1997). Somit waren mit der mikrobiellen Vielfalt in den natürlichen Proben und der Anreicherung über mehrere Passagen die entscheidenden Faktoren zur Isolierung geeigneter Organismen gegeben.

Ähnliche Erfahrungen wurden bei einem Screening von Proben natürlicher Standorte mit Carnitinamid zur Isolierung einer L-Carnitin-Amidase beschrieben. L-Carnitin (R-3-Hydroxy-4-trimethylamino-buttersäure) ist beim Lipid-Stoffwechsel von Säugtieren für den Transport der langkettigen Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran verantwortlich. Hier wurde erfolgreich DL-Carnitinamid als alleinige C- und N-Quelle in einem Flüssigmedium zur Anreicherung eingesetzt. Interessanterweise führte ein sogenanntes Direct-Plating-Verfahren zu keinen geeigneten Isolaten (Joeres und Kula, 1994).

Die Ergebnisse des Screening-Verfahrens mit DL-Tle- $\text{NH}_2$  sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Ausgehend von 81 Proben aus natürlichen Standorten ließen sich durch Anreicherung und Vereinzelung 224 Reinkulturen erhalten. Aus diesen 224 Kulturen ergaben sich 162 Stämme (72%) mit einer Amidase-Aktivität. Die verbleibenden 62 Isolate zeigten bei einer erneuten Kultivierung im Minimalmedium ein zu geringes Wachstum, sodass eine weitere Untersuchung nicht möglich war.

Für 159 Isolate (71%) wurden ausschließlich L-Amidase-Aktivitäten nachgewiesen, von denen wiederum 36 (16%) eine akzeptable Volumenaktivität über 30 mU/ml besaßen. Weiterhin fanden sich drei Stämme (1,3%) mit einer D-Amidase-Aktivität. Somit ließen sich mit racemischem Tle- $\text{NH}_2$  trotz der dominierenden Anreicherung von L-Isolaten auch Organismen mit einer D-Amidase isolieren.

**Tab. 8: Zusammenfassung des Screening-Verfahrens mit DL-Tle-NH<sub>2</sub>**

Screening mit DL-Tle-NH <sub>2</sub>	Anzahl	[%]
Proben aus natürlichen Standorten	81	-
Isolierte Stämme	224	100
Stämme mit Aktivität	162	72
Stämme mit L-Amidase-Aktivität	159	71
Stämme mit L-Aktivität > 30 mU/ml	36	16
Stämme mit D-Amidase-Aktivität	3	1,3

Im Vergleich dazu ließen sich bei dem oben erwähnten Screening nach einer enantioselektiven L-Carnitin-Amidase aus 267 Proben durch Anreicherung 1138 Isolate erhalten. Daraus wurden 65 Isolate (5,7%) mit einer Amidase-Aktivität identifiziert, die für 31 Stämme unspezifisch und für 34 Stämme (3,0%) spezifisch für L-Carnitinamid war. Eine D-spezifische Carnitin-Amidase konnte nicht gefunden werden (Joeres und Kula, 1994).

Auch die Vielzahl der bekannten Amidasen, die Aminosäureamide umsetzen, zeigt, dass die Hydrolyse der natürlichen L-Form deutlich bevorzugt wird und bisher nur wenige D-Aminosäuren-Amidase beschrieben wurden (siehe I.4.4). Bemerkenswert ist auch, dass die D-spezifischen Amidasen aus *Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3 (Asano et al., 1989a) und SCRC C1-38 (Asano et al., 1989b) mit enantiomerenreinen D-Valin- bzw. D-Alaninamid als einzige N-Quelle isoliert wurden. Ebenso verwendeten Godtfredsen und Mitarbeiter (Godtfredsen et al., 1988) die reinen D-Aminosäureamide zur Anreicherung von Isolaten mit entsprechender D-Amidase. In diesem Zusammenhang wäre möglicherweise die Verwendung von enantiomerenreinem D-Tle-NH<sub>2</sub> zur Anreicherung ein interessanter Ansatz.

### **Auswahl geeigneter Stämme für DL-*tert*-Leucinamid**

Für eine Racematspaltung von DL-Tle-NH<sub>2</sub> zur Herstellung von D-Tle wurde eine D-Amidase bevorzugt, da diese direkt zu D-Tle führt. Weitere Kriterien waren die Aktivität und Enantioselektivität, um eine nahezu vollständige Umsetzung des Substrats in einem technischen Prozess zu ermöglichen.

Für die besten L-Isolate wurden unter Screening-Bedingungen Aktivitäten bis zu 0,16 U/mg bestimmt. Nach Identifizierung der fünf besten Isolate wurden drei Stämme, *Rhizobium huantlense* (38-2) und zwei *Pseudomonas sp* (L-4/3 und 18-3) näher untersucht und eine Cofaktor-Abhängigkeit der Amidase-Aktivität von zweiwertigen Metallionen, insbesondere mit Zn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup>, festgestellt.

Eine Metallionen-Abhängigkeit für Amidasen ist ungewöhnlich, da für die typischen Vertreter der "Amidase Signature"-Familie (I.4.2) sowie auch für die sogenannten aliphatischen Amidasen (I.4.1) keine Cofaktor-Abhängigkeit beschrieben ist. Demgegenüber sind Aminopeptidasen, die als Nebenaktivität oft auch einfache Säureamide hydrolysieren, meistens Metalloenzyme und werden durch Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup> aktiviert (Maestracci et al., 1988).

So auch die zur Racematspaltung von Aminosäureamiden verwendete L-Amino-peptidase aus *Pseudomonas putida* ATCC 12633, die eine Steigerung der Aktivität mit  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  (2- bis 3-fache) und mit  $Mn^{2+}$  (12-fache) zeigt, andererseits  $Cu^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  eine Inhibition der Aktivität um 70 bzw. 40% bewirken (Hermes et al., 1993). Sehr ähnlich dazu zeigten die Amidase-Aktivitäten in *Rhizobium huantlense* mit  $Zn^{2+}$  und die beiden *Pseudomonas sp.* Stämme mit  $Co^{2+}$  die größten Steigerungen um den Faktor 28 bis 40 und eine Abnahme der Restaktivität um etwa 50% in Gegenwart von  $Ca^{2+}$ .

Unter optimierten Bedingungen wurde für *Rhizobium huantlense* die größte spez. Akt. mit 0,43 U/mg gemessen. Eine L-spezifische Amidase eignet sich zur Racematspaltung für D-Tle nur dann, wenn eine nahezu vollständige Umsetzung des L-Tle-NH<sub>2</sub> vorliegt. Die Untersuchung der Enantioselektivität ergab bei einem Umsatz von 48% des racemischen Tle-NH<sub>2</sub> ein ee-Wert von 99,2% bzgl. L-Tle. Anhand dieser Ergebnisse wurde *Rhizobium huantlense* aus der Gruppe der L-Isolate als geeigneter Stamm zur enzymatischen Racematspaltung ausgewählt.

Die Identifizierung der drei Stämme mit einer bevorzugten D-Amidase ergab für 19-3 und 34-4 eine Zuordnung zu *Variovorax paradoxus* und für 47-4 zu *Klebsiella sp.* Von diesen wurde der Stamm 19-3, *Variovorax paradoxus* mit einer spez. Akt. von 33 mU/mg im Rohextrakt und einer Enantioselektivität von 98,8% ee für D-Tle bei 33%igem Umsatz bzgl. DL-Tle-NH<sub>2</sub> als aussichtsreichstes Isolat mit einer D-Amidase-Aktivität ausgewählt.

Der folgende Hauptteil der vorliegenden Arbeit beinhaltet somit die Kultivierung von *Variovorax paradoxus* als Enzymquelle, die Reinigung und Charakterisierung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* sowie die Klonierung und Bereitstellung des Enzyms in rekombinanter Form (II.2.). Anschließend sind noch weitergehende Untersuchungen eines zweiten interessanten Enzyms, der L-Amidase aus *Rhizobium huantlense* aufgeführt, unter anderem die partielle Reinigung und die weitere Charakterisierung dieses Enzyms (II.3).

## 2. D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*

### 2.1. Zellkultivierungen von *Variovorax paradoxus*

#### 2.1.1. Wachstum und Enzymaktivität im Minimalmedium M-2

Für weitere Fermentationen wurde für *Variovorax paradoxus* eine Wachstumskurve im Minimalmedium M-2 mit DL-Tle-NH<sub>2</sub> als einzige N-Quelle erstellt. Aufgrund eines sehr langsamen Wachstums wurde die optische Dichte (OD<sub>660</sub>) mit zeitversetzten Ansätzen bestimmt, die ebenfalls aus zeitversetzten Vorkulturen angeimpft waren. Hierzu wurden jeweils 100 ml Minimalmedium M-2 in 1-L-Schüttelkolben mit Schikanen 5%ig aus den Vorkulturen angeimpft.

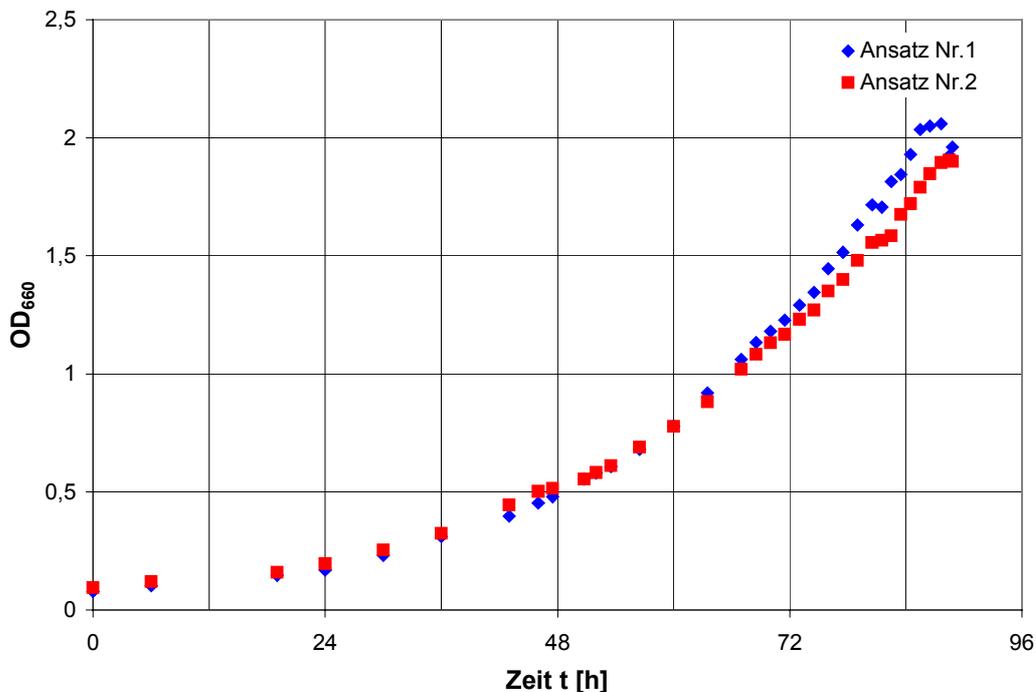
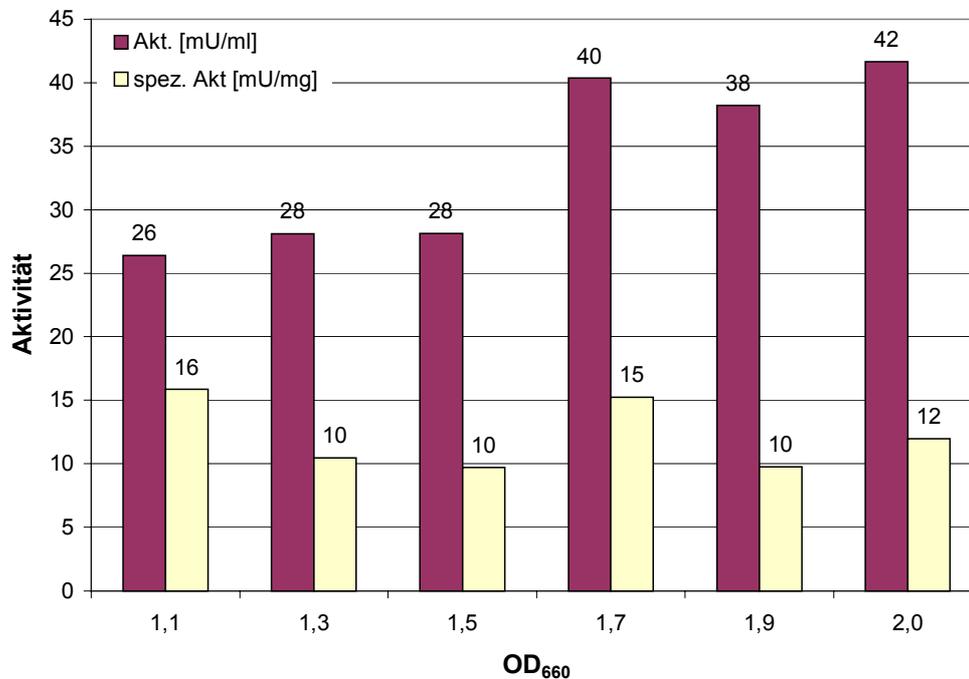


Abb. 18: Wachstumskurve von *Variovorax paradoxus* in Minimalmedium M-2

Der Verlauf der optischen Dichte zweier Ansätze ergibt sich aus jeweils drei zeitlich versetzten Schüttelkulturen und zeigt im Vergleich eine gute Übereinstimmung mit maximalen OD-Werten von 2,1 bzw. 1,9 nach 88 Stunden. Die Versuchsreihen wurden beim Erreichen der stationären Phase beendet.

### D-Amidase-Aktivität in Abhängigkeit von der optischen Dichte

Hierzu wurde bei verschiedenen OD-Werten die D-Amidase-Aktivität im Rohextrakt bestimmt.



**Abb. 19: Volumen- und spez. Aktivität in Abhängigkeit vom OD-Wert (Ansätze mit 100 ml Medium in 1-L-Schüttelkolben mit Schikanen)**

Bis zu einem OD-Wert von 1,5 ergibt sich eine Volumenaktivität bis zu 28 mU/ml und ab einem OD-Wert von 1,7 eine sprunghafte Aktivitätssteigerung bis zu 42 mU/ml Rohextrakt. Mit einem Proteingehalt von 1,7 bis 3,5 mg/ml Gesamtprotein berechnen sich spezifische Aktivitäten zwischen 10 und 16 mU/mg, innerhalb derer sich keine Tendenz zeigt. Insgesamt waren die Aktivitäten im Vergleich zum Screening mit 64 mU/ml bzw. 33 mU/mg deutlich niedriger.

#### 2.1.2. Wachstum und Enzymaktivität in den DSMZ-Medien-Nr 1 und 81

Mit den für *Variovorax paradoxus* empfohlenen DSMZ-Medien 1 und 81 wurde der Stamm in Abwesenheit von DL-Tle-NH<sub>2</sub> als Induktor auf eine mögliche konstitutive Bildung der D-Amidase überprüft. *Variovorax paradoxus* zeigte im Vergleich zum Minimalmedium M-2 ein deutlich schnelleres Wachstum, sodass für DSMZ 1 nach 20 h ein OD-Wert von 1,3 und für DSMZ 81 nach etwa 48 h ein OD-Wert von 1,2 erreicht wurde. Die maximal erreichten OD-Werte lagen jedoch für beide Medien mit etwa 2,5 wieder in der gleichen Größenordnung wie für das Minimalmedium.

Der Proteingehalt in den erhaltenen Rohextrakten war mit 3,5 mg/ml (DSMZ 1) und mit 4,2 mg/ml (DSMZ 81) vergleichbar zu den bisher ermittelten Proteinkonzentrationen. Jedoch konnte für beide Medien im Rohextrakt von *Variovorax paradoxus* keine D-Amidase-Aktivität unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden, sodass für die folgenden Fermentationen wieder auf das Minimalmedium M-2 zurückgegriffen wurde.

### 2.1.3. Optimierung des Wachstums von *Variovorax paradoxus*

#### Zugabe von Hefeextrakt zum Minimalmedium M-2

Aufgrund des langsamen und geringen Wachstums von *Variovorax paradoxus* im Minimalmedium M-2 und der beobachteten Schleimbildung bei größeren Kulturvolumina (siehe 2.1.4) sollten zunächst durch Zugabe von Hefeextrakt zum Medium bessere Wachstumsbedingungen angeboten werden. Hefeextrakt ist ein komplexes Substrat mit einem Aminosäureanteil von etwa 30% (w/w). Hierzu wurde im Bereich von 0,5 bis 5 g/L Hefeextrakt zum Minimalmedium M-2 anhand des Wachstumsverhaltens ( $OD_{660}$ ) und der Enzymaktivität eine Verbesserung des Wachstums untersucht.

Mit steigender Hefeextraktmenge nahm zwar die Wachstumsgeschwindigkeit zu, sodass mit 5 g/L Hefeextrakt nach 23 h ein OD-Wert von 1,4 erreicht wurde. Im Gegensatz dazu nahm die spez. Akt. stark von 6 mU/mg für 0,5 g/L bis auf keine nachweisbare Enzymaktivität für 5 g/L Hefeextrakt ab. In allen Ansätzen wurde wiederum bei der Zellernte eine Schleimbildung festgestellt.

Der Zusatz von Hefeextrakt und die damit verbundene Änderung des C/N-Verhältnisses im Minimalmedium konnte somit die Schleimbildung von *Variovorax paradoxus* nicht unterdrücken und führte zudem noch zu einer starken Abnahme bzw. zum Verlust der Amidase-Aktivität.

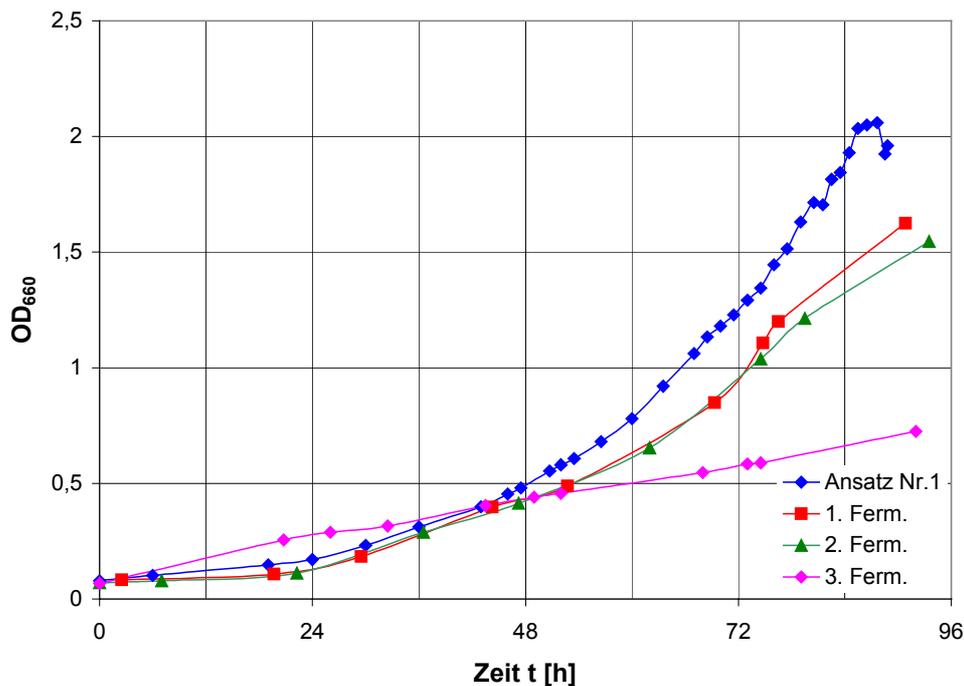
#### Induktion mit weiteren Säureamiden

Weiterhin wurde anstelle von DL-Tle-NH<sub>2</sub> als einzige N-Quelle im Minimalmedium die Verwendung alternativer Substrate der D-Amidase untersucht. Mit der Kenntnis des Substratspektrums der D-Amidase (siehe 2.3.2) kamen die kommerziell erhältlichen Säureamide Isobutyramid, Valerianamid, Acetessigsäureamid und Milchsäureamid zum Einsatz. Für diese Amide wurde eine deutlich höhere Aktivität der D-Amidase als für DL-Tle-NH<sub>2</sub> ermittelt.

Bei ansonsten gleicher Zusammensetzung des Minimalmediums führten alle vier Säureamide mit OD-Werten bis maximal 5,7 nach 33 h zu einem deutlich besseren Wachstum von *Variovorax paradoxus*. Mit spez. Akt. unterhalb von 3 mU/mg im Rohextrakt war jedoch für keine der vier Säureamide eine zufriedenstellende Induktion der D-Amidase unter diesen Bedingungen gegeben.

### 2.1.4. Fermentation von *Variovorax paradoxus* im Minimalmedium M-2

Zur Gewinnung größerer Zellmengen wurden Fermentationen im 30-L-Maßstab mit Minimalmedium M-2 durchgeführt (V.2.3.3). Der Verlauf der optischen Dichte im Vergleich zur Wachstumskurve einer Schüttelkultur (Ansatz-Nr. 1) und die Ausbeuten der drei Fermentationen sind in der folgenden Graphik und Tabelle zusammengefasst.



**Abb. 20: Verlauf der optischen Dichte dreier Fermentationen im Vergleich zur Schüttelkolbenkultur**

Der Verlauf der optischen Dichte für die erste und zweite Fermentation entsprach in etwa den Wachstumskurven für Schüttelkulturen (Ansatz-Nr. 1), jedoch wurden im gleichen Zeitraum mit etwa 1,6 kleinere OD-Werte erreicht. Die dritte Fermentation zeigte einen noch langsameren Anstieg der optischen Dichte und wurde nach 92 h mit einem OD-Wert von 0,7 abgebrochen.

**Tab. 9: Ergebnisse der Fermentationen von *Variovorax paradoxus* mit Minimalmedium M-2**

Fermentationen	1.	2.	3.
Volumen [L]	15	30	30
Biofeuchtmasse [g/L]	5,0	7,8	2,6
Gesamtaktivität [U]	15	18	22
spez. Akt. [mU/mg]	22	8	19

Für die erste Fermentation war die erhaltene Biofeuchtmasse mit 5 g/L im Vergleich zu 4,6 g/L für Schüttelkulturen sowie auch die spez. Akt. mit 22 mU/mg in der gleichen Größenordnung. Mit der zweiten Fermentation wurde zwar mit 7,8 g/L eine deutlich höhere Zellmasse erreicht, jedoch war die spez. Akt. mit 8 mU/mg deutlich niedriger, sodass insgesamt nur etwa die Hälfte an Gesamtaktivität erhalten wurde. Anhand der Wachstumskurve wurde die dritte Fermentation nach 92 h abgebrochen, sodass mit 2,6 g/L nur die Hälfte der Zellmasse, mit 19 mU/mg jedoch eine vergleichbare spez. Akt. zur ersten Fermentation erreicht wurde.

Bei der Kultivierung von *Variovorax paradoxus* im Minimalmedium M-2 wurde insbesondere bei größeren Volumina eine Schleimbildung beobachtet. Sehr ausgeprägt war diese Schleimbildung bei der zweiten Fermentation, die möglicherweise die höhere Zellmasse und die niedrigere spez. Akt. im Vergleich zur ersten Fermentation erklärt. Durch Probennahmen während der Fermentation wurde die Schleimbildung bereits bei niedrigen OD-Werten festgestellt.

Die Zellernte und der Zellaufschluss zur Herstellung des Rohextrakts für die chromatographische Reinigung waren dadurch stark erschwert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Kammerseparators (V.3.1) geerntet. Im Vergleich zu einer Becher-Zentrifugation wurde hier schon ein Anteil des Schleims mit dem Durchlauf abgetrennt.

### **2.1.5. Zusammenfassende Diskussion der Zellkultivierungen von *Variovorax paradoxus***

Insgesamt ergab sich für *Variovorax paradoxus* im Minimalmedium M-2 ein sehr langsames und geringes Wachstum. Eine Abhängigkeit der spez. D-Amidase-Aktivität im Bereich der späteren Wachstumsphase (OD-Wert: 1-2) wurde nicht festgestellt. Bei der Kultivierung im Maßstab von 30 L zeigte *Variovorax paradoxus* eine ausgeprägte Schleimbildung, die die Zellernte und die weitere Aufarbeitung zum Rohextrakt erschwerte. Im Vergleich hierzu führte eine Kultivierung in den empfohlenen DSMZ-Vollmedien zu keiner Schleimbildung, jedoch wurde unter diesen Bedingungen auch keine Amidase-Aktivität festgestellt.

Bei Bakterien, die unter normalen Umständen nicht zur Produktion von Schleimhüllen neigen, ist die Bildung von Schleimen häufig eine Folge der Abweichung vom optimalem C/N-Verhältnis im Nährmedium. Abhängig von der Species variiert die Zusammensetzung der Schleime und enthält neben Glycoproteinen, Polyalkoholen und Aminozuckern überwiegend Polysaccharide (Madigan et al., 2000).

Änderungen der Zusammensetzung des Minimalmediums durch Zugabe von Hefeextrakt im Minimalmedium M-2 führten zwar zu einem besseren Wachstum, jedoch auch zum Verlust der Enzymaktivität. Die Schleimbildung konnte mit Hefeextrakt und der damit verbundenen Änderung des C/N-Verhältnisses nicht unterdrückt werden.

Ebenso ergab der Einsatz von alternativen Substraten der D-Amidase anstelle von DL-Tle-NH<sub>2</sub> als einzige N-Quelle im Minimalmedium M-2 ein besseres Wachstum aber erneut den Verlust der Amidase-Aktivität.

Im Rahmen einer Nährmedienoptimierung für die bereits erwähnte L-Carnitin-Amidase führte eine ähnliche Supplementierung eines Minimalmediums mit 1,5 g/L Hefeextrakt zu dem optimalen Verhältnis von Wachstum und Enzymaktivität. Eine Erniedrigung der maximalen Enzymaktivität verbunden mit einem größeren Wachstum und einer Schleimbildung wurde in diesem Fall erst für deutlich höhere Hefeextraktmengen ab 7,5 g/L festgestellt (Joeres, 1992).

Mit den drei Fermentationen wurde die erforderliche Zellmenge für die Reinigung und anschließende biochemische Charakterisierung der D-Amidase bereit gestellt. Unter den bisherigen Bedingungen und mit den geschilderten Problemen bei der Kultivierung ist jedoch *Variovorax paradoxus* als Enzymquelle im großen Maßstab nur bedingt geeignet. Auf weitere Optimierungen der Kulturbedingungen von *Variovorax paradoxus* wurde daher verzichtet und die Zielsetzung auf eine rekombinante Bereitstellung der D-Amidase ausgerichtet.

## 2.2. Reinigung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*

### 2.2.1. Grundlage für eine Reinigungsstrategie

Als Ausgangspunkt zur Reinigung der D-Amidase dienten beschriebene Reinigungsverfahren ähnlicher Enzyme. Zum Beispiel erfolgt die Reinigung zweier Amidasen, die ebenfalls D-Aminosäureamide umsetzen, aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 (Yamamoto et al., 1996) und *Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38 (Asano et al., 1989b) in 6 bzw. 8 Reinigungsschritten (siehe Tab. 13).

Für beide Enzyme kam nach einer Grobreinigung durch fraktionierte Proteinfällungen als erster chromatographischer Reinigungsschritt eine Anionenaustausch-Chromatographie (IEC) mit dem DEAE-Liganden zum Einsatz. Anschließend wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Butyl- oder Phenyl-Liganden verwendet. Nach einem weiteren HIC- bzw. IEC-Reinigungsschritt erfolgte die Feinreinigung mittels Gelfiltration.

Für die Reinigung der D-Amidase sollte somit als erster Reinigungsschritt die Eignung der Anionenaustausch-Chromatographie untersucht werden. Darauf könnte die häufig verwendete HIC, gefolgt von einer Gelfiltration zur Feinreinigung, eingesetzt werden. Auf eine fraktionierte Protein-Fällung zur Grobreinigung, insbesondere mit Ammoniumsulfat, wurde verzichtet, da hohe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentrationen die Analytik der Enzymreaktion stören und somit eine gründliche Abtrennung nötig wäre.

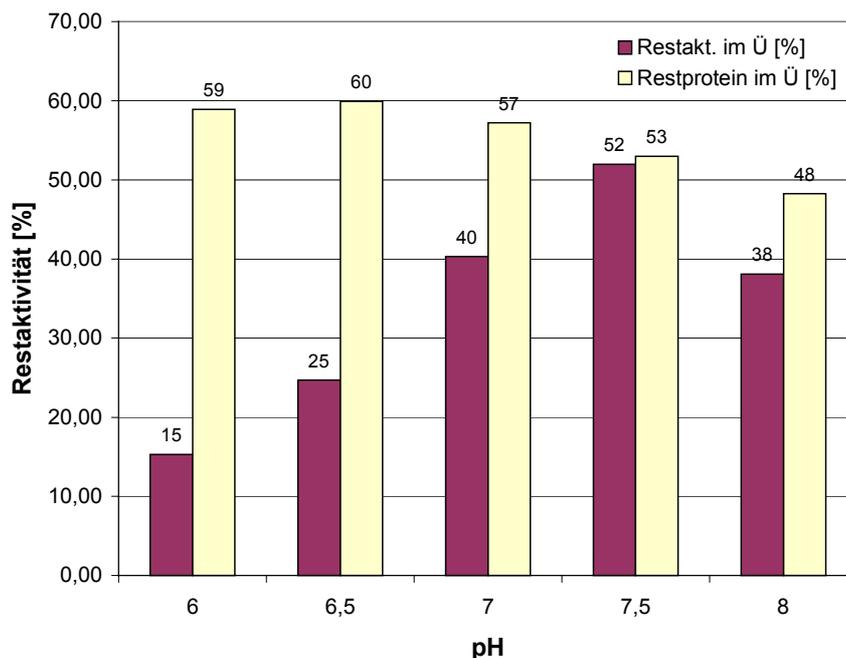
## 2.2.2. Anionenaustausch-Chromatographie (IEC)

### Bindung der D-Amidase an Q-Sepharose in Abhängigkeit vom pH-Wert

Ausgehend von Rohextrakt wurde die Bindung der D-Amidase an das Anionenaustauscher-Material Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences) bei pH-Werten zwischen 6 und 8 mit Kpi, 20 mM untersucht. Wie unter V.3.2.1 beschrieben, wurde 100 µl Adsorber mit 1,2 ml Rohextrakt bei entsprechendem pH-Wert 2 h in einem Überkopfschüttler inkubiert; als Kontrolle diente Rohextrakt bei gleichem pH-Wert.

Mit den Überständen (Ü) wurde ein Enzymtest durchgeführt und der Proteingehalt bestimmt. Anhand der Kontrolle konnte somit die Restaktivität und der verbleibende Proteingehalt im Überstand in Prozent berechnet werden (Abb. 21).

Bezüglich der Restaktivität zeigt sich von pH 7,5 bis 6,0 eine Abnahme von 52% auf 15%. Für den pH-Wert 8,0 nimmt die Restaktivität mit 38% im Vergleich zu 7,5 wieder etwas ab. Daraus lässt sich schließen, dass die gleiche Adsorbermenge bei niedrigerem pH-Wert mehr Enzym bindet.



**Abb. 21: Restaktivität und Restproteingehalt im Überstand nach Bindung an Q-Sepharose bei pH-Werten zwischen 6 und 8**

Der Proteingehalt im Überstand ist mit 48 bis 60% in diesem pH-Bereich etwa in der gleichen Größenordnung. Unter Berücksichtigung der pH-Abhängigkeit der D-Amidase-Aktivität (siehe 2.3.6) wurde für die folgende Reinigung mit Q-Sepharose der pH-Wert 6,5 gewählt.

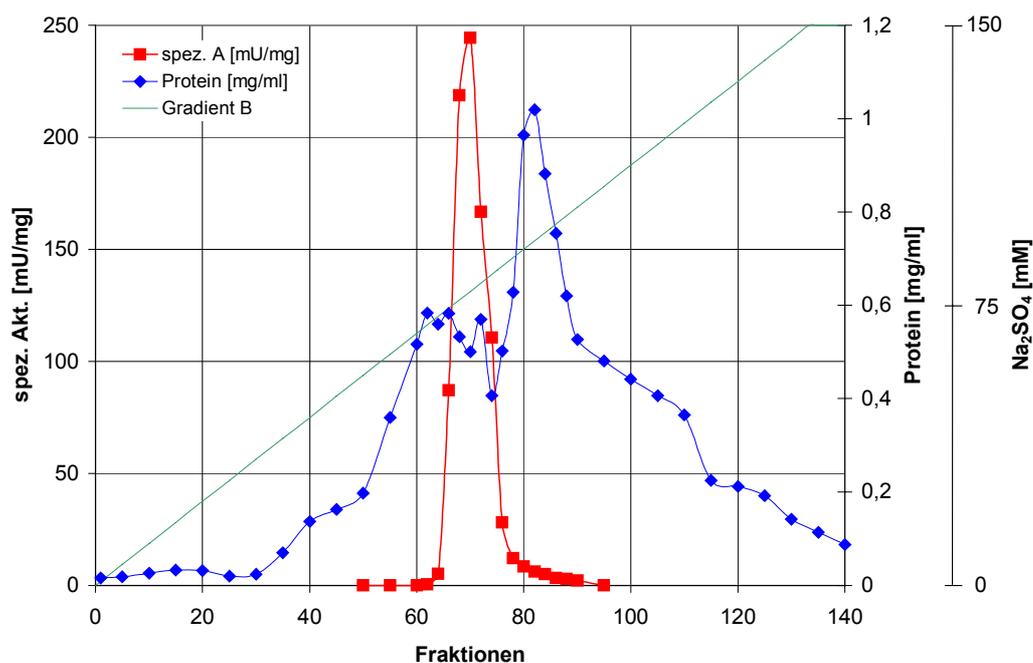
### Ergebnisse eines optimierten IEC-Säulenlaufs

Anhand mehrerer Säulenläufe wurden die Bedingungen im Hinblick auf die weitere Reinigung der D-Amidase angepasst. So erfolgte die Elution mit 0,15 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , die eine direkte Verwendung für den zweiten Reinigungsschritt (HIC) ermöglichte. Exemplarisch für eine IEC-Reinigung der D-Amidase sind die Ergebnisse eines optimierten IEC-Säulenlaufs unter den angegebenen Bedingungen (siehe V.3.2.5) in der Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tab. 10: Ergebnisse eines IEC-Säulenlaufs**

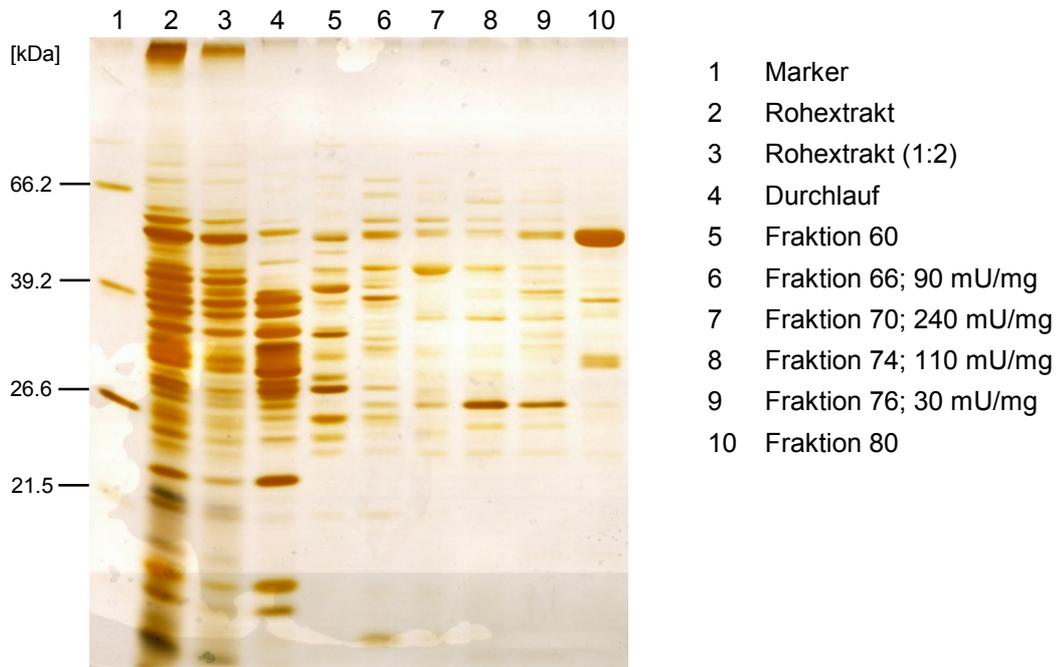
Akt. Rohex. [U]	16
Akt. IEC-Pool [U]	15
Ausbeute [%]	94
spez. Akt. <sub>Rohex.</sub> [mU/mg]	20
spez. Akt. <sub>Pool</sub> [mU/mg]	160
Reinigungsfaktor	8

Mit einer Ausbeute von 94% und einer Zunahme der spez. Akt. um den Faktor 8 zu 0,16 U/mg war die Reinigung sehr zufriedenstellend. In Abbildung 22 ist das Elutionsprofil mit Beginn des Gradienten dargestellt. Die D-Amidase eluierte innerhalb von 12 Fraktionen in einem Volumen von 144 ml. Unter Berücksichtigung eines Totvolumens von 200 ml entsprach dies einem Bereich von etwa 70 bis 90 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  innerhalb des Gradienten.



**Abb. 22: Elutionsprofil der optimierten IEC mit Beginn des Gradienten;**  
(Fraktionsvolumen = 12 ml)

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf der IEC-Reinigung anhand eines SDS-Polyacrylamidgels dargestellt.



**Abb. 23: SDS-PAGE (12,5%) der IEC: Rohextrakt, Durchlauf und ausgewählte Fraktionen.** In Spur 2 wurde 60 µg, in Spuren 3, 4 30 µg und in Spuren 5-10 jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

### 2.2.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

#### Bindung der D-Amidase an verschiedene HIC-Materialien

Nachdem die Stabilität der Aktivität in Anwesenheit von 0,8 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  überprüft wurde, konnte in einem Vorversuch die Bindung des Enzyms an die Adsorbentmaterialien Butyl-Sepharose 4 FF (B), Octyl-Sepharose 4 FF (O) und Phenyl-Sepharose CL-4B (P) untersucht werden. Wie unter V.3.2.2 beschrieben, wurden hierzu 50 µl Adsorber mit 1,2 ml Rohextrakt in 20 mM Kpi, pH 6,5 mit 0,8 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Adsorber abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit den Überständen und dem Rohextrakt als Kontrolle wurden ein Enzymtest durchgeführt und der Proteingehalt bestimmt.

Im Vergleich zur Kontrolle wurde in allen Überständen keine Aktivität nachgewiesen. Es wurde somit bei allen drei Materialien mit 50 µl Adsorber eine vollständige Bindung des Enzyms beobachtet. Der Proteingehalt in den Überständen betrug 1,2 mg/ml für (B), 1,3 mg/ml für (O) und 1,0 mg/ml für (P) und zeigt keine eindeutige Tendenz gegenüber der Kontrolle mit 2,7 mg/ml.

Für eine qualitative Aussage der Elution wurden die enzymgebundenen Adsorber nach einem Waschschrift in zwei Elutionsschritten mit je 1 ml 20 mM Kpi, pH 6,5 5 min inkubiert und die Elutions-Überstände abgenommen. In den Elutions-Überständen wurde eine Ausbeute der D-Amidase von 84% für (B), 5% für (O) und 12% für (P) bestimmt.

Zusammenfassend wurde für die folgende HIC-Reinigung die Butyl-Sepharose mit der größeren Selektivität und der vermutlich einfacheren Elution als geeigneter Adsorber verwendet.

### **Ergebnisse eines optimierten HIC-Säulenlaufs**

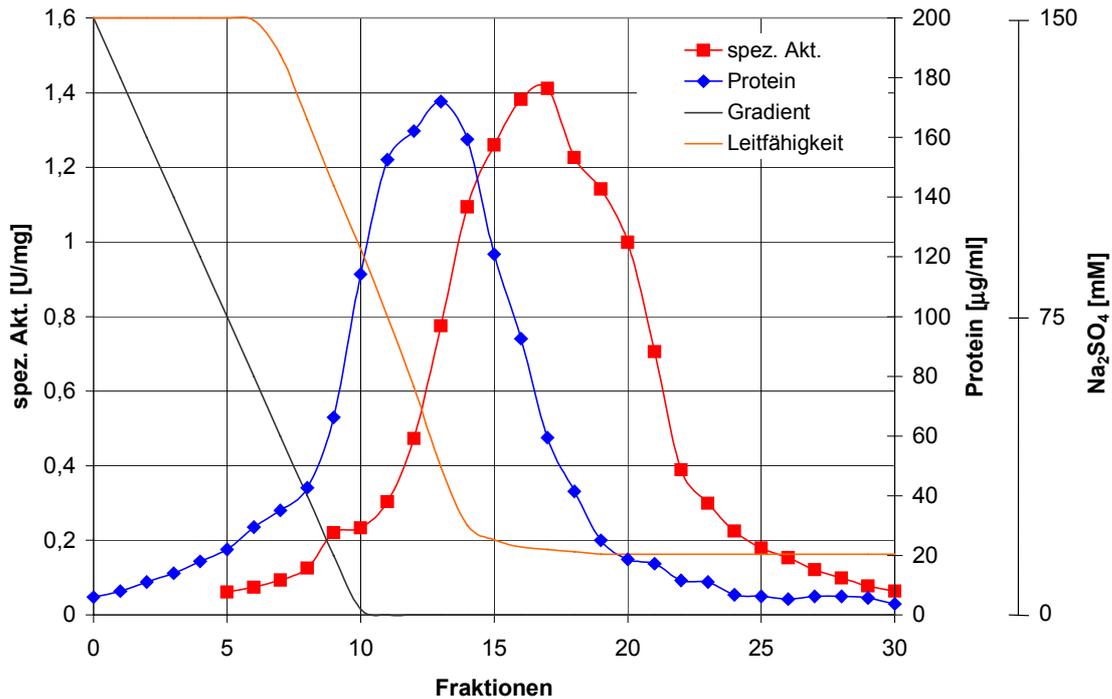
Anhand mehrerer Säulenläufe wurden die Bedingungen für eine verbesserte Reinigung der D-Amidase angepasst. So wurde aufgrund einer hohen Bindungsaffinität der D-Amidase an die Butyl-Sepharose die  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Äquilibriumspuffer von 0,8 M auf 0,15 M erniedrigt.

Weiterhin konnte zur Vereinfachung der Reinigung auf eine vorherige Konzentrierung der Probe durch Ultrafiltration verzichtet werden. So wurde im folgenden Säulenlauf der IEC-Pool anhand der Leitfähigkeit von 25 mS/cm auf eine  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 0,15 M eingestellt und direkt aufgetragen. Exemplarisch für eine HIC-Reinigung der D-Amidase sind die Ergebnisse eines optimierten HIC-Säulenlaufs unter den angegebenen Bedingungen (siehe V.3.2.5) in der Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tab. 11: Ergebnisse eines optimierten HIC-Säulenlaufs**

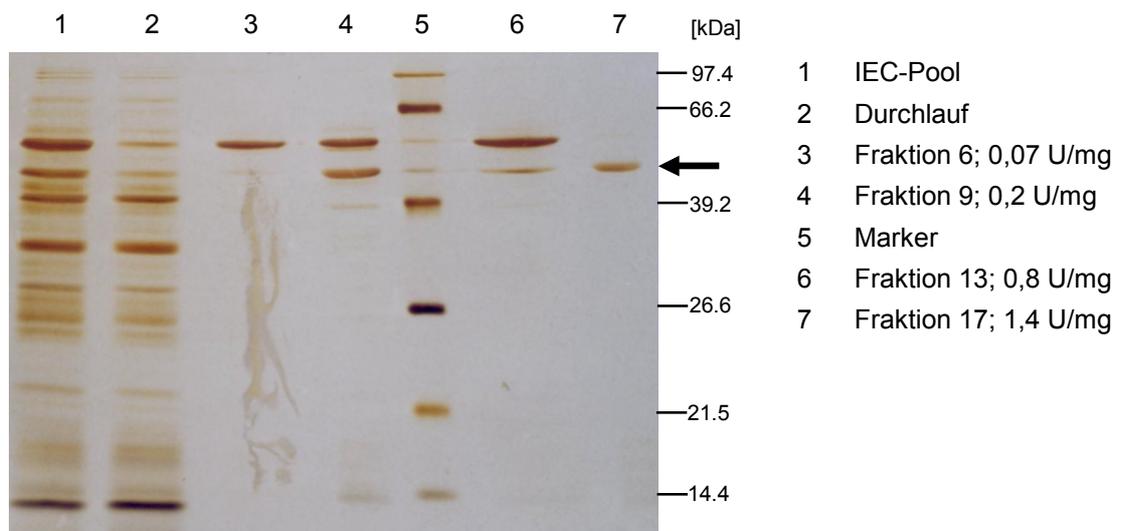
Akt. IEC-Pool [U]	3,2
Akt. HIC-Pool [U]	3,0
Ausbeute [%]	92
spez. Akt. <sub>IEC-Pool</sub> [U/mg]	0,10
spez. Akt. <sub>HIC-Pool</sub> [U/mg]	0,68
Reinigungsfaktor	7

Für die Reinigung berechnete sich eine Ausbeute von 92% und mit der spez. Akt. von 0,68 U/mg ein Reinigungsfaktor von 7. Das Elutionsprofil der HIC mit Beginn des Gradienten ist in Abb. 24 dargestellt.



**Abb. 24: Elutionsprofil der optimierten HIC mit Beginn des Gradienten**  
(Fraktionsvolumen = 4 ml)

Die D-Amidase eluierte innerhalb von 15 Fraktionen in einem Volumen von 60 ml. Die Elution des Enzyms begann bei 12 mS/cm, wobei das Elutionsmaximum bei einer Leitfähigkeit von 2,5 mS/cm beobachtet wurde, die dem 20 mM Kpi-Puffer entspricht. In Abbildung 25 sind eine SDS-PAGE-Analyse der Probe, des Durchlaufs sowie ausgewählte Fraktionen der HIC-Reinigung dargestellt.



**Abb. 25: SDS-PAGE (12,5%) der HIC: Probe, Durchlauf und ausgewählte Fraktionen.**  
Die Bande der D-Amidase ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. In Spuren 1 und 2 wurde 5 µg, in Spuren 3, 4 und 6, 7 wurden 2,5 µg Protein aufgetragen.

Mittels der optimierten HIC konnte ab Fraktion 17 (Abb. 25) zwar homogen gereinigte D-Amidase mit einer spez. Akt. von 1,4 U/mg erhalten werden, jedoch war die Ausbeute sehr gering. Daher wurden die vorangegangenen Fraktionen, die nur noch ein weiteres Begleitprotein enthielten, zusätzlich gepoolt und diese ergaben nach Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration eine 50% homogene D-Amidase mit einer spez. Akt. von 0,68 U/mg.

#### **2.2.4. Gelfiltration**

Für die Feinreinigung der 50% reinen D-Amidase, die noch ein Begleitprotein enthielt (siehe Abb. 25) und zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Verwendet wurde die in V.3.2.3 beschriebene Gelfiltrationssäule Superdex G-200 PG (Amersham Biosciences) unter den angegebenen Bedingungen.

Das Chromatogramm der Probe zeigte zwei Peaks mit einem mittleren Elutionsvolumen von 70,5 und 88,5 ml. Anhand eines Aktivitätstests wurde das Enzym in den Fraktionen des ersten Peaks detektiert und mittels einer Eichung für die D-Amidase ein natives Molekulargewicht von 171 kDa berechnet.

Die anschließende Aufkonzentrierung mit einer YM10-Membran (Amicon, Ausschlussgrenze 10 kDa) führten jedoch zu hohen Enzymverlusten bis auf 70%. Für den D-Amidase-Pool ergab sich eine spez. Akt. von 1,4 U/mg und somit ein Reinigungsfaktor von 2. Die spez. Akt. entsprach somit der Aktivität für die teilweise erhaltene homogene D-Amidase nach der HIC. Zusammenfassend war die Feinreinigung der D-Amidase mittels Gelfiltration durch die Abtrennung des Begleitproteins erfolgreich.

#### **2.2.5. Aufkonzentrierung der D-Amidase durch Ultrafiltration**

Nach den chromatographischen Reinigungen wurden die Fraktionen mit Enzymaktivität zu einem Pool vereinigt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

Die Filtration mit der YM10-Membran (Amicon, Ausschlussgrenze 10 kDa) führte, insbesondere nach der Gelfiltration, bei einer 16-fachen Aufkonzentrierung zu einer Wiederfindung des Enzyms von 30%. Aufgrund der hohen Enzymverluste ist diese Membran auf der Basis von regenerierter Cellulose nicht geeignet. Eine Vorbehandlung der Membran mit PEG 4000 führte zu keiner Verbesserung.

Im Gegensatz dazu waren folgende Ultrafiltrationen mit der Omega™-Membran, (Pall Gelman Laboratory, Ausschlussgrenze 10 kDa) auf der Basis einer modifizierten Polyethersulfon-Membran bei Aufkonzentrierungen nach der HIC um das 18-fache mit Ausbeuten über 90% zufriedenstellend.

### 2.2.6. Zusammenfassung und Diskussion der Reinigung

Die Reinigung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* zu homogen gereinigtem Enzym erfolgte in drei Chromatographieschritten. Die Ergebnisse der jeweiligen optimierten Säulenläufe sind in Tabelle 12 zusammengefasst. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die aufgeführten IEC- und HIC-Säulenläufe nicht aufeinander folgend durchgeführt wurden und somit die jeweilige Stufen-Ausbeuten angegeben wurden.

**Tab. 12: Zusammenfassung der Reinigung der D-Amidase**

Reinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Stufen-Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	0,02	100	-
IEC	0,16	94	8
HIC	0,68	92	7
GPC	1,4	30	2

Ohne eine vorherige Proteinfällung zur Grobreinigung wurde mit der Anionenaustausch-Chromatographie als ersten Reinigungsschritt bei einer Ausbeute von 94% und einer spez. Akt. von 0,16 U/mg eine 8-fache Anreicherung der D-Amidase erzielt. Mit 20 mM Kpi-Puffer bei pH 6,5 wurde eine vollständige Bindung der D-Amidase an das Säulenmaterial erreicht und durch die Elution mit Natriumsulfat eine direkte Verwendung für die HIC ermöglicht.

Bemerkenswert war beim zweiten Reinigungsschritt die hohe Affinität der D-Amidase an die Butyl-Sepharose, die eine Bindung des Enzyms in Gegenwart von 150 mM Natriumsulfat erlaubte. Unter diesen Bedingungen gelang es, einen Großteil an Fremdproteinen mit dem Durchlauf abzutrennen und die D-Amidase mit nur noch einem weiteren Fremdprotein zu eluieren. Bei einer Überdimensionierung der Säule führte diese hohe Bindungsstärke jedoch zu einer erschwerten und unvollständigen Elution des Proteins. Mittels der HIC konnte zwar teilweise homogen gereinigte D-Amidase erhalten werden, jedoch war die Ausbeute sehr gering. Daher wurde mit den vorangegangenen Fraktionen bei einer Ausbeute von 92% eine 50% homogene D-Amidase mit einer spez. Akt. von 0,68 U/mg erhalten und ein Reinigungsfaktor von 7 berechnet.

Die Feinreinigung der 50% reinen D-Amidase sowie eine Bestimmung des nativen Molekulargewichts erfolgte durch Gelfiltration. Die homogen gereinigte D-Amidase nach Gelfiltration ergab eine spez. Akt. von 1,4 U/mg und insgesamt ein Reinigungsfaktor von 2. Bisher führte jedoch die Gelfiltration mit einer anschließenden Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration zu hohen Enzymverlusten von 70%.

Zusammenfassend berechnet sich für die Reinigung der D-Amidase bei einer spez. Akt. mit 20 mU/mg im Rohextrakt und der spez. Akt. von 1,4 U/mg für das reine Enzym ein Reinigungsfaktor von 70. Aus den jeweiligen Stufen-Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte lässt sich eine Gesamtausbeute von 25% abschätzen.

Zum Vergleich erfolgte die Reinigung vergleichbarer Enzyme, die ebenfalls D-Aminosäureamide umsetzen, aus *Comamonas acidovorans* (Yamamoto et al., 1996) und *Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38 (Asano et al., 1989b) in 6 bzw. 8 Reinigungsschritten (Tab. 13). Für die Amidase aus *Comamonas* ließ sich bei einer Ausbeute von 34% eine 370-fache Reinigung und für das Enzym aus *Ochrobactrum* eine 2800-fache Reinigung bei einer Ausbeute von 17% erzielen.

**Tab. 13: Vergleich der Reinigung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* mit Amidasen aus *Comamonas acidovorans* und *Ochrobactrum anthropi***

<b><i>V. paradoxus</i></b>	<b><i>C. acidovorans</i></b>	<b><i>O. anthropi</i> C1-38</b>
1. IEC: Q-Sepharose	1. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	1. Fällung Protaminsulfat
2. HIC: Butyl-Sepharose	2. Ultrazentrifugation	2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung
3. GPC: Sephadex	3. IEC: DEAE-Cellulose	3. IEC: DEAE-Toyopearl
	4. HIC: Phenyl-Sepharose	4. HIC: Butyl-Toyopearl
	5. IEC: DEAE-Cellulose	5. HIC: Butyl-Toyopearl
	6. GPC: Sephacryl	6. GPC: Sephacryl
		7. Hydroxylapatit
		8. IEC: DEAE-5PW

Grundsätzlich wurde mit zunehmender Abtrennung von Fremdprotein und durch Verdünnung der D-Amidase eine Abnahme der Stabilität beobachtet. Dem entsprechend konnten gereinigte und verdünnte Enzymchargen durch Zugabe von BSA (1 mg/ml) stabilisiert werden. Obwohl im Vorversuch mit Dithiothreitol (1 mM) als Oxidationsschutz und EDTA (1 mM) nur eine geringfügige Stabilisierung der partiell gereinigten D-Amidase festgestellt wurde (siehe 2.3.1), ist möglicherweise eine Zugabe dieser Substanzen im Verlauf der Reinigung doch von Vorteil und reduziert die Enzymverluste bei der Gelfiltration und anschließenden Ultrafiltration.

Trotz der geringen Menge an Enzym in *Variovorax paradoxus* und der geschilderten Probleme bei der Kultivierung, gelang es mit dieser Reinigungsstrategie für die folgende biochemische und proteinchemische Charakterisierung der D-Amidase genügend reines Enzym bereitzustellen.

## 2.3. Biochemische Charakterisierung der D-Amidase

### 2.3.1. Aktivierung und Inhibierung der D-Amidase

#### Mögliche Enzymaktivierung durch Metallionen oder Dithiothreit

Für das homogen gereinigte Enzym wurde bisher eine spezifische Aktivität von 1,4 U/mg bezüglich DL-Tle-NH<sub>2</sub> ermittelt. Vor einer weiteren Charakterisierung des Enzyms sollte zuvor eine mögliche Aktivierung durch Metallionen oder Dithiothreit (DTT) untersucht werden.

Verwendet wurde 50% homogenes Enzym (nach HIC). Die Konzentration der Ionen im Enzymtest betrug 5 mM, DTT wurde 1 mM und 10 mM zugesetzt. Die Enzymtestansätze wurden zunächst 30 min ohne Substrat bei 25°C vorinkubiert, durch Zugabe von DL-Tle-NH<sub>2</sub> gestartet und 60 min inkubiert. Die ermittelten Restaktivitäten sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 14: Mögliche Enzymaktivierung durch Metallionen (5 mM) oder DTT, Kontrolle ohne Zusatz = 100%**

	Restaktivität [%]		Restaktivität [%]
Mg <sup>2+</sup>	100	Zn <sup>2+</sup>	99
Ca <sup>2+</sup>	102	Co <sup>2+</sup>	101
Mn <sup>2+</sup>	101	DTT 1 mM	118
Ni <sup>2+</sup>	99	DTT 10 mM	103

Für die aufgeführten Me<sup>2+</sup>-Ionen wurde kein Einfluss auf die Enzymaktivität festgestellt. Mit 1 mM DTT wurde eine leichte Aktivitätssteigerung auf 118% bestimmt, jedoch mit 10 mM eine Aktivität in Höhe des Kontrollwertes.

#### Enzyminhibierung

Untersucht wurde eine mögliche Inhibierung der D-Amidase mit verschiedenen Metallionen in Konzentrationen 1 und 0,1 mM im Enzymtest. Ebenso getestet wurden der Serin-Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), die Thiol-Gruppen reaktive Reagenzien Iodacetamid, 5,5'-Dithiobis-(2-Nitro-benzoesäure) (Ellman-Reagenz, DNTB) und 4-Hydroxy-Quecksilberbenzoat ("p-Chlormercuribenzoat", PCMB); das Carbonylreagenz Hydroxylamin und die Komplexbildner EDTA und o-Phenanthrolin. Vor Bestimmung der Restaktivität wurde das Enzym 30 min mit den potenziellen Inhibitoren bei 30°C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tab. 15: Restaktivität der D-Amidase mit verschiedenen Inhibitoren**

Inhibitoren	Restaktivität [%] [Inhib.] = 1 mM	Restaktivität [%] [Inhib.] = 0,1 mM
HgCl <sub>2</sub>	0	0
AgNO <sub>3</sub>	0	0
Pb(Ac) <sub>2</sub>	104	100
CuSO <sub>4</sub>	1,3	88
FeSO <sub>4</sub>	69	92
FeCl <sub>3</sub>	100	97
Phenylmethylsulphonylfluorid	0	6,9
Iodacetamid	93	101
Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	79	90
4-Hydroxy-Quecksilberbenzoat	0,7	38
Hydroxylamin	100	100
Komplexbildner	Restaktivität [%] [Inhib.] = 10 mM	Restaktivität [%] [Inhib.] = 1 mM
EDTA	104	104
o-Phenanthrolin	96	99

Eine vollständige Inhibierung lag in Anwesenheit von Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, 1 mM PMSF vor und nahezu vollständig mit 1 mM PCMB und 1 mM Cu<sup>2+</sup>. Mit 1 mM Fe<sup>2+</sup> (69%) und DTNB (79%) wurde ein partieller Aktivitätsverlust beobachtet. Die Abhängigkeit der Inhibierung von den Konzentrationen war besonders bei Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> und PCMB von Bedeutung, bei denen jeweils mit der höheren Inhibitor-Konzentration auch eine stärkere Inhibierung erreicht wurde.

Mit Restaktivitäten über 90% konnte für Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Iodacetamid, Hydroxylamin, EDTA und o-Phenanthrolin keine signifikante Inhibierung der D-Amidase festgestellt werden.

### 2.3.2. Substratspektrum

Als mögliche Substrate wurden Carbonsäureamide, Dicarbonsäureamide, Aminosäure- und  $\alpha$ -Hydroxysäureamide sowie acylierte Aminosäureamide untersucht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte für die Aminosäureamide, außer für Prolin mittels HPLC. Für alle anderen aufgeführten Substrate wurde die Produktbildung durch Bestimmung der Ammonium-Bildung quantifiziert.

Da die Aktivitäten im Vergleich zum Standardsubstrat DL-Tle-NH<sub>2</sub> stark variierten, wurde im Vorversuch die Enzymmenge bestimmt, die für die Messung eines Umsatzes von maximal 10% des Substrats benötigt wird. Die 50%-homogene D-Amidase (nach HIC) musste in verschiedenen Verdünnungsstufen bis zu 1:100 eingesetzt werden, für die jeweils Kontrollen mit dem DL-Tle-NH<sub>2</sub> mitgeführt wurden. Die Aktivität wurde für jedes Substrat anhand von Doppelbestimmungen bei zwei Inkubationszeiten, 20 und 30 min, ermittelt.

#### Säureamide

Die Säureamide wurden im Enzymtest in einer Konzentration von 40 mM eingesetzt, mit Ausnahme aufgrund der begrenzten Löslichkeit von Bernsteinsäurediamid, Adipinsäurediamid jeweils 10 mM und Benzylamid 20 mM. Im Vergleich zur spez. Akt. von 0,5 U/mg für DL-Tle-NH<sub>2</sub>, die für einen direkten Vergleich gleich 1 gesetzt wurde, ergaben sich folgende Aktivitäten.

**Tab. 16: Spez. Akt. für verschiedene Säureamide mit 50%-reinem Enzym**

Substrat	spez. Akt. [U/mg]	Aktivität bzgl. DL-Tle-NH <sub>2</sub>
DL-Tle-NH <sub>2</sub>	0,51	1
Formamid	0,06	0,13
Acetamid	2,1	4,0
Propionamid	12	26
Buttersäureamid	17	37
Isobuttersäureamid	15	33
Valeriansäureamid	16	36
Acetessigsäureamid	58	130
Malonsäurediamid	1,5	2,9
Bernsteinsäurediamid	1,1	2,1
Adipinsäurediamid	7,0	14
Acrylamid	4,0	7,7
Benzylamid	2,6	5,2
Nicotinamid	8,5	19
L-Asparagin	0,08	0,15
D-Asparagin	< 0,02	< 0,05

Mit Ausnahme von Formamid und Aspargin wurden für die aufgeführten Säureamide im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> um den Faktor 2 bis 130 deutlich höhere Aktivitäten gemessen. In der Reihe der geradkettigen Säureamide nahm die Aktivität vom Formamid, 0,06 U/mg, bis zum Buttersäureamid mit 17 U/mg stark zu. Das verzweigte Isobuttersäureamid mit 15 U/mg und Valeriansäureamid mit 16 U/mg zeigten Aktivitäten in der gleichen Größenordnung wie Buttersäureamid.

Ebenfalls mit einer C<sub>4</sub>-Kette wurde für das Amid der Acetessigsäure mit 58 U/mg die höchste Aktivität bestimmt, die 130-fach größer ist als für DL-Tle-NH<sub>2</sub>. Die Diamide der C<sub>4</sub>- und C<sub>5</sub>-Dicarbonsäuren, Malon- und Bernsteinsäure, werden im Vergleich dazu mit 1,5 und 1,1 U/mg deutlich schlechter umgesetzt, während für das homologe Adipinsäurediamid mit 7 U/mg wieder eine deutlich höhere Aktivität vorliegt. Über eine mögliche zweifache oder stufenweise Deamidierung dieser Diamide ist anhand der NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Bestimmung keine Aussage möglich. Für beide Enantiomere des Asparagins, das Monoamid der 2-Amino-bernsteinsäure, wurden jedoch nur noch geringe Restaktivitäten von 15% für L-Asn bzw. < 5% für D-Asn bestimmt.

Gegenüber Propionamid wurde das ungesättigte Acrylamid mit 4 U/mg deutlich schlechter akzeptiert. Für die beiden aromatischen Carbonsäureamide ist bemerkenswert, dass Nicotinamid mit 8,5 U/mg besser umgesetzt wird als Benzylamid mit 2,6 U/mg.

Harnstoff wurde ebenso wie Formamid deutlich schlechter umgesetzt als Tle-NH<sub>2</sub>. Die Messung erfolgte bisher mit angereinigtem Enzym (nach IEC) und ergab eine Restaktivität von 12% im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub>.

### **Aminosäureamide und $\alpha$ -Hydroxysäureamide**

Bis auf einige Ausnahmen standen bei den Aminosäure- und  $\alpha$ -Hydroxysäureamiden jeweils beide Enantiomere zur Verfügung. In der 4. Spalte wurde für einen weiteren Vergleich die Aktivität für das geringere Enantiomer gleich 1 gesetzt und daraus eine relative Aktivität für das bevorzugte Enantiomer berechnet (siehe Tab. 17).

Im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> wurden für alle aufgeführten D-Aminosäureamide um den Faktor 13 bis 890 deutlich höhere Aktivitäten gemessen. In der Reihe der aliphatischen D-AS-NH<sub>2</sub> wurde für D-Leu-NH<sub>2</sub> mit 223 U/mg eine 400-fache Aktivität, für D-Ala-NH<sub>2</sub> (23 U/mg) eine etwa 40-fache und für das ähnlich verzweigte D-Val-NH<sub>2</sub> mit 6,9 U/mg eine 13-fach höhere Aktivität gemessen.

Wie bereits bei den Säureamiden festgestellt, zeigt der Aktivitätsunterschied zwischen D-Leu-NH<sub>2</sub> und D-Ala-NH<sub>2</sub>, dass mit der verzweigten C<sub>5</sub>-Kette des Leucins im Vergleich zur 2-Amino-propansäure das größere Substrat bevorzugt wird. Mit der stark abnehmenden Aktivität in der Reihe Leu, Val und Tle hat jedoch die Verzweigung an C-3 der Aminosäuren den größten Einfluss auf die Aktivität der D-Amidase. Die entsprechenden Aktivitäten für die L-AS-NH<sub>2</sub> zeigen eine ähnliche Tendenz im Bereich von 0,17 U/mg für Ile, 0,59 U/mg für Val bis 15 U/mg für Leu.

Tab. 17: Spez. Akt. der Amino- und  $\alpha$ -Hydroxysäureamide mit 50% reinem Enzym

Substrat	spez. Akt. [U/mg]	Aktivität bzgl.-DL-Tle-NH <sub>2</sub>	Rel. Aktivität bzgl. D und L
DL-Tle-NH <sub>2</sub>	0,56	1	-
D-Ala-NH <sub>2</sub>	23	44	3,0
L-Ala-NH <sub>2</sub>	7,7	15	1
D-Leu-NH <sub>2</sub>	220	400	15
L-Leu-NH <sub>2</sub>	15	26	1
D-Val-NH <sub>2</sub>	6,9	13	11
L-Val-NH <sub>2</sub>	0,59	1,2	1
L-Ile-NH <sub>2</sub>	0,17	0,35	-
D-Phe-NH <sub>2</sub>	500	890	4,6
L-Phe-NH <sub>2</sub>	110	190	1
L-Tyr-NH <sub>2</sub>	47	100	-
DL-Trp-NH <sub>2</sub>	86	155	2,5
L-Trp-NH <sub>2</sub>	34	62	1
DL-Met-NH <sub>2</sub>	130	230	2,7
L-Met-NH <sub>2</sub>	48	86	1
D-Pro-NH <sub>2</sub>	12	24	1
L-Pro-NH <sub>2</sub>	28	56	2,3
D-Lac-NH <sub>2</sub>	29	59	1
L-Lac-NH <sub>2</sub>	33	66	1,1
DL-MHA-NH <sub>2</sub>	82	150	-

Interessant ist auch ein Vergleich der relativen Aktivitäten der Enantiomere. Mit Ausnahme von Prolin- und Milchsäureamid (Lac-NH<sub>2</sub>) zeigte sich für alle Substrate, bei denen beide Enantiomere getrennt vorlagen, eine Bevorzugung des D-Enantiomers. Für Ala mit dem Faktor 3 war die Selektivität bezüglich dem D-Enantiomer sehr gering, während für Val und Leu mit den Faktoren 11 bzw 15 schon höhere D-Selektivitäten beobachtet wurden.

Für das aromatische D-Phe-NH<sub>2</sub> wurde die höchste Aktivität mit etwa 500 U/mg bestimmt, die somit um den Faktor 900 höher ist als für DL-Tle-NH<sub>2</sub>. Das entsprechende L-Enantiomer ergab 110 U/mg, sodass daraus nur eine geringe D-Selektivität resultiert. L-Tyr-NH<sub>2</sub> und L-Trp-NH<sub>2</sub> wurden mit 48 U/mg bzw. 34 U/mg schon deutlich schlechter umgesetzt als L-Phe-NH<sub>2</sub>. Mit dem racemischem Trp-NH<sub>2</sub> lässt sich eine Aktivität von 86 U/mg berechnen und insgesamt resultiert auch hier eine geringe D-Selektivität. Ein ähnliches Verhältnis wurde für Methioninamid beobachtet mit 130 U/mg für das Racemat und 48 U/mg für L-Met-NH<sub>2</sub>.

Bemerkenswert kehrte sich die Selektivität der D-Amidase für Pro-NH<sub>2</sub> um. Hier wurde das L-Enantiomer mit 28 U/mg um eine 2,3-fach größere Aktivität umgesetzt als das D-Enantiomer. In etwa gleicher Größenordnung wie D-Alaninamid wurden die Milchsäureamide D- und L-Lac-NH<sub>2</sub> mit etwa 30 U/mg nahezu gleich umgesetzt. Für das methioninanaloge, racemische  $\alpha$ -Hydroxy- $\gamma$ -methylmercapto-buttersäure (MHA-NH<sub>2</sub>) war mit 82 U/mg eine etwas geringere Aktivität als für DL-Met-NH<sub>2</sub> vorhanden. Racemisches Carnitinamid, das  $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -trimethylammonio-buttersäureamid wurde gegenüber DL-Tle-NH<sub>2</sub> mit einer Restaktivität unterhalb von 3% umgesetzt.

### Acylierte Aminosäureamide

Mit dem Interesse an einer Racematspaltung von acylierten Aminosäureamiden (siehe II.1.2) wurde die D-Amidase auch auf eine Aktivität für verschiedene Acetyl-Aminosäureamide und Formyl-Valinamid überprüft. Das verwendete Enzym war eine partiell gereinigte D-Amidase (nach IEC).

**Tab. 18: Spez. Akt. für acylierte Aminosäureamide mit partiell gereinigter D-Amidase**

Substrat	spez. Akt. [mU/mg]	Aktivität bzgl. Tle-NH <sub>2</sub> [%]
DL-Tle-NH <sub>2</sub>	200	100
DL-Acetyl-Tle-NH <sub>2</sub>	0	0
DL-Acetyl-Met-NH <sub>2</sub>	< 3	< 1,5
D-Acetyl-Val-NH <sub>2</sub>	< 1	< 0,5
L-Acetyl-Val-NH <sub>2</sub>	0	0
DL-Formyl-Val-NH <sub>2</sub>	670	340
Substrat	spez. Akt. [mU/mg]	Aktivität bzgl. Val-NH <sub>2</sub> [%]
DL-Val-NH <sub>2</sub>	870	100
DL-Formyl-Val-NH <sub>2</sub>	670	77

Für die vorliegenden Acetyl-Aminosäureamide wurde im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> nahezu keine Aktivität der D-Amidase festgestellt. Gegensätzlich dazu akzeptiert das Enzym racemisches Formyl-Valinamid, das um den Faktor 3,4 besser umgesetzt wird als DL-Tle-NH<sub>2</sub>. Dies entspricht in bezug auf DL-Val-NH<sub>2</sub> einer Restaktivität von 77%.

### 2.3.3. Bestimmung der $K_M$ -Werte für DL-Tle-NH<sub>2</sub>, D-Leu-NH<sub>2</sub> und D-Phe-NH<sub>2</sub>

Für das Standardsubstrat DL-Tle-NH<sub>2</sub> wurde zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes mit angereinigtem Enzym (nach IEC) die Aktivität im Bereich von 0,2 bis 30 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub> nach 10, 20, 30 und 40 min Inkubation ermittelt. Um eine mögliche Substratüberschussinhibierung zu beobachten, dienten Ansätze mit 100 und 200 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub>. Die Aktivität berechnete sich aus der Steigung der Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit.

Unter Berücksichtigung einer Substratinhibierung in der Michaelis-Menten-Gleichung ergab sich eine deutlich bessere Anpassung an die Messwerte mit einem  $K_M$ -Wert von 0,74 mM und einem  $K_I$ -Wert von 640 mM bezogen auf das racemische Substrat DL-Tle-NH<sub>2</sub> (siehe Abb. 26). Mit der homogen gereinigten D-Amidase wurde eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  von 1,4 U/mg für DL-Tle-NH<sub>2</sub> bestimmt.

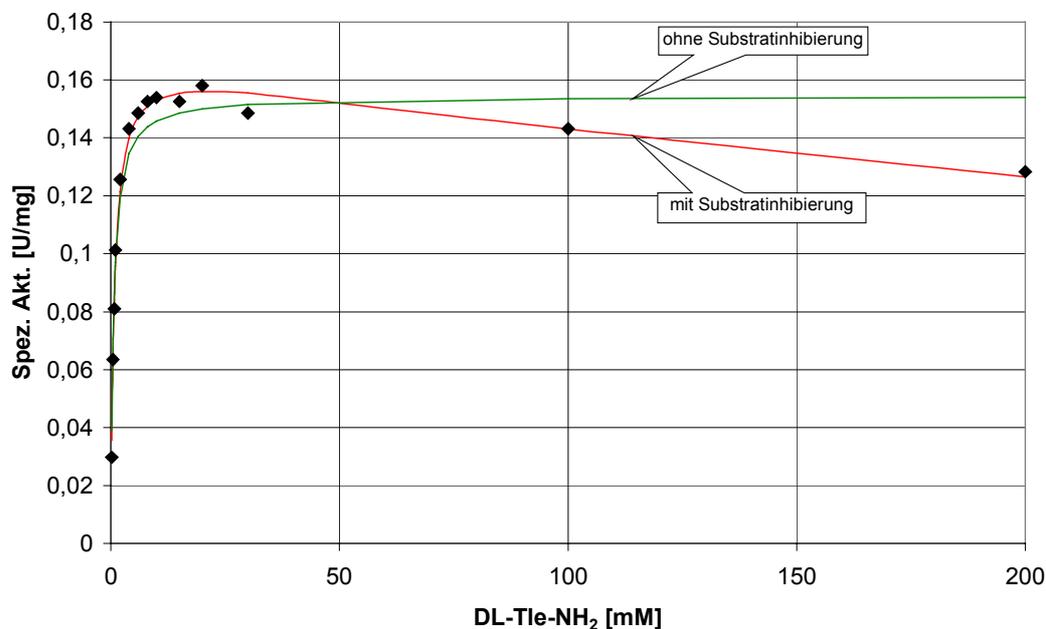


Abb. 26: Michaelis-Menten-Plot für 0,2 bis 200 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub>

Ebenso wurde für die Substrate D-Leu-NH<sub>2</sub> und D-Phe-NH<sub>2</sub> mit angereinigter D-Amidase (nach IEC) im Bereich von 0,5 mM bis 40 mM nach 15 min die Aktivität bestimmt (siehe Abb. 27). Zusammenfassend ergaben sich für die drei Substrate somit folgende  $K_M$ , und  $K_I$ -Werte.

Tab. 19:  $K_M$  und  $K_I$ -Werte für DL-Tle-NH<sub>2</sub>, D-Leu-NH<sub>2</sub> und D-Phe-NH<sub>2</sub>

Substrat	$K_M$ [mM]	$K_I$ [mM]
DL-Tle-NH <sub>2</sub>	0,74	640
D-Leu-NH <sub>2</sub>	0,70	380
D-Phe-NH <sub>2</sub>	0,62	120

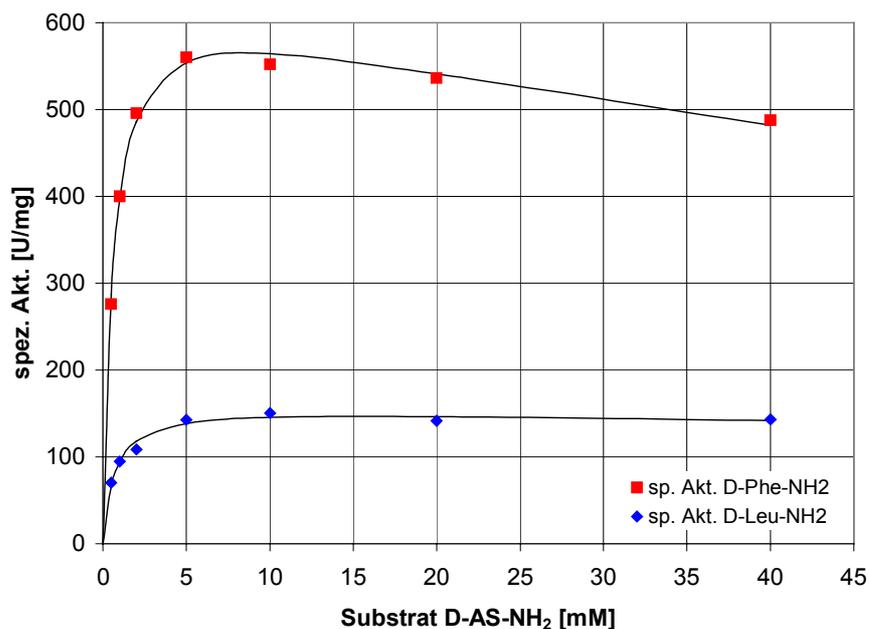


Abb. 27: Michaelis-Menten-Plot für D-Phe-NH<sub>2</sub> und D-Leu-NH<sub>2</sub>

#### 2.3.4. Bestimmung der Enantioselektivität für ausgewählte Substrate und Berechnung der E-Werte

##### Enantioselektivität für D,L-Tle-NH<sub>2</sub>

Für eine Eignung der D-Amidase zur Racematspaltung wurde mit racemischem Tle-NH<sub>2</sub> die Enantioselektivität der Produktbildung in Abhängigkeit vom Umsatz verfolgt. Zur quantitativen Beurteilung konnte daraus der von Chen eingeführte E-Wert (enantiomeric ratio) berechnet werden (siehe V.3.3.6; Chen et al., 1982).

Tab. 20: Enantioselektivität für D-Tle in Abhängigkeit vom Umsatz mit partiell gereinigter D-Amidase nach IEC

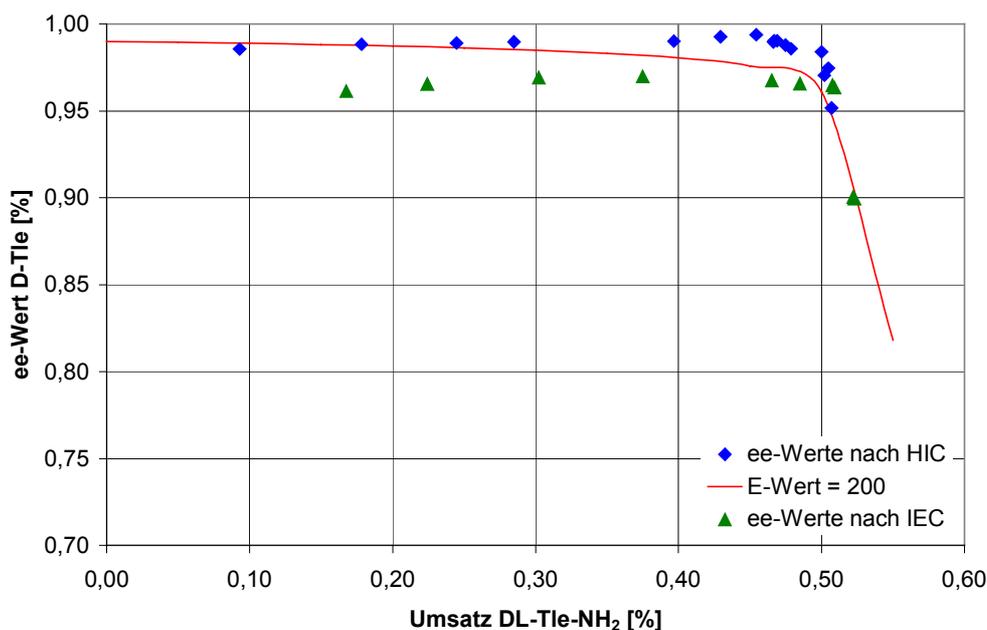
D-Amidase nach IEC		
Umsatz [%]	ee-Wert D-Tle [%]	E-Wert
30	96,9	97
38	97,0	120
47	96,8	160
49	96,6	180
50	96,5	330
52	90,0	94

Bereits mit angereinigtem Enzym nach IEC ließen sich bei einem Umsatz zwischen 45 und 50% Enantioselektivitäten von mindestens 96,6% bestimmen und daraus E-Werte über 150 berechnen (Tab. 20 und Abb. 30).

Im Vergleich hierzu ergaben sich mit 50% reinem Enzym nach der HIC im Bereich von 45 und 50% Umsatz noch höhere Enantioselektivitäten zwischen 99,4 und 98,6% ee. Bei Umsätzen größer als 50% ergaben sich wieder deutlich niedrigere ee-Werte bis auf 95,2%. Für diese Enzymcharge berechneten sich somit E-Werte über 200 (Tab. 21 und Abb. 30).

**Tab. 21: Enantioselektivität für D-Tle in Abhängigkeit vom Umsatz mit 50% reiner D-Amidase nach HIC**

D-Amidase nach HIC		
Umsatz [%]	ee-Wert D-Tle [%]	E-Wert
18	98,8	210
29	99,0	280
40	99,0	400
43	99,2	610
45	99,4	830
47	99,1	610
48	98,6	450
50	97,1	310
51	95,2	190



**Abb. 28: Enantioselektivität für D-Tle in Abhängigkeit vom Umsatz mit angereinigter D-Amidase (nach IEC) und 50% homogener D-Amidase (nach HIC)**

Mit einem E-Wert über 100 kann mit beiden Enzymchargen die Racematspaltung mit einer erwünschten, nahezu vollständiger Umsetzung des D-Tle-NH<sub>2</sub> ermöglicht werden.

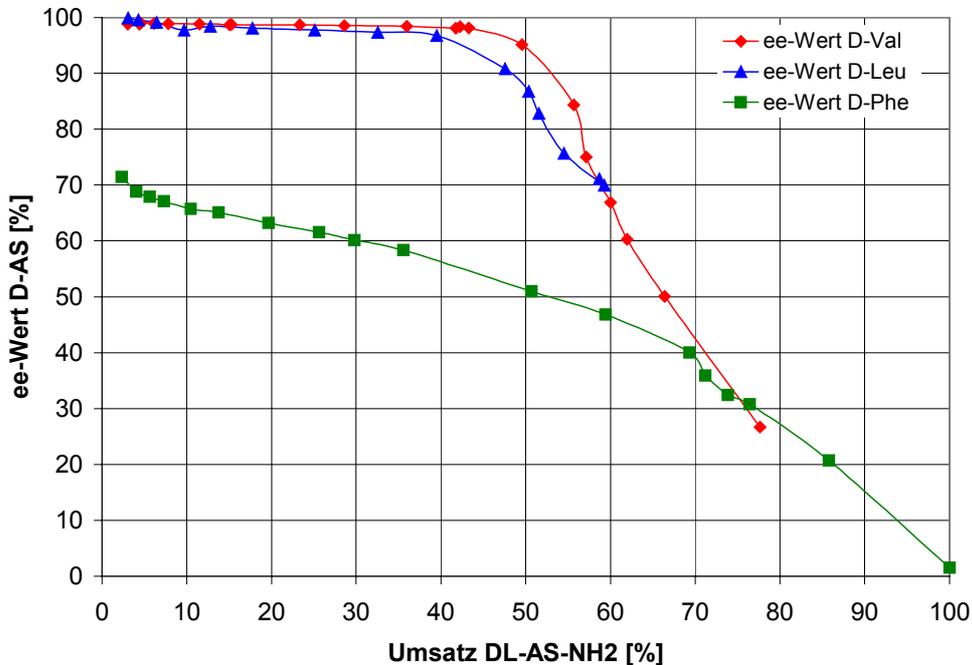
### Enantioselektivitäten für DL-Val-NH<sub>2</sub>, DL-Leu-NH<sub>2</sub> und DL-Phe-NH<sub>2</sub>

Analog wurde für racemisches Valin-, Leucin- und Phenylalaninamid mit partiell gereinigtem Enzym (nach IEC) die Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Umsatz bestimmt. In der folgenden Tabelle sind exemplarisch die ee-Werte, insbesondere im Bereich von 50% Umsatz, und die daraus berechneten E-Werte aufgeführt.

**Tab. 22: Enantioselektivitäten für D-Val, D-Leu und D-Phe**

D-Amidase nach IEC		
DL-Val-NH <sub>2</sub>		
Umsatz [%]	ee-Wert D-Val [%]	E-Wert
3	98,9	190
15	98,7	180
29	98,5	200
42	98,1	220
50	95,1	140
57	75,0	56
DL-Leu-NH <sub>2</sub>		
Umsatz [%]	ee-Wert D-Leu [%]	E-Wert
4	99,6	470
18	98,1	130
33	97,3	120
40	96,7	110
48	90,8	53
51	86,7	41
DL-Phe-NH <sub>2</sub>		
Umsatz [%]	ee-Wert D-Phe [%]	E-Wert
4	68,8	5,6
14	65,1	5,2
26	61,5	5,1
36	58,3	5,2
51	50,9	5,1

Im Bereich von 40 bis 50% Umsatz ergaben sich Enantioselektivitäten für D-Val im Bereich von 98,1 bis 95,1% ee, für D-Leu im Bereich von 96,7 bis 90,8% ee und für D-Phe im Bereich von 55% ee. Für das racemische Val-NH<sub>2</sub> und Leu-NH<sub>2</sub> berechnen sich mittlere E-Werte größer 100 und für Phe-NH<sub>2</sub> ein E-Wert von 5.



**Abb. 29: Enantioselektivität für D-Val, D-Leu und D-Phe in Abhängigkeit vom Umsatz**

Im Hinblick auf eine Racematspaltung mit einer erwünschten nahezu vollständigen Umsetzung des D-Enantiomers ist somit die D-Amidase für DL-Val-NH<sub>2</sub> und DL-Leu-NH<sub>2</sub> grundsätzlich geeignet. Eine Verwendung für DL-Phe-NH<sub>2</sub> kann ausgeschlossen werden. Darauf deuteten auch schon die relativen Aktivitäten der reinen Enantiomere, die sich nur um den Faktor 4,6 unterscheiden.

### 2.3.5. Bestimmung des Temperaturoptimums und der Aktivierungsenergie

#### Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums diente homogen gereinigtes Enzym mit einer spez. Akt. von 1,4 U/mg. Es erfolgte eine Bestimmung der Aktivität von 20 bis 50°C in 5°C-Schritten, wobei der Bereich von 40 bis 55°C mit weiteren Messungen näher untersucht wurde. Die Inkubationszeit wurde mit 15 min relativ kurz gewählt.

Aus Abb. 30 lässt sich für die D-Amidase das Temperaturoptimum im Bereich von 47 bis 49°C ermitteln.

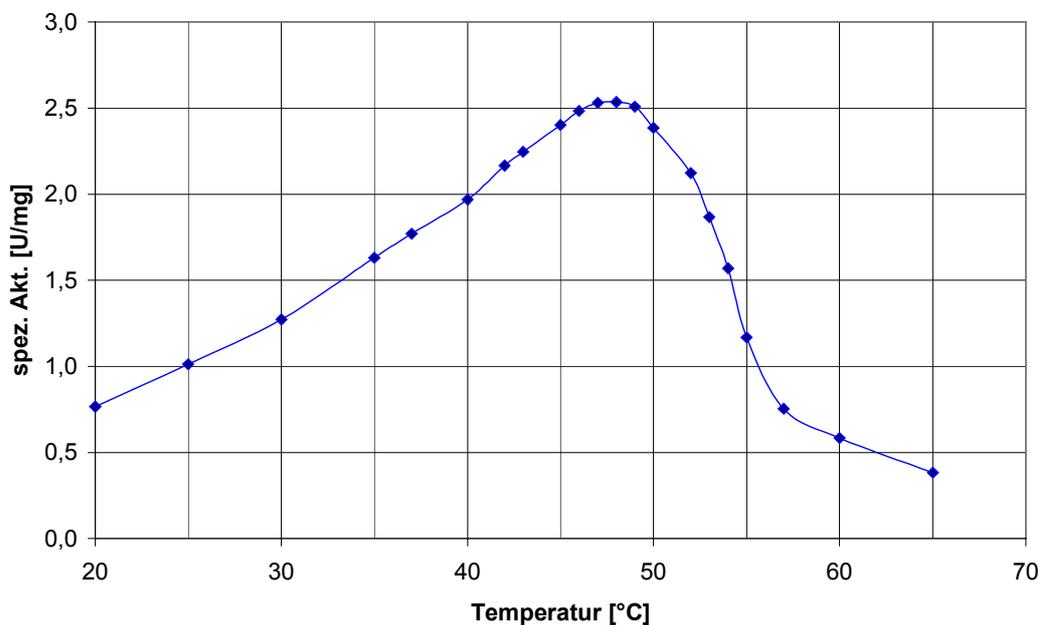


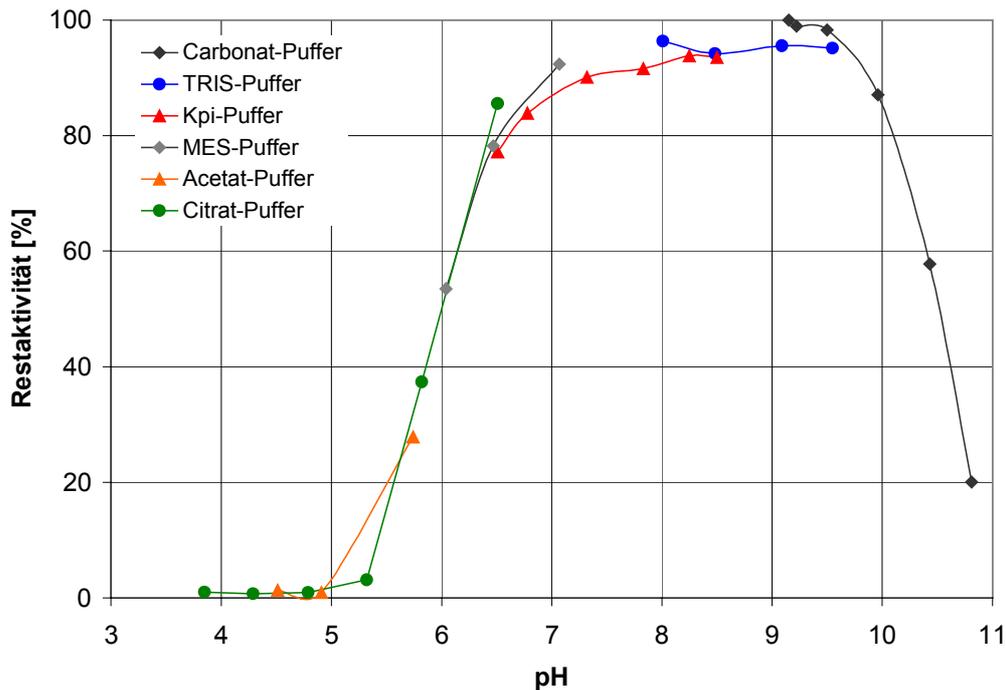
Abb. 30: Temperaturoptimum der D-Amidase

#### Aktivierungsenergie

Aus Abbildung 30 zeigt sich, dass im Temperaturbereich bis 45°C die Enzymaktivität der D-Amidase nahezu linear mit der Inkubationstemperatur zunimmt. Aus diesem Abschnitt der Temperaturoptimumkurve konnte die Aktivierungsenergie  $E_A$  der Enzymreaktion nach der Arrhenius-Gleichung bestimmt werden (siehe V.3.3.7).

Die aus der Steigung des Arrhenius-Diagramms (Abb. 31) errechnete Aktivierungsenergie der D-Amidase-Reaktion beträgt 35 kJ/mol.





**Abb. 32: pH-Optimum der D-Amidase**

Die Abbildung 32 zeigt ein breites pH-Optimum im Bereich von 7,0 bis 9,5 mit Restaktivitäten über 90% bezogen auf die größte Aktivität mit 0,18 U/mg (100%) im Na-Carbonat-Puffer bei pH 9,2. Im Bereich von 8 bis 9,5 wurde für den Tris-Puffer eine nahezu gleiche Aktivität um etwa 95% ermittelt. Im Standardenzymtest mit 100 mM Kpi (pH 7,5) war die Aktivität mit 92% nur geringfügig kleiner als die maximale Aktivität bei pH 9,2.

### 2.3.7. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Mit der homogen gereinigten D-Amidase erfolgte eine Sequenzierung des N-Terminus. Hierzu wurde in einem 12,5%igem SDS-Polyacrylamidgel 20 bis 50 µg Protein aufgetragen. Nach der Elektrophorese erfolgte ein Elektroblothing nach Kyhse-Andersen (siehe V.3.3.10; Khyse-Andersen, 1984). Die Bestimmung mittels des automatisierten Edman-Abbaus führte zu folgender Aminosäuresequenz:

**1 - SNEHYLELVDVGRRIQQKELSPVEVTQRQ - 30**

Ab der 14. AS sind die Ergebnisse nur unter Vorbehalt zu betrachten, insbesondere ab der 22. AS treten oft Unsicherheiten bei der Bestimmung der Aminosäuren auf.



Tab. 24: Auswahl von Substraten für die D-Amidase

<b>Säureamide</b>	rel. Aktivität	<b>Aminosäureamide</b>	rel. Aktivität
Acetamid	4,0	<b>DL-Tle-NH<sub>2</sub></b>	<b>1</b>
Butyramid	37	D-Val-NH <sub>2</sub>	13
Acrylamid	7,7	L-Val-NH <sub>2</sub>	1,2
Benzylamid	5,2	DL-Formyl-Val-NH <sub>2</sub>	3,4
Nicotinamid	19	D-Leu-NH <sub>2</sub>	400
Acetessigsäureamid	130	L-Leu-NH <sub>2</sub>	26
Malonsäurediamid	2,9	D-Phe-NH <sub>2</sub>	890
<b>Hydroxysäureamide</b>	rel. Aktivität	L-Phe-NH <sub>2</sub>	190
D-Lac-NH <sub>2</sub>	59	D-Pro-NH <sub>2</sub>	24
L-Lac-NH <sub>2</sub>	66	L-Pro-NH <sub>2</sub>	56

In der Reihe der Säureamide ist auffällig, dass Buttersäure- und besonders Acetessigsäureamid mit einer Kettenlänge von C<sub>4</sub> am besten umgesetzt wurden. Für kleinere Substrate wie Acetamid, Formamid und Harnstoff lag nur eine geringe oder nahezu keine Aktivität vor.

Anhand der stark zunehmenden Aktivitäten der D-Aminosäureamide von Tle, Val und Leu zeigt sich, dass eine Verzweigung am C-3 der Aminosäuren den größten Einfluss auf die Aktivität der D-Amidase hat. Dies erklärt teilweise auch die hohe Aktivität für D-Phe-NH<sub>2</sub> mit nur einer sterisch anspruchsvollen Phenylgruppe am C-3-Atom im Vergleich zu zwei oder drei Methylgruppen für Valin oder *tert*-Leucin.

### Enantioselektivität

Für die aliphatisch verzweigten, racemischen Aminosäureamide von Tle, Val und Leu zeigte die D-Amidase bei Umsätzen über 40% eine hohe D-Enantioselektivität mit ee-Werten größer 96% und E-Werten größer 100 und ist damit zur Racematspaltung für diese Substrate einsetzbar.

Tab. 25: Enantioselektivitäten der D-Amidase für ausgewählte Substrate

Substrat	Umsatz [%]	ee-Wert D-AS [%]	E-Wert
DL-Tle-NH <sub>2</sub>	48	98,6	450
DL-Val-NH <sub>2</sub>	42	98,1	220
DL-Leu-NH <sub>2</sub>	40	96,7	110
DL-Phe-NH <sub>2</sub>	36	58,3	5,2

Für DL-Phe-NH<sub>2</sub> lag bei einem 36%igem Umsatz nur noch geringe Enantioselektivität von 58% ee bzw. ein E-Wert von 5,2 vor. Insgesamt wurde somit für die D-Amidase innerhalb dieser vier Substrate mit zunehmender Enzymaktivität eine abnehmende D-Selektivität festgestellt.

### 2.3.9. Vergleichende Charakterisierung mit bekannten D-Amidasen und D-Aminopeptidasen

Für einen direkten Vergleich wurde in der Tabelle 26 die D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* den bekannten D-Amidasen bzw. D-Aminopeptidasen aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4, *Arthrobacter sp.* NJ-26, *Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3 und C1-38, die ebenfalls D-Aminosäureamide umsetzen, gegenüber gestellt.

Ähnlich zur D-Amidase sind die Substratspektren der beschriebenen Amidasen aus *Ochrobactrum anthropi* SV3 und *Comamonas acidovorans*. So besitzt das Enzym aus *Ochrobactrum anthropi* SV3 ebenso mit 370 U/mg die größte Aktivität für D-Phe-NH<sub>2</sub> (100%) und bezogen darauf nimmt die Aktivität in der Reihe D-Leucin-, D-Isoleucin- und D-Valinamid von 37%, 2,5% auf 0,5% stark ab. Da die entsprechenden L-AS-NH<sub>2</sub> mit Aktivitäten unter 0,1% bezogen auf das D-Amid nahezu nicht umgesetzt wurden, scheint die Enantioselektivität des Enzyms nicht von der Struktur des Substrates abhängig zu sein. K<sub>M</sub>-Werte von 0,089 mM für D-Phe-NH<sub>2</sub> und 0,057 mM für D-Leu-NH<sub>2</sub> weisen auf die hohe Affinität dieser D-Aminosäure-Amidase hin. Im Unterschied zur *Variovorax*-Amidase sind jedoch einfache Säureamide, wie Acetamid und Propionamid, als Substrate für das Enzym inaktiv (Asano et al., 1989a; Komeda und Asano, 2000).

Die enantioselektive Amidase aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 zeigt eine hohe Enantioselektivität für R-Ketoprofenamid (99% ee). Profene sind allgemein 2-Arylpropionsäuren und gehören zur Gruppe der nichtsteroidalen entzündungshemmenden Substanzen. Diese Amidase hydrolysiert aber auch Leu- und Phe-NH<sub>2</sub>, die mit relativen Aktivitäten der beiden Enantiomere von 251% zu 2,3% und 137% zu 45% für Leucin eine hohe und für Phenylalanin eine geringe D-Enantioselektivität vermuten lässt (Hayashi et al., 1997).

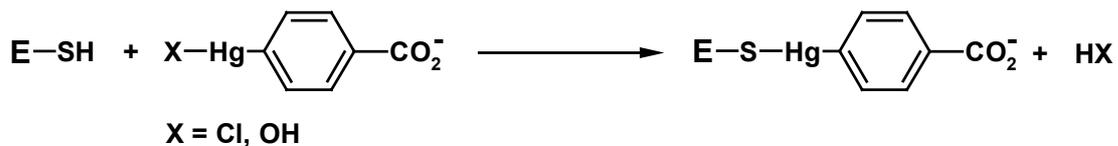
Im Unterschied dazu hydrolysieren die Enzyme in *Ochrobactrum anthropi* C1-38 (Asano et al., 1989b) und *Arthrobacter sp.* NJ-26 (Ozaki et al., 1992) spezifisch D-Alaninamid. Aminosäureamide mit größeren Resten werden nur äußerst langsam oder gar nicht umgesetzt. Das Enzym aus *Ochrobactrum* C1-38 bevorzugt D-Ala-Peptide und wurde somit als eine D-Aminopeptidase klassifiziert (Asano et al., 1992).

Ein Vergleich des Molekulargewichts innerhalb der fünf aufgeführten Enzyme zeigt, dass eine monomere Struktur zwischen 40 und 67 kDa überwiegt. Nur für die D-Aminopeptidase aus *Ochrobactrum* C1-38 wurde eine homodimere Struktur gefunden, während für die native D-Amidase aus *Variovorax* möglicherweise ein Homotrimer vorliegt. Auch die weiteren biochemischen Daten dieser Enzyme, pH-, Temperatur-Optima sowie der isoelektrische Punkt (pI) sind ähnlich. So erstreckt sich der optimale pH-Bereich meistens von 7,5 bis 8,5 und das Temperaturoptimum zwischen 45°C und 48°C, ausgenommen die Amidase aus *Comamonas* mit 35°C. Die drei angegebenen isoelektrischen Punkte liegen zwischen 5,3 und 4,2, wohingegen sich für die D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* ein aus der Primärsequenz berechneter pI von 6,2 ergibt, der möglicherweise vom tatsächlichen pI des nativen Enzyms abweichen kann.

**Tab. 26: Vergleich der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* mit den D-Amidasen bzw. D-Aminopeptidasen aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4, *Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3, *Ochrobactrum anthropi* C1-38 und *Arthrobacter* sp. NJ-26**

Organismus	Substrate	Molekulargewicht	Biochem. Daten	Inhibitoren	Homologie	Literatur
<i>Variovorax paradoxus</i> DSM 14468	D/L-Phe-NH <sub>2</sub> verzweigte D-AS-NH <sub>2</sub> D-Tle-NH <sub>2</sub> , Säureamide	50 kDa 171 kDa, nativ	pH <sub>opt</sub> 7,0-9,5 T <sub>opt</sub> 47-49°C	Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , PMSF, PCMB	"Amidase Signature"-Familie	vorliegende Arbeit
<i>Comamonas acidovorans</i> KPO-2771-4	R-Ketoprofen-NH <sub>2</sub> D-Leu-NH <sub>2</sub> D/L-Phe-NH <sub>2</sub>	1 x 55 kDa	pH <sub>opt</sub> 8,5-10,0 T <sub>opt</sub> 35°C	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , PCMB, N-Ethyl-maleimid	"Amidase Signature"-Familie	[46, 139]
<i>Ochrobactrum anthropi</i> SCRC SV3	D-Phe-NH <sub>2</sub> , aromatische D-AS-NH <sub>2</sub> , D-Leu-NH <sub>2</sub>	1 x 38 kDa	pH <sub>opt</sub> 7,5-8,0 pI 5,3	PMSF, DPF	D-Peptidasen, D-Aminopeptidase C1-38	[7, 12, 70]
<i>Ochrobactrum anthropi</i> SCRC C1-38	D-Ala-NH <sub>2</sub> , D-Ala-NHR, D-Ala-Peptide, (D-Aminopeptidase)	2 x 59 kDa	pH <sub>opt</sub> 8,5 T <sub>opt</sub> 45°C pI 4,2	Ag <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , PCMB, N-Ethyl-maleimid	Carboxypeptidase, β-Lactamase, D-Amidase SV-3	[8, 9, 12]
<i>Arthrobacter</i> sp. NJ-26	D-Ala-NH <sub>2</sub> Gly-NH <sub>2</sub>	1 x 67 kDa	pH <sub>opt</sub> 7,5 T <sub>opt</sub> 45°C pI 5,2	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , PCMB	n.b.	[94, 134]

Mit Ausnahme der Amidase aus *Ochrobactrum* SV3 wird für vier Enzyme eine Inhibierung mit den Schwermetallionen  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  wie auch mit dem Thiol-Gruppen reaktivem Reagenz 4-Hydroxy-Quecksilberbenzoat (PCMB) beobachtet. Für die Schwermetallionen ist bekannt, dass bereits katalytische Mengen die Oxidation der Cystein-Thiol-Gruppen in Proteinen mit molekularem Sauerstoff begünstigen (Cavallini et al., 1968). Andererseits können insbesondere  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  mit den Thiol-Gruppen Sulfid-Verbindungen bilden, die zur Denaturierung und Präzipitation der Proteine führen. Ähnlich dazu reagieren die Quecksilberbenzoate zu löslichen Mercaptiden, die sich wie die Produkte mit dem Ellman-Reagenz spektroskopisch quantifizieren lassen (Boyer, 1954).



**Abb. 33: Reaktion der Enzym-SH-Gruppen mit den Quecksilberbenzoaten**

Ebenso wurden die D-Amidasen aus *Variovorax* und *Ochrobactrum* SV3 mit dem Serin-Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inaktiviert. PMSF reagiert, wie auch Diisopropylfluorophosphat (DPF), unter physiologischen Bedingungen nur mit dem Alkoholat-Ion von Serin oder Threonin, nicht aber mit den freien Aminosäuren. Die Inhibierung eines Serin- oder Threonin-Restes mit PMSF setzt spezifische Wechselwirkungen mit anderen AS-Resten voraus, die unter physiologischen Bedingungen einen dissoziierten Zustand der Hydroxylgruppe ermöglicht (Schellenberger et al., 1989).

Eine mögliche Inhibierung durch Komplexbildner, z. B. mit EDTA oder o-Phenanthrolin, und eine damit verbundene Metallionen-Abhängigkeit wurde für keines der fünf Enzyme beobachtet. Auch die D-Amino-peptidase aus *Ochrobactrum* C1-38 ist im Unterschied zu den meisten Amino-peptidasen kein Metalloenzym. Die Inhibierungsexperimente für die D-Amidase aus *Variovorax* deuten darauf hin, dass möglicherweise ein Serin-Rest, wie bei den "Amidase Signature" Enzymen beschrieben, das angreifende Nukleophil im Katalysemechanismus ist. Jedoch zeigt die Inhibierung mit den Thiol-Reagenzien ebenso einen starken Einfluss der Cystein-Reste auf die katalytische Aktivität.

Wie die im Folgenden beschriebene Klonierung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* zeigen wird, kann anhand der Aminosäuresequenz dieses Enzym wie auch die R-Ketopropen-Amidase aus *Comamonas acidovorans* der "Amidase Signature"-Familie zugeordnet werden (siehe 1.4.2). Beide Enzyme besitzen die typischen konservierten Bereiche dieser Enzymfamilie, besonders eine Glycin-, Serin- und Alanin-reiche Region, die als "Amidase Signature" bezeichnet wird. Bemerkenswerterweise führte ein Sequenzvergleich der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* innerhalb dieser Familie zur höchsten Homologie mit der R-Amidase aus *Comamonas acidovorans* (siehe 2.4.9.2). Die Ähnlichkeit der Substratspektren und der Inhibierung beider Enzyme ist somit auch auf der Ebene der Primärsequenz vorzufinden.

Demgegenüber gehören die D-Amidase und D-Aminopeptidase aus den *Ochrobactrum anthropi* Stämmen nicht zu dieser Enzymfamilie. Homologieuntersuchungen deuten für diese beiden Enzyme auf eine Verwandtschaft zu Peptidasen aus *Bacillus cereus* DF4-B, *Streptomyces* R 61 und zu  $\beta$ -Lactamasen (Asano et al., 2000; 1992).

## 2.4. Klonierung und Expression der D-Amidase

### 2.4.1. Sequenzvergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz

Ein Vergleich des N-Terminus der D-Amidase in Proteindatenbanken via Internet (BLAST search, NCBI, Maryland, USA) führte zu Ähnlichkeiten mit den folgenden drei Enzymen. Die Sequenz der ähnlichen Amidasen steht jeweils oben, in der Mitte die Übereinstimmung bzw. ähnliche AS mit einem (+) gekennzeichnet und unten die ermittelte Sequenz der D-Amidase (VarDAmi) aus *Variovorax paradoxus*.

#### Hydrolase aus *Comamonas acidovorans* (ComHyd):

ComHyd	4-	SELHHLELLEVGREIQSRRISSEEVTR-30
		+ELH+LEL++VGR IQ + +S EVT+
VarDAmi	2-	NELHYLELVDVGRRIQQKELSPVEVTQ-28

Identische AS = 15/27 (55%)                      ähnliche AS = 22/27 (80%)

#### Nicotin-/Pyrazin-Amidase aus *Mycobacterium smegmatis* (MysNic):

MysNic	2-	ELYELPLIEVAEKIRTKEVSPVEVTE-27
		EL+ L L++V +I+ KE+SPVEVT+
VarDAmi	3-	ELHYLELVDVGRRIQQKELSPVEVTQ-28

Identische AS = 14/26 (53%)                      ähnliche AS = 21/26 (79%)

#### Enantioselektive Amidase aus *Rhodococcus* sp. (RhoAmi):

RhoAmi	3-	LHELTQAQVAAKIENKELSPVEL-25
		LH L L V +I+ KELSPVE+
VarDAmi	4-	LHYLELVDVGRRIQQKELSPVEV-26

Identische AS = 13/23 (56%)                      ähnliche AS = 16/23 (69%)

Abb. 34: Ergebnis des N-terminalen Sequenzvergleichs der D-Amidase, (BLAST-Search)

Der Vergleich des N-Terminus der D-Amidase mit einer patentierten Hydrolase aus *Comamonas acidovorans* (Zimmermann et al., 1995) führte zu 15 identischen bzw. 22 ähnlichen AS von insgesamt 27. Ähnlich hohe N-terminale Sequenzhomologien, vor allem mit dem Motiv KELSPVEVT, wurden für zwei weitere Enzyme gefunden (Abb. 34), der Nicotin-/Pyrazin-Amidase aus *Mycobacterium smegmatis* (Boshoff und Mizrahi, 1998) und der enantioselektiven Amidase aus *Rhodococcus* sp. (Mayaux et al., 1991). Diese beiden Enzyme gehören zur "Amidase Signature"-Familie, wohingegen die Hydrolase aus *Comamonas acidovorans* keiner Enzymfamilie zuzuordnen ist.

Motivation für den Sequenzvergleich in Proteindatenbanken war, mittels Homologien mit anderen bekannten Enzymen und deren Gesamtsequenz weitere Proteinsequenzinformationen der D-Amidase zu erhalten. Aufgrund einer fehlenden Klassifizierung der Hydrolase aus *Comamonas acidovorans* war die Proteinsequenz dieses Enzyms ungeeignet. Vielversprechender war die N-terminale Homologie der D-Amidase zu den beiden Amidasen, die zur "Amidase Signature"-Familie gehören und damit weitere homologe Bereiche in der Proteinsequenz vorkommen.

Mit der Möglichkeit, dass die D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* auch zur "Amidase Signature"-Familie gehören könnte, lag es nahe, eine Amplifizierung einer Teilsequenz mittels PCR mit Primern aus dem N-Terminus der D-Amidase und aus einem geeigneten homologen Bereich der "Amidase Signature" zu versuchen. Hierzu wurde die Gesamtsequenz der Nicotin-/Pyrazin-Amidase (MysNic) und der enantioselektiven Amidase (RhoAmi) mit weiteren ähnlichen Enzymen verglichen, um homologe Bereiche zu identifizieren, aus denen ein zweiter Primer abgeleitet werden konnte (Abb. 35).

	150	160	170	180	190	200	210
MysNic	T T G N P W A P D R T P	G G S S G G S G A A V A A	G V V H V A L G S D T G G S I R I P A A L	C G T V G L K P T Y G R A S R V G V A			
RhoAmi	T T R N P W D P R T P	G G S S G G T A A A L A A	G L I F A G M G T D T G G S I R I P A A V	C G T V G L K P T Y G R V S R R G V T			
SynAtf	V T A N P W D L R V P	G G S S G G S A A A V A A	D E C L I A L G S D T G G S I R Q P A S L	C G V V G M K P T Y G L V S R F G L V			
MytAtf	P T R N P W N L D R V P	G G S G G G S A A A L A A	F Q A P L A I G S D T G G S I R Q P A A L	T A T V G V K P T Y G T V S R Y G L V			
MylAmi	P T R N P W N V D R V P	G G S G G G S A A A L A A	F Q A P L A I G S D T G G S I R Q P A A L	T A T V G V K P T Y G T V S R Y G L V			
ArcAmi	P T R N P W D L R T V	G G S S G G S A A A V A A	G I L P V A S G N D G G G S I R I P A S F	C G L Y G L K P S F G R V P C Y P S L			
	* * * *	* . * * * . * * . * * : * * *	. * . * * * * * * * * * * * * . .	* : * * * : * . .			

MysNic:	Nicotin-/Pyrazin-Amidase	<i>Mycobacterium smegmatis</i> , (gi: 3869278)
RhoAmi:	enantioselektive Amidase	<i>Rhodococcus</i> sp., (gi: 152052)
SynAtf:	GlutRNA <sup>Gln</sup> -Amidotransferase	<i>Synechocytis</i> sp., (gi: 1652678)
MytAtf:	GlutRNA <sup>Gln</sup> -Amidotransferase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , (gi: 2791608)
MylAmi:	vermutliche Amidase	<i>Mycobacterium leprae</i> , (gi: 2414539)
ArcAmi:	vermutliche Amidase AF1954	<i>Archeoglobus fulgidus</i> , (gi: 7674442)

**Abb. 35: Homologie von ausgewählten Enzymen der "Amidase Signature"-Familie**

Ausgehend von genomischer DNA aus *Variovorax paradoxus* und Primern aus dem N-Terminus und dem geeigneten homologen Bereich (Abb. 35, grau unterlegt AS 178-191) der "Amidase Signature Sequence" könnte eine PCR zu genetischen Sequenzinformationen der D-Amidase führen.



Durch Verwendung des Primerpaares AAH-N1/AAH-C1 konnte in einer Touchdown PCR ein 0,5 kb großes Fragment des D-Amidase-Gens aus genomischer DNA amplifiziert werden (Abb. 37). Mit der Sequenzierung dieses Fragmentes wurde ein 509 bp langer DNA-Abschnitt der D-Amidase identifiziert.

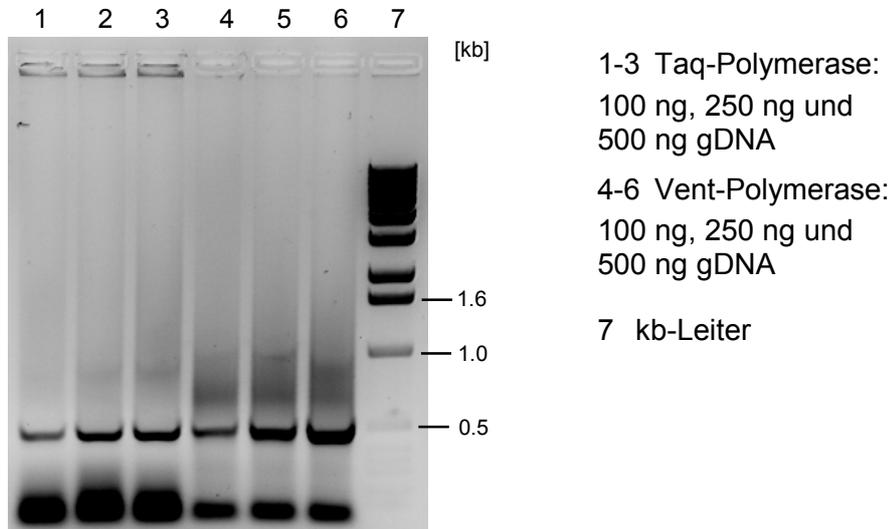


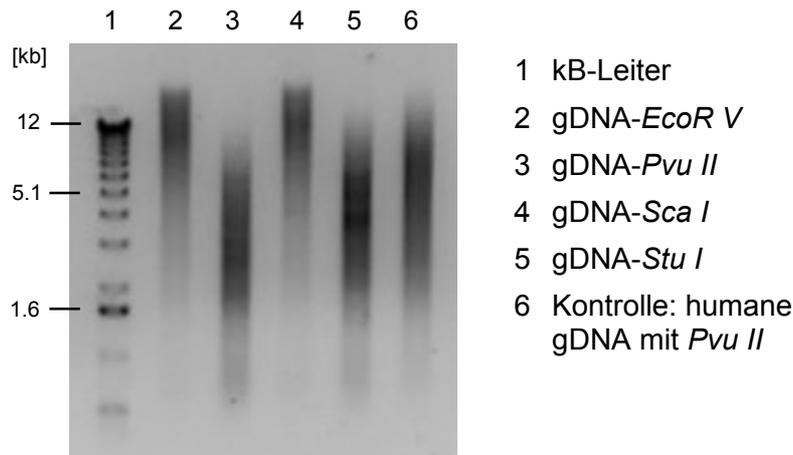
Abb. 37: Agarosegelanalyse der PCR mit 0,5 kb Fragment des D-Amidase-Gens

#### 2.4.4. Identifizierung der Gesamtsequenz mittels Universal-GenomeWalker™-System

Das zuvor bestimmte 509 bp Sequenz-Fragment des D-Amidase-Gens ermöglichte mittels des Universal-GenomeWalker™-Kits [Clontech, Palo Alto, USA] das Auffinden des gesamten D-Amidase-Gens sowie weiterer Sequenzinformationen vor und nach dem Gen (siehe V.4.6).

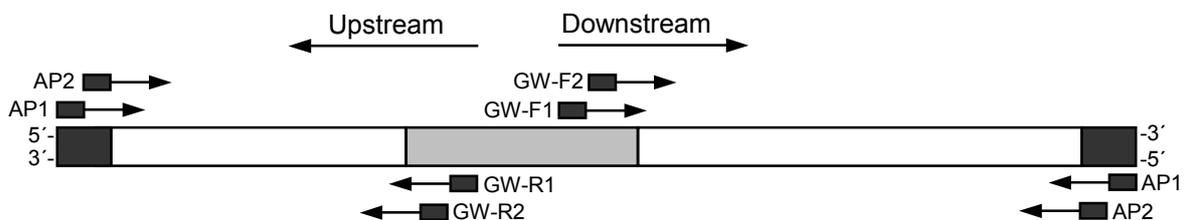
#### Anlegen einer sogenannten "GenomeWalker Bibliothek"

Für eine "GenomeWalker Bibliothek" (GW-Bib.) wurde genomische DNA jeweils mit den vier Restriktionsenzymen *EcoR V*, *Pvu II*, *Sca I* und *Stu I* hydrolysiert. Nach Reinigung der DNA-Restriktionsansätze folgte jeweils eine blunt-end Ligation mit den beigefügten GenomeWalker Adaptoren, für die zwei Adaptor-Primer (AP1 und AP2) vorlagen. Die erhaltenen Fragmente wurden in einem 0,5%igen Agarosegel analysiert (Abb. 38).



**Abb. 38: Agarosegel (0,5%) zur Analyse der "GenomeWalker Bibliothek"; je 2,5 µg gDNA wurden mit *EcoR V*, *Sca I*, *Pvu II* und *Stu I* verdaut**

Diese Bibliothek diente als Templat für eine erste PCR-Reaktion (Abb. 39). Hierzu wurden die genspezifischen Primer GW-R1 für die "Upstream-Richtung" oder GW-F1 für die "Downstream-Richtung" aus dem 509 bp langen Sequenz-Fragment (Abb. 39, grau hinterlegt) abgeleitet und mit dem Adaptor-Primer AP1 verwendet. Für die darauf folgende zweite PCR wurden die Primerpaare AP2/GW-R2 (Upstream) und AP2/GW-F2 (Downstream) benutzt.

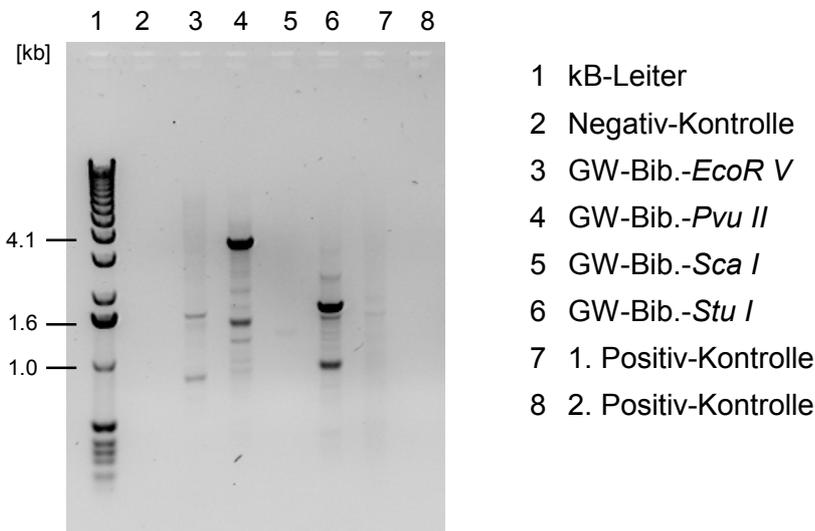


**Abb. 39: Schematische Darstellung eines hypothetischen DNA-Fragments mit dem 509 bp D-Amidase-Fragment (grau hinterlegt) und endständigen Adaptoren aus der "GenomeWalker Bibliothek" und die jeweiligen Primer für die 1. und 2. PCR in Upstream- und Downstream-Richtung**

Um eine Amplifizierung von großen DNA-Fragmenten zu ermöglichen ("long-distance PCR") wurde die Herculase® (Stratagene) als DNA-Polymerase eingesetzt.

## 1. PCR

Für die erste PCR mit dem Primerpaar AP1/GW-F1 in Downstream-Richtung zeigten sich in einem Agarosegel folgende Amplifikate.

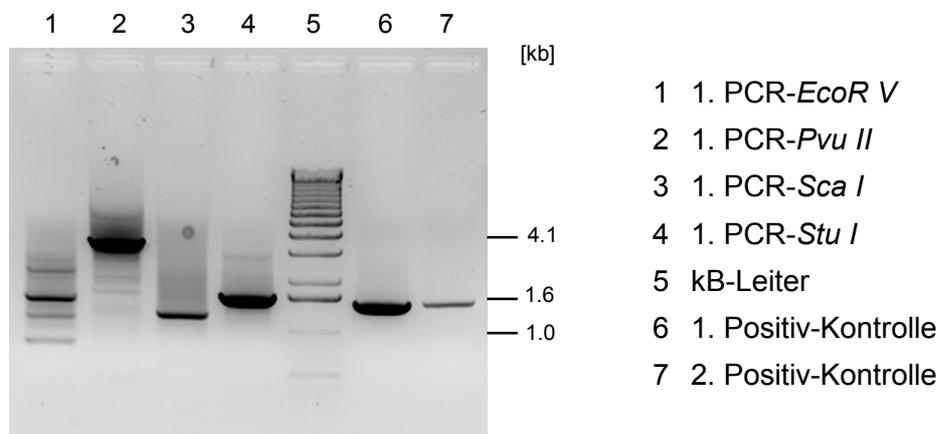


**Abb. 40: Agarosegelanalyse der 1. PCR mit Primer AP1/GW-F1 (downstream)**

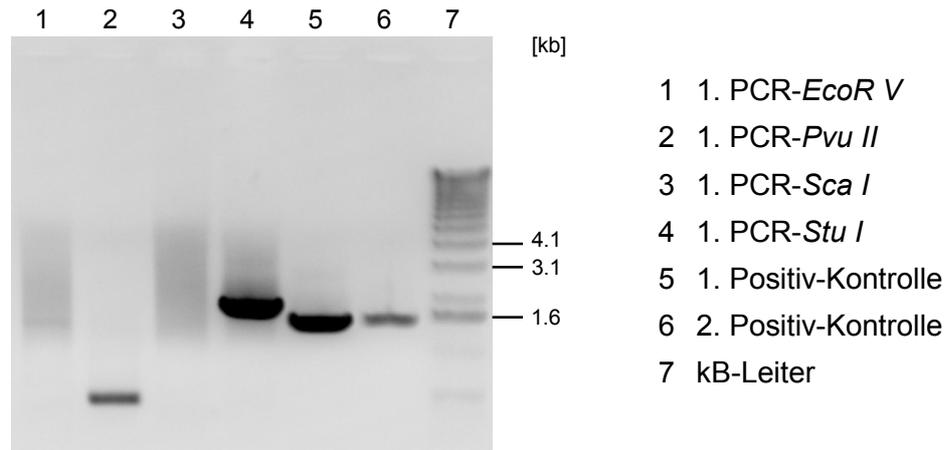
Die *Pvu II*- (Spur 4) und die *Stu I*-Bibliothek (Spur 6) zeigten eine deutliche Bildung von jeweils zwei PCR-Amplifikaten, wobei auch weitere unspezifische PCR-Produkte auftraten. Deutlich schwächer ist die Bildung zweier PCR-Produkte mit dem *EcoR V*-Templat (Spur 3); für *Sca I* (Spur 5) und für die beiden Positiv-Kontrollen wurde nahezu kein PCR-Produkt gebildet.

## 2. PCR

Mit den erhaltenen PCR-Produkten erfolgte eine zweite PCR ("Nested PCR") mit den Primerpaaren AP2/GW-F2 (Downstream) und AP2/GW-R2 (Upstream). Die resultierenden PCR-Produkte wurden in einem präparativen Agarosegel getrennt und das überwiegende Amplifikat gereinigt und sequenziert (Abb. 41 und Abb. 42).



**Abb. 41: Präparatives Agarosegel der 2. PCR mit Primer AP2/GW-F2 (downstream)**



**Abb. 42: Präparatives Agarosegel der 2. PCR mit Primer AP2/GW-R2 (upstream)**

Die Positiv-Kontrollen des Universal-GenomeWalker™-Kits zeigte bei der 2. PCR in beiden Fällen ein starkes Amplifikat mit der erwarteten Größe von 1,6 kb. Zusammenfassend ergaben sich somit ausgehend von der "GenomeWalker Bibliothek" (GW-Bib.) nach der 2. PCR folgende PCR-Amplifikate.

**Tab. 27: PCR-Produkte nach 2. PCR, Universal-GenomeWalker™-System**

Richtung: Downstream	Größe 2. PCR-Produkt
<i>EcoR V</i> -GW-Bib.	1,6 kb
<i>Pvu II</i> -GW-Bib.	3,5 kb
<i>Sca I</i> -GW-Bib.	1,2 kb
<i>Stu I</i> -GW-Bib.	1,4 kb
Richtung Upstream	Größe 2. PCR-Produkt
<i>EcoR V</i> -GW-Bib.	kein Amplifikat
<i>Pvu II</i> -GW-Bib.	0,5 kb
<i>Sca I</i> -GW-Bib.	kein Amplifikat
<i>Stu I</i> -GW-Bib.	1,8 kb

Mit den erhaltenen PCR-Fragmenten bis zu 3,5 kb (Downstream) und 1,8 kb (Upstream) waren die komplette Gensequenz der D-Amidase sowie weitere Sequenzinformationen vor und nach dem Gen amplifiziert worden und konnten durch Sequenzierung [Sequiserie, Vatterstetten] identifiziert werden.

### 2.4.5. Klonierung des D-Amidase-Gens

#### PCR des gesamten D-Amidase-Gens

Für die weiteren molekularbiologischen Arbeiten und eine Überprüfung der Gensequenz wurde mit genomischer DNA aus *Variovorax paradoxus* und dem Primerpaar AAH-K-N2/AAH-K-C2 das gesamte D-Amidase-Gen mit 92 bp vor dem Startcodon und 80 bp nach dem Stopcodon in drei parallelen Ansätzen mit zwei verschiedenen DNA-Polymerasen mit Proofreading-Aktivität (Vent<sub>R</sub><sup>®</sup>, New England Biolabs und Herculase<sup>®</sup>, Stratagene) amplifiziert.

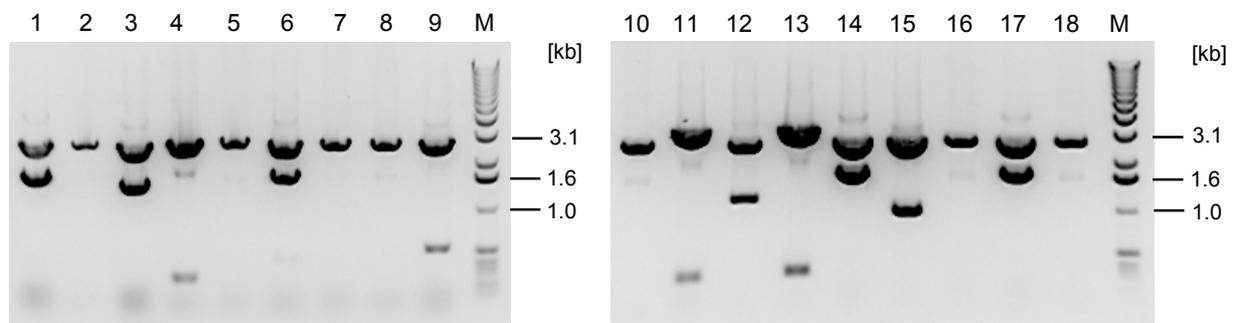
In allen drei Ansätzen konnte ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 1,6 kb erhalten werden.

#### Ligation der PCR-Produkte und anschließende Transformation

Diese PCR-Produkte wurden mittels des SureClone™ Ligation Kits (Amersham Biosciences) in den bereits linearisierten und 5'-dephosphorylierten Klonierungsvektor pUC18 ligiert.

Hierzu wurden die PCR-Produkte in einer "Blunting/Kinasing-Reaktion" von einem möglichen überstehenden 3'-Ende entfernt und am 5'-Ende phosphoryliert. Nach erneuter Reinigung wurden die Fragmente in den Vektor pUC18 ligiert. Ein Aliquot (5 µl) des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue verwendet.

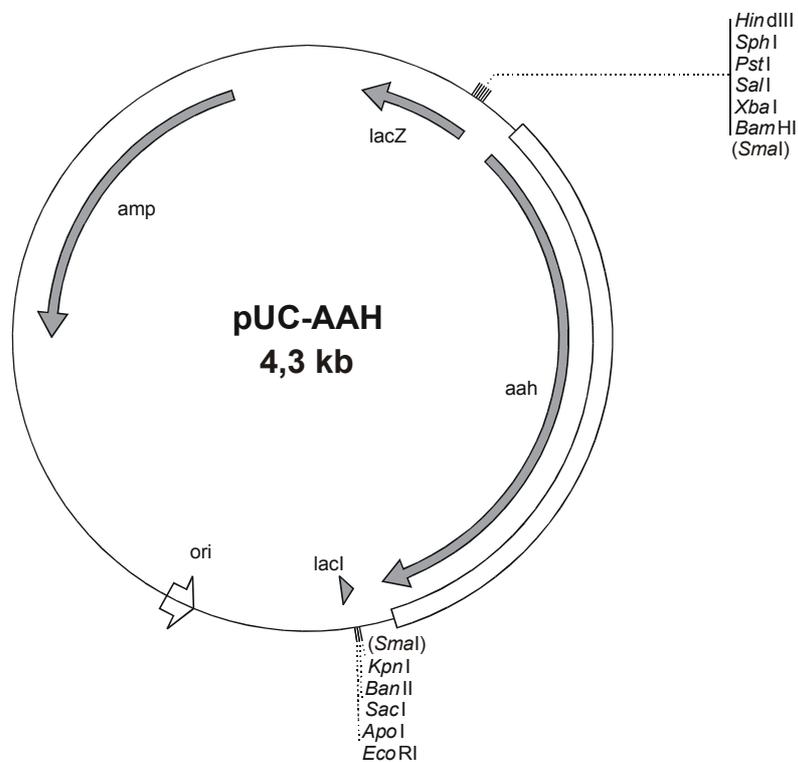
Aus dieser Transformation resultierten je ca. 30 Kolonien nach Selektion auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatte. Von den jeweiligen Ansätzen (Vent-A, Vent-B und Herc.-C) wurden jeweils 6 Kolonien ausgewählt, eine Übernachtskultur in 5 ml LB<sub>amp</sub>-Medium inkubiert und aus der jeweiligen Kultur Plasmid-DNA isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde einer Restriktionsanalyse mit *EcoR I* und *Hind III* unterzogen, die auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde (Abb. 43).



**Abb. 43: Restriktionsanalyse der positiven Klone aus der Klonierung des D-Amidase-Gens in pUC18; Spur 1-6: Klon 1 bis 6 aus Vent-A-PCR, Spur 7-12: Klon 1 bis 6 aus Vent-B-PCR, Spur 13-18: Klon 1 bis 6 aus Herc.-C-PCR**

Ein Großteil der Plasmide enthielt kein inseriertes DNA-Fragment. Fünf Genkonstrukte enthielten ein Fragment in der erwarteten Größe von 1,6 kb (Abb. 43, Spur: 1, 3, 6, 14 und 17) und ein Teil der Plasmide hatten Fragmente, die auf unterschiedliche Genkonstrukte schließen ließen. Aus den fünf Plasmid-Präparationen wurden die Plasmide Vent A-1 (Spur 1), Vent A-6 (Spur 6) und Herc. C-5 (Spur 17) ausgewählt und sequenziert. Die erhaltene Sequenzinformation diente der Überprüfung der bisherigen Gensequenz.

Die D-Amidase-Gensequenz der Plasmide Vent A-1 und Herc. C-5 wurde auf beiden DNA-Strängen sequenziert und war identisch. Ebenso stimmte die Gensequenz mit der teilweisen Sequenzierung von Plasmid Vent A-6 und den Sequenzinformationen mittels des Universal-GenomeWalker™-Systems überein. Für die weiteren Arbeiten wurde das Plasmid Vent A-1 verwendet und im Folgenden nur noch als pUC-AAH bezeichnet (Abb. 44).



**Abb. 44: Vektorkarte von pUC-AAH**

### 2.4.6. Gen- und Aminosäuresequenz der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*

Das D-Amidase-Gen besteht aus 1398 bp und resultiert in einem Protein aus 465 AS (Abb. 45). Mit der Basensequenz **aggagt** befindet sich sieben Basen vor dem Startcodon eine mögliche Ribosomenbindestelle. Aus der Aminosäure-Sequenz ergibt sich ein Molekulargewicht von 49605 Da und ein berechneter isoelektrischer Punkt von 6,2. Der ermittelte N-Terminus der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*, der Ausgangspunkt für die Klonierung war, ist in folgender Abbildung grau hinterlegt.

```

ctggatcatca agcgcggcca gatcggcggc gagatcccgc gcgagcacct -50
cggcgatttc gaaatcatga gccaatcac aggagtccac gg -92

atg agc aac gaa ctg cat tac ctc gag ctg gtc gac gtc ggc cgg cgc 48
Met Ser Asn Glu Leu His Tyr Leu Glu Leu Val Asp Val Gly Arg Arg
  1 1 5 10 15

atc cag cgc aag gag ctc tcg ccg gtc gag gtc acg caa gcg cag ctc 96
Ile Gln Arg Lys Glu Leu Ser Pro Val Glu Val Thr Gln Ala Gln Leu
  20 25 30

gcg cgc atc gag aag gtc gac ggc gcg ctc aag agc tat gtg atc gtg 144
Ala Arg Ile Glu Lys Val Asp Gly Ala Leu Lys Ser Tyr Val Ile Val
  35 40 45

atg gcc gaa cac gcg ctg gcc gac gcg cgc cgc gcc gag gcc gag atc 192
Met Ala Glu His Ala Leu Ala Asp Ala Arg Arg Ala Glu Ala Glu Ile
  50 55 60

gcc cgg ggc gag atc cgc ggg ccg ctg cac ggc gtg ccg gtg gcg gtg 240
Ala Arg Gly Glu Ile Arg Gly Pro Leu His Gly Val Pro Val Ala Val
  65 70 75 80

aag gac ctg tgc tgg aca aaa ggc gtg gcc acg gcc gcc ggc atg acg 288
Lys Asp Leu Cys Trp Thr Lys Gly Val Ala Thr Ala Ala Gly Met Thr
  85 90 95

ctc tac cgc gac ttc gtg ccc acc gag gac ggc acg gcc gtg cgc aag 336
Leu Tyr Arg Asp Phe Val Pro Thr Glu Asp Gly Thr Ala Val Arg Lys
  100 105 110

ctg cgc gaa gcc ggt gcc gtg atc ctc ggc aag ctg cag ctc acc gag 384
Leu Arg Glu Ala Gly Ala Val Ile Leu Gly Lys Leu Gln Leu Thr Glu
  115 120 125

agc gcc tat gcc gac cat cac ccc agc gtc acg ccg ccg gtc aat ccg 432
Ser Ala Tyr Ala Asp His His Pro Ser Val Thr Pro Pro Val Asn Pro
  130 135 140

tgg aac gcg gcg cac tgg tcg ggt gcc tcg tcg agc ggc tcg ggc gtg 480
Trp Asn Ala Ala His Trp Ser Gly Ala Ser Ser Ser Gly Ser Gly Val
  145 150 155 160

gcg acc gcg gcg ggg ctt tgc tat ggc tcg ctc ggc acc gac acg ggc 528
Ala Thr Ala Ala Gly Leu Cys Tyr Gly Ser Leu Gly Thr Asp Thr Gly
  165 170 175

```

ggc tcg atc cgc ttt ccg tcc tcg gcc aac ggc ctg acc ggc ctg aag	576
Gly Ser Ile Arg Phe Pro Ser Ser Ala Asn Gly Leu Thr Gly Leu Lys	
180 185 190	
ccg acc tgg ggc cgc gtg agc cgc cat ggc gcc ttc gag ctg gcc gcc	624
Pro Thr Trp Gly Arg Val Ser Arg His Gly Ala Phe Glu Leu Ala Ala	
195 200 205	
acg ctc gac cac atc ggc ccg atg acg cgc agc gcg gcc gat gcg ggt	672
Thr Leu Asp His Ile Gly Pro Met Thr Arg Ser Ala Ala Asp Ala Gly	
210 215 220	
gcg atg ctc ggc gcc atc gcg gga gcc gat ccg aag gac ccg acc gcg	720
Ala Met Leu Gly Ala Ile Ala Gly Ala Asp Pro Lys Asp Pro Thr Ala	
225 230 235 240	
agc ctc gcg gcc gtg ccc aac tac ctc gcg ggc atg gag cgc ggc ttg	768
Ser Leu Ala Ala Val Pro Asn Tyr Leu Ala Gly Met Glu Arg Gly Leu	
245 250 255	
cgc ggc ctg cgc gtg ggc atc gac gcg cgc tgg aac gcg gag ggc gtc	816
Arg Gly Leu Arg Val Gly Ile Asp Ala Arg Trp Asn Ala Glu Gly Val	
260 265 270	
gat gcg gcc acc gcg cag gtg atg gaa ggc gcg ctc gcg gcc gtg cgc	864
Asp Ala Ala Thr Ala Gln Val Met Glu Gly Ala Leu Ala Ala Val Arg	
275 280 285	
gaa ctc ggc gcc gaa gtg cgt cac gtg aca ttc ccc gac ccg gcg cag	912
Glu Leu Gly Ala Glu Val Arg His Val Thr Phe Pro Asp Pro Ala Gln	
290 295 300	
gtc atc gcc gac tgg ttc ccg ctg tgc ggc atc gag gcg gcc gtg gtg	960
Val Ile Ala Asp Trp Phe Pro Leu Cys Gly Ile Glu Ala Ala Val Val	
305 310 315 320	
cac gag tcg acc tat ccc gcg cgc aag cag atg tac ggc ccg gcg ctg	1008
His Glu Ser Thr Tyr Pro Ala Arg Lys Gln Met Tyr Gly Pro Ala Leu	
325 330 335	
tcg ggc ctg ctc gag ctg ggc cgt gcg caa agc ggc atc gac tac cag	1056
Ser Gly Leu Leu Glu Leu Gly Arg Ala Gln Ser Gly Ile Asp Tyr Gln	
340 345 350	
aag atc gtg ctc cgc cgc cat gcc ttc agc ggc agg gtg cgc gag atg	1104
Lys Ile Val Leu Arg Arg His Ala Phe Ser Gly Arg Val Arg Glu Met	
355 360 365	
ttc gag ggc atc gac ctg ctg ctg atg ccc tcg cag ggc gtc gcc tcg	1152
Phe Glu Gly Ile Asp Leu Leu Leu Met Pro Ser Gln Gly Val Ala Ser	
370 375 380	
ccc acg ctc gcg cgc atg ctg agc ttc ggc gag gac gcc gaa ctg atg	1200
Pro Thr Leu Ala Arg Met Leu Ser Phe Gly Glu Asp Ala Glu Leu Met	
385 390 395 400	
tcc gcg atg ctg cgc tac acc tgc ccg ctg gac atg agc ggc agc ccg	1248
Ser Ala Met Leu Arg Tyr Thr Cys Pro Leu Asp Met Ser Gly Ser Pro	
405 410 415	
acg atc acg ctg ccc ggc ggc ttc acc gat gcg ggc acg ccg gtc gca	1296
Thr Ile Thr Leu Pro Gly Gly Phe Thr Asp Ala Gly Thr Pro Val Ala	
420 425 430	

ttc cag ttc gtc gcg cgc cac ttc gag gaa gag ctg ctg gtg cgc gcc	1344
Phe Gln Phe Val Ala Arg His Phe Glu Glu Glu Leu Leu Val Arg Ala	
435 440 445	
ggc tgg gcc ttc cag cag gcg acc gac tgg cac cgg cgg cat ccg gtg	1392
Gly Trp Ala Phe Gln Gln Ala Thr Asp Trp His Arg Arg His Pro Val	
450 455 460	
ctg tag	1398
Leu	
465	
cccttccttc atgtacgaca cgatcatcgt cggcgcgggt tccgcgggct	1448
gcgtgctggc caatcggctg tcggccgatc	1478

**Abb. 45: Gen- und daraus abgeleitete Proteinsequenz der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*, rekombinant in pUC-AAH/*E. coli* XL1-Blue**

#### 2.4.7. Expression des D-Amidase-Gens in *E. coli* JM101

Zur Expression des D-Amidase-Gens in *E. coli* JM101 wurde das Gen in den Vektor pBTac2 kloniert. Dieser Vektor ist für die Proteinexpression vorgesehen und enthält ein regulierbares Promoterelement, bestehend aus dem starken tac-Promoter, über den die Expression mit IPTG, das den Repressor des lac-Operons inaktiviert, induziert werden kann. Als Selektionsmarker besitzt der Vektor das  $\beta$ -Lactamasegen (Ampicillin-Resistenz).

#### PCR zur Einführung von geeigneten Restriktionsschnittstellen

Zur Klonierung des AAH-Gens in dem Expressionsvektor pBTac2 war es erforderlich, geeignete Restriktionsschnittstellen an beiden Enden des Gens einzuführen. Hierzu wurde ausgehend vom Plasmid pUC-AAH mittels PCR mit den folgenden Primern eine *EcoR* I- am 5'-Ende und eine *Hind* III-Schnittstelle am 3'-Ende eingeführt. Das Stopcodon TAG wurde durch das für *E. coli* gebräuchlichere Stopcodon TAA ersetzt.

#### Primer AAH-N-*EcoR* I:

5'-CCG GAATTC ATG AGC AAC GAA CTG CAT TAC CT-3'

#### Primer AAH-C-*Hind* III:

5'-ATCCC AAGCTT TTA CAG CAC CGG ATG CCG-3'

Unter Berücksichtigung der überstehenden Enden (Mismatch) der Primer berechneten sich Schmelztemperaturen  $T_m$  von 51,5°C für AAH-N-*EcoR I* und 42,9°C für AAH-C-*Hind III*, sodass eine Touchdown PCR (siehe Tab. 49) zu einem Amplifikat in der erwarteten Größe von 1,4 kB führte.

### **DNA-Restriktion, Ligation und anschließende Transformation**

Nach der Reinigung des PCR-Produkts mittels PCR Purification Kit (Qiagen) wurde die DNA-Restriktion mit *EcoR I/Hind III* über Nacht durchgeführt. Die Trennung der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte durch ein präparatives Agarosegel und Isolierung mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen). Anschließend wurde eine blunt-end-Ligation in den ebenso linearisierten pBTac2 Expressionsvektor und die Transformation in kompetente *E. coli* JM101 Zellen durchgeführt.

Aus dieser Transformation resultierten ca. 50 Kolonien nach Selektion auf einer LB<sub>amp</sub>-Agarplatte. Es wurden sechs Kolonien ausgewählt, eine Übernachtskultur in 5 ml LB<sub>amp</sub>-Medium inkubiert und aus der jeweiligen Kultur Plasmid-DNA isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde einer Restriktionsanalyse mit *EcoR I* und *Hind III* unterzogen, die auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Alle sechs Klone zeigten den pBTac-Vektor (Größe x,y kB) sowie das ausgeschnittene Gen in der erwarteten Größe von 1,4 kB.

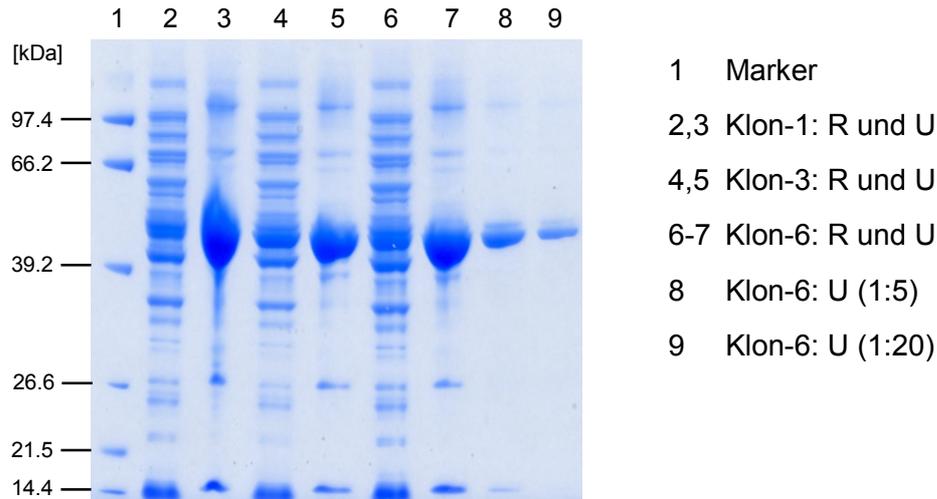
### **Expression der D-Amidase**

Zur Expression wurden drei von den sechs Klonen in 200 ml-LB<sub>amp</sub>-Medium mit den obigen Übernachtskulturen angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Nach einer Induktionsdauer von 4 h wurden die Kulturen geerntet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Zur Beurteilung der Expression ergaben sich im Rohextrakt mit DL-Tle-NH<sub>2</sub> als Substrat folgende Aktivitäten.

**Tab. 28: Enzymaktivitäten der rekombinanten D-Amidase in *E. coli* JM 101**

pBTac/JM101	Akt [U/ml]	Protein [mg/ml]	spez. Akt. [mU/mg]
Klon 1	1,4	17,2	80
Klon 3	3,9	18,2	210
Klon 6	1,8	16,1	115

Mit spezifischen Aktivitäten zwischen 80 und 210 mU/mg im Rohextrakt wurde die rekombinante D-Amidase aktiv nachgewiesen und im Vergleich zum Wildtyp *Variovorax paradoxus* mit einer spez. Akt. von ca. 20 mU/mg 4- bis 10-fach überexprimiert. Zur Überprüfung der Expression wurden sowohl lösliche Fraktion (Rohextrakt (R)) als auch die Proteine der unlöslichen Fraktion (U) in einem 10%igem NuPAGE® Bis/Tris-Gel analysiert.



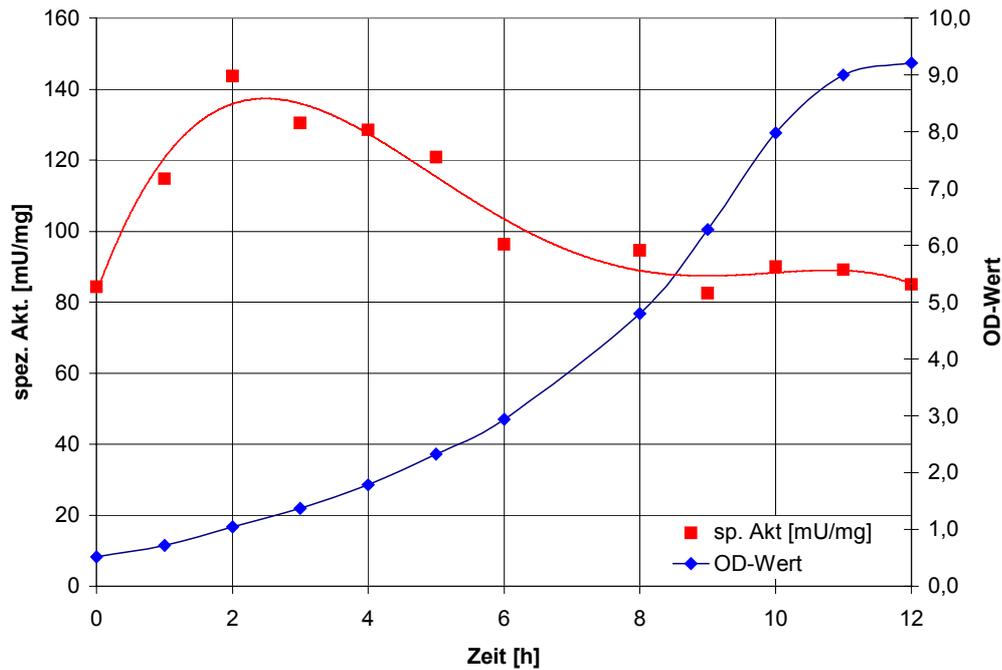
**Abb. 46: NuPAGE® Bis/Tris-Gel-Analyse (10%): Expression der recAAH in *E. coli* JM101; lösliche (R) und unlösliche Fraktionen (U) nach Aufschluss (jeweils 1 µl aufgetragen)**

Aus dem Gel ist ersichtlich, dass die rekombinante D-Amidase in *E. coli* JM101 überwiegend in der unlöslichen Fraktion exprimiert wurde. Eine Abschätzung anhand der aufgetragenen Volumina beider Fraktionen im Gel ergab im Vergleich zum Rohextrakt eine etwa 5-fache Menge an rekombinanter D-Amidase in unlöslicher Form.

Für den Klon-3 mit der größten Expression der D-Amidase wurde das Insert des Plasmids (pBTAC-E/H-3) durch doppelsträngige Sequenzierung überprüft. Diese ergab im Vergleich zur Sequenz des pUC-AAH-Plasmids auf beiden DNA-Strängen eine "stille Punktmutation" an Position 1026 von ursprünglich CTG zu CTA. Dennoch wurde für eine erste Fermentation zur Gewinnung der rekombinanten D-Amidase dieser Klon mit dem Plasmid pBTAC-E/H-3 verwendet und im Folgenden nur noch als pBTAC-AAH bezeichnet.

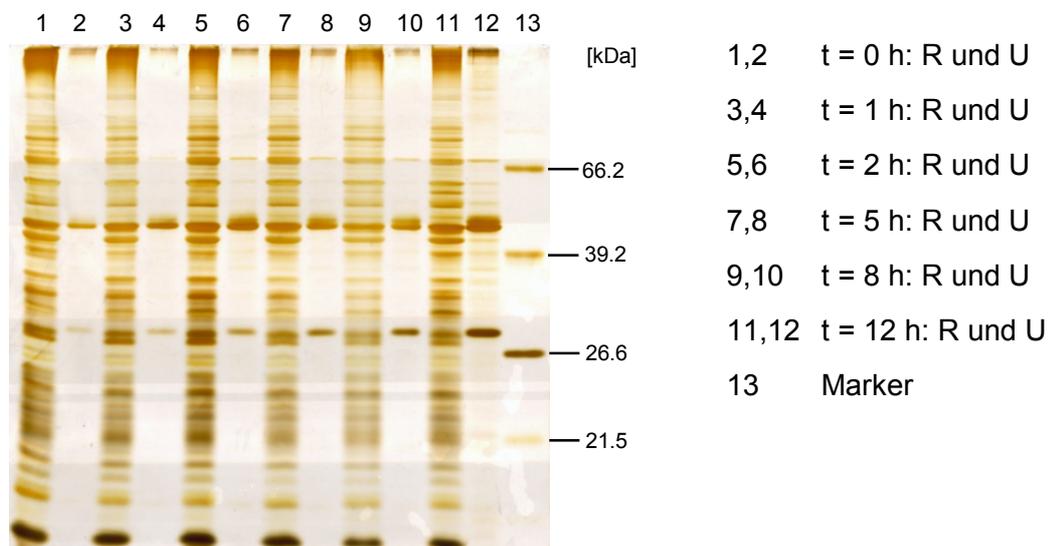
#### 2.4.8. Fermentation der rekombinanten D-Amidase in *E. coli* JM101

Der Stamm *E. coli* JM101 mit der rekombinant vorliegenden D-Amidase im pBTAC-AAH-Plasmid wurde in einer 15-L-Fermentation (Techfors 20 L, Infors) mit LB<sub>amp</sub>-Medium und 0,5% Glycerin als zusätzliche C-Quelle 14,5 h kultiviert. Nach 2,5 h bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,5 wurde die Expression mit 0,2 mM IPTG induziert und die Inkubationstemperatur von 37°C auf 30°C erniedrigt. Dies sollte im Vergleich zur Expression in Schüttelkulturen mit 1 mM IPTG bei 37°C die Bildung von Inclusion bodies minimieren. Während der Fermentation erfolgte eine kontinuierliche Probenahme zur OD- und Aktivitätsbestimmung (Abb. 47).



**Abb. 47: Fermentation des rekombinanten *E. coli* JM101 mit Beginn der Induktion**

Es zeigte sich, dass bereits vor Induktion durch IPTG (Zeitpunkt  $t = 0$ ) mit 84 mU/mg eine relativ hohe Expression der D-Amidase vorlag. Die maximale spez. Akt. mit 145 mU/mg wurde bereits nach 2 h bestimmt, wohingegen nach 12 h bei Erreichen der stationären Phase mit einem OD-Wert von 9 eine Aktivität von 85 mU/mg bestand. Zur Überprüfung der Expression wurden aus den Fermentationsproben die Rohextrakte (R) und die unlöslichen Fraktionen (U) nach Aufschluss über ein SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 48).



**Abb. 48: SDS-PAGE der Fermentationsproben; jeweils lösliche (R) und unlösliche Fraktion (U) zu unterschiedlichen Zeiten**

Wie bereits in Schüttelkulturen, wurde auch bei der Fermentation, trotz niedrigerer Kultivierungstemperatur und IPTG-Konzentration, ein großer Anteil an exprimierter D-Amidase in unlöslicher Form gebildet. Eine zeitliche Abhängigkeit des Verhältnisses löslicher zu unlöslicher Anteil der D-Amidase ist im SDS-Gel nicht zu erkennen. Aufgrund der "stillen Expression" vor IPTG-Zugabe und dem überwiegendem Anteil an unlöslichem Enzym ist mit dem Plasmid pBTAC-AAH in *E. coli* JM101 noch kein ideales Expressionssystem gegeben. Dennoch wurde mit spez. Akt. im Bereich von 83 bis 145 mU/mg im Vergleich zum Wildtyp *Variovorax paradoxus* mit 22 mU/mg eine 4- bis 7-fache Überexpression erreicht.

Insgesamt ergab die Kultivierung von *E. coli* JM101 nach 12 h eine Biofeuchtmasse von 13 g/L und eine Aktivität von 120 Units pro Liter Kulturvolumen. Ein Vergleich zur ersten Fermentation von *Variovorax paradoxus* führte somit zu einer 120-fach höheren Gesamtaktivität und zeigt damit die deutlich bessere Verfügbarkeit der D-Amidase (Tab. 29).

**Tab. 29: Fermentation von *E. coli* JM101 mit rekombinanter D-Amidase im Vergleich zur Fermentation von *Variovorax paradoxus***

Fermentationen	<i>E. coli</i> JM101	<i>V. paradoxus</i>
Volumen [L]	15	15
Biofeuchtmasse [g/L]	13	5,0
Aktivität [U/L Kultur]	120	1
Aktivität [U/g BFM]	9,6	0,2
Spez. Akt. [mU/mg]	85	22
RZA [U/L*h]	10	0,011

### 2.4.9. Zusammenfassende Diskussion der Klonierung, Sequenzhomologie und Expression der D-Amidase

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz der D-Amidase und eine nachfolgende Sequenzanalyse ermöglichte eine Amplifizierung einer Teilsequenz mittels PCR und mittels des Universal-GenomeWalker™-Systems eine Bestimmung der kompletten Gensequenz. Das Gen der D-Amidase wurde anschließend kloniert und zur besseren Verfügbarkeit in *E. coli* exprimiert. Ein Vergleich der ermittelten Proteinsequenz in Proteindatenbanken führte zu Homologien mit Enzymen der "Amidase Signature"-Familie, die in einem Sequenzvergleich gegenüber gestellt wurden. Die Ergebnisse der Klonierung, die Homologieuntersuchung und die Expression der D-Amidase sollen im Folgenden abschließend diskutiert werden.

#### 2.4.9.1. Identifizierung und Klonierung des D-Amidase-Gens

Mit dem N-Terminus der D-Amidase und der Homologie zur Familie der "Amidase Signature" Enzymen wurde ausgehend von genomischer DNA aus *Variovorax paradoxus* durch PCR ein 509 bp großes DNA-Fragment der D-Amidase erhalten. Diese DNA-Teilsequenz ermöglichte wiederum eine Bestimmung der kompletten DNA-Sequenz der D-Amidase mittels des Universal-GenomeWalker™-Systems. Ausgehend von einer "GenomeWalker Bibliothek" waren mit zwei aufeinanderfolgenden PCRs das 1398 bp lange D-Amidase-Gen und darüber hinaus Sequenzinformationen von etwa 1,6 kb vor und 2,4 kb nach dem Gen zugänglich.

Bereits die Analyse der Codon Usage von *Variovorax paradoxus* wies darauf hin, dass die DNA dieses Organismus mit 61,6% einen relativ hohen GC-Gehalt enthält (siehe Anhang). Möglicherweise war dies ein Grund dafür, dass im Rahmen des GenomeWalker™-Systems die empfohlene DNA-Polymerase (Advantage® Genomic Polymerase Mix, Clontech) zunächst zu keinem PCR-Produkt führte. Mit einer für GC-reiche DNA geeigneten Polymerase (Herculase®, Stratagene) und durch Zugabe von Dimethylsulfoxid konnte jedoch eine erfolgreiche Amplifizierung erzielt werden.

Bemerkenswert war auch, dass mit der 2. PCR (Nested PCR) des GenomeWalker™-Systems eine deutliche Verstärkung des erwünschten PCR-Produktes und eine Minimierung unspezifischer PCR-Produkte beobachtet wurde. So zeigte die Gelanalyse nach der 1. PCR für drei Ansätze meist mehrere PCR-Produkte und für den *Sca I*-Ansatz sowie die beiden Positiv-Kontrollen kein Amplifikat (Abb. 40). Im Unterschied dazu ergab die daraufhin durchgeführte 2. PCR für die Positiv-Kontrollen ein Amplifikat in der zu erwartenden Größe und für alle vier Ansätze ein überwiegend einheitliches PCR-Produkt (Abb. 41).

Im Vergleich zu einer im allgemeinen verwendeten Southern-Blot-Hybridisierung gelang mit dieser Methode eine einfache und schnelle Identifizierung des D-Amidase-Gens. An Stelle einer markierten genspezifischen Sonde wurden entsprechende Primer für eine PCR benutzt und das Screening nach einem Hybridisierungssignal innerhalb einer DNA-Bibliothek entfiel.

Zur Überprüfung der Gensequenz und für die weiteren molekularbiologischen Arbeiten wurde mit genomischer DNA aus *Variovorax paradoxus* das D-Amidase-Gen in drei Ansätzen mit zwei verschiedenen Polymerasen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den Klonierungsvektor pUC 18 ligiert und anschließend in *E. coli* XL1 Blue-Zellen transformiert. Die Gensequenz zweier Klone wurde doppelsträngig überprüft und war identisch. Ebenso stimmte die Gensequenz mit der Sequenzierung eines dritten Klons und den bisherigen Sequenzinformationen des Universal-GenomeWalker™-Systems überein. Das überprüfte Plasmid pUC-AAH war Grundlage für die Expression der D-Amidase.

Eine Analyse der 1398 bp langen Gensequenz der D-Amidase ergab einen hohen GC-Gehalt von insgesamt 71,2% und eine Verteilung von 70,4%, 51,1% und 92,3% auf die 1., 2. und 3. Stelle der verwendeten Codons. Erstaunlich ist hierbei die starke Bevorzugung von GC an der 3. Stelle des degenerierten Codes. Auffälligerweise wurde auch für die R-Ketoprofen-Amidase aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 mit insgesamt 66,1% ein ähnlich hoher GC-Gehalt und mit 70,8%, 49,4% und 78,2% eine vergleichbare Verteilung festgestellt (Hayashi et al., 1997). Ein Vergleich der DNA-Sequenzen für beide Enzyme ergab eine Homologie von 64% und deutet damit auf eine ähnliche Bevorzugung GC-reicher Codons beider Organismen. Die Homologie der Aminosäuresequenz der D-Amidase zur R-Ketoprofen-Amidase sowie zu einer Reihe anderer Enzyme wird im folgenden Kapitel diskutiert.

#### 2.4.9.2. Sequenzvergleich der D-Amidase

Bereits die N-terminale Aminosäuresequenz der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* führte zu Ähnlichkeiten mit zwei "Amidase Signature" Enzymen, der Pyrazinamidase aus *Mycobacterium smegmatis* (Boshoff und Mizrahi, 1998) und einer enantioselektiven Amidase aus *Rhodococcus sp.* (Mayaux et al., 1991). Ebenso bestand eine hohe Homologie zu einer Hydrolase aus *Comamonas acidovorans* (Zimmermann et al. 1995), die jedoch nicht zu dieser Enzymfamilie gehört (siehe 2.4.1). Die Homologie zwischen dem 30 Aminosäuren langen N-Terminus der D-Amidase und den N-Termini dieser Enzyme lag oberhalb von 53% und 69% für identische bzw. ähnliche Aminosäuren in diesem Abschnitt.

Mit der 1398 bp langen Gensequenz der D-Amidase und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz von 465 AS führte ein Sequenzvergleich in Proteindatenbanken (BLAST search, NCBI, Maryland, USA) zu signifikanten Homologien mit über 100 Enzymen, die alle der "Amidase Signature"-Familie zugeordnet werden. Die Ähnlichkeit betrug mindestens 25% oder 40% bezüglich identischer oder ähnlicher Aminosäuren in der Primärstruktur. Für eine Vielzahl dieser Proteine liegt jedoch bisher nur die Gensequenz vor und keine weitere biochemische Charakterisierung. Diese Sequenzen stammen meist aus Genomsequenzierungen von Mikroorganismen, und die Zuordnung zu dieser Familie und der vermutlichen Enzymaktivität erfolgte anhand der Homologie zu charakterisierten Enzymen.

In Abbildung 49 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz der D-Amidase mit den sechs ähnlichsten Enzymen aus Tabelle 30 dargestellt.

**Tab. 30: Enzyme mit der größten Homologie zur D-Amidase aus *Variovorax paradoxus***

Homologie zur D-Amidase	Identisch [%]	Ähnlich [%]
1. R-Ketoprofen-Amidase, <i>C. acidovorans</i>	56	71
2. vermutliche Amidase, <i>Mycobacterium tuberculo.</i>	49	65
3. enantioselektive Amidase, <i>Rhodococcus sp.</i>	37	52
4. Nicotin-/Pyrazin-Amidase, <i>M. smegmatis</i>	36	55
5. Amidase, <i>Pseudomonas putida 5B</i>	36	52
6. Glu-tRNA <sup>Gln</sup> -Amidotransferase, <i>Synechocytis sp.</i>	36	53

Bisher zeigt die D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* die größte Ähnlichkeit zur R-Ketoprofen-Amidase aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 mit 56% identischen bzw. 73% ähnlichen Aminosäuren innerhalb der Sequenz (Hayashi et al., 1997). Die Ähnlichkeit dieser beiden Enzyme, insbesondere die gemeinsame D-Selektivität für Aminosäureamide wurde bereits in 2.3.9 diskutiert. Die zweitgrößte Homologie wird für eine nicht näher charakterisierte Amidase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (gi: 15610511) gefunden.

Darauf folgen die bereits erwähnten Enzyme aus *Rhodococcus sp.* und *Mycobacterium smegmatis*, die schon eine hohe Homologie zum N-Terminus zeigten und eine Amidase aus *Pseudomonas putida 5B* (Wu et al., 1998). Die Ähnlichkeit der D-Amidase zu diesen drei Enzymen liegt mit etwa 36% bezüglich der identischen Aminosäuren deutlich niedriger. Mit einer Homologie innerhalb dieser drei Enzyme von 40% identischer Aminosäuren liegen sehr verwandte Enzyme vor. Das ähnliche Substratspektrum der Amidasen aus *Rhodococcus sp.* (Mayaux et al., 1991) und *Pseudomonas putida 5B* (Wu et al., 1998) unterstreicht diese Verwandtschaft. Beide Enzyme hydrolysieren zur obigen R-Ketoprofen-Amidase ähnlich, jedoch mit umgekehrter Selektivität, bevorzugt (S)-2-Aryl-propionsäureamide. Ebenso wurde für beide Enzyme eine genetische Kopplung mit einer Nitrilhydratase gefunden, wie sie für den zweistufigen enzymatischen Abbau von Nitrilen benötigt wird (siehe I.4.2). Demgegenüber deamidiert die Amidase aus *Mycobacterium smegmatis* Nicotin- und Pyrazinamid, das zur Behandlung von Tuberkulose eingesetzt wird (Boshoff und Mizrahi, 1998).

Weiterhin besitzt die D-Amidase aus *Variovorax* eine gewisse Verwandtschaft zur A-Untereinheit der heterotrimeren Glu-tRNA<sup>Gln</sup>-Amidotransferasen, insbesondere aus *Synechocytis sp.*, die ebenfalls zur "Amidase Signature"-Familie zugeordnet werden. Neben der üblichen Acylierung der tRNA mittels einer Glutamyl-tRNA-Synthetase katalysiert dieses Enzym die Transamidierung der "inkorrekten" Glu-tRNA<sup>Gln</sup> mit Glutamin und ATP zur Gln-tRNA<sup>Gln</sup>. Über die genauere Bedeutung der Homologie dieser Untereinheit von Amidotransferasen zu den Amidasen ist bisher wenig bekannt (Becker et al., 2000).



## Homologie der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* mit Enzymen der "Amidase Signature"-Familie

VardAmi	-----MSNEHLHYELVLDVGRRIQRKELSPVEVTTQÄQLARIKEKVDGALKSVYIVMAEHALADARRAEAEIARGEI RGPLHGVPVAVKDLICWTKGVATAA	93
ComRami	-----MPNADLHYWEAAELARKIRARDISPEVEVTEAIIERISDLDPALHSYALVLP EQALIEQARDAERALMHGGPILGALHGVPVAVKDLICWLAGSPATA	94
MytAmi	MTDADSAVPPRIIDEDAI SKIELLETVADLIRTRQÖLTSAEVTESTLRRIERLDPÖLKS YAFVMPETAIAAARAADAD IARGHYEGLHGVP IGVKDLICYTVDAPATA	105
RhoAmi	-----MGLHELTLAÖVAAKIENKELSPVELLDVILARVAEIEPKISAFVTITADSARKARLAAD E IAGGHYRGPLHGVP IGLKDLFEVAGVPNTA	91
MysNiC	-----MELYELPLIEVAEKIRTKKESVPEVTESSILARLEVEVEPLITAFVTTTPELALIEQAKAEKEIADKXYRGPLHG I PIGVKDLICYTVDAGIRTTTS	91
PseAmi	-----MSSLTRLLTLAÖVAÖKLKAREVSAVEVLDACL TQVRSTEKQISAYVCVLEDDQARAANAHTDADIR -GRWKGPLHGVPVAVKDLICYD IAGVPTTA	91
SymAtf	-----MSLIR-----ALHÖQLIDQEISAVAVAÖASLARI EAVDRILKSF LQVTA PÖA IAÖAEKVDAÖIAAGEP IGLAG IPIGI KDNLC TKGI VTTTC	87
. . . . .		
VardAmi	GMTLIYRDFVPTEDGTAVRKLEAGAVILGKLIÖLTESAYADHHP S -VTPVPVNPWNAAHWSGASSSSGSGVATAAGLICYSSLCTDTGGSI RFPSSANGLITGLK-PTW	195
ComRami	GTTIHKDFIPTEDATVVKLRDAGAVL GKIÖLT EGAFAITHHP S -IPEVPVNPWHPNHWA GASSSSGSGVATAAGLICYASI GTDTGGSI RFPAAANGLITGLK-PTW	196
MytAmi	GTTIFRDFRPA YDATTVARLRAAGAVIIGKIAMTEGAYLGYHPS -LPTVPVNPWDPTAWAGVSSSGCGVATTAAGLCFGSI GSDTGGSI IRFP TSMCGVTG I K -PTW	207
RhoAmi	SSRVRADYI P SSDGAAVEKLTA GAVMI GKTHTHEFA YGATTP T -----TRNPPWDPTRTPGSSSGTTAALAAGLIFÄGMGTD TGGSI IRI PÄAVCGTVGLK-PTY	190
MysNiC	SSAÖRADYV P DADSVSAKL YDAGMWLVGKTHTHEFA YGATTP T -----TGNPPWAPDRTPGGSSGSGA AVAAGVHVALLGSDTGGSI IRI PÄALCGTVGLK-PTY	190
PseAmi	SSPA-HELDAÖQD PARVRRLÖDAGAVILGKTHTHEFA YGRITPK -----SRNPPRDPGRTPGSSSGSAA TVAACCVYLLATGTD TGGSVRI PSSM CNTVGLKÖPTV	191
SymAtf	ASÖILRGFVPEYESTVTEKIQKAGAVMWGKTNLDEFAMGSSSTENSGYQVTANP WDLTRVPPGSSSGSAA AVA ADECLIALGSDTGGSI RQ PASICGVWG MK-PTY	191
. . . . .		
VardAmi	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	300
ComRami	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	300
MytAmi	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	300
RhoAmi	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	310
MysNiC	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	295
PseAmi	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	295
SymAtf	GRVSRHGAFELLA TL DHI GPMT RSAADAGAMLGAIAGADPKDPTASLA AVPNYI LAGMERGLRGLRVGIDARWNAE GVDATA TAQVMEGALIAAVRELGA E VRHVTFP	296

Mit der Homologie innerhalb dieser sieben Enzyme wird besonders durch die Sequenzlücken (gaps) eine mögliche Einteilung ersichtlich (Abb. 49). So bildet die D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* mit den zwei ähnlichsten Amidasen aus *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 und *Mycobacterium tuberculosis* eine Gruppe sehr ähnlicher Enzyme. Auffälligerweise besitzen diese drei Enzyme auch nicht das hochkonservierte "Amidase Signature"-Motiv, sondern variieren leicht mit der Sequenz G(AV)SSSG (Abb. 49, grau hinterlegt). Darauf folgen die Amidasen aus *Rhodococcus* sp., *Mycobacterium smegmatis*, und *Pseudomonas putida* 5B als eine Gruppe mit der typischen GGSSGG-Signatur. Ebenso können die zuletzt genannten Glu-tRNA<sup>Gln</sup>-Amidotransferasen innerhalb dieser Familie als eine eigenständige Gruppe betrachtet werden. Unabhängig davon zeigen alle sieben aufgeführten Enzyme mit dem neun Aminosäure langen Motiv G(T/S)DTGGS(I/V)R einen weiteren großen hochkonservierten Bereich (Abb. 49, grau hinterlegt), sowie eine Vielzahl kleiner homologer Regionen.

Die Homologie der D-Amidase zu den typischen Amidasen dieser Enzymfamilie (siehe 1.4.2) aus *Pseudomonas chlororaphis* B23, *Rhodococcus* sp. R312 und *Rhodococcus rhodochrous* J1, sind im Bereich von etwa 30% identischer Aminosäuren. Wohingegen die Ähnlichkeit zu der umfangreich untersuchten Fettsäureamid Hydrolase aus *Rattus norvegicus* 20% beträgt. Trotz dieser geringen Homologie sind die für die katalytische Aktivität diskutierten Aminosäuren Serin<sup>241</sup> und Lysin<sup>142</sup> der Fettsäureamid Hydrolase in der D-Amidase aus *Variovorax* und den sechs homologen Enzymen konserviert (Abb. 49, gelb hinterlegt). Durch die Inhibierung der D-Amidase mit Phenylmethylsulfonylfluorid unterstützt, könnte somit, wie für die Fettsäureamid Hydrolase vorgeschlagen wurde, Ser<sup>178</sup> das angreifende Nukleophil für die Bindung des Substrates bereitstellen. Im Vergleich dazu ist von den vier Cystein-Resten der D-Amidase keiner in dieser Gruppe konserviert, für die ebenfalls eine Inhibierung der D-Amidase mit Thiol-blockierenden Reagenzien beobachtet wurde.

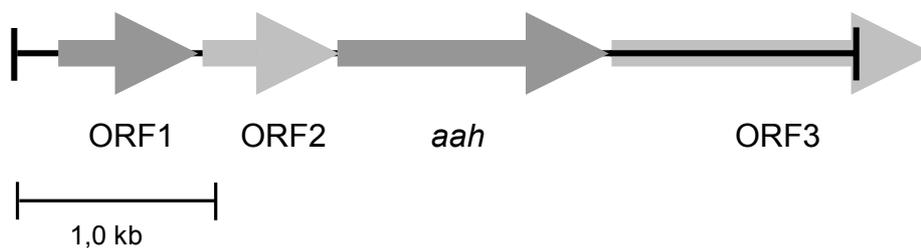
Mit der Sequenzanalyse in Proteindatenbanken wurde zudem eine bisher nicht näher beschriebene Indol-acetamid Hydrolase in *Variovorax paradoxus* TV gefunden (gi: 6521703). Die Homologie zur D-Amidase betrug 26%.

Während bisher nur die Homologie der D-Amidase betrachtet wurde, soll im Folgenden anhand der gesamten vorliegenden Sequenzinformation aus *Variovorax paradoxus* die Genstruktur diskutiert werden

### 2.4.9.3. Analyse der vorliegenden DNA-Sequenz in *Variovorax paradoxus*

Eine Analyse der bisher sequenzierten, aus der "GenomeWalker Bibliothek" zugänglichen DNA-Sequenzinformationen von 4,3 kb in Proteindatenbanken führte aufgrund der Ähnlichkeit zu weiteren codierenden Sequenzen, den sogenannten offenen Leserahmen (Open Reading Frames, ORF; Abb. 50).

Mit dem Startcodon des Amidase-Gens als relativen Bezugspunkt konnte 1,4 kb bzw. 0,7 kb in 5'-Richtung (upstream) jeweils ein ORF1 (720 bp) und ORF2 (705 bp) mit unterschiedlicher Homologie zu einer vermutlichen ATP-bindenden Untereinheit eines ABC-Transporters zugeordnet werden.



**Abb. 50: Organisation des D-Amidase-Gens (*aah*) in *Variovorax paradoxus***

Die Superfamilie der ABC-Transporter ist ein weit verbreitetes System, das aus zwei hydrophoben integralen Membran-Domänen und zwei hydrophilen ATP-bindenden Domänen im Cytoplasma besteht, die als "ATP-binding cassette" (ABC) bezeichnet werden. Unter ATP-Hydrolyse ermöglichen diese ABC-Proteine den aktiven Transport. Die vier Domänen können als separate Proteine oder unterschiedlich miteinander fusioniert bis zu einer einzelnen Polypeptidkette vorkommen (Walshaw et al., 1997). Die Subfamilie der bakteriellen Transporter besitzt zusätzlich noch ein oder mehrere Substrat-bindende Proteine (solute-binding protein), die sich im Periplasma (gram-negativ) oder für gram-positive Bakterien an der Zellwand assoziiert befinden (Hosie et al., 2001a).

Überraschenderweise wurden in der Gruppe der aliphatischen Amidasen (siehe I.4.1) Gene im Amidase-Operon beschrieben, die zu ORF1 und ORF2 ähnlich sind. So wurden im Operon der Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* zwei Gene, AmiB und AmiS identifiziert, die möglicherweise zwei Komponenten eines ABC-Transporters bilden. Das Genprodukt von AmiB besitzt ATPase-Aktivität und könnte der cytoplasmatischen ATP-bindenden Einheit entsprechen, wohingegen AmiS möglicherweise den integrale Membrantransporter bildet (Wilson, 1995). Ganz ähnlich zu AmiB und AmiS wurden im Operon der "wide-substrat Amidase" aus *Rhodococcus* sp. R312 entsprechende Gene beschrieben, die für den Transport der Substrate oder Produkte der Amidase diskutiert werden (Chebrou et al., 1996a).

In 3'-Richtung (downstream) wurde mit den bisherigen Sequenzinformationen 11 Basen nach dem Stop-Codon des *aah*-Gens der Beginn eines mindestens 1,26 kb großen ORF3 mit hoher Ähnlichkeit zu einer Alkohol-Dehydrogenasen gefunden. Mit der vorliegenden Teilsequenz des ORF3 ergab sich die größte Homologie (48%) zu einer Alkohol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* Gpo1 mit 178 identischen der insgesamt 430 AS langen Teilsequenz. Diese 552 AS lange Alkohol-Dehydrogenase oxidiert aliphatische n-Alkohole und gehört zu einem größeren Enzym-System, das für den Abbau von n-Alkanen zu Fettsäuren verantwortlich ist (Beilen et al., 2001). Die mutmaßliche Funktion der drei offenen Leserahmen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 31: Homologie der ORFs 1 bis 3 zu folgenden Proteinen**

ORF	Protein, Organismus	Homologie [%]
1	mögliches ATP-bindendes Protein eines Harnstoff/Amid ABC-Transp., <i>Deinococcus rhadiodurans</i> R1 (gi: 15807983)	42
2	mögliche ATP-bindende Untereinheit eines ABC-Transp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (gi: 15600055)	48
3	Alkohol-Dehydrogenase, <i>Pseudomonas putida</i> (gi: 5531409)	41

Abschließend ist noch anzumerken, dass eine mit der D-Amidase gekoppelte Nitrilhydratase, deren Gene häufig in direkter Nähe zum Amidase-Gen liegen (siehe Abb. 11), in der vorliegenden Gensequenz nicht vorkommt.

#### 2.4.9.4. Expression der D-Amidase

Für eine Expression der D-Amidase wurden zunächst mit Plasmid pUC-AAH durch eine PCR geeignete Schnittstellen an beiden Enden des Gens eingeführt und die präparierten DNA-Fragmente in den Expressionsvektor pBTAC ligiert. Dieser Vektor ist speziell für die Proteinexpression vorgesehen und enthält den starken tac-Promoter, über den die Expression mit IPTG induziert wird. Die folgende Transformation in den Wirtsorganismus *E. coli* JM101 war erfolgreich. Alle Klone enthielten laut Restriktionsanalyse das D-Amidase-Gen in der erwarteten Größe.

Die Expression der D-Amidase in *E. coli* JM101-Schüttelkulturen ergab unter den bisherigen Bedingungen eine spez. Akt. im Rohextrakt zwischen 85 und 210 U/mg und im Vergleich zu 20 mU/mg in *Variovorax paradoxus* eine 4- bis 10-fache Überexpression. Eine SDS-Gelanalyse von Rohextrakt und Proteine der unlöslichen Fraktion zeigte jedoch, dass nur etwa 20% der rekombinanten D-Amidase in löslicher Form gebildet wurde und der Großteil des Enzyms in Form von "Inclusion bodies" vorlag.

Weitere Untersuchungen im Rahmen einer 15 L-Fermentation ergaben, dass mit diesem Expressionssystem bereits vor Induktion mit IPTG mit etwa 80 mU/mg eine relativ hohe Proteinsynthese der D-Amidase erfolgte und wiederum ein Großteil in unlöslicher Form gebildet wurde. Die maximale spez. Akt. mit 145 mU/mg wurde bereits nach 2 h bestimmt, wohingegen bei Erreichen der stationären Phase nur noch eine spez. Akt. von 85 mU/mg bestand. Im Vergleich zu den Schüttelkulturen führte eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 30°C und Induktorkonzentration auf 0,2 mM zu keiner erheblichen Verbesserung der Expression, sodass in allen Proben der Hauptteil der exprimierten D-Amidase in unlöslicher Form auftrat.

Ganz ähnliche Probleme bei der Expression von Amidasen wurde für eine Reihe von "Amidase Signature" Enzymen beschrieben. So wurde für die enantioselektive Amidase aus *Rhodococcus* sp. in verschiedenen *E. coli* Stämmen die ausschließliche Bildung des Enzyms in unlöslicher Form beobachtet. Ebenso zeigte die Genstruktur dieser Amidase mit 64,6% einen hohen GC-Gehalt. Mit *Brevibacterium lactofermentum*, einem gram-positiven Wirtsorganismus, der *Rhodococcus* sp. sehr ähnlich ist, gelang es die enantioselektive Amidase aktiv zu exprimieren. Dabei entsprach die Aktivität des rekombinanten Enzyms im Rohextrakt 25% des Wildtyps (Mayaux et al., 1991). Auch die Expression der ähnlichen Amidasen aus *Mycobacterium smegmatis*, und *Pseudomonas putida 5B* mit Vektoren der pET-Serie und verschiedenen *E. coli* Stämmen führte zur überwiegenden Bildung von "inclusion bodies" (Boshoff und Mizrahi, 1998; Wu et al., 1998).

Demgegenüber konnte für die Expression der Amidase aus *Rhodococcus* sp. R312 in *E. coli* mit Plasmiden, die einen Tryptophan-induzierten bzw. einen hitze-induzierten Promotor besitzen, bereits durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur von 38°C auf 30°C eine deutliche Steigerung des löslichen Enzyms von 10 auf 80% erzielt werden (Mayaux et al., 1990).

Für das bisher zur D-Amidase ähnlichste Enzym, die R-Ketoprofen-Amidase aus *Comamonas acidovorans*, wurde eine Expression in *E. coli* JM109 mit pUC18 beschrieben, wobei mit 383 mU/mg getrockneter Zellen im Vergleich zum Wildtyp nur 20% exprimiert wurden. Über eine Bildung von unlöslichem rekombinantem Enzym wurden keine Angaben gemacht (Hayashi et al., 1997).

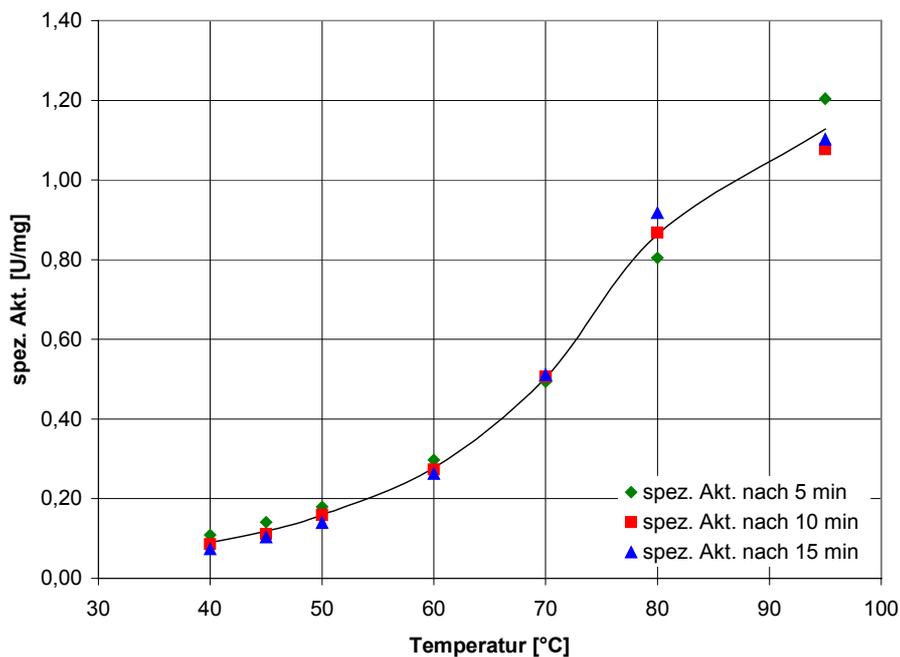
### 3. L-Amidase aus *Rhizobium huautlense*

#### 3.1. Optimierung des Enzymtests für die Aktivitätsbestimmung

Unter den bisherigen Bedingungen wurde der Enzymtest für die Aktivitätsbestimmung durch ein dreiminütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt. Mit diesem Hitzestopp lag jedoch für die L-Amidase keine vollständige Enzyminaktivierung vor. Im folgenden wurde somit eine Inaktivierung durch Zugabe eines Enzymtestvolumens von 0,01 M NaOH oder durch direkte Zugabe von 40 µl des Enzymtests in 140 µl NaBorat-Puffer (pH 10,4) zur Derivatisierung für die anschließende HPLC-Analytik erreicht.

#### Temperaturabhängigkeit der L-Amidase-Aktivität

Die Temperaturabhängigkeit der L-Amidase im Bereich von 40 bis 95°C bei 5, 10 und 15-minütiger Inkubation ist in der folgenden Graphik dargestellt. Mit einer Steigerung der Aktivität in diesem Bereich von 0,1 auf 1,1 U/mg im Rohextrakt lag eine ungewöhnlich hohe Temperaturabhängigkeit für dieses Enzym vor (Abb. 51).

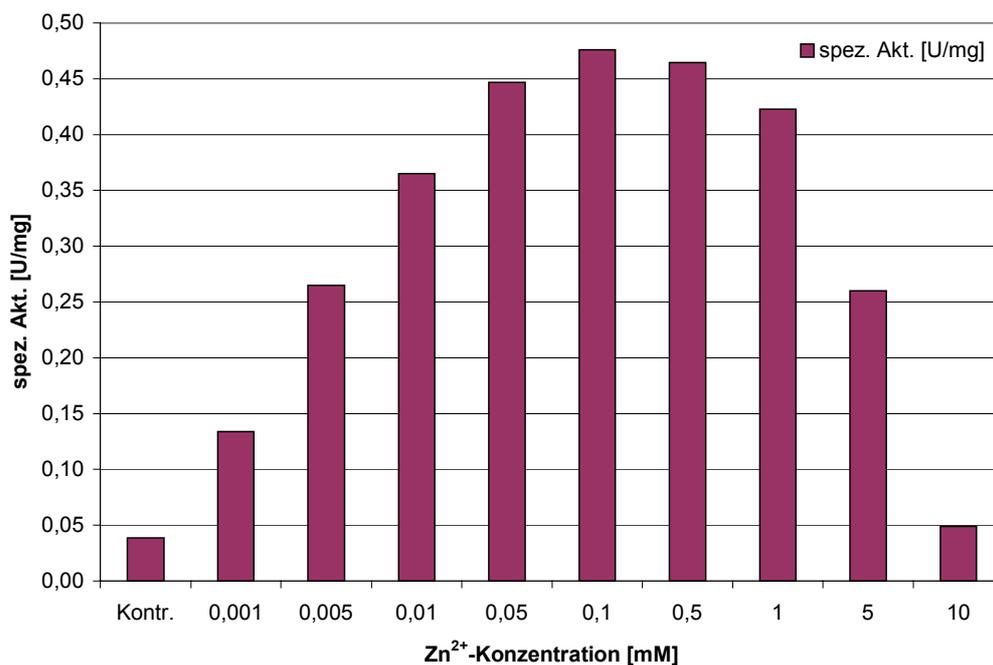


**Abb. 51: Temperaturabhängigkeit der Amidase-Aktivität im Rohextrakt**

Für die weiteren Aktivitätsbestimmungen wurde eine Inkubationstemperatur von 70°C gewählt, bei der mit 0,5 U/mg etwa die Hälfte der maximalen Aktivität vorlag. Eine Untersuchung der Stabilität der L-Amidase bei 70°C führte mit Inkubationen bis zu 2 h und auch bei Vorinkubation der Enzymlösung von 30 min zu keinem signifikantem Aktivitätsverlust. Eine detaillierte Untersuchung des Temperaturoptimums und der Stabilität erfolgte mit partiell gereinigtem Enzym und ist in 3.4.1 aufgeführt.

### Abhängigkeit der L-Amidase-Aktivität von der Zn<sup>2+</sup>-Konzentration

Mit der Inkubation bei 70°C wurde erneut die Abhängigkeit der Aktivität von der Zn<sup>2+</sup>-Konzentration im Bereich von 1 µM bis 10 mM im Enzymtest untersucht und damit die geeignete Zn<sup>2+</sup>-Konzentration bestimmt. Der verwendete Rohextrakt wurde hierzu, wie bereits unter II.1.1.3, über eine PD-10 Gelfiltrations-Säule (Amersham Biosciences), mit MES-Puffer entsalzt. Mit Aktivitäten über 0,4 U/mg lag der geeignete Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationsbereich von 50 µM bis 1 mM. Das Aktivitätsmaximum mit 0,48 U/mg wurde bei einer Konzentration von 0,1 mM Zn<sup>2+</sup> ermittelt (Abb. 52).



**Abb. 52: Abhängigkeit der Aktivität von der Zn<sup>2+</sup>-Konzentration im Enzymtest**

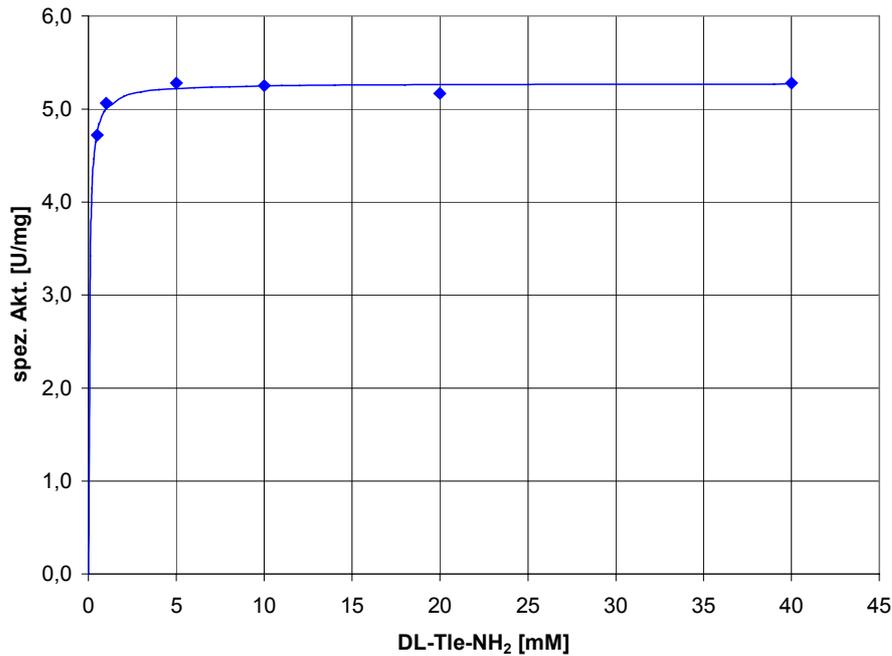
Für die weiteren Aktivitätsbestimmungen der L-Amidase wurde somit der Enzymtest in folgender Zusammensetzung verwendet (Tab. 32); zwischen 15 und 60 min bei 70°C inkubiert und durch Zugabe von 40 µl des Enzymtests in 140 µl NaBorat-Puffer (pH 10,4) zur Derivatisierung für die anschließende HPLC-Analytik abgestoppt.

**Tab. 32: Optimierter Enzymtest für die Aktivitätsbestimmung der L-Amidase**

Enzymtest der L-Amidase	Volumen [µl]
MES-Puffer (0,1 M, pH 7,5) + 0,1 mM ZnSO <sub>4</sub>	400
DL-Tle-NH <sub>2</sub> (0,2 M)	50
Rohextrakt oder Enzymlösung	50

### 3.1.1. Abschätzung des $K_M$ -Wertes für DL-Tle-NH<sub>2</sub>

Zur Bestimmung des Linearitätsbereiches für den Enzymtest wurde mit dem Standardsubstrat DL-Tle-NH<sub>2</sub> eine Abschätzung des  $K_M$ -Wertes der L-Amidase durchgeführt. Hierzu wurde mit angereinigtem Enzym (nach IEC) die Aktivität im Bereich von 0,5 bis 40 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub> nach 20 und 30 min Inkubation ermittelt (Abb. 53).



**Abb. 53: Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration DL-Tle-NH<sub>2</sub>**

Anhand des Verlaufes der Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der kleinen Anzahl an Messwerten lässt sich für die L-Amidase ein  $K_M$ -Wert kleiner als 0,5 mM für DL-Tle-NH<sub>2</sub> abschätzen. Eine Substratüberschussinhibierung im Bereich bis 40 mM konnte nicht festgestellt werden. Mit der üblichen Substratkonzentration von 20 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub> und einer Produktbildung bis zu 2 mM im Enzymtest waren somit die Bedingungen eines linearen Enzymtests gegeben und es wurden Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gemessen.

### 3.2. Wachstum und Enzymaktivität in Minimalmedium M-2 und DSMZ-Medium 1

Eine Zellkultivierung von jeweils 400 ml Minimalmedium M-2 in 2-L-Schüttelkolben, die 5%ig angeimpft wurde, führte nach 24 h bei einem  $OD_{660}$  von 1,5 zu einer Zellausbeute von 6,9 g/L. Nach Zellaufschluss durch Ultraschall ergab sich mit einem Proteingehalt von 5,3 mg/ml eine spez. Akt. von etwa 0,4 U/mg.

Die Kultivierung von *Rhizobium huautlense* in dem DSMZ-Medium-Nr. 1 führte ebenso zum Nachweis der L-Amidase im Rohextrakt. Unter ähnlichen Wachstumsbedingungen konnte nach Zellaufschluss mit einem Proteingehalt von 4,5 mg/ml eine spez. Akt. von 0,11 U/mg bestimmt werden. Im Vergleich zur Aktivität im Minimalmedium M-2 war somit bei fehlender Induktion eine Restaktivität der L-Amidase von etwa 30% vorhanden.

### 3.3. Reinigung der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense*

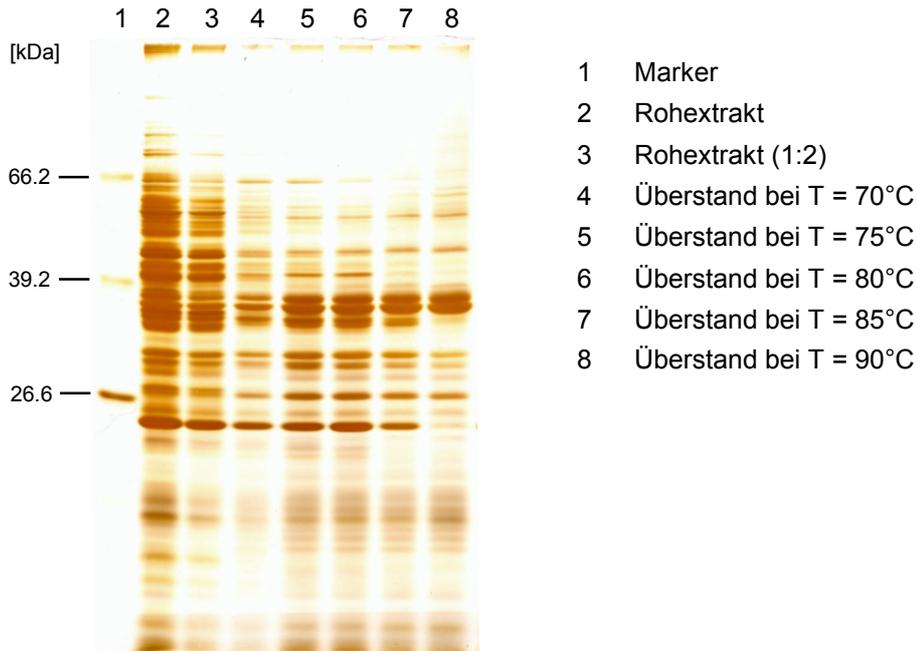
#### 3.3.1. Hitzefällung als 1. Reinigungsschritt

Die hohe Temperaturstabilität der L-Amidase ermöglichte eine Hitzefällung als ersten Reinigungsschritt. In einem Vorversuch wurde hierzu Rohextrakt bei Temperaturen zwischen 70 und 90°C für 10 min inkubiert, anschließend abzentrifugiert und im Überstand die folgenden Aktivitäten und Proteingehalte bestimmt.

**Tab. 33: Enzymaktivitäten und Proteingehalte im Überstand nach Hitzefällung bei Temperaturen zwischen 70 und 90°C**

T [°C]	Kontrolle	70	75	80	85	90
Restaktivität [%]	100	92	93	100	96	39
Protein [mg/ml]	7,0	2,6	1,8	1,6	1,4	1,2
spez. Akt. [U/mg]	0,60	1,5	2,2	2,6	2,8	1,3

Bis zu einer Temperatur von 85°C war bei einer 10-minütigen Inkubation im Vergleich zur Kontrolle die Restaktivität im Überstand größer als 90%. Bei 90°C konnte jedoch nur noch eine Restaktivität von 39% bestimmt werden. Gleichzeitig zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme des Gesamtproteins im Überstand mit zunehmender Temperatur. Insgesamt resultierte somit eine Zunahme der spez. Akt. von 0,6 U/mg bis auf 2,8 U/mg bei einer Temperatur von 85°C. Der Rohextrakt und die Überstände wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 54).



**Abb. 54: SDS-PAGE (12,5%) zur Analyse der Reinigung mittels Hitzefällung: Rohextrakt und Überstände nach Hitzefällung zwischen 70 und 90°C.**  
 Aufgetragene Proteinmengen: Spur 1: 60 µg, Spur 2: 30 µg und Spuren 3 bis 8: jeweils 20 µg

Im Hinblick auf eine Abtrennung von Fremdproteinen unter relativ schonenden Bedingungen wurde für eine Hitzefällung mit 30 ml Rohextrakt eine 10-minütige Inkubation bei 80°C gewählt. Ausgehend von einer Volumenaktivität mit 3,5 U/ml und einer spez. Akt. von 0,40 U/mg ergab sich nach der Hitzefällung eine Volumenaktivität von 3,7 U/ml und mit 2,3 U/mg eine vergleichbare spez. Akt. wie im Vorversuch. Daraus berechnete sich ein ungewöhnlich hoher Reinigungsfaktor von 6 bei einer 100%igen Ausbeute.

### 3.3.2. Anionenaustausch-Chromatographie (IEC)

#### Bindung der L-Amidase an DEAE- und Q-Sepharose bei pH-Wert 6,5

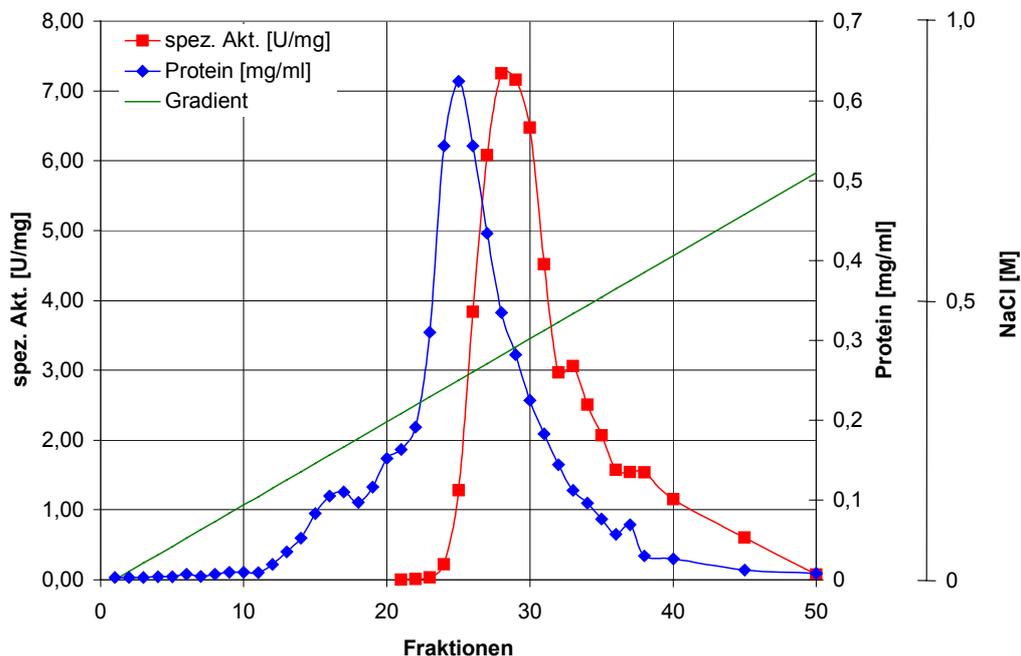
Ausgehend von der hitzegefällten Amidase-Fraktion wurde die Bindung des Enzyms an DEAE- und Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences) mit Kpi, 20 mM, bei pH-Wert 6,5 untersucht. Hierzu wurde Adsorber mit der Enzymlösung 2 h in einem Überkopfschüttler inkubiert, anschließend abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit den Überständen wurde ein Enzymtest durchgeführt und der Proteingehalt bestimmt. Anhand der Kontrolle konnten somit die Restaktivität und der verbleibende Proteingehalt im Überstand berechnet werden.

Für beide Adsorber wurde unter diesen Bedingungen keine Aktivität im Überstand bestimmt. Mit dieser Adsorbermenge erfolgte somit bei pH 6,5 eine vollständige

Bindung des Enzyms an die DEAE- bzw. Q-Sepharose. Mit einem Proteingehalt von 0,41 mg/ml für DEAE- und 0,50 mg/ml für Q-Sepharose im Überstand war keine Aussage über eine höhere Selektivität eines der beiden Materialien möglich.

### IEC mit DEAE-Sepharose als 2. Reinigungsschritt

Unter den angegebenen Bedingungen (siehe Tab. 41) führte ein IEC-Säulenlauf zu folgendem Elutionsprofil (Abb. 55). Die L-Amidase-Aktivität wurde in einem breiten Bereich von etwa 20 Fraktionen bzw. 100 ml nachgewiesen. Unter der Annahme eines Totvolumens von 15 ml eluierte das Enzym im Bereich von 0,3 bis 0,6 M NaCl.



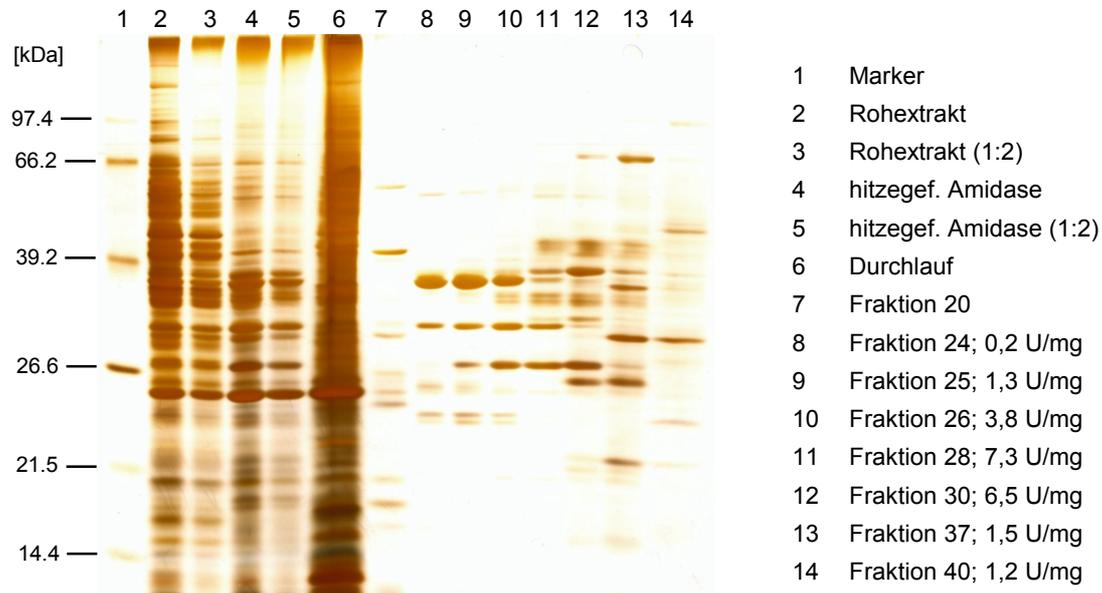
**Abb. 55: Elutionsprofil der IEC mit Beginn des Gradienten**

Anhand der spez. Akt. der aufgetragenen Probe von 2,3 U/mg auf 5,8 U/mg im Pool berechnete sich ein Reinigungsfaktor von 2,5 und eine Ausbeute von 96% (Tab. 34). Die anschließende Aufkonzentrierung des Pools (Omega™-Membran, Pall Gelman Laboratory) um den Faktor 10 führte zu einer Gesamtausbeute von 93%.

**Tab. 34: Ergebnisse des IEC-Säulenlaufs und der anschließenden Ultrafiltration**

IEC	hitzegefällte Amidase	Pool 25-34
Aktivität [U]	74	71
Protein [mg/ml]	1,6	0,24
spez. Akt. [U/mg]	2,3	5,8

In der folgenden Graphik ist der Verlauf der IEC-Reinigung anhand eines SDS-Polyacrylamidgels dargestellt.



**Abb. 56: SDS-PAGE (12,5%) der Hitze-fällung und der IEC: Rohextrakt, hitzegefällte Amidase, Durchlauf und ausgewählte Fraktionen.**

Aufgetragene Proteinmengen: Spur 2: 40 µg, Spur 3: 20 µg, Spur 4: 20 µg, Spur 5: 10 µg und Spuren 7 bis 14: jeweils 10 µg.

### 3.3.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

#### Bindung der L-Amidase an verschiedene HIC-Materialien

Nachdem die Stabilität der Aktivität in Anwesenheit von 0,5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  überprüft wurde, konnte in einem Vorversuch die Bindung des Enzyms an die Adsorbentmaterialien Butyl-Sepharose 4 FF (B), Octyl-Sepharose 4 FF (O) und Phenyl-Sepharose CL-4B (P) untersucht werden. Dazu wurde der Adsorbent mit hitzegefällter Amidase-Fraktion in 20 mM Kpi, pH 6,5 und 0,5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Adsorbent abgetrennt und der Überstand abgenommen.

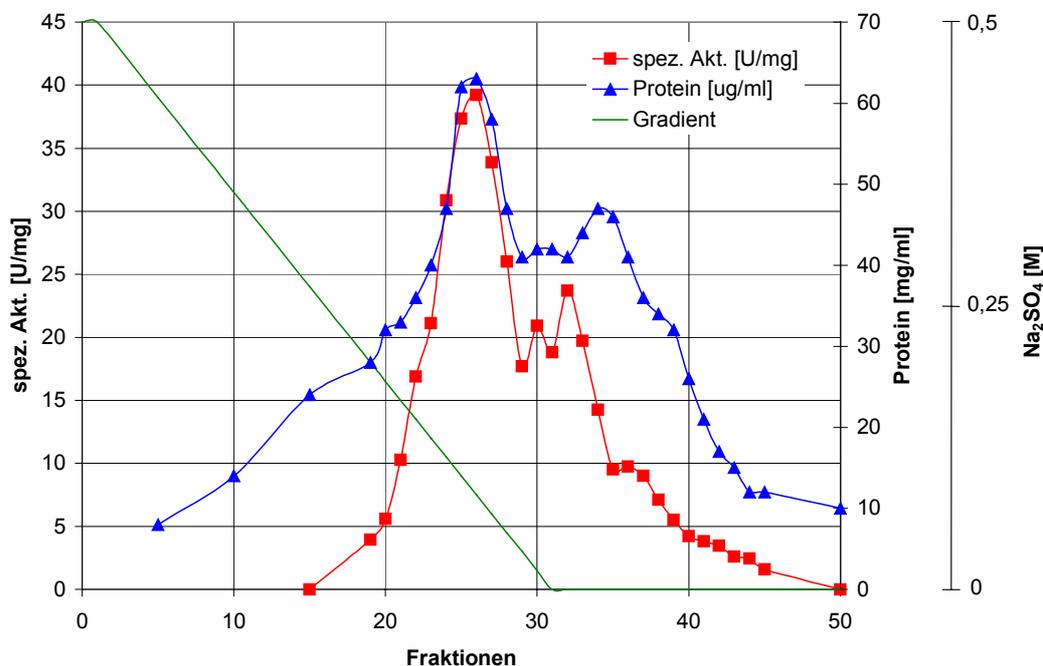
Im Vergleich zur Kontrolle wurde nur im Überstand der Butyl-Sepharose eine geringe Restaktivität von 6% beobachtet. Für Octyl- und Phenyl-Sepharose lag eine vollständige Bindung des Enzyms vor. Die Proteingehalte in den Überständen waren 0,48 (B), 1,23 (O) und 0,35 mg/ml (P) und zeigten keine eindeutige Tendenz gegenüber der Kontrolle mit 1,6 mg/ml.

Weiterhin wurde versucht, mit dem enzymgebundenem Adsorbent nach einem Waschschrift in zwei Elutionsschritten mit je 1 ml 20 mM Kpi, pH 6,5 eine erste Aussage über die Elution des Enzyms zu erhalten. Anhand der beiden Elutions-

schritte wurde für alle drei Materialien eine nahezu vollständige Elution des Enzyms erreicht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Butyl-Sepharose mit der vermutlich größeren Selektivität als geeigneter Adsorber verwendet.

### HIC mit Butyl-Sepharose als 2. Reinigungsschritt

Die Reinigung mit der HIC-Säule (siehe Tab. 41) führte zu folgendem Verlauf der Aktivität und des Proteingehalts innerhalb der Fraktionen (Abb. 57). Aufgrund des Auftretens von zwei nicht getrennten Peaks wurden die Fraktionen mit Enzymaktivität zunächst in zwei Pools vereinigt und aufkonzentriert. Der erste Pool beinhaltete die Fraktionen 22 bis 30 und der zweite Pool die Fraktionen 33 bis 40, die Fraktionen 31 und 32 wurden als Mischfraktionen nicht verwendet.



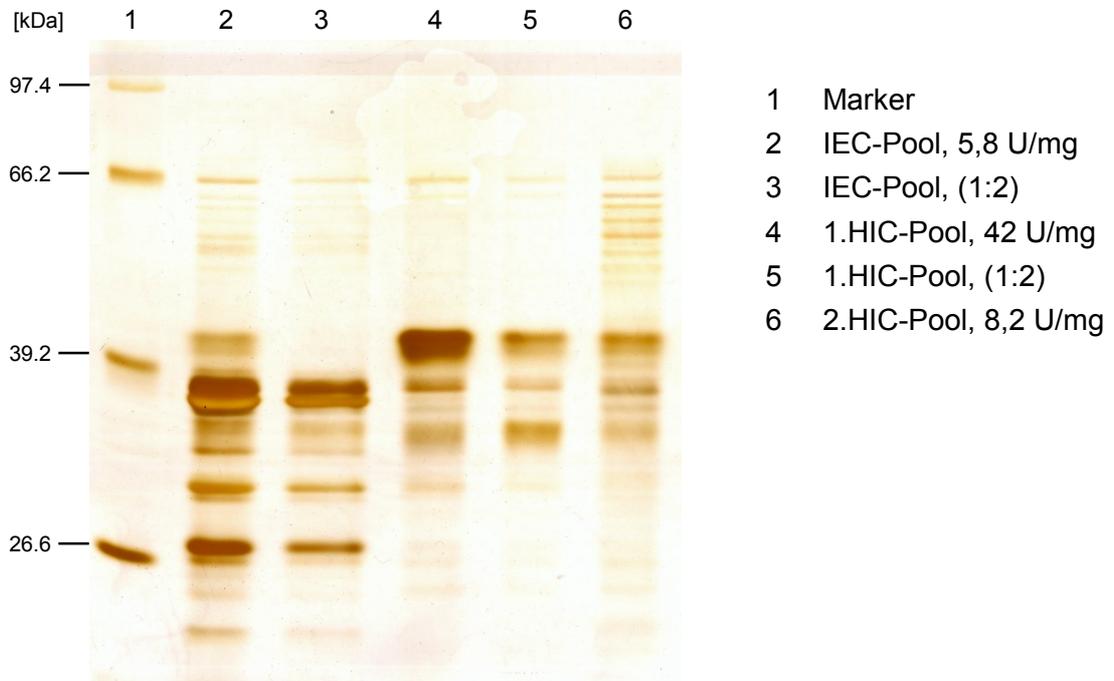
**Abb. 57: Elutionsprofil der HIC mit Beginn des Gradienten**

Der Hauptteil der aufgetragenen Enzymmenge konnte mit einem Reinigungsfaktor von 7 und einer Ausbeute von 76% im ersten Pool (Fraktion 22-30) wiedergefunden werden. Der zweite Pool mit den Fraktionen 33-40 enthielt mit weniger als 10% nur noch einen geringen Anteil der L-Amidase.

**Tab. 35: Ergebnisse des HIC-Säulenlaufs mit anschließender Ultrafiltration**

HIC	IEC-Pool	1. Pool 22-30	2. Pool 33-40
Aktivität [U]	47	36	3,5
Protein [mg/ml]	1,2	0,43	0,24
spez. Aktivität [U/mg]	5,8	42	8,2

Im folgenden SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Analyse der Proteinzusammensetzung vom aufgetragenen IEC-Pool und den zwei HIC-Pools durchgeführt. Auch nach diesem dritten Reinigungsschritt waren im ersten HIC-Pool (Fraktion 22-30) noch immer ein Bandenmuster mit mindestens drei Proteinbanden stärkerer Intensität sowie weitere schwächere Verunreinigungen zu erkennen.



**Abb. 58: SDS-PAGE (12,5%) der HIC: IEC-Pool, 1. und 2. HIC-Pool**

Aufgetragene Proteinmengen: Spur 2: 20  $\mu\text{g}$ , Spur 5: 5  $\mu\text{g}$  und alle anderen Spuren jeweils 10  $\mu\text{g}$ .

### 3.3.4. Zusammenfassung der Reinigung der L-Amidase

Die partielle Reinigung der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense* erfolgte bisher in drei Reinigungsschritten, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

**Tab. 36: Zusammenfassung der partiellen Reinigung der L-Amidase**

Reinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	0,4	100	-
Hitzefällung	2,3	100	6
IEC	5,8	93	3
HIC	42	76	7

Ausgehend von einer spez. Akt. von 0,4 U/mg im Rohextrakt ergab sich für die L-Amidase nach dem dritten Reinigungsschritt eine Akt. von 42 U/mg und damit insgesamt ein Reinigungsfaktor von 105 bei einer Gesamtausbeute von 71%.

Durch die ungewöhnlich hohe Temperaturstabilität der L-Amidase konnte mit einer Hitzefällung bei 80°C als erster Reinigungsschritt ein bemerkenswert hoher Reinigungsfaktor von 5,8 bei einer Ausbeute von 100% erzielt werden. Mit der darauf folgenden Ionenaustausch-Chromatographie ergab sich eine Zunahme der spez. Akt. um den Faktor 2,5 auf 5,8 U/mg bei einer Ausbeute von 93%.

Ähnlich zur D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* führte eine HIC als dritter Reinigungsschritt zu der bisher effektivsten Reinigung der L-Amidase mit dem Faktor 7.

### 3.4. Biochemische Charakterisierung der L-Amidase

#### 3.4.1. Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der L-Amidase

##### Temperaturoptimum

Zur Bestimmung diente partiell gereinigtes Enzym mit einer spez. Akt. von 4 U/mg bei einer Inkubation von 70°C. Es erfolgte eine Bestimmung der Aktivität von 20 bis 95°C in 5°C-Schritten, wobei der Bereich von 70 bis 95°C mit weiteren Messungen näher untersucht wurde. Die Inkubationszeit wurde relativ kurz gewählt und betrug 15 min. Unter diesen Bedingungen konnte für die L-Amidase aus *Rhizobium huautlense* ein ungewöhnlich hohes Temperaturoptimum im Bereich von 90 bis 95°C ermittelt werden (Abb. 59).

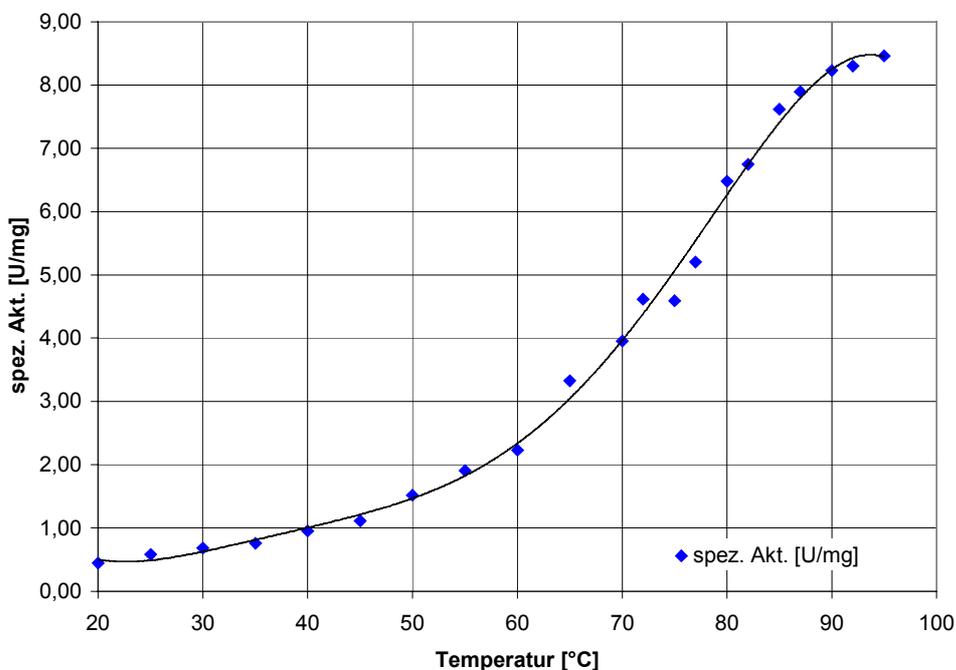
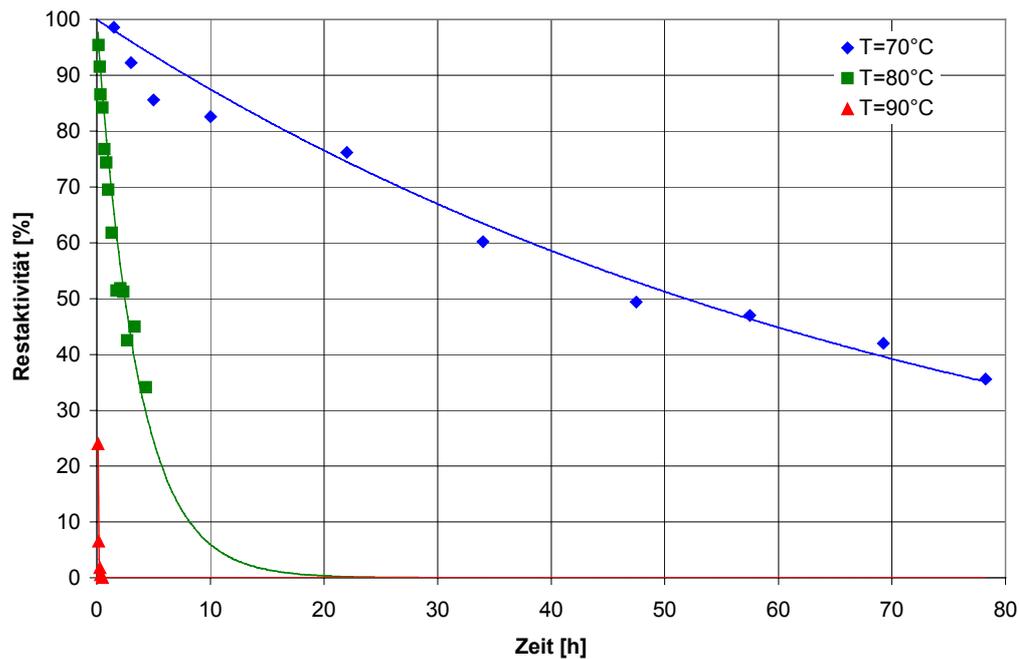


Abb. 59: Bestimmung des Temperaturoptimums der L-Amidase

##### Temperaturstabilität

Mit diesem Temperaturoptimum erschien es interessant, die Temperaturstabilität der L-Amidase bei 70, 80 und 90°C zu untersuchen. Hierzu wurde das Enzym im MES-Puffer, 100 mM pH 7,5 + 0,1 mM Zn<sup>2+</sup>, bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und in zeitlichen Abständen die Restaktivität bestimmt (Abb. 60).



**Abb. 60: Temperaturstabilität der L-Amidase in MES-Puffer bei 90, 80 und 70°C**

Die gemessenen Restaktivitäten konnten unter der vereinfachten Annahme einer Enzyminaktivierung nach einem Zeitgesetz erster Ordnung angepasst werden (Abb. 60), nach dem gilt:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

A = Aktivität zur Zeit t  
 A<sub>0</sub> = Aktivität zur Zeit t = 0  
 k = Inaktivierungskonstante  
 t = Zeit

Mit der erhaltenen Inaktivierungskonstante k ließ sich die Halbwertszeit  $\tau$  für die jeweilige Temperatur aus dem Zusammenhang,  $\tau = \ln 2/k$ , berechnen (Tab. 37). Dabei betragen die Halbwertszeiten der Inaktivierung 52 h bzw. 150 min bei 70 und 80°C. Im Bereich des Temperaturoptimums mit 90°C lag mit 2,7 min nur noch eine sehr geringe Stabilität des Enzyms vor. Mit dem sehr hohem Temperaturoptimum zeigte die L-Amidase somit auch eine beachtliche Temperaturstabilität im Bereich bis 80°C.

**Tab. 37: Temperaturstabilität der L-Amidase; Halbwertszeit  $\tau$  bei 70, 80 und 90°C**

Inkubationstemperatur [°C]	Halbwertszeit $\tau$
70	52 h
80	150 min
90	2,7 min

### 3.4.2. Substratspektrum der L-Amidase

Als mögliche Substrate der L-Amidase wurden weitere Aminosäureamide untersucht, die überwiegend als Racemat vorlagen. Diese wurden 40 mM im Enzymtest eingesetzt und mit angereinigtem Enzym die Aktivität im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> bestimmt. In einem Vorversuch musste zunächst die Enzymmenge bestimmt werden, die einen maximalen Umsatz von 10% des Substrats ermöglicht. In Bezug zur spez. Akt. von 4,3 U/mg ergaben sich folgende Aktivitäten.

**Tab. 38: Spez. Akt. der Aminosäureamide mit partiell gereinigter L-Amidase**

Substrat	spez. Akt. [U/mg]	Aktivität bzgl. DL-Tle-NH <sub>2</sub>
DL-Tle-NH <sub>2</sub>	4,3	1
L-Tle-NH <sub>2</sub>	4,2	0,98
L-His-NH <sub>2</sub>	14	3,2
DL-Gln-NH <sub>2</sub>	15	3,4
DL-Val-NH <sub>2</sub>	17	4,0
L-Ile-NH <sub>2</sub>	20	4,6
DL-Leu-NH <sub>2</sub>	29	6,6
DL-Ala-NH <sub>2</sub>	33	7,6
DL-Met-NH <sub>2</sub>	23	5,3
DL-Phe-NH <sub>2</sub>	28	6,4
DL-Trp-NH <sub>2</sub>	50	11

Alle bisher eingesetzten Substrate wurden von der L-Amidase im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> deutlich besser umgesetzt. Die Steigerungen lagen zwischen einer 3-fach höheren Aktivität für L-His-NH<sub>2</sub> und einer 11-fach höheren Aktivität für racemisches Tryptophanamid mit 50 U/mg. In der Reihe der aliphatischen verzweigten Aminosäureamide Valin-, Isoleucin- und Leucinamid nahm die Aktivität von 17 auf 29 U/mg zu. Für das Substrat mit der kleinsten Seitenkette, Ala-NH<sub>2</sub> wurde eine nahezu 8-fache Steigerung ermittelt.

Für alle aufgeführten racemischen Substrate zeigte die L-Amidase eine nahezu ausschließliche Hydrolyse des jeweiligen L-Enantiomers. Mit Umsätzen kleiner als 10% ergaben sich ee-Werte größer als 98%. Für die Substrate DL-Tle-NH<sub>2</sub>, DL-Val-NH<sub>2</sub> und DL-Leu-NH<sub>2</sub> erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Umsatz für einen möglichen Einsatz zur Racematspaltung.

### 3.4.3. Bestimmung der Enantioselektivität für ausgewählte Substrate und Berechnung der E-Werte

Zur Beurteilung der L-Amidase für eine Racematspaltung von DL-Tle-NH<sub>2</sub>, DL-Val-NH<sub>2</sub> und DL-Leu-NH<sub>2</sub> wurde die Enantioselektivität der Produktbildung in Abhängigkeit vom Umsatz bestimmt. Mit angereinigtem Enzym nach der IEC konnten folgende ee-Werte für die jeweiligen L-Aminosäuren ermittelt werden.

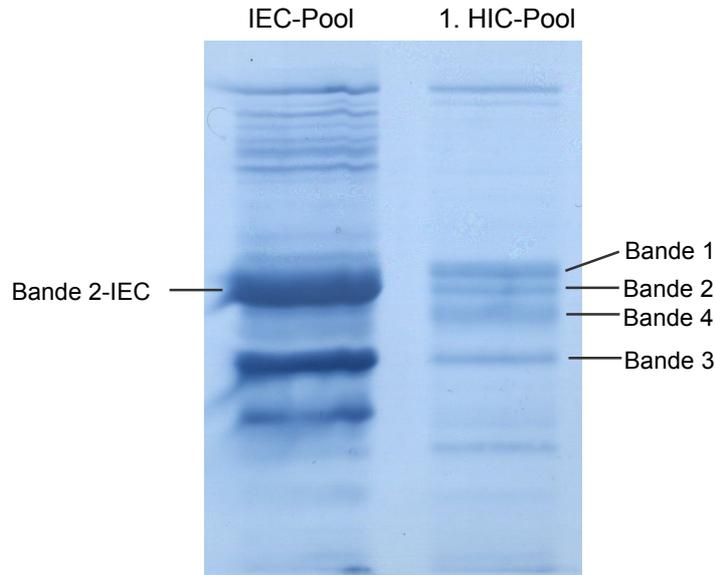
**Tab. 39: Enantioselektivitäten der L-Amidase in Abhängigkeit vom Umsatz mit DL-Tle-NH<sub>2</sub>, DL-Val-NH<sub>2</sub> und DL-Leu-NH<sub>2</sub> als Substrat**

DL-Tle-NH <sub>2</sub>	
Umsatz [%]	ee-Wert L-Tle [%]
12	99,7
27	99,7
35	99,8
47	99,7
50	99,5
DL-Val-NH <sub>2</sub>	
Umsatz [%]	ee-Wert L-Val [%]
14	99,6
25	99,6
39	99,6
50	99,3
51	97,5
DL-Leu-NH <sub>2</sub>	
Umsatz [%]	ee-Wert L-Leu [%]
17	98,5
23	98,6
34	98,6
44	98,5
52	91,3

Für racemisches Tle-NH<sub>2</sub> wie auch für Val-NH<sub>2</sub> lagen bei einem Umsatz bis zu 50% hohe Enantioselektivitäten mit ee-Werten größer 99% vor. Im Vergleich hierzu waren die gemessenen ee-Werte für L-Leu bei einem Umsatz bis 44% um 98,5% etwas niedriger. Die daraus berechneten E-Werte lagen für DL-Tle-NH<sub>2</sub> und DL-Val-NH<sub>2</sub> im Bereich größer 200, wohingegen sich für DL-Leu-NH<sub>2</sub> ein E-Wert größer als 100 berechnete.

### 3.4.4. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Trotz des inhomogenen Proteinmusters der L-Amidase nach drei Reinigungsschritten wurde mit dem partiell gereinigten Enzym eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden die Enzymchargen 1. HIC-Pool (Fraktionen 22-30) und der IEC-Pool erneut in einem SDS-Gel getrennt und geblottet (Abb. 61).



**Abb. 61: Blot von partiell gereinigten Enzymchargen der L-Amidase: IEC-Pool (1. Spur, 150 µg) und 1. HIC-Pool (2. Spur, 50 µg)**

Ausgehend vom 1. HIC-Pool (2. Spur) wurden die vier stärksten Proteinbanden N-terminal sequenziert und einer Sequenzanalyse unterzogen.

**Bande 1:** 1- **EVLVGVGGPLTGPNAAFG-18**  
 +VL+ V GPLTGPNAAFG

**BraC:** 24- **DVLIAVAGPLTGPNAAFG-41**

Identische AS = 14/18 (77%)

ähnliche AS = 16/18 (88%)

Der N-Terminus von Bande 1 zeigte die höchste Homologie zu einem periplasmatischen Substrat-bindenden Protein eines ABC-Transporters (BraC), der "branched-chain amino acid permease" aus *Rhizobium leguminosarum* (Hosie et al., 2001a)

Wie bereits erwähnt (siehe 2.4.9.3), sind ABC-Transporter eine weit verbreitete Enzymgruppe, die aus zwei hydrophoben integralen Membran-Domänen und zwei hydrophilen ATP-bindenden Domänen im Cytoplasma bestehen. Die Subfamilie der bakteriellen Transporter für Aminosäuren besitzen zusätzlich noch ein oder mehrere Substrat-bindende Proteine, die sich im Periplasma (gram-negativ) oder für gram-positive Bakterien an der Zellwand assoziiert befinden (Hosie und Poole, 2001b).

**Bande 3: 1- GTLDDVKAKGFVQCGVNGSNLAGFG-25**

**TL DVKAKGFVQCGVN + L GF**

**AapJ: 25- TTLSDVKAKGFVQCGVN-TGLTGFA-48**

Identische AS = 18/23 (78%)      ähnliche AS = 19/23 (82%)

Überraschenderweise zeigte der N-Terminus der Bande 3 Ähnlichkeit zu einem weiteren Substrat-bindendem Protein (AapJ) der "general amino acid permease", ebenfalls eine periplasmatische Komponente eines ABC-Transporters aus *Rhizobium leguminosarum* (Walshaw et al., 1996). Im Unterschied zur Bra-Permease, die bevorzugt aliphatische Aminosäuren transportiert, bindet diese Permease ein breites Spektrum an Aminosäuren (Hosie und Poole, 2001b).

Die Sequenzierung der Bande 2 und 4 ergab keine eindeutige Hauptsequenz, sodass hier mehrere Proteine vorlagen und auf eine weitere Auswertung verzichtet wurde.

Demgegenüber gab die Sequenzanalyse der stärksten Bande nach der IEC-Reinigung (2-IEC) erneut eine hohe Homologie zu einem vermutlich Substrat-bindendem Protein eines ABC-Transporters aus *Sinorhizobium meliloti* (Finan et al., 2001).

**Bande 2IEC: 1- KDLVVGVSWSNFQQQAWKTDEAAIK-25**

**KDLV+GVSWSNFQ++ WKTDEAAIK**

**Q926F3: 24 KDLVIGVSWSNFQEERWKTDEAAIK-48**

Identische AS = 21/25 (84%)      ähnliche AS = 24/25 (96%)

Unabhängig von ihrer ähnlichen Funktion und Größe zeigen die drei aufgeführten Substrat-bindenden Proteine, BraC, AapJ und Q926F3 untereinander keine Sequenzhomologie. Die Zuordnung einer L-Amidase-Aktivität zu einer dieser drei Aminosäuren- bzw. Substrat-bindenden Proteine ist mit der bisherigen Kenntnis über die Funktion dieser Proteine unwahrscheinlich (Higgins, 2001). So geben zum Beispiel die umfangreichen Untersuchungen des Histidin-bindenden Proteins HisJ der Histidin Permease keinen Hinweis auf eine Amidase-Aktivität oder einen kovalenten Angriff auf das Substrat (Wolf et al., 1995). Vermutlich führte die bisherige Reinigung der L-Amidase auch zur Anreicherung dieser Proteine, die möglicherweise für den Transport von Tle-NH<sub>2</sub> eine Rolle spielen.

### 3.5. Zusammenfassende Diskussion der L-Amidase

Mit der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense* wurde ein weiteres, sehr interessantes Enzym für die Racematspaltung von Aminosäurenamiden isoliert. Bereits im Rohextrakt wurden für die L-Amidase eine Metallionen-Abhängigkeit sowie eine ungewöhnlich hohe Abhängigkeit der Aktivität von der Assaytemperatur festgestellt. So lag mit 0,1 mM  $Zn^{2+}$  im Enzymtest eine 28-fache Steigerung der Aktivität vor, ebenso waren aber auch  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  mit Zunahmen um das 5- bis 8-fache geeignet. Dies führte zu einem optimierten Enzymtest mit 0,1 mM  $Zn^{2+}$  und einer Inkubationstemperatur von 70°C.

Die Kultivierung von *Rhizobium huautlense* im Minimalmedium M-2 ergab eine Zellausbeute von 6,9 g/L und eine spez. Akt. von etwa 0,4 U/mg für DL-Tle-NH<sub>2</sub>. Ebenso führte die Kultivierung im DSMZ-Medium-Nr. 1 ohne Induktion zur Bildung der L-Amidase, die jedoch mit 0,11 U/mg deutlich geringer war. Im Vergleich zu *Variovorax paradoxus* war mit *Rhizobium huautlense* in Bezug auf das Wachstumsverhalten und die Enzymaktivität eine deutlich bessere Enzymquelle gegeben.

Die anschließende Reinigung der L-Amidase durch Hitzefällung, Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktions-Chromatographie führte bisher zu partiell gereinigtem Enzym mit einer spez. Akt. von 42 U/mg und ergab einen Reinigungsfaktor von 105 bei einer Ausbeute von 60%. Mit der angereinigten L-Amidase-Fraktion erfolgte die Untersuchung des Temperaturoptimums und der Stabilität, des Substratspektrums sowie die Untersuchung der L-Amidase für eine Racematspaltung.

Die Bestimmung des Temperaturoptimums ergab im Bereich von 20 bis 95°C eine Steigerung der Aktivität um fast das 20-fache und unter den angegebenen Bedingungen wurde ein Optimum größer als 90°C ermittelt. Bei einer Inkubationstemperatur von 70°C lag etwa die Hälfte der maximalen Aktivität vor. Die Halbwertszeiten der Inaktivierung des Enzyms betragen bei 70°C 52 h und bei 80°C 150 min. Diese Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass die L-Amidase ein thermopiles Enzym ist.

Mit den bisher untersuchten Aminosäureamiden zeigte die L-Amidase ein vielversprechendes Substratspektrum. Ganz ähnlich zur D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* wurden auch von der partiell gereinigten L-Amidase im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> mit einer Aktivität von 42 U/mg alle aufgeführten Aminosäureamide deutlich besser umgesetzt. Die Steigerungen der Aktivität lagen zwischen dem 3-fachen für L-His-NH<sub>2</sub> und dem 11-fachen für racemisches Tryptophanamid. Mit der zunehmenden Aktivität in der Reihe Tle > Val > Ile > Leu konnte, wie auch für die D-Amidase, ein sehr großer Einfluss der Verzweigung am C-3 Atom festgestellt werden.

Für alle racemischen Substrate zeigte die L-Amidase eine nahezu ausschließliche Hydrolyse des L-Enantiomers. Die Untersuchung der Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Umsatz ergab für DL-Tle-NH<sub>2</sub> und DL-Val-NH<sub>2</sub> bei Umsätzen bis zu 50% ee-Werte über 99% bzw. E-Werte größer als 200. Für DL-Leu-NH<sub>2</sub> wurden bei einem Umsatz bis 44% etwas niedrigere ee-Werte um 98,5% ermittelt und ein E-Wert größer als 100 berechnet. Eine Eignung der L-Amidase zur Racematspaltung ist mit dieser Enantioselektivität grundsätzlich für alle drei Substrate gegeben.

Im Hinblick auf die Herstellung der D-Aminosäure, insbesondere D-Tle, führt die Racematspaltung mit einer L-Amidase jedoch zunächst zum verbleibenden D-AS-NH<sub>2</sub>, das in einem weiteren Reaktionsschritt zur reinen D-Aminosäure deamidert werden kann.

Aufgrund der Temperatur- und der Metallionen-Abhängigkeit zeigt die L-Amidase Ähnlichkeit zur Gruppe der Aminopeptidasen, die neben der Hydrolyse der N-terminalen Aminosäure von Polypeptiden häufig auch Aminosäureamide hydrolysieren. Aminopeptidasen sind üblicherweise Metalloenzyme, die durch Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> aktiviert werden. Sie kommen sowohl intrazellulär wie auch extrazellulär vor und besitzen meist ein Temperaturoptimum über 50°C. Einige Aminopeptidasen werden durch höhere Temperaturen aktiviert und zeigen eine besondere Temperaturstabilität (Maestracci et al., 1988).

So zeigt die zur Racematspaltung von DL-Phenylglycinamid eingesetzte L-Aminopeptidase in *Pseudomonas putida* eine ganz ähnliche Steigerung der Aktivität mit Mn<sup>2+</sup> um das 12-fache, mit Mg<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> um das 2- bis 3-fache. Das homooktamere Enzym mit 53 kDa für das Monomer wurde aus der Zellmembran isoliert und besitzt eine optimale Enzymaktivität bei 40°C und pH 9,5. Mit einem breitem Substratspektrum für Aminosäureamide zeigt jedoch das Enzym die größte Aktivität für Phe- und Leu-Dipeptide und wurde anhand der Sequenzhomologie zur Familie der Leucin-Aminopeptidasen zugeordnet (Sonke et al., 2000).

Ganz ähnlich zur L-Amidase wurden für die hitzestabile Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* mit 85°C ein sehr hohes Temperaturoptimum und eine Stabilität bei 70°C von mindestens 5 h ohne Verlust an Aktivität beschrieben. Diese Aminopeptidase ist ein extrazelluläres, monomeres Enzym mit 32 kDa; es hydrolysiert bevorzugt hydrophobe Aminosäuren vom N-Terminus eines Polypeptids und gehört zur Klasse der zweikernigen Zinkenzyme (Chen et al., 1997). Eine Aktivität für Aminosäureamide wurde bisher nicht beschrieben. Zur Reinigung dieses Enzyms für die Kristallisation wurde nach Ammoniumsulfat-Fällung und hydrophober Interaktionschromatographie eine Hitzefällung bei 70°C über 5 bis 7 h beschrieben, gefolgt von einer Anionenaustausch-Chromatographie (Schalk et al., 1992).

Trotz des inhomogenen Proteinmusters der L-Amidase nach der bisherigen Reinigung wurden die vier stärksten Proteinbanden im SDS-Gel N-terminal sequenziert und die resultierenden Sequenzdaten analysiert. Jedoch konnte für keine der vier N-terminalen Aminosäuresequenzen eine Homologie zu einem Enzym mit einer Aminopeptidase- oder Amidase-Aktivität gefunden werden. Überraschenderweise ergab sich für zwei Sequenzen jeweils eine hohe Ähnlichkeit zu einem Aminosäuren- bzw. Substrat-bindenden Protein eines ABC-Transporters. Die Zuordnung einer L-Amidase-Aktivität zu einem dieser Proteine ist mit der bisherigen Kenntnis über den Mechanismus dieser ABC-Transporter sehr unwahrscheinlich.

### III. Zusammenfassung

Zahlreiche enzymatische Verfahren werden bereits zur Produktion enantiomerenreiner Aminosäuren eingesetzt. So wird auch L-tertiär-Leucin, eine nicht proteino-gene Aminosäure mit dem sterisch anspruchsvollen tertiär-Butylrest, mittels des Enzyms Leucin-Dehydrogenase durch reduktive Aminierung von Trimethylpyruvat hergestellt. Das zugehörige D-tertiär-Leucin, für das ebenso ein Bedarf besteht, z. B. als Baustein in pharmakologischen Wirkstoffen, ist über diesen Syntheseweg nicht zugänglich. Zur Gewinnung von D-tertiär-Leucin durch eine enzymatische Racemat-spaltung mittels einer Aminosäure-Amidase wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst in einem Screening-Verfahren nach neuen Aminosäure-Amidasen gesucht.

#### Screening-Verfahren mit Anreicherungskulturen

Ausgehend von 81 Proben natürlicher Standorte wurden in einem Anreicherungs-verfahren 224 Isolate erhalten, die auf eine geeignete enantioselektive Amidase-Aktivität untersucht wurden. Es zeigte sich, dass die mikrobielle Vielfalt in den Proben und die Anreicherung über mehrere Passagen in einem Kulturmedium mit DL-Tle-NH<sub>2</sub> als einzige Stickstoffquelle sehr gute Bedingungen zur Isolierung von Organismen mit einer Amidase-Aktivität bot. So wurden aus den 224 Isolaten zunächst 39 Organismen mit einer überwiegend L-spezifischen Amidase-Aktivität identifiziert. Von diesen 39 Stämmen wurden drei mit einer D-Amidase und fünf Stämme mit einer L-Amidase auf ihre Eignung zur Racematspaltung näher unter-sucht. Die Identifizierung der Stämme und die Auswahl der am besten geeigneten Isolate führte schließlich zu zwei Stämmen, *Variovorax paradoxus* mit einer D-Amidase- und *Rhizobium huautlense* mit einer L-Amidase-Aktivität.

Trotz der größeren Aktivität der L-Amidase in *Rhizobium huautlense* wurde im Hinblick auf die Gewinnung von D-Tle die D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* bevorzugt untersucht, da diese direkt zum gewünschten Produkt führt und in Kombination mit einer Aminosäureamid-Racemase eine dynamische Racemat-spaltung ermöglichen würde.

#### D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*

Nach Kultivierung von *Variovorax paradoxus* im größeren Maßstab (30 L) wurde eine Reinigung der D-Amidase in drei Schritten mit Anionenaustausch-, hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration etabliert. Bereits nach dem 2. Reini-gungsschritt lag eine 50% reine Enzymcharge vor, die nur noch ein weiteres Fremd-protein enthielt. Die homogen gereinigte D-Amidase hatte eine spez. Akt. von 1,4 U/mg für DL-Tle-NH<sub>2</sub> bei einem Reinigungsfaktor von 70 und einer Ausbeute von 25%.

Mit der gereinigten D-Amidase erfolgte eine umfassende biochemische und protein-chemische Charakterisierung. Das Molekulargewicht für das Monomer beträgt 50 kDa, wohingegen für das native Enzym mittels Gelfiltration ein mittleres Molekulargewicht von 171 kDa bestimmt wurde. Optimale Bedingungen für die Amidase-Aktivität lagen im pH-Bereich von 7,0 bis 9,5 und bei einer Temperatur von

47-49°C vor. Eine Inhibierung des Enzyms wurde für die Ionen  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , den Serin-Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid sowie das Thiol-Gruppen spezifische Reagenz 4-Hydroxy-Quecksilberbenzoat festgestellt.

Das breite Substratspektrum der D-Amidase umfasst neben einer Vielzahl von Aminosäureamiden auch Amide von Carbonsäuren und  $\alpha$ -Hydroxysäuren. Die Aktivität für das beste Substrat D-Phe-NH<sub>2</sub> ist etwa 900-fach höher als für DL-Tle-NH<sub>2</sub>. Mit Ausnahme von Prolin- und Milchsäureamid wurde für alle chiralen Substrate eine Bevorzugung des D-Enantiomers festgestellt, wobei die Enantioselektivität wie auch die Aktivität von der sterischen Struktur des Substrates abhängig ist.

Die Racematspaltung ergab für verschiedene gereinigte Enzymchargen der D-Amidase bei Umsätzen größer als 45% bezogen auf DL-Tle-NH<sub>2</sub> Enantioselektivitäten zwischen 96,5 und 99% ee, woraus sich E-Werte größer als 100 berechneten. Ebenso wurden für die strukturell verwandten Substrate, DL-Val-NH<sub>2</sub> und DL-Leu-NH<sub>2</sub>, bei Umsätzen über 40% ähnliche ee-Werte von mindestens 96,7% bestimmt. Im Vergleich hierzu lag für DL-Phe-NH<sub>2</sub> mit der größten Aktivität nur noch eine geringe D-Selektivität mit 58% ee bei einem 36% Umsatz bzw. ein E-Wert von 5 vor.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz sowie eine daraus abgeleitete Sequenzhomologie zu Enzymen der "Amidase Signature"-Familie ermöglichte zunächst, ein 0,5 kb großes Teilstück des D-Amidase-Gens mittels PCR zu amplifizieren. Mit dieser DNA-Sequenz wurde mittels des Universal-GenomeWalker™-Systems eine komplette Identifizierung der D-Amidase-Gensequenz sowie weiterer Sequenzinformationen vor und nach dem Gen erreicht. Die D-Amidase wurde in *E. coli* kloniert und die bisherige heterologe Expression in *E. coli* ergab im Vergleich zum Wildtyp *Variovorax paradoxus* eine mindestens 4-fach höhere spez. Akt. im Rohextrakt. Obwohl noch ein großer Anteil des rekombinanten Enzyms in unlöslicher Form gebildet wurde, war mit diesem nicht optimierten Expressionssystem bereits eine deutlich bessere Verfügbarkeit der D-Amidase erzielt worden.

Wie bereits der N-Terminus der D-Amidase vermuten ließ, führte eine Analyse der Aminosäuresequenz in Proteindatenbanken zu Homologien mit einer Vielzahl von Enzymen, die zur "Amidase Signature"-Familie zugeordnet werden. Im besten Fall betrug die Homologie zu einer R-Ketoprofen-Amidase aus *Comamonas acidovorans* 56% an identischen Aminosäuren, die ebenfalls zu einer der wenigen Enzyme gehört, die D-Aminosäureamide hydrolysieren.

### **L-Amidase aus *Rhizobium huautlense***

Mit dem zweiten aus dem Screening ausgewähltem Enzym, der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense*, liegt ein weiterer sehr interessanter Biokatalysator für die Racematspaltung von Aminosäureamiden vor. Bereits im Rohextrakt wurde für die L-Amidase eine Metallionen-Abhängigkeit sowie eine ungewöhnlich hohe Temperaturabhängigkeit und Stabilität festgestellt. So wurde in einem optimierten Enzymtest mit 0,1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  und einer Inkubationstemperatur von 70°C eine spez. Akt. von 0,4 U/mg im Rohextrakt für DL-Tle-NH<sub>2</sub> bestimmt.

Die bisherige Reinigung der L-Amidase durch Hitzefällung, Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktions-Chromatographie führte zu partiell gereinigtem Enzym mit einer spez. Akt. 42 U/mg und damit zu einem Reinigungsfaktor von 105 bei einer Ausbeute von 60%. Die anschließende Untersuchung des Temperaturoptimums ergab im Bereich von 20 bis 95°C eine Steigerung der Aktivität um fast das 20-fache und ein Optimum größer als 90°C. Die Bestimmung der Halbwertszeit für die Inaktivierung des Enzyms betrug bei 70°C 52 h und bei 80°C noch 150 min und verdeutlicht damit die ungewöhnlich hohe Temperaturstabilität der L-Amidase.

Anhand der bisher untersuchten Aminosäureamide zeigte die L-Amidase ein vielseitiges Substratspektrum. Im Vergleich zu DL-Tle-NH<sub>2</sub> lagen die relativen Aktivitäten zwischen dem 3-fachen für L-His-NH<sub>2</sub> und dem 11-fachen für racemisches Tryptophanamid, wobei mit racemischen Substraten das Enzym die nahezu ausschließliche Hydrolyse des L-Enantiomers katalysierte. Die Untersuchung der Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Umsatz ergab für DL-Tle-NH<sub>2</sub> und DL-Val-NH<sub>2</sub> bei nahezu vollständigem Umsatz, größer 49%, ee-Werte über 99% bzw. E-Werte größer als 200. Für DL-Leu-NH<sub>2</sub> wurden bei einem Umsatz bis 44% etwas niedrigere ee-Werte um 98,5% ermittelt und ein E-Wert größer als 100 berechnet.

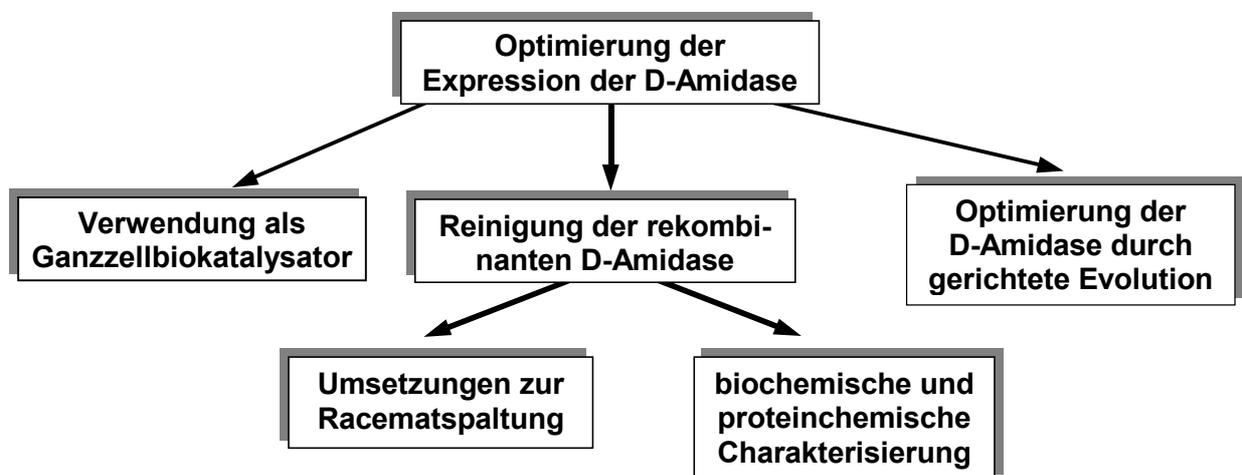
Für die Herstellung einer D-Aminosäure, insbesondere D-Tle, führt die Racematspaltung mit diesem Enzym jedoch zunächst zum verbleibenden D-AS-NH<sub>2</sub>, das in einem weiteren Reaktionsschritt zur reinen D-Aminosäure deamidiert werden kann. Wohingegen eine dynamische Racematspaltung der L-Amidase mit einer Racemase theoretisch die vollständigen Umsetzung zur L-Aminosäure ermöglichen würde.

Mit der Temperatur- und Metallionen-Abhängigkeit der L-Amidase liegt möglicherweise eine Verwandtschaft zur Gruppe der Aminopeptidasen vor, die neben der Hydrolyse der N-terminalen Aminosäure von Polypeptiden häufig auch Aminosäureamide umsetzen. Aminopeptidasen sind üblicherweise Metalloenzyme und einige Vertreter zeigen ebenso eine hohe Temperaturstabilität. Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen der vier stärksten Proteinbanden des partiell gereinigten Enzyms ergab jedoch bisher keine Homologie zu einer bekannten Aminopeptidase oder Amidase.

## IV. Ausblick

### D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*

Im Hinblick auf eine technische Verwendung der D-Amidase zur Herstellung einer D-Aminosäure, insbesondere D-Tle, ist *Variovorax paradoxus* als Enzymquelle nur bedingt geeignet. Für die weiteren Arbeiten erscheint es daher sinnvoll, das rekombinante Enzym zu verwenden (Abb. 62). Das bisher verwendete pBTac2-Expressionssystem in *E. coli* JM101 führte schon zu einer deutlich besseren Verfügbarkeit der D-Amidase. Trotzdem bieten sich zur Optimierung noch eine Reihe von alternativen Expressionssystemen an, sodass eine Expression der rekombinanten D-Amidase ohne die Bildung von unlöslichem Enzym realisiert werden könnte.



**Abb. 62: Weiterführende Arbeiten zur D-Amidase aus *Variovorax paradoxus***

Weiterhin wäre mit der Verknüpfung eines Histidin-Oligomers (His-tag) an den C- oder N-Terminus der klonierten D-Amidase eine vereinfachte Reinigung mittels einer Metallaffinitäts-Chromatographie möglich. Sollte die Einführung eines His-tags die Enzymeigenschaften negativ beeinflussen, so ist mit der etablierten Reinigung aus *Variovorax paradoxus* eine Strategie vorhanden, die auf das *E. coli*-Expressionssystem übertragen werden kann und wahrscheinlich ebenfalls zu homogen gereinigtem rekombinantem Enzym führt.

Mit einer optimierten Expression und dem Vorliegen von gereinigter rekombinanter D-Amidase in größeren Mengen könnten dann auch Umsetzungen zur Racematspaltung im größeren Maßstab durchgeführt werden.

Ebenso wäre eine Optimierung der D-Amidase mit den Methoden der gerichteten Evolution möglich. So könnte einerseits die Enzymaktivität für sterisch anspruchsvolle Substrate, wie für D-Tle-NH<sub>2</sub>, oder andererseits die niedrige Enantioselektivität für Substrate mit hoher Enzymaktivität, wie für D-Phe-NH<sub>2</sub>, die Zielgröße sein, die verbessert werden soll.

Nicht zuletzt wäre eine Verwendung der rekombinanten D-Amidase in *E.coli* oder einem anderen Wirtsorganismus als Ganzzellbiokatalysator eine interessante Alternative und ebenso in Kombination mit einer geeigneten Aminosäureamid-Racemase eine Koexpression möglich, wie sie bereits für andere Enzymsysteme, z. B. für das Hydantoinase-Verfahren (Wilms et al., 2001), verwirklicht wurde.

### **L-Amidase aus *Rhizobium huautlense***

Als weiterführende Arbeiten für die interessante L-Amidase sollten in erster Linie die weitere Reinigung und Charakterisierung des Enzyms genannt werden. Mit dem homogen gereinigten Enzym könnte dann die weitere Charakterisierung der L-Amidase sowie die Bestimmung und Analyse des N-Terminus in Proteindatenbanken eine Zuordnung des Enzyms, eventuell in die Gruppe der Aminopeptidasen, ermöglichen.

Zur D-Amidase ähnlich, könnte die N-terminale Sequenzierung des Proteins den Einstieg in die Isolierung und Klonierung des Gens und in die heterologe Expression der L-Amidase ermöglichen. Es sei jedoch erwähnt, dass mit *Rhizobium huautlense* im Vergleich zur D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* eine deutlich bessere Enzymquelle vorliegt und durch eine Optimierung der Expression des nativen Enzyms in *Rhizobium huautlense* ausreichend Enzym für größere Umsetzungen isoliert werden könnte.

## V. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Verwendete Geräte

##### Analytik

HPLC	[Dionex]
Protein-Sequenzer 477 A	[Applied Biosystems]
DC-Platten ChiralPlate	[Macherey & Nagel]

##### Bildverarbeitung

Eagle Eye II	[Stratagene]
--------------	--------------

##### Chromatographie

Pharmacia FPLC-System	[Amersham Biosciences]
Biocad Sprint	[Perseptive Biosystems]

##### Desintegration

Schwingkugelmühle	[Retsch]
Ultraschallgerät	[Branson]
Desintegrator S	[IMA]

##### Elektrophorese

DNA-Elektrophoresekammer GNA 100	[Amersham Biosciences]
DNA-Elektrophoresekammer Horizon 11.14	[Life Technologies]
Protein-Elektrophoresekammer	[Biorad]
Novablot 2117	[LKB]
NuPAGE® Bis-Tris Elektrophorese System mit NuPAGE® Bis-Tris Gele	[Invitrogen]

##### Fermentation

40-L-Bioreaktor Techfors	[Infors]
Kammerseparator Typ KA 6	[Westfalia]

##### Spektroskopie

UV/VIS-Spektralphotometer 160	[Shimadzu]
UV/VIS-Spektralphotometer DU 650	[Beckmann]

##### Ultrafiltration

Microcon 3 kDa, 10 kDa	[Millipore]
YM-Membran 10 kDa	[Millipore]
Rührzelle 8050, 8010	[Millipore]
Macrosep™	[Pall Gelman Laboratory]
Omega™-Membran 10 kDa	[Pall Gelman Laboratory]

## Zentrifugation

Sorvall RC5B	[DuPont]
Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150 H mit Kühlfalle Unicryo MC 1L	[Uniequip]
Tischzentrifuge 5415 C	[Eppendorf]
Tischkühlzentrifuge Rotina 35R	[Hettich]

## 1.2. Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien für Lösungen und Puffer waren mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Fluka, Sigma, Roth oder Merck bezogen. Nährmedienbestandteile waren von Merck oder Difco, die Coenzyme von Biomol oder Gerbu. Enzyme für die Molekularbiologie kamen von NEB, Amersham Biosciences, Biozym, Stratagene, Clontech oder Roche und waren von höchster Qualität. Chromatographiemedien stammten von Amersham Biosciences oder Tosohaas, Elektrophorese-Chemikalien von Roth oder Serva. Aminosäureamide sowie andere Aminosäurederivate wurden von Novabiochem oder Bachem bezogen. Das eingesetzte DL-*tert*-Leucinamid und eine Reihe weitere Aminosäurederivate wurden freundlicherweise von der Firma Degussa zur Verfügung gestellt.

## 1.3. Verwendete Mikroorganismen

<i>E. coli</i> XL1-Blue	[Amersham Biosciences]
<i>E. coli</i> JM101	[Amersham Biosciences]

## 1.4. Verwendete Vektoren

<i>pUC18</i>	[Amersham Biosciences]
<i>pBTac2</i>	[Roche]

## 2. Mikrobiologische Methoden

### 2.1. Nährmedien

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Sterilisation durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und 1,2 bar. Da  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{Fe(III)-citrat}$ , Glucose, Säureamide, Antibiotika, Vitamin- und Spurensalzlösungen auf diese Art der Sterilisation empfindlich reagieren, wurden sie den Nährlösungen erst nach dem Autoklavieren durch Sterilfiltration über 0,2 µm Membranen (Sartorius, Göttingen) hinzugefügt. Für feste Medien wurde eine Agarkonzentration von 1,5% eingesetzt.

#### Minimalmedium M-2:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,3 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,8 g
NaCl	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
D,L-tertiär-Leucinamid	3,3 g
Glucose	4,5 g
Spurensalzlösung	0,8 ml
Vitaminlösung	2,5 ml
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 7,3

#### Spurensalzlösung (Joeres und Kula, 1994):

$\text{FeCl}_3$	625 mg
$\text{ZnCl}_2$	190 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	75 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	38 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
Aq. demin.	ad 200 ml

#### Vitaminlösung (Schlegel, 1985):

Pyridoxamin	5,0 mg
Nicotinsäure	2,0 mg
Cyanocobalamin	2,0 mg
Thiamin	1,0 mg
4-Aminobenzoat	1,0 mg
Panθοthenat	0,5 mg
Biotin	0,2 mg
Aq. demin.	ad 100 ml

**LB<sub>amp</sub>-Medium:**

Bacto-Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5,0 g
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 7,0-7,5
Ampicillin-Lsg. (100 mg/ml)	1 ml

**DSMZ-Medium-Nr. 1:**

Pepton	5,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 7,0

**DSMZ-Medium-Nr. 81:**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,9 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Glucose	4,5 g
(NH <sub>4</sub> )Fe(III)citrat	0,05 g
Spurensalzlösung SL-6	5,0 ml
Aq. demin.	ad 1000 ml; pH 6,8

**Spurensalzlösung SL-6:**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	30 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	30 mg
CuSO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10 mg
Aq. demin.	ad 1000 ml

## 2.2. Screening mit Anreicherungskulturen

Es wurden Boden- und Gewässerproben von unterschiedlichen Standorten einer Anreicherung unterzogen. Die Bodenproben wurden zunächst in einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9% (w/v)) suspendiert und auf einer Rundschüttelmaschine 4 h bei 150 Upm inkubiert. Nach Abtrennung der festen Partikel wurden mit Aliquots der Überstände 30 ml des Minimalmedien M-2 beimpft. Die Gewässerproben konnten direkt zur Beimpfung von 30 ml des Minimalmediums M-2 eingesetzt werden.

Zur Anreicherung erfolgte nach drei bis sieben Tagen insgesamt viermal die Übertragung eines Milliliters der Kultur in 30 ml frisches Medium. Nach Durchführung des letzten Anreicherungs-schrittes wurden die Ansätze auf feste Medien ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 30°C waren isolierbare Einzelkolonien vorhanden, von denen pro Ansatz je vier Kolonien möglichst unterschiedlicher Morphologie und Größe über zwei Reinigungsausstriche in Reinkultur gebracht wurden. Bis zur Prüfung auf Enzymaktivität erfolgte die Lagerung auf festen Medien bei 4°C.

## 2.3. Kulturführung

### 2.3.1. Plattenkulturen

Die Inkubation fester Medien erfolgte aerob bei 30°C oder 37°C für *E. coli*-Kulturen, bis ein gutes Koloniewachstum feststellbar war, längstens jedoch fünf Tage. Eine Abdichtung der Platten verhinderte die Austrocknung der Medien und Organismen.

### 2.3.2. Schüttelkolbenkulturen

Flüssigmedien wurden mit Einzelkolonien von festen Medien, Konserven oder 1 bis 5% (v/v) anderer Flüssigkulturen beimpft. Das Volumen betrug 30 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen oder 20% des Schüttelkolbenvolumens für größere Kulturen. Die Inkubation erfolgte ein bis sieben Tage bei 30°C oder 37°C für *E. coli*-Kulturen und 150 Upm eines Rundschüttelgeräts.

### 2.3.3. Fermentationen

Zur Gewinnung größerer Zellmengen wurden Fermentationen bis zu 30 Liter durchgeführt (Techfors 40 L bzw. 20 L, Infors). Für *Variovorax paradoxus* wurde das Minimalmedium M-2 verwendet, welches 5%ig mit einer Vorkultur angeimpft wurde. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 30°C und die Einstellung des pH-Wertes von 7,2 unter Verwendung von 3 M Natronlauge und 3 M Phosphorsäure.

Die Fermentation von *E. coli* JM101 wurde mit LB<sub>amp</sub>-Medium und 0,5% Glycerin als zusätzliche C-Quelle durchgeführt. Das Medium wurde 2%ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Einstellung des pH-Wertes von 7,5 erfolgte mit 30%igem Ammoniak und 3 M Phosphorsäure.

Die Expression der rekombinanten D-Amidase wurde nach 2,5 h bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,5 mit 0,2 mM IPTG induziert und die Inkubationstemperatur auf 30°C erniedrigt.

Für die aufgeführten Fermentationen wurden Rührerdrehzahl und Sauerstoffeintrag so angepasst, dass ein Sauerstoffpartialdruck von 30% nicht unterschritten wurde. Die Standardwerte betragen 500 Upm und 10 L/min.

## 2.4. Konservierung und Stammhaltung

Für eine Konservierung über längere Zeiträume wurden Aliquots angelegter Flüssigkulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, unter Zusatz von 5% (v/v) Dimethylsulfoxid bei –80°C aufbewahrt.

Die bei –80°C gelagerten Konserven wurden in 30 ml Flüssigkulturen des empfohlenen Vollmediums auf Wachstumsaktivität und durch Vereinzelausstriche auf Reinheit überprüft. Innerhalb der Testphase wurden die Stämme auf festen Medien bei 4°C gelagert. Alle vier Wochen musste auf frisches Medium überimpft werden.

## 3. Biochemische Methoden

### 3.1. Gewinnung von Rohextrakten

Zur Ernte von geringen Mengen an Biofeuchtmasse wurden die Flüssigkulturen bei 12.000 Upm, 4°C und einer Laufzeit von 20 min zentrifugiert und die Organismenfeuchtmasse mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5) auf eine 20%ige Zellsuspension verdünnt.

Die Zellen aus den 15-Liter- und 30-Liter-Fermentationen von *Variovorax paradoxus* wurden mit einem Kammerseparator (Westfalia Separator AG, Typ KA 02, Oelde) über 4 Kammern bei 9.600 Upm geerntet. Größere Zellmengen wurden portioniert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20°C gelagert.

Zur Erniedrigung von Protease-Aktivitäten erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte unter Kühlung auf 4°C. Die Proteingehaltsbestimmung im Rohextrakt ermöglichte die Beurteilung der Aufschlussgüte.

### 3.1.1. Zellaufschluss im analytischen Maßstab

Für den Aufschluss geringer Mengen bakterieller Zellen erwies sich die Nassvermahlung mittels einer Schwingmühle der Firma Retsch als geeignetes Verfahren (Hummel und Kula, 1989).

In 1,5 ml Eppendorf-Caps wurden 1,2 g Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm) und 0,6 ml Zellsuspension gefüllt und mittels einer Schwingmühle 10 min bei maximaler Schwingfrequenz aufgeschlossen. Aus dem Zellhomogenat wurden Glasperlen und Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den Enzymtests eingesetzt.

### 3.1.2. Aufschluss für Volumina bis 20 ml

Für Zellsuspensionen bis 20 ml erfolgte der Aufschluss mit gepulstem Ultraschall mittels eines Pulsed Sonifier [Branson].

*Variovorax paradoxus*, *Rhizobium huautlense* und andere gram-negative Organismen wurden in Portionen von maximal 10 ml mit 8 mal 60 s-bursts bei 70% Puls, 80% Intensität und einminütigem Zwischenkühlen aufgeschlossen.

*E. coli* Kulturen wurden in 1 ml Portionen mit 4 mal 60 s-bursts bei 70% Puls, 80% Intensität und einminütigem Zwischenkühlen aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wurde 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und der Rohextrakt abgenommen. Zur Untersuchung des Anteils an unlöslich exprimiertem Protein (inclusion bodies) wurde das Zellpellet zunächst in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5) gewaschen, erneut abzentrifugiert und für eine SDS-PAGE in Probenpuffer resuspendiert.

### 3.1.3. Aufschluss für Volumina bis 200 ml

Der Aufschluss von Volumina zwischen 20 und 200 ml wurde in einem Desintegrator S [IMA] durchgeführt. Dazu wurden Zellsuspension und Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm) in einem Verhältnis 1:1,5 gemischt und die Zellen 20 min bei 3.500 Upm aufgeschlossen.

## 3.2. Chromatographische Methoden

Für die Reinigung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* und der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense* wurden die folgenden chromatographischen Methoden angewendet, die für die D-Amidase zu einer optimierten Reinigungsstrategie und zur Gewinnung von homogenem Enzym führte (3.2.5). Zur Reinigung der L-Amidase kam vor den chromatographischen Methoden eine Hitzefällung zum Einsatz (3.2.6).

### 3.2.1. Anionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Allgemein wird in der Ionenaustausch-Chromatographie von Proteinen die elektrostatische Wechselwirkung von geladenen Gruppen auf der Oberfläche eines Proteins mit geladenen Liganden einer Matrix ausgenutzt. Die Affinität, mit der ein Protein an einen Ionenaustauscher bindet, ist von der Art und Konzentration der übrigen Ionen, mit denen er um die Bindungsstellen des Ionenaustauschers konkurriert, abhängig. Zum anderen ist die Bindungsaffinität eines Proteins als Polyelektrolyt von seiner Ladung und somit stark vom pH-Wert abhängig.

Als Anionenaustausch-Materialien wurden Q- und DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences) verwendet.

#### Untersuchung der Bindung von Enzymen an Anionenaustauscher in Abhängigkeit vom pH-Wert

In einem Vorversuch kann die Bindung des Enzyms an Anionenaustauscher-Materialien in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht werden. Hierzu wurde in 1,5 ml Eppendorf-Caps 50 bis 200  $\mu$ l Adsorber mit 1,2 ml Rohextrakt bei pH-Werten zwischen 5 und 8 zwei Stunden lang in einem Überkopfschüttler inkubiert; als Kontrolle diente Rohextrakt bei entsprechendem pH-Wert. Der Adsorber wurde anschließend 2 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Mit den Überständen wurde ein Enzymtest durchgeführt und der Proteingehalt bestimmt. Anhand der Kontrolle konnte somit die Restaktivität und der verbleibende Proteingehalt im Überstand in Prozent berechnet werden.

### 3.2.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Bei dieser chromatographischen Methode werden die hydrophoben Eigenschaften eines Proteins ausgenutzt. Durch Zugabe eines stark chaotropen Salzes, z. B. Ammoniumsulfat, werden Proteinen ihrer Hydrathüllen entzogen und die hydrophoben Domänen können mit hydrophobenden Liganden des Säulenmaterials in Wechselwirkung treten. Häufig verwendete Liganden sind Phenyl-, Octyl- und Butylgruppen. Die bei hoher Salzkonzentration an die Säule gebundenen Proteine werden durch einen fallenden Gradienten eluiert.

Da hohe Ammonium-Konzentration die Bestimmung der Enzymaktivität mittels der  $\text{NH}_4^+$ -Bestimmung und die OPA/IBLC-Derivatisierung von Tle für die HPLC unmöglich macht, wurde statt dem meist verwendeten Ammoniumsulfat Natriumsulfat eingesetzt.

### **Bestimmung der Fällungskonzentration an Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Durch Bestimmung der Natriumsulfat-Konzentration, bei der das Enzym auszufallen beginnt, kann die maximale Konzentration an Natriumsulfat zur Bindung des Enzyms an das Säulenmaterial bestimmt werden. Hierzu wurde in verschiedenen Ansätzen 500 µl Rohextrakt mit dem entsprechenden Volumen einer 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Stamm-lösung zu einer Konzentration von 0,4 bis 1,4 M bei 4°C versetzt. Die Ansätze wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und ein gebildeter Niederschlag 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand sowie das resuspendierte Pellet wurde für einen Enzymtest eingesetzt und der Proteingehalt bestimmt.

### **Untersuchung der Bindung von Enzymen an verschiedene HIC-Materialien**

In einem Vorversuch kann die Bindung des Enzyms an verschiedene HIC-Materialien untersucht werden. Dazu wurden in 1,5 ml Eppendorf-Cups zwischen 50 und 200 µl Adsorber mit 1,2 ml Rohextrakt in 20 mM Kpi, pH 6,5 und einer geeigneten Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration 2 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 2 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Für eine qualitative Aussage über die mögliche Elution des Enzyms vom Adsorber wurde nach einem Waschschrift mit 1 ml obigem Puffer in zwei Elutionsschritten mit je 1 ml 20 mM Kpi, pH 6,5 die Enzymaktivität untersucht. Mit den Überständen und den Elutionsansätzen wurde ein Enzymtest durchgeführt und der Proteingehalt bestimmt.

### **3.2.3. Gelfiltration (GPC)**

Die Gelfiltration oder Gelpermeationschromatographie (GPC) ermöglicht die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe. Bei den verwendeten Gelen handelt es sich um poröse Materialien mit definierter Porengröße. Diese Poren ermöglichen es kleineren Molekülen einzudiffundieren, und zwar umso leichter, je kleiner die Moleküle sind. Ihre Verweilzeit in einer Säule ist daher länger als die größerer Moleküle. Diesen Molekularsiebeffekt nutzt man aus, um Proteine unterschiedlicher Größe zu trennen. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Proteine entscheidend, das zwar in erster Näherung mit dem Molekulargewicht korreliert, jedoch geht hier auch die Molekülform ein.

Die Methode ist auch geeignet, das native Molekulargewicht globulärer Proteine zu bestimmen. Voraussetzung ist eine Eichung mit Proteinen, deren Molekulargewicht bekannt ist. Zur Beschreibung der Elution einer Substanz bei der Gelfiltration hat sich der  $K_{av}$ -Wert (coefficient of available volume) als geeignet erwiesen, da er nur von der Art des betrachteten Moleküls und dem Gelmaterial, nicht aber vom Gesamtvolumen  $V_t$  und der Packungsdichte der Säule abhängig ist.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$K_{av}$  = "Coefficient of available volume"

$V_e$  = Elutionsvolumen

$V_0$  = Ausschlussvolumen

$V_t$  = Gesamtvolumen der Säule

Der Term  $V_t - V_0$  entspricht dem Volumen der stationären Phase  $V_{Gelmatrix}$  einschließlich dem Volumen der mobilen Phase  $V_i$  in den Poren des Gels. Das Volumen  $V_i$  kann nicht direkt bestimmt werden. Mit der Näherung  $V_t - V_0 = V_i$  gibt der  $K_{av}$ -Wert den Volumenanteil von  $V_i$  an, welcher für das betrachtete Molekül effektiv zugänglich ist.

### Verwendete Gelfiltrationssäule

Matrix:	Superdex G-200 PG (Amersham Biosciences)
Trennbereich:	10 - 600 kDa
Säulendurchmesser:	1,6 cm
Säulenvolumen $V_t$ :	124 ml
Flussrate:	1 ml/min
Puffer:	20 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,5 + 180 mM NaCl

### Eichung

Das Ausschlussvolumen  $V_0$  wurde mit Blue Dextran 2000 (MG  $2 \times 10^6$  kDa) als 48,35 ml bestimmt. Zur Eichung wurden folgende Proteine (Low und High Molecular Weight Kit, Amersham Biosciences) verwendet:

Thyroglobulin	669 kDa	BSA	67 kDa
Ferritin	440 kDa	Ovalbumin	43 kDa
Catalase	232 kDa	Chymotrypsinogen A	25 kDa
Aldolase	158 kDa	Ribonuclease A	13,7 kDa

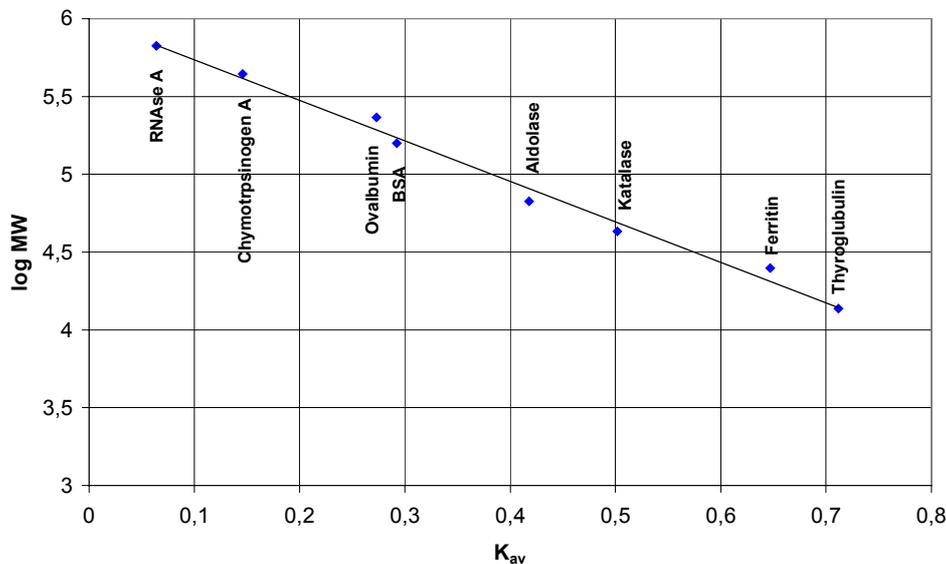


Abb. 63: Eichgerade der Superdex G-200 PG

**Geradengleichung**

$$\log MW = -2,60 \cdot K_{av} + 6,00$$

Korrelationskoeffizient: 0,9898

**3.2.4. Entsalzung, Konzentrierung und Lagerung von Enzymlösungen**

Zur Entsalzung und Umpufferung von Enzymlösungen bis zu einem Probenvolumen von 2,5 ml kamen PD-10-Fertigsäulen [Amersham Biosciences] zum Einsatz. Diese Säulen beruhen auf dem Prinzip der Gelfiltration mit dem Sephadex G-25 Material.

Die verdünnten Enzymlösungen wurden mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Hierzu wurden überwiegend Rührzellen [Millipore] verwendet. Für Volumina bis 10 ml kamen zusätzlich Zentrifugations-Einheiten wie Macrosep™ [Pall Gelman Laboratory] und für Volumina bis 0,5 ml Microcon™ [Millipore] zum Einsatz. Als geeignete Membran wurde die Omega™-Membran [Pall Gelman Laboratory], die eine modifizierte Polyethersulfon-Membran ist, mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet.

Die gereinigten konzentrierten Enzymlösungen wurden mit 50% (v/v) Glycerin bei -20°C gelagert.

### 3.2.5. Reinigung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus*

Die Reinigung der D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* zum homogenen Enzym erfolgte in drei Chromatographieschritten unter den folgenden Bedingungen:

**Tab. 40: Reinigung der D-Amidase**

<b>1. Anionenaustausch-Chromatographie</b>	
Säule	410 ml Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences)
Probe	185 ml Rohextrakt; 16 U; 1,3 g Gesamtprotein
Puffer A	20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5
Puffer B	20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5 + 150 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flussrate	10 ml/min
linearer Gradient	100% B in 1,6 L (4 Säulenvolumina)
Fraktionsgröße	12 ml
UV-Detektion	280 nm
<b>2. Hydrophobe Interaktionschromatographie</b>	
Säule	6,5 ml Butyl-Sepharose 4 FF (Amersham Biosciences)
Probe	64 ml IEC-Pool; 3,2 U; 35 mg Gesamtprotein
Puffer A	20 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,5 + 0,15 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Puffer B	20 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,5
Flussrate	1 ml/min
linearer Gradient	100% B in 40 ml (6 Säulenvolumina)
Fraktionsgröße	4 ml
UV-Detektion	280 nm
<b>3. Gelfiltration</b>	
Säule	124 ml Superdex 200 PG; $\varnothing=1,6$ cm; (Amersham Biosciences)
Probe	1 ml HIC-Pool; 2 U; 1,4 mg Gesamtprotein
Puffer	20 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,5 + 180 mM NaCl
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Fraktionsgröße	1 ml
UV-Detektion	280 nm

### 3.2.6. Reinigung der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense*

Die partielle Reinigung der L-Amidase aus *Rhizobium huautlense* erfolgte in drei Chromatographieschritten unter den folgenden Bedingungen:

**Tab. 41: Partielle Reinigung der L-Amidase**

<b>1. Hitzefällung</b>	
Temperatur	80°C
Inkubation	10 min
Probe	30 ml Rohextrakt; 110 U; 220 mg Gesamtprotein
Puffer	20 mM Kpi-Puffer, pH 6,5 + 0,1 mM ZnSO <sub>4</sub>
<b>2. Anionenaustausch-Chromatographie</b>	
Säule	43 ml DEAE-Sepharose FF (Amersham Biosciences)
Probe	20 ml hitzegef. Amidase-Fraktion; 74 U; 32 mg Gesamtprotein
Puffer A	20 mM Kpi-Puffer, pH 6,5 + 0,1 mM ZnSO <sub>4</sub>
Puffer B	20 mM Kpi-Puffer, pH 6,5 + 0,1 mM ZnSO <sub>4</sub> + 1 M NaCl
Flussrate	3 ml/min
linearer Gradient	100% B in 336 ml (ca. 8 Säulenvolumina)
Fraktionsgröße	5 ml
UV-Detektion	280 nm
<b>3. Hydrophobe Interaktionschromatographie</b>	
Säule	8,4 ml Butyl-Sepharose 4 FF (Amersham Biosciences)
Probe	6,5 ml IEC-Pool; 47 U; 7,5 mg Gesamtprotein
Puffer A	20 mM Kpi-Puffer; pH 6,5 + 0,5 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0,1 mM ZnSO <sub>4</sub>
Puffer B	20 mM Kpi-Puffer, pH 6,5 + 0,1 mM ZnSO <sub>4</sub>
Flussrate	1 ml/min
linearer Gradient	100% B in 60 ml (ca. 7 Säulenvolumina)
Fraktionsgröße	2 ml
UV-Detektion	280 nm

### 3.3. Analytische Methoden

#### 3.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes im Rohextrakt ermöglichte eine Abschätzung des Zellwachstums der getesteten Organismen und der Güte des gewählten Aufschlussverfahrens.

Die Methode (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische, insbesondere Arginyl- und aromatische Aminosäurereste beliebiger Proteine. Zur Erstellung der Eichgeraden dienten 0,02 bis 0,2 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA). Proben mit Proteinkonzentrationen außerhalb des geeichten Bereiches wurden geeignet verdünnt.

#### Bradford-Reagenzlösung:

Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
Ethanol (100%)	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%)	100 ml
Aq. demin.	ad 1000 ml
Lagerung im Dunkeln bei RT	

Für die Bestimmung wurden jeweils 0,05 ml Probe mit 0,95 ml Reagenzlösung in einer 1,5 ml Plastikzuvette vermischt und nach 8 min die Extinktion bei 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen.

#### 3.3.2. Bestimmung der Amidase-Aktivität

Die Aktivität eines Enzyms wird bestimmt durch die Messung des Substratumsatzes in einer bestimmten Zeiteinheit. Bei der Umsetzung von *tert*-Leucinamid oder allgemein von Säureamiden durch eine Amidase kommt es zur Bildung von Ammoniak bzw. Ammoniumionen und *tert*-Leucin bzw. der Carbonsäure in äquimolaren Mengen.



Als Nachweis der Amidase-Aktivität wurde somit die Bestimmung der Ammoniumionen-Zunahme und die Bildung von *tert*-Leucin mittels HPLC herangezogen. Die Konzentrationsänderung der beteiligten Komponenten konnte mit einem Enzymtest gemessen werden, der aus einer 10- bis 60-minütigen Inkubation bei 30°C des folgenden Testansatzes bestand.

**Tab. 42: Enzymtest für die Bestimmung einer Amidase-Aktivität**

Enzymtest	Volumen [ $\mu$ l]
Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,5)	400
Rohextrakt oder Enzymlösung	50
DL-Tle-NH <sub>2</sub> (0,2 M)	50
Gesamtvolumen	500

Durch die Zugabe des Substrats wurde der Enzymtest gestartet, der Reaktionsstopp erfolgte durch 3-minütiges Erhitzen auf 95°C. Ausgefälltes Protein wurde 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand untersucht. Als Kontrollen dienten Ansätze, denen kein Substrat bzw. kein Rohextrakt zugesetzt war.

Anschließend erfolgte die Analyse der Ammoniumionen enzymatisch mittels der Glutamat-Dehydrogenase (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Assay, siehe 3.3.3). Die Bestimmung der gebildeten Aminosäure, insbesondere der Enantiomere D- und L-Tle, konnte durch ein HPLC-Verfahren mittels einer OPA/IBC-Derivatisierung (siehe 3.3.5) ermittelt werden.

### **Berechnung der Enzymaktivität**

Die Enzymaktivität [U] ist definiert als die Enzymmenge, die unter definierten Bedingungen 1  $\mu$ mol Substrat pro Minute umsetzt.

Die Menge an verbrauchtem Substrat Tle-NH<sub>2</sub> entspricht der gebildeten Menge an Tle bzw. der Ammonium-Zunahme. Somit berechnet sich die Volumenaktivität, Akt. [U/ml], anhand der Ammonium-Konzentrationszunahme  $c(\text{NH}_4^+)$  oder der Konzentration an gebildetem Tle  $c(\text{Tle})$  nach der Formel:

$$\text{Akt. [U/ml]} = \frac{c \text{ [mM]} \cdot V_{\text{Test}} \text{ [\mu l]}}{t \text{ [min]} \cdot V_{\text{Enzym}} \text{ [\mu l]}}$$

$$\begin{array}{ll} c & = \quad c(\text{NH}_4^+) \text{ oder } c(\text{Tle}) \\ V_{\text{Test}} & = \quad \text{Enzymtestvolumen} \\ V_{\text{Enzym}} & = \quad \text{Volumen an Enzymlösung im Enzymtest} \\ t & = \quad \text{Inkubationszeit des Enzymtests} \end{array}$$

### **Spezifische Aktivität**

Mit der Volumenaktivität Akt. [U/ml] und dem Proteingehalt der eingesetzten Enzymlösung  $c_{\text{Protein}}$  [mg/ml] berechnet sich die spezifische Aktivität, spez. Akt. [U/mg], zu:

$$\text{spez. Akt. [U/mg]} = \frac{\text{Akt. [U/ml]}}{c_{\text{Protein}} \text{ [mg/ml]}}$$

### 3.3.3. Bestimmung der Ammonium-Konzentration mittels der Glutamat-Dehydrogenase (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Assay)

Die Konzentration an Ammoniumionen einer Lösung lässt sich auf unterschiedliche Weise bestimmen. Bekannt hierfür sind das Nessler-Reagenz (Vogel, 1989), die Indophenolreaktion, die auch Berthelot'sche Reaktion genannt wird (Wagner, 1969), und die enzymatische Bestimmung mittels der Glutamat-Dehydrogenase (Bergmeyer und Beutler, 1985).

Aufgrund der leichten Handhabbarkeit und der Störuneempfindlichkeit für die Routineanalytik hat sich die enzymatische Bestimmung als geeignet erwiesen. Das Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GluDH; E.C.1.4.1.3) setzt 2-Ketoglutarat zu L-Glutamat um, wobei Ammonium verbraucht und NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert werden.



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Menge an Ammonium äquivalent. Die Konzentrationsänderung an NADH ist die Messgröße und kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden.

#### Testlösungen:

2-Oxoglutarat/ADP/TEA-Puffer:	9,3 g TEA 670 mg 2-Ketoglutarat 95 mg ADP Aq. demin. ad 100 ml, pH 8,0
NADH-Lösung:	30 mg NADH 60 mg NaHCO <sub>3</sub> in 6 ml Aq.demin. gelöst
Glutamat-Dehydrogenase:	120 U/mg aus Rinderleber in 50% Glycerin, [Roche]

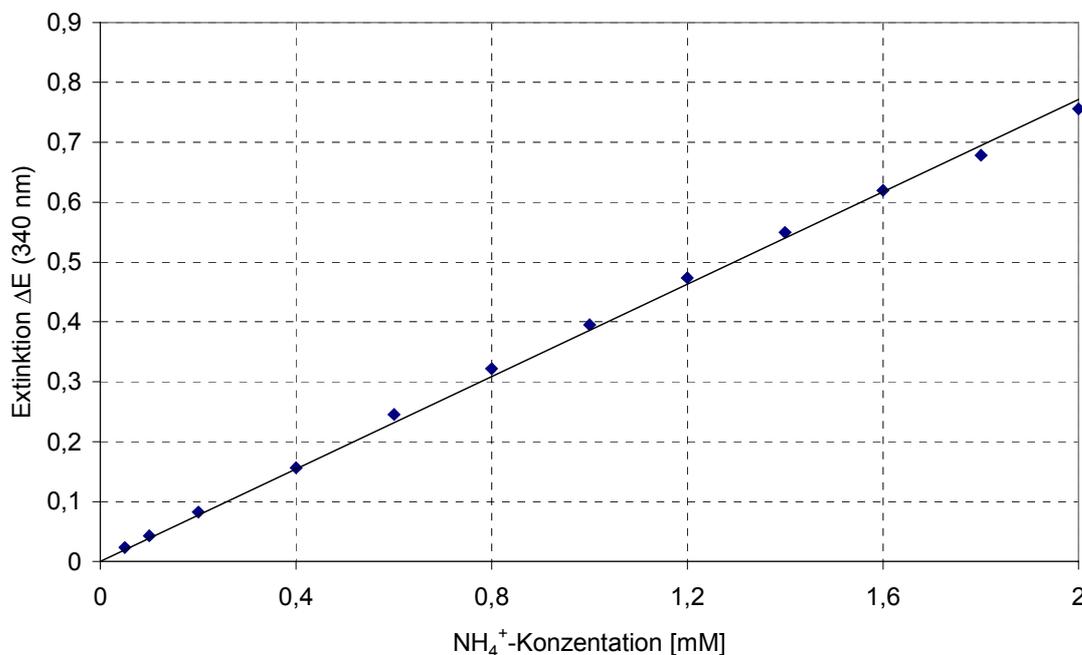
**Tab. 43: Zusammensetzung des NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Assays**

Komponente	Volumen [μl]
Aq. demin	950
2-Oxoglutarat/ADP/TEA-Puffer	500
NADH-Lösung	50
Probe-Lösung	100
Gesamtvolumen	1600

Die angegebenen Testkomponenten wurden nacheinander in 2,0 ml Plastikküvetten pipettiert, vermischt und nach 5 min die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10  $\mu$ l GluDH und nach vollständigem Ablauf der Reaktion, in der Regel nach 30 min, erneut eine Extinktionsmessung.

Die Extinktionsänderung  $\Delta E$  ergab sich durch Subtraktion des zweiten Wertes vom ersten. Ist  $\Delta E$  der Probe größer als 0,8 Extinktionseinheiten, so ist die Konzentration an Ammonium in der Probe zu groß und die gesamte Menge an NADH verbraucht. Daraus ergibt sich für die Probe ein Messbereich bis zu 2 mM Ammonium.

Ein Vergleich zwischen Probeansätzen und zugehörigen Kontrollen gab Aufschluss, ob die gemessenen Werte auf aus D,L-Tle-NH<sub>2</sub> freigesetzten oder auf bereits im Rohextrakt vorhandenes Ammonium zurückzuführen waren. Als signifikant wurden Extinktionsänderungen von mehr als 0,03 Einheiten betrachtet. Anhand der Erstellung einer Eichgeraden mittels definierter Mengen Ammoniumchlorid konnte aus den Extinktionsänderungen die Ammonium-Konzentration bestimmt werden.



**Abb. 64: Eichgerade zur Ammonium-Bestimmung mittels der Glutamat-Dehydrogenase**

### Geradengleichung

$$\Delta E = 0,386 [\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}] \cdot c [\text{mM}]$$

Korrelationskoeffizient: 0,998

Die Ammoniumkonzentration  $c(\text{NH}_4^+)$  errechnet sich somit aus der Extinktionsänderung  $\Delta E$  zu:

$$c(\text{NH}_4^+) [\text{mM}] = 2,59 [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}] \cdot \Delta E$$

### 3.3.4. Nachweis von D- und L-*tert*-Leucin mittels chiraler Dünnschichtchromatographie (ChiralPlate)

Die Dünnschichtchromatographie ist eine einfache Trennmethode, mittels derer Substanzgemische durch Verteilung über zwei Phasen in ihre Komponenten zerlegt werden. Die Vorteile dieser Methode sind kurze Trennzeiten, hohe Empfindlichkeiten und Trennschärfen.

Die kommerziell erhältlichen DC-Platten mit der Markenbezeichnung „ChiralPlate“ [Macherey & Nagel] sind zur Enantiomerentrennung von  $\alpha$ -Aminosäuren, Dipeptiden und  $\alpha$ -Hydroxysäuren geeignet. Es handelt sich um Kieselgel-beschichtete Glasplatten mit Reversed-Phase-Eigenschaften, die mit einem Prolinderivat und Kupfer(II)-Ionen imprägniert sind. Die Trennung der Enantiomere basiert auf Ligandenaustausch durch Bildung von Chelatkomplexen mit Kupfer(II)-Ionen. Die Detektion erfolgte mit dem für Aminosäuren gebräuchlichen Ninhydrin.

#### Testbedingungen

Stationäre Phase:	Kieselgel (0,25 mm), imprägniert mit Prolinderivat und Cu(II)-Ionen; Trägermaterial: Glas Aktivierung vor Gebrauch: 15 min bei 100°C
Mobile Phase:	Methanol/Wasser/Acetonitril: 1:1:4 (v/v/v)
Probenvolumen:	1 $\mu$ l einer 5 mM Lösung der Reinsubstanzen bzw. 5 $\mu$ l der Probelösungen
Detektion:	Ninhydrin-Sprühreagenz: 0,3% (w/v) Ninhydrin in Isopropanol, Entwicklung: 5 min bei 110°C

Die Identifizierung der Enantiomere erfolgte durch den Vergleich mit reinen Referenzsubstanzen. Es ergaben sich nachfolgend angegebene  $R_f$ -Werte.

<u>Substanz:</u>	<u><math>R_f</math>-Wert:</u>
L-Tle	0,60
D-Tle	0,45
D,L-Tle-NH <sub>2</sub>	0,03-0,12



**Derivatisierung**

Konzentrationen im Testansatz

Na-Borat-Puffer:	140 $\mu$ l	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> :	70 mM
Probe-Lösung:	40 $\mu$ l	Tle:	bis zu 0,4 mM
OPA/IBC:	20 $\mu$ l	OPA:	17 mM
		IBC:	26 mM
Gesamtvolumen:	200 $\mu$ l		
Injektionsvolumen:	20 $\mu$ l		

Die Derivatisierungskomponenten wurden in 1,5 ml Eppendorf-Caps pipettiert, vermischt und konnten direkt gemessen werden.

**Chromatographiebedingungen**

Stationäre Phase:	Kromasil™ HPLC-Säule, 250 × 4 mm, 5 $\mu$ m, 100 Å Firma Eka Nobel	
Mobile Phase:		
Laufmittel A:	23 mM Natriumacetat in Aq. demin. gelöst, pH 6,0 1 M Essigsäure eingestellt	
Laufmittel B:	Acetonitril (HPLC-Grade) und Aq. demin.: 10:1,5 (v,v)	
Tle-Programm:	Zeit [min]	Laufmittel B [%]
Fluss 1,0 ml	0	22
	25	29
	27	100
	30	100
	32	0
	42	0
Detektion:	Fluoreszenz:	Ex. 340 nm Em. 440 nm
Temperatur:	RT	

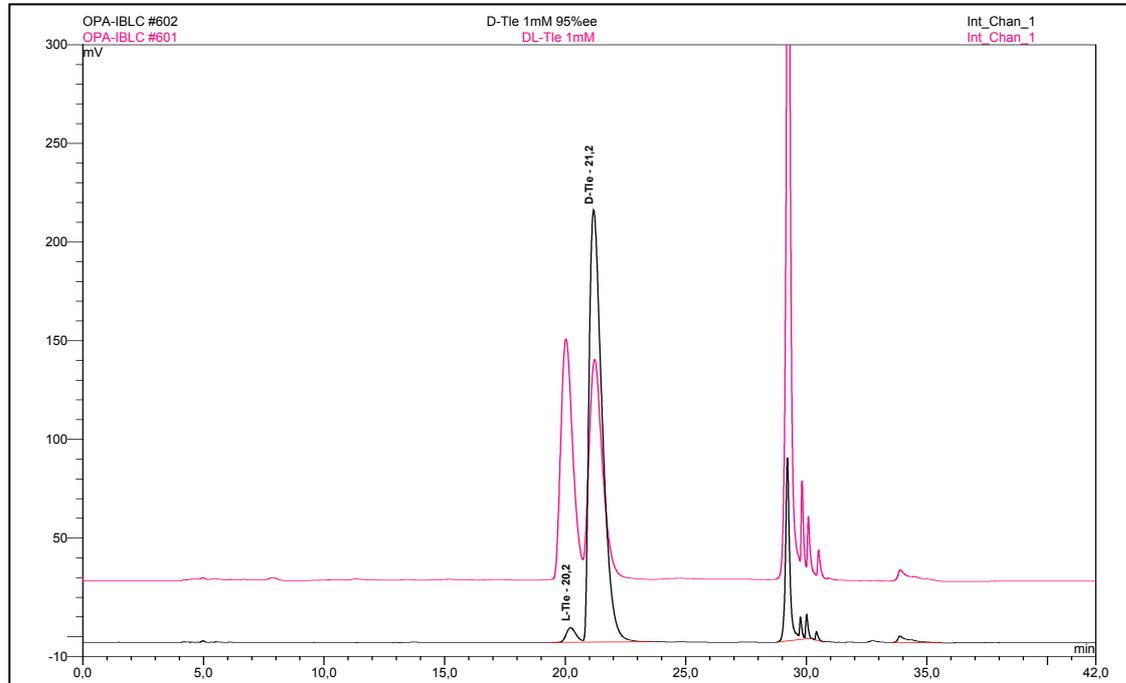
Mit dem Tle-Elutionsprogramm war für die Aminosäuren Tle, Leu, Val, Phe, Trp und Met eine Enantiomerentrennung möglich. Bei einer Derivatisierung mit IBLC ergaben sich für die jeweiligen Enantiomere folgende Retentionszeiten. Ebenso wurden mit diesem Programm L-Ile bei 18,5 min und L-Tyr bei 10,9 min detektiert.

**Tab. 44: Retentionszeiten der Enantiomere verschiedener Aminosäuren nach Derivatisierung mit OPA/IBLC und Elutionsprogramm Tle**

AS	Tle	Leu	Val	Phe	Trp	Met
L-AS: t <sub>R</sub> [min]	20,2	19,5	10,1	21,8	18,8	12,2
D-AS: t <sub>R</sub> [min]	21,2	23,2	13,5	23,0	21,8	14,5

Für die Enantiomere von Gln, His und Ala wurden optimierte Gradientenprogramme verwendet (siehe Anhang).

Exemplarisch sind in Abbildung 66 die Chromatogramme für 1 mM D-Tle (95% ee) mit 1 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub> und 1 mM DL-Tle mit 20 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub> (weiterer Peak bei 29,3 min) gezeigt. Das derivatisierte Substrat DL-Tle-NH<sub>2</sub> eluierte somit erst bei hoher Acetonitril-Konzentration, wobei keine Trennung in die Enantiomere erfolgte.



**Abb. 66:** HPLC-Chromatogramme für 1 mM D-Tle (95% ee) + 1 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub> und 1 mM DL-Tle + 20 mM DL-Tle-NH<sub>2</sub>; Retentionszeiten: L-Tle: 20,2 min, D-Tle: 21,2 min und DL-Tle-NH<sub>2</sub>: 29,3 min, Derivatisierung mit OPA/IBLC und Tle-Elutionsprogramm

Zur quantitativen Bestimmung der D- und L-AS wurde eine Eichung im Bereich von 0,2 bis 2,0 mM vorgenommen. In Abbildung 67 ist exemplarisch die Eichung für L- und D-Tle aufgeführt. Eine Quantifizierung der eingesetzten Aminosäureamide wurde nicht vorgenommen.

### Geradengleichungen

$$c(\text{D-Tle}) [\text{mM}] = 6,65 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Peakfläche} [\text{mV} \cdot \text{min}]$$

rel. Standardabweichung: 1,04%

Korrelationskoeffizient: 99,99%

$$c(\text{L-Tle}) [\text{mM}] = 6,43 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Peakfläche} [\text{mV} \cdot \text{min}]$$

rel. Standardabweichung: 1,23%

Korrelationskoeffizient: 99,99%

Grundsätzlich wurden für eine Quantifizierung zu einer Probensequenz zusätzlich drei Standardproben bekannter Konzentration für eine Eichung bestimmt.

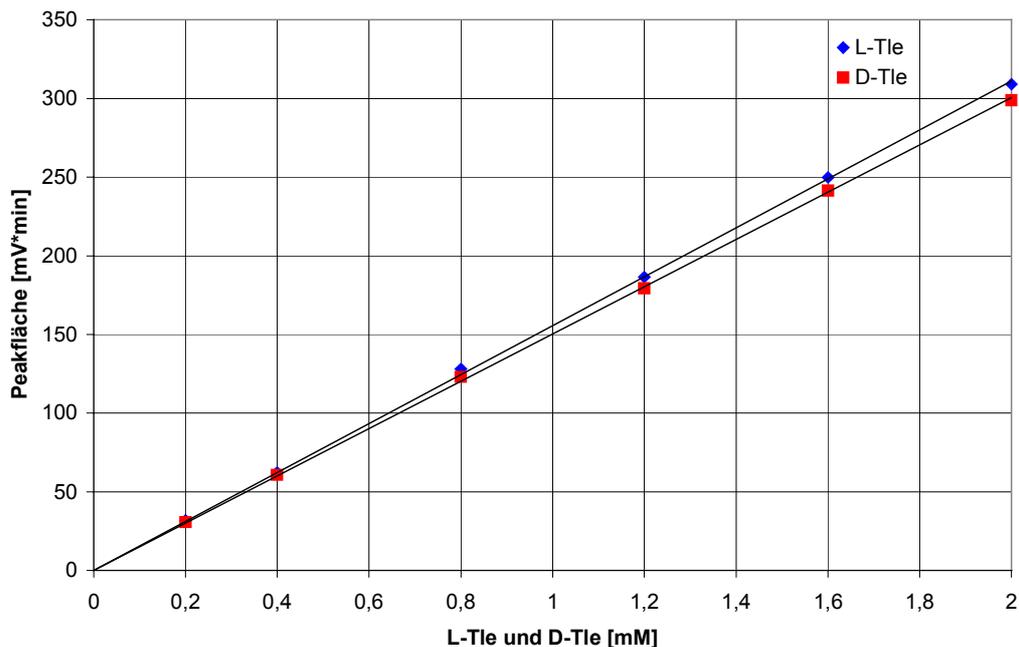


Abb. 67: Eichgerade für D- und L-Tle-Bestimmung mittels HPLC

### 3.3.6. Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (ee-Wert) und der Enantioselektivität anhand des E-Wertes (enantiomeric ratio)

Der Enantiomerenüberschuss (ee-Wert) ist ein Maß für die optische Reinheit einer chiralen Substanz und lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$ee [\%] = \frac{(R) - (S)}{(R) + (S)} \cdot 100$$

wobei  $(R) \geq (S)$ ;  $(R)$  und  $(S)$  die Enantiomerenanteile der Verbindung sind.

Um eine kinetische Racematspaltung quantitativ beurteilen zu können, wurde von Chen der Parameter E des Enantiomerenverhältnisses (enantiomeric ratio) eingeführt. Der E-Wert ist als das Verhältnis der kinetischen Konstanten der parallel verlaufenden Reaktionen beider Enantiomere  $R$  und  $S$  definiert und beschreibt die Enantioselektivität der Racematspaltung (Chen et al., 1982).

$$E = \frac{k_{\text{cat}}^R / K_M^R}{k_{\text{cat}}^S / K_M^S}$$

Ebenso lässt sich der E-Wert auch durch den Enantiomerenüberschuss des Produktes  $ee_p$  und den Umsatz  $\xi$  ausdrücken (Straathof und Jongejan, 1997).

$$E = \frac{\ln[1 - \xi(1 + ee_p)]}{\ln[1 - \xi(1 - ee_p)]}$$

Ausgehend vom racemischem D,L-Tle-NH<sub>2</sub> bzw. DL-Aminosäureamid wurde somit zur Berechnung des E-Wertes der Enantiomerenüberschuss  $ee_p$  des überwiegend gebildeten Produktes in Abhängigkeit vom Umsatz verfolgt.

### 3.3.7. Bestimmung der Aktivierungsenergie

Die Arrhenius-Gleichung beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  einer Reaktion.

$$k = A \cdot e^{-E_A / R \cdot T}$$

$k$  = Geschwindigkeitskonstante  
 $A$  = präexponentieller Faktor  
 $E_A$  = Aktivierungsenergie [J/mol]  
 $R$  = allgemeine Gaskonstante; 8,314 [J/mol\*K]  
 $T$  = Temperatur [K]

In der logarithmierten Form ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  und der reziproken absoluten Temperatur.

$$\ln k = \ln A - E_A / R \cdot T$$

Unter der Voraussetzung, dass die Arrhenius-Gleichung gilt, ergibt sich aus der Auftragung  $\ln k$  gegen  $1/T$  eine Gerade, aus deren Steigung  $-E_A/R$  sich die Aktivierungsenergie berechnen lässt.

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie  $E_A$  wurde der lineare Abschnitt aus der Temperaturoptimumskurve herangezogen und nach Arrhenius berechnet.

### 3.3.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE können Proteinproben unterschiedlicher Reinheit auf ihre Proteinzusammensetzung und Homogenität überprüft werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein stark denaturierendes Detergens, das in einem konstanten Verhältnis an Proteinen von etwa einem SDS-Molekül pro zwei Aminosäure-Resten (1,4 g SDS/g Protein) bindet. Dadurch erhalten die aufgefalteten Proteine bzw. Untereinheiten proportional zu ihrer Größe eine negative Ladung. Somit entfallen Trennungseigenschaften durch unterschiedliche Ladung und die Proteine werden im Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) unter Verwendung diskontinuierlich gegossener Polyacrylamid-Gele durchgeführt. Für die optimale Auftrennung der Proteine im Bereich von 20 bis 60 kDa wurde überwiegend ein 12,5%iges Trenngel mit einem 4%igem Sammelgel verwendet.

#### Verwendete Stammlösungen:

Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
SDS	10 %	(w/v)
APS	10 %	(w/v)
Acrylamid	30 %	(w/v)

**Tab. 45: Zusammensetzung eines 12,5%igen Trenngels mit einem 4%igen Sammelgel**

<b>Trenngel (12,5%)</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Trenngelpuffer	10,0 ml	0,375 M
Aq. demin.	12,9 ml	-
Acrylamid	16,7 ml	12,5 %
SDS	0,4 ml	0,1 %
TEMED	40 µl	0,1 %
APS	100 µl	0,025 %
<b>Sammelgel (4%)</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Sammelgelpuffer	2,5 ml	0,125 M
Aq. demin.	5,9 ml	-
Acrylamid	1,5 ml	4 %
SDS	100 µl	0,1 %
TEMED	20 µl	0,2 %
APS	60 µl	0,06 %

Die aufgeführten Volumina wurden für ein Maxi-Gel (12 x 16 cm<sup>2</sup>) oder zwei Midi-Gele (8 x 10 cm<sup>2</sup>) angesetzt. Die Komponenten der Gele wurden in der angegebenen Reihenfolge vermischt und sofort in geeignete Gelkammern gegossen. Das Trenngel polymerisierte 1 bis 2 h, bevor es mit dem Sammelgel überschichtet wurde.

**Probenpuffer:**

Tris-HCl pH 6,8	0,063	M
Glycerin	10	%
SDS	2	%
Bromphenolblau	0,1	%
DTT	10	%

Das Dithiothreitol (DTT) wurde dem Probenpuffer erst kurz vor Gebrauch zugesetzt. Die Proteinproben wurden 1:2 bis 1:5 mit dem reduzierendem Probenpuffer versetzt, 2 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

Als Molekulargewichtsstandard kam der "Premixed Standard, low range" [Roche] zum Einsatz. Für Coomassie-Färbungen wurde eine 1:20, für Silberfärbungen eine 1:100 Verdünnung mit reduzierendem Probenpuffer vorgenommen und ebenfalls 2 min bei 95°C denaturiert. Je nach Gelgröße kamen Aliquots von 5 bis 20 µl zum Einsatz.

**Elektrophoresepuffer, pH 8,0:**

Tris-HCl	0,025	M
Glycin	0,129	M
SDS	0,1	% (w/v)

**Trennbedingungen:**

Midi-Gele (8 x 10 cm <sup>2</sup> )	20 mA const.	15°C
Maxi-Gele (12 x 16 cm <sup>2</sup> )	10 – 20 mA const.	15°C

Weiterhin wurden auch die kommerziell erhältlichen NuPAGE<sup>®</sup> Bis-Tris Fertiggele mit dem NuPAGE<sup>®</sup> Elektrophorese System [Invitrogen] verwendet. Diese Gele basieren auf einer mit Bis-Tris gepufferten (pH 6,4) Polyacrylamidmatrix und wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

**3.3.9. Färbungen von Proteinen nach einer PAGE****Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250**

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 30 bis 60 min in der Färbelösung inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde zunächst in Entfärbelösung geschüttelt und anschließend über Nacht in 0,5 M NaCl oder Aq. demin. inkubiert.

**Färbelösung:**

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1% (w/v)
Ethanol techn.	40% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)
Aq. demin.	50% (v/v)

**Entfärbelösung:**

Ethanol techn.	40% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)
Aq. demin.	50% (v/v)

**Färbung mit Amidoschwarz**

Die Detektion von Proteinen nach Elektroblothing auf PVDF-Membranen erfolgte mit Amidoschwarz analog der Coomassie-Färbung.

**Färbelösung:**

Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Ethanol techn.	40% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)
Aq. demin.	50% (v/v)

Nach der Entfärbung wurde die Membran an der Luft getrocknet und in einer Plastikhülle bei 4°C gelagert.

**Färbung mit Silbernitrat**

Die Proteine wurden dreimal 30 min im Gel fixiert und anschließend je 10 min mit 20% (v/v) Ethanol und Wasser gewaschen, um Reste der Fixierlösung sowie SDS zu entfernen. Die Färbung der Proteine erfolgte nach Blum et al. (Blum et al., 1987). Zuerst wurde das Gel für 1 min in der Sensitivierungslösung geschüttelt, kurz mit Wasser gespült und anschließend 20 bis 30 min in der Färbelösung inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Gel wieder kurz mit Wasser gespült und dann entwickelt. Sobald die Banden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Zugabe der Fixierlösung abgestoppt.

<b>Fixierlösung:</b>	40% Ethanol, (v/v) 10% Eisessig, (v/v)
<b>Sensitivierungslösung:</b>	0,02% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O, (w/v)
<b>Färbelösung:</b>	2% AgNO <sub>3</sub> , (w/v) 750 µl/L HCHO, 37% (v/v)
<b>Entwicklerlösung:</b>	6% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , (w/v) 500 µl/L HCHO, 37% (v/v) 0,0005% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O, (w/v)

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Färbemethode wurde für alle Lösungen und Waschschriffe Reinstwasser (Millipore) verwendet.

### 3.3.10. Elektroblothing nach Khyse-Andersen [1984]

Zur N-terminalen Sequenzierung der Enzyme wurden nach einer SDS-PAGE die Proteine auf eine PVDF-Membran Immobilon P (Millipore) transferiert. Das diskontinuierliche Blotting wurde nach dem semi-dry-Verfahren (Khyse-Andersen, 1984) durchgeführt, bei dem ein gleichmäßiger Transfer der Proteine aller Molekulargewichtsbereiche auf die Membran stattfindet.

#### Blottingpuffer:

<b>Anodenpuffer I:</b>	0,3 M Tris-HCl 10 % Methanol, pH 10,4 (v/v)
<b>Anodenpuffer II:</b>	25 mM Tris-HCl 10 % Methanol, pH 10,4 (v/v)
<b>Kathodenpuffer:</b>	25 mM Tris-HCl 40 mM $\epsilon$ -Aminohexansäure 10% Methanol, pH 10,4 (v/v)

Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol kurz eingelegt, in Wasser gewaschen und anschließend in Anodenpuffer II äquilibriert. Das SDS-Gel wurde nach dem Waschschrift in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere wurden teils mit Anodenpuffer I, teils mit Anodenpuffer II befeuchtet und in dieser Reihenfolge luftblasenfrei auf die Anode gelegt. Die restlichen Filter wurden mit Kathodenpuffer befeuchtet, der Zusammenbau der Blottingkammer erfolgte analog der Herstellerangaben. Die Proteine wurden 45 min mit 1,5 mA/cm<sup>2</sup> geblottet und die Membran mit Amidoschwarz gefärbt.

### 3.3.11. Bestimmung der N-terminalen-Aminosäuresequenz

Die Proteinproben wurden mit Hilfe des automatisierten Edman-Abbaus mit einem Automated Sequencer 477A [Applied Biosystems] mit on-line HPLC 120 A durchgeführt. Die endständige Aminosäure des N-Terminus reagiert mit Phenylisothiocyanat (Edman-Reagens) zu einem Phenylthiocarbamoyl-Addukt, welches unter den folgenden Reaktionsbedingungen abgespalten und in das stabilere Phenylhydantoin (PTH)-Derivat überführt wird. Durch wiederholte Zyklen und Bestimmung der jeweils freigesetzten PTH-Aminosäure können auf diese Weise Aminosäuresequenzen von maximal 40 bis 60 Aminosäuren ermittelt werden. Zugrunde lagen geblottete und mit Amidoschwarz gefärbte Proteinproben.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1. Präparation von genomischer DNA aus *Variovorax paradoxus*

#### Anzucht der Zellen

Ausgehend von einer konservierten Stammkultur von *Variovorax paradoxus* wurde eine 30 ml Vorkultur im DSMZ-Medium-Nr. 1 über Nacht kultiviert und damit 5%ig 200 ml Ansätze des gleichen Mediums angeimpft. Diese Ansätze wurden bis zu einer  $OD_{660}$  von ca. 0,9 bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen bei 4°C und 5.000 Upm in einer Kühlzentrifuge geerntet. Das Zellpellet wurde mit sterilem Kpi-Puffer (20 mM, pH 6,5) gewaschen und erneut abzentrifugiert.

#### Präparation von genomischer DNA mittels Dneasy Tissue Kit [Qiagen]

Die Durchführung erfolgte dem Protokoll für gram-negative Bakterien entsprechend (Qiagen Dneasy Tissue Kit Handbook, 4/99). Abschließend wurde die genomische DNA mit zweimal 200 µl AE-Puffer eluiert.

### 4.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Linearisierte DNA wurde zur Identifizierung, Qualifizierung und Isolierung in Agarosegelen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte gemäß Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). Verwendet wurden 0,6 bis 1,2%ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer, die 0,005% (v/v) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) enthielten. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 5 bis 7 V/cm Gellänge.

**TAE-Puffer, pH 8,0:**                    0,04 M Tris-HCl  
    5,7% Essigsäure (v/v)  
    1 mM EDTA

**Probenpuffer:**                        6x TAE-Puffer, pH 8,0 mM Tris-HCl  
    50% Glycerin (v/v)  
    0,05% Bromphenolblau (w/v)

**Molekulargewichtsstandard:**    1 kb-Leiter [Gibco]

Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem EagleEye II [Stratagene] dokumentiert, indem die Ethidiumfluoreszenz im UV-Durchlicht bei 312 nm angeregt wurde.

### 4.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAquick Gel Extraction Kit [Qiagen]

Die Isolierung elektrophoretisch separierter DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte gemäß dem QIAquick Gel Extraktion Kit Protokoll (1/99). Hierzu wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden über spezielle Membransäulen aus dem Gel isoliert und nach einem Waschschrift die DNA von der QIAquick-Zentrifugationssäule mit 50 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,5) eluiert.

### 4.4. Herstellung von synthetischen Oligonukleotiden und Berechnung der Schmelztemperatur

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG in Form eines Lyophilisats bezogen. Diese wurden mit Aq. demin. (Millipore) auf einheitliche 100 pmol/µl verdünnt. Die Schmelztemperatur  $T_m$  eines Primers wurde folgendermaßen bestimmt:

Für eine Abschätzung der  $T_m$  gilt für Primerlängen  $\leq 24$  bp (Thein und Wallace, 1988).

$$T_m [^\circ\text{C}] = 2x (\text{Basenzahl A} + \text{T}) + 3x (\text{Basenzahl G} + \text{C})$$

Für Primerlängen  $\geq 14$  bp gilt [MWG Biotech]:

$$T_m [^\circ\text{C}] = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC-Gehalt} [\%]) - 650/\text{Primerlänge}$$

Für Primerlängen mit einem "Mismatch"  $\geq 25$  bp gilt [Stratagene]:

$$T_m [^\circ\text{C}] = 81,5^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC-Gehalt} [\%]) - 675/\text{Primerlänge} - \text{Mismatch} [\%]$$

### 4.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die Amplifikation (Vervielfachung) definierter DNA-Fragmente. Neben der DNA werden zwei Oligonukleotide (Primer), eine ausreichende Menge der vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) und eine DNA-Polymerase benötigt. Die Primer entsprechen den 5'-Enden des sense- und antisense-Stranges des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Die doppelsträngige DNA wird zunächst durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt (Denaturierungsschritt). Es folgt bei niedriger Temperatur das Anlagern der Primer (Annealingschritt). Danach werden bei der optimalen Temperatur für die Polymerase an beiden Einzelsträngen komplementäre DNA-Stränge in Richtung 5'-3' synthetisiert (Amplifizierungsschritt).

Anhand hitzebeständiger DNA-Polymerasen erübrigt es sich, nach jedem Denaturierungsschritt erneut Polymerase zuzugeben. Durch x derartiger Zyklen wird eine Amplifikation um den Faktor  $2^x$  erzielt. Mit entsprechenden Geräten ist die Reaktion komplett automatisiert.

Durch PCR wurde zunächst ein Teilabschnitt des D-Amidase-Gens, später das gesamte D-Amidase-Gen aus genomischer DNA amplifiziert. Nach Sicherung und Überprüfung der D-Amidase Gensequenz wurde Plasmid-DNA als Template benutzt.

**Tab. 46: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für genomische DNA oder Plasmid-DNA**

<b>PCR-Ansatz</b>	
genomische DNA oder Plasmid-DNA	100 – 500 ng 20 ng
Polymerase-Puffer (10x)	1/10 Vol.
dNTP's	je 0,2 mM
Sense- und Antisense-Primer	je 10 – 50 pmol
DNA-Polymerase	1 – 5 U
DMSO	5% (v/v)
Aq. demin.	ad 50 $\mu$ l

Als DNA-Polymerasen wurden die Taq- [Roche], Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> [NEB] und Herculase<sup>®</sup> [Stratagene] eingesetzt und die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Die PCR-Ansätze wurden mit 50 bis 100  $\mu$ l leichtem Mineralöl [Sigma] überschichtet und die PCR mit Hilfe eines automatischen DNA-Thermal-Cyclers [Biometra 200 bzw. 500] durchgeführt.

Ausgehend von genomischer DNA wurde zur Amplifizierung eines 0,5 kB großen Fragments des D-Amidase-Gens mittels einer Touchdown PCR folgendes Temperatur-Programm verwendet (Tab. 47). Die Schritte 2 bis 4 wurden 10-mal durchlaufen, wobei die Annealingtemperatur von Schritt 3, um  $-1^{\circ}\text{C}$  pro Cyclus erniedrigt wurde. Anschließend wurden die Schritte 5 bis 7 20-mal durchlaufen.

**Tab. 47: PCR-Programm für Fragment des D-Amidase-Gens mit Primerpaar AAH-N1 / AAH-C1**

PCR-Programm für D-Amidase-Fragment		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	1 min
3	70 - 61°C	45 sec
4	72°C	30 sec
5	95°C	1 min
6	70°C	45 sec
7	72°C	30 sec
8	72°C	2 min

Zur Amplifizierung des gesamten D-Amidase-Gens aus genomischer DNA wurde folgendes Temperatur-Programm verwendet, wobei die Schritte 2 bis 3 10-mal und anschließend die Schritte 4 bis 5 20-mal durchlaufen wurden.

**Tab. 48: PCR-Programm für gesamtes D-Amidase-Gen mit 92 bp vor Startcodon und 80 bp nach dem Stopcodon; Primerpaar AAH-K-N2 / AAH-K-C2**

PCR-Programm für gesamtes D-Amidase-Gen		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	45 sec
3	70°C	2,5 min
4	95°C	45 sec
5	67°C	2,5 min
6	67°C	5 min

Ausgehend von Plasmid-DNA wurden für die Expressionsklonierung der D-Amidase mittels PCR geeignete Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende erzeugt. Unter Berücksichtigung der überstehenden Enden der Primer berechneten sich Schmelztemperaturen  $T_m$  von 51,5°C für AAH-N-*EcoR I* und 42,9°C für AAH-C-*Hind III*, sodass eine Touchdown-PCR unter den folgenden Bedingungen verwendet wurde (Tab. 49). Die Schritte 2 bis 4 wurden 12-mal durchlaufen, wobei die Annealingtemperatur von Schritt 3, um  $-1^\circ\text{C}$  pro Cyclus erniedrigt wurde; anschließend wurden die Schritte 5 bis 7 20-mal durchlaufen.

**Tab. 49: PCR-Programm für die Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende des D-Amidase-Gens mit Primerpaar AAH-N-EcoR I / AAH-C-Hind III**

Temperatur-Programm		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	1 min
3	52 - 41°C	1 min
4	70°C	2 min
5	95°C	1 min
6	62°C	1 min
7	70°C	2 min
8	70°C	5 min

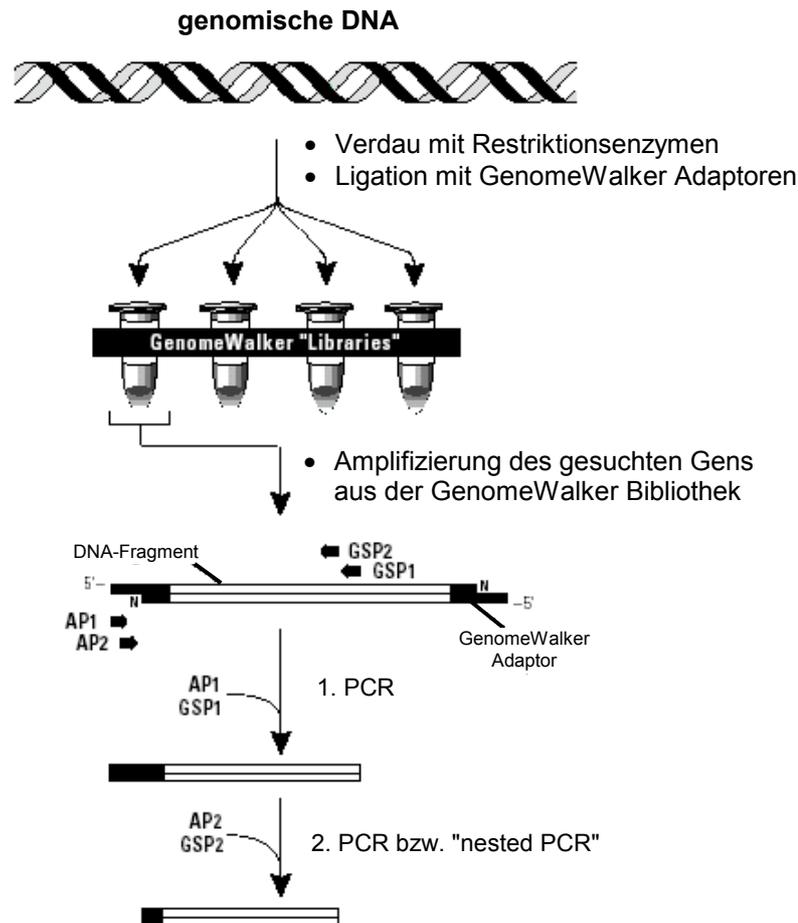
Die Reinigung und Isolierung der PCR-Produkte erfolgte entweder direkt mittels des PCR Purification Kits [Qiagen] oder durch Agarosegel-Elektrophorese des gesamten PCR-Ansatzes und anschließende Isolierung des DNA-Fragmentes mittels QIAquick Gel Extraktion Kit.

#### 4.6. Universal-GenomeWalker™-System [Clontech]

Ausgehend von genomischer DNA ermöglicht das Universal-GenomeWalker™-System die PCR-vermittelte Klonierung einer gesuchten DNA-Sequenz, für die nur ein genspezifischer Primer vorliegen muss (Abb. 68; Siebert et al., 1995).

Zunächst wird eine sogenannte "GenomeWalker Bibliothek" angelegt. Hierzu wird genomische DNA mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoR V*, *Sca I*, *Pvu II* und *Stu I*) verdaut. Nach Reinigung der DNA-Restriktionsansätze folgt jeweils eine blunt-end Ligation mit den beigefügten GenomeWalker Adaptoren, für die zwei Adaptor-Primer (AP1 und AP2) vorliegen.

Diese Bibliothek dient als Template für eine erste PCR-Reaktion (Primary PCR) mit dem Adaptor-Primer 1 (AP1), der an dem ligierten Adaptorende bindet, und dem eigenen genspezifischen Primer (GSP1). Unter den Bedingungen einer "long-distance PCR" können mit den empfohlenen DNA-Polymerasen bis zu 6 Kb große Amplifikate erhalten werden. Mit der zweiten PCR (Secondary or nested PCR) mit Adaptor-Primer 2 (AP2) und einem weiteren genspezifischen Primer (GSP2), die jeweils weiter innen binden, kann die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten minimiert werden.



**Abb. 68: Schematische Darstellung des Universal-GenomeWalker™-Systems**

Die resultierende PCR-Produkte können in einem Agarosegel getrennt und das überwiegende Amplifikat wie beschrieben aufgereinigt und sequenziert werden. Mit vorhandenen Restriktionsschnittstellen in den genspezifischen und Adaptor-Primern ist grundsätzlich auch eine direkte Ligation der PCR-Produkte in T/A-Type Vektoren möglich.

Durch die Orientierung der genspezifischen Primer ist es mit dieser Methode möglich, Sequenzinformationen in beide Richtungen (upstream und downstream) des bekannten DNA-Abschnitts zu erhalten. Mit einer beigefügten humanen genomischen DNA, einer humanen "GenomeWalker Bibliothek" und den Kontroll-Primern liegt somit eine Positiv-Kontrolle für alle drei Techniken vor, genomische DNA-Restriktion, Ligation der Adaptoren und "long-distance PCR" mit einer weiteren nested PCR.

Die genomische DNA-Restriktion sowie die Ligation der Adaptoren erfolgte gemäß dem Universal-GenomeWalker™-Kit User Manual (3/2000). Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die Temperatur-Programme wurden jedoch variiert und sind im folgenden aufgeführt. Zur Amplifizierung von großen DNA-Fragmenten wurde die Herculase® (Stratagene) eingesetzt und die PCR-Ansätze mit etwa 50 µl Mineralöl überschichtet.

**Tab. 50: Zusammensetzung der PCR-Ansätze; Universal-GenomeWalker™-System**

PCR, Universal-GenomeWalker™-System	
GenomeWalker-Bibliothek bzw. 1. PCR-Amplifikat	2 µl
Polymerase-Puffer (10x)	1/10 Vol.
dNTP's	je 0,2 mM
Sense- und Antisense-Primer	50 pmol
DNA-Polymerase	2,5 U
DMSO	5% (v/v)
Aq. demin.	ad 50 µl

**Tab. 51: Temperatur-Programm für die 1. PCR mit Primerpaar AP1 / GW-F1 bzw. AP1 / GW-R1**

1. PCR, Universal-GenomeWalker™-System		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	2 min
2	95°C	30 sec
3	70°C	4 min
4	95°C	30 sec
5	67°C	4 min
6	67°C	10 min

Die Schritte 2 bis 3 wurden 10-mal durchlaufen. Anschließend wurden die Schritte 4 bis 5 25-mal durchlaufen, wobei die Dauer von Schritt 5 um 10 sec pro Cyclus verlängert wurde (Zeitinkrement).

Für die zweite PCR wurden die Amplifikate der ersten Reaktion je nach Konzentration bis zu 1:50 mit Aq. demin verdünnt und 2 µl als Templat eingesetzt (Tab. 50). Folgendes Temperatur-Programm wurde verwendet, wobei die Schritte 2 bis 3 10-mal und anschließend die Schritte 4 bis 5 20-mal durchlaufen wurden.

**Tab. 52: Temperatur-Programm für die 2. PCR mit Primerpaar AP2/GW-F2 bzw. AP2/GW-R2**

2. PCR, Universal-GenomeWalker™-System		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	2 min
2	95°C	30 sec
3	70°C	4 min
4	95°C	30 sec
5	67°C	4 min
6	67°C	10 min

## 4.7. Ligationen

### Ligation von glatten Enden ('blunt-ends')

Zur Ligation von glatten Enden ('blunt-ends') wurde das SureClone™ Ligation Kit [Amersham Biosciences] eingesetzt, mit dessen Hilfe PCR-Fragmente kloniert wurden. Das Kit enthielt den mit *Sma* I [CCC/GGG] linearisierten Klonierungsvektor pUC 18, dessen blunt-ends 5'-dephosphoryliert vorlagen. Fragmente mit überstehenden 3'-Enden wurden gemäß der Herstellerangaben mittels des Klenow-Fragments der *E. coli*-Polymerase I entfernt und 5'-phosphoryliert (Blunting/Kinasing Reaction). Die Ligation in den Vektor pUC18-*Sma* I/BAP (Bovine Alkaline Phosphatase) erfolgte nach dem SureClone™-Protokoll, wobei Vektor / Insert-Verhältnisse von 1:5 gewählt wurden. 5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen verwendet.

### Ligation von überstehenden Enden ('sticky-ends')

Die Ligation erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit [Roche]. Die Ligationsansätze enthielten 1 x Ligationspuffer und 5 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von maximal 20 µl. Das Insert wurde in einem 5-fach-molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt und die Ligationen wurden 30 min bei RT inkubiert.

## 4.8. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* XL1-Blue und *E. coli* JM101 erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

## 4.9. Transformation von *E. coli*

Die Standardtransformation wurde weitgehend nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) durchgeführt. Hierzu wurden 100 bis 200 µl tiefgefrorene kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 bis 100 ng DNA aus dem Ligationsansatz versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 45 sec auf 42°C temperiert (Hitzeschock), 5 min auf Eis gestellt, mit vier Volumen LB-Medium versetzt und zur Regeneration 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 µl Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 4.10. Expression rekombinanter Gene

Die Expressionsklonierung des rekombinanten D-Amidase-Gens wurde über Ligation mit überstehenden Enden zwischen Vektor und Gen durchgeführt. Anhand von Primern mit integrierten Schnittstellen wurden in einer PCR überstehende Enden am Gen erzeugt. Dies ermöglichte zum einen die Klonierung des Gens in der gewünschten Orientierung, zum anderen konnte mit der Wahl der Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende des Gens ein geeigneter Abstand des Startcodons zum Promoter und damit zur Ribosomenbindungsstelle auf dem Plasmid eingestellt werden. Das D-Amidase-Gen wurde in das Expressionsplasmid pBTac2 ligiert und in *E. coli* JM101 transformiert.

Als Vorkultur wurden die transformierten *E. coli* JM101-Zellen in 3 ml LB<sub>amp</sub>-Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden hiermit 30 ml bzw. 200 ml Kulturen im Verhältnis 1:100 beimpft und bei 37°C und 150 Upm auf einem Schüttler kultiviert. Bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) zwischen 0,4 und 0,6 wurde mit 1 mM IPTG (β-D-Isopropylthiogalaktosid) induziert und nach einer Expressionsdauer von weiteren 4 bis 6 h bei 30°C die Zellen geerntet. Nach Zellaufschluss konnte die Expression durch Aktivitätsnachweis der D-Amidase und SDS-PAGE von Rohextrakt und Zellpellet beurteilt werden.

## 4.11. Präparation von Plasmid-DNA

### Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979)

Zur Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zunächst in 100 µl Lösung A resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 200 µl Lösung B und 5-minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Durch Zugabe von 150 µl Lösung C und 15 min Inkubation auf Eis wurde die Lösung neutralisiert und die denaturierten Proteine gefällt, die anschließend durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 Upm abgetrennt wurden. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 260 µl 2-Propanol (70% (v/v)) und 30 min Inkubation bei -20°C gefällt. Die Abtrennung der DNA erfolgte durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 Upm. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) getrocknet und in 50 µl TE pH 8,0 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA) resuspendiert.

#### **Lösung A:**

50 mM Glucose  
10 mM EDTA  
25 mM Tris-HCl, pH 8,0  
100 µg/ml Rnase A, jeweils frisch zugefügt

**Lösung B:** 0,2 M NaOH  
1% SDS (w/v)

**Lösung C:** 3,0 M Natriumacetat, pH 4,8

Die so präparierte Plasmid-DNA eignete sich sowohl zur Restriktionsanalyse als auch zur Präparation von Insert-DNA für Ligationen.

### **Präparation mittels der Plasmid mini/midi prep Kits [Qiagen]**

Plasmid-DNA, die für eine Sequenzierung oder für Ligationen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des Plasmid-Kits [Qiagen] präpariert. Die Methode beruht in einer modifizierten Form auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) und anschließender Anionenaustausch-Chromatographie. Für Mini-, bzw. Midi-Präparationen wurden folgende Kulturvolumina (LB<sub>amp</sub>-Medium) für die Übernachtskulturen verwendet.

**Tab. 53: Verwendete Kulturvolumina für Plasmidpräparationen**

<b>Plasmid</b>	<b>Mini-Präparation</b>	<b>Midi-Präparation</b>
high copy plasmid	5 ml	25 ml
low copy plasmid	25 ml	100 ml

Die Durchführung der Präparation erfolgte gemäß dem Qiagen Plasmid Handbook. Allerdings wurde die Plasmid-DNA-Fällung mit 2-Propanol bei 15°C durchgeführt, um eine Kopräzipitation von Salzen zu vermeiden. Die DNA wurde zweimal mit 70% (v/v) Ethanol bei RT gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und für die Sequenzierung in Aq. demin. (Millipore) aufgenommen.

## **4.12. DNA-Restriktion**

Zu analytischen Zwecken wurden 0,5 bis 1 µg DNA mit 1 bis 5 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 bis 2 h unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Pufferzusammensetzung, Temperatur) inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz oder ein Aliquot davon auf ein Agarosegel aufgetragen und somit die Qualität und Vollständigkeit der enzymatischen Spaltung überprüft. Bei präparativen Restriktionsanalysen wurde der gesamte Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und die gewünschten Fragmente nach der Trennung aus dem Gel isoliert.

## VI. Literaturverzeichnis

- [1] Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. (1996)  
1,2-Amino Alcohols and Their Heterocyclic Derivatives as Chiral Auxiliaries in Asymmetric Synthesis.  
Chem. Rev. 96, 835-876
- [2] Ambler, R. P.; Auffret, A. D.; Clarke, P. H. (1987)  
The amino acid sequence of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*.  
FEBS Lett. 215, 285-290
- [3] Arnold, F. H. (2001)  
Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design.  
Nature 409, 253-257
- [4] Asano, Y.; Tani, Y.; Yamada, H. (1980)  
A New Enzyme Nitrile Hydratase Which Degrades Acetonitrile in Combination with Amidase.  
Agric. Biol. Chem. 44, 2251-2252
- [5] Asano, Y.; Tachibana, M.; Tani, Y.; Yamada, H. (1982)  
Microbial-Degradation of Nitrile Compounds: 6. Purification and Characterization of Amidase Which Participates in Nitrile Degradation.  
Agric. Biol. Chem. 46, 1175-1181
- [6] Asano, Y.; Nakazawa, A.; Endo, K. (1987)  
Novel Phenylalanine Dehydrogenases from *Sporosarcina-Ureae* and *Bacillus-Sphaericus* - Purification and Characterization.  
J. Biol. Chem. 262, 10346-10354
- [7] Asano, Y.; Mori, T.; Hanamoto, S.; Kato, Y.; Nakazawa, A. (1989a)  
A new D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi*.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 162, 470-474
- [8] Asano, Y.; Nakazawa, A.; Kato, Y.; Kondo, K. (1989b)  
Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*.  
J. Biol. Chem. 264, 14233-14239
- [9] Asano, Y.; Kato, Y.; Yamada, A.; Kondo, K. (1992)  
Structural similarity of D-aminopeptidase to carboxypeptidase DD and beta-lactamases.  
Biochemistry 31, 2316-2328
- [10] Asano, Y.; Komeda, T.; Yamada, H. (1993)  
Microbial-Production of Theobromine from Caffeine.  
Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 1286-1289
- [11] Asano, Y. (1998)  
Japanese Screening Approach: Selection of an Opine Dehydrogenase and Alkaline D-Peptidase.  
In: New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysis. Kieslich, K.; van der Beck, C. P.; de Bondt, J. A. M.; van den Tweel, W. J. J. (eds.), Elsevier Science B.V.

- [12] Asano, Y.; Lubbehusen, T. L. (2000)  
Enzymes acting on peptides containing D-amino acid.  
J. Biosci. Bioeng. 89, 295-306
- [13] Bandyopadhyay, A. K.; Nagasawa, T.; Asano, Y.; Fujishiro, K.; Tani, Y.; Yamada, H. (1986)  
Purification and Characterization of Benzonitrilases from *Arthrobacter* Sp Strain J-1.  
Appl. Environ. Microbiol. 51, 302-306
- [14] Becker, H. D.; Min, B.; Jacobi, C.; Racznik, G.; Pelaschier, J.; Roy, H.; Klein, S.; Kern, D.; Soll, D. (2000)  
The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA(Asn) amidotransferase can also generate Gln-tRNA(Gln).  
FEBS Lett. 476, 140-144
- [15] Beilen, v. J. B.; Panke, S.; Lucchini, S.; Franchini, A. G.; Röthlisberger, M.; Witholt, B. (2001)  
Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene Clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes.  
Microbiology 147, 1621-1630
- [16] Bergmeyer, H. U.; Beutler, H.-O. (1985)  
Ammonia. in: Methods of Enzymatic Analysis.  
Bergmeyer, H. U. (eds.), VCH-Verlag, Weinheim, 454-461.
- [17] Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523
- [18] Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987)  
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.  
Electrophoresis 8, 93-99
- [19] Bommarius, A. S.; Schwarm, M.; Stingl, K.; Kottenhahn, M.; Huthmacher, K.; Drauz, K. (1995)  
Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine.  
Tetrahedron Asymmetry 6, 2851-2888
- [20] Bommarius, A.; Schwarm, M.; Drauz, K. (2001)  
Comparison of Different Chemoenzymatic Process Routes to Enantiomerically Pure Amino Acids.  
Chimia 55, 50-59
- [21] Bork, P.; Koonin, E. V. (1994)  
A new family of carbon-nitrogen hydrolases.  
Protein Science 3, 1344-1346
- [22] Boshoff, H. I.; Mizrahi, V. (1998)  
Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*.  
J. Bac. 180, 5809-5814
- [23] Boyer, P. D. (1954)  
Spectrophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials.  
J. Am. Chem. Soc. 76, 4331-4337

- [24] Bradford, M. M. (1976)  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Anal. Biochem.* 72, 248-254
- [25] Brückner, H.; Wittner, R.; Godel, H. (1991)  
Fully Automated High-Performance Liquid Chromatographic Separation of DL-Amino Acids Derivatized with o-Phtaldialdehyde together with *N*-Isobutyryl-Cysteine. Applications to Food Samples.  
*Chromatographia* 32, 383-388
- [26] Cavallini, D.; Demarco, C.; Dupre, S. (1968)  
Luminol Chemiluminescence Studies of Oxidation of Cysteine and Other Thiols to Disulfides.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 124, 18
- [27] Chebrou, H.; Bigey, F.; Arnaud, A.; Galzy, P. (1996a)  
Amide metabolism: a putative ABC transporter in *Rhodococcus* sp. R312.  
*Gene* 182, 215-218
- [28] Chebrou, H.; Bigey, F.; Arnaud, A.; Galzy, P. (1996b)  
Study of the amidase signature group.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1298, 285-293
- [29] Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. (1982)  
Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers.  
*J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294-7299
- [30] Chen, G.; Edwards, T.; D'Souza V, M.; Holz, R. C. (1997)  
Mechanistic studies on the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*: a two-metal ion mechanism for peptide hydrolysis.  
*Biochemistry* 36, 4278-4286
- [31] Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. (1995)  
Probing Protein-Structure and Function with an Expanded Genetic-Code.  
*Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 34, 621-633
- [32] Cowan, D.; Cramp, R.; Pereira, R.; Graham, D.; Almatawah, Q. (1998)  
Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes.  
*Extremophiles* 2, 207-216
- [33] Davis, D. H.; Doudoroff, M.; Stanier, R. Y.; Mandel, M. (1969)  
Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.* 19, 375-390
- [34] Drauz, K.; Waldmann, H. (1995)  
Enzyme catalysis in organic synthesis.  
VCH-Verlag, Weinheim.
- [35] Duthaler, R. O. (1994)  
Recent developments in the stereoselective synthesis of  $\alpha$ -aminoacids.  
*Tetrahedron* 50, 1539-1650

- [36] Endo, I.; Nojiri, M.; Tsujimura, M.; Nakasako, M.; Nagashima, S.; Yohda, M.; Odaka, M. (2001)  
Fe-type nitrile hydratase.  
J. Inorg. Biochem. 83, 247-253
- [37] Endo, T.; Watanabe, I. (1989)  
Nitrile Hydratase of Rhodococcus Sp N-774 - Purification and Amino-Acid Sequences.  
FEBS Letters 243, 61-64
- [38] Faber, K. (1997)  
Biotransformation in organic chemistry: a textbook.  
Springer-Verlag, Berlin
- [39] Fallon, R. D.; Stieglitz, B.; Turner, I. (1997)  
A Pseudomonas putida capable of stereoselective hydrolysis of nitriles.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 156-161
- [40] Fotheringham, I. (2000)  
Engineering biosynthetic pathways: new routes to chiral amino acids.  
Curr. Opin. Chem. Biol. 4, 120-124
- [41] Fusetani, N.; Matsunaga, S. (1993)  
Bioactive Sponge Peptides.  
Chem. Rev. 93, 1793-1806
- [42] Godtfredsen, S. E.; Kim, C.; Kjeld, I.; Hermes, H. F.; van Balken, J. A.; Meijer, E. M. (1988)  
EP 0 307 023.
- [43] Gomi, K.; Kitamoto, K.; Kumagai, C. (1991)  
Cloning and Molecular Characterization of the Acetamidase- Encoding Gene (Amds) from Aspergillus-Oryzae.  
Gene 108, 91-98
- [44] Graaf de, A. A.; Eggeling, L.; Sahm, H. (2001)  
Metabolic Engineering for L-Lysine Production by Corynebacterium glutamicum.  
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 73, 9-29
- [45] Hanahan, D. (1983)  
Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids.  
J. Mol. Biol. 166, 557
- [46] Hayashi, T.; Yamamoto, K.; Matsuo, A.; Otsubo, K.; Muramatsu, S.; Matsuda, A.; Komatsu, K. (1997)  
Characterization and cloning of an enantioselective amidase from Comamonas acidovorans KPO-2771-4.  
J. Ferm. Bioeng. 83, 139-145
- [47] Hermes, H. F.; Peeters, W. P.; Peters, P. J. H. (1990)  
EP 0 383 403.
- [48] Hermes, H. F. M.; Sonke, T.; Peters, P. J. H.; Vanbalken, J. A. M.; Kamphuis, J.; Dijkhuizen, L.; Meijer, E. M. (1993)  
Purification and Characterization of an L-Aminopeptidase from Pseudomonas-Putida Atcc 12633.  
Appl. Environ. Microbiol. 59, 4330-4334

- [49] Higgins, C. F. (2001)  
ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview.  
Res. Microbiol. 152, 205-210
- [50] Honda, J.; Nagamune, T.; Teratani, Y.; Hirata, A.; Sasabe, H.; Endo, I. (1992)  
Photosensitive Nitrile Hydratase from *Rhodococcus* Sp N-771 - Structure and Function of the Enzyme.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 672, 29-36
- [51] Hosie, A. H. F.; Allaway, D.; Jones, M. A.; Walshaw, D. L.; Johnston, A. W. B.; Poole, P. S. (2001a)  
Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake.  
Mol. Microbiol. 40, 1449-1459
- [52] Hosie, A. H. F.; Poole, P. S. (2001b)  
Bacterial ABC transporters of amino acids.  
Res. Microbiol. 152, 259-270
- [53] Huang, W.; Jia, J.; Cummings, J.; Nelson, M.; Schneider, G.; Lindqvist, Y. (1997)  
Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold.  
Structure 5, 691-699
- [54] Hummel, W.; Kula, M. R. (1989)  
Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeasts.  
J. Microbiol. Meth. 9, 201-209
- [55] Hummel, W.; Weiss, N.; Kula, M. R. (1984)  
Isolation and Characterization of a Bacterium Possessing L- Phenylalanine Dehydrogenase-Activity.  
Arch. Microbiol. 137, 47-52
- [56] Jallageas, J. C.; Fradet, H.; Bui, K.; Maestracci, M.; Thiery, A.; Arnaud, A.; Galzy, P. (1984)  
Development of an assay method for cyanide, alpha-aminonitriles and alpha-hydroxynitriles for the study of the biological hydrolysis of these compounds.  
Analyst 109, 1439-1442
- [57] Joeres, U. (1992)  
L-Carnitin-Amidase: Ein neues Enzym zur Herstellung von L-Carnitin aus DL-Carnitinamid.  
Dissertation, Universität Düsseldorf
- [58] Joeres, U.; Kula, M. R. (1994)  
Screening for a Novel Enzyme Hydrolyzing L-Carnitine Amide.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 599-605
- [59] Johnson, J. S.; Evans, D. A. (2000)  
Chiral bis(oxazoline) copper(II) complexes: Versatile catalysts for enantioselective cycloaddition, aldol, Michael, and carbonyl ene reactions.  
Accounts Chem. Res. 33, 325-335
- [60] Kamphuis, J.; Boesten, W. H.; Broxterman, Q. B.; Hermes, H. F.; van Balken, J. A.; Meijer, E. M.; Schoemaker, H. E. (1990)  
New developments in the chemo-enzymatic production of amino acids.  
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 42, 133-186

- [61] Kataoka, M.; Shimizu, K.; Sakamoto, K.; Yamada, H.; Shimizu, S. (1995)  
Optical Resolution of Racemic Pantolactone with a Novel Fungal Enzyme,  
Lactonohydrolase.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 974-977
- [62] Kato, Y.; Yamagishi, J.; Asano, Y. (1995)  
Maleate cis-trans isomerase from *Arthrobacter* sp TPU 5446.  
J. Ferm. Bioeng. 80, 610-612
- [63] Khyse-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. Meth. 10, 203-209
- [64] Klages, U., .Weber, A. (1988)  
DE 3 816 063 A1.
- [65] Knoop, F.; Landmann, G. (1914)  
Synthese des Pseudoleucins.  
Z. physiol. Chem. 89, 157-159
- [66] Kobayashi, M.; Nishiyama, M.; Nagasawa, T.; Horinouchi, S.; Beppu, T.; Yamada, H.  
(1991)  
Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-  
containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous* J1.  
Biochim. Biophys. Acta. 1129, 23-33
- [67] Kobayashi, M.; Nagasawa, T.; Yamada, H. (1992)  
Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over.  
Trends Biotechnol. 10, 402-408
- [68] Kobayashi, M.; Fujiwara, Y.; Goda, M.; Komeda, H.; Shimizu, S. (1997)  
Identification of active sites in amidase: evolutionary relationship between amide bond-  
and peptide bond-cleaving enzymes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11986-11991
- [69] Kobayashi, M.; Shimizu, S. (1998)  
Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology.  
Nat. Biotechnol. 16, 733-736
- [70] Komeda, H.; Asano, Y. (2000)  
Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the D-  
stereospecific amino-acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3.  
Eur. J. Biochem. 267, 2028-2035
- [71] Kottenhahn, M.; Drauz, K. (1994)  
Chiral Amino Acids: A versatile tool in the synthesis of pharmaceuticals and fine  
chemicals.  
In: Chemical Specialties USA, Chicago
- [72] Krieg, L. S. (1997)  
Suche und Bewertung einer spezifischen Aminosäure-Amidase.  
Diplomarbeit, Universität Bonn

- [73] Krix, G.; Bommarius, A. S.; Drauz, K.; Kottenhahn, M.; Schwarm, M.; Kula, M. R. (1997)  
Enzymatic reduction of alpha-keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids.  
J. Biotechnol. 53, 29-39
- [74] Labahn, J.; Neumann, S.; Granzin, J.; Büldt, G.; Kula, M.-R. (submitted)  
An alternative mechanism for amidase signature enzymes.  
J. Mol. Biol.
- [75] Laemmli, U. K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227, 680-685
- [76] Layh, N.; Hirrlinger, B.; Stolz, A.; Knackmuss, H. J. (1997)  
Enrichment strategies for nitrile-hydrolysing bacteria.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 668-674
- [77] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (2000)  
Brock Biology of Microorganisms.  
Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- [78] Maestracci, M.; Bui, K.; Thiery, A.; Arnaud, A.; Galzy, P. (1988)  
The amidases from a *Brevibacterium* strain: study and applications.  
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 36, 67-115
- [79] Martinkova, L.; Kren, V. (2002)  
Nitrile- and Amide-converting Microbial Enzymes: Stereo-, Regio- and Chemoselectivity.  
Biocatal. Biotrans. 20, 73-93.
- [80] May, O.; Nguyen, P. T.; Arnold, F. H. (2000)  
Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine.  
Nat. Biotechnol. 18, 317-320
- [81] Mayaux, J. F.; Cerebelaud, E.; Soubrier, F.; Faucher, D.; Petre, D. (1990)  
Purification, cloning, and primary structure of an enantiomer-selective amidase from *Brevibacterium* sp. strain R312: structural evidence for genetic coupling with nitrile hydratase.  
J. Bacteriol. 172, 6764-6773
- [82] Mayaux, J. F.; Cerebelaud, E.; Soubrier, F.; Yeh, P.; Blanche, F.; Petre, D. (1991)  
Purification, cloning, and primary structure of a new enantiomer-selective amidase from a *Rhodococcus* strain: structural evidence for a conserved genetic coupling with nitrile hydratase.  
J. Bacteriol. 173, 6694-6704
- [83] Mori, H.; Shibasaki, T.; Uozaki, Y.; Ochiai, K.; Ozaki, A. (1996)  
Detection of novel proline 3-hydroxylase activities in *Streptomyces* and *Bacillus* spp by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline.  
Appl. Environ. Microbiol. 62, 1903-1907
- [84] Morin, A.; Hummel, W.; Kula, M. R. (1987)  
Enrichment and Selection of Hydantoinase-Producing Micoorganisms.  
J. Gen. Micobiol. 133, 1201-1207

- [85] Nagasawa, T.; Ryuno, K.; Yamada, H. (1986)  
Nitrile Hydratase of *Brevibacterium*-R312 - Purification and Characterization.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 1305-1312
- [86] Nagasawa, T.; Takeuchi, K.; Yamada, H. (1991)  
Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1.  
*Eur. J. Biochem.* 196, 581-589
- [87] Nagashima, S.; Nakasako, M.; Dohmae, N.; Tsujimura, M.; Takio, K.; Odaka, M.; Yohda, M.; Kamiya, N.; Endo, I. (1998)  
Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms.  
*Nat. Struct. Biol.* 5, 347-351
- [88] Nakasako, M.; Odaka, M.; Yohda, M.; Dohmae, N.; Takio, K.; Kamiya, N.; Endo, I. (1999)  
Tertiary and quaternary structures of photoreactive Fe-type nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771: roles of hydration water molecules in stabilizing the structures and the structural origin of the substrate specificity of the enzyme.  
*Biochemistry* 38, 9887-9898
- [89] Nastopoulos, V.; Vallone, B.; Politi, L.; Scotto D'Abusco, A.; Scandurra, R.; Tsernoglou, D. (2001)  
Crystallization and X-ray diffraction measurements of a thermophilic archaeal recombinant amidase from *Sulfolobus solfataricus* MT4.  
*Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 1036-1037
- [90] Neumann, S.; Granzin, J.; Kula, M. R.; Labahn, J. (2002)  
Crystallization and preliminary X-ray data of the recombinant peptide amidase from *Stenotrophomonas maltophilia*.  
*Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 333-335
- [91] Novo, C.; Tata, R.; Clemente, A.; Brown, P. R. (1995)  
*Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys166 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism.  
*FEBS Lett.* 367, 275-279
- [92] Ogawa, J.; Shimizu, S. (1997)  
Diversity and versatility of microbial hydantoin-transforming enzymes.  
*J. Mol. Cat. B-Enzymatic* 2, 163-176
- [93] Ogawa, J.; Shimizu, S. (1999)  
Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods.  
*Trends Biotechnol.* 17, 13-21
- [94] Ozaki, A.; Kawasaki, H.; Yagasaki, M.; Hashimoto, Y. (1992)  
Enzymatic Production of D-Alanine from DL-Alaninamide by Novel D-Alaninamide Specific Amide Hydrolase.  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1980-1984
- [95] Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. (2000)  
Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family.  
*J. Biol. Chem.* 275, 19177-19184

- [96] Pfaltz, A (1999)  
Cyclopropanation and C-H Insertion with Cu. in: *Comprehensive Asymmetric Catalysis*.  
Eds.: Jacobsen, E. N.; Pfaltz, A.; Yamamoto, H.;  
Springer-Verlag, Berlin, Vol. 2, 513-518
- [97] Pietzsch, M.; Syldatk, C.; Wagner, F. (1992)  
A New Racemase for 5-Monosubstituted Hydantoins.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 672, 478-483
- [98] Powell, K. A.; Ramer, S. W.; del Cardayre, S. B.; Stemmer, W. P. C.; Tobin, M. B.;  
Longchamp, P. F.; Huisman, G. W. (2001)  
Directed evolution and biocatalysis.  
*Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 40, 3948-3959
- [99] Rabasseda, X.; Silvestre, J.; Castaner, J. (1999)  
BMS-232632: Anti-HIV, HIV-1 Protease Inhibitor.  
*Drugs of the Future* 24, 375-380
- [100] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989)  
Molecular cloning. A laboratory manual.  
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- [101] Schalk, C.; Remy, J. M.; Chevrier, B.; Moras, D.; Tarnus, C. (1992)  
Rapid purification of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase: crystallization and  
preliminary X-ray data.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 294, 91-97
- [102] Schellenberger, A.; Fischer, G.; Hübner, G.; Ulbrich, R. (1989)  
Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme.  
Springer-Verlag, Berlin.
- [103] Schipper, D. (1983)  
The Revised Structure of Botromycin A2.  
*J. Antibiotics* 36, 1076-1077
- [104] Schlegel, H. G. (1985)  
Allgemeine Mikrobiologie.  
Thieme Verlag, Stuttgart.
- [105] Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. (2001)  
Industrial biocatalysis today and tomorrow.  
*Nature* 409, 258-268
- [106] Schöllkopf, U.; Neubauer, H. J. (1982)  
Asymmetric Syntheses Via Heterocyclic Intermediates .12. Enantioselective Synthesis  
of (R)-Alpha-Amino Acids Using Tert- Leucine as Chiral Auxiliary Reagent.  
*Synthesis* 10, 861-864.
- [107] Shimizu, S.; Ogawa, J.; Kataoka, M.; Kobayashi, M. (1997)  
Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically  
useful compounds.  
*Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58, 45-87
- [108] Short, J. M. (1997)  
Recombinant approaches for accessing biodiversity.  
*Nat. Biotechnol.* 15, 1322-1323

- [109] Siebert, P. D.; Chenchik, A.; Kellogg, D. E.; Lukyanov, K. A.; Lukyanov, S. A. (1995)  
An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA.  
*Nucleic. Acids Res.* 23, 1087-1088
- [110] Sigman, M. S.; Vachal, P.; Jacobsen, E. N. (2000)  
A general catalyst for the asymmetric Strecker reaction.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 1279-1281
- [111] Silman, N. J.; Carver, M. A.; Jones, C. W. (1991)  
Directed Evolution of Amidase in *Methylophilus-Methylotrophus* - Purification and Properties of Amidases from Wild-Type and Mutant Strains.  
*J. Gen. Microbiol.* 137, 169-178
- [112] Skouloubris, S.; Labigne, A.; De Reuse, H. (2001)  
The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues.  
*Mol. Microbiol.* 40, 596-609
- [113] Sonke, T.; Kaptein, B.; Boesten, W. H. J.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E.; Kamphuis, J.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Rutjes, F. P. J. T. (2000)  
Aminoamidase-Catalyzed Preparation and Further Transformations of Enantiopure  $\alpha$ -Hydrogen- and  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids.  
In: *Stereoselective Biocatalysis*. Patel, R. N. (eds.), Marcel Dekker, New York, 23-58.
- [114] Soubrier, F.; Levy-Schil, S.; Mayaux, J. F.; Petre, D.; Arnaud, A.; Crouzet, J. (1992)  
Cloning and primary structure of the wide-spectrum amidase from *Brevibacterium* sp. R312: high homology to the amiE product from *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Gene* 116, 99-104
- [115] Stelkes-Ritter, U.; Beckers, G.; Bommarius, A.; Drauz, K.; Gunther, K.; Kottenhahn, M.; Schwarm, M.; Kula, M. R. (1997)  
Kinetics of peptide amidase and its application for the resolution of racemates.  
*Biocat. Biotrans.* 15, 205-219
- [116] Stolz, A.; Trott, S.; Binder, M.; Bauer, R.; Hirrlinger, B.; Layh, N.; Knackmuss, H.-J. (1998)  
Enantioselective nitrile hydratases and amidases from different bacterial isolates.  
*J. Mol. Cat. B-Enzymatic* 5, 137-141
- [117] Straathof, A. J. J.; Jongejan, J. A. (1997)  
The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction.  
*Enzyme Microb. Technol.* 21, 559-571
- [118] Sugiura, Y.; Kuwahara, J.; Nagasawa, T.; Yamada, H. (1987)  
Nitrile Hydratase - the 1st Nonheme Iron Enzyme with a Typical Low-Spin Fe(III)-Active Center.  
*J. Am. Chem. Soc.* 109, 5848-5850
- [119] Thein, S. L.; Wallace, R. B. (1988)  
The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders.  
In: *Human genetic diseases: a practical approach* (Davis, K. E., ed.). IRL Press, Hemdon, Virginia.

- [120] Verseck, S.; Bommarius, A.; Kula, M. R. (2001)  
Screening, overexpression and characterization of an N-acylamino acid racemase from *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida*.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 354-361
- [121] Vogel, A. I. (1989)  
Vogel's textbook of quantitative chemical analysis.  
John Wiley & Sons, Inc., New York, 679-698.
- [122] Wagner, R. (1969)  
Neue Aspekte zur Stickstoffanalytik in der Wasserchemie.  
VCH-Verlag, Weinheim
- [123] Walshaw, D. L.; Lowthorpe, S.; East, A.; Poole, P. S. (1997)  
Distribution of a sub-class of bacterial ABC polar amino acid transporter and identification of an N-terminal region involved in solute specificity.  
*FEBS Lett.* 414, 397-401
- [124] Wandrey, C.; Flaschel, E. (1979)  
Process Development and Economic Aspects in Enzyme Engineering. Acylase L-methionine System.  
*Adv. Biochem. Engineering.* Fiechter, A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 12, 147-218
- [125] Wang, E. T.; van Berkum, P.; Beyene, D.; Sui, X. H.; Dorado, O.; Chen, W. X.; Martinez-Romero, E. (1998)  
*Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 687-699
- [126] Whitesides, G. M.; Wong, C. H. (1985)  
Enzymes as Catalysts in Synthetic Organic-Chemistry.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 617-638
- [127] Wichmann, R.; Wandrey, C.; Buckmann, A. F.; Kula, M. R. (1981)  
Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous Nad(H) Regeneration.  
*Biotechnol. Bioeng.* 23, 2789-2802
- [128] Wiese, A.; Pietzsch, M.; Syldatk, C.; Mattes, R.; Altenbuchner, J. (2000)  
Hydantoin racemase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747: heterologous expression, purification and characterization.  
*J. Biotechnol.* 80, 217-230
- [129] Willems, A.; Deley, J.; Gillis, M.; Kersters, K. (1991)  
Comamonadaceae, a New Family Encompassing the Acidovorans Ribosomal-Rna Complex, Including *Variovorax-Paradoxus* Gen-Nov, Comb-Nov, for *Alcaligenes-Paradoxus* (Davis 1969).  
*Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 445-450
- [130] Wilms, B.; Wiese, A.; Syldatk, C.; Mattes, R.; Altenbuchner, J. (2001)  
Development of an *Escherichia coli* whole cell biocatalyst for the production of L-amino acids.  
*J. Biotechnol.* 86, 19-30

- [131] Wolf, A.; Shaw, E. W.; Oh, B. H.; De Bondt, H.; Joshi, A. K.; Ames, G. F. (1995)  
Structure/function analysis of the periplasmic histidine-binding protein. Mutations decreasing ligand binding alter the properties of the conformational change and of the closed form.  
J. Biol. Chem. 270, 16097-16106
- [132] Wolf, L. B.; Sonke, T.; Tjen, K.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E.; Rutjes, F. (2001)  
A biocatalytic route to enantiomerically pure unsaturated alpha-H-alpha-amino acids.  
Adv. Synth. Catal. 343, 662-674
- [133] Wu, S.; Fallon, R. D.; Payne, M. S. (1998)  
Cloning and nucleotide sequence of amidase gene from *Pseudomonas putida*.  
DNA Cell. Biol. 17, 915-920
- [134] Yagasaki, M.; Ozaki, A. (1998)  
Industrial biotransformations for the production of D-amino acids.  
J. Mol. Cat. B-Enzymatic 4, 1-11
- [135] Yamada, H.; Asano, Y.; Hino, T.; Tani, Y. (1979)  
Microbial Utilization of Acrylonitrile.  
J. Ferm. Technol. 57, 8-14
- [136] Yamada, T.; Palm, C. J.; Brooks, B.; Kosuge, T. (1985)  
Nucleotide-Sequences of the *Pseudomonas-Savastanoi* Indoleacetic-Acid Genes Show Homology with *Agrobacterium-Tumefaciens* T-DNA.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 6522-6526
- [137] Yamada, H.; Shimizu, S. (1988)  
Microbial and Enzymatic Processes for the Production of Biologically and Chemically Useful Compounds.  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27, 622-642
- [138] Yamada, H.; Kobayashi, M. (1996)  
Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide.  
Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 1391-1400
- [139] Yamamoto, K.; Otsubo, K.; Matsuo, A.; Hayashi, T.; Fujimatsu, I.; Komatsu, K. (1996)  
Production of R(-)-ketoprofen from an amide compound by *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4.  
Appl. Environ. Microbiol. 62, 152-155
- [140] Yet, L. (2001)  
Recent developments in catalytic asymmetric Strecker-type reactions.  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40, 875-877
- [141] Zhao, H.; Arnold, F. H. (1997)  
Combinatorial Protein Design: Strategies for Screening Protein Libraries.  
Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 480-485.
- [142] Zimmermann, T.; Robins, K.; Birch, O. M.; Boehlen, E. (1995)  
US-Patent 5 427 934: Genetic engineering process for the production of S-2,2-Dimethyl-cyclopropane-carboxamide by microorganisms.

## VII. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mögliche Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren	4
Abb. 2: Tertiär-Leucin (Tle)	5
Abb. 3: L-tertiär-Leucinol als Baustein in Bis(Oxazolin)-Liganden	6
Abb. 4: L-Tle als Baustein in einem HIV-Protease-Inhibitor	6
Abb. 5: Katalytisch-asymmetrische Strecker-Reaktion für D-Tle	7
Abb. 6: Dehydrogenase-Verfahren zur Synthese von L-Tle	8
Abb. 7: Hydantoinase-Verfahren zur Synthese von D-Tle	8
Abb. 8: Reaktionsschema der Amidase	9
Abb. 9: Homologie von Vertretern der "Amidase Signature"-Familie	11
Abb. 10: Reaktionsschema der zweistufigen Hydrolyse von Nitrilen mit einem Nitrilhydratase/Amidase-System	12
Abb. 11: Genstruktur verschiedener Nitrilhydratase/Amidase-Systeme	12
Abb. 12: Koordination des Eisenions einer Fe-Typ Nitrilhydratase	13
Abb. 13: Für Nitrilhydratasen vorgeschlagener Katalysemechanismus	14
Abb. 14: DSM-Verfahren zur Gewinnung enantiomerenreiner Aminosäuren	15
Abb. 15: Mögliche Racematspaltungen von DL-Tle-NH <sub>2</sub> mit einer enantioselektiven D- oder L-Amidase	17
Abb. 16: Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
Abb. 17: Flussdiagramm des Screenings mit Anreicherungskulturen	21
Abb. 18: Wachstumskurve von <i>Variovorax paradoxus</i> in Minimalmedium M-2	30
Abb. 19: Volumen- und spez. Aktivität in Abhängigkeit vom OD-Wert	31
Abb. 20: Verlauf der optischen Dichte dreier Fermentationen im Vergleich zur Schüttelkolbenkultur	33
Abb. 21: Restaktivität und Restproteingehalt im Überstand nach Bindung an Q-Sepharose bei pH-Werten zwischen 6 und 8	36
Abb. 22: Elutionsprofil der optimierten IEC mit Beginn des Gradienten	37
Abb. 23: SDS-PAGE (12,5%) der IEC	38
Abb. 24: Elutionsprofil der optimierten HIC mit Beginn des Gradienten	40
Abb. 25: SDS-PAGE (12,5%) der HIC	40
Abb. 26: Michaelis-Menten-Plot für 0,2 bis 200 mM DL-Tle-NH <sub>2</sub>	50
Abb. 27: Michaelis-Menten-Plot für D-Phe-NH <sub>2</sub> und D-Leu-NH <sub>2</sub>	51
Abb. 28: Enantioselektivität für D-Tle in Abhängigkeit vom Umsatz	52
Abb. 29: Enantioselektivität für D-Val, D-Leu und D-Phe in Abhängigkeit vom Umsatz	54
Abb. 30: Temperaturoptimum der D-Amidase	55
Abb. 31: Arrhenius-Diagramm der D-Amidase	56
Abb. 32: pH-Optimum der D-Amidase	57
Abb. 33: Reaktion der Enzym-SH-Gruppen mit den Quecksilberbenzoaten	62
Abb. 34: Ergebnis des N-terminalen Sequenzvergleichs der D-Amidase	63
Abb. 35: Homologie von ausgewählten Enzymen der "Amidase Signature"-Familie	64

Abb. 36: Agarosegel (0,5%) zur Analyse der präparierten genomischen DNA aus <i>Variovorax paradoxus</i>	65
Abb. 37: Agarosegelanalyse der PCR mit 0,5 kb Fragment des D-Amidase-Gens	66
Abb. 38: Agarosegel (0,5%) zur Analyse der "GenomeWalker Bibliothek"	67
Abb. 39: Schematische Darstellung eines hypothetischen DNA-Fragments mit dem 509 bp D-Amidase-Fragment und endständigen Adaptoren aus der "GenomeWalker Bibliothek"	67
Abb. 40: Agarosegelanalyse der 1. PCR mit Primer AP1/GW-F1	68
Abb. 41: Präparatives Agarosegel der 2. PCR mit Primer AP2/GW-F2	68
Abb. 42: Präparatives Agarosegel der 2. PCR mit Primer AP2/GW-R2	69
Abb. 43: Restriktionsanalyse der positiven Klone aus der Klonierung des D-Amidase- Gens in pUC18	70
Abb. 44: Vektorkarte von pUC-AAH	71
Abb. 45: Gen- und daraus abgeleitete Proteinsequenz der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> , rekombinant in pUC-AAH/ <i>E. coli</i> XL1-Blue	74
Abb. 46: NuPAGE <sup>®</sup> Bis/Tris-Gel-Analyse (10%): Expression der recAAH in <i>E. coli</i> JM101	76
Abb. 47: Fermentation des rekombinanten <i>E. coli</i> JM101	77
Abb. 48: SDS-PAGE der Fermentationsproben	77
Abb. 49: Sequenzvergleich der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> mit den sechs ähnlichsten Enzymen	82
Abb. 50: Organisation des D-Amidase-Gens in <i>Variovorax paradoxus</i>	85
Abb. 51: Temperaturabhängigkeit der L-Amidase-Aktivität im Rohextrakt	88
Abb. 52: Abhängigkeit der Aktivität von der Zn <sup>2+</sup> -Konzentration im Enzymtest	89
Abb. 53: Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration DL-Tle-NH <sub>2</sub>	90
Abb. 54: SDS-PAGE (12,5%) zur Analyse der Reinigung mittels Hitzefällung	92
Abb. 55: Elutionsprofil der IEC mit Beginn des Gradienten	93
Abb. 56: SDS-PAGE (12,5%) der Hitzefällung und der IEC	94
Abb. 57: Elutionsprofil der HIC mit Beginn des Gradienten	95
Abb. 58: SDS-PAGE (12,5%) der HIC	96
Abb. 59: Bestimmung des Temperaturoptimums der L-Amidase	98
Abb. 60: Temperaturstabilität der L-Amidase in MES-Puffer bei 90, 80 und 70°C	99
Abb. 61: Blot von partiell gereinigten Enzymchargen der L-Amidase	102
Abb. 62: Weiterführende Arbeiten zur D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i>	109
Abb. 63: Eichgerade der Superdex G-200 PG	120
Abb. 64: Eichgerade zur Ammonium-Bestimmung mittels der Glutamat-Dehydrogenase	127
Abb. 65: Derivatisierung einer Aminosäure mit OPA/N-Isobutyryl-L-Cystein	129
Abb. 66: HPLC-Chromatogramme für 1 mM D-Tle (95% ee) + 1 mM DL-Tle-NH <sub>2</sub> und 1 mM DL-Tle + 20 mM DL-Tle-NH <sub>2</sub>	131
Abb. 67: Eichgerade für D- und L-Tle-Bestimmung mittels HPLC	132
Abb. 68: Schematische Darstellung des Universal-GenomeWalker <sup>™</sup> -Systems	143

## VIII. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Klassifizierung der Enzyme	2
Tab. 2:	Auswahl isolierter Enzyme durch Anreicherungs- und Anpassungsverfahren	3
Tab. 3:	Ergebnis der Identifizierung und Aktivitäten der D-Isolate	22
Tab. 4:	Identifizierung, Aktivitäten und Enantioselektivitäten der besten L-Isolate	23
Tab. 5:	Relative Aktivitäten der L-Isolate 38-2, L-4/3 und 18-3 im Rohextrakt und im PD-10-Eluat mit $\text{Me}^{2+}$ -Ionen im Vergleich zur Restaktivität im PD-10-Eluat ohne Zusätze	24
Tab. 6:	Spez. Akt. von 38-2, L-4/3 und 18-3 im PD-10-Eluat bei der geeignetsten $\text{Me}^{2+}$ -Konzentration	25
Tab. 7:	Enantioselektivitäten der L-Isolate 38-2, L-4/3 und 18-3 im PD-10 Eluat	26
Tab. 8:	Zusammenfassung des Screening-Verfahrens mit DL-Tle- $\text{NH}_2$	28
Tab. 9:	Ergebnisse der Fermentationen von <i>Variovorax paradoxus</i> mit Minimalmedium M-2	33
Tab. 10:	Ergebnisse eines IEC-Säulenlaufs	37
Tab. 11:	Ergebnisse eines optimierten HIC-Säulenlaufs	39
Tab. 12:	Zusammenfassung der Reinigung der D-Amidase	42
Tab. 13:	Vergleich der Reinigung der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> mit Amidasen aus <i>Comamonas acidovorans</i> und <i>Ochrobactrum anthropi</i>	43
Tab. 14:	Mögliche Enzymaktivierung durch Metallionen oder DTT	44
Tab. 15:	Restaktivität der D-Amidase mit verschiedenen Inhibitoren	45
Tab. 16:	Spez. Akt. für verschiedene Säureamide	46
Tab. 17:	Spez. Akt. der Amino- und $\alpha$ -Hydroxysäureamide	48
Tab. 18:	Spez. Akt. für acylierte Aminosäureamide	49
Tab. 19:	$K_M$ und $K_I$ -Werte für DL-Tle- $\text{NH}_2$ , D-Leu- $\text{NH}_2$ und D-Phe- $\text{NH}_2$	50
Tab. 20:	Enantioselektivität für D-Tle in Abhängigkeit vom Umsatz	51
Tab. 21:	Enantioselektivität für D-Tle in Abhängigkeit vom Umsatz	52
Tab. 22:	Enantioselektivitäten für D-Val, D-Leu und D-Phe	53
Tab. 23:	Verwendete Puffer zur Bestimmung des pH-Optimums	56
Tab. 24:	Auswahl von Substraten für die D-Amidase	59
Tab. 25:	Enantioselektivitäten der D-Amidase für ausgewählte Substrate	59
Tab. 26:	Vergleich der D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i> mit D-Amidasen bzw. D-Aminopeptidasen	61
Tab. 27:	PCR-Produkte nach 2. PCR, Universal-GenomeWalker™-System	69
Tab. 28:	Enzymaktivitäten der rekombinanten D-Amidase in <i>E. coli</i> JM 101	75
Tab. 29:	Fermentation von <i>E. coli</i> JM101 mit rekombinanter D-Amidase im Vergleich zur Fermentation von <i>Variovorax paradoxus</i>	78
Tab. 30:	Enzyme mit der größten Homologie zur D-Amidase aus <i>Variovorax paradoxus</i>	81

Tab. 31: Homologie der ORFs 1 bis 3 zu folgenden Proteinen	86
Tab. 32: Optimierter Enzymtest für die Aktivitätsbestimmung der L-Amidase	89
Tab. 33: Enzymaktivitäten und Proteingehalte im Überstand nach Hitzefällung	91
Tab. 34: Ergebnisse des IEC-Säulenlaufs und der anschließenden Ultrafiltration	93
Tab. 35: Ergebnisse des HIC-Säulenlaufs mit anschließender Ultrafiltration	95
Tab. 36: Zusammenfassung der partiellen Reinigung der L-Amidase	97
Tab. 37: Temperaturstabilität der L-Amidase; Halbwertszeit $\tau$ bei 70, 80 und 90°C	99
Tab. 38: Spez. Akt. der Aminosäureamide mit partiell gereinigter L-Amidase	100
Tab. 39: Enantioselektivitäten der L-Amidase in Abhängigkeit vom Umsatz mit DL-Tle-NH <sub>2</sub> , DL-Val-NH <sub>2</sub> und DL-Leu-NH <sub>2</sub> als Substrat	101
Tab. 40: Reinigung der D-Amidase	122
Tab. 41: Partielle Reinigung der L-Amidase	123
Tab. 42: Enzymtest für die Bestimmung einer Amidase-Aktivität	125
Tab. 43: Zusammensetzung des NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Assays	126
Tab. 44: Retentionszeiten der Enantiomere verschiedener Aminosäuren nach Derivatisierung mit OPA/IBLC und Elutionsprogramm Tle	130
Tab. 45: Zusammensetzung eines 12,5%igen Trenngels mit einem 4%igen Sammelgel	134
Tab. 46: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für genomische DNA oder Plasmid-DNA	140
Tab. 47: PCR-Programm für Fragment des D-Amidase-Gens mit Primerpaar AAH-N1 / AAH-C1	141
Tab. 48: PCR-Programm für gesamtes D-Amidase-Gen mit 92 bp vor Startcodon und 80 bp nach dem Stopcodon; Primerpaar AAH-K-N2 / AAH-K-C2	141
Tab. 49: PCR-Programm für die Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen mit Primerpaar AAH-N-EcoR I / AAH-C-Hind III	142
Tab. 50: Zusammensetzung der PCR-Ansätze; Universal-GenomeWalker™-System	144
Tab. 51: Temperatur-Programm für die 1. PCR mit Primerpaar AP1 / GW-F1 bzw. AP1 / GW-R1	144
Tab. 52: Temperatur-Programm für die 2. PCR mit Primerpaar AP2/GW-F2 bzw. AP2/GW-R2	144
Tab. 53: Verwendete Kulturvolumina für Plasmidpräparationen	147

## IX. Verzeichnis der Abkürzungen

AAH	Acylamid Amidohydrolase
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Akt.	Aktivität
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aq. demin.	entmineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
AS-NH <sub>2</sub>	Aminosäureamid
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celcius
ca.	circa
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitro-benzoesäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPF	Diisopropylfluorphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
E	enantiomeric ratio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	enantiomeric excess, Enantiomerenüberschuss
FF	fast flow
g	Gramm
gi	GenBank Identification
GPC	Gelpermeationschromatographie bzw. Gelfiltration
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HIV	Human Immundeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBDC	<i>N</i> -Isobutyryl-D-Cystein
IBLC	<i>N</i> -Isobutyryl-L-Cystein
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie
IPTG	β-D-Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante

$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
Kpi	Kaliumphosphat
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
Me	Metall
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mU	MilliUnit
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NHase	Nitrilhydratase
N-Quelle	Stickstoff-Quelle
OD	Optische Dichte
OPA	<i>ortho</i> -Pthaldialdehyd
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PCMB	" <i>p</i> -Chlormercuribenzoat", 4-Hydroxy-Quecksilberbenzoat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
$R_f$ -Wert	Retentionsfaktor
Rohex.	Rohextrakt
RT	Raumtemperatur
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
<i>tert</i>	tertiär
Tle	tertiär-Leucin
Tle-NH <sub>2</sub>	tertiär-Leucinamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vmax	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
z. B.	zum Beispiel



## 2. Codon Usage in *Variovorax paradoxus*

*Variovorax paradoxus* [gbbct]: 9 CDS's (3274 codons)

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: per thousand]

UUU F 0.31 11.0	UCU S 0.05 3.1	UAU Y 0.28 6.7	UGU C 0.12 0.9
UUC F 0.69 24.1	UCC S 0.17 10.4	UAC Y 0.72 17.1	UGC C 0.88 6.7
UUA L 0.00 0.3	UCA S 0.06 3.7	UAA * 0.22 0.6	UGA * 0.67 1.8
UUG L 0.16 15.6	UCG S 0.34 21.1	UAG * 0.11 0.3	UGG W 1.00 11.3
CUU L 0.14 13.4	CCU P 0.16 9.2	CAU H 0.36 8.2	CGU R 0.15 9.5
CUC L 0.23 22.3	CCC P 0.30 17.1	CAC H 0.64 14.7	CGC R 0.37 23.8
CUA L 0.03 2.7	CCA P 0.12 6.7	CAA Q 0.35 11.6	CGA R 0.13 8.2
CUG L 0.45 44.3	CCG P 0.42 24.1	CAG Q 0.65 22.0	CGG R 0.27 17.4
AUU I 0.24 13.7	ACU T 0.11 5.8	AAU N 0.20 4.9	AGU S 0.11 7.0
AUC I 0.71 40.6	ACC T 0.38 19.5	AAC N 0.80 19.5	AGC S 0.27 16.8
AUA I 0.05 3.1	ACA T 0.18 9.2	AAA K 0.23 6.7	AGA R 0.04 2.4
AUG M 1.00 24.4	ACG T 0.34 17.4	AAG K 0.77 22.3	AGG R 0.06 3.7
GUU V 0.11 8.9	GCU A 0.06 7.0	GAU D 0.40 20.8	GGU G 0.17 15.6
GUC V 0.39 32.4	GCC A 0.40 46.1	GAC D 0.60 31.8	GGC G 0.51 48.0
GUA V 0.09 7.6	GCA A 0.19 21.7	GAA E 0.43 20.5	GGA G 0.14 13.1
GUG V 0.41 34.2	GCG A 0.36 41.5	GAG E 0.57 26.9	GGG G 0.18 16.8

Coding GC 61.64% 1st letter GC 64.81% 2nd letter GC 46.67% 3rd letter GC 73.43%

Stand: Mai 2002 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>)

### 3. HPLC-Gradientenprogramme für Ala, Gln und His

#### Gradientenprogramm für Ala:

Fluss 1,0 ml/min	Zeit [min]	Laufmittel B [%]
	0	15
	15	21
	17	100
	20	100
	22	0
	32	0

Retentionszeiten: L-Ala: 12,9 min, D-Ala: 13,5 min, bei Derivatisierung mit OPA/IBLC

#### Gradientenprogramm für Gln und His:

Fluss 1,0 ml/min	Zeit [min]	Laufmittel B [%]
	0	12
	25	18
	27	100
	30	100
	32	0
	42	0

Retentionszeiten: L-Gln: 13,6 min, D-Gln: 14,9 min, L-His: 17,1 min bei Derivatisierung mit OPA/IBLC

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Enzymtechnologie durchführen zu können, die sehr guten Arbeitsbedingungen und ihr stetes und reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit,

Herrn Prof. Dr. H. Weiss, Institut für Biochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die freundliche Übernahme des Korreferates,

der Hermann-Schlosser-Stiftung für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums,

der Degussa AG, Hanau, für die Bereitstellung wichtiger Substrate, sowie Herrn Dr. A. Bommarius für seine Diskussionsbereitschaft, Herrn Dr. K. Günther für die Unterstützung bei der HPLC-Analytik und nicht zuletzt Herrn Dr. S. Verseck für die Einführung in die "molekularbiologische Welt" und sehr gute Zusammenarbeit,

Frau Dr. H. Slusarczyk für die Unterstützung der molekularbiologischen Arbeiten, ihre konstruktiven Anregungen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit,

Frau B. Hensen für die Durchführung der Proteinsequenzierungen sowie Herrn R. Goldbaum und Herrn H. Gieren für ihre technische Unterstützung bei der HPLC und den Fermentationen,

Frau B. Krolczyk, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit einige interessante Stämme isolierte,

allen – auch ehemaligen – Mitarbeitern des IET's für die kollegiale Zusammenarbeit und das herzliche Arbeitsklima, insbesondere Dr. M. Ansorge, Dr. M. Bönitz, B. Geueke, P. Heim, E. Janzen, Dr. B. Lingen, Dr. A. Matzen, S. Neumann, K. Odendahl, Dr. S. Oßwald, Dr. A. Sandgathe und A. Weckbecker für eine sehr angenehme und nicht selten heitere Arbeitsatmosphäre in Labor und Büro,

meinen Eltern und der gesamten Familie Krieg.