

**Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von
Alkoholdehydrogenasen und einer Oxygenase aus *Rhodococcus* Spezies**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Kofi Abokitse
aus Klonou

Jülich, 2004

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

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel

Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2000 bis April 2004 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Hummel durchgeführt.

Die Arbeit wurde durch die Degussa AG unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurde veröffentlicht:

- [1] Gröger, H., W. Hummel, C. Rollmann, F. Chamouleau, H. Hüsken, H. Werner, C. Wunderlich, K. Abokitse, K. Drauz, and S. Buchholz,
Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase, Tetrahedron. Tetrahedron: Asymmetry, 2004. 60(3): p. 633-640.
- [2] Abokitse, K. and W. Hummel,
Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from Rhodococcus erythropolis DSM 43297. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003. 62: p. 380-386.
- [3] Abokitse, K. and W. Hummel,
High-level expression of the (S)-specific alcohol dehydrogenase from Rhodococcus erythropolis DSM 43297 in Escherichia coli. Enzym Microbial Technol, 2004. in Press.
- [4] Gröger, H., W. Hummel, S. Buchholz, K. Drauz, T.-V. Nguyen, C. Rollmann, H. Hüsken, and K. Abokitse,
Practical Asymmetric Enzymatic Reduction through Discovery of a Dehydrogenase-Compatible Biphasic Reaction Media. Org. Lett., 2003. 5(2): p. 173-176.
- [5] Hummel, W., K. Abokitse, K. Drauz, C. Rollmann, and H. Gröger,
Towards a Large-Scale Asymmetric Reduction Process with Isolated Enzymes: Expression of an (S)-Alcohol Dehydrogenase in E. coli and Studies on the Synthetic Potential of this Biocatalyst. Adv. Synth. Catal., 2003. 345(1-2): p. 153-159.

Patentanmeldung:

Abokitse, K., Hummel, W., Gröger, H.

Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis*. Deutsche Anmeldung 102 18 689.8 vom 23.10.2002 (Degussa)

Einleitung	1
1. Rhodococcus und Abbau von Kohlenwasserstoffe	1
2. Bedeutung von Alkoholdehydrogenasen	2
2.1 Coenzym-Regenerierung	5
2.2 Herstellung chiraler Alkohole	6
2.3 Die Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i> (RE-ADH)	9
3. Monooxygenasen	9
3.1 Monooxygenase als Biokatalysator	11
3.2 Die Tetrahydrofuran-Monooxygenase (TMO) aus <i>Rhodococcus ruber</i>	12
4. Zielsetzung und Aufgabestellung	15
 Material und Methoden	 17
1. Material	17
Geräte	17
Chemikalien	18
2. Mikrobiologische Methoden	18
2.1 Mikroorganismen	18
2.2 Zellanzucht und Medien	19
Medien	19
2.3 Anzucht von rekombinanten <i>E. coli</i> Stämmen	19
2.4 Konservierung von Bakteriestämmen	21
3. Molekularbiologische Methoden	21
3.1 Fällung von DNA	21
3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren	22
3.3 Präparation von DNA	22
3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
3.5 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	23
3.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	24
3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
3.8 Ligation von DNA Fragmente	25
3.9 Kompetente <i>Escherichia coli</i> Zellen	25
3.10 Transformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen	25
3.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26
3.12 Konstruktion synthetischer Oligonukleotiden	29
3.13 DNA-Sequenzierung	29
3.14 Herstellung einer DNA-Bank	29
3.14 Gezielte Mutagenese	30
3.15 Plasmid-Vektoren	31
3.16 Konstruktion eines Expressionsplasmids mit niedriger Kopiezahlen	32
4. Biochemische Methoden	33
4.1 Zellenaufschluß und Rohextraktgewinnung	33
4.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten	34
4.3 Quantitative Proteinbestimmung	37
4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	37

4.5 Aufreinigung der Alkoholdehydrogenasen	37
4.6 Lagerung und Stabilität der Proteinlösungen	39
4.7 Substratspektrum und Kinetik	39
4.8 Immobilisierungsversuche	40
4.9 Untersuchung zum Einfluß von Zn ²⁺ -Ionen auf die Expression der Alkoholdehydrogenase	41
Ergebnisse	44
A. Expression der Alkoholdehydrogenase	45
1. Expression der Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i> (RE-ADH)	46
2. Optimierung der Expression der RE-ADH.....	50
2.1 ADH-Expression mit weiteren kommerziell verfügbaren Expressionsvektoren	52
2.2 Reduktion der Genkopienzahl pro Zellen: Konstruktion und Verwendung eines "medium copy number"-Expressionsplasmids	52
2.3 Optimierung der Codon-Verwendung im <i>re-adh</i> Gen	57
2.4 Einfluß von Zn ²⁺ -Ionen auf die RE-ADH Aktivität und Expression	61
3. Biochemische Charakterisierung der RE-ADH.....	66
3.1 Temperaturstabilität.....	67
3.2 Kinetische Daten und Substratspektrum.....	68
4. Biotechnologisches Potential der RE-ADH	72
4.1 Enantiomerenreinheit enzymatisch gebildeter Alkohole.....	72
4.2 Immobilisierung der RE-ADH	73
B. Untersuchung zur Funktion des C-Terminus der RE-ADH	74
1. Isolierung des <i>par</i> Gens aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>	76
1.1 Amplifizierung des <i>par</i> Gens	78
1.2 Expression der PAR.....	79
1.3 Herstellung von PAR Varianten mit kürzeren Aminosäuresequenzen	81
2. Einfluss der Aminosäurezusammensetzung am C-Terminus	86
auf die Eigenschaft der Enzyme	86
2.1 Expression der RR-ADH (Alkoholdehydrogenase aus (<i>R. ruber</i>))	89
C. Rhodococcus und Oxidation von Tetrahydrofuran	99
1. Isolierung der Gene des Tetrahydrofuran- Monooxygenase Komplexes von.....	97
<i>Rhodococcus ruber</i>	97
1.1 DNA Fragmente aus der β -Untereinheit.....	97
1.2 Der vollständige TMO-Komplex.....	99
1. Charakterisierung des Monooxygenase- Komplexes	100
2. Klonierung der <i>tmo</i> Gene aus <i>R. ruber</i> 219.....	103
2.1 Erzeugen einer DNA Bank	103
2.2 Screening der DNA Bibliothek.....	104
3. Expression der <i>tmo</i> Gene.....	105

Diskussion	107
A. Reduktive Enzyme in <i>Rhodococcus</i> -Stämmen	111
1. RE-ADH und der Einfluss von Zinkionen	112
2. Funktion des C-Terminus der RE-ADH.....	115
2.1 Einfluß der Länge der Proteinkette.....	116
2.2 Einfluss der Aminosäuresequenz des C-Terminus.....	116
4. Vielfältigkeit der Alkoholdehydrogenasen.....	123
5. Thermostabilität der untersuchten Alkoholdehydrogenasen	125
B. Oxidative Enzyme in <i>Rhodococcus</i>-Stämmen am Beispiel der Monooxygenasen.	126
Lokalisation des tmo Genclusters.....	129
Zusammenfassung	133
Anhang	136
Literaturverzeichnis	149

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADHs	Alkoholdehydrogenasen
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
cam	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium Bromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ee	enantiomeric excess, Enantiomerenüberschuss
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FF	Fast Flow
FMN	Flavinadeninmononukleotid
G+C	Guanosine + Cytidine
h	Stunde
IPTG	β -D-Isopropylthiogalaktosid
kcat	katalytische Konstante
K_M	Michaelis-Menten Konstante
KPi -Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar
NAD/NADH	Nicotinamadenindinukleotid, oxidiert/reduziert
NADP/NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat oxidiert/reduziert
N-Terminus	Amino-Terminus
OD_n	Optische Dichte, bei einer Wellenlänge von n nm
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
T_m	Schmelztemperatur eines Primers
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)

V_{max}

Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Einleitung

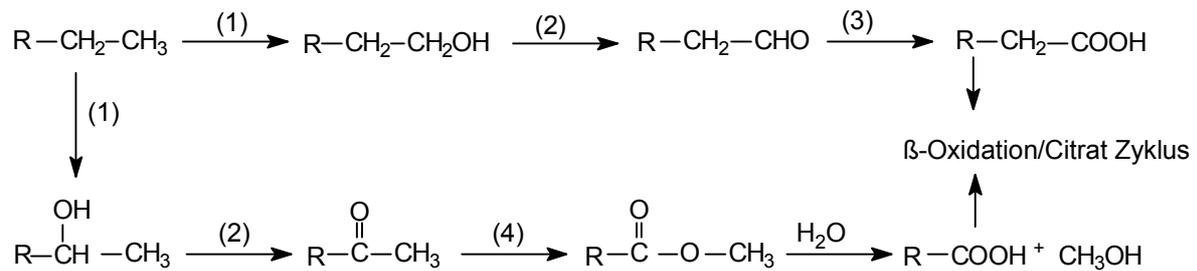
1. Rhodococcus und Abbau von Kohlenwasserstoffe

Mikroorganismen verfügen über eine geeignete Enzym-Ausstattung zum Ausführen aller lebenswichtigen Funktionen. Die verschiedenen Mikroorganismen zeichnen sich durch das Vorhandensein bestimmter Gruppen von Enzymen aus, die, wie die Genom- und Proteomforschung mittlerweile gezeigt hat, in ihrem Enzym-Spektrum und ihren Sequenzen für die Mikroorganismen-Art charakteristisch ist; dadurch besitzen sie das Anpassungsvermögen an besondere Wachstumsbedingungen.

Die Gram-positiven Bakterien der Gattung *Rhodococcus* sind bekannt für ihre Fähigkeit, viele Xenobiotika und Naturstoffe (meist reaktionsträge Kohlenwasserstoffe) zu verwerten und sie als einzige Energiequelle zu benutzen [1]. Sie besitzen dazu sehr vielseitige Stoffwechselwege. Die Anwesenheit von Mycolsäure, eine 2-Methyl-3-Hydroxyl-C₃₀₋₅₄-haltige Fettsäure, in der Zellwand verleiht den *Rhodococcus*-Zellen ihre hydrophoben Eigenschaften [2], welche für die Aufnahme stark wasserunlöslicher Verbindungen wie langkettige Alkane und viele andere Xenobiotika notwendig sind. Die Oxidoreduktasen spielen in den Abbauprozessen dieser Verbindungen eine entscheidende Rolle [3]. In vielen Fällen sind die durch Oxygenasen katalysierten Hydroxylierungsreaktionen der einleitende Schritt. Die weiteren Reaktionen in der Verwertung dieser Verbindungen werden durch Dehydrogenasen katalysiert. Die Alkoholdehydrogenasen setzen die entstandenen Alkohole oxidativ zu Ketonen oder Aldehyden um, welche für die Zelle als C-Quelle verwendet werden können. Die Abbildung 1 gibt einen allgemeinen Überblick über Abbauwege von Kohlenwasserstoff-Verbindungen in Mikroorganismen.

Die aus den oxidativen Reaktionen entstandenen Carbonsäuren werden über die β -Oxidation weiter zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches im Citratzyklus als Energie-Quelle für die Zelle dienen kann.

A



B

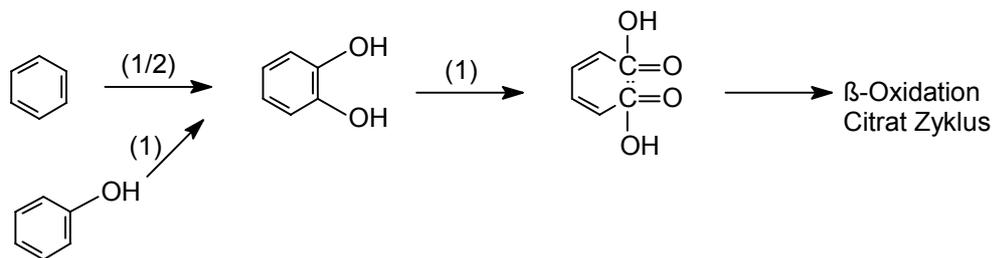


Abb. 1: Allgemeine Darstellung des Abbauweges von Kohlenstoffe durch Mikroorganismen [3]. (A) entspricht dem Abbauweg aliphatischer, und (B) zyklischer Verbindungen, (R) stellt einen aliphatischen Rest dar, (1) Oxygenase; (2) Alkoholdehydrogenase; (3) Aldehyddehydrogenase und (4) Bayer-Villiger Oxygenase.

2. Bedeutung von Alkoholdehydrogenasen

Der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen, da sie gegenüber chemischen Katalysatoren viele Vorteile besitzen. Die enzymatischen Reaktionen verlaufen unter milden Bedingungen (Temperatur, pH und Druck) mit hoher Stereospezifität. Je nach Art der katalysierten Reaktion werden alle Enzyme durch die „International Union of Biochemistry“ in sechs Klassen unterteilt. Die Oxidoreduktasen (Klasse 1) katalysieren die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen. Die Dehydrogenasen bilden eine Unterklasse der Oxidoreduktasen.

Innerhalb der Dehydrogenasen kommt den Alkoholdehydrogenasen aufgrund ihres biotechnologischen Potentials eine besondere Bedeutung zu.

Alkoholdehydrogenasen (ADHs; EC 1.1.1.1) sind sehr weit verbreitet in der Natur und kommen in Mikroorganismen, Pflanzen- und Tiergeweben vor [4]. Die biologische Funktion der ADHs ist nicht einheitlich, teilweise bilden sie Gärungsprodukte und dienen damit der biologischen NAD- bzw. NADP-Regenerierung, teilweise sind sie in oxidative Abbauprozesse involviert oder haben eine Funktion in der Zellabwehr [5].

Die Klassifizierung der ADHs in drei Klassen erfolgt nach der Länge der Proteinkette des Monomers. Die langkettigen besitzen mehr als 350 Aminosäuren, sie sind Metallionen-abhängig, insbesondere enthalten sie Eisen oder Zink. Insgesamt sind aber nur relativ wenige Enzyme dieser Gruppe bekannt und sie sind biochemisch am wenigsten detailliert untersucht [4]. Die mittelkettigen ADHs mit ca. 350 Aminosäuren sind Zink-abhängige Proteine, mit der Hefe-ADH oder dem Enzym aus Pferdeleber zählen sie zu den am längsten bekannten Enzymen. Die kurzkettigen ADHs mit ca. 250 Aminosäuren enthalten kein Metallion.

Von den zahlreichen mittelkettigen mikrobiellen ADHs, die alle Homotetramere sind, wurden überwiegend die Enzyme aus thermophilen bzw. hyperthermophilen Bakterien umfassend biochemisch charakterisiert. Tabelle 1 fasst diese Alkoholdehydrogenasen zusammen. Aus dieser Gruppe sind die dreidimensionalen Strukturen der Enzyme von *Thermoanaerobium brockii* [6], *Aeropyrum pernix* [7, 8] und *Sulfolobus solfataricus* [9] bekannt.

Mittelkettige ADHs aus Säugern sind ebenfalls beschrieben; das Enzym aus Pferdeleber (HLADH), dessen dreidimensionale Struktur ebenfalls bekannt ist, stellt die älteste bekannte ADH dar. Im Gegensatz zu den mikrobiellen ADHs ist die HLADH ein dimeres Protein [10].

Tab. 1 Übersicht über die bekanntesten Alkoholdehydrogenasen aus thermophilen bzw. hyperthermophilen Bakterien

Bakterien/ADH-Coenzymabhängigkeit	Coenzymabhängigkeit	Quelle
<i>Bacillus stearothermophilus</i> /ADH-hT	NAD	[11]
<i>Thermococcus hydrothermalis</i> ADH	NADP	[12]
<i>Aeropyrum pernix</i> ApADH	NAD	[8]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ADH SsADH	NAD	[13]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200 ADH	NADP	[14]
<i>Thermoanaerobacter brockii</i> ADH/ ThbADH	NADP	[15]
<i>Clostridium beijerinckii</i> ADH/ CbADH	NADP	[15]

Aus mesophilen Mikroorganismen wie *Acinetobacter* sp. M-1 [16] und *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 wurden ADHs isoliert und charakterisiert, ebenso sind ADHs aus *Rhodococcus*-Stämmen bekannt [17-19].

Bezogen auf die Aminosäuresequenzen zeigen die thermophilen bzw. hyperthermophilen ADHs Homologien zwischen 40-85 % zu den mesophilen Enzymen, mit überlappenden dreidimensionalen Strukturen und ähnlichen Reaktionsmechanismen; untereinander zeigen thermophile bzw. hyperthermophile Enzyme sehr hohe Ähnlichkeiten von mehr als 90 % [20].

Alle diese Enzyme zeichnen sich durch ihre Coenzym-Spezifität (NAD oder NADP) und ihr häufig begrenztes Substratspektrum aus, wobei eine Präferenz für aliphatische, zyklische oder offenkettige Seitenketten oder aromatische Strukturen besteht.

Für technische Anwendungen werden die ADHs überwiegend für die Herstellung chiraler Alkohole eingesetzt, da sie in der Lage sind, stereospezifisch Ketone zu reduzieren (Abb. 2).

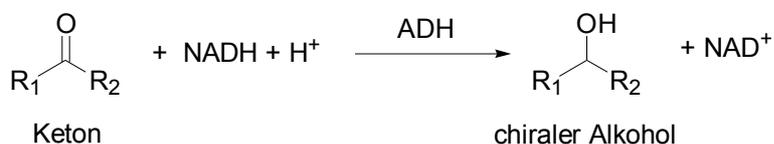


Abb. 2 Reduktion von Ketonen durch Alkoholdehydrogenasen. (R_1 und R_2 sind aliphatische oder zyklische Seitenketten).

2.1 Coenzym-Regenerierung

Während der enzymatischen Reduktion von Ketonen wird das Coenzym NADH bzw. NADPH verbraucht, die oxidierte Form reichert sich im Reaktionsverlauf an. Für präparative Synthesen müsste das Coenzym in stöchiometrischer Menge zugesetzt werden; da aber die Kosten für die Nicotinamid-Coenzyme generell sehr hoch sind (siehe Tabelle 2) und auch die Gleichgewichtslage gegen eine solche Verwendung spricht, sind Regenerierungssysteme erforderlich, um die Synthese wirtschaftlich durchführen zu können.

Tab. 2 Preise für die Nicotinamid-Coenzyme. Biomol-Katalog 2002/2003

Coenzym	Preis (€/g)	Preis (€/mol)
NAD	17	12.189
NADP	159	133.083
NADH	53	40.439
NADPH	399	361.095

Enzymatische Verfahren zur Regenerierung werden eindeutig bevorzugt, chemische, elektrochemische und photochemische Methoden haben dagegen bislang eher akademische Bedeutung. Die Regenerierung kann im Prinzip entweder über die Kopplung der Alkoholdehydrogenase-Reaktion mit einer anderen Dehydrogenase (Enzym-gekoppelte

Regenerierung) oder über die Verwendung eines zweiten Substrats im Reaktionsansatz erfolgen (Substrat-gekoppelte Regenerierung) [21]. Die Formiat-Dehydrogenase, die die Oxidation von Formiat (HCOOH) zu Kohlendioxid katalysiert, hat sich als effektivste Methode für die Regenerierung von NADH herausgestellt, da praktisch keine Rückreaktion stattfindet [22, 23]. Das Coenzym NADPH wird hauptsächlich über Glucose-Dehydrogenase oder Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G-6-P-DH) regeneriert. Das erste System hat den Vorteil, dass Glucose ein kostengünstiges Substrat ist, es wird daher im technischen Maßstab eingesetzt [24]. Nachteilig ist, dass es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt und der K_m -Wert für Glucose relativ hoch ist. Die G-6-P-DH-Reaktion dagegen ist irreversibel, dafür ist das Substrat G-6-P teuer und instabil.

Aufgrund der effizienteren NADH-Regenerierung werden die NAD-abhängigen ADHs für präparative Anwendungen bevorzugt eingesetzt.

2.2 Herstellung chiraler Alkohole

Chirale Vorstufen, insbesondere chirale Alkohole dienen als Bausteine für Produkte der pharmazeutischen, kosmetischen und landwirtschaftlichen Industrie, da die alkoholische Gruppe leicht mittels chemischer Methoden zu anderen funktionellen Gruppen umgewandelt werden kann [25]. Zur Gewinnung chiraler Alkohole stehen zwei Synthesewege zur Verfügung, die Reduktion eines prochiralen Ketons oder die Spaltung eines racemischen Alkohols. Die Reduktion von prochiralen Ketonen kann sowohl enzymatisch als auch chemisch durchgeführt werden.

- Keton-Reduktion mittels chemischer Katalysatoren

Die asymmetrische Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen über chemische Wege erfolgt generell mit Hilfe von Schwermetall-haltigen Katalysatoren. Von den vielen bekannten Katalysatoren kann man den BINAP/1,2-Diamine-Ruthenium(II)-Komplex erwähnen [26]. Die Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit diesem Metall-Komplex wurde bei 30 °C mit 82 % (ee) erreicht. Speziell Phenylethanol, aber auch eine ganze Reihe einfacher Ketone, können aber mittlerweile mit chemischen Katalysatoren mit praktisch 100% Enantiomerenüberschuß hergestellt werden.

Gegenüber enzymatischen Verfahren zeigen chemische Methoden im Allgemeinen viele Limitierungen wie geringere Ausbeute, Verunreinigung des Produktes und umweltbelastende Reaktionsbedingungen (höhere Temperaturen und Druck; extreme pH-Werte, Verwendung organischer Lösungsmittel und Schwermetall-haltiger Katalysatoren). Viele dieser Limitierungen treffen für die Gewinnung chiraler Alkohole über enzymatische Wege dagegen nicht zu.

- Enzymatische Herstellung chiraler Alkohole

Die Alkoholdehydrogenasen zählen zu den wichtigsten Biokatalysatoren zur asymmetrischen Reduktion von Ketonen neben den Aldehyd-, Aldose- und Carbonyl-Reduktasen. Für die Pferdeleber-ADH (HLADH), die die am besten charakterisierte mittelkettige ADH darstellt, sind seit langem präparative Anwendungen für die Produktion von chiralen Alkoholen beschrieben [27]. Daneben sind Enzyme aus Hefen die am meisten verwendeten Biokatalysatoren in industriellen Prozessen [28]. Die nachfolgende Tabelle fasst die in der Literatur beschriebenen mikrobiellen Herstellungsverfahren chiraler Alkohole über die Reduktion von Ketonen zusammen.

Tab. 3 Überblick über mikrobielle Enzyme zur industriellen Herstellung chiraler Alkohole

Enzym	Stereospezifität	Quelle
<i>Thermoanaerobium brokii</i> -ADH	(S)	[29].
<i>Pseudomonas</i> sp.PED-ADH	(R)	[30]
<i>Lactobacillus kefir</i> -ADH	(R)	[31]
<i>Corynebacterium</i> sp. Phenylacetaldehyd-Reduktase (PAR)	(S)	[32]
<i>Candida magnoliae</i> -Carbonylreduktase	(S)	[33, 34]
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> - Aldehydreduktase	(R)	[35]
<i>Candida parapsilosis</i> (IFO1396)-ADH	(S)	[36]

Neben der Reduktion von Ketonen werden chirale Alkohole über Racemat-Spaltung gewonnen. Dabei werden nicht nur ADHs eingesetzt, sondern auch hydrolytische Enzyme wie Lipasen oder Esterasen. Racemische Alkohole dienen als Ausgangsmaterial für die

Spaltung mittels ADHs, wobei während der Reaktion eines der beiden Stereoisomere zum entsprechenden Keton oxidiert wird.

Beim Einsatz von Lipasen und Esterasen findet eine hydrolytische Spaltung racemischer Ester statt. Die Reaktion, die mehr oder weniger stereospezifisch abläuft, führt zur Bildung enantiomerenreiner oder -angereicherter Alkohole. Trotz der Produktausbeute von maximal 50 % wird diese Methode sehr häufig verwendet, da diese Enzyme keinen Cofaktor benötigen und gute Lösungsmittelstabilitäten besitzen. So werden beispielsweise Bausteine für die Herstellung von künstlichen Pyrethroiden durch die Reaktion der *Arthrobacter globiformis* Esterase (AES) gewonnen; die Vorstufe des 2-Pyridyl-Ethers, einem Insektizid, wird mittels der *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL) hergestellt [37].

Bei der Herstellung chiraler Alkohole über den enzymatischen Weg gelangen Biokatalysatoren in unterschiedlicher Form zum Einsatz. Häufig werden ganze Mikroorganismenzellen benutzt, sowohl als wachsende als auch als ruhende Kulturen, oder in suspendierter oder immobilisierter Form.

Die wesentlichen Vorteile von isolierten Enzymen im Vergleich zu Ganzzell-Umsetzungen sind die hohen Raum-Zeit-Ausbeuten, die durch Reinigung und Aufkonzentrierung der Präparate möglich sind und die Nebenprodukt-freien Synthesen. Andererseits sind Enzymreinigungen auch immer mit zusätzlichen Kosten verbunden. Eine Zwischenstellung nehmen rekombinante Enzyme bzw. Stämme ein, bei denen durch ein gutes Expressionssystem bereits hohe Volumenaktivitäten erreicht werden, die denen aufkonzentrierter Enzyme entsprechen. Solche Enzympräparate können direkt ohne Enzymreinigung eingesetzt werden, da mögliche Nebenreaktionen durch Wirtsstamm-eigene Enzyme weitgehend vernachlässigbar sind.

Die wesentliche Limitierung beim Einsatz isolierter ADHs für die Herstellung chiraler Alkohole ist die Verfügbarkeit von Enzyme mit breitem Substratspektrum, die in der Lage sind, höhere Konzentrationen an Ketonen oder auch Lösungsmittel zu vertragen.

2.3 Die Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis*

(RE-ADH)

Die Alkoholdehydrogenase aus *R. erythropolis* (RE-ADH) setzt zahlreiche Keto-Verbindungen zu den entsprechenden (*S*)-Alkoholen um und benötigt NADH als Coenzym. Die Standardreaktion der RE-ADH ist in Abbildung 3 dargestellt; p-Cl-Acetophenon wird zu (*S*)-p-Cl-Phenylethanol reduziert.

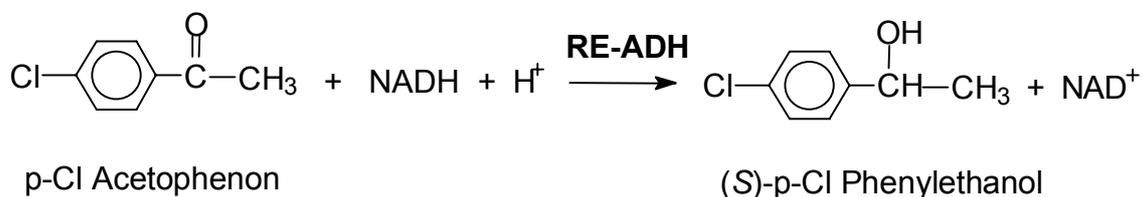


Abb. 3 Reaktionsschema der RE-ADH

Das Enzym wurde gereinigt, biochemisch charakterisiert [38] und sein Einsatz für präparative Zwecke gezeigt. Untersuchungen zu möglichen Inhibitoren zeigten, dass die RE-ADH durch chelatierende Reagenzien wie 1,10-Phenanthrolin und 2,2'-Bipyridin gehemmt wird. Diese Reagenzien komplexieren das katalytische Zinkion in Zink-enthaltenden Alkoholdehydrogenasen, wie es beispielsweise für das Enzym aus Pferdeleber (HLADH) beschrieben ist. Diese Versuche geben also bereits Hinweise auf die Beteiligung von Zink-Ionen an der Reaktion.

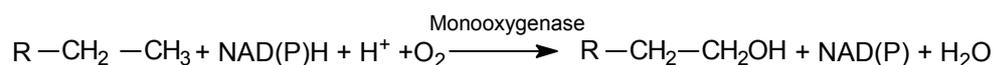
3. Monooxygenasen

Die Oxygenasen bilden eine weitere Unterklasse innerhalb der Oxidoreduktasen und stellen die am meisten verbreitete Enzymgruppe dar.

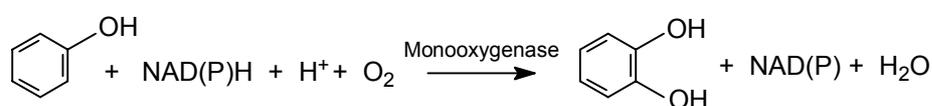
Oxygenasen sind Enzyme, die den ersten Schritt des aeroben Abbaus aromatischer und aliphatischer Verbindungen katalysieren. Während dieser Reaktion wird entweder ein Atom

des molekularen Sauerstoffs in das Produkt eingeführt (Monooxygenasen) und das zweite zu Wasser reduziert, oder beide Sauerstoffatome werden in das Substrat inkorporiert (Dioxygenasen). Die Abbildung 4 zeigt die allgemeine Reaktion und Beispiele für Oxygenase-Reaktionen.

(1)



(2)



(3)

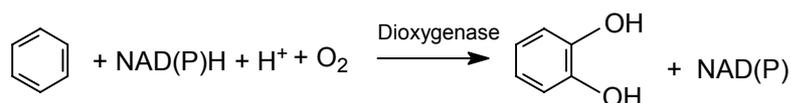


Abb. 4 Allgemeine Reaktionen der Oxygenasen. Die Dioxygenasen (3) katalysieren die Hydroxylierung von Kohlenstoff-Ringen (z. B. Benzol), während die Monooxygenasen (1) und (2) sowohl aliphatische azyklische und zyklische als auch aromatische Kohlenwasserstoff-Verbindungen (z.B. Phenol) hydroxylieren. (R) steht für einen aliphatischen Rest.

NAD(P)H dient als Elektronen-Donor und wird dabei oxidiert [39]. Diese Reaktion kann in zwei Stufen eingeteilt werden: die Oxidation des Cofaktors NAD(P)H, die Reduktionsäquivalente liefert und die Hydroxylierung des Substrats. Oxygenasen können aus einer oder mehreren Komponenten aufgebaut sein. Einkomponenten-Monooxygenasen, die die Hydroxylierung aromatischer Ringe katalysieren, sind Flavoproteine, bei denen die Oxidation des Cofaktors und die Hydroxylierung des Substrates in einem Schritt an einem gebundenen Flavin stattfinden. Der bekannteste Vertreter dieser Enzymgruppe ist die p-Hydroxybenzoat-Hydroxylase aus *Pseudomonas fluorescens* [40]. Eine weitere Klasse der flavinabhängigen Monooxygenasen stellen die sogenannten TC-FDM (two-component flavin-diffusible monooxygenases) dar. Diese bestehen aus einer Reduktase- und einer Oxygenase-Komponente. Beide Komponenten enthalten Flavin nicht als prosthetische, also kovalent am Enzym gebundene Gruppe, sondern als „lose“ gebundenes Coenzym. Das für die

Monooxygenaseaktivität essentielle Flavin wird von der Reduktase reduziert und dann von der Oxygenase-Komponente zur Hydroxylierungsreaktion genutzt. Ein Beispiel für eine Monooxygenase der TC-FDM-Familie ist die 4-Hydroxyphenylacetat-3-Hydroxylase aus *E. coli* W [41].

Neben den flavinabhängigen Enzymen gibt es eisenhaltige Mehrkomponenten-Monooxygenasen, bei denen die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs am Übergangsmetall erfolgt [39]. Man unterscheidet Nicht-Häm-Eisen Oxygenasen mit einem mononuklearen (2-Oxo-1,2-Dihydroquinolin 8-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* 86 [42]) oder binuklearen Eisenzentrum (z. B. die Methan Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* [43]) und Cytochrom P450-abhängige Enzyme mit einem Häm-Cofaktor [44]. Alle diese Mehrkomponenten-Oxygenasen enthalten neben der eigentlichen Oxygenase-Komponente ein Elektronen-Transportsystem, das für den Transfer der Elektronen von NAD(P)H auf die terminale Oxygenase-Komponente sorgt [39]. Die Elektronen-Transportkette enthält zwei Redox-Zentren, wobei das erste häufig ein Flavin enthält, während das zweite ein Eisen-Schwefel Cluster ist.

3.1 Monooxygenase als Biokatalysator

Die Fähigkeit der Oxygenasen (Mono- und Dioxygenasen), molekularen Sauerstoff in Verbindungen einzuführen, wird technisch genutzt, um chemisch inerte Kohlenwasserstoffe zu aktivieren, die Reaktion verläuft sehr häufig stereospezifisch. Dieser katalytische Prozess ist von großer Bedeutung in der chemischen Industrie, da viele Hydroxy-Verbindungen, die chemisch kaum synthetisierbar sind, über diesen Weg produziert werden können.

Der biotechnologische Einsatz von Monooxygenasen ist in vielen Fällen mit großem biochemischen Aufwand verbunden, da sie überwiegend Mehrkomponenten-Enzymssysteme sind; für die Erzeugung der Aktivität ist die Anwesenheit aller Proteine in ihren aktiven Formen notwendig. Zusätzlich sind sie Coenzym- und Metall-abhängig, die Coenzym-Regenerierung verläuft bei der technischen Anwendung über Dehydrogenasen (z. B. Formiat Dehydrogenase für NADH und Glucose-Dehydrogenase für NADPH); sie können auch Membran-gebundene Proteine sein, was ihren Einsatz als isolierte Enzyme beschränkt. Außerdem besitzen Monooxygenasen generell ein engeres Substratspektrum. Trotz dieser

Limitierungen bezüglich des großen Aufwandes bei der Prozessentwicklung finden die Oxygenasen immer mehr technische Verwendung und kommen häufiger in Form von rekombinanten Ganzzellsystemen zum Einsatz.

Einige Beispiele für die Nutzung von Monooxygenasen als Biokatalysator sind:

- die Herstellung von kommerziell erhältliche Verbindungen, wie Pravastatin, Indigo, cis, cis-Muconsäuren und Hydroxyprolin mit Hilfe von Oxygenasen; signifikante Menge an 4-Hydroxyprolin (bis zu 25 g/l) konnten mit der Prolin 4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. RH1 synthetisiert werden [45].

- Ein Biokatalysator wurde aus der Styren-Monooxygenase (*Pseudomonas* sp. VLB120) entwickelt; die Strukturgene *StyAB* wurden dazu heterolog in *E. coli* kloniert und exprimiert. Die rekombinanten Zellen wurden für die Produktion von enantiomeren-reinen Styrenoxiden eingesetzt [46-48].

- Die Xylen Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* mt-2 katalysiert die Hydroxylierung von Xylol und Toluol. Technisch wurde diese Reaktion genutzt zur Oxidation von Xylol, Pseudocumene oder Toluol (verschiedene substituierte Toluol-Derivate) zu den entsprechenden Alkoholen, Aldehyden und Säuren [49, 50].

3.2 Die Tetrahydrofuran-Monooxygenase (TMO) aus *Rhodococcus ruber*

Der *R. ruber* Stamm 219 wurde als erstes THF-abbauendes Bakterium in Reinkultur von Bernhardt [51] isoliert. Dieser Stamm wächst auf einem Medium mit THF bis zu einer Konzentration von ca. 10 mM. Über die Biochemie bzw. Enzymologie des THF-Abbauwegs ist bisher wenig bekannt. Mikrobiologische Versuche haben gezeigt, dass der Stamm neben THF auch γ -Butyro-lacton, 1,4-Butandiol und Succinat umsetzen kann. Ein entsprechendes Substratspektrum wurde als möglicher Abbauweg für THF postuliert. Aus der Arbeit von Spallek [52] ergaben sich Hinweise, daß der einleitende Schritt beim THF-Abbau eine Hydroxylierung am C2-Atom des THF ist, die zur Bildung eines Halbacetals führt, (Abb. 5, Reaktion der TMO).

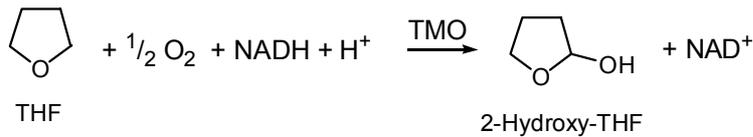


Abb. 5 Hydroxylierungsreaktion von Tetrahydrofuran (THF) durch die Tetrahydrofuran-Monooxygenase (TMO).

Für die Umsetzung des dann entstehenden 2-Hydroxy-THF werden zwei Möglichkeiten postuliert (siehe Abbildung 5), aber die entsprechenden Intermediaten konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten, daß *Rhodococcus ruber* 219 eine sehr instabile Monooxygenase für den initialen Abbau von THF besitzt [52].

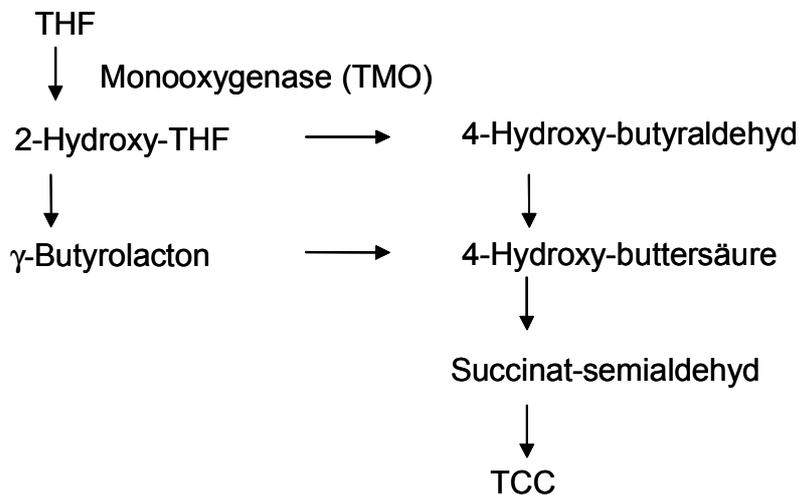


Abb. 6. Postulierter Abbauweg für Tetrahydrofuran [51].

Eine Dreikomponenten-Monooxygenase (ThmADBC), die in der Lage ist, THF zu hydroxylieren, wurde von Thiemer [53] isoliert und charakterisiert. Dieses Enzymsystem aus *Pseudonocardia* sp. katalysiert den einleitenden Schritt des Tetrahydrofuran- (THF-)Abbaus und wurde als ein binukleares Eisen-Enzym klassifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass der einleitende Schritt tatsächlich durch eine Monooxygenase katalysiert wird. Ein weiteres Enzym, das am Abbau beteiligt ist, konnte als Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase identifiziert werden, das Gen konnte eindeutig in dem für den Abbau verantwortlichen Gencluster nachgewiesen werden.

4. Zielsetzung und Aufgabestellung

Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* besitzen oxidative und reduktive Stoffwechselwege, die ein interessantes synthetisches Potential darstellen. In dieser Arbeit soll dies an zwei Beispielen verdeutlicht werden: Durch die Charakterisierung der Alkoholdehydrogenasen aus *R. erythropolis* (RE-ADH), bzw. aus *R. ruber* (RR-ADH) soll das reduktive Potential eines Enzyms dieser Mikroorganismen-Gruppe erläutert werden, während die Tetrahydrofuran-Monooxygenase (TMO) aus *R. ruber* beispielhaft für oxidative Reaktionen steht.

Zur Bereitstellung chiraler Alkohole hat sich die asymmetrische Reduktion von Ketonen gegenüber der Racematspaltung als vorteilhaft erwiesen; 100 % Ausbeute können erreicht werden. Es besteht daher ein großes Interesse an neuen Oxidoreduktasen, die ein breites Substratspektrum besitzen und eine hohe Enantioselektivität in der Reduktionsreaktion zeigen. Ein gutes Beispiel dafür ist die RE-ADH, deren Verfügbarkeit für die Anwendung allerdings sehr limitiert ist. Da das für die RE-ADH kodierende Gen vorliegt, soll durch Klonierung und heterologe Expression die Voraussetzung für eine gute Enzymproduktion geschaffen werden. Die Bedeutung von Zinkionen für die Synthese enzymatisch aktiver rekombinanter RE-ADH soll herausgestellt werden. Die Charakterisierung der Proteindomäne ist essentiell für eine eventuelle Veränderung des Substratspektrums der RE-ADH, die für die Katalyse wichtigen Domänen sollen identifiziert werden. Dabei sollen gegebenenfalls auch weitere homologe neue Alkoholdehydrogenase (RR-ADH aus *Rhodococcus ruber*) oder literaturbekannte (Alkoholdehydrogenase aus *Sulfolobus solfataricus*, Ss-ADH und Phenylacetaldehyd-Reduktase aus *Corynebacterium* sp.) durch Homologie-Vergleiche mit einbezogen werden, für die Herstellung von Mutanten durch gerichtete Mutagenese.

Der Einsatz von Monooxygenasen zur Aktivierung von C-H-Gruppen stellt eine interessante Alternative zu den drastischen chemischen Methoden dar. Dazu soll die THF-Monooxygenase aus *R. ruber* charakterisiert werden. Vorversuche haben bereits gezeigt, dass die Isolierung des Proteins aus dem Wildstamm wegen der Komplexität des Enzyms keinen Zugang darstellt, daher soll in dieser Arbeit versucht werden, das codierende Gen zu isolieren und nach Möglichkeit die für die Gesamtreaktion verantwortliche Genstruktur zu charakteri-

sieren. Damit wären die Voraussetzungen geschaffen, durch Klonierung und heterologe Expression der Gene einen hydroxylierenden Biokatalysator zu erzeugen.

Material und Methoden

1. Material

Geräte

Analytik

Spektrophotometer UV-VIS 160A & UV-1602

Shimadzu

Spektrophotometer UV-VIS

Pharmacia Biotech

Gaschromatograph GC-17A & GC-9A

Shimadzu

Chromatographie

FPLC

Amersham-Pharmacia Biotech

Disintegration

Schwingkugelmühle MM2

Retsch

SCP-Disintegrator

Innomed-Konsult AB

Sonopuls HD 60

Bandelin Electronic

Elektrophorese

Wide-Mini Sub Cell GT

Biorad

EI9001-Xcell™, Mini Cell

Invitrogen

PCR-Cycler

Personal Cycler

Biometra

Robocycler Gradient 40

Stratagene

Zentrifugen

Du Pont Instruments Sorvall RC-5B

Kendro

Rotina 35R

Hettich

Mikro 22R

Hettich

Centrifuge 5415D

Eppendorf

Speedvac Univapo 150H

Uniequip

Sonstige

Ultrafiltrationszelle Modell 8050, 8010

Amicon

Bildverarbeitung, Eagle-Eye II

Stratagene

Heizblock, Thermostat 5320

Eppendorf

Chemikalien

Alkohole, Ketone, Keto-ester, Tetrahydrofuran und –Derivate sowie Dioxan wurden von Fluka, Sigma oder Aldrich (Deutschland) bezogen. Alle nicht hier aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma, Fluka, Aldrich, Oxoid, Merck oder Roth bezogen und besaßen p.a.-Qualität. Die Nährmedienbestandteile stammen von Merck, Difco, Oxoid und die Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden von Roche Applied Science, BD Clonotech, Stratagene, Fermentas, New England Biolabs oder Amersham Pharmacia bezogen.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Mikroorganismen

Als Wildtyp-Stämme wurden *Rhodococcus erythropolis* und *Rhodococcus ruber* eingesetzt, während *E. coli*-Stämme zur Herstellung rekombinanter Mikroorganismen verwendet wurden. Folgenden Mikroorganismen wurden eingesetzt:

<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43297	DSMZ
<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 219	DSMZ
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10 Gold	Stratagene
<i>E. coli</i> JM105	Amersham Pharmacia Biotech
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Origami (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> ER2420 (K12 Derivat)	New England Biolabs

2.2 Zellanzucht und Medien

Alle Kulturmedien wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren bei 121 °C und 1,4 bar Überdruck für 20 min sterilisiert.

Medien

M65-Medium:

Glucose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
Ad. 1000 ml H ₂ O, pH 7,2	

LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefextrakt	5 g
NaCl	10 g
Ad. 1000 ml H ₂ O, pH 7,5	

Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,5% Bactoagar (Difco) zugegeben.

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden standardmäßig bei 37 °C, 120 Upm in LB-Medium angezogen. Zur Selektion von Transformanten wurden den Kulturen Ampicillin 100µg/ml oder Chloramphenicol 34 µg/ml hinzugefügt. Zur Gewinnung von genomischer DNA aus *Rhodococcus ruber* DSM 219 wurden die Zellen in LB-Medium kultiviert. Die Flüssigkultur wurde bei 37 °C, 120 rpm für 16 h inkubiert. Die Anzucht von *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297 erfolgte in M65-Medium im Schüttelkolben bei 30 °C, 120 rpm für 24 h und 48 h.

2.3 Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Zur Expression der klonierten Gene wurden zwei verschiedene *E. coli* Expressionsstämme eingesetzt, die die Alkoholdehydrogenasen aus *Rhodococcus erythropolis* (*re-adh*) und aus *Rhodococcus ruber* (*rr-adh*) produzieren. Daneben wurden auch Stämme, die das *re-adh* Gen mit optimierter Codon usage enthielten und Mutanten des RR-ADH-Enzyms hergestellt. Ausserdem wurden weitere *E. coli* Stämme, die das Tetrahydrofuran Monooxygenase Gen

aus *Rhodococcus ruber* exprimieren, erzeugt. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Expressionssysteme.

Tab.4 Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendete Expressionssysteme. Aufgeführt wurden die rekombinanten Plasmide und die dazugehörige *E. coli* Stämme. Die Beschreibung der Plasmide ist in der Tabelle 8 (siehe 3.15) aufgeführt.

<i>E. coli</i> Expressionsstamm	Rekombinante Plasmid
JM 105	pRE-ADH1
BL21 (DE3)	pRE-ADH2
BL21(DE3)	pRE-ADH3
BL21(DE3)	pRE-ADH4
JM105	pRE-ADH5
JM105	pRE-ADH6
JM105	pRE-ADH7
BL21 (DE3)	pPAR
BL21 (DE3)	pPAR1
BL21 (DE3)	pPAR2
BL21 (DE3)	pPAR3
BL21 (DE3)	pPAR4
BL21 (DE3)	pPAR5
BL21 (DE3)	pRR-ADH1
BL21 (DE3)	pRR-ADH2
BL21 (DE3)	pRR-ADH3
JM105	pTMO1

Die Expression der *re-adh*, *rr-adh* und *tmo* Gene erfolgte über Anzucht der jeweiligen *E. coli* Zellen in LBamp (*E. coli* JM105) bzw. LBcam [*E. coli* BL21 (DE3)]. Zur Kultivierung der Zellen wurden 5-20 ml Vorkulturen vorbereitet, die mit einzelnen Kolonien von Agarplatten angeimpft wurden. Die Schüttelkulturen wurden bei 37 °C, 120 rpm inkubiert. Die Vorkulturen dienten zur 1%igen Animpfung von Hauptkulturen der Volumina 30 ml – 12 Liter.

Die *E. coli* JM105 Zellen, die die RE-ADH exprimieren, wurden bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert. Die Expression wurde dann durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Es erfolgt ein weiteres Wachstum von 16-18 h, anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 5000 Upm) und bei -20 °C eingefroren oder direkt für weitere Untersuchungen verwendet.

Die Stämme BL21 (DE3) wurden für die Expression der Enzyme RE-ADH und RR-ADH bei 37 °C angezogen; bei einer OD₆₀₀ von 0,3 wurde die Inkubationstemperatur auf 25 °C umgestellt und nach 30 min erfolgt die Genexpression mit 25 µM IPTG. Anschließend wurden die Kulturen nach weiterem Wachstum (16-18 h) abzentrifugiert (15 min, 5000 Upm). Die Expression der *tmo* Gene erfolgte bei 37 °C. Die Induktion der Genexpression wurde bei einer OD₆₀₀ durch Zugabe von 1mM IPTG durchgeführt. Zur Bestimmung der TMO-Aktivität wurden die Zellen nach zusätzlichem Wachstum von 6-10 h geerntet.

2.4 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur Konservierung der *E. coli*-Stämme wurde eine sterilisierte Glycerin/LB-Medium Mischung (50% LB-Medium, 50% Glycerin) hergestellt.

E. coli Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden zur Konservierung mit einer autoklavierten Glycerin/LB-Medium Mischung (Verhältnis 1:1) versetzt und durch vortexen gemischt, so dass der Glyceringehalt in dem Eppendorfgefäß 25 % betrug. Durch diese Mischung wurden den zu konservierenden Zellen frisches LB-Medium zu Verfügung gestellt. Die Kryokulturen wurden für späteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Für die Konservierung der *Rhodococcus* Stämme wurde zu 850 µl Kultur (aus der log-Phase) 150 µl DMSO gegeben und die Suspension bei -80 °C eingefroren.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. 96 %igen technischen kalten Ethanol versetzt und durch mehrmaliges Schwenken gut durchgemischt. Die Mischung wurde für 1 h bei -20 °C inkubiert und anschließend 20 min zentrifugiert (13000 Upm, 4 °C). Das ausgefallene DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen (TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0). Die DNA Lösung wurde bei -20 °C eingefroren.

3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der OD_{260} -Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA [54]. Alternativ zu dieser Methode wurde die Konzentration mittels Agarosegel bestimmt. Die DNA Lösung wurde gemeinsam mit einem DNA-Größenmarker bekannter Konzentration auf das Gel aufgetragen und nach Trennung der Banden wurde die DNA-Konzentration durch Vergleich der Bandenintensitäten abgeschätzt.

3.3 Präparation von DNA

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Mini-prep Kits nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Methode leitet sich von der Plasmid-Minipräparation nach BIRNBOIM und DOLY ab [55]. Die DNA wurde über Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt, als Elutionslösung wurde TE-Puffer, pH 8,0 verwendet. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurden 1,5-3 ml einer 5 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit den geeigneten Antibiotika) eingesetzt.

3.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Rhodoccus-Stämmen

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 100 ml Kultur in einem 500 ml Schüttelkolben. Die *R. erythropolis* Zellen wurden in M65-Medium angeimpft und bei 30 °C für 24 h geschüttelt (120 rpm); für *R. ruber* wurde LB-Medium verwendet. Die Kolben wurden bei 27 °C für 72 h inkubiert.

Die genomische DNA wurde nach [56] wie folgt isoliert: 50 ml der jeweiligen Kultur wurden abzentrifugiert (20 min, 5000 Upm, 4 °C) und das Pellet in 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) mit anschließender 90-minütiger Inkubation bei 37 °C. Die Proben wurden dabei gelegentlich geschüttelt. Die entstandenen Zelllysate wurden mit 100 μl RNAse (10 mg/ml) versetzt und erneut 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 1,5 ml SDS 10 %, 120 μl Proteinase K (10 mg/ml), 1 ml 5 M NaCl und 1,5 ml CTAB/NaCl (10% CTAB; 4,1% NaCl) hinzugefügt und gut gemischt. Diese proteolytische Behandlung erfolgte bei 65 °C, 20 min. Aus diesen

Zelllysaten wurde die genomische DNA durch fraktionierte Phenolfällung von dem restlichen Zellinhalt abgetrennt. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte in zwei Schritte über Zugabe eines gleichen Volumens an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1).

Bei jedem Schritt wurden die Phasen durch vorsichtiges Schwenken vermischt und anschließend durch Zentrifugation bei 13000 Upm (Sorvall R5B, SS34 Rotor, 20 °C 15 min) getrennt. Nach erfolgreicher Phasentrennung wurde jeweils die wäßrige Oberphase für den nächsten Schritt abgenommen. Die Oberphase aus dem Chloroform/ Isoamylalkohol Schritt wurde mit 0,6 Volumen (9ml) Isopropanol vermischt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die DNA ausgefällt und auf einer Pasteurpipette aufgewickelt. Das DNA-Pellet wurde dann 2 x mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumszentrifuge getrocknet und in 300µl TE Puffer aufgenommen.

3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Durchführung der DNA-Spaltung erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Pufferzusammensetzung, Temperatur). Der Verdau genomischer DNA wurde über Nacht durchgeführt (16-18 h).

Für analytische und präparative (Klonierung) Zwecke wurden 0,1-1µg DNA mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen (1-10 U) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze oder Aliquots davon wurden in einem Agarosegel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei präparativen Restriktionsanalysen wurde der gesamte Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und nach der Trennung aus dem Gel isoliert.

3.5 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor effizient durchzuführen, muß die Religation des linearen Plasmids vermieden werden. Dies wird durch die Beseitigung von 5'-Phosphatgruppen bei der DNA-Präparation erzielt. Dazu wird die DNA in 1 x Reaktionspuffer aufgenommen. Es wurden 0,2-1 pmol DNA-Enden pro 1 U alkalischer Phosphatase (SAP; Shrimp alkalische Phosphatase) zugesetzt. Der Ansatz mit den zu dephosphorylie-

renden DNA-Fragmenten wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Desaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) abgestoppt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Agarosegel 0,8 % aufgetragen und die DNA durch Gelextraktion zurückgewonnen.

3.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für analytische und präparative Zwecke wurde die doppelsträngige DNA auf 0,5-2 %ige Agarosegele aufgetragen und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Agarose wurde mit 1 x TAE oder 0,5 x TBE Puffer angefertigt. Diese Agaroselösung wurde in vorher abgedichtete Kammern [Pharmacia] gefüllt. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht wurde der Lösung vor dem Abkühlen 0,05% Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach der Polymerisation der Agarose wurden die Kämme entfernt, die Gele in Elektrophoresekammern mit 1 x TAE Puffer oder 0,5 x TBE Puffer überschichtet und die DNA-Lösungen einpipettiert. Die Elektrophorese der DNA erfolgte bei 80-100mA über einen Zeitraum von 1-2 h.

1 x TAE-Puffer

Tris-Acetat	40 mM	
EDTA	1 mM	pH 8,0

0,5 x TBE Puffer

Tris-Borat	45 mM	
EDTA	1 mM	pH 8,0

Die zu trennende DNA-Lösung wurde mit einfach DNA-Probenpuffer [6 x DNA-Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % Sucrose] versetzt. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas 1 kb-Ladder (GeneRuler) auf das Gel mit aufgetragen. Die Agarosegele wurden mit dem EAGLE-EYE System (Stratagene) dokumentiert.

3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Klonierungsexperimente wurden DNA-Fragmente und PCR-Produkte nach Auftrennung in Agarosegelen unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

3.8 Ligation von DNA Fragmente

3.8.1 Ligation von DNA Fragmenten mit überhängenden Enden

Zur Ligation von DNA Fragmenten wurde das Rapid Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Plasmid-Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment wurden im geeigneten Verhältnis gemischt und in 1 x DNA-Probenpuffer aufgenommen. Die Ligation erfolgt in 1 x Ligationspuffer durch Zugabe von 5 U T4-Ligase bei Raumtemperatur.

3.8.2 Ligation von DNA Fragmenten mit blunt-Enden

Für die bluntend-Ligation wurde der Ansatz 2 h bei 16 °C inkubiert (Plasmidvektor und PCR-Produkt), das genomische DNA Fragment und DNA-Adaptoren oder Plasmid wurden für 16 h bei gleicher Temperatur ligiert. Für die Herstellung von DNA-Banken zur Amplifizierung von DNA Fragmenten mit unbekanntem Sequenzen wurden bluntend verdaute genomische DNA mit Adaptoren (GenomeWalker, CLONTECH) ligiert. Der Reaktionsansatz von 8 µl enthält 0.5 µg DNA, 25 µM Adaptor und 3 U T4- Ligase.

3.9 Kompetente *Escherichia coli* Zellen

Kompetente Zellen der Stämme XL1 Blue, JM105 wurden nach [57] hergestellt. Die Lagerung erfolgte in 100 µl Aliquot bei -80 °C. Kompetente Zellen von *E. coli* XL1 Blue MRF' und Origami (DE3) wurden von Stratagene bzw. von Novagen bezogen.

3.10 Transformation von *Escherichia coli* Zellen

Aliquots von 100µl kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 20-100 µg Plasmid-DNA versetzt. Darauf folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis mit anschließendem

Hitzeschock (90 sec, 42 °C). Dem Ansatz wurden 300µl LB-Medium zupipettiert und 30 min bei 37 °C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden auf eine Agarplatte (LB-Medium mit geeigneten Antibiotika als Selektionsdruck) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR bietet die Möglichkeit, DNA-Fragmente gezielt zu amplifizieren [58]. Zur Herstellung der verschiedenen rekombinanten Plasmide wurde diese Methode verwendet. Die PCR fand in einem Thermocycler sowohl mit beheizbarem Deckel (Biometra) als auch ohne Deckel-Beheizungssystem (Stratagene) statt.

3.11.1 Standard PCR

Als Template dienten sowohl chromosomale DNA aus *R. erythropolis* und *R. ruber* als auch rekombinante Plasmid-DNA. Zur effizienten Amplifizierung (Vermeiden von Sekundärstrukturen der GC-reichen genomischen DNA) des *re-adh* Gens wurde hauptsächlich das Plasmid pRE-ADH (ein 5,2 kb Fragment in pUC18 kloniert) verwendet [59].

Eingesetzt wurde die TITANIUM-Taq-DNA-Polymerase (TITANIUM™Taq: Mischung aus einer am N-Terminus mutierten Taq-Polymerase ohne 5'-Exonuklease-Aktivität und TaqStart™ -Antikörpern) der Firma CLONTECH. DMSO in den Konzentrationen von 5-10 % wurde den Ansätzen zugegeben, um die Effizienz der Reaktion zu erhöhen, indem durch diesen Zusatz die Bildung von Sekundärstrukturen vermieden wurde (Tab. 5 Reaktionsansatz eines Standard PCR).

Tab.5 Zusammensetzung eines Standard PCR-Ansatzes

Komponente	Menge
DNA-Template (Plasmid-DNA)	5-100 ng
Reaktionspuffer 10x	10 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM
Primer A	100 pmol
Primer B	100 pmol
Titanium Taq Polymerase	5 U
Aqua bidest	ad 50 µl

Die PCR Reaktion erfolgte nach dem folgenden Temperaturprogramm:

Initialdenaturierung:	94 °C	3 min
30 Zyklen aus:		
Denaturierung:	94 °C	45 sec
Primeranlagerung:	Tm-3 °C	30 sec
Extension:	68 °C	1 min pro kb

Anschließend wurde die Reaktion beendet über die folgenden beiden Schritte:

Endextension:	68 °C	10 min
Kühlung:	6 °C	Pause

3.11.2 Long-Distance PCR: GenomeWalking

Die Durchführung der Long-Distance PCR erfolgte nach [60]. Zur Isolierung von DNA Fragmenten unbekannter Sequenzen wurde das Universal GenomeWalker Kit (CLONTECH) verwendet. Die DNA Polymerase [Advantage GC-Genomic Polymerase: Mischung aus thermostabiler DNA Polymerase aus *Thermus thermophilus* (Tth DNA Polymerase) mit proofreading Sequenz und TthStartTM (Antikörper um ein automatisches „hot start“ zu gewährleisten) und das GC-Melt, die in dem Kit enthalten sind, ermöglichen die Amplifikation von DNA Fragmenten aus einem GC-reichen DNA-Template (Tab. 6 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes).

Tab.6 Zusammensetzung einer primären PCR (GenomeWalking)

Komponente	Menge
DNA-Template (DNA Bank)	ca. 20 ng
GC-Genomic PCR Reaktion Puffer 5 x	10 µl
Mg(OAc) ₂	1,1 mM
GC-Melt	1 M
AP1 (Adaptor-Primer 1)	10 pmol
GSP-Primer 1	100 pmol
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM
Advantage GC-Genomic Polymerase	5 U
Aqua. bidest	ad 50 µl

Der aus der primären PCR gewonnene Ansatz wurde 1/25 verdünnt und als Template für die sekundäre (nested) PCR eingesetzt. In Tab. 7 ist die Zusammensetzung der nested PCR beschrieben.

Tab.7 Zusammensetzung einer sekundären (nested) PCR [GenomeWalking]

Komponente	Menge
DNA-Template (aus primärer PCR)	ca. 20 ng
GC-Genomic PCR Reaktion Puffer 5 x	10 µl
Mg(OAc) ₂	1,1 mM
GC-Melt	1 M
AP2 (Adaptor-Primer 2)	10 pmol
GSP-Primer 2	100 pmol
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM
Advantage GC-Genomic Polymerase	5 U
Aqua. bidest	ad 50 µl

Während der Genome-Walker PCR wurden die Proben stets mit 40 µl Mineralöl überschichtet.

Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet:

Primäre PCR

7 Zyklen

94 °C 25 sec

72 °C 3 min

32 Zyklen

94 °C 25 sec

67 °C 3 min

Endextension

67 °C 7 min

Sekundäre PCR

Die Zyklenzahlen ändern sich von 7 auf 5 und 32 auf 25.

3.12 Konstruktion synthetischer Oligonukleotiden

Die Oligonukleotid-Primer wurden über die Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die folgende Formel diente zur Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotide:

Schmelztemperatur T_m in °C = $69,3 + 0,41 \times [\text{GC-Gehalt in \%}] - 650 / [\text{Anzahl an Nukleotiden}]$.

Die verwendeten Primer sind im [Anhang] aufgelistet.

3.13 DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) mit ABI-Nukleinsäure-Sequenzierautomaten durchgeführt unter Verwendung geeigneter Oligonukleotid-Primer.

3.14 Herstellung einer DNA-Bank

Zur Amplifizierung von DNA Fragmenten upstream und downstream bekannter Sequenzen wurde genomische DNA von *R. erythropolis* und *R. ruber* mit verschiedenen

Restriktionsendonukleasen (Eco47-3, EheI, NruI, PvuII, ScaI, SmaI) für ca. 16 h verdaut. Die Nukleinsäuren wurden aus den enzymatische Ansätzen gereinigt (Qiagen Gelextraktion Kit). Die Erzeugung der DNA-Bibliothek erfolgte über die Ligation (16 °C, 16-18 h) der entstandenen blunt-end Fragmente mit einem Linker (Genome-Walker Adaptor). Die Ligationsansätze wurden als Template für die Long Distance PCR verwendet.

3.14 Gezielte Mutagenese

Die gerichtete Änderung von Nukleotidsequenzen wurde zur Einführung von Aminosäureaustauschen oder zur Optimierung der Codon-Verwendung durchgeführt. Diese erfolgte nach dem Prinzip der überlappenden PCR [61]. Dazu wurden zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Enden erzeugt, welche die gewünschten Mutationen tragen. Über eine zweite PCR wurden die beiden Fragmente fusioniert. Dabei dienten die überlappenden 3'-Enden jeden Strangs als Primer für die Synthese des Gegenstrangs. Das resultierende Fusionsprodukt wurde mit Hilfe von äußeren Primern, die dem 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden Genes entsprechen, vermehrt.

Der Ablauf der Reaktion ist schematisch in folgender Abbildung dargestellt:

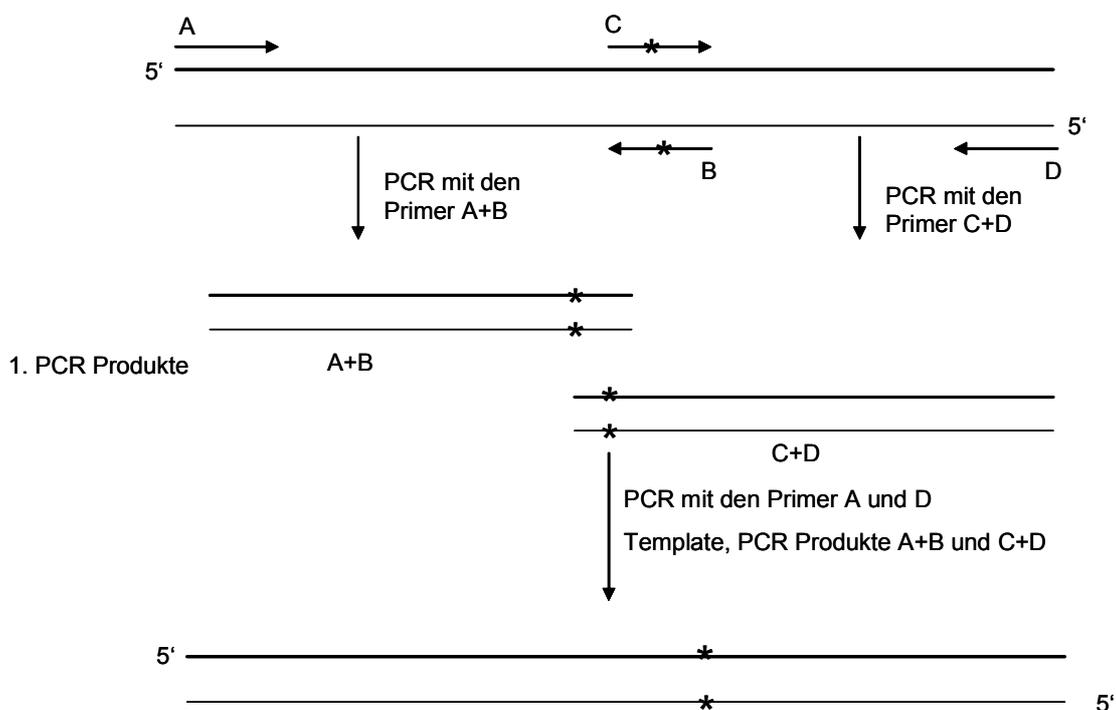


Abb. 7 Schematische Darstellung der Mutagenese mittels PCR nach der Methode der „Overlap extension PCR“. Die überlappenden Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Trennung und Isolierung in äquimolaren Mengen eingesetzt (50-100 ng). Die Annealing-Temperatur der PCR richtet sich nach der Schmelztemperatur der überlappenden Sequenz.

3.15 Plasmid-Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Klonierung der verschiedenen Gene und deren Expression kommerziell zugängliche Plasmid-Vektoren verwendet. Die für diese Plasmide relevanten Eigenschaften sind in der Tabelle 8 beschrieben.

Tab.8 Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Quelle, Referenz
pBluescript II SK (+)	Klonierungsvektor; Amp ^r	Stratagene, Amsterdam
pACYC184	Klonierungsvektor; Cam ^r , Tet ^r ; p15Aori	[62]
pKK223-3	Expressionsvektor; Amp ^r ; P _{tac} ; pBR322ori	Amersham Pharmacia, Freiburg
pET11a	Expressionsvektor (Novagen); Amp ^r ; P _{T7} ; ColE1	Novagen, Darmstadt
pRE-ADH	pUC18-Derivat; Amp ^r , 5,2 kb EcoRI Fragment, mit dem <i>re-adh</i> ORF	[59]
pKA1	Expressionsvektor; pACYC184-Derivat; P _{T7} ; Cam ^r	diese Arbeit
pRE-ADH1	pKK223-3-Derivat, <i>re-adh</i> Gen über EcoRI/HindIII kloniert, Amp ^r ;	diese Arbeit
pRE-ADH2	pET11a-Derivat, <i>re-adh</i> Gen über NdeI/BamHI kloniert, Amp ^r	
pRE-ADH3	pKA1-Derivat, Cam ^r ; <i>re-adh</i> Gen über NdeI/BamHI kloniert, Cam ^r	diese Arbeit
pRE-ADH4	pKA1-Derivat, <i>re-adh</i> Gen Variante mit optimiertem Arginin-Codon; Klonierung über NdeI/BamHI	diese Arbeit
pRE-ADH5	pKK223-3-Derivat, <i>re-adh</i> Gen Variante mit optimiertem Prolin-Codon; Klonierung über EcoRI/HindIII	diese Arbeit
pRE-ADH6	pKK223-3-Derivat, <i>re-adh</i> Gen Variante mit optimierten Arginin- und Prolin-Codon; Klonierung über EcoRI/HindIII	diese Arbeit
pRE-ADH7	pKK223-3-Derivat, <i>re-adh</i> Variante mit His ₆ -Tag	diese Arbeit
pPAR	1158 bp in pKA1, exprimiert PAR	diese Arbeit
pPAR1	1157 bp (Insertion des G-949) in pKA1 kloniert,	diese Arbeit

Fortsetzung Tab.8 Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Quelle, Referenz
pPAR2	1158 bp (Insertion G-949 und T-1025)/pKA1 Derivat	diese Arbeit
pPAR3	<i>par353</i> /pKA1 Derivat, exprimiert PAR353	diese Arbeit
pPAR4	1157 bp <i>R. erythropolis</i> DNA in pKA1 kloniert über NdeI/BamHI; Deletion des G-1025	diese Arbeit
pPAR5	<i>par348</i> in pKA1, exprimiert PAR348	diese Arbeit
pRR-ADH1	pKA1-Derivat, <i>rr-adh</i> Gen über NdeI/BamHI kloniert	diese Arbeit
pRR-ADH2	pKA1-Derivat, <i>rr-adh</i> , Mutante R338S	diese Arbeit
pRR-ADH3	pKA1-Derivat, <i>rr-adh</i> , Mutante R338E	diese Arbeit
pTMO	pBluescript II SK(+)-Derivat, <i>tmo</i> Gene über NotI/EcoRV kloniert	diese Arbeit
pTMO1	pKK223-3-Derivat, <i>tmo</i> Gene in die SmaI Schnittstelle kloniert	diese Arbeit

3.16 Konstruktion eines Expressionsplasmids mit niedriger**Kopienzahlen**

Zur Optimierung der Expression der Alkoholdehydrogenase-Gene *re-adh*, *rr-adh* und ihrer jeweiligen Mutanten und Varianten wurde aus den kommerziell erhältlichen Expressionsplasmiden pET11a (Novagen) und pACYC184 [62] das pKA1 Plasmid konstruiert. Zur Isolierung des pACYC184 Plasmids wurde *E coli* ER2420 (K12 Derivat)/ pACYC184 in 5 ml LBcam/Tet kultiviert. Die Antibiotika Chloramphenicol und Tetrazyclin wurden in den Konzentrationen von je 34 und 50 µg/ml verwendet. Aufgrund der geringen Kopienzahl (10-15 Kopien pro Zelle) des Plasmids wurde der Kultur bei einer OD₆₀₀ 0,5 Spectinomycin (40 µg/ml) zugesetzt. Die Isolierung der Plasmide (pACYC184 und pET11a) erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Isolierungskit. Zur Konstruktion des pKA1-Expressionsvektors wurden die Plasmide pET11a und pACYC184 mit den Restriktionsendonucleasen HindIII und NruI verdaut. Das 2260 bp große pET11a Fragment enthält die Expressionselemente lac I, T 7 Promotor und T 7 Terminator. Dieses Fragment wurde an das 3299 bp große HindIII/NruI pACYC184 Fragment ligiert. Durch den Verdau mit HindIII/NruI wurde das Tetracyclin-Gen (Tet) des pACYC184 inaktiviert. Das entstandene Plasmid pKA1 (Cam^r, 5559 bp) wurde zur

Vermehrung in *E. coli* Zellen XL1 Blue transformiert und auf LB Agar Platten mit Chloramphenicol (40 µg/ml) ausplattiert.

4. Biochemische Methoden

4.1 Zellaufschluß und Rohextraktgewinnung

Die rekombinanten *E. coli* Zellen, die die Alkoholdehydrogenasen exprimieren, wurden in 100 mM Kpi Puffer, pH 6,0 resuspendiert (40 % oder 20 % Zellsuspension) und mit Ultraschall (Zyklen 50, Power 100 %) 2 x 1 min mit 15 sec Kühlungsintervallen aufgeschlossen. Der Aufschluß der TMO exprimierenden Zellen wurde in 100 mM Kpi Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Größere Zellenmenge wurden entweder in einer Schwingmühle (bis zu 10 ml Zellsuspension) der Firma Retsch GmbH & Co KG [63] oder in einem Disintegrator S IMA (20-50 ml, 4000 Upm) aufgeschlossen. Dazu wurde zu der Zellsuspension der 2-fache Gewichtsanteil an Glasperlen (Φ 0,3 mm) zugegeben, die vorher mit 10 % PEG 6000 behandelt wurden. Die Glasperlen und Zelltrümmer wurden anschließend aus dem Zellhomogenat abzentrifugiert (15 min 5000 Upm). Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Pellet mit dem Aufschlusspuffer gewaschen, erneut zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Rhodococcus-Zellen wurden generell mechanisch aufgeschlossen. Die gewonnenen Rohextrakte wurden auf Enzymaktivität getestet und für weitere analytische Untersuchungen aufbewahrt.

Für die effiziente Verwendung der Enzyme wurde die RE-ADH an das Trägermaterial Ni²⁺-NTA (Qiagen, Hilden) immobilisiert, eine hochvernetzte Agarosematrix mit Nitrilotriessigsäure-Liganden, an denen Ni²⁺-Ionen koordinativ gebunden sind. Zur Immobilisierung der His₆-RE-ADH Proteine wurden die rekombinanten *E. coli* Zellen enzymatisch in einem Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0) aufgeschlossen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe einer Lysozymlösung (zellwandabbauendes Enzym) mit der Endkonzentration von 1 mg/ml für 1 h bei 37 °C. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 Upm) und das zellfreie Rohextrakt zur Enzymaktivitätsbestimmung und für die Immobilisierungsversuche verwendet.

4.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

4.2.1 Photometrische Aktivitätsbestimmung

4.2.1.1 Aktivitätstest der Alkoholdehydrogenasen

Die Bestimmung der Aktivität der ADHs erfolgte photometrisch. Der Test wurde bei 30 °C und pH 6,0 durchgeführt und verlief über die Messung der Extinktionsabnahme oder -zunahme von NADH bei 340 nm. Diese beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Die Enzymaktivitäten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$U = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot \epsilon \cdot v}$$

ΔE	Extinktionsänderung
V	Gesamtvolumen des Ansatzes (ml)
v	Enzymvolumen (ml)
ϵ	Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [$\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22$]
d	Schichtdicke der Küvette (cm)

Standardmässig wurde die Aktivität der Alkoholdehydrogenasen in einem Reaktionsvolumen von 1 ml bestimmt. Als Substrat diente p-Cl-Acetophenon für die Reduktionsreaktion und racemisches p-Cl-Phenylethanol für die Oxidationsreaktion. Die Konzentrationen betragen 3 mM. Nach 2-5 minütiger Vorinkubation bei 30 °C wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet.

Reaktionsansätze:

Reduktionsreaktion

970 μl 100 mM Kpi (pH 6,0) mit 3 mM p-Cl-Acetophenon (2,9 mM im Test)
20 μl 12,5 mM NADH (0,25 mM im Test)
10 μl Enzymlösung

Oxidationsreaktion

970 μl 100 mM Kpi (pH 6,0) mit 3 mM p-Cl-Phenylethanol (2,9 mM im Test)
20 μl 25 mM (0,5 mM NAD im Test)
10 μl Enzymlösung

4.2.1.2 Monooxygenase Aktivität

Der Reaktionsansatz (1 ml) für die photometrische Bestimmung (Messung der Extinktionsabnahme von NADH Abnahme bei 340 nm) der Monooxygenase Aktivität besteht aus:

3 mM Substrat [Tetrahydrofuran (THF) oder 2-Methyl-Tetrahydrofuran] gelöst in 100 mM Kpi-Puffer
1 mM NADH
0,1 mM FAD
0,1 mM FMN

Die Reaktion wurde mit 10 µl (Enzym) Rohextrakt gestartet.

4.2.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde zur Bestimmung der optischen Reinheit von Reaktionsprodukten verwendet. Daneben diente sie als Methode zur Messung von Enzymaktivitäten in präparativen Ansätzen sowie zur Aktivitätsbestimmung der auf Ni²⁺-NTA immobilisierten RE-ADH. Für die Gaschromatographie wurde das chirale Säulenmaterial CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack) eingesetzt. Die Messung wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 60 °C, 5 min; Gradient 5 °C/min bis 190 °C.

4.2.2.1 Präparative Umsetzung von Ketonen mittels isolierter Alkoholdehydrogenasen

Zur Untersuchung des biotechnologischen Potentials der Alkoholdehydrogenasen wurden die RE-ADH, RR-ADH und die davon abgeleiteten Mutanten auf ihre Fähigkeit, verschiedene Ketone enantioselektiv zu reduzieren, getestet. Wie im photometrischen Test wurde als Substrat p-Cl-Acetophenon und p-Cl-Phenylethanol in den Konzentrationen 5-10 mM verwendet. Um einen weitgehend vollständigen Umsatz zu ermöglichen, wurden für die Regenerierung des Coenzym NADH Formiat und das Enzym Formiat Dehydrogenase (FDH) zugesetzt. Der Reaktionsansatz von 1 ml enthält:

5-10 mM Substrat
5 mM NAD
1 U FDH
100mM Na-formiat (in 100 mM Kpi-Puffer, pH 6,0)

Die Reaktion fand bei 30 °C statt.

Zur GC-Analytik wurden 100 µl Proben nach 0 min, 5 min, 10 min und 30 min genommen und die organische Phase mittels 100 µl Chloroform extrahiert.

4.2.2.2 Reduktion von Ketonen mittels immobilisierter RE-ADH

Der Reaktionsansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität in Immobilisaten ähnelt dem Ansatz mit dem löslichen Enzym. Anstatt des Rohextrakts wurden Immobilisate eingesetzt.

- Ansatz mit RE-ADH/ Ni^{2+} -NTA Immobilisat

30 mg des Immobilisats wurde zum Reaktionsansatz gegeben. Die Probenahme (100 µl) fand nach 0 min und anschließend jede 5 min bis 30 min statt.

4.2.2.3 Monooxygenase Aktivität

Der Ansatz zur Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität am GC enthielt wie bereits unter 4.2.2.1 beschrieben ein Regenerierungssystem (Formiat und Formiat-Dehydrogenase). Die Umsetzung der zu untersuchenden Substrate wurde in kleinem Maßstab (1 ml) durchgeführt.

Ansatz mit Regenerierung von NADH

3, 5 und 10 mM Substrat (THF oder 2-Methyl-THF) in 100 mM Kpi-Puffer
1 mM NADH
0,1 mM FAD
0,1 mM FMN
100 mM Natrium-Formiat
2 U FDH

Die Reaktion wurde mit 20 µl Rohextrakt gestartet. Es wurden 100 µl Proben nach 5, 20, 60 und 120 min genommen und die organische Phase mit 100 µl Chloroform extrahiert (Proben und Chloroform gut gemischt und 5 min. 13000 Upm abzentrifugiert). Eine Nullprobe wurde vor der Zugabe des Rohextraktes entnommen und wie oben behandelt.

Wegen der leichten Flüchtigkeit der Substraten THF, 2-Methyl-THF und der entsprechenden Produkte der Monooxygenase-Reaktion wurde das Temperaturprogramm im GC optimiert; die Starttemperatur lag hier bei 40 °C (niedrigere Temperaturen waren aus technischen Gründen nicht einstellbar).

4.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer Proteinlösung erfolgte nach Bradford [64]. Das Prinzip beruht auf der Bindung des ionischen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische Aminosäuren. Zur Herstellung der Bradford-Reagenzlösung wurden 100 mg des Farbstoffs in 50 ml 96 %igen (v/v) Ethanol gelöst, mit 100 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit dest. H₂O auf 1 L aufgefüllt. Für die Probenvorbereitung wurde 100 µl Proteinlösung mit 900 µl Bradford-Reagenz gemischt und der Ansatz mindestens 5 min bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt. Als Referenz wurde Puffer anstelle der Proteinlösung verwendet. Anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve (Bereich 20-100 µg/ml) konnten die Proteinwerte ermittelt werden.

4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Dokumentierung der einzelnen Aufreinigungsschritte sowie zur Analyse der Expressionsleistung wurden die proteinhaltigen Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde entweder mit selbstangefertigten 12 %igen Acrylamidgelen nach der Methode von Laemmli [65] oder mit einem NuPAGE-Gelelektrophorese-System (Bis-Tris-12 % Gele und 4-12% Gradientengele) durchgeführt. Als Laufpuffer für die fertigen Gele wurde ein MES-Puffer gemäß der NuPAGE-Anleitung verwendet. Für die Coomassie Färbung wurde SimpleBlue-SafeStain (Invitrogen) verwendet. Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Blum [66] durchgeführt.

4.5 Aufreinigung der Alkoholdehydrogenasen

4.5.1 Hitzefällung

Die RE-ADH, RR-ADH und einige ihrer Mutanten sind hitzestabil. Diese Eigenschaft wurde für den ersten Aufreinigungsschritt ausgenutzt. Dazu wurden die RE-ADH Rohextrakte bei 65 °C für 15 min behandelt, während die RR-ADH Rohextrakte bei 60 °C für 15 min inkubiert wurden. Kleinere Mengen an Enzymlösung wurden im Heizblock inkubiert; für größere Mengen wurde ein Wasserbad verwendet. Die ausgefällten Fremdproteine wurden durch Zentrifugation (15 min, 5000 Upm. 4 °C) abgetrennt und der Überstand für die weitere Reinigung durch Anionenaustausch-Chromatographie eingesetzt.

4.5.2 Ionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose FF)

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie binden die Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix. Der hier verwendete Anionenaustauscher, Q-Sepharose FF (Amersham Pharmacia, 1 x 10 cm) trägt positiv geladene quarternäre Ammoniumionen. Dieses Säulenmaterial wurde für die Aufreinigung sowohl von RE-ADH als auch RR-ADH und ihren jeweiligen Mutanten verwendet. Die Säule wurde dazu mit 50 mM TEA Puffer pH 7,0 äquilibriert. Die gebundenen Proteine wurden in einem 3-Stufen NaCl Gradienten (0-1 M) eluiert. Die RE-ADH eluierte vom Anionenaustauscher mit 0,7 M NaCl. Die RR-ADH wurde deutlich schwächer gebunden, sie eluierte bei 0,3 M NaCl. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und entweder aufkonzentriert oder direkt für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

4.5.3 Hydrophobe Interaktion Chromatographie

Die RE-ADH wurde zur Homogenität gereinigt. Die aus dem zweiten Reinigungsschritt (nach Hitzefällung und Q-Sepharose FF) gewonnene Enzymlösung wurde weiter mittels einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) gereinigt. Dazu wurde Butyl-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen von Äquilibrierungspuffer (50 mM TEA pH 7,0; 1,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) versetzt und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierten Säule (Butyl-Sepharose 4FF, 0,7 x 2.5 cm) gegeben. Die Elution erfolgte über einen fallenden 3-Stufengradienten mit Ammoniumsulfat von 1,8 bis 0 M. Die RE-ADH eluierte bei einer Salzkonzentration von 0,18 M. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration entsalzt.

4.5.4 Ultrafiltration (Amicon YM10)

Die Ultrafiltration wurde eingesetzt, um die aus der chromatographischen Reinigung gesammelten Fraktionen aufzukonzentrieren und gegebenenfalls die Proteinlösung umzupuffern. Hierzu wurden Rührzellen mit Amicon YM 10-Membranen (10 kDa Ausschlussgröße) verwendet.

4.6 Lagerung und Stabilität der Proteinlösungen

Da sich die Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* RE-ADH in sehr vielen Versuchen als sehr stabil gezeigt hat, wurden keine speziellen Lagerungstest für dieses Enzym durchgeführt. RE-ADH wurde über mehrere Monate ohne stärkeren Aktivitätsverlust bei 4 °C aufbewahrt. Alternativ wurden die Stabilität der RR-ADH, der PAR und deren jeweiligen Mutanten mit verschiedenen Zusätzen von Glycerin oder Ammoniumsulfat bei -20 °C getestet.

4.7 Substratspektrum und Kinetik

4.7.1 Kinetik der ADHs

Sowohl die Reduktions- als auch die Oxidationsreaktion der Alkoholdehydrogenasen wurden kinetisch untersucht. K_M - und V_{max} -Werte für verschiedene Substrate (Ketone, Aldehyde und Ketoester) und reduziertes bzw. oxidiertes Coenzym (NADH, NAD) wurden bestimmt. Dazu wurden homogene oder partiell aufgereinigte Enzymlösungen in Doppelansätzen verwendet. Die Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte erfolgte durch die Messung der Anfangsgeschwindigkeit v im Photometer bei verschiedenen Substratkonzentration bzw. NADH- und NAD-Konzentrationen.

Die Berechnung der kinetischen Daten erfolgte nach der Michaelis-Menten Gleichung:

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

S	Substratkonzentration [mM]
v	Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]
K_M	Michaelis-Menten Konstante [mM]

Bei Berücksichtigung einer Substratüberschuß-Inhibierung wurde die folgende Gleichung zur Berechnung der kinetischen Konstanten verwendet:

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

Ki Substratinhibierungskonstante [mM]

4.7.2 Substratspektrum

Zur Aufnahme von Substratspektren wurde die relative Aktivität der Alkoholdehydrogenasen (RE-ADH, RR-ADH und Mutanten) gegenüber verschiedenen Ketonen, Aldehyden, α - und β -Ketoester bestimmt. Bei der Wahl der zu untersuchenden Substrate wurde die Position der C=O Gruppe und die Länge der Seitenketten berücksichtigt, so dass eine Aussage über die Art der Substratbindung gemacht werden kann. Die Bestimmung erfolgte photometrisch.

4.8 Immobilisierungsversuche

Die RE-ADH wurde auf dem Trägermaterial Ni²⁺-NTA (Qiagen) immobilisiert. Die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) stellt eine affinitätschromatographische Methode zur Feinreinigung von Proteine dar und beruht auf der Fähigkeit bestimmter Aminosäuren (insbesondere Histidin), bei neutralem pH einen Chelatkomplex mit den bivalenten Metallionen wie Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ und Co²⁺ zu bilden. Das Trägermaterial ist eine Agarosematrix mit Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA)-Liganden und enthält Nickel als zweiwertiges Metallion. Dieses Material wird zur Aufreinigung von Proteinen verwendet. Die Bindung des Proteins erfolgt durch die Wechselwirkung zwischen dem Nickel-Ion und Histidinresten der Proteinkette (siehe Abbildung 8). Zur besseren Bindung werden üblicherweise Histidinreste (His-Tag) entweder am N-Terminus oder C-Terminus der Aminosäurekette des zu untersuchenden Proteins angehängt.

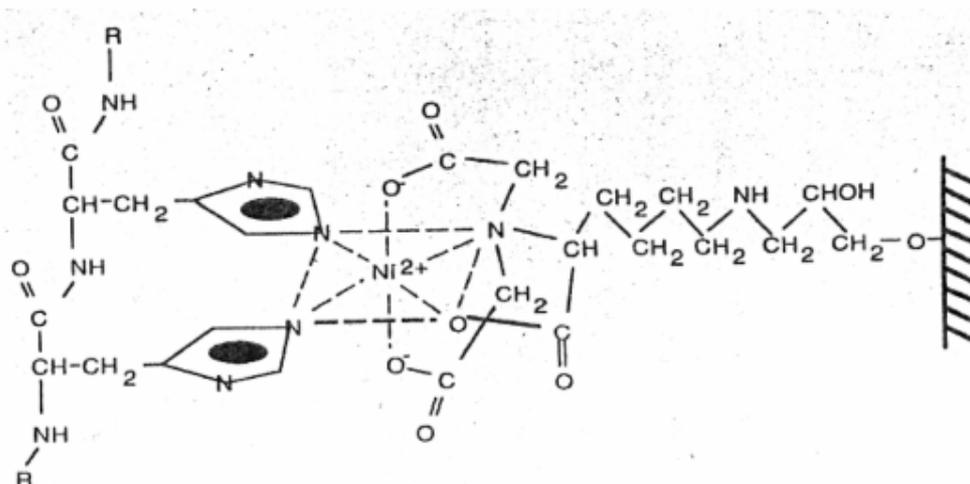


Abb. 8 Spezifische Bindung eines Histidinfusionsproteins an die Ni-NTA-Matrix.

Diese Eigenschaft des Ni^{2+} -NTA Materials wurde zur Immobilisierung der RE-ADH genutzt. Dazu wurde RE-ADH mit einem His₆-Tag am C-Terminus erzeugt. Zellenfreier Rohextrakt wurde aus dem rekombinanten Stamm *E. coli* JM105/pRE-ADH7 präpariert. Zur Herstellung der rekombinanten Zellen wurde das *re-adh* Gen mit dem Primerpaar RE1-5'/RE7-3' amplifiziert. Der Oligoprimer RE7-3' ermöglicht das Einfügen des His-Tag. Die Klonierung erfolgte nach dem im Ergebnisteil A.1 gezeigten Schema 9. Die Kultivierung der Zellen zur Expression wurde analog zu der Kultivierung der Zellen *E. coli* JM105/pRE-ADH1 durchgeführt (siehe Ergebnis A.1). Die Immobilisierung erfolgte über Zugabe von 300 mg des Trägermaterials Ni^{2+} -NTA zu 1 ml Enzymlösung der Aktivität von 13 U/ml; die Mischung wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Mischung wurde der Überstand für die Bestimmung der Restaktivität (ungebundenes Enzym) aufbewahrt und das Pellet als Immobilisat für präparative Umsetzungen von p-Cl-Acetophenon unter Coenzym-Regenerierung verwendet.

4.9 Untersuchung zum Einfluß von Zn^{2+} -Ionen auf die Expression der Alkoholdehydrogenase

Die meisten Alkoholdehydrogenasen gehören zu den Zink-enthaltenden Enzymen. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Zn^{2+} -Ionen auf der RE-ADH untersucht. Dazu wurden

verschiedene ZnCl_2 -Konzentrationen sowohl zum Aufschluß-Puffer als auch zum Wachstumsmedium gegeben. Damit konnte bestimmt werden, inwiefern Zn^{2+} für die Bildung eines enzymatisch aktiven Proteins benötigt wird. Die rekombinanten *E. coli* Stämme JM105/pRE-ADH1 und BL21 (DE3)/pRE-ADH4 wurden für den Test verwendet.

4.9.1 Zinkzugabe zum Aufschlusspuffer

Die rekombinanten *E. coli* Stämme wurden zur Herstellung des Rohextraktes nach Zentrifugation in 100 mM Kpi-Puffer pH 6 resuspendiert (40 %ige Zellesuspension). Dieser Puffer enthielt verschiedene ZnCl_2 -Konzentrationen: 10 μM , 50 μM , 100 μM und 150 μM . Eingesetzt wurde der Stamm JM105/pRE-ADH1. Da die Expression der RE-ADH mit dem System BL21 (DE3)/pRE-ADH4 besser verlief, wurden die Untersuchung zum Einfluß von Zink mit höheren Konzentrationen (50 μM , 100 μM , 500 μM , 1 mM, und 2mM) durchgeführt, um eine effiziente Versorgung des exprimierten Proteins mit Metall-Ionen zu gewährleisten. Der Aufschluß erfolgte über Ultraschall (siehe 4.1)

4.9.2 Zinkzugabe zum Wachstumsmedium

Die *E. coli* JM105/pRE-ADH1-Zellen wurden bei 30 °C, 120 Upm in LBamp mit 50 μM und 100 μM sterilfiltriertem ZnCl_2 angezogen. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde die Expression der ADH durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, die Kultur wurde über Nacht für weitere 16 Stunden inkubiert. *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurden zur Expression in LBcam bei 37 °C kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,3 wurde die Anzuchttemperatur auf 25 °C umgestellt und ZnCl_2 (Konzentrationen: 10 μM , 500 μM , 1 mM und 2 mM) der Kultur zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei dieser Temperatur wurde die Expression der ADH durch Zugabe von 25 μM IPTG induziert und die Zellen für weitere 16 h inkubiert.

Der Einfluß von Zinkionen auf die Expression der RE-ADH in den beiden Stämmen wurde sowohl durch die photometrische Bestimmung der Enzymaktivitäten (siehe 4.2.1.1) als auch durch eine SDS-PAGE (Expressionsleistung) untersucht.

4.9.3 Bestimmung von Zinkgehalt in ADH-Proteine

Um einen Zusammenhang zwischen den Aktivitäten der unter verschiedenen Bedingungen (Anzucht der rekombinanten Zellen mit und ohne zusätzliche Zinkionen im Medium) exprimierten ADH und dem Zinkgehalt in den Proteinlösungen herauszufinden, wurde die Konzentration des Metallions gemessen. Die Bestimmung erfolgte mittels LA-ICP-MS (Laser Ablations-Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie) und wurde im Forschungszentrum Jülich (Zentralabteilung für chemische Analysen, ZCH; Frau Dr. Becker) durchgeführt [67].

Ergebnisse

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, das reduktive Potential des Gram-positiven Bakteriums *R. erythropolis* zu untersuchen. Dieses führte zur biochemischen Charakterisierung neuer Alkoholdehydrogenasen, die für die Synthese enantiomerenreiner chiraler Alkohole und Hydroxyester eingesetzt werden können. Die präparativen Anwendungen der neuen Alkoholdehydrogenasen zur stereospezifischen Reduktion von Ketonen wurde ebenfalls untersucht. Eine wesentliche Limitierung für die Anwendung des Enzyms bestand in der Bereitstellung größerer Mengen an Enzym. Daher wurde nach Aufklärung der Gensequenz die Klonierung und Überexpression mit DNA-Rekombinationstechniken detailliert untersucht.

Das Gram-negative Bakterium *E. coli* stellt aufgrund der erheblichen Kenntnisse, die über die Genetik dieses Mikroorganismus verfügbar sind [68, 69], die Wirtszelle der Wahl für die heterologe Expression von Proteinen dar. Zur Herstellung der rekombinanten ADHs wurde ausschließlich dieses Expressionssystem verwendet.

Die Alkoholdehydrogenasen gehören zu den Redox-Enzymen, sie benötigen für den Hydrid-Transfer NAD oder NADP als Coenzym. Die technische Anwendung dieser Enzyme erfordert die Verfügbarkeit von Regenerierungssystemen für diese Coenzyme [70]. Aufgrund der vielen entwickelten Regenerierungs-Methoden für NADH und den deutlich niedrigeren Preis dieses Coenzym im Vergleich zu NADP sind die entsprechenden NAD-abhängigen Alkoholdehydrogenasen für Anwendungen bevorzugt [21].

Eine weitere Voraussetzung für die Anwendung der ADHs stellt die Kenntnis und Charakterisierung des Substratspektrums dar. Viele Alkoholdehydrogenasen weisen nur ein relativ begrenztes Substratspektrum auf, wobei die für die Anwendung interessanten Ketone, beispielsweise aromatische oder halogen-substituierte Ketone mit den bekannten Enzymen aber nicht umgesetzt werden, so dass die Suche nach neuen Enzyme weiterhin von großem Interesse ist.

Generell ist die Stabilität von Biokatalysatoren ein entscheidender Faktor für ihre technische Anwendung. Thermostabile Alkoholdehydrogenasen [8, 71, 72] sind beschrieben, jedoch ist ihre technische Anwendung in vielen Fällen durch ungünstige Substratspektren beschränkt.

Vorversuche mit der NAD-abhängigen ADH aus *R. erythropolis* haben gezeigt, dass dieses Enzym ein interessantes präparatives Potential besitzt: es setzt ein breites Spektrum an Ketonen (verschiedenste Acetophenone, Aldehyde, Ketoester) um und ist sehr stabil. Es verhält sich von der Stabilität her wie ein Enzym aus einem thermophilen Organismus, obwohl der Wirtstamm *R. erythropolis* eindeutig mesophil ist mit einem Wachstumsoptimum bei ca. 30 °C.

A. Expression der Alkoholdehydrogenasen

Eine Reihe von bakteriellen Alkoholdehydrogenasen wurde in *E. coli* überexprimiert unter Verwendung von kommerziell verfügbaren Expressionsvektoren wie pTrc99 (trc-Promotor) und pKK223-3 (Tac-Promotor); gute Ausbeuten an rekombinanten ADH-Proteinen wurden ebenfalls erhalten mit Hilfe des T7-basierten pET-Vektors. Die meisten ADHs sind aus thermophilen bzw. hyperthermophilen Bakterien. Alkoholdehydrogenasen aus Archaeobakterien wurden ebenfalls in *E. coli* exprimiert. Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über die bekanntesten bakteriellen Enzyme.

Über die Expression von Alkoholdehydrogenasen aus Gram-positiven Bakterien wie *Rhodococcus* in *E. coli* sind in der Literatur allerdings praktisch keine Angaben zu finden.

Tab. 9 Überblick über bakterielle Alkoholdehydrogenasen, die rekombinant verfügbar sind

Bakterium/ADH/Coenzym	Verwendeter Expressionsvektor	Quelle
<i>Bacillus stearothermophilus</i> /ADH-hT/NAD	pTrc99A	[11]
Hyperthermophiles Archaeabakt. <i>Thermococcus hydrothermalis</i> ADH/NADP	pET	[12]
Hyperthermophiles Archaeabakt. <i>Aeropyrum pernix</i> ApADH/NAD	pTrc99A	[8]
Thermoacidophiles Archaeabakt. <i>Sulfolobus solfataricus</i> SsADH/NAD	pTrc99A	[13]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200 ADH/NADP	Konstitutiv mit eigenem Promotor in <i>E. coli</i> exprimiert/pET	[14]
<i>Thermoanaerobacter brockii</i> TbADH/NADP	pET	[15]
<i>Clostridium beijerinckii</i> CbADH/NADP	pUC	[15]

1. Expression der Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* (RE-ADH)

Die Vorgehensweise der Klonierung und Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene wird schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt.

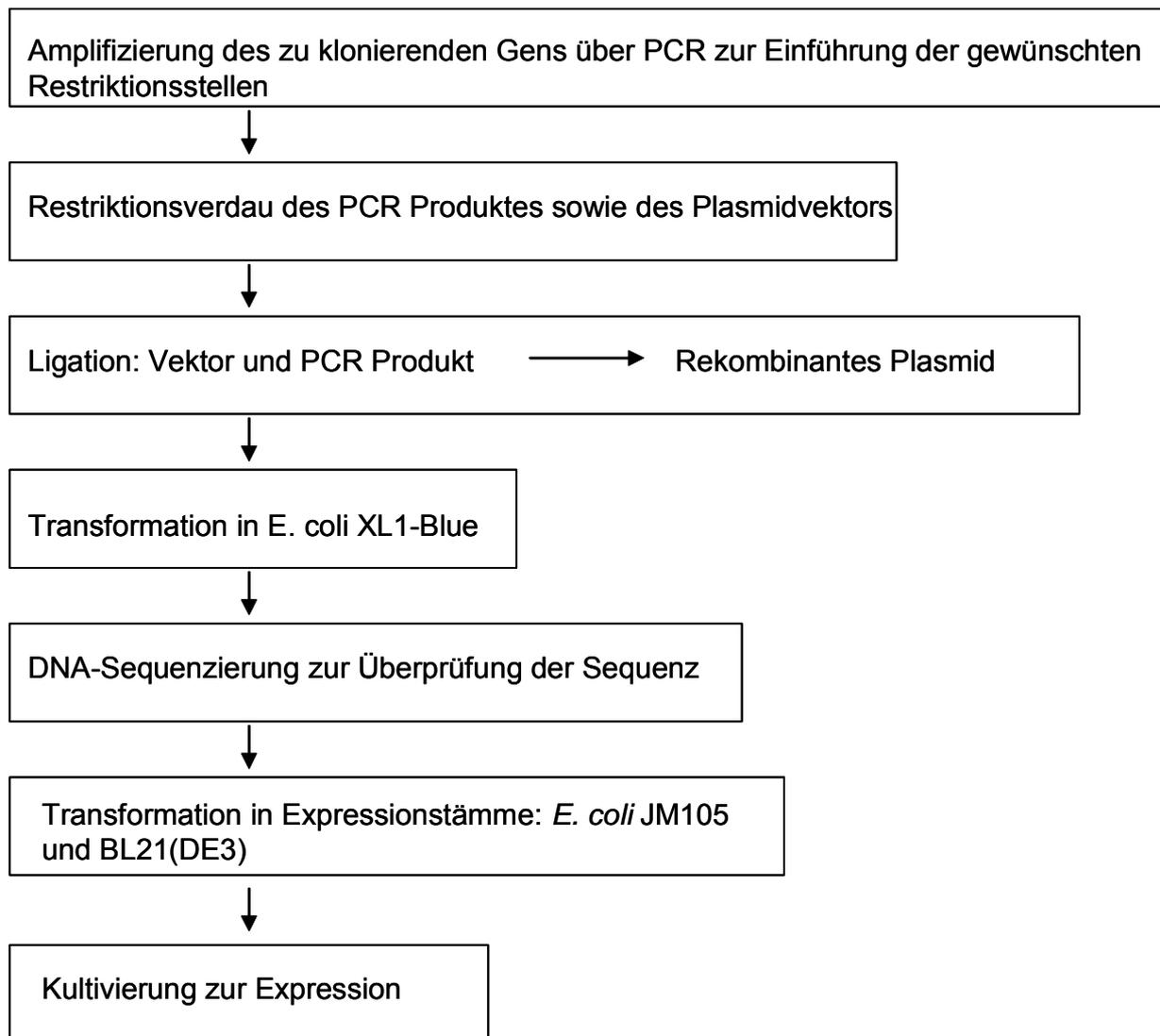


Abb. 9 Fließdiagramm zur Klonierung der in dieser Arbeit beschriebenen Gene (*re-adh*, *rr-adh*, *tmo*) zur Erzeugung der verschiedenen Expressionssysteme.

Zur Expression der RE-ADH in *E. coli* diente zuerst das Expressionsplasmid pKK223-3 (Amersham Pharmacia). Dieser Vektor besitzt einen IPTG-induzierbaren tac-Promotor (trp-lac-Hybridpromotor) mit einer starken Transkriptionsinitiationsstelle. Dieser Promotor steht unter der Kontrolle des lac-Repressors (*lacI*). Das *re-adh* Gen wurde mittels PCR amplifiziert mit Hilfe des Primerpaares RE1-5'/RE1-3'. Die Klonierung erfolgte über die EcoRI/HindIII Schnittstellen des Plasmids (entstandenes rekombinantes Plasmid: pRE-ADH1), als Expressionstamm wurde *E. coli* JM105 verwendet.

Nach Optimierung der Kultivierungsbedingung durch Variation der Temperatur (25-37 °C), Induktorkonzentration (0,1-1,5 mM IPTG), Induktionsdauer (3-20 h) und Induktionszeitpunkt (OD_{600} 0,3-1) haben sich für die Expression der RE-ADH mit diesem Expressionssystem die folgenden Parameter als optimal erwiesen:

Temperatur	30 °C
Induktionszeit	OD_{600} 0,3; Wachstum 16-20 h
IPTG	1 mM

Die Anzucht der rekombinanten *E. coli* JM105/pRE-ADH1 bei 37 °C ergab keine Expression der RE-ADH. Die Expressionsleistung dieses Stammes bei den niedrigeren Temperaturen 30 °C und 25 °C sind in einer ähnlichen Größenordnung. Die Expressionsversuche der ADH mit IPTG-Konzentrationen von 0,5, 1 und 1,5 mM unterschieden sich nicht wesentlich voneinander und ergaben eine Aktivität von 6 U/mg. Mit Konzentrationen des Induktors unter 0,5 mM wurde nur eine ADH-Aktivitäten von ca. 3 U/mg erreicht. Die Optimierung des Induktionszeitpunkts wurde bei 30 °C und mit 1 mM IPTG durchgeführt. Die Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse dieser Optimierung.

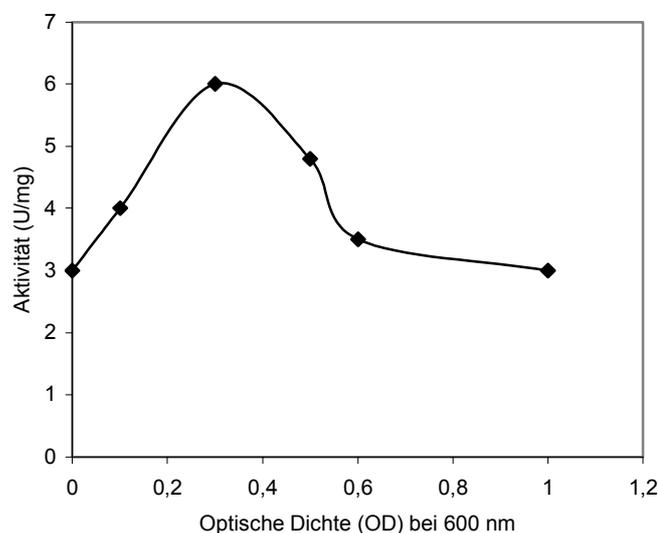


Abb. 10 Diagramm zur Bestimmung des optimalen Induktionszeitpunkts der RE-ADH. Die *E. coli* JM105/pRE-ADH1 Zellen wurden bei 30 °C angezogen. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG bei der jeweiligen optischen Dichte. Eine Probe wurde zum Beginn des Wachstums induziert, dies entspricht einer Induktion bei OD_{600} von 0.

Die Abb. 10 zeigt, dass die Induktion bei einer OD von ca. 0,3 zu einer optimalen ADH-Aktivität von 6 U/mg (Rohextrakt) führt. Allerdings ergaben auch Induktionen zu früheren oder späteren Zeitpunkten noch Aktivitäten in der Größenordnung von ca. 3 U/mg.

Zur Charakterisierung der mit Hilfe dieses Expressionssystems erhaltenen rekombinanten RE-ADH wurden größere Menge *E. coli* JM105/pRE-ADH1 Zellen (12 Liter Maßstab) angezogen. Es konnten 5 g Feuchtmasse pro Liter Kultur gewonnen werden. Das Enzym wurde exprimiert, eine erwartete Überexpression lag allerdings nicht vor. Berücksichtigt man, dass die spezifische Aktivität des homogenen Enzyms bei 850 U/mg liegt, ergibt sich, dass bei Expression mit dem pKK223-3-Vektor mit einer spezifischen Aktivität des Enzyms im Rohextrakt von 6 U/mg die exprimierte RE-ADH weniger als 1 % des löslichen Gesamtproteins der Wirtszelle ausmacht. Die rekombinante RE-ADH wurde über Hitzefällung, gefolgt von 2 Chromatographieschritten aufgereinigt. Eine Zusammenfassung der Aufreinigung ist in Tabelle 10 angegeben.

Tab.10 Reinigung der rekombinanten RE-ADH bis zur Homogenität (Expressionssystem: pRE-ADH1/*E. coli* JM105)

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	326	1734	5,3	100	1
Hitzefällung	54	2088 ⁽¹⁾	38,6	120	6,4
Q-Sepharose	8,4	861 ⁽²⁾	72	74 (62) ⁽³⁾	16
Butyl-Sepharose	0,45	381	846	65 (54) ⁽³⁾	128

(1) 1160 U wurden auf die Q-Sepharose Säule gegeben.

(2) 430 U wurden für die Butyl-Sepharose verwendet.

(3) in Klammern: Ausbeute bezogen auf den Wert nach der Hitzefällung

Tab. 10 zeigt, dass bei einer 128-fachen Anreicherung und mit einer Ausbeute von 65% homogenes Enzym gewonnen werden konnte. Auffallend war, dass nach der Hitzefällung eine Aktivitätssteigerung beobachtet wurde. Das zeigte sich auch in Wiederholungen und mit rekombinantem Enzym aus anderen Expressionssystemen. Offensichtlich wird das Enzym durch die Hitzebehandlung irreversibel in eine aktivere Konformation überführt. Bezieht man die Ausbeute des gereinigten Enzyms auf die Aktivität nach der Hitzefällung, ergibt sich eine Ausbeute von ca. 54%.

Die Proteinlösung aus den einzelnen Reinigungsschritten sowie der Rohextrakt wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Abbildung 11A zeigt das Proteinspektrum im Rohextrakt nach den ersten und zweiten Aufreinigungsschritten (Hitze-fällung und Q-Sepharose); die Proteinbande in der Abbildung 11B entspricht dem reinen Enzym nach dem Butyl-Sepharose Schritt. Die RE-ADH zeigt eine Molmasse der Untereinheit von ca 39 kDa. Dieser Wert weicht deutlich von der aus der Aminosäure-Sequenz abgeleiteten Größe von 36,2 kDa ab. Die RE-ADH läuft im Gel höher als das Markerprotein LDH (Lactat Dehydrogenase; Mark 12, Invitrogen), die bei 36 kDa läuft. Die Enzymausbeute betrug 64 µg reines ADH Protein pro g Zellen.

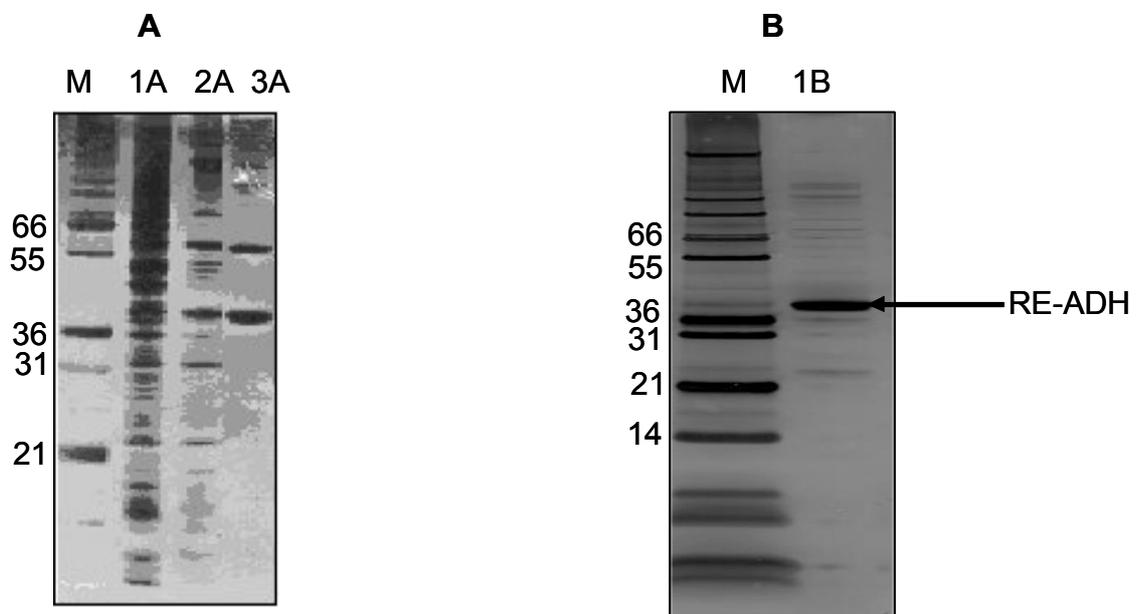


Abb. 11 SDS-PAGE, 12 %iges Tris-Bis Gel (NuPAGE). Aufgetragen wurden: (M), Marker 12 [Invitrogen]; (1A) Rohextrakt; (2A) Hitze-fällung; (3A) Q-Sepharose; (1B) Butyl-Sepharose. Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt.

2. Optimierung der Expression der RE-ADH

Unter Verwendung des Expressionssystems pRE-ADH1/*E. coli* JM105 konnte keine Überexpression der RE-ADH erreicht werden. Die Auftragung des Rohextraktes auf ein SDS-Gel zeigte keine eindeutige Bande für das rekombinante Protein. Erst nach der Aufreinigung konnte die RE-ADH als ein ca 39,2 kDa großes Protein nachgewiesen werden.

Um eine Überexpression der ADH zu erreichen, sind im Folgenden einige Möglichkeiten aufgeführt, die zu einer verbesserten Expression führen können:

- *Verwendung anderer kommerziell verfügbarer Expressionsvektoren.* Bei der Auswahl des Vektors soll die Stärke des Promotors berücksichtigt werden.

- *Gendosis in den rekombinanten Zellen;* diese wird durch die Plasmidkopienzahl des Vektors bestimmt. Für die Standard-Expressionsvektoren (pKK223-3, pET z.B.) werden die von dem Plasmid pBR322 abgeleiteten Expressionsvektoren bevorzugt; diese werden alle zu den high copy number Plasmiden gezählt (ColE1 ori). Ihre Verwendung für die heterologe Expression in *E. coli* führt nicht immer zur erhöhten Produktion des gewünschten Proteins, insbesondere wenn das Protein toxisch auf der Wirtszelle wirken kann oder das rekombinante Protein eine Wechselwirkung mit dem Zellstoffwechsel eingehen kann. In solchen Fällen wird eine Expression unter niedrigerer Gendosis angestrebt [73], was generell über medium (ori p15A) bzw. low copy (ori pSC101) Plasmide erreicht werden kann. Zur Verbesserung der Expression der RE-ADH wird in dieser Arbeit daher ein medium copy number Plasmid verwendet.

- *die Codonverwendung* des zu exprimierenden Gens kann die heterologe Expression beeinflussen, wenn diese von der der *E. coli* Wirtszelle stark abweicht. Als Strategie werden Unterschiede in der Codonverwendung auf zwei Weise ausgeglichen:

1- Verwendung von *E. coli* Stämmen, die zusätzliche Gene für bestimmte tRNAs enthalten, beispielsweise BL21-CodonPlus(DE3)-RP (für die Arginin Codons AGA/AGG und das Prolin Codon CCC) und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (für die Arginin Codons AGA/AGG, das Isoleucin Codon ATA und das Leucin Codon CTA).

2- Austausch von Basen (stille Mutationen).

Zur Optimierung der RE-ADH Expression wurden ausschließlich Codonaustausche im Gen vorgenommen.

- *Biochemische Eigenschaften der RE-ADH*: Einfluss des Cofaktors Zink. Die Expression eines Proteins in seiner nativen Konformation wird ebenfalls durch die Verfügbarkeit von Cofaktoren (Coenzym, Coenzym-Vorstufen oder Metallionen) im Wachstumsmedium beeinflusst. Für die RE-ADH als einer Zink-abhängigen Alkoholdehydrogenase soll untersucht werden, welchen Einfluss ein Zink-Zusatz auf die Expression in *E. coli* hat.

Diese hier beschriebenen Möglichkeiten der Expressionsoptimierung werden im Folgenden systematisch untersucht.

2.1 ADH-Expression mit weiteren kommerziell verfügbaren Expressionsvektoren

Als erster Optimierungsschritt wurde das *re-adh* Gen im pET11a Expressionsvektor (Novagen) kloniert (Schnittstellen NdeI/BamHI). Dieses Plasmid besitzt den IPTG (lac I Repressor) induzierbaren starken Bakteriophagen-Promotor T7. Durch die Spezifität des T7 Promotors zu der T7 RNA-Polymerase wird die Expression von Proteinen in Abwesenheit des Induktors niedrig gehalten. Die für diese pET-Vektoren entwickelten Wirtsstämme besitzen das T7 RNA-Polymerasegen im Chromosom [74].

Das Oligonukleotid-Primerpaar RE2-5'/RE2-3' diente zur Amplifizierung des *re-adh* Gens und zur Einführung der Schnittstellen NdeI/BamHI. Aus der Klonierung des Gens in pET11a wurde das Plasmid pRE-ADH2 erzeugt.

Zur Expression wurden die rekombinanten *E.coli* Zellen in 100 ml Kultur angezogen. Die Induktion erfolgte mit 25 μ M IPTG bei 25 °C, 16 h. Die RE-ADH zeigte im Rohextrakt eine Aktivität von 0,5 U/mg; der größte Teil des Proteins war jedoch unlöslich und lag als Inclusion Bodies vor. Aus diesem Grund wurden weitere Optimierungen vorgenommen.

2.2 Reduktion der Genkopienzahl: Konstruktion und

Verwendung eines "medium copy number"-Expressionsplasmids

Ein wesentlicher Faktor, der die heterologe Expression in *E. coli* beeinflussen kann, betrifft die Kopienzahl des Expressionsplasmids. Diese spiegelt die Genkopienzahl in der Zelle

wider. Generell werden für die Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* high copy ColE1 (ColE1Replicon) Plasmide verwendet. Die Anwendung dieser Plasmide zur Klonierung und Expression führt in den meisten Fällen zur Überexpression des Zielgens, in einigen Fällen sind allerdings auch Erschöpfung der Transkription und Translationsmaschinerie der Wirtszelle beschrieben. Eine der Konsequenzen ist die Synthese von Proteinen in ihrer nicht-nativen Konformation [75]. Ein Expressionssystem, welches die Reduktion der Genkopienzahl in RE-ADH exprimierenden *E. coli* Zellen bewirkt, wurde geprüft, inwiefern eine Verbesserung der Expression erreicht wird.

2.2.1 Konstruktion eines "moderate copy number" Plasmids

Zur Reduktion der *re-adh* Genkopienzahl in rekombinanten *E. coli*-Zellen wurde das „moderate copy number“ Plasmid pKA1 konstruiert. Dieses Plasmid enthält Teile aus dem pET11a-Plasmid (Fa. Novagen) und dem Plasmid pACYC184 [62]. Die Kopienzahl pro Zelle beträgt 10-15 für pACYC184, während sie bei den pBR223-3 abgeleiteten Plasmiden etwas höher bei 15-20 liegt.

Die Abbildung 12 zeigt das pKA1 Expressionsplasmid. Das Fragment (grau markiert) aus pET11a enthält stromabwärts des T7-Promotors die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI für die Klonierung des zu exprimierenden Gens und das lacI Gen, das für die Regulation der Expression notwendig ist. Das Fragment aus pACYC184 (dünne Linie) enthält den Replikationsursprung, ori p15A, der die Kopienzahl des pKA1 Plasmids und dadurch die des klonierten Gens in der Wirtszelle bestimmt.

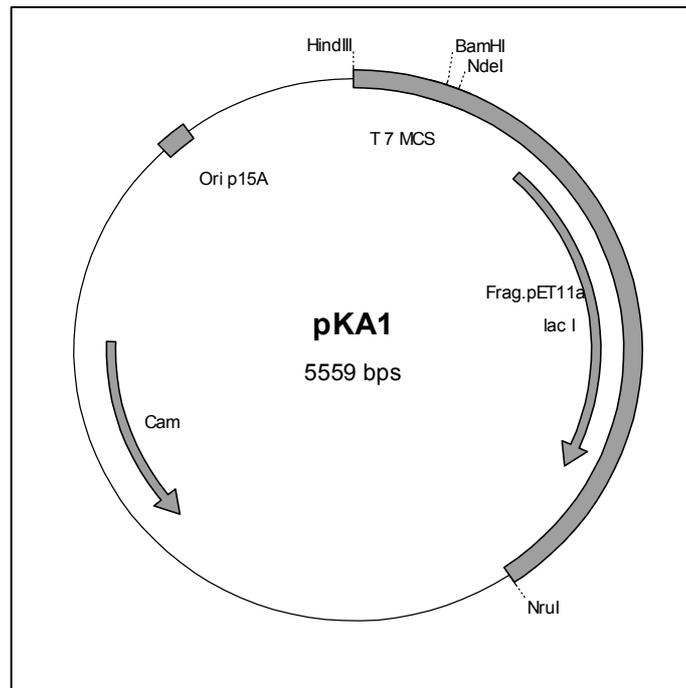


Abb. 12 Vektorkarte des selbstkonstruierten „moderate copy number“ Plasmids pKA1. Der Vektor enthält Komponenten aus dem kommerziellen pET11a-Plasmid und pACYC184.

2.2.2 Expression der ADH mit Hilfe des "moderate copy number" Plasmids pKA1

Zur Nutzung des pKA1-Vektors zur Expression wurde das *re-adh* Gen mit den Primern RE2-5'/RE2-3' amplifiziert und über die NdeI/BamHI Schnittstellen in den Vektor kloniert. Das entstandene Plasmid pRE-ADH3 wurde zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die auf Agarplatten (LBcam) gewachsenen Kolonien wurden für eine 5 ml Vorkultur eingesetzt, welche zum Animpfen von 1 L Hauptkultur verwendet wurde.

Die Hauptkultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C umgestellt und nach 30 min die Expression der RE-ADH mit 25 µM IPTG induziert. Die Ernte der Zellen fand nach 16-18 h weiterem Wachstum statt. Die 4 g Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Rohextrakt für die Aufreinigung eingesetzt.

Bei Verwendung dieses selbst-konstruierten Plasmids wurde eine deutliche Überexpression von löslichem, aktivem Enzym beobachtet, die Aktivität im Rohextrakt lag bei 30-50 U/mg.

Die Expressionsleistung konnte also im Vergleich zum pKK223-3-Vektor um das 5-8-fache gesteigert werden.

Die Untersuchung des Rohextraktes auf einem SDS-Gel (Abb. 13) bestätigte die photometrischen Aktivitätsmessungen, es konnte eine deutliche Proteinbande als Zeichen für eine Überexpression im Gel beobachtet werden. Der größte Teil des Proteins befindet sich allerdings im Pellet als unlösliche Fraktion. Zur Charakterisierung der aus diesem Stamm gewonnenen rekombinanten RE-ADH wurde das Enzym aus dem Rohextrakt partiell gereinigt. Der erste Schritt der Aufreinigung besteht aus der Hitzefällung (analog zur Aufreinigung der RE-ADH aus dem Stamm JM105/pRE-ADH1). Dazu wurde der Rohextrakt 15 min bei 65 °C inkubiert, dann wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation (5000 Upm, 15 min) abgetrennt und der Überstand (RE-ADH) über eine Q-Sepharose weiter gereinigt. Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Reinigungsschritte. Nach der Q-Sepharose-Säule lag das Enzym noch nicht als homogenes Protein vor, allerdings konnte die Bestimmung von kinetischen Daten und die Untersuchung des Substratspektrums mit diesem Präparat durchgeführt werden, da keine Störaktivität festgestellt wurde.

Tab.11: Reinigung der RE-ADH aus dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3)/pRE-ADH3

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	77,5	3773	48,6	100	1
Hitzefällung	38	3358	88,4	89	2
Q-Sepharose	9,8	2989	305	79,2	6,2

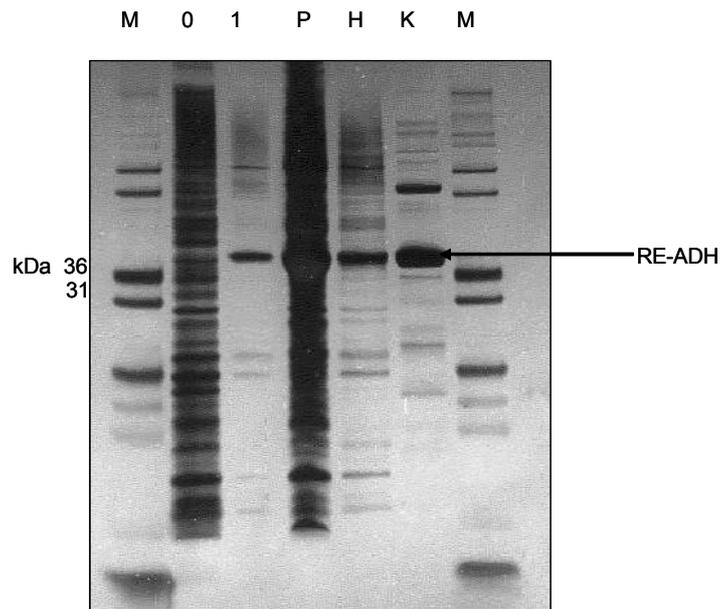


Abb. 13: SDS-PAGE zur Kontrolle der Expressionsleistung des Stammes BL21 (DE3)/pRE-ADH3. Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt. (M) Marker [Mark 12, Invitrogen]; (0) Rohextrakt aus nicht induzierten Zellen; (1) Rohextrakt mit exprimierter RE-ADH; (P) Pellet; (H) Probe nach Hitzefällung; (K) Zum Vergleich Rohextrakt aus Zellen mit JM105/pRE-ADH1 nach Hitzefällung.

Von den Ergebnissen der Reinigung der RE-ADH, die mit diesem Expressionsstamm produziert worden ist, sind einige Besonderheiten hervorzuheben:

- Das mit diesem Expressionssystem gewonnene RE-ADH-Protein unterscheidet sich von der RE-ADH, die mit Hilfe des pKK223-3 Vektors exprimiert wurde. Beispielsweise fällt auf, dass man hier keine Aktivierung durch die Hitzefällung beobachtet. Die Hitzestabilität ist jedoch erhalten geblieben.
- Im SDS-Gel ist auf der Höhe der ADH auch bei nicht-induzierten Zellen eine Bande zu sehen, diese entspricht *E. coli* eigenem Protein, da keine basale Aktivität zu messen war. Die ADH wurde überexprimiert, so dass nur wenige *E. coli* eigene Proteine im Rohextrakt zu finden waren.

Bei den Proben nach der Q-Sepharose und Butyl-Sepharose (reines Protein) wurde im Wesentlichen kein Unterschied zur ersten Aufreinigung (Abb. 11A und 11B) beobachtet, sie wurden daher hier nicht gezeigt.

Mit dem konstruierten pKA1-Expressionsvektor konnte die RE-ADH überexprimiert werden. Eine Verbesserung um bis zum 5- bis 8-fachen im Vergleich zu pKK223-3 wurde erreicht. Die RE-ADH-Proteine, die in beiden Fällen erhalten wurden, unterscheiden sich kaum voneinander, was die Aktivierung durch Hitzebehandlung betrifft. Die Überexpression der RE-ADH mit Hilfe des pKA1 Vektors ist auf die Reduzierung der Genkopienzahl in der Zelle zurückzuführen.

Da der größte Teil der exprimierten ADH, auch bei Anzucht der rekombinanten Zellen bei niedrigerer Temperatur (20 °C), unlöslich im Zellpellet vorlag, wurden weitere Optimierungsversuche durchgeführt. Dazu wurde die Codon-Verwendung im *re-adh* Gen optimiert.

2.3 Optimierung der Codon-Verwendung im *re-adh* Gen

Die Codon-Verwendung des zu exprimierten Gens spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der heterologen Expression in *E. coli*. In diesem Wirtsorganismus werden einige Codons als relativ selten klassifiziert. Insbesondere die Arginin-Codons AGA/AGG treten in der mRNA von *E. coli* nur zu 0,21 % und 0,14 % auf [76]. Speziell das Vorkommen dieser Codons innerhalb der ersten 25 Basen eines Gens könnte die Expression negativ beeinflussen [77]. Aus der im Internet verfügbaren Tabelle zur Codon-Verwendung von Mikroorganismen (www.kazusa.or.jp/codon) kann man entnehmen, dass die AGA/AGG-Codons auch in *R. erythropolis* zu den seltenen zählen. Da im Allgemeinen die Geschwindigkeit der Translation bei diesen Codons gering ist (die Anzahl der entsprechenden tRNAs ist gering im Vergleich zu den anderen), könnte ihr Austausch zur Verbesserung der Expressionsleitung führen.

2.3.1 Das seltene Arginin-Codon AGA

Im *re-adh* Gen befindet sich in Position 8 (Aminosäure-Position) ein AGA (Arginin) Codon. Um den Einfluss dieses seltenen Codons auf die Expression zu testen, wurde dieses Codon gegen CGT(Arginin) ausgetauscht. Dazu wurde zur Amplifizierung des *re-adh* Gens ein Megaprimer konstruiert, in dem AGA(8) durch CGT ersetzt wurde. Die PCR wurde mit Hilfe des Primerpaares RE3-5'/RE2-3' (siehe Anhang - Primer) durchgeführt. Die Klonierung erfolgte im pKA1 Vektor über die Schnittstellen NdeI/BamHI. Das daraus resultierende Plasmid pRE-ADH4 wurde zur Expression der RE-ADH in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Zur Herstellung der rekombinanten RE-ADH wurden die Zellen im 100 ml Maßstab kultiviert

und die Expressionsleistung durch Bestimmung der ADH-Aktivität untersucht. Die Anzucht der *E. coli* Zellen verlief ähnlich der des Stammes BL21 (DE3)/pRE-ADH3, so dass ein direkter Vergleich über den Einfluss des Codon-Austausches möglich war. Die Auswirkung des Austausches AGA(8) gegen CGT wurde durch parallele Anzucht der Stämme BL21 (DE3)/pRE-ADH3 und BL21(DE3)/pRE-ADH4 geprüft.

Die Aktivitätsmessungen ergaben einen Wert von 50 U/mg im Rohextrakt für das Enzym, dessen Codon-Verwendung optimiert worden ist im Vergleich zu 30 U/mg beim Wildtyp-Gen. Offensichtlich wird die Expression also tatsächlich durch das seltene Arg-Codon reduziert. Trotzdem lag auch bei Expression mit dem verbesserten Codon immer noch ein großer Teil des Proteins als Inclusion Bodies vor. Durch SDS-PAGE konnte die gemessene Erhöhung der spezifischen Aktivität nicht eindeutig nachgewiesen werden, die Unterschiede in der Intensität der Proteinbanden waren dazu nicht deutlich genug.

2.3.2 Weitere Optimierung der Codon-Verwendung

Um herauszufinden, ob die niedrige Expressionsrate im pKK223-3 Vektor auf eine ungünstige Codon-Verwendung zurückzuführen ist, wurden die weiteren Codon-Optimierungen mit diesem System durchgeführt. Da die Expression der RE-ADH in pKK223-3 (*E. coli* JM105/pRE-ADH1) keine Überexpression ergeben und ebenfalls keine unlösliche Fraktion produziert hat, wurde die Optimierung der Codon-Verwendung in diesem Expressionssystem durchgeführt. Das *re-adh* Gen enthält insgesamt sieben seltene Prolin-Codons CCC (0,41 % in *E. coli*), vier davon befinden sich ziemlich nahe des 5'-Endes (Prolin 13, 19, 21 und 23). Die drei letzten besitzen eine clusterähnliche Anordnung, so dass ihr Austausch die Expression des Gens auf der translationalen Ebene beeinflussen könnte.

Zuerst wurde der Stamm *E. coli* JM105/pRE-ADH5 erzeugt. Dieser Stamm exprimiert die Variante des *re-adh* Gens mit optimierten Prolin-Codons für die Proline 13, 19 und 21. Die Amplifizierung dieser Genvariante erfolgte über PCR mit Hilfe der Primer RE5-5'/RE1-3'. Der Primer RE5-5' ist ein Megaprimer von 78 bp, in dem die 3 Prolin-Codons CCC im Wildtyp Gen durch CCG ersetzt wurden. Die PCR erfolgte standardmäßig wie im Abschnitt 3.11.1 beschrieben wurden. Das *re-adh* wurde im pKK223-3 Vektor über die Schnittstellen EcoRI/HindIII kloniert und in JM105-Zellen transformiert. Zur Expression wurden die Zellen

in 100 ml LBamp von einer Vorkultur 1 %ig überimpft. Die Expression des Gens wurde mit 1 mM IPTG induziert bei einer OD₆₀₀ von 0,3 (30 °C, 120 Upm). Die photometrisch gemessene Enzymaktivität zeigte überraschenderweise keine Steigerung der Expressionsrate, die Aktivität betrug nur 4,2 U/mg gegenüber 6 U/mg für das Enzym des Wildtyp-Gens im selben Expressionssystem (JM105/pRE-ADH1).

Auf der Grundlage dieses Gens mit den 3 ausgetauschten Prolin-Codons wurde nun erneut die Auswirkung des Austausches des Arg8-Codons (AGA) auf die Expression untersucht, dazu wurde der Stamm *E. coli* JM105/pRE-ADH6 erzeugt. Zur Herstellung dieses Stammes wurde zusätzlich zu den drei Prolin-Codons (Positionen 13, 19 und 21 der Aminosäure-Sequenz) das Arginin-Codon optimiert (Austausch AGA gegen CGT). Dazu wurden die Amplifizierungsprimer RE6-5'/RE1-3' verwendet. Die Austausche der Arg8, Pro(13,19, 21)-Codons wurden über die Megaprimer RE6-5'erreicht. Die Expression der RE-ADH verlief wie oben beschrieben in einer 100 ml Schüttelkultur (1 mM IPTG, 30 °C, 120 Upm). Auch hier wurden überraschenderweise nur relativ niedrige Expressionsraten gemessen, die Enzymaktivität im Rohextrakt betrug nur 2,4 U/mg.

Eine Zusammenfassung zur Optimierung der RE-ADH Expression wird in der nachfolgenden Tabelle 12 angezeigt.

Tab.12 Zusammenfassung zur Optimierungen der RE-ADH Expression in *E. coli* (¹ angegeben ist die Position in der Aminosäure-Sequenz)

Expressionssystem/ <i>E. coli</i> -Stamm	Ausgangs- Plasmid	ausgetauschte Codons ¹⁾	Induktion (µM IPTG)	Aktivität (U/mg)	Inclusion Bodies
JM105/pRE-ADH1	pKK223-3	Wildtyp	1000	6	Nein
BL21(DE3)/pRE- ADH2	pET11a	Wildtyp	25	0,5	Ja
BL21(DE3)/pRE- ADH3	pKA1	Wildtyp	25	30	Ja
BL21(DE3)/pRE- ADH4	pKA1	Arg-8	25	50	Ja
JM105/pRE-ADH5	pKK223-3	Pro-13 Pro-19 Pro-21	1000	4,2	Nein

Fortsetzung Tab.12: Zusammenfassung zur Optimierungen der RE-ADH Expression in *E.coli* (¹ angegeben ist die Position in der Aminosäure-Sequenz)

Expressionssystem/ <i>E. coli</i> -Stamm	Ausgangs- Plasmid	ausgetauschte Codons ¹⁾	Induktion (μ M IPTG)	Aktivität (U/mg)	Inclusion Bodies
JM105/pRE-ADH6	pKK223-3	Pro-13 Pro-19 Pro-21 Arg.8	1000	2,4	Nein

Die gesamte Optimierung der Expression von RE-ADH wird in der Abbildung 14 illustriert.

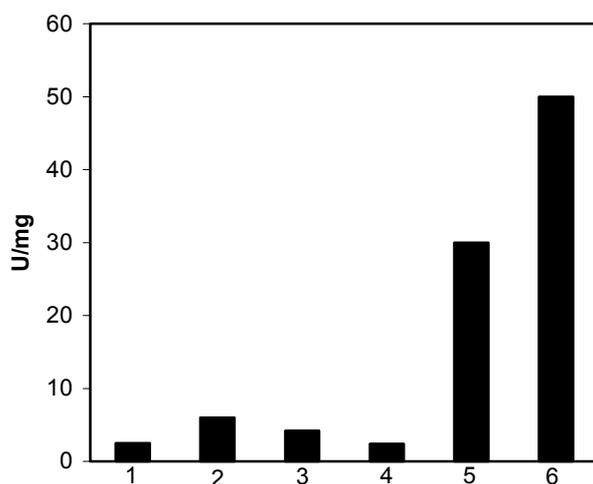


Abb. 14 Graphische Darstellung der Optimierung der Expression von RE-ADH in *E. coli* verglichen mit der Wildtyp RE-ADH aus *Rhodococcus erythropolis*. (1) Wildtyp RE-ADH aus *R. erythropolis*; (2-6) stellen die verschiedenen Expressionssysteme dar: (2) JM105/pRE-ADH1; (3) JM105/pRE-ADH5; (4) JM105/pRE-ADH6; (5) BL21 (DE3)/pRE-ADH3; (6) BL21 (DE3)/pRE-ADH4. Weitere Einzelheiten s. Tab. 8.

Zusammenfassung der genetischen Optimierung der Expression

Durch die Reduzierung der Genkopienzahl in den RE-ADH exprimierenden *E. coli* Zellen wurde eine deutlich bessere Expression des Enzyms erreicht. Die Optimierung der Codon-Verwendung und die Verwendung des pKA1 Vektors, der die Reduzierung der Genkopiezahl ermöglicht, ergab eine ca. 8-fach erhöhte Enzymaktivität, verglichen mit der Klonierung des

Wildtypgens in pKK223-3 (50 gegenüber 6 U/mg). Die Klonierung des *re-adh* Gens mit optimierten Codons in pKK223-3 führte zu schlechteren Enzymausbeuten.

Zur weiteren Verbesserung der RE-ADH Expression wurde den Einfluss von Zink-Ionen untersucht.

2.4 Einfluß von Zn^{2+} -Ionen auf die RE-ADH Aktivität und Expression

Die RE-ADH zählt zu den Zink-enthaltenden Alkoholdehydrogenasen, die im allgemeinen zwei Zink-Ionen pro Untereinheit besitzen [78]. Die beiden Zink-Ionen sind funktionell nicht gleichwertig, eins dient der Aufrechterhaltung der Struktur (strukturelles Zink), eines ist an der Katalyse beteiligt. In der RE-ADH wurden die Aminosäuren Cys⁹², Cys⁹⁵, Cys⁹⁸ und Cys¹⁰⁶ als Liganden für das strukturelle Zink identifiziert, während Cys³⁸, His⁶² und Asp¹⁵³ für die Bindung des katalytischen Zinks verantwortlich sind [59].

Das aktive RE-ADH-Molekül ist ein Tetramer, so dass ein Mol Enzym 8 Mol Zink enthält. Geht man davon aus, dass eine normale erfolgreiche heterologe Expression 2000 Units des Enzyms pro 1 Liter ergeben, bedeutet dies, dass 0,14 μ mol Zink in die ADH eingebaut worden sind. Da das verwendete LB-Medium dieses Ion nur als Spurenelement enthält, besteht die Möglichkeit, dass bei der Expression nicht ausreichend Zn^{2+} für das Enzym zur Verfügung steht.

Für die ADH aus *Bacillus stearothermophilus* [11] wurde die Produktion um das 2-fache gesteigert durch den Zusatz von Zinksulfat zum Wachstumsmedium. Dieser positive Effekt konnte ebenfalls für die primäre Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 [14] beobachtet werden, hier allerdings beim Zusatz des Metallions zum Reaktionsansatz.

2.4.1 In-vitro-Einfluss von Zink auf die Enzymaktivität

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsleistungen der *E. coli* Stämme JM105/pRE-ADH1 und BL21(DE3)/pRE-ADH4 wurde die Untersuchung des Einflusses von Zink auf die Synthese enzymatisch aktiver ADH mit den beiden rekombinanten Zellen durchgeführt. Für die in vitro Untersuchungen wurden die Zellen zur Expression der ADH in LB Medium

angezogen (siehe A.1 und A.2.2). Zum Aufschluss wurden in 5 Eppendorfgläsern je 0,4 g der JM105/pRE-ADH1 Zellen in 100 mM Kpi pH 6,0 resuspendiert (40 % Suspension). Zu vier Proben wurde ZnCl_2 der Endkonzentrationen 0,01, 0,05, 0,1 und 0,5 mM gegeben, eine weitere diente als Kontrolle (ohne Metall-Ionen). Fünf weiteren Proben wurden mit BL21(DE3)/pRE-ADH4 Zellen vorbereitet und enthielten je 0,4 g Zellen ebenfalls in 100 mM Kpi Puffer resuspendiert (40 % Suspension). Eine Probe diente als Kontrolle, während zu den vier restlichen ZnCl_2 der Endkonzentrationen 0,05; 0,1; 0,5; 1 und 2 mM zugesetzt wurden. Der Aufschluss erfolgte nach Zinkzusatz mittels Ultraschall. In beiden Fällen konnte kein einheitlicher Effekt beobachtet werden:

Für die JM105/pRE-ADH1 Zellen wurde eine Verdopplung der Aktivität festgestellt ab einer Zink-Konzentration von 50 μM . Für die BL21(DE3)/pRE-ADH4 Zellen wurde keine eindeutige Verbesserung der Aktivität festgestellt (siehe Abbildung 15).

Die Zugabe von Zn^{2+} zum Aufschlusspuffer hatte zwar eine leichte Steigerung der RE-ADH zur Folge, da das Abwiegen der Zellen und auch der Zellaufschluss (Ultraschall) jedoch nicht absolut gleichmäßig waren, konnte es zu unterschiedlichen Werten bei der Aktivitätsmessung kommen.

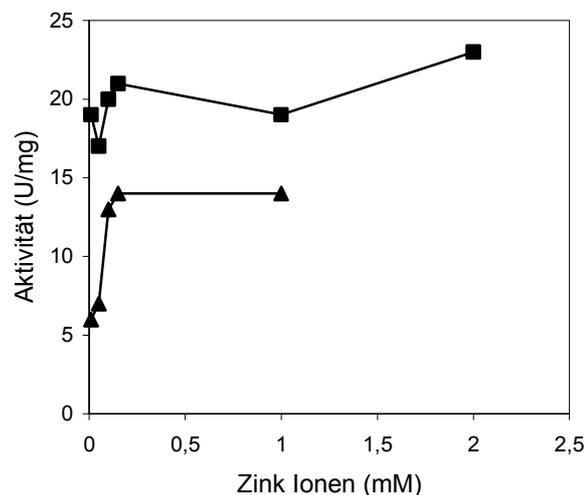


Abb. 15 In-vitro Einfluss von Zink-Ionen auf die exprimierte RE-ADH. Gleiche Menge an rekombinanten *E. coli*-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ZnCl_2 im 100 mM Kpi Puffer aufgeschlossen. (■) entspricht BL21(DE3)/pRE-ADH4, während (▲) die JM105/pRE-ADH1 darstellt.

2.4.2 Einfluss von zugesetztem Zink auf die Expression

Mit dem Expressionssystem BL21 (DE3)/ pRE-ADH4 konnte durch Zugabe von Zink-Ionen im Bereich von 10 - 2000 μM zum Wachstumsmedium eine signifikante Steigerung der Enzym-Expression beobachtet werden. Die gemessene RE-ADH Aktivität stieg mit steigenden Zink-Konzentrationen, die spezifische Aktivität konnte von ca. 35 U/mg (ohne Zn^{2+} -Zusatz) auf 80 U/mg mit 1 bzw. 2 mM Zink-Ionen erhöht werden (Abb. 16). Bei Konzentrationen über 2 mM wurde dann eine Inhibierung des Zellwachstums beobachtet. Diese Erhöhung der spezifischen Aktivität im Rohextrakt geht mit einer Steigerung der Enzymmenge im zellfreien Zellextrakt einher, wie auch das SDS-Gel bestätigt (Abb. 17).

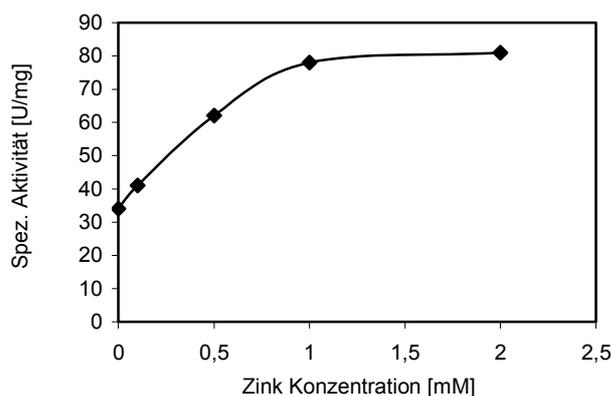


Abb. 16 Einfluß von Zink Ionen auf die Expression des *re-adh* Gens (BL21 (DE3)/pRE-ADH4). Aufgetragen ist die spezifische Aktivität der RE-ADH im zellfreien Rohextrakt.

Für die SDS-PAGE wurden von den o.a. Rohextrakten bzw. den Pellets jeweils gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen (Abb. 17). Dadurch wird ersichtlich, dass sich durch die Erhöhung der Zink-Konzentration vor allem die Menge an RE-ADH erhöht, während einige andere intrazelluläre Proteine unverändert in gleichbleibender Menge vorkommen. Allerdings ist auch bei zwei oder drei weiteren *E. coli*-eigenen Proteinen eine erhöhte Synthese zu beobachten. Diese relative Erhöhung der RE-ADH-Menge bei nahezu gleichbleibendem Proteinbackground ist auch ein Zeichen dafür, dass es sich beim beobachteten Effekt durch die Zn-Ionen nicht um eine Veränderung im Zellaufschluss oder der Enzymfreisetzung handelt. Die Analyse der Pellet-Fraktion als Maß für die Bildung von Inclusion Bodies zeigt,

dass dieser Anteil durch die Zn-Ionen nicht signifikant verändert worden ist, immer noch liegt ein relativ hoher Anteil des Enzyms in unlöslicher Form vor.

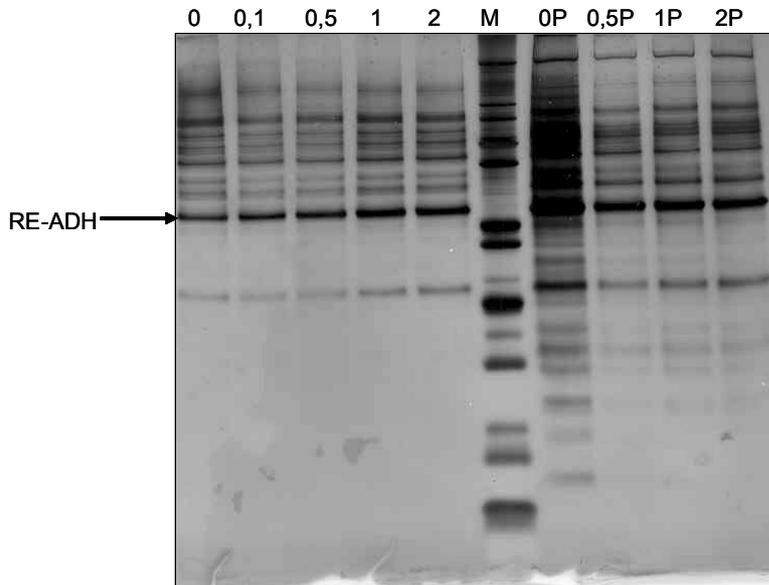


Abb. 17 Einfluß von Zink-Ionen auf die Expression der *re-adh*. Das SDS-Gel zeigt das exprimierte Enzym im zellenfreien Rohextrakt (linke Spuren) und die jeweils dazugehörige Pellet-Fraktion (0P - 2P). Die Zahlen über den Spuren entsprechen den Mengen (mM) an ZnCl_2 , die zum Medium gegeben wurden. Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt.

Für *E. coli* JM105/pRE-ADH1-Zellen wurde kein Einfluss der RE-ADH-Expression durch die Zink-Zusätze im Bereich von 10-100 μM beobachtet werden. Der Einfluss höherer Konzentrationen an Zink-Ionen wurde nicht getestet, da Inhibierungseffekte schon bei 100 μM zu finden waren.

2.4.3 Quantifizierung von aktivem ADH-Protein

Zinkionen zeigten einen Einfluss auf die Expression der RE-ADH; die spezifische Aktivität konnte deutlich von 50 U/mg auf 80 U/mg gesteigert werden. Im SDS-Gel konnte zudem eine leichte Reduzierung der Bildung von Inclusion Bodies beobachtet werden (Abb. 17). Aufgrund des positiven Effekts, der durch die Zugabe des Metall-Ions zum Wachstumsmedium erzielt wurde, sollte das Enzym aus beiden Anzuchtmedien (mit und ohne Zink-Zusatz) gereinigt und vergleichend charakterisiert werden. Dazu wurden die *E. coli* Zellen BL21 (DE3)/pRE-ADH4 in 250 ml Schüttelkulturen angezogen. Zu einer Probe wurde 1mM

Zinkchlorid gegeben, die andere wurde ohne Zinkzusatz parallel fermentiert (Anzuchtbedingungen s. 2.2). Das ADH-Protein aus den beiden Kulturen wurde bis zur Homogenität aufgereinigt (Hitzenaturierung, Q-Sepharose und Butyl-Sepharose). Eine Zusammenfassung der Aufreinigungsschritte ist in den nachfolgenden Tabellen (13 und 14) zu finden.

Tab.13. Reinigung der RE-ADH bis zur Homogenität aus dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3)/pRE-ADH4. Die Anzucht wurde ohne Zugabe von Zink-Chlorid durchgeführt.

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	10	255,6	25,4	100	1
Hitze-fällung	3,8	196	51	76,7	2
Q-Sepharose	1,3	184	138	72	5,5
Butyl-Sepharose	0,72	114	158	44	6,2

Tab. 14 Reinigung der RE-ADH bis zur Homogenität aus dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3)/pRE-ADH4. Zu der Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,3 ZnCl₂ in einer Endkonzentration von 1 mM gegeben. Die Induktion erfolgte erst nach einer weiteren Inkubation von 30 min.

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	12,6	786	63,6	100	1
Hitze-fällung	5	467	93,5	59	1,5
Q-Sepharose	2,5	394	158	50	2,5
Butyl-Sepharose	0,83	276	332	35	5,2

Bezogen auf 1 g Zellen wurden aus den Zellen ohne Zinkzusatz 2,88 mg reines Enzym, aus den Zellen mit Zink 3,32 mg gewonnen. Die Enzymaktivitäten unterschieden sich für beide Präparationen allerdings beträchtlich: ohne Zinkzusatz wurden 456 U und mit 1104 U erhalten. Bei einer Kultivierung der Zellen ohne Zugabe von Zinkionen wird die RE-ADH zwar überexprimiert, aber die Hälfte des Proteins in der löslichen Fraktion ist enzymatisch inaktiv. Dies ist offensichtlich auf die Verfügbarkeit an diesem Cofaktor zurückzuführen. Das ADH-Protein in der Probe, die ohne Zink hergestellt wurde, ist vermutlich eine Mischung aus

ADH-Molekülen, die mit Zink gesättigt sind und solche, die ein Defizit an Zink (weniger als 8 Mol) enthalten.

2.4.4 Bestimmung des Zinkgehalts in ADH-Proteinen

Die Zugabe von Zinkionen zum Wachstumsmedium war mit einer Steigerung an ADH-Aktivität verbunden. Um herauszufinden, ob diese durch die Aufnahme zusätzlicher Zinkionen durch die rekombinante ADH zurückzuführen ist, wurde die Konzentration des Metallions in den homogenen ADH-Proteinen (aus Zellen mit und ohne Zinkionen im LB-Medium angezogen) bestimmt (LA-ICP-MS). Die Tabelle 15 zeigt einen doppelten Zinkgehalt in der RE-ADH aus Zellen, die mit zusätzlichen Metallionen angezogen wurden. Das gleiche Verhältnis wurde für die Aktivitäten der beiden Enzymspezies gefunden (siehe Tabellen 13 und 14).

Tab. 15 Zinkgehalt in homogener RE-ADH. Die Proteine wurden aus rekombinanten Zellen aufgereinigt, die mit (+ Zn) und ohne (- Zn) zusätzliche Zinkionen im Wachstumsmedium angezogen worden sind.

RE-ADH	Zinkgehalt (ng · ml ⁻¹)
(-) Zn	15,08 ± 0,6
(+) Zn	34,20 ± 1,5

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der RE-ADH deutlich mit Hilfe des entwickelten Expressionssystems optimiert werden konnte. Um höhere Enzymausbeuten zu erzielen, ist ein Zusatz von 1 mM Zinkionen zum Wachstumsmedium notwendig. Ein Teil der exprimierten ADH konnte in vitro durch das Metallion aktiviert werden. Offensichtlich ist das ADH-Protein in der unlöslichen Fraktion mit unzureichenden Zinkionen versorgt.

3. Biochemische Charakterisierung der RE-ADH

Aus Vorarbeiten [59] sind bereits einige biochemische Daten bekannt:

Das Enzym besteht aus 4 identischen Untereinheiten mit einer Molmasse von jeweils 36,206 kDa, das pH-Optimum der Reduktion liegt bei 6, für die Oxidation liegt es bei 8.

Im Folgenden sind vor allem Daten zusammengestellt, die für die präparative Anwendung des Enzyms von Interesse sind. Die Temperaturstabilität ist eine Eigenschaft, die für die Reinigung und besonders die Enzymgewinnung im grösseren Maßstab von Bedeutung ist. Daneben ist es aber vor allem das umfangreiche Substratspektrum, das dieses Enzym im Vergleich zu anderen bekannten Enzymen auszeichnet. Diese Charakterisierung ist insofern auch interessant, als von einigen anderen ADHs dieser Gruppe Substratspektren und Strukturen bekannt sind und sich über einen detaillierten Vergleich die Möglichkeit eröffnet, Zusammenhänge von Struktur und Substratspektren herauszuarbeiten. Interessant in diesem Zusammenhang sind vor allem die ADHs von *Sulfolobus solfataricus* [9] und *Rhodococcus ruber* (Gene accession number AJ491307).

3.1 Temperaturstabilität

Vorversuche hatten gezeigt, dass die RE-ADH Inkubationen bei ca. 60 oder 65°C ohne Verlust übersteht. Das war nicht zu erwarten, da der *Rhodococcus*-Stamm selbst eindeutig mesophil ist. Das Temperaturoptimum für das Wachstum beträgt ca. 30°C, bei 40°C wächst der Stamm nicht mehr. Allerdings gibt es unter den Zink-enthaltenden mittelkettigen ADHs mehrere, von denen bekannt ist, dass sie thermostabil sind. Einige stammen allerdings auch aus thermophilen bzw. hyperthermophile (Archaea) Mikroorganismen, beispielsweise die TbADH, die SsADH oder die ApADH (Siehe Tab. 9). Eine thermostabile ADH aus einem mesophilen Organismus ist die RR-ADH.

Die Temperaturstabilität der RE-ADH wurde detaillierter untersucht. Dazu wurde partiell gereinigtes Enzym bei verschiedenen Temperaturen (40 °C, 50 °C, 60 °C und 65 °C) für 1 h inkubiert. Die photometrische Bestimmung der Restaktivität zeigt überraschenderweise eine reproduzierbare Steigerung der Aktivität von 14 % zwischen 50 °C und 60 °C. Eine Inaktivierung des Enzyms wurde erst ab 65 °C beobachtet, die Restaktivität betrug an diesem Punkt 57 % (Abbildung 18).

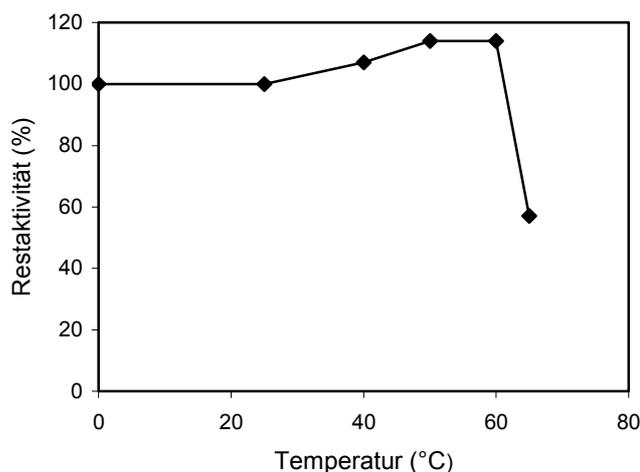


Abb. 18 Temperaturstabilität der RE-ADH. Die Proben (Rohextrakt) wurden für 1 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert, nach Abkühlen wurde dann die Restaktivität mit dem Standardassay bestimmt.

3.2 Kinetische Daten und Substratspektrum

Die kinetischen Daten für die Standardsubstrate p-Cl-Acetophenon (Reduktionsreaktion) und p-Cl-Phenylethanol (Oxidationsreaktion) bzw. für die Coenzyme NADH und NAD sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Messung wurde sowohl mit der rekombinanten RE-ADH als auch mit dem Wildtyp-Enzym durchgeführt, da diese Messungen vorab zeigen sollten, ob es signifikante Unterschiede dieser beiden Enzyme gibt.

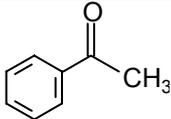
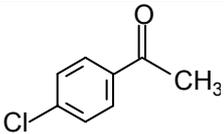
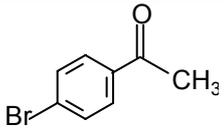
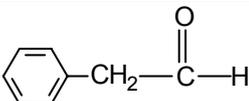
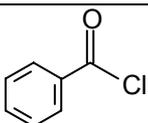
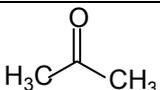
Tab. 16 Vergleich der kinetischen Daten der RE-ADH für die Standardsubstrate p-Cl-Acetophenon und p-Cl-Phenylethanol. Die K_M -Werte für NADH und NAD wurden bei einer Keton/Alkohol-Konzentration von 3 mM bestimmt.

Substrat	K_M (mM)		k_{cat} (s^{-1})	
	rek. RE-ADH	Wildtyp RE-ADH	rek. RE-ADH	rek. RE-ADH
p-Cl-Acetophenon	0,82	0,59	1936	2361
p-Cl-Phenylethanol	0,38	0,28	166	436
NADH	0,05	0,025	-	-
NAD	0,09	0,083	-	-

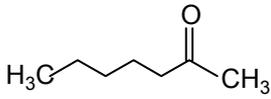
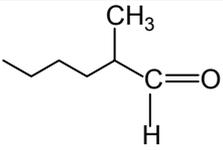
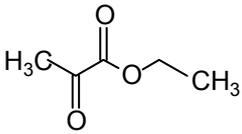
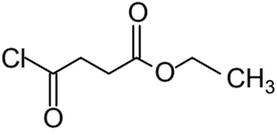
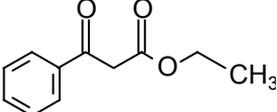
Die Affinität der rekombinanten RE-ADH zu den Keto-Substraten und NAD(H) unterscheidet sich ein wenig von der des Wildtyps, in allen Vergleichsfällen ist der K_M -Wert für das rekombinante Enzym etwas höher. Dies könnte durch unzureichende Zink-Ionen bewirkt sein; trotz der Zugabe des Metallions zur Kultur fehlt möglicherweise einem Teil des exprimierten Proteins Zinkionen.

Um eine Vorstellung über die Substratbindungstasche zu erhalten, wurden kinetische Messungen mit verschiedenen Substraten (Ketone, Ketoester und Aldehyde) durchgeführt. Bei der Auswahl des zu untersuchenden Substrates wurde auf die Natur der Kohlenstoffkette (aliphatisch oder aromatisch) sowie deren Länge geachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Tab. 17 Kinetische Daten der RE-ADH für verschiedene Substrate.

Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
 Acetophenon	0,72	87	121
 p-Cl-Acetophenon	0,82	893	1089
 3-Br-Acetophenon	1,2	1531	1276
 Phenylacetaldehyd	1,5	251,5	168
 Phenacylchlorid	0,52	12310,5	23674
 Aceton	426	465	1

Fortsetzung Tab. 17, kinetische Daten der RE-ADH für verschiedene Substrate

Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
 2-Heptanon	0,48	2269	4727
 2-Methylpentanal	1,2	131	109
 Pyruvat-Ethylester	24,2	4111	170
 4-Cl-3-Keto- Buttersäureethylester	19,6	347	18
 Benzoylessigsäureethylester	16,3	24	1,5

Ketone zeigen generell eine bessere Affinität zur RE-ADH (K_M -Werte < 1) als die Aldehyde und Ketoester und werden dementsprechend besser umgesetzt (höhere k_{cat}/K_M -Werte). Die Länge und die Natur (aliphatisch oder aromatisch) der Kohlenstoffkette der "grossen" Seitenkette beeinflusst wesentlich die Reaktionsgeschwindigkeit der RE-ADH; aromatische und längerkettige aliphatische Seitenketten dieses Teils des Substrates werden mit deutlich besserer Affinität umgesetzt als kurzkettige Substituenten (höchster K_M -Wert bei Aceton mit 426 mM). Die Kohlenstoffkette der "kleinen" Seitenkette hingegen führt zur Verschlechterung der Substratsbindung, wenn sie länger werden (größer als die Methylgruppe $-CH_3$); die K_M -Werte bei Ketoestern sind wesentlich größer als die der Ketone und Aldehyde. Keine Substratbindung findet statt, wenn die "kleinere" Gruppe kleiner als Methyl

ist, wie es beim Benzaldehyd mit -H vorliegt, dieses wird von der RE-ADH gar nicht mehr umgesetzt.

Weiterhin wurde für praktische Anwendungen die Umsetzung einiger technisch interessanter Substrate durch die RE-ADH untersucht. Hier wurden jeweils nur photometrische Aktivitätswerte bei einer Konzentration gemessen, eine Bestimmung von K_M - und v_{max} -Werten wurde nicht durchgeführt.

Abbildung 19 verdeutlicht noch einmal, dass verschiedenste Ketone durch die RE-ADH umgesetzt werden. Die Substituenten am aromatischen Ring von Acetophenon begünstigen die Umsetzungsrate. Acetophenon-Derivate mit einem sperrigen Substituenten (Brom) werden von dem Enzym bevorzugt [relative Aktivität für o-Br-Acetophenon, 1755 %, (Abbildung 19)].

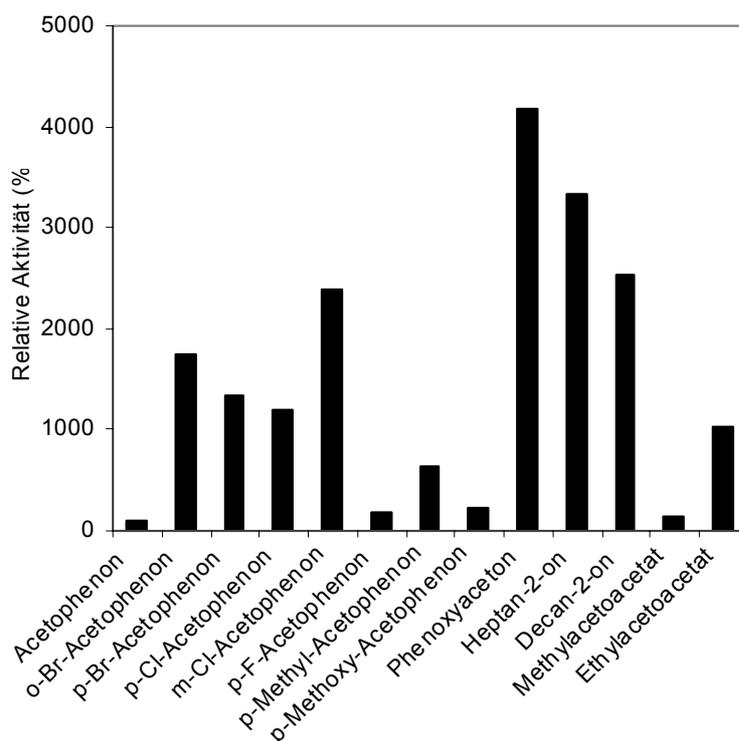


Abb. 19 Umsetzung einiger Ketone und Ketoester mit der RE-ADH. Die Enzymaktivität wurde photometrisch bei einer Substratkonzentration von 3 mM bestimmt.

4. Biotechnologisches Potential der RE-ADH

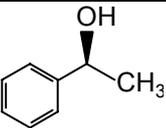
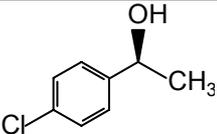
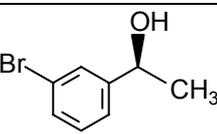
4.1 Enantiomerenreinheit enzymatisch gebildeter Alkohole

Aufgrund seines breiten Substratspektrums wurde das biotechnologische Potential der RE-ADH für einige Ketone exemplarisch untersucht. Insbesondere Ausbeute und der ee-Wert für einige beispielhafte Reduktionen sollten das präparative Potential der RE-ADH aufzeigen. Dazu wurde das Enzym mit einer gekoppelten, simultan ablaufenden Coenzym-Regenerierung eingesetzt. Die Regenerierung des Coenzym NADH wurde mittels eines zweiten Enzyms, der Formiat-Dehydrogenase (FDH), erreicht.

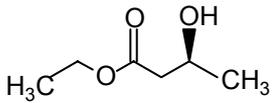
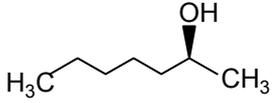
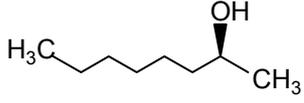
Acetophenon und p-Cl-Acetophenon wurden in den Konzentrationen von 5 mM als Substrat verwendet. Die gaschromatographische Analytik diente zur Überprüfung der optischen Reinheit der gebildeten Alkohole und der Bestimmung der Ausbeute. Die Berechnung des Enantiomeren-Überschusses erfolgte mittels der Formel:

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

Tab. 18 Herstellung chiraler (S)-Alkohole mittels isolierter RE-ADH. Die optische Reinheit und die Ausbeute von (S)-Phenylethanol und (S)-p-Cl-Phenylethanol wurden aus den GC-Daten berechnet. (Testansätze: 5 mM Keto-substrat, 1 mM NAD, 0,5 U RE-ADH (partiell gereinigt, nach Hitzefällung und Ionenaustausch-Chromatographie), 1 U FDH, in 100 mM Formiat-Puffer, pH 6,0; Probenahme nach 1 Std; Extraktion der Produktlösung mit Ethylacetat)

Produkt	Ausbeute (%)	ee [%]
	> 95	> 99
	> 95	> 99
	> 95	> 99

Fortsetzung Tab. 18: Herstellung chiraler (*S*)-Alkohole mittels isolierter RE-ADH

	> 95	> 99
	> 95	> 99
	> 95	> 99

Zusammenfassung der präparativen Umsetzungen:

Tabelle 18 zeigt, dass alle Keto-Verbindungen vollständig und mit hoher Enantioselektivität umgesetzt worden sind, in keinem Fall zeigten sich Verunreinigungen durch die (*R*)-Komponente.

4.2 Immobilisierung der RE-ADH

Die Herstellung von reinem (*S*)-*p*-Cl-Phenylethanol wurde ebenfalls mittels immobilisierter RE-ADH durchgeführt. Die RE-ADH konnte auf dem Trägermaterial Ni²⁺-NTA immobilisiert werden. Die Ausbeute lag bei 77 % (Ausgangsaktivität 13 U; Restaktivität 3 U). Die Reduktion von *p*-Cl-Acetophenon zu (*S*)-*p*-Cl-Phenylethanol konnte mit dem Immobilisat durchgeführt werden. Das für die Reaktion eingesetzte Keton (2,95 mM) wurde vollständig nach ca 20 Minuten umgesetzt. Aus der Kinetik der Umsetzung (Abb. 20) konnte eine Enzymaktivität von 7 U/g Material berechnet werden. Die Ausbeute (aktives Enzym im Immobilisat) beträgt 21 %.

Der Verlauf der Bildung von (*S*)-*p*-Cl-Phenylethanol ist in Abbildung 20 gezeigt.

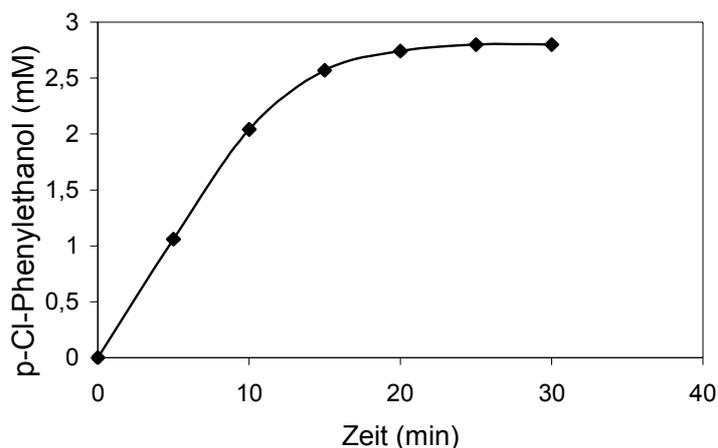


Abb. 20. Produktion von (S)-p-Cl-Phenylethanol mittels immobilisierter RE-ADH. Eingesetzt wurde 30 mg Immobilisat, dieses entspricht 1 U RE-ADH.

B. Untersuchungen zur Funktion des C-Terminus der RE-ADH

Die RE-ADH stellt ein interessantes Enzym mit hohem biotechnologischen Potential dar. Wesentliche Vorteile für die Nutzung sind die Abhängigkeit von NAD und nicht von NADP und die hohe Stabilität. Trotz des breiten Substratspektrums gibt es aber auch eine Reihe von Verbindungen, die von diesem Enzym nicht oder nur mit schwacher Aktivität umgesetzt werden. Beispielsweise werden praktisch nur Ketone mit einer Methyl-Seitenkette umgesetzt, eine Verlängerung zum entsprechenden Ethylderivat reduziert die Aktivität drastisch. Auch bezüglich der "grossen" Seitenkette gibt es eine Reihe von Limitierungen insbesondere bei Verbindungen mit Heteroatomen. Daher ist es ein wesentliches Ziel, Zusammenhänge von Struktur und Aktivität aufzuklären, so dass Eigenschaften des Enzyms gegebenenfalls gezielt geändert werden können. Dazu ist die Kenntnis und Charakterisierung der verschiedenen Domänen im Protein notwendig, um gezielte Veränderungen vornehmen zu können. Dieses Auffinden von Domänen und aktivitätsrelevanten Strukturelementen wird erleichtert durch das Vorliegen von weiteren homologen Wildtyp-Enzymen. Für einige dieser literaturbekannten ADHs liegen zudem Substratspektren vor, so dass die Möglichkeit besteht, Struktur-Aktivitätsbeziehungen aufzeigen zu können. Das ist in diesem Fall möglicherweise ein erfolgversprechenderer Weg als die Aufklärung der Tertiärstruktur, da diese keine Verknüpfung von Strukturelementen mit Aktivitäten liefert. Zudem ist es auch bei Vorliegen von Enzym-Kristallen häufig noch schwierig, gerade strukturelle Details des aktiven

Zentrums aufzuklären, da hierfür mit nicht-umsetzbaren Substratanaloga, die mitunter nicht verfügbar sind, gearbeitet werden muss.

In dieser Arbeit wird daher versucht, über die Struktur weiterer publizierter strukturverwandter Enzyme Domänen zu identifizieren, die für die Aktivität von Bedeutung sind. Dazu sollen die in Tab. 19 aufgeführten Enzyme herangezogen werden.

Tab. 19 Enzyme, die in der Untersuchung des RE-ADH C-Terminus verwendet wurden. Die für die jeweiligen Proteine in dieser Arbeit benutzten Bezeichnungen werden aufgelistet.

Enzym/ Abkürzung/Referenzen	Organismus	Gen-Sequenz- Bezeichnung	Molmasse	Homologie zur RE-ADH (Aminosäuren)
Phenylacetaldehyd- Reduktase (PAR) [79]	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>par</i>	40 kDa	84 %
Alkoholdehydrogenase (RR-ADH) [80]	<i>Rhodococcus</i> <i>ruber</i>	<i>rr-adh</i>	35,5 kDa	63 %
Alkoholdehydrogenase (SsADH) [13]	<i>Sulfolobus</i> <i>solfataricus</i> DSM 1617	<i>ss-adh</i>	37,5 kDa	31 %

Die RE-ADH zeigt eine Homologie von 84 % zur Phenylacetaldehyd-Reduktase (PAR) aus *Corynebacterium* sp. [59]. Biochemisch unterscheiden sich die beiden Enzyme nur durch die Aktivitäten gegenüber Ketonen. Für die RE-ADH konnte eine spezifische Aktivität von 50-80 U/mg (Reduktion von p-Cl-Acetophenon) bestimmt werden, während für die PAR nur 2,1 U/mg (Reduktion von Phenylacetaldehyd) gefunden wurde. Das Substratspektrum der beiden Enzyme ist ziemlich ähnlich. Die RE-ADH und PAR unterscheiden sich hinsichtlich der Hitzestabilität deutlich voneinander [59, 79]. Beide Proteine sind bis zur Aminosäure 316 in der Aminosäure-Sequenz identisch, in diesem Bereich liegen auch die beiden Zinkbindungs- und die Coenzymbindungsstelle. Das katalytische Zink wird von Cys38, His62 und Asp53 gebunden und das strukturelle Zink von Cys92, Cys95, Cys98 und Cys106. Die Rossmann-Fold [81] mit dem Motiv G-X-G-X-X-G, welches für die Bindung des Dinukleotids von NADH verantwortlich ist, wird von den Aminosäuren Gly¹⁷⁹-T-G-G-L-G¹⁸⁴ [78, 82] gebildet. Da sich die beiden Enzyme in der Aminosäuresequenz nur am C-Terminus unterscheiden (ab Aminosäure 317), ist die Untersuchung der Funktion des C-Terminus für den katalytischen Mechanismus für die vollständige Charakterisierung der RE-ADH von großer Bedeutung. Dazu ist es erforderlich, diese Untersuchungen mit rekombinanter PAR durchzuführen.

Die PAR wurde von [79] in *E. coli* exprimiert. Da der publizierte *Corynebacterium* sp.-Stamm für die Amplifizierung des *par* Gens nicht zur Verfügung stand, und da andererseits die einfache Möglichkeit besteht, dieses Gen aus der genomischen DNA von *R. erythropolis* zu gewinnen, wurde diese Alternative genutzt. Das *par* Gen wurde dann über Standard-PCR amplifiziert. Allerdings war die Durchführung von zwei Insertionen notwendig um das vollständige Gen zu erhalten.

1. Isolierung des *par* Gens aus *Rhodococcus erythropolis*

Das für die RE-ADH kodierende Gen mit 1048 bp zeigt 99 % Homologie zu dem *par* Gen (*par* 1158 bp groß). Außer Basenunterschieden an 8 Positionen (siehe Tabelle 20), die zu keinen Aminosäure-Austauschen führen und einer Deletion (Position 949), sind die Nukleotidsequenzen aus beiden Mikroorganismen identisch. Allerdings gibt es für einige Aminosäuren deutliche Unterschiede zwischen beiden Genen in der Codonverwendung (Tab. 19). Wegen dieser geringen Unterschiede, die nur einige wenige Codons betreffen, besteht die Möglichkeit, aus der genomischen DNA von *R. erythropolis* auf der Grundlage des für die RE-ADH kodierenden Gens (1048 bp) das *par* Gen (1158 bp) zu amplifizieren. Durch die Insertion einer Base G (Position 949) wurde das 5'-Endes des 1049 bp grossen Gens erhalten. Zur Isolierung des gesamten *par* Gens wurden die bekannten Nukleotidsequenzen stromabwärts des *re-adh* Gens untersucht und weiter in diese Richtung amplifiziert.

Tab. 20 Vergleich der Codonverwendung von *re-adh* und *par*. Aufgelistet sind die Aminosäuren mit ihren unterschiedlichen Codons, wie sie in den beiden Genen im Bereich der Basen 1 - 948 bp verwendet werden. Die Zahlen zeigen die Positionen der jeweiligen Aminosäuren an.

RE-ADH	PAR
GCA-Ala3	GCG-Ala3
GCC-Ala35, 187	GCT-Ala35, 187
CGT-Arg192	CGC-Arg192
AGA-Arg8	CGA-Arg8
CTG-Leu242	TTG-Leu242
GGG-Gly182	GGT-Gly182
TGT-Cys92	TGC-Cys92

Die Tabelle zeigt, dass die RE-ADH und die PAR in ihren ersten 316 Aminosäuren vollständig identisch sind, lediglich für 7 Aminosäuren werden unterschiedliche Codons verwendet.

Das pRE-ADH Plasmid (ein pUC18 Derivat) [59] enthält das EcoR I 5,1 kb Fragment. Das *re-adh* Gen befindet sich auf diesem Fragment im Bereich 4015 - 5062 bp. Die darauf folgenden 46 bp stromabwärts vom *re-adh* Gen sind zu 100 % identisch zu den entsprechenden Sequenzen in *par* (1049-1094 bp). Das zeigt, dass das komplette *par* Gen auf dem *R. erythropolis* Genom kodiert ist. Die unterschiedlichen Grössen beider Enzyme erklären sich durch die Deletion / Insertion, wodurch sich ein neues Stopp-Codon in anderer Position ergibt.

Zur Isolierung weiterer Nukleotidsequenzen stromabwärts des bekannten 5,1 kb Fragments wurden davon Oligonukleotidprimer abgeleitet und für die Long Distance (Genome Walking) PCR (siehe 3.11.2) verwendet. Die *R. erythropolis* genomische DNA wurde mit dem blunt end erzeugenden Restriktionsenzym Ehe I verdaut, gereinigt und zu dem Adaptor (aus dem Universal Genome Walker kit, Clontech) ligiert. Die Oligonukleotide RE7-5' und AP1 dienten als Primer in der primären PCR, während RE8-5' und AP2 in der sekundären (nested) PCR eingesetzt wurden. Mit dieser Methode konnte ein Amplifikat von 561 bp erhalten werden. Das 5'-Ende dieses Fragments entspricht den letzten 64 bp des *par* Gens. Somit besteht tatsächlich die Möglichkeit, das komplette *par* Gen aus dem *R. erythropolis* Genom zu amplifizieren, allerdings sind nach Amplifizierung des DNA Fragments (1156 bp) noch zwei Insertionen (G-949 und T-1048) notwendig (*par*, 1158 bp groß) um eine Verschiebung des Leserasters zu erzeugen. Die nachfolgende Abbildung 21 zeigt die schematische Darstellung des *R. erythropolis* 5609 bp Fragmentes.

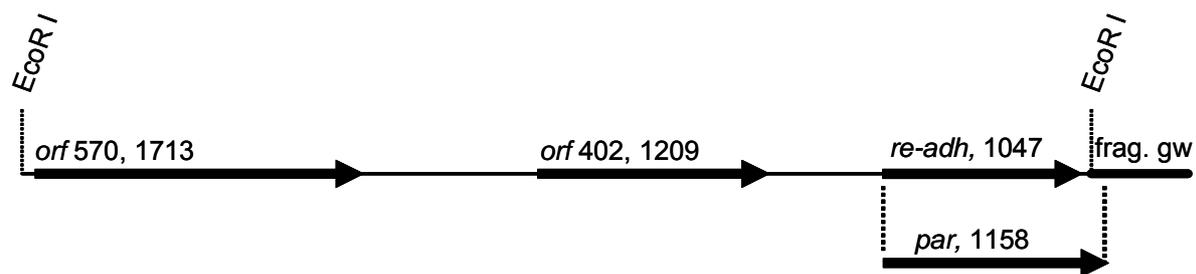


Abb. 21. Organisation der ORFs (offene Leseraster) auf dem 5609 bp DNA-Fragment von *R. erythropolis*. Das EcoR I Fragment stammt aus dem Plasmid pRE-ADH; (frag. gw) entspricht dem über die Long Distance PCR (Genome Walking) 561 bp amplifizierten DNA-Fragment. Die Zahlen neben den ORFs geben die Größe der Fragmente in bp an. *orf570* und *orf402* kodieren für zwei hypothetische Proteine mit 570 (Homologie zu Aminosäuren und Alkane Transportern) bzw. 402 Aminosäuren (Homologie zu verschiedenen Oxidoreduktasen); die für die RE-ADH und PAR kodierenden Sequenzen sind mit *re-adh* bzw. *par* bezeichnet.

1.1 Amplifizierung des *par* Gens

Das *par* Gen ist 1158 bp groß, 1156 bp davon befinden sich auch im *R. erythropolis* Genom. Zur Gewinnung des vollständigen Gens wurden zwei Mutationen mit der Overlap Extension PCR (siehe 3. 4) durchgeführt, die Insertionen eines G und eines T in den Positionen 949 und 1049 beinhalten.

1.1.1 Insertion des G-949

Zuerst wurden zwei DNA-Fragmente *par962* und *par216* (962 bp und 216 bp groß) mit überlappendem Bereich über Standard-PCR amplifiziert. Das Primerpaar RE2-5'/C.Mu11 diente zur Amplifizierung des 962 bp Fragmentes, während die Primer Mu11 und PA3.3' zur Isolierung des 216 bp Fragmentes verwendet wurden (siehe Anhang Primer). Die beiden Amplifikate wurden über eine Agarosegel-Extraktion (Qiaquick Agarosegel Extraction Kit, Qiagen) gereinigt und als Template für die Erzeugung eines 1157 bp Fragmentes eingesetzt. Während der Overlap Extension PCR wurden nach 10 Zyklen die Primer RE2-5' und PA3.3' zum Reaktionsansatz gegeben. Das 1157 bp Fragment wurde im Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel gereinigt und in die NdeI/BamHI Schnittstellen des Plasmids kloniert. Das resultierende Plasmid pPAR1 wurde für die Vermehrung in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Dieses Plasmid diente als Template zur Einführung des T-1049.

1.1.2 Insertion des T-1049

Hierzu wurden die Fragmente *par1066* und *par133* (1066 bp und 133 bp groß) mit Hilfe der Primerpaare RE2-5'/C.Mu22 bzw. Mu22/PA3.3' amplifiziert. Die DNA wurde wie oben beschrieben auf Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Zur Gewinnung des 1158 bp DNA Fragments wurden die beiden Amplifikate *par1066* und *par133* in einer Fusion-PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde in die NdeI/BamHI Schnittstellen des pKA1 Vektors kloniert. Das entstandene Plasmid pPAR2 konnte für die Expression der PAR(K339)-Variante verwendet werden. Das so erhaltene PAR(K339) unterscheidet sich jetzt von dem originalen PAR aus *Corynebacterium* sp. nur noch durch den Austausch Lysin339 gegen Glutamin339. Zur Gewinnung des originalen PAR (mit Glutamin 339) wurde eine zusätzliche Mutation durchgeführt.

1.1.3 Erzeugung der Mutation K339Q

Die Durchführung der Mutation verläuft wie vorab beschrieben nach der Overlap extension PCR Methode. Zur Amplifizierung der zu fusionierenden DNA Fragmente wurden die Primerpaare RE2-5'/ PA.Q339K'und PA3.3'/ PA.Q339K in der PCR verwendet. Das Plasmid pPAR2 diente als Template. Die entsprechenden Amplifikate *par1032* und *par192* (Größe 1032 bzw.192 bp) wurden über die Overlap extension PCR fusioniert. Das erhaltene *par* Gen (1158 bp) wurde zur Expression in den pKA1 Vektor kloniert (resultiertes Plasmid pPAR) und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

1.2 Expression der PAR

Die Expression der PAR wurde mit dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Kulturen (LB-Medium mit 43 µg/ml Cam) im Maßstab von 30 ml bis 1 Liter wurden bei 25 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 wurde die Expression des *par* Gens durch Zugabe von 25 µM IPTG zur Kultur gestartet. Das Wachstum der Zellen wurde über 16-20 h fortgesetzt. Zur Charakterisierung des Enzyms wurde aus den geernteten Zellen Rohextrakt hergestellt (Aufschluß mit Ultraschall, 40 % Zellsuspension); die Überprüfung der Expressionsleistung erfolgte über eine SDS-PAGE (Abbildung 22) und eine photometrische Bestimmung der Enzymaktivität. Überraschenderweise konnte in der löslichen Fraktion nur eine Aktivität von

0,2 U/mg gemessen werden. In der Literatur sind für das bezüglich der Aminosäure-Sequenz völlig identische Protein ca. 10-fach höhere Expressionen in der Größenordnung von 2,1 U/mg (Rohextrakt) beschrieben. Das SDS-Gel der unlöslichen Fraktion zeigte, dass das aus der *R. erythropolis* Gensequenz abgeleitete Enzym zwar überexprimiert wurde, der größte Teil des Proteins liegt aber als Inclusion Bodies vor. Versuche zur Optimierung der Expression (niedrigere Anzuchtstemperatur von 20 °C und Induktorkonzentration 10 µM) konnten den Anteil an löslichem Protein nicht erhöhen.

Die Verwendung anderer Stämme, wie *E. coli* Origami (DE3), welcher die Faltung des exprimierten Proteins verbessern sollte, konnte ebenfalls keine Steigerung der löslichen Fraktion bewirken.

Zusätzlich, wurde das *par* Gen in den Rhamnose induzierbaren Expressionsvektor pJOE4036 über die NdeI/BamHI Schnittstelle kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte mit 0,1 % L- Rhamnose bei einer OD₆₀₀ der Zelle von 0,5. Verschiedene Wachstumstemperaturen wurden getestet (25 °C, 30 °C und 37 °C); Proben wurden bei 37 °C angezogen, gefolgt von einer Umstellung der Temperatur zu 30 °C bzw. 25 °C. Trotz dieser Variationen der Expressionsbedingungen konnte die PAR nicht erfolgreich mit dieser Vektor-Wirtskombination exprimiert werden. Der Anteil an lösliches Protein und dementsprechend die Aktivität konnten nicht erhöht werden.

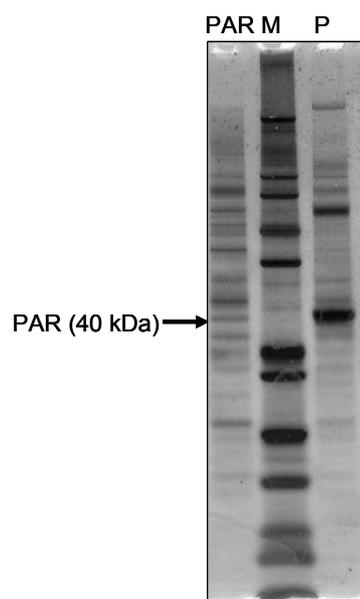


Abb. 22. SDS-PAGE (Silberfärbung), Expression der aus dem *R. erythropolis* Genom erhaltenen PAR in *E. coli* BL21 (DE3). (M) Marker 12, (Invitrogen) Proteingrößenstandard; PAR, exprimierte Phenylacetaldehyd Reduktase; (P) Pellet.

Die Abb. 22 zeigt, dass die PAR zum größten Teil als unlösliches Protein exprimiert wurde. Eine dicke Proteinbande ist im Pellet zu finden (Spur P auf Gel).

1.2 Herstellung von PAR-Varianten mit veränderten

Aminosäuresequenzen

Die Expression des PAR-Enzyms, abgeleitet aus dem *R. erythropolis* Genom, zeigt zwei interessante Ergebnisse:

Zum einen wird die *R. erythropolis*-PAR mit 0,2 U/mg im Vergleich zum publizierten Wert [79] für die PAR aus *Corynebacterium* (2,1 U/mg) mit einer deutlich niedrigeren spezifischen Aktivität (gemessen mit 3 mM Phenylacetaldehyd) exprimiert. Unabhängig von diesem eigenen Wert war aber bereits bei Berücksichtigung der Literaturwerte für die PAR aus *Corynebacterium* gegenüber diversen Substraten klar, dass das PAR-Enzym gegenüber der RE-ADH eine deutlich niedrigere Aktivität besitzt. Offensichtlich ist der C-Terminus, der durch die Deletion bedingt ist und durch den sich die beiden Enzyme voneinander unterscheiden, für das unterschiedliche Aktivitätsspektrum verantwortlich.

Bedingt durch die Deletion ändert sich ab der Aminosäure 316 die Aminosäure-Sequenz völlig. Vergleicht man die Sequenzen der beiden unterschiedlichen C-Termini, zeigt sich, dass diese Unterschiede, die für die *R. erythropolis* ADH 32 Aminosäuren ausmacht, entweder auf die Eigenschaften der Aminosäure-Reste dieser Teilstücke zurückzuführen oder auf die unterschiedlichen Längen. Zur Untersuchung des Einflusses der Länge der C-Termini auf die Eigenschaften der beiden Proteine (PAR, RE-ADH) wurden verschiedene Varianten der PAR (PAR348, PAR353) mit kürzerer Aminosäuresequenz erzeugt. Der Unterschied der Varianten ist im Folgenden graphisch abgebildet.

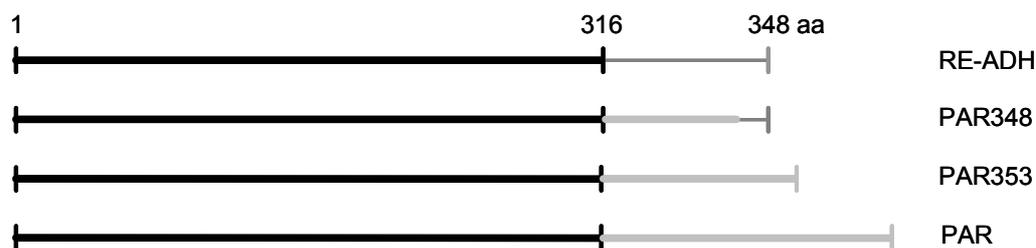


Abb. 23 Vergleich der PAR Varianten mit der RE-ADH. Dargestellt sind jeweils stark schematisiert die Aminosäurenketten

- (*) schwarz fett, 1-316 identische Aminosäuresequenzen in allen vier Proteinen;
- (*) grau fett, PAR-spezifische Aminosäuresequenzen;
- (*) grau dünn, RE-ADH spezifische Sequenzen.

Die für die PAR-Varianten kodierenden Gene *par353* und *par348* wurden zur heterologen Expression in *E. coli* in pKA1 über die NdeI/BamHI Schnittstellen kloniert und die entstandenen Plasmide pPAR3 und pPAR5 in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Kultivierung der rekombinanten Zellen erfolgte wie bei PAR [Stamm *E. coli* BL21 (DE3)/pPAR] unter gleichen Expressionsbedingungen.

1.3.1 Amplifikation des *par353*

Die PAR-Variante PAR353 stellt eine um 32 Aminosäuren gekürzte *Corynebacterium* sp. Phenylacetaldehyd-Reduktase dar. Die Abbildung 24 zeigt einen Vergleich des C-Terminus der beiden Proteine.

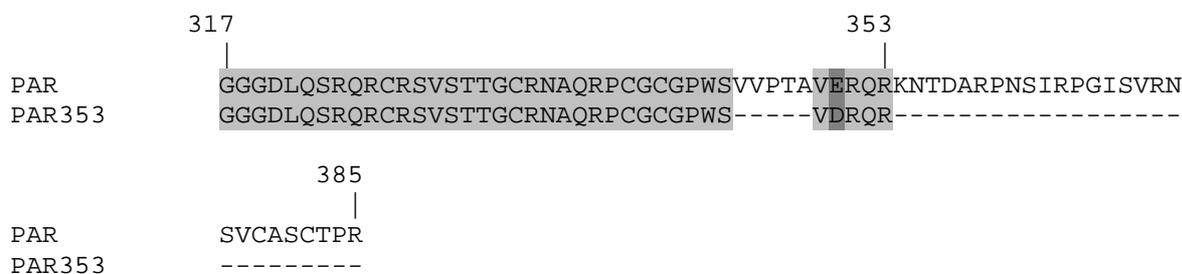


Abb. 24 Alignment des C-Terminus der PAR und PAR353. Die Aminosäuren ab Position 317 wurden bei den beiden Proteinen verglichen. Identische Aminosäurereste sind hellgrau unterlegt, ähnliche dunkelgrau.

Das für PAR353 kodiende Gen (1062 bp) wurde mittels Standard-PCR amplifiziert. Als Template diente das Plasmid pPAR, die Oligonukleotide RE2-5' und PA.353-3' als Amplifizierungsprimer.

1.3.2 Amplifikation des *par348*

Während der Isolierung des *par* Gens wurden zwei Insertionen eingeführt. Nach Insertion des G-949 konnte bei der Suche nach Klonen mit der richtigen Sequenz ein Klon identifiziert werden, dessen PAR-Gen (pPAR4) die Deletion des G-1025 trug. Diese Mutation führte durch Veränderung des Leserasters zur Veränderung der Aminosäuresequenz; die Übersetzung ergab ein Protein mit 348 Aminosäuren (Variante PAR348). Ein Alignment des C-Terminus der PAR und PAR348 ist in der Abbildung 25 zu finden.

Da die PAR348 und RE-ADH gleich lang sind, kann aus dem Vergleich der beiden Proteine eine Aussage über den Einfluss der Länge auf die Eigenschaften der Enzyme gemacht werden.

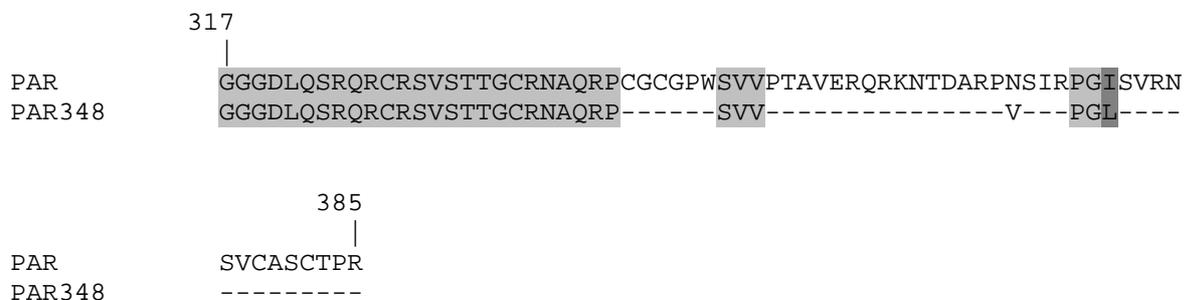


Abb. 25 Alignment des C-Terminus der PAR und PAR348. Die Aminosäuren ab Position 317 wurden bei den beiden Proteinen verglichen. Identische Aminosäurereste sind hellgrau unterlegt, ähnliche dunkelgrau.

Zur Amplifizierung des *par348* diente das Plasmid pPAR4 als Template und die Oligonukleotide RE2-5'/PA.348-3' als Primer. Die PAR353 und PAR348 konnte überexpressiert werden, ein kleiner Teil der rekombinanten Proteine war löslich.

1.3.4 Charakterisierung der PAR353 und PAR348

Durch eine Charakterisierung der PAR-Varianten (PAR aus dem *R. erythropolis* Genom und die beiden verkürzten Enzyme PAR353 und PAR348) mit der RE-ADH bezüglich der Aktivität (U/mg) im Rohextrakt und der Hitzestabilität sollte aufgezeigt werden, inwiefern die unterschiedlichen Längen des C-Terminus für die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften verantwortlich sind. Die Sequenzen der verkürzten PAR-Enzyme entsprechen dabei im wesentlichen dem längeren PAR-Enzym. Die Aktivitäten wurden photometrisch bestimmt, sie sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tab. 21 Aktivität (Rohextrakt) der PAR und PAR Varianten (353 und 348). Die Messungen wurden mit den Standardsubstraten durchgeführt, Phenylacetaldehyd für das *Corynebacterium* sp. Enzym und p-Cl-Acetophenon für die RE-ADH.

Substrat (3mM)	PAR (U/mg)	PAR353 (U/mg)	PAR348 (U/mg)	RE-ADH
Phenylacetaldehyd	0,2	0,7	0,9	14,3
p-Cl-Acetophenon	0,06	0,11	0,15	80

Tab. 21 zeigt deutlich, dass durch Verkürzung des PAR-Enzyms bis zur identischen Länge des RE-ADH-Enzyms keine wesentliche Änderung der Aktivität in Richtung der RE-ADH zu beobachten ist.

Des weiteren wurde die Temperaturstabilität der PAR und PAR-Varianten untersucht, da dieses Merkmal für die RE-ADH charakteristisch ist. Dazu wurden die Enzyme (Rohextrakt) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Während die RE-ADH 1 h bei 40 °C oder höheren Temperaturen (60 °C, 65 °C) stabil bleibt und sogar eine deutliche Aktivierung zeigt (gemessene Restaktivität von 114 %; s. Abb. 18), waren die PAR und PAR-Varianten nach dieser Hitzebehandlung vollständig inaktiviert. Die Untersuchung zur Hitzestabilität dieser Enzyme wurde daher bei niedrigerer Temperatur durchgeführt. Ein Aktivitätsverlust von 60 % wurde für PAR bei 40 °C, 15 min gemessen. Die Varianten (PAR353 und PAR348) zeigten 50 % Restaktivität bei 40 °C nach 15 min Inkubation (siehe Abbildung 26).

2. Einfluss der Aminosäurezusammensetzung am C-Terminus auf die Eigenschaft der Enzyme

Eine weitere Möglichkeit für die Ursache in den Aktivitätsdifferenzen der beiden Enzyme RE-ADH und PAR können Unterschiede in der jeweiligen Aminosäurezusammensetzung am C-Terminus der beiden Proteine sein. Diese Ursache ist, obwohl es sich nur um eine kleine Teilsequenz handelt, relativ schwierig zu verifizieren, da sowohl einzelne Aminosäuren, im Prinzip jede einzelne, als auch ein Sequenzbereich aus mehreren Aminosäuren dafür verantwortlich sein kann. Im Extremfall kann es auf den Einfluss einer einzigen Aminosäure ankommen. Das bedeutet bei systematischer Vorgehensweise eine nicht realisierbare Vielzahl von Austauschen und Kombinationen.

Im Folgenden ist daher eine Einschränkung gemacht worden, indem die Zusammensetzung der beiden C-terminalen Teilstücke verglichen und auf auffällige Unterschiede hin untersucht wurde. Zusätzlich wurden noch die PAR-Mutante PAR348 und die ADH aus *Rhodococcus ruber* vergleichend mit herangezogen, da diese Enzyme eine gleiche Länge wie die RE-ADH aufweisen (348 und 346 Aminosäuren). Für die Untersuchung zur Funktion einzelner Aminosäuren des C-Terminus der Alkoholdehydrogenasen war es sinnvoller, Mutanten der *R. ruber* ADH herzustellen, da diese relativ leicht exprimierbar waren und eine gute Stabilität aufwiesen. Die nachfolgende Tabelle gibt einige relevante biochemische Eigenschaften der vier Proteine an.

Tab. 22 Zusammenstellung einiger Eigenschaften (Aktivität und Temperaturstabilität) der RE-ADH, PAR, PAR348 und RR-ADH. Die Aktivität wurde mit 3 mM p-Cl-Acetophenon bestimmt.

Enzyme	RE-ADH	PAR	PAR348	RR-ADH
Aktivität (U/mg)	80	0,06	0,15	4,5
Temperaturstabilität Inkubation bei 60 °C, 30 min (% Restaktivität)	114	0	0	100

In Tabelle 23 sind die Aminosäuren des C-Terminus dieser 4 ADHs gegenübergestellt

Tab. 23 Aminosäurezusammensetzung am C-Terminus (ab Aminosäure 317) der RE-ADH, PAR, PAR348 und RR-ADH. In den beiden letzten Zeilen sind die Summen der basischen und sauren Aminosäuren zusammengestellt.

Aminosäuren	RE-ADH	PAR	PAR348	RR-ADH
Ala	6	4	1	3
Cys	0	6	2	0
Asp	1	2	1	1
Glu	2	1	0	3
Phe	1	0	0	1
Gly	4	7	5	5
His	0	0	0	1
Ile	0	2	0	1
Lys	0	1	0	0
Leu	4	1	2	2
Asn	1	4	1	0
Pro	1	6	2	2
Gln	0	4	3	0
Arg	3	11	5	5
Ser	2	8	4	1
Thr	2	5	2	4
Val	4	6	4	3
Tyr	1	0	0	1
Basische (+)	3	12	5	5
Saure (-)	3	3	1	4

Die Tabelle 23 hebt einen möglichen Einfluss der Nettoladung am C-Terminus der Proteine hervor. Ein Zusammenhang zwischen Nettoladung, ausgedrückt als Verhältnis von basischen Aminosäuren zu sauren und der Enzymaktivität bzw. Proteinstabilität kann dieser Tabelle und der Tabelle 22 entnommen werden.

Die RE-ADH besitzt die höchste Aktivität (bis zu 80 U/mg) und Stabilität (keine Deaktivierung nach Inkubation bei 60°C für 1 h), auffallend ist bei diesem Enzym, dass der C-Terminus eine Nettoladung von 0 zeigt (Verhältnis basische AS/saure AS = 1). Für die PAR und PAR348 liegt dieses Verhältnis mit 12:3 bzw. 5:1 deutlich höher. Diese Proteine zeichnen sich durch ihre niedrigen katalytischen Aktivitäten und Thermostabilitäten aus. Die Aktivität der RR-ADH liegt bei 4,5 U/mg, die Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung ähnelt der der RE-ADH (leicht Aktivierung bei 60 °C, 30 min; 105 % Restaktivität). Das Verhältnis basische AS/saure AS von 1,25 ist hier dem der RE-ADH angenähert.

Zusätzlich besitzen die RE-ADH und RR-ADH keine weitere Cysteinreste am C-Terminus (ab Aminosäure 317). In diesem Bereich des Proteins befinden sich sechs Cysteinreste in PAR und zwei in PAR348. Berücksichtigt man die wichtige Rolle dieser Aminosäuren in der Bindung von Zinkionen in der Alkoholdehydrogenase [83], könnten diese Unterschiede Ursache für große strukturelle Veränderungen sein. Insbesondere in der PAR und PAR348 wurden (wie in der RE-ADH und RR-ADH) die Cysteinreste, die an der Bindung von Zn^{2+} beteiligt sind, identifiziert (Cys³⁸, Cys⁹², Cys⁹⁵, Cys⁹⁸ und Cys¹⁰⁶), so dass den zusätzlichen sechs bzw. zwei keine definierte Funktion zugeordnet werden konnte.

In folgenden wird nur auf den Einfluss des Verhältnisses basische zu sauren Aminosäuren am C-Terminus der Proteine auf ihre biochemischen Eigenschaften eingegangen. Da sich die RR-ADH gut exprimieren lässt, wurde dieses Enzym zur weiteren Untersuchung des Einflusses der Aminosäurezusammensetzung (netto Ladung) am C-Terminus auf das Verhalten der Proteine verwendet.

Die Tabelle 23 zeigt, dass sich in der RR-ADH im C-terminalen Bereich fünf basische Aminosäuren (Arginin) und vier saure (drei Glutamat und ein Aspartat) befinden. Durch den Austausch eines Arginins gegen eine andere nichtbasische Aminosäure wird das Verhältnis basische zu saure AS zu 1 umgewandelt (vier zu vier). Vom RR-ADH-Enzym wurden daher Mutanten erzeugt, in denen ein Argininrest gegen eine neutrale Aminosäure, Serin bzw.

gegen eine saure Aminosäure, Glutamat, ausgetauscht ist. In der zweiten Mutante ist das Verhältnis sogar zugunsten der sauren Aminosäuren verschoben.

2.1 Expression der RR-ADH (Alkoholdehydrogenase aus *R. ruber*)

Zu Vergleichszwecken wurde die Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus ruber* (RR-ADH) in *E. coli* exprimiert. Vorversuche [80] hatten bereits gezeigt, dass es sich bei diesem Enzym auch um eine NAD-abhängige mittelkettige Zink-ADH handelt. Mit dem Enzym aus *R. erythropolis* zeigt es Ähnlichkeiten bezüglich der Temperaturstabilität und einem breiteren Substratspektrum. Bezüglich der Aminosäuresequenz zeigt es eine Homologie von 63 % zur RE-ADH, so dass dieses Enzym für vergleichende Fragestellungen mit herangezogen werden kann.

Das *rr-adh* Gen (1041 bp), Genbank Accession Nummer AJ491307 wurde aus dem Tetrahydrofuran-abbauenden Gram-positiven Bakterium *Rhodococcus ruber* isoliert [80]. Die rekombinante RR-ADH wurde durch Klonierung in *E. coli* erzeugt. Die Expression dieses Enzyms verlief ähnlich wie die der RE-ADH. Das Gen wurde über PCR amplifiziert mit Hilfe des Primerpaares RR1-5'/RR1-3'. Die Klonierung erfolgte in den pKA1-Vektor über die NdeI/BamHI-Schnittstellen. Das daraus resultierende Plasmid pRR-ADH1 wurde zur Expression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

Zur Produktion des Enzyms wurden die rekombinanten Zellen in 30 ml bis 1 Liter Maßstab (Schüttelkulturen; LB-Medium, Cam 34 µg/ml) angezogen, 16-20 h nach Induktion mit IPTG geerntet und für die Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Aus 1 Liter konnten 3 g Zellen erhalten werden. Die spezifische Aktivität von 4,5 U/mg (p-Cl-Acetophenon als Substrat) wurde photometrisch mit Rohextrakt bestimmt.

Zur Charakterisierung des Enzyms wurden 3 g Zellen aufgeschlossen (20 % Zellsuspension, 100 mM Kpi Puffer, pH 6,0) und die RR-ADH über Hitzedenaturierung und eine Q-Sepharose partiell gereinigt. Die Tabelle 24 fasst die Aufreinigungsschritte zusammen.

Tab. 24 Zusammenfassung der Reinigungsschritte der RR-ADH aus *E. coli* BL21 (DE3)/pRR-ADH1

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	80,7	372	4,5	100	1
Hitze-fällung	28,8	391	13,5	105	2,8
Q-Sepharose	1,5	195	123	52,3	26,6

Die RR-ADH konnte mit diesem System überexprimiert werden, aber mehr als die Hälfte des Proteins lag als Inclusion Bodies vor. Die Untersuchung der Proteinlösung mittels SDS Agarosegel-Elektrophorese (Abb. 28) zeigt eine ca. 36 kDa große Proteinbande für die Untereinheit. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Molmasse von 35,5 kDa, wie sie sich aus der Primärstruktur errechnet.

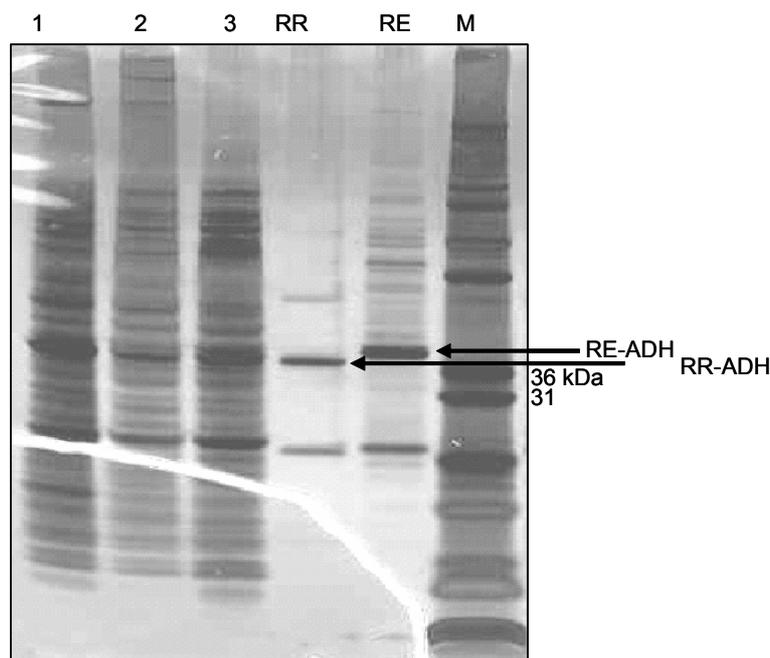


Abb. 28 SDS-PAGE zur Expression der RR-ADH in *E. coli* [BL21 (DE3)/pRR-ADH1]. Die Proteinbande wurden mit Silberfärbung nachgewiesen. (M) Marker 12, Invitrogen; (1) Pellet; (2) Rohextrakt; (3) Proteinlösung nach Hitzedenaturierung; (RR) RR-ADH nach Q-Sepharose; (RE) RE-ADH nach partieller Aufreinigung [Q-Sepharose], die zum Vergleich mit aufgetragen wurde.

2.2 Erzeugen von RR-ADH Mutanten

Die Homologie-Recherche diente zur Identifizierung von Aminosäuren in der RR-ADH, die für die Einführung von Mutationen relevant sein könnten. Sowohl die RE-ADH als auch die RR-ADH zeigen Ähnlichkeiten von 30 % in ihrer primären Struktur zur Alkoholdehydrogenase aus *Sulfolobus solfataricus* (SsADH). Die dreidimensionale Struktur dieses Enzyms ist publiziert [9] und es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des Proteins zum aktiven Zentrum gehört. Für eine Veränderung des Verhältnisses von basischen zu sauren Aminosäuren am C-Terminus, welche zur Erhöhung der Aktivität führen sollte, kommt nur der Austausch von positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Argininresten) in Frage. Die dreidimensionale Struktur der Alkoholdehydrogenasen zeigt, dass der Pyrophosphat-Teil des Coenzym NADH in einer positiv geladenen Tasche, bestehend aus zwei basischen Aminosäureresten, eingebunden ist [9]. In der SsADH wird diese Tasche durch H39 und R342 gebildet. Der C-Terminus ist damit bekannt als Bestandteil des aktiven Zentrums. Ein Alignment der drei Enzyme RE-ADH, RR-ADH und SsADH zeigt, dass R342 in der SsADH dem Argininrest R341 in der RE-ADH und R340 in der RR-ADH entspricht. Die Abbildung 29 (Nummerierung nach RE-ADH Aminosäuresequenzen) zeigt dieses Alignment der C-terminalen Aminosäuren (ab 315) für die drei Proteine, ausgerichtet an den o.a. Arginin-Resten. Für die Einführung von Mutation würden der Austausch des R340 der RR-ADH zur Veränderung in der Ladung der positiv geladenen Tasche und damit zur Beeinträchtigung der NADH-Bindung und dementsprechend der enzymatischen Reaktion führen. Für einen Austausch zur Verringerung des Anteils an basischen Aminosäuren wurde daher das benachbarte R338 mutiert.

In dieser Position ist sowohl in der SsADH als auch in der RE-ADH eine neutrale Aminosäure vorhanden.

	315		341																
RE-ADH	-	DI	AV	ET	FS	LD	NG	AE	AY	RR	LA	AG	TL	SG	RA	VV	VP	GL	
RR-ADH	-	DI	HT	ET	FT	LD	EG	PT	AY	RR	LR	EG	SI	RG	RG	VV	VP	PG	-
SsADH	-	PM	IT	KT	MK	LE	EA	NE	AI	DN	LE	NF	KA	IG	RQ	VL	IP	--	

Abb. 29 Partielles Alignment der RE-ADH, RR-ADH und SsADH. Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen ab 315 (Nummerierung nach RE-ADH). Die NADH-Liganden (Wechselwirkung der Pyrophosphat-Gruppen mit Argininresten) [9] sind fett geschrieben. Identische Reste sind hellgrau unterlegt, ähnliche dunkelgrau.

Die Untersuchung des Einflusses der Aminosäurezusammensetzung am C-Terminus auf die Aktivität und Thermostabilität der RR-ADH konzentrierte sich vor allem auf das Verhältnis von basischen zu sauren Aminosäuren. Im Wildtyp-Enzym der RR-ADH beträgt dieses 5:4 (Tabelle 23). Durch Austausch des Argininrestes R338 gegen Serin (neutral) bzw. gegen Glutaminsäure (sauer) kann ein Verhältnis von 4:4 (Ser) bzw. 4:5 (Glu) erreicht werden.

Zur Amplifizierung der Gene für die Klonierung der Mutanten wurden die Primer RR1-5'/RR-R338S (Mutante R338S) und RR1-5'/RR-R338E (Mutante R338E) in der PCR verwendet. Die Klonierung in den pKA1-Vektor ergab die Plasmide pRR-ADH2 und pRR-ADH3. Diese Plasmide wurden in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und für die Expression unter gleichen Bedingungen wie bei der Wildtyp-RR-ADH angezogen. Die beiden Mutanten zeigten deutlich höhere Aktivitäten im Rohextrakt (16,8 U/mg für R338S und 17,6 U/mg für R338E) als das Wildtyp-Enzym (4,5 U/mg).

Zum besseren Vergleich wurden die beiden Mutanten über eine Hitzedenaturierung und eine chromatographische Reinigung (Q-Sepharose) partiell gereinigt und die spezifischen Aktivitäten bestimmt (Tabelle 25 und 26).

Tab. 25 Reinigungsprotokoll der RR-ADH Mutante R338S (Stamm BL21 (DE3)/pRR-ADH2; gemessen mit p-Cl-Acetophenon)

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	53,5	900	16,8	100	1
Hitzefällung	22,8	1030,5	45	114	2,6
Q-Sepharose	1,8	518	278	57	16,5

Tab. 26 Reinigung der RR-ADH Mutante R338E (Stamm BL21 (DE3)/pRR-ADH3; gemessen mit p-Cl-Acetophenon)

Reinigungsschritte	Protein (mg)	Aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	53	936	17,6	100	1
Hitzefällung	13,9	676	48,8	72	2,8
Q-Sepharose	0,85	341	404	36	22,9

Durch den Austausch des Arginin338 wurden RR-ADH Mutanten erzeugt, die im gereinigten Zustand deutlich höhere Aktivitäten zeigten als der Wildtyp (Abbildung 30); zudem sieht man eine Abstufung der spezifischen Aktivität von 110 U/mg für das Wildtyp-Enzym mit einer basischen Aminosäure in Position 338 über 280 U/mg für Serin in dieser Position und 400 U/mg für die saure Aminosäure Glutaminsäure.

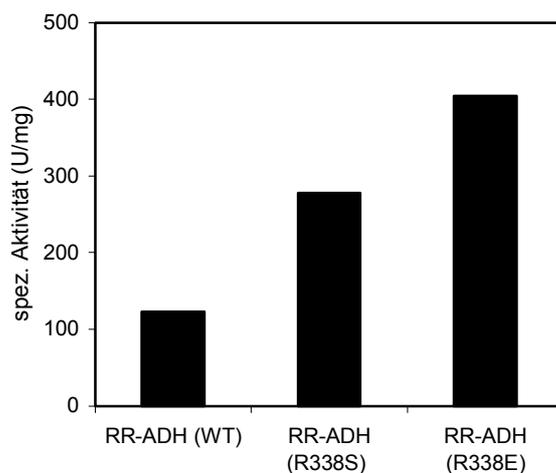


Abb. 30 Graphischer Vergleich der Aktivitäten von RR-ADH (WT) und der Mutanten R338S bzw. R338E. Aufgetragen sind die spezifischen Aktivitäten nach 2-stufiger Aufreinigung (3 mM p-Cl-Acetophenon als Substrat).

2.3 Charakterisierung der RR-ADH Mutanten R338S und R338E

Der Einfluss der Mutationen auf die Enzymeigenschaften wurde durch Messung von kinetischen Eigenschaften detaillierter bestimmt. Da dem C-Terminus eine Funktion in der Bindung des NADH-Pyrophosphats zugeschrieben werden kann (Alignment mit SsADH), wurden die RR-ADH Mutanten auf ihre Affinität zu NADH untersucht. Die K_M -Werte der Enzyme für NADH sind in Tabelle 27 vergleichend dargestellt.

Tab. 27 K_M Werte von RR-ADH und Mutanten für NADH. Die Messung wurde mit 3 mM p-Cl-Acetophenon durchgeführt

Enzym	K_M (mM)
RR-ADH (WT)	0,039
RR-ADH (R338S)	0,085
RR-ADH (R338E)	0,16

Deutlich zeigt sich hier wie bei der spezifischen Aktivität ein Gang von der basischen AS in Position 338 über die neutrale zur sauren AS: Das Enzym mit der basischen Arginin hat die höchste Affinität zum Coenzym (kleinster K_M -Wert), über die neutrale zur sauren Aminosäure sinkt dann die Affinität beträchtlich ab.

Da die Aussagen zum Einfluss der Mutationen auf die Aktivität bislang nur mit einem Substrat (p-Cl-Acetophenon) gemacht wurden, sollte zur weiteren Charakterisierung der Mutanten der Einfluss dieser Mutationen auf das Substratspektrum untersucht. Dazu wurden kinetischen Daten von ausgewählten Substraten bestimmt.

Tab. 28 Vergleich des Substratspektrums der RR-ADH zu den Mutanten R338S und R338E. Kinetische Parameter der Enzyme wurden verglichen. K_M (mM), k_{cat} (s^{-1}) und k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$).

Substrat	RR-ADH (Wildtyp)			RR-ADH (R338S)			RR-ADH (R338E)		
	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M
Acetophenon	0,76	303	399	0,9	303	337	0,67	328	489,5
p-Cl-ACetophenon	0,06	595	9917	0,77	878	1140	0,31	1103	3558
o-Br-Acetophenon	0,04	607	15175	0,02	1645	822,5	0,06	1861	31017
Phenylacetaldehyd	0,17	158	929	0,92	247,5	269	0,5	255	510
Phenacylchlorid	0,6	61	102	-	-	-	-	-	-
Benzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceton	35,7	408	11	19	133	7	121,7	809	7
2-Heptanon	2,1	709	338	0,15	1211	8073	0,3	1755	5850
2-Methylpentanal	0,15	149	993	0,65	231	355	11,8	256	21,7

Fortsetzung Tab. 28 Vergleich des Substratspektrums der RR-ADH zu den Mutanten R338S und R338E. Kinetische Parameter der Enzyme wurden verglichen. K_M (mM), k_{cat} (s^{-1}) und k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$).

Pyruvat-Ethylester	25	156	6	20,5	203	10	25,5	54	2
4-Cl-3-Keto-Buttersäure-ethylester	0,2	214	1070	1,1	253	230	0,6	385	642
Benzoylessigsäure-ethylester	79	100	1,2	64	30	0,4	-	-	-

Die Tabelle 28 zeigt, dass das Substratspektrum der RR-ADH nicht wesentlich durch die Mutationen verändert wurde; für einige Substrate konnten allerdings signifikante Veränderungen in der Affinität (K_M) und beim k_{cat} -Wert beobachtet werden. Diese Veränderungen traten beim k_{cat} -Wert gleichmäßig auf, d.h. wenn hier eine Veränderung beobachtet wurde, dann stieg er von R338 (WT) über S338 zu E338 an (siehe folgende Abbildung)

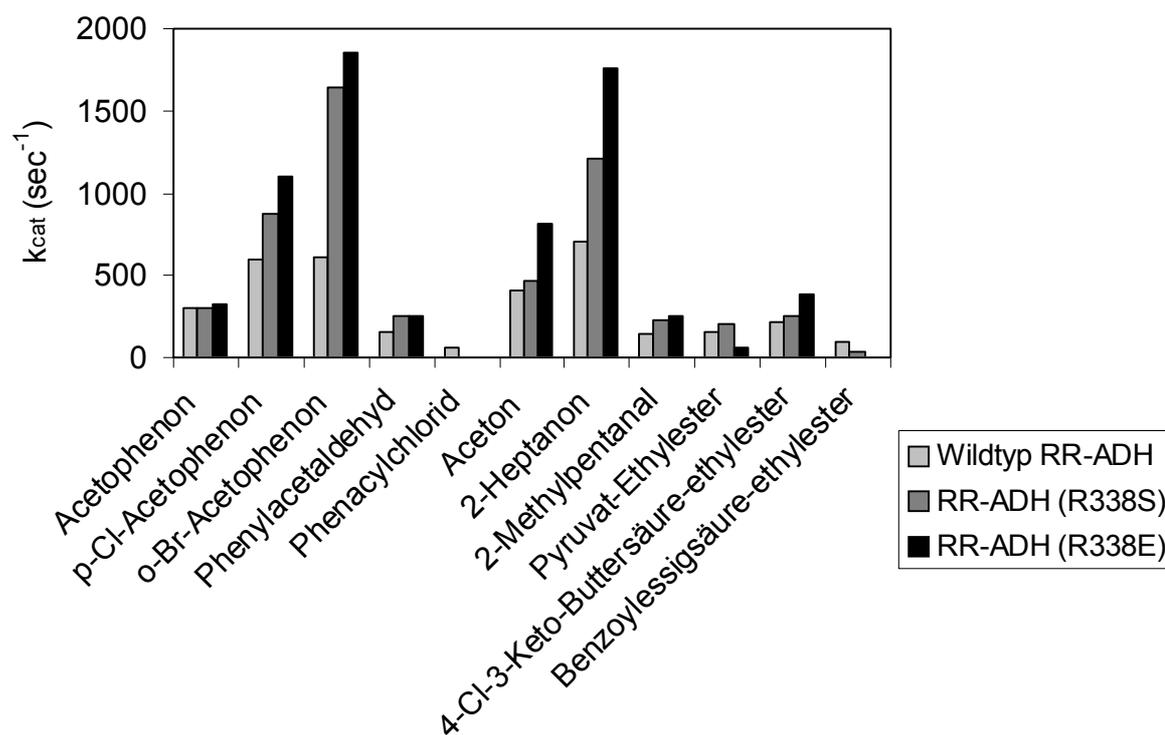


Abb. 31 Graphische Darstellung der k_{cat} -Werte einiger untersuchter Substrate. Die Werte für das Wildtyp RR-ADH und die Mutanten R338S bzw. R338E sind für die jeweiligen Substrate nebeneinander gestellt.

Durch die Mutationen konnte keine neue Aktivität, also neue Umsetzungen, die der Wildtyp nicht katalysierte, erzeugt werden. Lediglich im umgekehrten Sinne wurde beobachtet, dass einige Substrate, die der Wildtyp umsetzte, von den Mutanten nicht mehr akzeptiert wurden. So wird Phenacylchlorid nur vom Wildtyp-Enzym umgesetzt, die Mutanten zeigen keine Aktivität mehr, die Mutante R338E nimmt Benzoylessigsäure-ethylester nicht mehr als Substrat. Benzaldehyd wird nicht vom Wildtyp umgesetzt, aber auch die Mutanten sind dazu nicht in der Lage.

Durch die Mutation R338E wurde das Enzym so verändert, dass Substrate mit sperrigen Substituenten auf beiden Seiten der Keto-Gruppe nicht mehr für das aktive Zentrum zugänglich sind. Sperrige Substituenten auf beiden Seiten sind auch vorher, also vom Wildtyp, nicht umgesetzt worden.

Zusammenfassung: Optimierung der Expression von Alkohol-Dehydrogenasen aus *Rhodococcus*-Stämmen

Durch die Verwendung des konstruierten pKA1 Vektors (p15A Ori), konnten die RE-ADH und RR-ADH in *E. coli* deutlich von ca. 6 auf 50 U/mg überexprimiert werden. Ein Teil der rekombinanten ADHs ist jedoch als Inclusion Bodies zu finden. Der Zusatz von Zink-Ionen (Cofaktor für die ADHs) führte zu weiterer Steigerung an Enzymausbeute auf ca. 80 U/mg.

C. Rhodococcen und Oxidation von Tetrahydrofuran

Tetrahydrofuran und viele andere zyklische Ether wie 1,4-Dioxane und Tetrahydropyran, die als Lösungsmittel in der chemischen Industrie dienen, werden nur von wenigen Mikroorganismen abgebaut und als C-Quelle genutzt. Die Fähigkeit von Rhodococcen bzw. allgemein von Actinomyceten, Schadstoffe abzubauen und diese als Energie-Quelle zu verwenden, ist seit längerem bekannt [84, 85]. Speziell für den Abbau von Tetrahydrofuran wurde 1991 ein *Rhodococcus*-Stamm (*Rhodococcus ruber* 219) von Bernhardt und Diekmann isoliert und beschrieben [51]. Der einleitende Schritt bestehend aus einer Hydroxylierung, die von einer Monooxygenase katalysiert wird und einer nachfolgenden Ringöffnung. Einige

Enzyme des vollständigen Abbauweges konnten grob proteinchemisch nachgewiesen werden [51]. Von besonderem Interesse ist dabei der einleitende Schritt der Hydroxylierung durch die Monooxygenase. Generell besteht die enzymatisch funktionelle Einheit der Monooxygenase aus mehreren Proteinen (3-5), so dass man hier typischerweise von einem Enzymkomplex sprechen kann.

Die für den TMO (Tetrahydrofuran-Monooxygenase)-Komplex kodierenden Gene wurden in der vorliegenden Arbeit isoliert, zur Charakterisierung kloniert und sequenziert.

1. Isolierung der Gene des Tetrahydrofuran- Monooxygenase Komplexes von *Rhodococcus ruber*

1.1 DNA Fragmente aus der β -Untereinheit

Wie für andere Monooxygenase-Komplexe beschrieben, liegen die für diese Proteine kodierenden Gene als Operon (Gencluster) im Genom vor [53, 86]. Die Isolierung der Gene erfolgte über die Amplifizierung von DNA-Fragmenten einer Komponente dieses Clusters, dann wurde, ausgehend von dieser Partialsequenz, das gesamte Gencluster sequenziert.

In dem Tetrahydrofuran-abbauenden Bakterium *Pseudonocardia* sp. wurden die für diesen Weg kodierenden Gene isoliert und sind in einer Datenbank verfügbar [53]. Durch Homologie-Recherche sowohl in der Datenbank BLAST als auch in Block Seacher konnte dieser Enzym-Komplex zur Methan/Phenol/Toluen-Hydroxylase-Familie zugeordnet werden. In Analogie dazu wurde das postulierte TMO aus *R. ruber* 219 ebenfalls dieser Familie zugeordnet. Die Vertreter dieser Familie sind Multikomponenten-Enzymsysteme mit konservierten Bereichen in den Proteinen.

Zur Isolierung eines Teils dieses Genclusters aus *R. ruber* wurden zuerst degenerierte Primer (siehe Anhang Primer) aus konservierten Bereichen der Methan/Phenol/Toluen-Hydroxylase Familie (Identification number: IPB003430A, Datenbank Block Seacher) abgeleitet. Die konservierten Bereiche aus der β -Untereinheit dieser Proteinfamilie wurden dabei berücksichtigt

Mit Hilfe des Primerpaares THF1/THF1' konnte ein DNA-Fragment von 264 bp amplifiziert werden. Die PCR mit dem Primerpaar THF2/THF2' ergab ein 648 bp Fragment. Die Datenbank Recherche (BLAST bei NCBI) zeigte eine Ähnlichkeit von 97 % des Amplifikats zur β -Subunit der Multikomponenten-Tetrahydrofuran Monooxygenase von *Pseudonocardia* sp. K1 [53] sowie zu anderen gut bekannten Monooxygenasen-Komplexen wie der Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Homologie zu chain B), Toluol-O-xylene-monooxygenase aus *Pseudomonas stutzeri* und der Phenol-Hydroxylase aus *Ralstonia* sp. KN1. Die beiden Sequenzen überlappen weitgehend am 3'-Ende, so dass auf diese Weise unter Verwendung der beiden Primerpaare THF1/THF1' bzw. THF2/THF2' zwei überlappende Fragmente aus dem gleichen Bereich des TMO-Komplexes amplifiziert wurden. Die schematische Darstellung der amplifizierten DNA Fragmenten ist der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen.

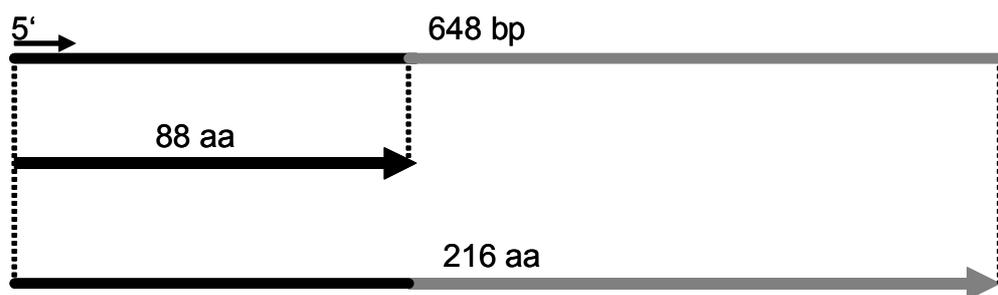


Abb. 32 Schema zur Position der mittels der degenerierten Primerpaare THF1/THF1' und THF2/THF2' amplifizierten Nukleotid-Sequenzen, 264 bp (88 aa) bzw. 648 bp (216 aa). Der überlappende Bereich ist mit schwarz gezeichnet. Die in grau unterlegte Teilsequenz gehört ausschließlich zu dem 648 bp Fragment.

Ein Alignment der Sequenz der 216 Aminosäuren (aus 648 bp übersetzt) mit der β -Untereinheit des Monooxygenase-Komplexes aus *Pseudonocardia* sp. K1 wird zur Veranschaulichung der Ähnlichkeit von 97 % hier gezeigt (Abb. 33).

	10	20	30	40	50	60
R. ruber	GLWERTFFQGTGSTHEREIENDLQVARDNNLFVAASKEWVDFLSAQLLPISLTFYGLVAPQ					
Pseud.	GLWERTFFQGTGSTHEREIENDLQVARDNNLFD AV SKWVDFLSAQLLPISLTFYGLVAPQ					
	70	80	90	100	110	120
R. ruber	SAALRPALGDAIANCLGYSAGYKLRQAQALVLYGGELEREIPGFSTADGKRRFLEDPEWQ					
Pseud.	SAALRPALGDAIANCLGYSAGYKLRQAQALVLYGGELEREIPGFSTADGKRRFLEDPEWQ					
	130	140	150	160	170	180
R. ruber	PTRYLERLGSITDWAETVVAANICFEPLIGNLLRRDVLIRLAGSYGDATTPTLGQVAQA					
Pseud.	PTRYLERLASITDWAETI V VAANICFEPLIGSLLRREVLIRLAGSYGDATTPTLGQVAQA					
	190	200	210			
R. ruber	EWGWVRDWSVALVRFILNDATHSEANTQKVQEWLED					
Pseud.	EWGWVRDWSVALVRFILND T TYSEANTQKVQEWLED					

Abb. 33 Alignment der Partialesequenz von 216 Aminosäuren aus *R. ruber* mit der β -Untereinheit der *Pseudonocardia* sp. K1 Tetrahydrofuran Monooxygenase. Die Homologie liegt bei 97 %. Identische Aminosäuren sind in hellgrau hervorgehoben, die ähnlichen sind dunkelgrau unterlegt.

1.2 Der vollständige TMO-Komplex

Unter Verwendung der Long Distance PCR Methode (Universal Genome Walking kit, Clontech) wurden über 7 verschiedene Ansätze die vollständigen Gene des TMO-Komplexes isoliert.

Als Template für die primäre PCR diente die aus der genomischen DNA hergestellte Bibliothek. Zur Durchführung der nested PCR wurde eine 1:25 Verdünnung aus der ersten PCR angesetzt (siehe 3.11.2.). Die verwendeten Oligonukleotid-Primer THF3, 5, 7, 9, 11, 13 und THF15 (primäre PCR) und THF4, 6, 8, 10, 12, 14, und THF16 (nested PCR) sind im Anhang (Primer) aufgelistet. Die Abbildung 34 stellt den schematischen Ablauf der PCR zur Isolierung der vollständigen TMO-Gene dar.

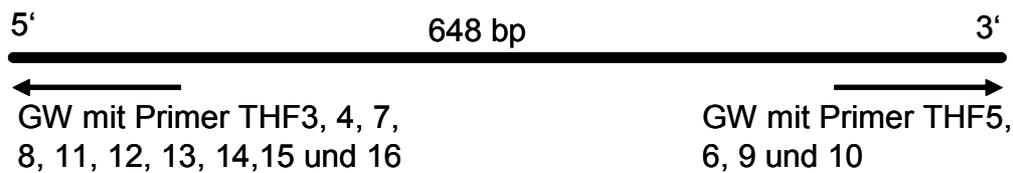


Abb. 34 Schema zur Isolierung des TMO Komplexes mittels Genome Walking (GW). Die Pfeile geben die Richtung der Amplifizierungen an.

Anhand der angegebenen Primer konnten weitere DNA-Fragmente upstream und downstream der 648 bp Nukleotidsequenz amplifiziert werden. Auf dem letztendlich isolierten 8490 bp Fragment konnten 9 ORFs identifiziert werden, die Homologien zu den Komponenten der von Thiemer [53] charakterisierten Mehrkomponenten-Monooxygenase, der Succinatsemi-aldehyd-Dehydrogenase und einem hypothetischen Protein aus *Pseudonocardia* sp. K1 zeigen. Die folgende Abbildung zeigt die Anordnung diese ORFs.

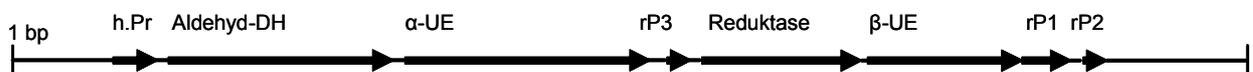


Abb. 35 Anordnung der Strukturgene des TMO Komplexes auf dem 8490 bp DNA Fragment. Die Gene sind mit den Pfeilen gekennzeichnet und zeigen die Richtung der Transkription bzw. Translation. (h. Pr) Hypothetisches Protein; (Aldehyd-DH) Aldehyd Dehydrogenase; (α -UE) α -Untereinheit der Monooxygenase; (β -UE) β -Untereinheit der Monooxygenase; rP1, rP2 und rP3 sind hypothetische Proteine mit möglicher regulatorischer Funktion.

1. Charakterisierung des Monooxygenase- Komplexes

Bei 7 der 9 identifizierten ORFs konnten jeweils stromaufwärts potentielle Ribosomen-Bindungsstellen (RBS) identifiziert werden, die mehr oder weniger der Standard-RBS von *E. coli* [87] ähneln. Lediglich vor dem Startcodon des ORF rP2 konnte keine ähnliche Sequenz identifiziert werden. Die Tabelle 29 gibt die Position von 8 ORFs auf dem 8490 bp DNA Fragment an. Der neunte ORF (1110 bp) wird auf dem komplementären Strang kodiert (7284 bp bis 8394), die davon abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeit zu vielen Transposasen (meist aus Pseudomonaden).

Tab. 29 Die Position von 8 ORFs auf dem 8490 bp DNA Fragment

ORF für Protein	Position (bp)	Protein (aa)
h. Prot.	683-1006	107
Aldehyd. DH	1159-2661	500
α -UE	2810-4447	545
rP3	4456-4540	27
Reduktase	4571-5659	362
β -UE	5690-6730	346
rP1	6730-7084	117
rP2	7145-7289	47
Transposase	8394-7284	369

Die Übersetzung der isolierten Nukleotidsequenzen in Aminosäuren zeigt einige für die Oxygenase charakteristische Eigenschaften an.

Am N-Terminus der TMO-Reduktase befindet sich das Motiv $CX_4CXXCX_{24-34}C$ [Abbildung 36 (konserviert bei Oxygenase-Elektronentransportern)]. Dieses Motiv wurde als Ligand für die Bindung des Eisen-Schwefel Clusters vom Chloroplasten-Typ beschrieben [88]. Die potentiellen Bindungsstellen für die Coenzyme FAD und NAD konnten in der Reduktase durch Vergleich mit bekannten Proteinen identifiziert werden. Die Reduktase vieler Mehr-Komponenten Monooxygenasen enthält die Bindungsdomäne für die beiden Coenzyme [89] (siehe Abb. 36).

A

	10	20	30	40	50	60																																																						
Reduktase.TMO	M	G	T	F	N	V	R	F	E	P	I	G	E	E	I	E	C	G	E	D	E	T	I	L	D	A	A	F	R	S	G	L	N	L	V	H	G	C	R	E	G	R	C	S	A	C	K	A	F	V	L	D	E	G	W	I	Y	L	K	K
Reduktase.ThmD	M	G	T	F	N	V	R	F	E	P	I	G	E	E	I	E	C	G	E	D	E	T	I	L	D	A	A	F	R	S	G	L	N	L	V	H	G	C	R	E	G	R	C	S	A	C	K	A	F	V	L	D	E	G	W	I	Y	L	K	K
Ralstonia.PoxF	--	M	Y	S	L	T	I	E	P	I	G	Q	T	I	P	I	A	P	G	Q	T	V	L	D	A	C	L	R	S	G	V	W	L	P	H	A	C	C	H	L	C	A	T	C	K	V	Q	V	V	E	G	--	E	V	D	Q	G	E		
Ps.putida.PheA6	--	M	S	Y	N	V	T	I	E	P	T	G	E	V	I	E	V	E	D	G	Q	T	I	L	Q	A	A	L	R	Q	G	V	W	L	P	F	A	C	G	H	G	T	C	A	T	C	K	V	Q	V	V	E	G	--	E	V	D	I	G	E
Noc.corallina.AmoD	M	T	T	I	N	V	--	Q	P	F	S	H	E	Y	S	C	E	D	G	E	S	L	L	D	G	A	L	R	N	S	L	L	L	K	Y	G	C	K	H	G	G	C	G	T	C	K	V	R	L	L	D	G	--	D	V	E	E	P		

	70	80																									
Reduktase.TMO	Y	S	S	F	A	L	S	D	Q	E	E	E	G	G	Y	T	L	L	C	R	A	V	P	E	S	D	V
Reduktase.ThmD	Y	S	S	F	A	L	S	D	Q	E	E	E	G	G	Y	T	L	L	C	R	A	V	P	E	S	D	V
Ralstonia.PoxF	A	S	S	F	A	L	M	D	F	E	R	D	N	G	Q	L	A	C	C	A	T	A	Q	S	D	L	
Ps.putida.PheA6	A	S	P	F	A	L	M	D	I	E	R	D	E	R	K	V	L	A	C	C	A	I	P	L	S	D	L
Noc.corallina.AmoD	G	S	S	F	A	L	T	P	E	D	R	E	N	D	V	I	L	A	C	A	S	V	P	L	E	P	C

B

	130	140	150	160	170	180																																																						
Reduktase.TMO	T	H	D	I	R	R	L	E	L	Q	I	E	S	P	Q	G	F	G	F	L	P	G	Q	F	V	D	I	W	I	P	G	T	E	Q	R	R	S	F	S	M	A	N	L	P	S	D	--	G	R	L	E	F	I	I	K	Q	Y	P	G	G
Reduktase.ThmD	T	H	D	I	R	R	L	E	L	Q	I	E	S	P	Q	G	F	G	F	L	P	G	Q	F	V	D	I	W	I	P	G	T	E	Q	R	R	S	F	S	M	A	N	L	P	S	D	--	G	R	L	E	F	I	I	K	Q	Y	P	G	G
Ralstonia.PoxF	T	P	T	I	R	G	I	W	L	R	V	K	G	A	K	V	A	F	Q	A	G	Q	Y	L	N	L	Q	V	P	G	C	D	Q	P	R	A	F	S	L	A	N	A	P	D	--	E	E	L	V	E	L	H	V	R	K	V	E	G	G	
Ps.putida.PheA6	S	P	T	I	K	G	L	H	I	K	L	D	R	--	P	M	P	F	Q	A	G	Q	Y	V	N	L	A	L	P	G	I	D	G	T	R	A	F	S	L	A	N	P	P	S	R	N	D	E	V	E	L	H	V	R	L	V	E	G	G	
Noc.corallina.AmoD	T	A	D	I	A	R	V	R	L	R	L	E	P	G	E	E	I	A	F	T	A	G	Q	F	V	N	V	E	V	P	G	T	G	L	L	R	T	F	S	L	A	N	A	P	D	D	P	S	V	E	L	I	C	K	L	Y	P	D	G	

FAD

	190	200	210	220	230	240																																																						
Reduktase.TMO	R	F	G	A	M	L	D	E	G	L	T	V	G	D	S	V	K	F	T	G	P	Y	G	T	C	Y	L	R	D	T	G	G	S	R	S	A	L	L	I	A	G	G	S	M	A	P	I	L	S	L	L	R	Q	M	S	E	D	G	Q	
Reduktase.ThmD	R	F	G	A	L	L	D	D	G	L	A	V	G	D	P	V	K	F	T	G	P	Y	G	T	C	Y	L	R	D	T	G	G	S	R	S	A	L	L	I	A	G	G	S	M	A	P	I	L	S	L	L	R	Q	M	S	D	D	G	Q	
Ralstonia.PoxF	Q	A	T	G	Y	L	H	E	R	L	A	V	G	D	A	L	R	F	S	A	P	Y	G	R	F	F	V	R	R	S	A	--	Q	A	P	M	L	F	L	A	G	G	S	G	L	S	S	P	R	A	M	I	R	E	L	L	A	A	G	E
Ps.putida.PheA6	A	A	T	G	F	I	H	K	Q	L	K	V	G	D	A	V	E	L	S	G	P	Y	Q	F	F	V	R	D	S	Q	--	A	G	D	L	I	F	I	A	G	G	S	L	S	S	P	Q	S	M	I	L	N	L	L	E	R	G	D		
Noc.corallina.AmoD	L	F	S	R	F	L	R	D	E	A	A	P	G	T	P	V	R	V	F	G	P	Y	Q	L	K	I	R	L	S	--	H	R	P	I	L	M	I	A	G	G	S	L	A	P	L	L	S	M	L	R	D	L	A	A	K	K	C			

NAD-Ribose

Abb. 36 Partielles Alignment der TMO-Reduktase mit dem ThmD (*Pseudonocardia* K1, [53]), PoxF (*Ralstonia eutropha*, [90]), PheA6 (*Pseudomonas putida*, BH [91]) und AmoD (*Nocardia corallina* B-276, [92]). Die Zahlen über den Aminosäuresequenzen zeigen deren Positionen an. (A) Die Eisen-Schwefel Liganden (konservierte Cysteinreste) und (B) die potentielle Bindungsstelle des FAD-Isoalloxazin-Rings und der NAD-Ribose [89] sind in hellgrau unterlegt.

Außerdem konnte zweimal das Motiv DE(D)XRH in der primären Struktur der α -Untereinheit der TMO in dem charakteristischen Abstand von 100 Aminosäureresten gefunden werden (Abb. 37). Diesem Motiv wird eine Funktion in der Bindung des Eisen-Oxo-Komplexes (Fe-O-Fe) zugeschrieben und stellt das aktive Zentrum der Oxygenase dar [90].

	130	140	150	160	170	180																																																						
α -UE.TMO	I	D	D	P	E	L	Q	N	A	Y	I	Q	L	D	E	Q	R	H	T	A	M	Q	M	N	L	Y	R	W	Y	M	K	N	M	P	E	P	V	G	W	N	L	G	L	Q	A	V	G	G	D	S	I	L	V	A	A	Q	N	L		
Prot.A	A	T	A	A	E	Q	K	N	G	Y	L	A	Q	V	L	D	E	I	R	H	T	H	Q	C	A	F	I	N	H	Y	S	K	H	Y	H	D	P	A	G	H	N	D	A	R	R	T	R	A	I	G	P	L	W	K	G	M	K	R	V	
	190	200	210	220	230	240																																																						
α -UE.TMO	T	G	S	-	F	M	T	G	D	P	F	Q	A	A	V	A	L	Q	V	V	E	T	A	F	T	N	T	I	L	V	A	F	P	D	V	A	V	R	N	H	D	F	A	L	P	T	V	M	N	S	V	Q	S	D	E	A	R	H	I	
Prot.A	F	A	D	G	F	I	S	G	D	A	V	E	C	S	V	N	L	Q	L	V	G	E	A	C	F	T	N	P	L	I	V	A	V	T	E	W	A	S	A	N	G	D	E	I	T	P	T	V	F	L	S	V	E	T	D	E	L	R	H	M

Abb. 37 Partielles Alignment der α -Untereinheit der TMO und des löslichen Methan-Monooxygenase Protein A (β) aus *Methylocystis* sp. Stamm WI 14 (Genbank accession number AAF01269). Die konservierten DE(D)XRH Motive des binuklearen Eisenzentrums sind in hellgrau hervorgehoben.

2. Klonierung der *tmo* Gene aus *R. ruber* 219

Bei der THF-Monooxygenase (TMO) handelt es sich um eine Mehrkomponenten-Monooxygenase. Die Klonierung aller Komponenten in einem einzigen Klonierungsschritt kann aufgrund der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments (bis zu 6 kb) ineffizient ablaufen, zahlreiche Fehlermöglichkeiten bestehen, beispielweise das Auftreten von Mutationen. Die PCR zur Amplifikation der für die Monooxygenase-Aktivität notwendigen Gene von insgesamt 5,6 kb könnte fehlerhaft verlaufen, auch wenn man Polymerasen einsetzt, die in der Lage sind, große DNA-Fragmente (bis zu 20 kb) zu amplifizieren. Statt die Gene über PCR zu amplifizieren, wurde als Alternative mit Hilfe einer DNA Bank ein 6,1 kb DNA-Fragment, welche die TMO-Gene enthält, aus dem *R. ruber* Genom isoliert.

2.1 Erzeugen einer DNA Bank

Unter Verwendung der in dem GenomeWalker Kit (Clontech) beschriebenen Methode wurde ein 8229 bp großes Fragment isoliert. Auf diesem DNA-Fragment befinden sich alle für den THF-Abbau notwendigen Gene (α - und β -Untereinheiten der Monooxygenase, Reduktase und die weitere erforderliche Proteine). Zur Klonierung der *tmo* Gene in einem Schritt wurde eine DNA-Bank hergestellt. Dazu wurde die genomische DNA aus *R. ruber* 219 mit den Restriktionsendonukleasen Not I und Eco47-3 verdaut, da sich die Gene die für den THF-Abbau kodieren, auf einem 6135 bp großen Not I / Eco47-3 Fragment befinden (Abb.38)

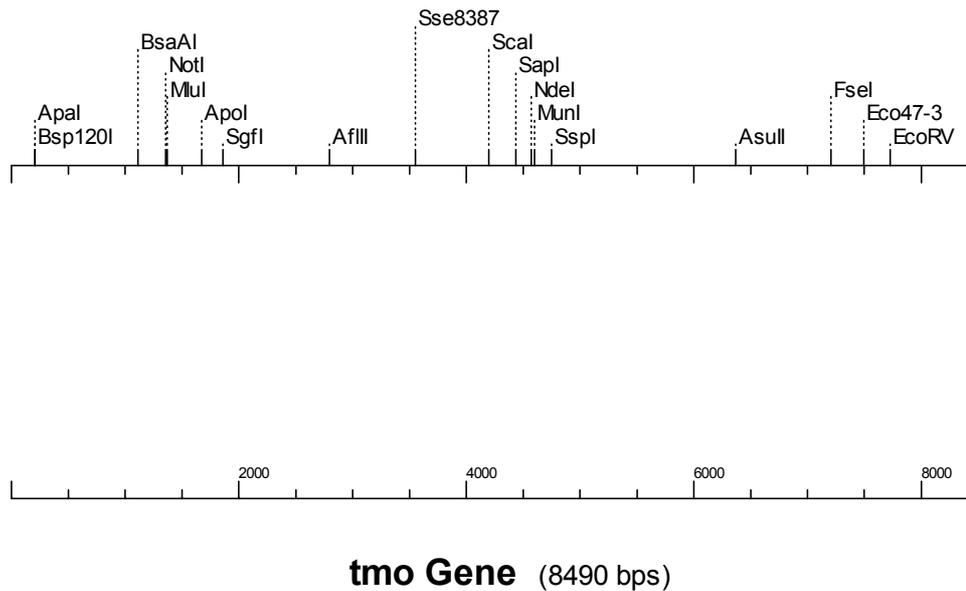


Abb. 38 Restriktionskarte des 8490 bp Fragments aus *R. ruber*. Die Zahlen geben die Positionen der Schnittstellen in Basenpaaren an. Die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen NotI und Eco47-3 entsprechen den Positionen 1357 und 7491.

Die DNA Fragmente der Größe 5-6,5 kb wurden isoliert (Agarosegel Extraktion Kit, Qiagen) und über die Not I und EcoR V Schnittstellen des pBluescript II SK (+) Klonierungsvektors ligiert. Die entstandenen rekombinanten Plasmide wurden in *E. coli* XL10 Gold (Stratagene) transformiert.

2.2 Screening der DNA Bibliothek

Die rekombinanten *E. coli* XL10 Gold-Zellen wurden zur Plasmidisolierung in 5 ml Übernachtskultur angezogen (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin). Für eine effiziente Suche nach positiven Klonen wurden Plasmidpools (3-5 Kolonien in 5 ml Kultur) erzeugt. Die Identifizierung der Kolonie, die die *tmo* Gene trägt, erfolgte über PCR. Die verwendeten Primer SCRE1 und SCRE2 wurden von dem 5'- bzw. 3'-Ende der *tmo*- α -Untereinheit (kodiert für die α -Untereinheit der Monooxygenase-Komponente) abgeleitet. Das aus diesem Screening identifizierte Plasmid pTMO wurde über Restriktionsanalyse nach TMO Komponenten (β -Untereinheiten und Reduktase) untersucht, für diesen Verdau wurde HindIII eingesetzt (da dieses Enzym an zwei Stellen innerhalb des 6,1 kb NotI/Eco47-3 Fragments schneidet, siehe Restriktionskarte, Abb. 38). Es folgt eine partielle Sequenzierung (ca. 700 bp

in beiden Richtungen, sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) zur Bestätigung der vorherigen Nachweismethode. Alle Komponenten des TMO-Genclusters konnte auf diese Weise in dem Plasmid pTMO nachgewiesen werden. In Abbildung 39 ist ein Agarosegel des mit HindIII verdauten pTMO Plasmids dargestellt.

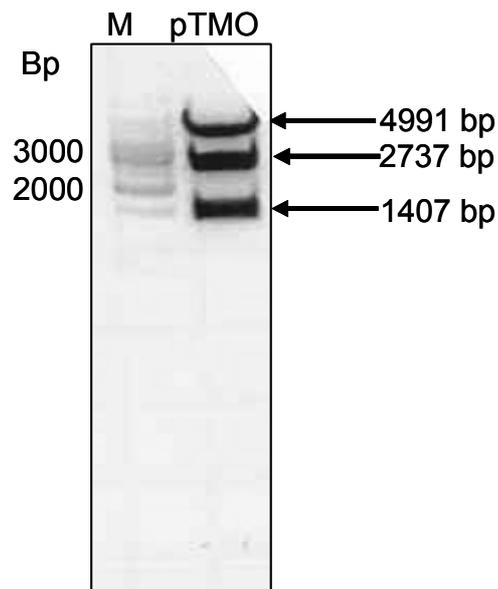


Abb. 39 Agarosegel (0,8 %) zum Nachweis der *tmo* Gene auf dem pTMO Plasmid. Der Verdau wurde mit HindIII durchgeführt. (M) ist der 1 kb DNA Ladder-Marker (GeneRulerTM).

3. Expression der *tmo* Gene

Zur Expression wurden die *tmo* Gene im Expressionsvektor pKK223-3 subkloniert. Dazu wurde das Plasmid pTMO mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und Not I verdaut und das ca. 6200 bp große Fragment, welches die TMO Gene enthält, isoliert (Agarosegel Extraktion Kit, Qiagen). Nach Auffüllung der Enden dieses Fragments mit dem Klenow Enzym folgt die Klonierung in der Sma I Schnittstelle des pKK223-3 Vektors (dephosphoryliert, SAP) und die Transformation in *E. coli* JM105. Aus den Kolonien wurden Plasmide isoliert und auf richtige Orientierung des Inserts untersucht (Verdau mit BamH I). Klone mit dem richtigen rekombinanten Plasmid pTMO1 wurden für Expressionsversuche angezogen.

Die Messung der Monooxygenase-Aktivität erfolgte photometrisch (mit zellfreiem Rohextrakt als Enzymquelle) durch Detektion der NADH-Extinktionsabnahme (Aktivität

ausgedrückt als Anfangsreaktionsgeschwindigkeit). Die Werte für verschiedene Substrate (THF, 2-Methyl-THF, 1,4-Dioxan und Pyrrolidin), die in gleicher Größenordnung liegen (gerechnete spezifische Aktivität um 0,15 U/mg), sind in nachfolgender Graphik (Abb. 40) zusammengefasst.

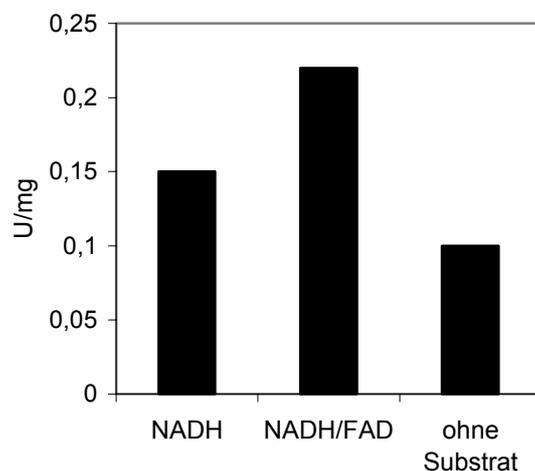


Abb. 40 Diagramm zur Umsetzung von THF, 2-Methyl-THF, 1,4-Dioxan und Pyrrolidin mittels der TMO. Für jedes Substrat wurde zwei unterschiedlichen Messungen durchgeführt, mit NADH oder NADH/FAD. Ein Ansatz ohne Substrat diente als Kontrolle.

Eine Abnahme der NADH Extinktion konnte festgestellt werden, dies wurde durch die Zugabe von FAD gestärkt. Aus diesen photometrischen Umsätzen konnte für THF eine Aktivität von 0,15 (Ansatz ohne FAD) bzw. 0,22 U/mg (Ansatz mit FAD) für die Monooxygenase berechnet werden. Als „Hintergrund“ wurde eine Substrat-unabhängige NADH-Oxidation von 0,1 U/mg detektiert. Da die photometrischen Aktivitäten nur als erste orientierende Ergebnisse aufzufassen sind, war geplant, die Umsetzungen auch durch gaschromatographische Messungen zu ergänzen, wobei dann die Abnahme von THF bzw. die Zunahme eines Produkts nachzuweisen wäre. Diese Messungen stießen allerdings auf methodische Schwierigkeiten, da THF wegen des niedrigen Siedepunkts (66 °C) mit den verfügbaren Gaschromatographen nicht detektierbar war. Alternative Nachweismethoden wie HPLC oder Kapillarelektrophorese sind für THF wegen eines fehlenden Chromophors ebenfalls nicht anwendbar.

Diskussion

A- Reduktive Enzyme in *Rhodococcus*-Stämmen

Die Fähigkeit von *Rhodococcus* Stämmen, reduktive Reaktionen zu katalysieren, wurde an zwei NAD-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen näher untersucht: einem Enzym aus *Rhodococcus erythropolis* (RE-ADH) und einem ähnlichen Enzym aus *R. ruber* (RR-ADH). Beide Enzyme wurden umfassend biochemisch charakterisiert, wobei bei der RE-ADH der Schwerpunkt auf der Expression und Anwendung lag und bei RR-ADH auf der Identifizierung von Proteindomänen, die für die Katalyse essentiell sind.

Alkoholdehydrogenasen zählen zu einer sehr umfassenden Enzymgruppe, die in der Lage sind, Ketone stereospezifisch zu reduzieren. Insbesondere durch das breite Substratspektrum und die hohe Stabilität der RE-ADH ist dieses Enzym ein interessanter Katalysator für asymmetrische Synthesen. Limitierend für die industrielle Anwendung war allerdings zu Beginn dieser Arbeit die Verfügbarkeit, im Wildstamm wird das Enzym mit einer spezifischen Aktivität von ca. 2 U/mg gebildet, das rekombinante Enzym ergab bei Verwendung eines Standard-Vektors auch kaum höhere Enzymgehalte bei Bildung großer Mengen an unlöslichen Inclusion Bodies. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher die Optimierung der Expressionsbedingungen für die RE-ADH.

Zur heterologe Expression der RE-ADH in *E. coli* wurden verschiedenen Expressionssysteme verwendet. Mit dem Stamm JM105/pRE-ADH1 konnte keine Überexpression des *re-adh* erreicht werden. Die gemessene Enzymaktivität lag bei 6 U/mg und das SDS-Gel zeigte kein überexprimiertes Protein. Der *E. coli* Stamm JM105 enthält das Allele $lacI^Q$, welches durch eine erhöhte Synthese des *lacI* Repressor Proteins eine effiziente Kontrolle der Expression gewährleisten soll. Trotzdem wird eine basale Expression häufig bei der Anwendung von *tac*-Promotor basierten Systemen beobachtet. Dies kann zur Verschlechterung bei einer heterologen Expression führen, da die Transkription bzw. Translationsmaschinerie der Wirtszelle dadurch überlastet wird. Für die Expression der RE-ADH mittels dieser Wirtsvektor-Kombination kann das Fehlen der strengeren Kontrolle der Translation die Ursache für die geringere Expressionsleistung sein, auch wenn vor der Induktion mit IPTG keine Enzymaktivität gemessen wird.

Generell wird zum Erzielen einer besseren heterologen Proteinexpression in *E. coli* neben den Tac-Promotor basierten Vektoren das um ein mehrfaches stärkere Bakteriophagen T7 System (pET Vektoren) verwendet, welches praktisch keine basale Transkription zeigt. Die Tabelle 30 gibt für einige Promotoren eine Rangordnung ihrer Stärke an. Die Stärke des bla-Promotors (β -Lactamase) diene bei dem Vergleich als relative Einheit [93].

Tab.30 Relative Promotorstärken [93]

Promotor	Relative Stärke (bla)
T7 _{A1}	76
T5 _{D/E20}	56
λ_{PL} , λ_{PR}	37
tac	17
lac	6
lacUV5	4
con	4
bla	1

Die erste Optimierung der Expression fand mit dem pET System statt. Das *re-adh* Gen wurde in den pET11a Vektor kloniert (BL21 (DE3)/pRE-ADH2), die Expression des Enzyms ergab allerdings nur unlösliches Protein und eine entsprechend sehr niedrige Aktivität. Dieses Ergebnis spiegelt eine der Limitierungen der pET Vektoren wider; mit dem T7 Promotor werden prinzipiell größere Mengen an mRNA (des zu exprimierenden Gens) synthetisiert und dementsprechend höhere Konzentrationen am gewünschten Protein (z.B. bis zum 40-50 % der gesamten Proteins der Wirtzelle) [68]. Aufgrund der Geschwindigkeit der darauf folgenden Translation kommt es allerdings in vielen Fällen zur Synthese von Proteinen in nicht nativen Konformationen. Im Vergleich zu den P_{tac} Systemen wird die basale Transkription von pET Systemen als sehr niedrig beschrieben. Allerdings war im Fall der RE-ADH im Rohextrakt aus *E. coli* Zellen BL21 (DE3)/pRE-ADH2 durch photometrische Aktivitätsbestimmung nur eine geringfügige Proteinexpression nachweisbar, was auch im SDS-Gel bestätigt wurde.

Ein weiterer Optimierungsversuch erfolgte über die Reduzierung der Genkopienzahl in den Zellen. Beim Einsatz rekombinanter *E. coli* zur Expression spielt die Plasmidkopienzahl, welche die Gendosis widerspiegelt, eine entscheidende Rolle. Durch Reduktion der Gendosis

wird eine entsprechende Verringerung der Menge an synthetisierter mRNA erreicht, die Erschöpfung der Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Wirtszelle kann dadurch vermieden werden. Das *re-adh* Gen wurde dazu in den selbstkonstruierten Hybridvektor pKA1 (p15A ori) kloniert. Dieser Vektor enthält Komponenten aus pET11a (ein pBR322 Derivat) und pACYC184, einem typischen "medium-copy-number"-Plasmid. Obwohl die Kopienzahl pro Zelle des pACYC184-Vektors mit 10-12 nah bei der des pET11a mit 15-20 liegt [94], wurde eine deutlich bessere Expressionsleistung mit dem pKA1 Vektor erzielt. Die Aktivität des löslichen Enzyms konnte auf 30 U/mg erhöht werden, was einer 5-fachen Aktivität des pKK223-3-Systems entspricht.

Trotz dieser Verbesserung wurde allerdings weiterhin ein signifikanter Teil des RE-ADH Proteins als unlöslicher Teil exprimiert. In einem nächsten Optimierungszyklus sollte daher eine Optimierung der Codonverwendung vorgenommen werden. Im *E. coli* Genom sind nicht alle Codons gleichmäßig vertreten. Die Codons wie AGG, AGA, CCC, CUA, AUA und CGA zählen zu den seltenen, den sog. „minor codons“. Limitierungen ergeben sich vor allem daraus, dass die entsprechenden tRNAs ebenfalls in gleicher, niedriger Größenordnung vorhanden sind [76]. Die Tabelle 31 gibt die Präferenz in % an.

Tab. 31 Präferenz von der sechs am seltesten verwendeten Codons in *E. coli*

Codon	AGG	AGA	CGA	CUA	AUA	CCC
Aminosäuren	Arginin	Arginin	Arginin	Leucin	Isoleucine	Prolin
Präferenz (%)	0,14	0,21	0,31	0,32	0,41	0,43

Diese seltenen Codons können die heterologe Expression bei der Translation in *E. coli* negativ beeinflussen, insbesondere wenn sie als Cluster in dem zu exprimierenden Gen auftreten. Allerdings treten auch bereits durch einzelne seltene Codons Probleme bei der Translation auf [76]. Die Anzahl dieser sogenannten „minor codons“ im gesamten Gen, ihre Lage (am 5'-Ende vorkommende führen zu einer deutlichen Verschlechterung bei der heterologen Expression) und ihre Häufigkeit wurden als Ursache für translationale Fehler wie Frameshifts oder Fehler bei der Proteinfaltung beschrieben [95].

Das *re-adh* Gen enthält ein Arginin AGA Codon in Position 8 und sieben Prolin-Codons CCC. Vier der sieben Prolin-Codons befinden sich nahe des N-Terminus in den Positionen 13, 19, 21 und 23 (siehe Abbildung 41).

ATG	AAG	GCA	ATC	CAG	TAC	ACG	AGA	ATC	GGC	GCG	GAA	CCC	GAA	CTC	ACG	GAG	ATT	54
M	K	A	I	Q	Y	T	R	I	G	A	E	P	E	L	T	E	I	18
CCC	AAA	CCC	GAG	CCC	GGT	CCA	GGT	GAA	GTG	CTC	CTG	GAA	GTC	ACC	GCT	GCC	GGC	108
P	K	P	E	P	G	P	G	E	V	L	L	E	V	T	A	A	G	36

Abb. 41 Übersetzung der ersten 108 Nukleotiden des *re-adh* Gens. Die seltenen Codons und ihre entsprechenden Aminosäuren sind fett markiert.

Aufgrund ihrer Lage am 5'-Ende und ihrer clusterartigen Anordnung sollte die Auswirkung ihres Austausches auf die Expression untersucht werden. Zur Verbesserung der RE-ADH Expression wurde das Arginin-Codon AGA an der Position 8 gegen ein CGT ausgetauscht. Dieser Austausch war durchaus erfolgreich, es konnte eine Steigerung der Enzymaktivität von 30 auf 50 U/mg festgestellt werden. Allerdings war damit auch noch nicht die Bildung von Inclusion Bodies beseitigt, die SDS-Gele zeigen, dass weiterhin der überwiegende Teil als unlösliches Protein hergestellt wird.

Die Untersuchung des Einflusses der Codonverwendung auf die RE-ADH Expression wurde weiter untersucht bezüglich eines Zusammenhangs mit der Geschwindigkeit der Translation. Durch die Stärke des verwendeten Promotors kann man die Translation beeinflussen. Der Tabelle 30 kann man entnehmen, dass der BakteriophageT7-Promotor ca. vier Mal stärker als der tac-Promotor ist [93]. Die Optimierung der Codonverwendung im *re-adh* Gen wurde daher im pKK223-3 fortgesetzt, um herauszufinden, ob das Fehlen von Überexpression mit diesem System auf eine ungünstige Codonverwendung zurückzuführen ist. Dazu wurden die selten Codons AGA (Arginin 8) gegen CGT und CCC (Prolin13, 19 und 21) gegen CCG ausgetauscht; die optimierten Nukleotidsequenzen wurden in pKK223-3 kloniert. Die Codons der drei Prolinreste wurden ausgewählt, da sie ziemlich nah nebeneinander liegen und damit eine Cluster-ähnliche Struktur bilden; die Translation könnte daher in diesem Bereich anders ablaufen als im gesamten Gen. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass die Expression des optimierten *re-adh* Gens mit dem tac-Promotor basierten Vektor zu niedrigeren Enzymproduktionen führt als bei Verwendung des Wildtypgens. Die Aktivitäten lagen bei 4,2 U/mg für die optimierten Prolin-Codons bzw. 2,4 U/mg bei Austausch der Prolin-und Arginin-Codons gegenüber 6 U/mg für das Wildtypgen. Die schlechte Regulierbarkeit des tac-Promotor abhängigen Expressionssystems konnte hierdurch bestätigt werden. Bei einer guten

Translation wie im Falle des *re-adh* Gens nach dem Austausch der seltenen Codons am 5'-Ende wird die basale Translationsrate größer, so dass die gesamte Expressionsleistung dadurch beeinträchtigt wird. Da im T7-System die Translation besser reprimiert ist, hat der Austausch des Arginin 8 Codons AGA zur Verbesserung der RE-ADH Expression geführt.

Auffallend ist die Abweichung der durch SDS-Gelelektrophorese ermittelten Molmasse von 39 kDa mit der aus der Aminosäuresequenz berechneten von 36,2 kDa. Im Zusammenhang mit der Diskussion um mögliche Auswirkungen seltener Codons könnte man sich vorstellen, dass es sich hier um eine veränderte Primärsequenz handeln könnte, die durch Fehler während der Translation bedingt sind. Dieses Phänomen tritt häufig bei der heterologen Expression von Genen in *E. coli* auf, wenn die Codonverwendung des zu exprimierenden Gens stark von der der Wirtszelle abweicht. Für die Protease Domäne p27 des Herpes Simplex Virus (HSV-2) wurde Mistranslation am Arginin-Codon CGG (relativ selten, 0,54 %) beschrieben, die zur Verschiebung des Leserasters führte und den Einbau von Glutamin (CAG) anstelle von CGG (Arginin) bewirkte. Zusätzlich wurden weitere Aminosäuren im Protein gefunden [95]. In der RE-ADH könnten beispielsweise die sieben Prolin-Codons CCC (drei davon liegen nah beieinander) und das Arginin-Codon AGA die Ursache für eine fehlerhafte Translation sein. Im Fall der RE-ADH ist die beobachtete Abweichung zwischen der berechneten Molmasse und der ermittelten Größe im SDS-Gel mit ziemlicher Sicherheit als Artefakt des SDS-Gels anzusehen, da die Abweichung von der zu erwartenden Molmasse in der Gelelektrophorese auch bereits mit dem Wildtyp-Enzym gefunden wurde.

Weitere Beobachtungen sprechen dafür, dass die Codonverwendung nicht die einzige und möglicherweise auch nicht die entscheidende Ursache für die schlechte Exprimierbarkeit der RE-ADH ist. Die hoch ähnliche RR-ADH aus *R. ruber* 219 zeigte vergleichbare Expressionsleistungen im pKA1 Vektor, die Menge an gebildetem Protein sowohl in der löslichen als auch der unlöslichen Fraktion war in der gleichen Relation wie bei der RE-ADH. Die Anzahl der seltenen Codons im *rr-adh* Gen beträgt nur drei (drei Prolin-Codon CCC) und diese befinden innerhalb der ersten 216 Nukleotide (siehe Abb. 42). Diese Codons in den *re-adh* und *rr-adh* Genen könnten die Expression negativ beeinflussen, sind jedoch nicht die einzige Ursache für die Verschlechterung der Proteinproduktion.

Bei der RR-ADH aus *R. ruber* wurde eine bessere Übereinstimmung zwischen den beiden Werten für die Molmasse gefunden, man erhielt 35,5 kDa aus der Aminosäuresequenz und 36 kDa auf dem SDS-Gel. Die für die RE-ADH beobachtete Abweichung, die wahrscheinlich als

Artefakt im SDS-Gel anzusehen ist (39 kDa auf dem SDS-Gel und 36,2 kDa aus der Sequenz), war hier nicht zu finden.

ATG	AAA	GCC	CTC	CAG	TAC	ACC	GAG	ATC	GGC	TCC	GAG	CCG	GTC	GTC	GTC	GAC	GTC	54
M	K	A	L	Q	Y	T	E	I	G	S	E	P	V	V	V	D	V	18
CCC	ACC	CCG	GCG	CCC	GGG	CCG	GGT	GAG	ATC	CTG	CTG	AAG	GTC	ACC	GCG	GCC	GGC	108
P	T	P	A	P	G	P	G	E	I	L	L	K	V	T	A	A	G	36
TTG	TGC	CAC	TCG	GAC	ATC	TTC	GTG	ATG	GAC	ATG	CCG	GCA	GAG	CAG	TAC	ATC	TAC	162
L	C	H	S	D	I	F	V	M	D	M	P	A	E	Q	Y	I	Y	54
GGT	CTT	CCC	CTC	ACC	CTC	GGC	CAC	GAG	GGC	GTC	GGC	ACC	GTC	GCC	GAA	CTC	GGC	216
G	L	P	L	T	L	G	H	E	G	V	G	T	V	A	E	L	G	72

Abb. 42 Übersetzung der ersten 216 Nukleotiden des *rr-adh* Gens. Gezeigt sind die seltenen Prolin-Codons CCC in den Positionen 19, 23 und 57.

1. RE-ADH und der Einfluss von Zinkionen

Zinkionen kommen in vielen Proteinen vor (z.B. Enzyme, Hormone) und unterstützen sie bei der Strukturbildung und in der Ausführung ihrer biologischen Funktion. Zink wird ganz allgemein für das Zellwachstum und für Transportvorgänge benötigt, für viele Proteine kennt man aber auch die spezielle Rolle von Zink in der Ausbildung charakteristischer Strukturen. In Abbildung 43 sind drei Zinkmotive, Zinkfinger, Zinktwist und Zinkcluster dargestellt.

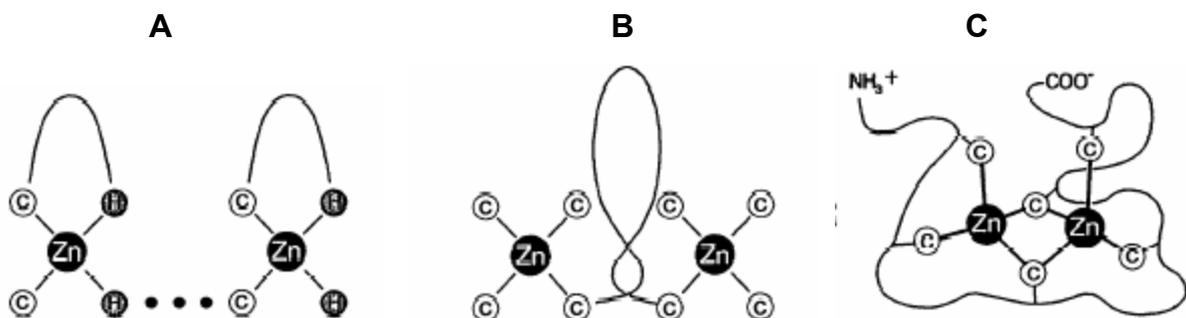


Abb.43 Charakteristische Motive von Zink-Bindungsstellen in zinkhaltigen Proteinen. (A) Zinkfinger, (B) Zinktwist und (C) Zinkcluster [96].

Drei typische Funktionen von Zinkionen sind bekannt: eine strukturelle, eine katalytische und eine cokatalytische. Die Aminosäuren Histidin, Glutamat, Aspartat und Cystein stellen im Allgemeinen die Bindungsliganden dar [83]. Das katalytische Zinkion wird durch die Stick-

stoff-, Sauerstoff- und Schwefelatome der vier Aminosäuren koordinativ gebunden, wobei der Stickstoff des Histidinrestes am häufigsten vorkommt. In einigen Fällen wird das Schwefelatom vom Cystein durch das Sauerstoffatom des Wassers ersetzt, so dass das Metallion in der tetraedrigen Koordination erhalten bleibt. Als Liganden für das strukturelle Zinkion dienen vier Cysteinreste. In der RE-ADH konnten die Liganden sowohl für das katalytische als auch das strukturelle Zink identifiziert werden [59]. Cokatalytische Bindungen sind allein oder in Multi-Metall-Enzymen wie z. B. der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* anzutreffen. In solchen Proteinen werden zwei benachbarte Metallatome (ein Zink und ein Magnesium) über einen einzigen Aminosäurerest, meist ein Aspartat, koordiniert. Ein Wassermolekül kann zusätzlich an der Bindung beteiligt werden.

Aufgrund der wichtigen Rolle des Zinkions in vielen Prozessen in der Zelle [83] und sein Vorkommen in zahlreichen Enzymen [97] kann die heterologe Expression eines Zink-abhängigen Proteins bzw. Enzyms den Bedarf an diesem Ion erheblich erhöhen. Andere für die Zellen erforderliche enzymatische Reaktion könnten möglicherweise durch die Expression eines Zink-bindenden Proteins beeinträchtigt werden. In der Literatur ist ein Beispiel für die Optimierung der heterologen Expression eines Zink-abhängigen Enzyms, der humanen Glyoxalase I, die 1 mol Zink pro Mol Enzym enthält, beschrieben. Dieses Beispiel zeigt, dass ein übliches Anzuchtmedium für *E. coli* nicht ausreichend Zink enthält und durch Supplementierung eine beträchtliche Steigerung der Enzymausbeute erreicht werden kann [98].

Dieser Effekt von Zink wurde auch bei der Optimierung der heterologen Expression von Alkoholdehydrogenasen aus *Bacillus stearothermophilus* [11] und *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 [14] beobachtet. Die Expressionsausbeute wurde durch Zugabe von Zinkionen zum Kulturmedium gesteigert.

Die RE-ADH enthält 8 Mol Zink pro Mol Enzym, es ist also zu erwarten, dass eine gute Überexpression des Enzyms relativ große Mengen an Zink bindet bzw. dass eine Supplementierung erforderlich ist. Tatsächlich führte ein externer Zinkzusatz in den Konzentrationen bis 1 mM im Wachstumsmedium zu einer Erhöhung der Enzymaktivität von 50 auf 80 U/mg. Offensichtlich enthält das "normale" Medium nicht die erforderliche Menge an Zink. Interessant ist, dass unter Zink-Mangelbedingungen Enzym mit niedrigerer spezifischer Aktivität gebildet wird. Bei paralleler Anzucht der rekombinanten Zellen BL21 (DE3)/pRE-

ADH4 ohne und mit 1 mM Zink konnte gezeigt werden, dass das hochgereinigte Enzym aus der Anzucht ohne Zinkzusatz eine nur halb so hohe spezifische Aktivität aufweist. Anscheinend fehlt einem großen Teil der exprimierten ADH das Metallion. Da sich beide vermuteten Enzymspezies bei der Reinigung völlig gleich verhalten, ist zu erwarten, dass einem Teil des gereinigten Enzyms das katalytische Zink fehlt. Würde das strukturelle Zink fehlen, könnte sich nicht die richtige Struktur ausbilden und es ist zu erwarten, dass solche Proteine dann einen Teil der Inclusion Bodies ausmachen.

Die Bestimmung des Zinkgehaltes in den homogenen ADH-Proteinen zeigte einen Zusammenhang zwischen Zink-Konzentration und Enzymaktivität. Bei Zugabe des Metallions zum Kulturmedium findet man eine erhöhte (doppelte) Menge an Zinkion in der Proteinlösung. Dies ist ein Beweis dafür, dass das LB-Medium nicht die erforderliche Menge an Zinkion für das rekombinante RE-ADH zur Verfügung stellt.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die schlechte Exprimierbarkeit der RE-ADH mehrere Ursachen hat:

- die Anwesenheit seltener Codons, insbesondere im N-terminalen Bereich, insbesondere das Arginin-Codon AGA an Position 8 und die Prolin-Codons CCC, die eine Cluster-ähnliche Struktur in der Nähe des 5'-Endes des *re-adh* Gens bilden.
- Neben diesen speziellen seltenen Codons ist aber auch das komplette Gen für *E. coli* nicht leicht zu exprimieren. Die G+C-Gehalte des *re-adh*-Gens (62 %) und des *E. coli*-Genoms (51 %) differieren beträchtlich. Das bedeutet für die Expression, dass Transkription und Translation besser ablaufen werden bei Reduzierung der Genkopienzahl, was durch die Verwendung eines "medium-copy-number"-Plasmids erreicht wurde.
- die Verfügbarkeit von Zinkionen, die bei einer Überexpression der RE-ADH dem Protein offensichtlich fehlen.

2. Funktion des C-Terminus der RE-ADH

Homologie-Untersuchungen zeigten eine Ähnlichkeit von 84 % der RE-ADH zu der Phenylacetaldehyd-Reduktase (PAR) aus *Corynebacterium* sp. [59, 99]. Da der Unterschied zwischen den beiden Proteinen nur im C-Terminus (ab Aminosäuren 317) liegt, war von Interesse herauszufinden, ob dieser für die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften verantwortlich ist. Die beiden Enzyme unterscheiden sich bezüglich ihrer Aktivität, Stabilität und dem Substratspektrum. Tab.32 stellt die wesentlichen Unterschiede beider Enzyme dar.

Tab. 32 Vergleich von Aktivität und Stabilität der ADH aus *R. erythropolis* und der Phenylacetaldehyd-Reduktase aus *Corynebacterium* sp. Die Aktivitäten für die Standardsubstrate p-Cl-Acetophenon und Phenylacetaldehyd sind gegenübergestellt.

Enzyme	RE-ADH	PAR
Aktivität (U/mg)	80 ¹⁾ 14,3 ²⁾	0,15 ¹⁾ 0,9 ²⁾
Hitzestabilität (60 °C, 30 min); Restaktivität (%)	114	0

¹⁾ p-Cl-Acetophenon

²⁾ Phenylacetaldehyd

In der Literatur gibt es für den Einfluss des C-Terminus auf Enzymeigenschaften nur ein analoges Beispiel: Bei der short chain Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila* wurde der C-Terminus als Substrat-Bindungsdomäne identifiziert. Dazu wurden Proteinvarianten mit verkürzten Aminosäurenketten hergestellt [100] und der Einfluss dieser Veränderungen auf die Enzymaktivität geprüft. Alle erzeugten Enzymvarianten zeigten ein gleiches Substratspektrum wie die natürliche ADH, aber es wurde eine Reduzierung der Aktivität festgestellt. Der C-Terminus der ADH wurde als Bestandteil der Substratbindungstasche identifiziert. Die Aminosäuren in diesem Teil des Proteins sind essentiell für die Hydrophobizität der Tasche.

2.1 Einfluß der Länge der Proteinkette

Zur Untersuchung der Funktion des C-Terminus der RE-ADH mit Hilfe der Homologie zur PAR wurden zuerst verkürzte PAR-Varianten (PAR353 und PAR348) erzeugt. Die PAR348 ist genauso lang wie die RE-ADH (mit 348 Aminosäuren) und es wurde erwartet, dass die beiden Proteine ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen. Während die RE-ADH höhere Aktivität (bis zu 80 U/mg) und Stabilität (Aktivierung bei 65 °C und stabil über mehrere Monate bei 4 °C) zeigte, konnte für die PAR348 nur eine Aktivität unter 1 U/mg gemessen werden. Diese Aktivität blieb nur über einen Zeitraum von einigen Stunden (bis zu 48 h) nachweisbar. Das Temperatur-Stabilitätsprofil zeigte zudem, dass das PAR348-Enzym schon bei 50 °C inaktiviert wurde.

Zusätzlich wurden unterschiedliche Ergebnisse des PAR-Enzyms bzw. der PAR-Varianten und der RE-ADH während der Expression festgestellt. Die RE-ADH lässt sich relativ gut exprimieren, insbesondere im pKA1-Vektor, trotz der Bildung von Inclusion Bodies. Die PAR und PAR-Varianten dagegen wurden zum größten Teil nur als unlösliche Proteine exprimiert. Dieser Unterschied in der Exprimierbarkeit ist offensichtlich auf die unterschiedlichen C-Termini zurückzuführen.

Der Vergleich von RE-ADH und dem gleichgrossen PAR348-Enzym zeigt zudem, dass die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften beider Enzyme nicht auf die Länge der Proteinkette zurückzuführen sind, sondern eher in den unterschiedlichen Sequenzen begründet sind. Daher wurde die Aminosäurezusammensetzung der beiden C-Termini vergleichend untersucht.

2.2 Einfluss der Aminosäuresequenz des C-Terminus

Zum Einführen von Mutationen am C-Terminus sind PAR und die PAR-Varianten nicht gut geeignet aufgrund ihrer schlechten Exprimierbarkeit. Für diese Zwecke wurde die ADH aus *R. ruber* (RR-ADH) verwendet, da sie sich deutlich leichter exprimieren lässt. Biochemisch zeigt die RR-ADH ähnliche Eigenschaften wie die RE-ADH, sie besitzt ein ähnliches Substratspektrum und zeigt ähnliche Stabilitäten wie die RE-ADH. Die Proteinketten der beiden Enzyme sind ungefähr gleich (346 und 348 Aminosäuren). Demnach sollten

Mutationen am C-Terminus der RR-ADH Informationen über die Funktion des C-Terminus der ADHs liefern (RE-ADH, RR-ADH und PAR).

Wie vorab bereits beschrieben unterscheiden sich die RE-ADH und PAR auf Grund eines Frameshifts auf Proteinebene nur durch ihre C-Termini. Die beiden auffallenden Unterschiede beider Enzyme betreffen eine deutlich höhere Aktivität und bessere Stabilität der RE-ADH. Obwohl diese Sequenzunterschiede im C-terminalen Bereich nur eine kurze Proteinkette betreffen (69 Aminosäuren lang), ist es nicht möglich, durch systematisches Austauschen die für diese Unterschiede relevanten Aminosäuren zu identifizieren. Ein summarischer Vergleich der Aminosäuren der beiden C-Termini zeigt allerdings bereits deutliche Unterschiede im Verhältnis von sauren und basischen Aminosäure, ebenfalls für die RR-ADH.

In dieser Arbeit ist der Einfluss der Aminosäure in Position 338 der RR-ADH näher untersucht worden. Durch ein Alignments (siehe Ergebnis 2.2) der Aminosäuren am C-Terminus von RE-ADH, RR-ADH und einer weiteren, ähnlichen ADH-Sequenz aus der Datenbank (ADH aus *Sulfolobus solfataricus*) wurde Arg338 als eine geladene Aminosäure identifiziert, die einerseits nicht essentiell ist (keine NAD-Bindungsstelle), andererseits für Aktivitätsunterschiede dieser drei Enzyme verantwortlich sein sollte. Arginin340 konnte auf Grund des Alignments dagegen als hoch konserviert identifiziert werden, diese Aminosäure ist für die Bindung des Coenzym erforderlich und kommt daher für Mutagenesestudien nicht in Frage. Für vergleichende Untersuchungen wurden die Mutanten RR-ADH (R338S) und RR-ADH (R338E) erzeugt, so dass der Einfluss einer basischen, einer neutralen und einer sauren Aminosäure in dieser Position systematisch untersucht werden konnte. Aus der Analogie zur SsADH, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist, ergibt sich, dass die Aminosäuren Histidin 39 und Arginin 340 die positiv geladene Tasche für die Bindung des Pyrophosphat-Teils des NADH bilden (H39 und R342 in der SsADH aus *Sulfolobus solfataricus*) [9]. Die benachbarten positiv geladenen Aminosäuren können ebenfalls über ihre Ladung zur Verstärkung der Bindung des Pyrophosphat-Teils des Coenzym NADH beitragen, das Alignment zeigt aber, dass diese Aminosäuren weniger essentiell sind. Auffallend ist, dass sich in der RE-ADH (hohe Aktivität und Stabilität) keine weitere basische Aminosäure in der Nachbarschaft des für die Katalyse wichtigen R341 befindet (homolog zu R342 in Ss-ADH). Um die Nettoladung dieser Tasche zu beeinflussen bzw. zu reduzieren, wurde Arginin 338 in der RR-ADH mutiert, um eine Veränderung der Nettoladung am C-Terminus zu erreichen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Austausch von R338 gegen die

neutrale Aminosäure Serin der K_M -Wert für NADH signifikant größer wird, d.h. die Bindung zu NADH gelockert wird. Das geht einher mit einer höheren Enzymaktivität, was man sich damit erklären kann, dass das Coenzym das aktive Zentrum schneller verlässt. Dieser Effekt wurde durch die zweite Mutation, R338E, durch die eine negative Ladung in dieser Position eingeführt wird, verstärkt. Der ermittelte K_M -Wert für NADH war vierfach größer als bei dem Wildtypenzym und es wurde eine zusätzliche Steigerung der Aktivität (Verdopplung der Aktivität) beobachtet.

In der Literatur ist ein Enzym beschrieben, bei dem analoge Effekte beobachtet wurden: In der Salicylat-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* S-1 wurde ebenfalls ein positiv geladenes Lysin163 identifiziert, welches in diesem Fall allerdings sogar nachweislich an der Bindung von NADH beteiligt ist. Der Austausch dieses Lysinrestes gegen ein Arginin, Glycin und Glutamat führte zu höheren K_M -Werten, in diesem Fall allerdings verbunden mit Aktivitätsverlusten [101].

Ebenfalls in der RR-ADH konnte für Arg340 und das benachbart liegende Arg338 eine Rolle in der Bildung der positiv geladenen Tasche, die die Bindung von NADH über ionische Wechselwirkung ermöglicht, zugeschrieben werden. Ein Vergleich der Substratspektren von Wildtyp-Enzym und den beiden Muteinen R338S und R338E zeigt, dass es keine signifikanten Veränderungen in den Substratspektren gibt, so dass man daraus schliessen kann, dass dieser Teil des Proteins die Substratspezifität kaum beeinflusst. Aus diesen Versuchen mit der RR-ADH kann man folgern, dass in der RE-ADH dem Arg341 eine Funktion in der NADH-Bindung zugeschrieben werden kann. Das spricht dafür, dass der C-Terminus (ab Aminosäure 317) eher Bestandteil der Bindungstasche des NADH als der Ketone bzw. Alkohole ist. Das kann man auch aus Homologiebetrachtungen zur SsADH ableiten.

Im Gegensatz zu den short-chain-ADHs, bei denen der C-Terminus für die Bildung der hydrophoben Substrat-bindenden Tasche notwendig ist [100], ist der C-Terminus der hier untersuchten medium-chain-ADH eher an der NADH-Bindung beteiligt. Allerdings muss auch das Keton-Substrat in der Nähe gebunden werden, da eine räumlich eng gekoppelte Übertragung des Hydrid-Ions vom Coenzym stattfindet. Die Abbildung 45 stellt die Modellierung des C-Terminus der RE-ADH dar. Als Templat wurde die Struktur der SsADH (ADH aus *Sulfolobus solfataricus*) eingesetzt. Die nachfolgende Abbildung zeigt die dreidimensionale Struktur dieses Proteins.

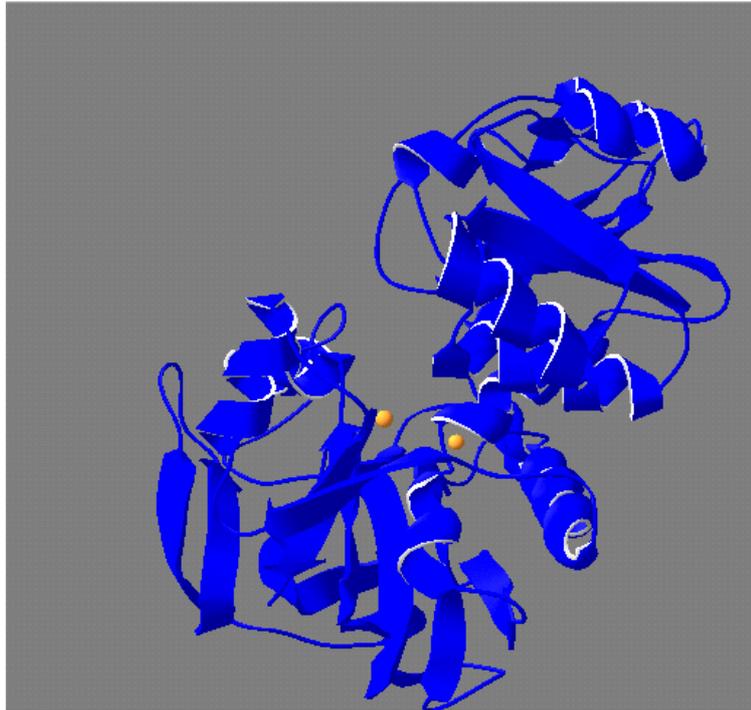


Abb. 44 Dreidimensionale Struktur der SsADH. Die Zinkionen [katalytisches (links) und strukturelles] sind gelb dargestellt.

Dieses Enzym ist trotz der relativ geringen Sequenz-Ähnlichkeit für Modellierungsversuche der RE-ADH gut geeignet. Die Vorhersage zur dreidimensionalen Struktur eines Proteins kann gemacht werden, wenn eine Homologie von mindestens 30 % zu einem anderen Protein bekannter Struktur besteht [102]. Demnach besitzen vermutlich die SsADH und die RE-ADH (31 % Homologie) ähnliche dreidimensionale Strukturen und eine Modellierung der Struktur der RE-ADH kann mit der SsADH als Templat durchgeführt werden. Diese Modellierung kann zwar nicht mit der gesamten RE-ADH erfolgen, die Bedeutung des C-terminale Bereichs kann allerdings gut bezüglich seiner Funktion als Teil des aktiven Zentrums veranschaulicht werden.

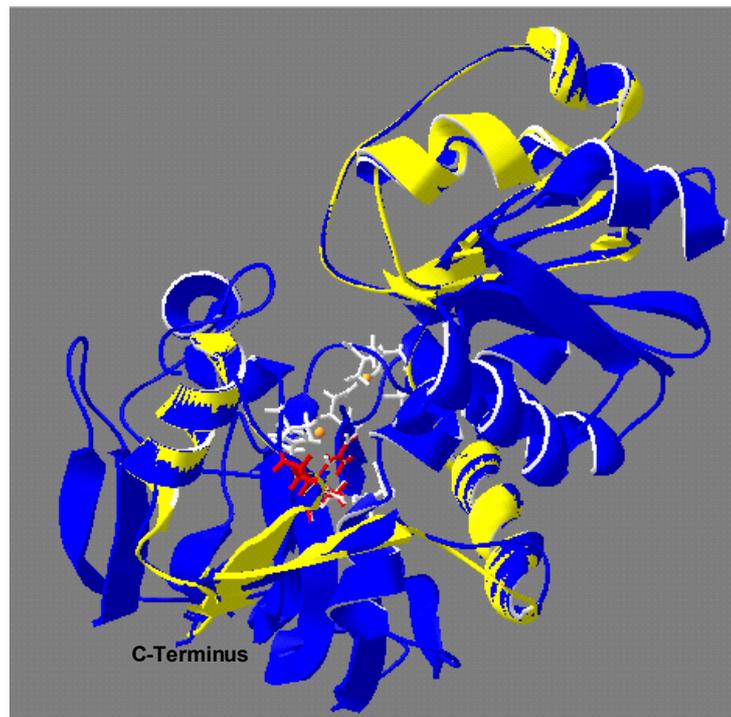


Abb. 45 Dreidimensionale Modellierung des Sequenzbereichs A240-L348 der RE-ADH mit der SsADH aus *Sulfolobus solfataricus*. Dargestellt sind die α -Helices und die β -Faltblätter, das Templatmolekül (blau), die RE-ADH (gelb). Die beiden C-Termini überlappen vollständig. Das aktive Zentrum wird durch die Aminosäuren (rot für die RE-ADH und weiß für die SsADH), die die Liganden für das katalytische bzw. das strukturellen Zinkion darstellen, gezeigt. [erstellt mit Swiss-Model und Pdb-Viewer]

Die Abbildung 45 zeigt, dass der C-Terminus der RE-ADH zum aktiven Zentrum gehört. In der vergrößerten Darstellung kann man deutlich die Lage der Aminosäuren R341 (RE-ADH) und R342 (SsADH) sehen. Das Serin 339 (RE-ADH), das dem ausgetauschten Arginin R338 (RR-ADH) entspricht, ist ebenfalls gezeigt. Die Modellierung macht deutlich, dass diese Argininreste Bestandteil des aktiven Zentrums sind.

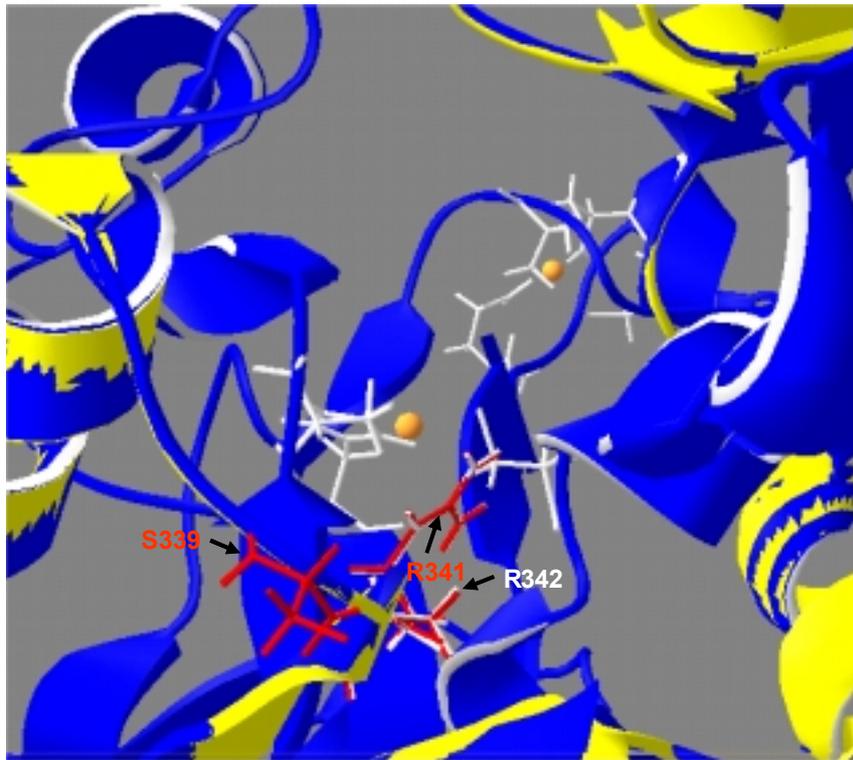


Abb. 46 Vergrößerte Darstellung des aktiven Zentrums der RE-ADH. Die Argininreste R342 (SsADH) und R341 (für die RE-ADH), die für die Katalyse wichtig sind, gezeigt. Das Serin S339, welche dem Arginin R338 in RR-ADH entspricht (wurde bei der Herstellung der Mutanten R338S und R338E ausgetauscht) liegt ebenfalls in der Nähe des aktiven Zentrums.

Die vereinfachte Darstellung in Abb.47 zeigt deutlich die Lage der Aminosäuren im aktiven Zentrum.

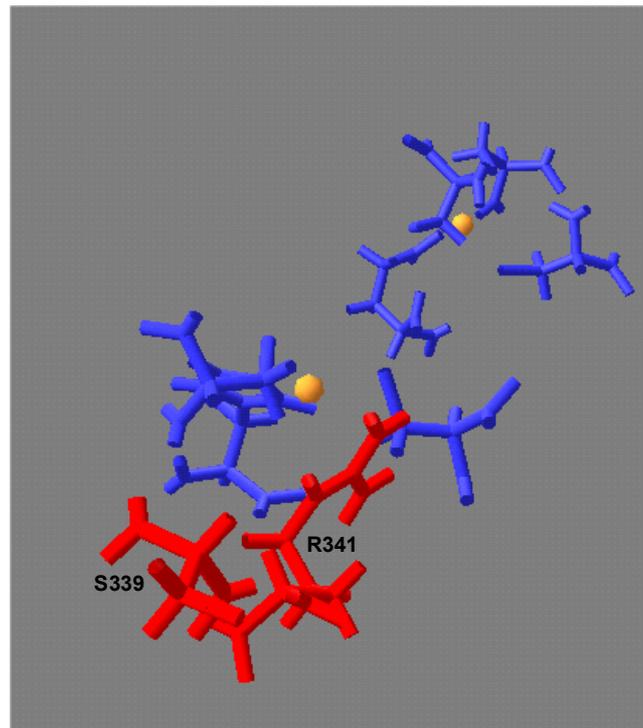


Abb. 47 Vereinfachte Darstellung der Aminosäuren im aktiven Zentrum der modellierten RE-ADH. Gezeigt sind das an der Katalyse beteiligte Arginin341 und das Serin339 (rot), welches dem ausgetauschten Arginin338 im RR-ADH (*R. ruber* ADH) entspricht. Die Liganden für die Zinkionen (gelb) sind in blau dargestellt

Zusammenfassung der Modellierung

Über die Herstellung der RR-ADH Mutanten mit erhöhten Aktivitäten kann man folgern, dass für die PAR die Anwesenheit von mehr basischen Aminosäuren am C-Terminus der PAR (Verhältnis basische zu saure Aminosäuren von 12 zu 3 (Tabelle 23) die Ursache dafür ist, dass sie eine deutlich niedrigere enzymatische Aktivität als RE-ADH und RR-ADH zeigt. Die erzielte Verbesserung an Aktivität der RR-ADH durch die Herstellung der Mutanten (R338S und R338E) stellt einen Beweis für die Rolle der Aminosäurezusammensetzung in diesem Teil des Proteins dar.

4. Vielfältigkeit und Verwandtschaft der Alkoholdehydrogenasen

Die Alkoholdehydrogenasen, die in ihrer nativen Form als Dimer oder Tetramer vorkommen, werden nach der Länge ihrer Proteinkette in drei Familien eingeteilt:

- kurzkettige Alkoholdehydrogenasen (short chain ADH) mit 250 Aminosäuren pro Unter-einheit. Sie enthalten keine Metallionen. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist die Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila*, deren dreidimensionale Struktur von Smilda [103] bestimmt wurde. Der N-terminale Bereich der Proteine wurde als Bindungsdomäne für das Coenzym NAD(P) bestimmt, während der C-Terminus das Substrat bindet. Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen einiger Enzyme dieser Familie zeigen hohe Ähnlichkeiten am N-Terminus, die C-Termini unterscheiden sich deutlich voneinander. Insgesamt betragen die Sequenzähnlichkeiten nur 15-30 %. Dieser Befund wird durch die unterschiedlichen Substratspektren der bekannten Enzyme bestätigt, die ihre Präferenz entweder bei Steroiden, primären, sekundären oder zyklischen Alkohole aufweisen [104].

- die mittelkettigen (medium chain ADH) sind bis zu 350 Aminosäuren lang; die Pferdeleber-ADH ist das am besten charakterisierte Enzym dieser Gruppe. Die medium chain Alkoholdehydrogenasen sind Zink-enhaltende Proteine und enthalten im Allgemeinen zwei Zinkionen. Ein Metallatom spielt eine katalytische Rolle, während das zweite für die Stabilisierung der Proteinstruktur zuständig ist. In den Alkoholdehydrogenasen, die nur ein Zink enthalten, findet man nur das katalytische Zinkion, wie in der thermophilen ADH aus *Thermoanaerobium brockii* oder dem Enzym aus *Clostridium beijerinckii* [15]. Im Gegensatz zu den short chain ADHs ist der N-Terminus als Substratbindungs-Domäne identifiziert worden, da dieser Bereich des Proteins das für die Polarisierung des Substrats notwendige Zinkionen enthält [105]. Die Polarisierung des Substrats stellt den entscheidenden Schritt zum Hydridtransfer, die eigentliche Katalyse, dar [106].

Die medium chain ADH werden auch als "MDR (Medium-chain Dehydrogenase/Reduktase) bezeichnet". Diese Gruppe umfasst Proteine unterschiedlicher enzymatischer Aktivität. In einer verbesserten Klassifikation basierend auf phylogenetischen, Sequenz- und Funktions-Ähnlichkeiten wurden die MDR (Medium chain Dehydrogenase/Reduktase) als Superfamilie definiert [107], sie besteht aus den Enzym-Familien:

- PDH, Polyol Dehydrogenasen
- ADH, klassische Alkoholdehydrogenasen
- CADH/Y-ADH, Cinnamyl- und Hefe-Alkoholdehydrogenasen
- QOR, Quinone-Oxidoreduktase.

Evolution der *Rhodococcus/Corynebacterium*-ADHs

Die Proteine der ADH-Familie zeichnen sich durch ihre geringere Sequenzähnlichkeit (meist unter 30%) mit vergleichbaren dreidimensionalen Strukturen aus. Trotzdem besitzen sie gleiche Reaktionsmechanismen und vergleichbare konservierte Bereiche für die Bindung von Zink und das Coenzym. Da mittlerweile sehr viele ADHs dieser Gruppe bekannt sind, konnten auch in Einzelfällen Verwandtschaften nachgewiesen werden; es wurde gezeigt, dass die verschiedenen Subfamilien der ADHs durch eine Reihe genetischer Ereignisse (Gene-Duplikationen, Deletionen und Insertionen) von einander ableitbar sind [108].

Auch die RE-ADH und die PAR (*Corynebacterium* sp.) zählen zu der ADH-Familie der medium chain ADHs. Die hohe Homologie beider Gene zeigt bereits, dass beide eng verwandt sein müssen. Offensichtlich hat sich das *readh*-Gen aus dem *par*-Gen durch Deletion entwickelt.

Die RE-ADH kann als eine verbesserte Variante der PAR (mit höheren Aktivität und Stabilität) betrachtet werden. Auch wenn die biologische Funktion der ADHs aus *Rhodococcus* oder *Corynebacterium* nicht bekannt ist, kann man doch annehmen, dass sie, wie das für viele bakterielle Alkoholdehydrogenasen beschrieben wurde [109], eine Rolle in der Oxidation (Entgiftung) von Alkoholen und Aldehyden spielen. Eine höhere Thermostabilität geht dabei immer einher mit einer höheren Toleranz gegenüber Lösungsmitteln und Alkoholen, so dass damit eine verbesserte Abbauleistung gegeben ist. Durch natürliche evolutive Veränderung, die über zwei Deletionen verlief, ist die kürzere und stabilere RE-ADH (348 aa) entstanden.

In der Literatur, wurde die Evolution der 11 β - und 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen-Typ 2 aus *Caenorhabditis elegans* untersucht [110]. Die beiden Enzyme katalysieren die Oxidation von Alkoholen am C-17 bzw. C-11 von Wachstumshormonen (Androgen, Estrogen und Glucocorticoid) und zeigen eine Retinoid-Dehydrogenase Aktivität. Die

Sequenzähnlichkeit der beiden Proteine zu den all-trans und 11-cis-Retinol-Dehydrogenasen beträgt 33 %. Trotz dieser relativ geringen Homologie konnte mittels phylogenetischer Berechnungen (Erstellung eines phylogenetischen Baums) nachgewiesen werden, dass die *Caenorhabditis elegans* Proteine durch Evolution der Retinol Dehydrogenase entstanden sind.

Die RE-ADH und die PAR, die sich nur in ihrer Stabilität und Aktivität unterscheiden, aber sehr hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, sind in der Evolution sehr nahe verwandt. Diese vermutete Verwandtschaft der Proteine wird durch die taxonomische Verwandtschaft der Mikroorganismen *R. erythropolis* und *Corynebacterium* unterstützt.

5- Thermostabilität der untersuchten Alkoholdehydrogenasen

Die RE-ADH sowie die RR-ADH zeigen eine hohe Thermostabilität, die Aktivität kann sogar noch durch eine Hitzebehandlung (Inkubation bei 60 °C) signifikant und reproduzierbar auf 114 % bzw. 105 % gesteigert werden. Die RE-ADH zeigt nach einer Inkubation für 1 h bei 60 °C keine Inaktivierung. Diese Eigenschaft wurde für viele Alkoholdehydrogenasen beschrieben, die meisten davon wurden aus thermophilen Bakterien wie *Thermoanaerobacter ethanolicus* und *Thermococcus hydrothermalis* [12, 71] oder aus hyperthermophilen Archaeobakterien wie *Sulfolobus solfataricus* und *Aeropyrum pernix* [8, 72] isoliert. Die ADH aus diesen Bakterien zeigen ihre optimale Aktivität bei sehr hohen Temperaturen von 70-90 °C, diese entspricht in diesen Fällen auch den Temperaturen, bei denen die Mikroorganismen optimal wachsen. Bei den Rhodococcus-Enzymen trifft dies unerwarteterweise nicht zu, *R. erythropolis* beispielsweise hat ein Wachstumsoptimum bei ca. 37 °C, bei 40°C wächst der Stamm nicht mehr.

Untersuchungen an vielen hitzestabilen Proteinen heben die Rolle von Prolinresten und anderen hydrophoben Aminosäuren für ihre Stabilisierung hervor. Die Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* [Halbwertszeit von 60 min bei 93 °C] enthält insgesamt mehr hydrophobe Aminosäuren und Prolinreste als das sehr hoch homologe Enzym (86 % Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz) aus *Clostridium beijerinckii* (Halbwertszeit von 60 min bei 67 °C), dies spiegelt die Thermostabilität der beiden Proteine wider [15]. Die Rolle

dieser Aminosäuren wurde bei anderen Proteinen wie der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus coagulans* ATCC 7050 bestätigt [111].

Für die RE-ADH und PAR, die trotz der hohen Ähnlichkeit (84 % in der Aminosäuresequenz) unterschiedliche Thermostabilitäten aufweisen, konnte ein entsprechender Unterschied im Prolingehalt zugunsten der RE-ADH nicht festgestellt werden (21 für RE-ADH und 26 für PAR). Jedoch weist die RE-ADH im Vergleich zur PAR einen höheren Anteil an hydrophoben Aminosäuren (57 % bzw. 53,5 %) auf. Dieser Parameter könnte zu unterschiedlichen Stabilitäten der Proteine führen, wahrscheinlich sind es aber nicht einfache summarische Werte für Prolin bzw. die hydrophoben Aminosäuren, sondern man muss die Lage dieser Aminosäuren innerhalb von Strukturelementen betrachten. Generell entsteht die Thermostabilität eines Proteines durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie die Packungsdichte, ionische bzw. hydrophobe Wechselwirkung Salz- und Wasserstoffbrücke [112].

B-Oxidative Enzyme in *Rhodococcus*-Stämmen am Beispiel der Monooxygenasen

Oxidative Stoffwechselwege und oxidative Enzyme sind nahezu charakterisierend für *Rhodococcus*-Stämme, nicht zuletzt, weil es sich um strikt aerobe Organismen handelt, die keinen gärenden Stoffwechsel kennen. Technisch fanden diese Stämme Verwendung sowohl in der chemischen als auch pharmazeutischen Industrie; z. B. werden die *Rhodococcus* Stämme I24 und B-264-1 zur Herstellung von Indandiol-Enantiomeren, Intermediate des Crixivan (ein Protease Inhibitor, der die Vermehrung des HIV-Virus inhibiert) verwendet [113]. Sie werden auch weitgehend in der Produktion von chemischen Verbindungen wie aromatischen Amiden eingesetzt [84, 114]. In der Umweltbiotechnologie werden Bakterienstämme aus der Gattung *Rhodococcus* für die Bodendekontamination verwendet [84].

In dieser Arbeit wurde ein oxidativer Stoffwechselweg, der Abbau von Tetrahydrofuran (THF) näher untersucht. Dieser Abbau wird von einer Monooxygenase-Reaktion eingeleitet, durch die eine reaktionsträge C-H-Bindung durch Oxidation in eine reaktive C-OH-Gruppe überführt wird. Die darauf folgenden Schritte sind dann biochemisch einfachere Metaboli-

sierungen des Hydroxy-THF durch eine Abfolge von NAD-abhängigen oxidativ wirkenden Dehydrogenasen. Der wesentliche Schritt besteht in der Monooxygenase-Reaktion, katalysiert durch die Tetrahydrofuran-Monooxygenase (TMO). Dieses Enzym ist, wie von anderen bakteriellen Monooxygenasen bekannt ist, komplexer aufgebaut. Es beinhaltet zwei Hauptfunktionen, eine elektronen-aktivierende Reduktase-Komponente, durch die eine aktivierte Sauerstoff-Species gebildet wird und eine oxidierende Komponente, durch die der Sauerstoff regioselektiv in das Molekül eingeführt wird. Es ist zu erwarten, dass zum einen die Gene für die Untereinheiten als Cluster vorliegen und dass es sich bei dem vollständigen TMO-Gen um einen größeren Genabschnitt handelt.

In dieser Arbeit konnte das vollständige TMO-Gen isoliert und kloniert werden und die Hauptkomponenten funktionell zugeordnet werden. Zum Nachweis der Monooxygenase-Aktivität, wurde das 6,1 kb DNA Fragment, welches für die Komponenten dieses Enzymsystems kodiert, kloniert und in *E. coli* transformiert. Da die Funktion der kleinen Proteine rP1, rP2 und rP3 nicht bekannt ist und da die Klonierung der einzelnen Gene sehr aufwendig ist (Klonierung von insgesamt fünf Genen, wobei drei davon auf einem Plasmid und zwei auf einem anderen kloniert werden sollten), war die Durchführung der Klonierung auf die Isolierung des 6,1 kb Fragments aus der chromosomalen DNA und seine Ligation in das Expressionsplasmid pKK223-3 beschränkt.

Das SDS-Gel des Rohextrakts des rekombinanten Stamms zeigte zwar keine Überexpression der Gene, aber Proteinbanden der erwarteten Größen. Das Fehlen an Überexpression der TMO Komponenten kann mehrere Ursache haben:

Durch die Klonierung des gesamten Fragments wird jedes Gen seine potentielle Ribosomen Bindungsstelle für die Translation benutzen, deren Eigenschaften sich wahrscheinlich von den *E. coli* eigenen unterscheiden. Folgende Merkmale der potentiellen RBS können für die TMO-Komponenten hervorgehoben werden:

- *Abstand der RBS vom Startcodon innerhalb des TMO Operons*

Die jeweiligen Startcodons der drei Haupt-Strukturgene, die für die α - und β -Untereinheiten der Hydroxylase-Komponente und die Reduktase kodieren, haben unterschiedliche Abstände von ihren potentiellen Ribosomen-Bindungsstellen. Insbesondere die RBS für die α -Untereinheit liegt relativ weit vom ATG entfernt, sie befindet sich 14 bp upstream vom Startcodon.

Für die β -Untereinheit und die Reduktase-Komponente liegt die RBS 10 bp bzw. 11 bp vor dem jeweiligen Startcodon ATG. Die Effizienz der Translation wird im Allgemeinen durch diesen Parameter beeinflusst, die optimale Entfernung der Ribosomen-Bindungsstelle zum Startcodon für die Translation ist bei vielen Bakterien mit 7 bis 10 bp beschrieben [115]. Da die potentielle RBS der α -Untereinheit der TMO 14 bp entfernt vom ATG Startcodon liegt, wird ihre Expression vermutlich schlechter ablaufen und dadurch die Aktivität der TMO niedrig halten. Die Expression der TMO-Proteine konnte aufgrund der schwachen Expressionsausbeute im SDS-Gel nicht nachgewiesen werden, allerdings stellt die photometrisch gemessene NADH-Oxidation von 0,15 U/mg einen Nachweis für eine TMO-Aktivität dar. Der Rohextrakt aus einem parallel angezogenen "leeren" *E. coli* JM105 als Kontrolle (ohne das Plasmid pTMO) zeigte dagegen keine NADH-Oxidation.

Zusätzlich kann die beobachtete Substrat-unabhängige NADH-Oxidation von 0,1 U/mg als Hinweis für eine Monooxygenase-Aktivität angenommen werden. Eine solche Oxidation findet als eine Art "Leerlauf-Reaktion" auch statt, wenn das zu oxidierende Substrat fehlt. Unter diesen Bedingungen fungiert Luft- O_2 als Elektronenakzeptor, üblicherweise wird dann H_2O_2 produziert. Diese Substrat-unabhängige Umsetzung des NADH wurde für viele Ein- und Multikomponenten-Monooxygenasen wie die Phenol Hydroxylase aus *Acinetobacter radioresistens* S13 bzw. die 2-Hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase aus *Pseudomonas azelaica* HBP1 [116, 117] nachgewiesen. Man nimmt an, dass im Allgemeinen unter experimentellen Bedingungen immer ein gewisser Anteil an photometrisch nachweisbarer NADH-Oxidation aus der Reaktion mit O_2 kommt [117].

Eine weitere Beobachtung, die für die Anwesenheit einer rekombinanten Monooxygenase spricht, kommt aus der Beobachtung zum Einfluss von FAD. Durch Zugabe dieses Coenzym wurde eine Aktivitätssteigerung von 0,15 auf 0,22 U/mg festgestellt. FAD ist ein üblicher Bestandteil von Monooxygenasen, in der Sequenz der TMO-Reduktase befindet sich das Motiv RXXS (siehe Abb. 36B), welches als Bindungsstelle für den Isoalloxazin-Ring des FAD beschrieben ist [89]. Die Steigerung an Aktivität durch Zugabe von FAD ist daher auf eine Erhöhung an Aktivität der Reduktase-Komponente zurückzuführen.

Lokalisation des *tmo* Genclusters

Die für den Abbau von xenobiotischen Verbindungen notwendigen Gene sind häufig auf Plasmiden kodiert [118], dies ermöglicht deren Übertragung zwischen Mikroorganismen über Gentransfer. Übertragen werden nicht nur Gene, die für Enzyme des katabolischen Stoffwechsels kodieren, sondern auch diejenigen, die in der allgemeinen DNA-Modifikation eine Rolle spielen [119], beispielsweise Gene für Transposasen, Restriktionsenzyme und Enzyme der DNA-Rekombination. Für den Abbau xenobiotischer Verbindungen sind zahlreiche Beispiele für Gentransfer beschrieben [120, 121]. Die Verbreitung von Genen, die den Mikroorganismen Resistenz gegen Antibiotika oder Schwermetalle verleihen, verläuft ebenfalls über diesen Mechanismus. Generell sind solche Gene plasmid-kodiert, teilweise als konjugative Plasmide. Sie können aber auch auf einem Transposon kodiert sein und dann als genetische Einheit übertragen werden [122]. Dieser Transferprozeß wird durch konjugative Plasmide (Konjugation) bzw. Bakteriophagen (Transduktion) vermittelt [123]. Nach Transfer von katabolischen Plasmiden sind sehr häufig noch Mutationen, genetische Rekombinationen und Transpositionen im Akzeptororganismus notwendig, um eine Anpassung in bezug auf Codonverwendung zu gewährleisten [120].

Obwohl die experimentellen Daten keinen direkten Beweis für eine mögliche Lokalisation der *tmo* Gene auf einem katabolen Plasmid liefern, deuten die Informationen aus den bisher vorliegenden Nukleotidsequenzen auf die Lokalisation der *tmo*-Gene auf einem Plasmid.

Diese Hinweise auf eine Plasmidlokalisation sind im wesentlichen:

- Der G+C-Gehalt des *tmo*-Genclusters im Vergleich zum G+C-Gehalt von *Rhodococcus ruber*,
- Sequenzinformationen ausserhalb des *tmo*-Genclusters
- Lokalisation des hoch homologen *thm*-Genclusters bei *Pseudonocardia* sp. K1

Der G+C-Gehalt des tmo-Genclusters

Der C+G-Gehalt und die Codonverwendung stellen zwei Parametern dar, die für jedes Genom charakteristisch sind; Informationen über die Herkunft bestimmter Gene können durch die

Untersuchung des G+C-Gehaltes gewonnen werden. Die Nukleotidsequenzen der Gene eines Bakteriums besitzen ähnliche Basen- und Codonzusammensetzungen und Gene anderen Ursprungs, die durch Gentransfer erworben wurden, sind leicht durch ihre Basen- bzw. Codonzusammensetzung zu erkennen, wenn diese deutlich von Wirts-typischen Genen abweichen [124, 125].

Durch den Vergleich des GC-Gehaltes der *tmo* Gene mit dem des gesamten *R. ruber* Genoms konnte eine ziemlich sichere Aussage über die Lokalisation (Plasmid-kodiert oder Chromosom-kodiert) dieses Genclusters gemacht werden. Das 8490 bp große Fragment von *R. ruber* ist groß genug, um einen sicheren Wert für den G+C-Gehalt angeben zu können. Mit 60,8 % ist dieser deutlich unterschiedlich zum G+C-Gehalt von *R. ruber* mit 67 % (Codon usage Database www.kazusa.or.jp/codon/). Dies ist ein deutlicher Hinweis für einen Gentransfer aus einem Stamm mit geringerem G+C-Gehalt. Nach Meinhardt [126] ist ein DNA-Transfer zwischen unterschiedlichen Spezies möglich, so dass die Übertragung der *tmo*-Gene von einer Spezies vorstellbar ist.

Sequenzinformationen ausserhalb des tmo-Genclusters

Auf dem isolierten 8490 bp befindet sich ein ORF der Größe 1110 bp (7284 bp bis 8394 bp), welches auf dem komplementären Strang kodiert ist. Die Übersetzung in eine Aminosäure-Sequenz und die Datenbank-Recherche mit dieser 369 Aminosäuren großen Sequenz zeigt Homologien zu Transposasen und Insertions-Elementen vieler Bakterien, vor allem Pseudomonaden. Die Homologien zu den Transposasen aus *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* sind in Abb. 48 angegeben. Aus der Gruppe der Pseudomonaden sind viele katabolische Plasmide beschrieben, die Gene für Enzyme des Abbaus von Alkanen und Xenobiotica besitzen und deren Zusammenhang zu Transposasen bzw. Insertion-Elementen beschrieben wurde [127].

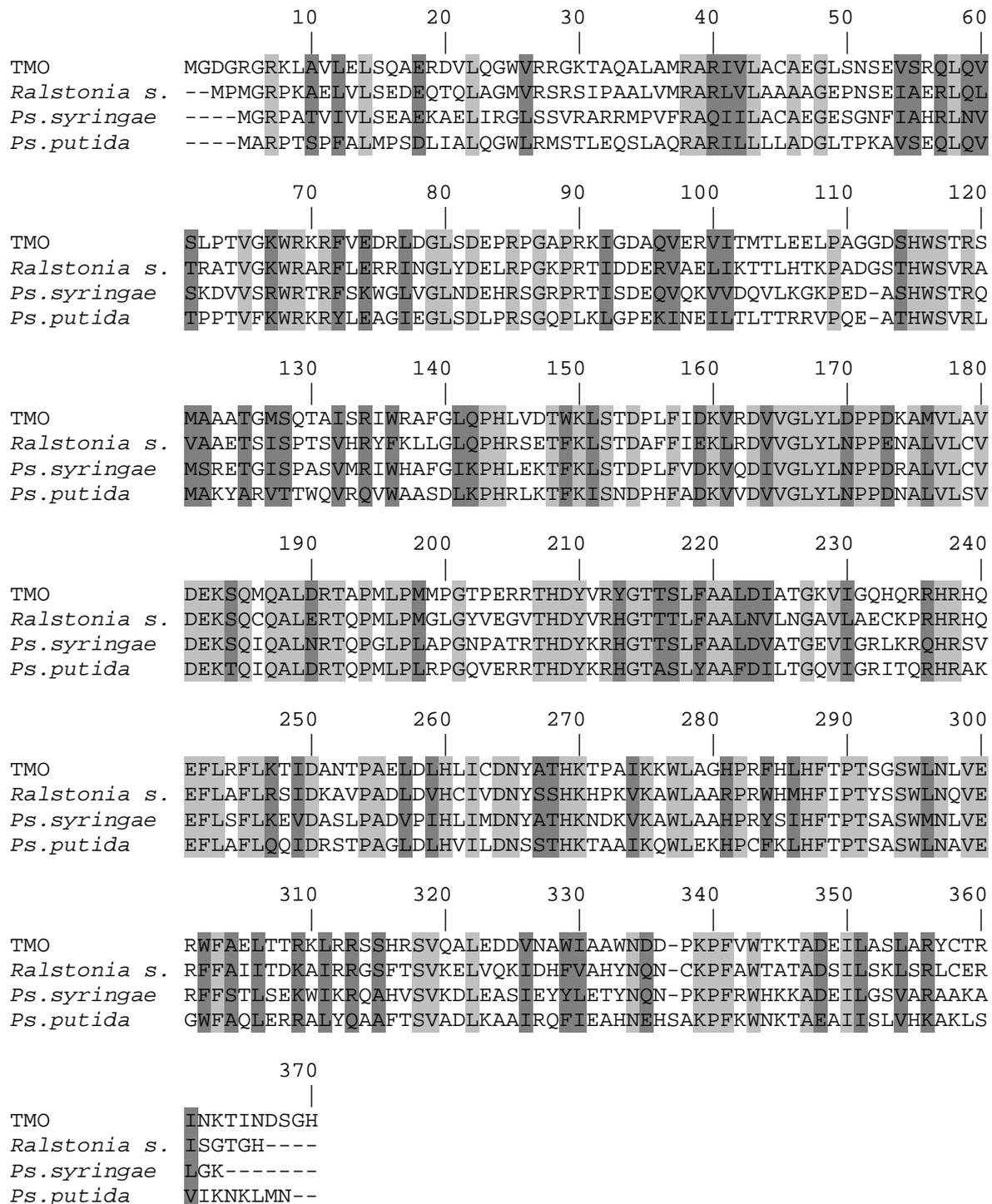


Abb. 48 Datenbank-Recherche mit der TMO-Transposase (369 aa).

Identische Aminosäuren sind hellgrau unterlegt, ähnliche sind dunkelgrau markiert. Homologien zu dem ISRSO5 Protein (*Ralstonia solanacearum* Genbank accession number NC 003295.1), *Pseudomonas putida* (AJ233397.3) und *Pseudomonas syringae* (AF69828.1) sind gezeigt.

Das Vorhandensein von Transposasen als Teil eines Plasmids macht Sinn, da Transposasen Enzyme sind, die eine entscheidende Rolle beim Austausch von Genen zwischen Mikroorganismen spielen. Die für die Transposasen kodierenden Gene befinden sich auf beweglichen genetischen Elementen, den Transposons. Viele katabolische Transposons sind bekannt, sie beinhalten Gencluster für Enzyme des Abbaus aromatischer Kohlenwasserstoff oder organischer Verbindungen [128]. Man kann aus diesem Befund folgern, daß das isolierte 8490 bp Fragment ein Teil eines Plasmids mit katabolischen Funktionen oder eines katabolischen Transposons darstellt. Dieses Plasmid oder Transposon sollte daher aus einem Mikroorganismus mit niedrigem G+C-Gehalt stammen, beispielsweise könnte ein *Pseudomonas*-Stamm als Donor für diesen Transferprozess betrachtet werden, z.B. *Pseudomonas syringae* mit Werten zwischen 46 und 62% für den G+C-Gehalt.

Vergleich mit der Lokalisation des thm-Genclusters

Viele für den Abbau xenobiotischer Verbindungen katabolische Enzyme wurden beschrieben und es konnte nachgewiesen werden, daß die dafür verantwortlichen Gene auf Plasmiden lokalisiert sind. Die *thm*-Gene aus *Pseudonocardia* sp. K1 mit sehr hoher Homologie (für *orfY* sogar Identität) zu den *tmo*-Gene aus *R. ruber* 219 wurden als plasmidkodiert identifiziert [53]. Das entsprechende zirkuläre Plasmid pKSK50 mit einer Größe von ca. 60 kb konnte isoliert werden. Diese Informationen sind bereits ein starker Hinweis, daß auch das *tmo*-Gencluster in *Rhodococcus* plasmidkodiert ist.

Alle diesen Informationen sind eindeutige Hinweise für die Lokalisation des *tmo*-Genclusters auf einem Plasmid und man kann davon ausgehen, dass die Gene durch lateralen Gentransfer erworben wurden. Auch die beobachteten Mutationen können als Hinweis für einen Gentransfer angesehen werden. Möglicherweise sind dies Versuche von *Rhodococcus ruber*, das Fremdgen an die Verhältnisse des eigenen Organismus anzupassen, wobei Mutationen, in diesem Fall also die hohe Anzahl von Frameshifts, nur in den nicht-kodierenden „Linker“-Bereichen zugelassen wurden.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Charakterisierung von reduktiven und oxidativen Enzyme in zwei Gram-positiven Bakterien, *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297 bzw. *Rhodococcus ruber* DSM 219.

Als ein reduktives Enzym mit dem Schwerpunkt der präparativen Anwendung wurde die Alkoholdehydrogenase aus *R. erythropolis* untersucht. Die RE-ADH setzt stereospezifisch zahlreiche Ketone in die entsprechenden (*S*)-Alkoholen um und benötigt NADH als Coenzym. Zusätzlich zu diesem breiten Substratspektrum ist die RE-ADH sehr stabil (keine Desaktivierung nach 1 h bei 60 °C), was dieses Enzym für präparative Anwendungen attraktiv macht. Das Enzym wurde in *E. coli* überexprimiert, dazu wurden verschiedene Vektor-Wirtskombinationen eingesetzt. Eine ADH-Aktivität von 6 U/mg wurde mit dem Expressionssystem pKK223-3/*E. coli* JM105 erzielt, das rekombinante Protein machte weniger als 1 % des gesamten Proteins der Wirtszelle aus. Da keine Überexpression vorlag, wurde das Hybridplasmid pKA1, abgeleitet von den kommerziell erhältlichen Vektoren pET11a und pACYC184 entwickelt. Die verwendete Strategie war dabei, die Genkopienzahl in der Wirtszelle zu reduzieren, diese Eigenschaft wird durch den Replikationsursprung Ori p15A vermittelt. Eine Steigerung der Aktivität der RE-ADH um das 5-fache (30 U/mg) konnte dadurch erreicht werden, der größte Teil des exprimierten Proteins lag allerdings als unlösliche Fraktion im Zellpellet vor.

Die Optimierung der Codon-Verwendung im *re-adh* Gen (Austausch von Arginin-Codon AGA an Position 8) ermöglichte eine weitere Erhöhung der Enzymaktivität auf 50 U/mg. Die Anzucht der rekombinanten *E. coli* Zelle mit zusätzlichem Zink im Wachstumsmedium führte zu einer weiteren Verbesserung der Expressionsausbeute, die Aktivität der ADH lag damit bei 80 U/mg. Die RE-ADH gehört zu den zink-enthaltenden mittelkettigen Alkoholdehydrogenasen. Die ausführliche Untersuchung des Einflusses von Zinkionen auf die Expression zeigte, dass bei einer Überexpression anscheinend der größere Teil des Proteins nicht mit ausreichenden Mengen an Metallionen versorgt ist.

Des weiteren wurde mit Hilfe von Homologievergleichen und der Einführung gezielter Mutationen die Funktion des C-Terminus der RE-ADH aufgeklärt. Dazu wurden die in der

Literatur beschriebene hoch homologe Phenylacetaldehyd-Reduktase aus *Corynebacterium* sp. (84 % Ähnlichkeit zu RE-ADH) und die ADH aus *R. ruber* (63 % Ähnlichkeit) genutzt. Die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Sulfolobus solfataricus*, deren dreidimensionale Struktur beschrieben ist, diente zur Modellierung des C-Terminus der RE-ADH. Dieser Teil des Proteins ist Bestandteil des aktiven Zentrums und an der Bindung des Pyrophosphat-Teils von Coenzym NADH beteiligt.

Zur Bestimmung der Funktion des C-Terminus von RE-ADH, wurde die ebenfalls NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *R. ruber* (RR-ADH) in *E. coli* überexprimiert (gleiches Expressionssystem wie bei der RE-ADH). Zwei RR-ADH Varianten, die Mutationen am C-Terminus tragen, wurden erzeugt; sie zeigen jeweils doppelte Aktivität als das Wildtyp-Enzym. In diesem Bereich des Proteins spielt das Verhältnis basische zu sauren Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die Reaktionsgeschwindigkeit.

Als Beispiel für die oxidative Anwendung von Rhodococcen wurde der einleitende Schritt des oxidativen Abbaus von Tetrahydrofuran durch *R. ruber* näher untersucht. Schlüsselenzym ist eine Multikomponenten Monooxygenase, die 2-Hydroxy-Tetrahydrofuran bildet. Die für die Monooxygenase verantwortlichen Gene konnten isoliert und identifiziert werden. Die Tetrahydrofuran-Monooxygenase (TMO) ist ein Enzym-Komplex bestehend aus zwei Untereinheiten (α und β); die dafür kodierenden Gene wurden auf dem isolierten 8490 bp DNA-Fragment lokalisiert. Zu diesem Enzym-Komplex gehört auch eine NAD-abhängige Reduktase, die für die Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf das Eisen-Oxo-Zentrum der Monooxygenase-Komponente notwendig ist.

Die drei Gene, kodierend für die α -, β -Untereinheiten der Monooxygenase und die Reduktase, wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert. Eine NADH-Reduktion durch diesen rekombinanten Enzym-Komplex wurde photometrisch detektiert. Diese NADH-Abnahme wurde durch Zusatz von FADH erhöht, was mit dem in der Reduktase gefundenen FAD-Bindungs-Motiv übereinstimmt.

Die letzten 1110 bp des isolierten 8490 bp DNA-Fragments zeigen Homologie zu vielen Transposasen, die meisten literaturbekannt sind aus Pseudomonaden. Der Vergleich des G+C-Gehaltes dieses DNA-Fragments (60 %) mit dem des gesamten *R. ruber* Genoms (67 %) weist einen deutlichen Unterschied auf. Diese beiden Beobachtungen sprechen für eine

Lokalisierung des 8490 bp dann-Fragments auf einem Plasmid und für ein Gentransfer-Ereignis aus einem Mikroorganismus mit niedrigerem G+C Gehalt.

Die TMO-Komponenten zeigen hohe Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Tetrahydrofuran-Monooxygenasen-Komponenten aus *Pseudonocardia* sp. K1 (THM), die auf dem Plasmid pKSK50 lokalisiert sind. Auch dieser Befund stützt die Annahme einer Lokalisation der TMO-Gene auf einem Plasmid.

Anhang

Primer für die Arbeiten an RE-ADH

RE1-5'

5'-GCG GAA TTC ATG AAG GCA ATC CAG TAC ACG-3'

RE1-3'

5'-CGC AAG CTT CTA CAG ACC AGG GAC CAC AAC-3'

RE2-5'

5' -GAG GTC GGT CAT ATG AAG GCA ATC CAG-3'

RE2-3'

5' - CGC GGA TCC CTA CAG ACC AGG GAC CAC AAC - 3'

RE3-5'

5' - GGT CAT ATG AAG GCA ATC CAG TAC ACG CGT ATC GGC - 3'

RE5-5'

5'-GTC GGT GGATTCATG AAG GCA ATC CAG TAC ACG AGA ATC GGC GCG GAA
CCG GAA CTC ACG GAG ATT CCGAAA CCG GAG-3'

RE6-5'

5'-GTC GGT GGATTC ATG AAG GCA ATC CAG TAC ACG CGT ATC GGC GCG **GAA**
CCG GAA CTC ACG GAG ATT CCGAAA CCG GAG-3'

RE7-3'

5' - CGC AAG CTT CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAG ACC AGG GAC - 3'

Primer für die Arbeiten an RR-ADH

RR1 -5'

5'-GTC GGG CGC CAT ATG AAA GCC CTC CAG-3'

RR1-3'

5'-GTC GTG GGA TCC TCA GCC CGG GAC GACC-3'

RR- R338S

5'-GTC GTG GGA TCC TCA GCC CGG GAC GAC CAC CCC GCG GCC GCT GAT
GCT GC-3'

RR- R338E

5'-GTC GTG GGA TCC TCA GCC CGG GAC GAC CAC CCC GCG GCC CTC GAT
GCT GC-3'

Primer für die Arbeiten an Phenylacetaldehyd Reduktase (PAR)**C.Mu11**

5'-CTG AAG GTC TCC ACC GCC GAT GTC GAA GAT GCC GGC- 3'

PA3-3'

5'-GGA ACT TG GGATCCTCA TCG AGG CGTG-3'

Mu11

5'-GCC GGC ATC TTC GAC ATC GGC GGT GGA GAC CTT CAG- 3'

Mu22

5'-CGG TTG TGG TCC CTG GTC TGT AGT ACC GAC AGC GGT AGA ACG-3'

C.Mu22

5'-CGT TCT ACC GCT GTC GGT ACT ACA GAC CAG GGA CCA CAA CCG-3'

PA.Q339K

5'-CTG CCG GAA CGC TCA GCG GCC GTG CGG TTG-3'

PA.Q339K'

5'-CAA CCG CAC GGC CGC TGA GCG TTC CGG CAG-3'

PA.353-3'

5'-GTCGTT GGATCC CTA CCG CTG TCG GTC TAC A GAC-3'

PA.348-3'

5'-GTCGGTA GGA TCC CTA CAG ACC AGG GAC CAC AAC CGA CGG CCG CTG
AGC GTT CCG-3'

Primer für die Long Distance PCR (Genome Walker)

RE7-5'

5'-TAT CGA CGA CTG GCT GCC GGA ACG CT-3'

RE8-5'

5'-GCG GTT GTG GTC CCT GGT CTG TAG AC-3'

AP1

5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

AP2

5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'

Primer für die Arbeiten am (Tetrahydrofuran Monooxygenase) TMO Komplex

Tab. 31 Primer zur Isolierung des 648 bp groß DNA-Fragmentes

Primer Bezeichnung	Primersequenz	Konservierte Aminosäuresequenz
THF1	5'-CTC/G TGG GAG CGC/G ACC/G TTC TTC CAG -3'	LWERTFFQ
THF1'	5'-CTG C/GGC CTG C/GCG C/GAG CTT GTA-3'	YKLRQAQ
THF2	5'-GGT GGC CTG TGG GAG CGC/G ACC/G TTC-3'	GGLWERTF
THF2'	5'-GGT GCC CCA GTC CTC G/CAG CAA CTC CTG-3'	QEWLEDWGT

Primer für die Isolierung des vollständigen TMO Komplexes

Primäre PCR

THF3

5'-CCA GAC TGG CTC AAC TCA TGA GCG CGA GA-3'

THF5

5'-GTAGCCGAGGCAGTTCGCGATGGCATCAC-3'

THF7

5'-TCACTGAATCACCCACCGTCAGGCCCTC-3'

THF9

5'-CAT TGA CGT CGT CCT CGA GAG CCT GGA CG-3'

THF11

5'-GCG TCT TAC CGT CCG GAC GGA GGA AGC C-3'

THF13

5'-TAT CGG CTG GGA TAC TTC CCG CGC TCA TG-3'

THF15

5'-GCT CGT CAC TGA GCC CGT CGA GCC GAT C-3'

Sekundäre PCR**THF6**

5'-ACTGCGGGGCAACCAGACCATACTCGGTAA-3'

THF4

5'-GGA CAA CAA TCT GTT CGT TGC GGC AAG CA-3'

THF8

5'-GAACCGACCGCCCGGATACTGCTTGATGA-3'

THF10

5'-AGC GGC GTA GTT TGC GGG TGG TCA ACT C-3'

THF12

5'-TGC TTA GCA GGG TCG GGA TCA ACG TGC G-3'

THF14

5'- ATC TTG GCG TGG CTC GCC GTA ATG CTT CG- 3'

THF16

5'-CCA CTT GCC CAC AGT GGG CAG CGA CAC-3'

Primer zum Screening der TMO DNA Bibliothek

SCRE1 (5' Primer)

5'-GCA TCG TCT GGC GCT CCA CCC AC-3'

SCRE2 (3' Primer)

5'-AGC CTG CCG GGA CGA GAC ATG AG-3'

Die Sequenz des 8490 bp DNA-Fragments aus *Rhodococcus ruber* DSM 219. Die für die TMO kodierenden Gene sind hervorgehoben.

C	GAC	GGC	CCG	GGC	TGG	TAC	TGG	GGA	ACC	GCC	AGC	AAG	GCG	TAT	GGC	AAC	GAA	52
D	G	P	G	W	Y	W	G	T	A	S	K	A	Y	G	N	E	17	
GCC	TCG	ACC	AGC	CGC	ATC	ACC	TGC	CCC	TCC	GTT	GCG	ACT	TCC	TGC	TGC	TGA	GCG	106
A	S	T	S	R	I	T	C	P	S	V	A	T	S	C	C	*	A	35
GCC	ACA	CCG	TGG	GGA	GCT	TGA	CAG	CTC	TAC	ATG	TGA	CAT	GCC	ACT	CTG	TAC	CGC	160
A	T	P	W	G	A	*	Q	L	Y	M	*	H	A	T	L	Y	R	53
AGC	ATG	CTA	CAT	GCC	AGT	ATG	CGC	ATC	CCC	TAG	CCA	GTA	AAT	CGC	TGG	GCC	CAG	214
S	M	L	H	A	S	M	R	I	P	*	P	V	N	R	W	A	Q	71
GGG	AGC	CGC	TCC	GTC	GCA	TCG	TCG	GGA	TGG	AAC	AGC	CTA	TGG	GTG	ACA	CTG	CTT	268
G	S	R	S	V	A	S	S	G	W	N	S	L	W	V	T	L	L	89
GGC	GCC	TTC	GAG	TTG	ACC	GGG	TGT	CGG	CCG	ATA	GTT	GTG	CGG	GTT	TCG	CAA	GGT	322
G	A	F	E	L	T	G	C	R	P	I	V	V	R	V	S	Q	G	107
CTT	TCG	TTT	CAC	CCC	TGG	CGT	TGA	AGA	GGT	TTG	CGC	TGT	ACG	GCG	GCA	ACT	CTG	376
L	S	F	H	P	W	R	*	R	G	L	R	C	T	A	A	T	L	125
GGT	GCG	GCT	GGG	CGG	GAT	CAG	ATC	ACT	ACT	CCT	TCT	GTC	GGG	TCT	CGG	CGC	CGT	430
G	A	A	G	R	D	Q	I	T	T	P	S	V	G	S	R	R	R	143
TAG	TGT	CAT	ATC	CTG	GTT	GCT	AGT	CCT	AAC	GCG	CAT	GCT	CCG	CGA	TTC	GCT	TAG	484
*	C	H	I	L	V	A	S	P	N	A	H	A	P	R	F	A	*	161
TTT	TTC	TAT	TGC	CGC	TTG	TCG	TGT	TGC	GTT	AAT	GTA	GCG	CAT	AGC	GAC	CTA	TGG	538
F	F	Y	C	R	L	S	C	C	V	N	V	A	H	S	D	L	W	179
TTG	ATG	TCG	AGC	TCG	TTC	AGC	GGT	ATT	GCA	ATC	GGA	ATC	GCG	GTT	CGT	CAG	AAA	592
L	M	S	S	S	F	S	G	I	A	I	G	I	A	V	R	Q	K	197
GCT	TCA	AGC	GTG	GCC	TCG	CCA	ACG	CAT	TCT	GGT	CTA	GGA	AAG	TGT	GGC	ATG	TTA	646
A	S	S	V	A	S	P	T	H	S	G	L	G	K	C	G	M	L	215
CAT	GCC	ACA	TCG	CAG	TGG	AGA	CTC	GGA	GGC	TGG	ACT	ATG	TTC	AAG	ATC	ATG	TTT	700
H	A	T	S	Q	W	R	L	G	G	W	T	M	F	K	I	M	F	233
GTC	GTC	TAC	GAG	CGC	GAG	GGT	ATC	GAT	CGG	GAT	GAG	GCT	CTG	CGT	TAT	TGG	CGC	754
V	V	Y	E	R	E	G	I	D	R	D	E	A	L	R	Y	W	R	251
GAG	CAG	CAT	GGC	CCG	CTC	GCG	TCC	AAG	GTT	CCC	GGC	CTG	CGT	TAT	TAC	GCT	CAG	808
E	Q	H	G	P	L	A	S	K	V	P	G	L	R	Y	Y	A	Q	269
ACG	CAC	GCC	CTC	AGC	TCT	GCT	GAC	GGG	GGC	TCG	GCC	CCG	TAC	CTC	GGA	TCT	GCT	862
T	H	A	L	S	S	A	D	G	G	S	A	P	Y	L	G	S	A	287
GAA	ATG	GCG	TTC	GAC	AGC	CAG	GGA	GCC	TTT	GTC	GAG	GCA	ACG	GCA	TCT	CCC	GAG	916
E	M	A	F	D	S	Q	G	A	F	V	E	A	T	A	S	P	E	305
TTC	GAT	GCA	GTT	CTG	AAG	GAC	GTG	GTC	AAC	TTT	GCA	GAT	CCT	GAC	AAC	GTT	CCG	970
F	D	A	V	L	K	D	V	V	N	F	A	D	P	D	N	V	P	323
ACG	GCA	GTT	GTC	CAG	GAT	TAC	GTC	TTC	GTT	GAC	TGA	CCT	TTA	TTC	TGG	TGA	CTG	1024
T	A	V	V	Q	D	Y	V	F	V	D	*	P	L	F	W	*	L	341
GCC	GAG	TCG	TCA	TCG	GCC	GTC	ATA	ATT	TAG	GTG	TCT	GGT	TTC	GCT	CGC	GGC	GCC	1078
A	E	S	S	S	A	V	I	I	*	V	S	G	F	A	R	G	A	359
GGC	CAC	GCC	TTT	GAA	TGT	GCG	GTT	CCG	TCT	TAG	CAC	GTA	GGG	CCT	ATT	CAG	CTT	1132
G	H	A	F	E	C	A	V	P	S	*	H	V	G	P	I	Q	L	377

ACC	CTC	GCC	GTT	GAA	GGA	GTA	ATA	GGA	TGA	CTG	TGA	TCG	CCA	AGC	CCG	ATT	ACC	1186
T	L	A	V	E	G	V	I	G	*	L	*	S	P	S	P	I	T	395
TAT	TGC	GTG	ACG	ACG	TAC	AGA	AGT	TCA	TTG	ATC	GCC	CGA	AGA	AGC	TTT	TCA	TCA	1240
Y	C	V	T	T	Y	R	S	S	L	I	A	R	R	S	F	S	S	413
ATG	GTC	AGT	GGC	ACG	ACT	CCA	TCA	AGG	GTG	AGA	CTC	TCG	AGG	TCT	ACG	ACC	CTG	1294
M	V	S	G	T	T	P	S	R	V	R	L	S	R	S	T	T	L	431
CGG	TTG	GGA	CGA	AGA	TCT	GTA	CCG	TTG	CTG	CGG	GTG	ACG	CCG	AGG	ATG	TCG	ACC	1348
R	L	G	R	R	S	V	P	L	L	R	V	T	P	R	M	S	T	449
GAG	CTG	TGG	CGG	CCG	CGC	GCC	ACG	CGT	TCG	ACG	AGG	GGC	CGT	GGT	CCA	AGC	TGA	1402
E	L	W	R	P	R	A	T	R	S	T	R	G	R	G	P	S	*	467
ATC	CTT	CGG	AGC	GCG	GCA	GGC	TGG	TCT	GGC	GGC	TCG	CGG	ATC	TTC	TCG	AGG	AGC	1456
I	L	R	S	A	A	G	W	S	G	G	S	R	I	F	S	R	S	485
ACG	CGG	ACG	AGT	TTG	CAC	AGA	TCG	ATG	CGC	TCG	ACA	ACG	GCA	AAC	CGG	TCA	CGG	1510
T	R	T	S	L	H	R	S	M	R	S	T	T	A	N	R	S	R	503
ACG	CGC	GTG	CGG	TAG	ACG	TGG	CGT	TCT	CGA	TCG	AAC	TGC	TGC	GAT	ACA	TGG	CTG	1564
T	R	V	R	*	T	W	R	S	R	S	N	C	C	D	T	W	L	521
GTT	GGT	CGA	ACA	AGA	TTT	ATG	GCG	AGA	CGA	TTC	CGC	TCA	CCA	ACC	CGG	CTG	ACT	1618
V	G	R	T	R	F	M	A	R	R	F	R	S	P	T	R	L	T	539
TCC	ATG	CAT	ACA	CGC	TTC	GCG	AGC	CGG	TCG	GCG	TGG	TCG	GGC	AGA	TCG	TTC	CTT	1672
S	M	H	T	R	F	A	S	R	S	A	W	S	G	R	S	F	L	557
GGA	ATT	TCC	CCC	TCA	TGA	TGG	CGG	TCT	GGA	AGG	TCG	CTC	CTG	CCC	TGG	CCG	CCG	1726
G	I	S	P	S	*	W	R	S	G	R	S	L	L	P	W	P	P	575
GCT	GCA	CCG	TGA	TCC	TCA	AGC	CCG	CCG	AGC	AGA	CGC	CGC	TGA	GCG	CAC	TTC	GCC	1780
A	A	P	*	S	S	S	P	P	S	R	R	R	*	A	H	F	A	593
TGG	CTG	AGC	TCA	CCG	AGG	AGG	CCG	GCT	TCC	CGC	CGG	GTG	TCT	TCA	ACG	TCA	TCA	1834
W	L	S	S	P	R	R	P	A	S	R	R	V	S	S	T	S	S	611
CCG	GCT	TTG	GCG	AGA	CGG	CAG	GTG	CGG	CGA	TCG	CCG	CCC	ACG	ACA	ACA	TCG	ACA	1888
P	A	L	A	R	R	Q	V	R	R	S	P	P	T	T	T	S	T	629
AGG	TCG	CGT	TCA	CCG	GTT	CGA	CCG	AGG	TCG	GGC	GGC	TGA	TCG	CGC	ATG	CGG	CGA	1942
R	S	R	S	P	V	R	P	R	S	G	G	*	S	R	M	R	R	647
GCG	GGA	ACC	TCA	AGA	AGG	TCT	CCC	TCG	AGC	TTG	GCG	GAA	AGT	CCC	CCG	TGA	TCG	1996
A	G	T	S	R	R	S	P	S	S	L	A	E	S	P	P	*	S	665
TGT	TCG	GTG	ATT	CTG	ACA	TCG	AGC	AGG	CTG	TTG	CCG	GTG	CTT	CCA	GCG	CGA	TTT	2050
C	S	V	I	L	T	S	S	R	L	L	P	V	L	P	A	R	F	683
TCT	ACA	ACA	ACG	GGC	AGA	CCT	GCA	CGG	CGG	GAT	CTC	GTC	TCT	ATG	TGC	ACC	GGA	2104
S	T	T	T	G	R	P	A	R	R	D	L	V	S	M	C	T	G	701
AGG	TCT	ACG	ACA	AGG	TCG	TGG	AGG	GTA	TCG	CCA	GTG	AGG	CGT	CTG	CTC	TCC	CGA	2158
R	S	T	T	R	S	W	R	V	S	P	V	R	R	L	L	S	R	719
TCG	GTC	ACG	GTC	TCG	ACC	CGG	CGA	CCC	GTA	TCG	GGC	CGC	TGA	TCT	CGG	CGG	AGC	2212
S	V	T	V	S	T	R	R	P	V	S	G	R	*	S	R	R	S	737
AGC	GCG	ACC	GTG	TCA	CTG	GCT	ACA	TCG	CAC	AGG	GCC	GCG	AGG	CCG	GCG	CAG	AGG	2266
S	A	T	V	S	L	A	T	S	H	R	A	A	R	P	A	Q	R	755
TGA	TCG	TGG	GTG	GGG	ACA	CTG	TCG	GTG	ATC	GGG	GCT	ACT	TCA	TTC	AGC	CGA	CCA	2320
*	S	W	V	G	T	L	S	V	I	G	A	T	S	F	S	R	P	773

TCC	TTA	CCA	AGA	CTG	ATC	CGA	GCA	TGA	GCG	TAG	TGC	GCG	AGG	AGA	TCT	TCG	GCC	2374
S	L	P	R	L	I	R	A	*	A	*	C	A	R	R	S	S	A	791
CGG	TGC	TGT	GTG	CCA	TGG	CCT	TTG	ACG	AAG	ACA	CCA	TCG	ATA	GCG	TTG	TGC	GTG	2428
R	C	C	V	P	W	P	L	T	K	T	P	S	I	A	L	C	V	809
AGG	CGA	ACA	ACT	CGG	TGT	ACG	GGT	TGG	CCG	CGA	GTA	TCT	ACA	CCC	GCG	ACA	TTA	2482
R	R	T	T	R	C	T	G	W	P	R	V	S	T	P	A	T	L	827
GCG	TCG	CAC	ATC	GAG	TCG	CCA	AGC	GGC	TCA	AGG	CTG	GAA	CGA	TCG	GTA	TCA	ATA	2536
A	S	H	I	E	S	P	S	G	S	R	L	E	R	S	V	S	I	845
CCC	ACC	ATG	TGG	TCG	ATG	TCG	CGC	TCC	CAT	TCG	GCG	GAT	TCA	AGC	AGT	CCG	GAT	2590
P	T	M	W	S	M	S	R	S	H	S	A	D	S	S	S	P	D	863
ATG	GTC	GGG	ACA	TGG	GCC	GCG	ACG	CGA	TCG	ACC	AGT	ACA	CCG	AGG	TCA	AGT	CGA	2644
M	V	G	T	W	A	A	T	R	S	T	S	T	P	R	S	S	R	881
TCG	GTA	TCG	CAC	TCT	GAC	GCT	ACT	GCG	CTC	ACC	AGG	GGG	AGC	ACT	CTC	ATT	CAA	2698
S	V	S	H	S	D	A	T	A	L	T	R	G	S	T	L	I	Q	899
GAG	AAG	ATT	GGT	GCC	CAG	GTA	AGC	GCG	ACA	TCT	CGG	ACT	TGA	TAC	CCC	GCA	TCG	2752
E	K	I	G	A	Q	V	S	A	T	S	R	T	*	Y	P	A	S	917
TCT	GGC	GCT	CCA	CCC	ACC	ATA	TAG	AGG	CGC	CAT	CAA	TGG	GAA	AGG	CTT	AAG	ATC	2806
S	G	A	P	P	T	I	*	R	R	H	Q	W	E	R	L	K	I	935

 α -UE (Monooxygenase)

ACG	ATG	ACT	GCC	CCA	CCG	ATG	AAG	AGG	CCG	CGT	CGA	AGC	ATT	ACG	GCG	AGC	CAC	2860
T	M	T	A	P	P	M	K	R	P	R	R	S	I	T	A	S	H	953
GCC	AAG	ATC	GGC	GAG	CTG	GGC	TGG	GAC	CGG	ACG	TAC	TAC	CCC	CAT	GAG	CGC	GGG	2914
A	K	I	G	E	L	G	W	D	R	T	Y	Y	P	H	E	R	G	971
AAG	TAT	CCC	AGC	CGA	TAC	AAG	CTG	CCG	AAC	AAG	CCA	GGC	CGG	GAT	CCC	ATG	AAG	2968
K	Y	P	S	R	Y	K	L	P	N	K	P	G	R	D	P	M	K	989
CAG	ATC	ATG	GGC	GAC	TAC	CTG	CAC	ATG	CAG	AAC	GAG	AAG	GAT	GAC	CGC	GTC	CAC	3022
Q	I	M	G	D	Y	L	H	M	Q	N	E	K	D	D	R	V	H	1007
GGT	GGC	CTC	GAT	GCA	GCC	GTC	CGC	GCA	GAG	GTC	CCC	GGC	AAG	GCC	CCG	CTT	CGG	3076
G	G	L	D	A	A	V	R	A	E	V	P	G	K	A	P	L	R	1025
TGG	CTG	GAG	CTG	CTC	AAG	CCT	TAC	CTG	CTG	ACT	GTT	GTT	AGC	GCC	GAG	GCC	GCC	3130
W	L	E	L	L	K	P	Y	L	L	T	V	V	S	A	E	A	A	1043
GCT	ACC	CGC	TGT	ATG	GGC	ATG	CTT	GTT	GAT	GCC	ATC	GAC	GAC	CCC	GAG	CTG	CAG	3184
A	T	R	C	M	G	M	L	V	D	A	I	D	D	P	E	L	Q	1061
AAC	GCC	TAT	TAC	ATC	CAG	CAG	CTC	GAC	GAG	CAG	CGT	CAC	ACC	GCG	ATG	CAG	ATG	3238
N	A	Y	Y	I	Q	Q	L	D	E	Q	R	H	T	A	M	Q	M	1079
AAC	CTG	TAT	CGC	TGG	TAC	ATG	AAG	AAC	ATG	CCC	GAG	CCG	GTC	GGC	TGG	AAC	CTC	3292
N	L	Y	R	W	Y	M	K	N	M	P	E	P	V	G	W	N	L	1097
GGG	CTC	CAG	GCG	GTC	GGG	GGC	GAC	TCC	ATC	CTG	GTC	GCC	GCC	CAG	AAC	CTC	ACC	3346
G	L	Q	A	V	G	G	D	S	I	L	V	A	A	Q	N	L	T	1115
GGA	AGC	TTC	ATG	ACC	GGT	GAC	CCC	TTC	CAG	GCC	GCG	GTG	GCG	CTC	CAG	GTC	GTC	3400
G	S	F	M	T	G	D	P	F	Q	A	A	V	A	L	Q	V	V	1133
GTT	GAG	ACC	GCC	TTC	ACG	AAC	ACC	ATC	CTG	GTC	GCG	TTC	CCG	GAC	GTG	GCA	GTC	3454
V	E	T	A	F	T	N	T	I	L	V	A	F	P	D	V	A	V	1151
CGG	AAC	CAT	GAC	TTC	GCT	CTG	CCC	ACT	GTC	ATG	AAC	TCC	GTG	CAG	TCG	GAC	GAG	3508
R	N	H	D	F	A	L	P	T	V	M	N	S	V	Q	S	D	E	1169

GCG	CGC	CAC	ATC	AAC	AAC	GGC	TAC	GCG	ACA	CTT	CTG	TAC	CTC	CTG	CAG	GAG	CCG	3562
A	R	H	I	N	N	G	Y	A	T	L	L	Y	L	L	Q	E	P	1187
GAG	AAC	GCC	CCC	CTG	CTT	GAG	CAG	GAC	ATC	CAG	CAG	ATG	TTC	TGG	ACC	GTG	CAC	3616
E	N	A	P	L	L	E	Q	D	I	Q	Q	M	F	W	T	V	H	1205
GCA	TTC	GTC	GAC	GCC	TTC	ATG	GGC	ATC	CTC	GTC	GAG	TAC	GCC	CCC	ACG	GAT	GCG	3670
A	F	V	D	A	F	M	G	I	L	V	E	Y	A	P	T	D	A	1223
ACC	GAC	CCG	GAA	AGC	TGG	ACC	ACG	AAG	TGG	GAC	CGG	TGG	GTG	AAT	GAC	GAC	TAC	3724
T	D	P	E	S	W	T	T	K	W	D	R	W	V	N	D	D	Y	1241
TAC	CGT	TCC	TAC	ATC	GTC	AAC	CTC	GGC	AAG	CTG	GGC	TTG	AAG	ATC	CCC	GAC	TCG	3778
Y	R	S	Y	I	V	N	L	G	K	L	G	L	K	I	P	D	S	1259
ATC	TTC	AAG	CGC	GCG	CGT	GAA	CGG	ATT	GCT	GCC	GAC	TAC	CAC	CAC	AAG	GTT	GCT	3832
I	F	K	R	A	R	E	R	I	A	A	D	Y	H	H	K	V	A	1277
GTC	GGC	GTC	TGG	GCC	TCG	TGG	CCC	TTC	CAC	TAC	TAT	AAG	TAC	GGC	AAC	CTC	GAG	3886
V	G	V	W	A	S	W	P	F	H	Y	Y	K	Y	G	N	L	E	1295
CAG	AAG	GAC	TAC	GAC	TGG	TTC	GAG	AGC	AAG	TAC	CCG	GGC	TGG	AAC	GAG	AAG	TAC	3940
Q	K	D	Y	D	W	F	E	S	K	Y	P	G	W	N	E	K	Y	1313
GGT	GCG	TTC	TGG	CGC	GGC	TAC	GCC	GAC	GTT	CGC	TAC	CCC	GGT	TCG	GGT	CCC	TTG	3994
G	A	F	W	R	G	Y	A	D	V	R	Y	P	G	S	G	P	L	1331
CAG	CTG	CCC	GGG	CTG	CTC	GAG	GGT	GCC	GGC	CCG	ATC	TGC	TGG	ACC	TGC	CAG	CTC	4048
Q	L	P	G	L	L	E	G	A	G	P	I	C	W	T	C	Q	L	1349
GGA	TGC	CTG	CGG	CCC	GAG	GAG	CAG	TGC	CAC	CGC	GTT	GTC	GAC	GAG	CAC	ACG	CGG	4102
G	C	L	R	P	E	E	Q	C	H	R	V	V	D	E	H	T	R	1367
TTC	TAT	TGC	TCG	CCG	GAG	TGC	AAG	TGG	ATC	GAC	ATG	ACC	AAC	CCT	GGT	CGC	TAT	4156
F	Y	C	S	P	E	C	K	W	I	D	M	T	N	P	G	R	Y	1385
GTC	GGT	GAC	CGT	GTT	TGG	TTC	GAC	CGC	TAC	CAC	GGC	TGG	GAG	TAC	TCC	GAG	ATC	4210
V	G	D	R	V	W	F	D	R	Y	H	G	W	E	Y	S	E	I	1403
GTG	CGT	GAC	CTC	GGC	TTC	CTC	CGT	CCG	GAC	GGT	AAG	ACG	CTC	ACA	GGC	CAG	CCG	4264
V	R	D	L	G	F	L	R	P	D	G	K	T	L	T	G	Q	P	1421
CAC	GTT	GAT	CCC	GAC	CCT	GCT	AAG	CAG	TGG	ACG	ATC	GAT	GAT	CTC	CGA	GAG	CTC	4318
H	V	D	P	D	P	A	K	Q	W	T	I	D	D	L	R	E	L	1439
GGC	CAC	ATC	ATG	CAG	AGC	CCG	AAC	ATC	CTC	ACT	GCG	GAG	CGT	CTC	GGC	CTG	CCC	4372
G	H	I	M	Q	S	P	N	I	L	T	A	E	R	L	G	L	P	1457
TAT	AAG	CGA	GTG	GAA	TAC	ACC	GGC	ACT	AAG	ACC	GGT	GAC	ATG	CCC	CCC	ACC	ATT	4426
Y	K	R	V	E	Y	T	G	T	K	T	G	D	M	P	P	T	I	1475
rP3																		
CCG	CCG	CTC	TTC	GGG	GTC	TGA	GTA	AGT	CTC	ATG	TCT	CGT	CCC	GGC	AGG	CTG	CCG	4480
P	P	L	F	G	V	*	V	S	L	M	S	R	P	G	R	L	P	1493
ACT	CGT	GGT	TTG	GCA	ACC	TGC	CGG	GGC	TTG	GCG	TAT	GAC	TCT	CAC	CGA	GTC	ATC	4534
T	R	G	L	A	T	C	R	G	L	A	Y	D	S	H	R	V	I	1511
Reduktase																		
AGA	TGA	GTG	GCC	GCA	GGT	TGG	GAG	GGT	GGC	GAG	CAT	ATG	GGA	ACG	TTC	AAC	GTA	4588
R	*	V	A	A	G	W	E	G	G	E	H	M	G	T	F	N	V	1529
AGG	TTC	GAG	CCA	ATT	GGT	GAA	GAG	ATC	GAA	TGC	GGC	GAG	GAT	GAG	ACC	ATT	CTC	4642
R	F	E	P	I	G	E	E	I	E	C	G	E	D	E	T	I	L	1547
GAT	GCA	GCA	TTT	CGA	TCG	GGT	TTG	AAC	CTT	GTG	CAC	GGT	TGC	CGC	GAG	GGG	CGC	4696
D	A	A	F	R	S	G	L	N	L	V	H	G	C	R	E	G	R	1565

TGC	TCG	GCG	TGC	AAG	GCA	TTT	GTC	CTC	GAT	GAA	GGA	TGG	ATA	TAT	CTA	AAG	AAA	4750
C	S	A	C	K	A	F	V	L	D	E	G	W	I	Y	L	K	K	1583
TAT	TCA	AGC	TTC	GCT	CTC	TCC	GAT	CAG	GAA	GAG	GAG	GGG	GGA	TAT	ACC	CTT	CTA	4804
Y	S	S	F	A	L	S	D	Q	E	E	E	G	G	Y	T	L	L	1601
TGC	CGG	GCA	GTT	CCG	GAG	TCA	GAC	GTT	ACG	ATT	GAG	CTG	CTC	AAC	TAT	GAT	CCA	4858
C	R	A	V	P	E	S	D	V	T	I	E	L	L	N	Y	D	P	1619
GAC	CAC	TAT	CGG	CTC	GAG	CAC	GCC	ATT	ACT	GAT	GGA	GTT	GGC	CGA	GTA	GTC	GAT	4912
D	H	Y	R	L	E	H	A	I	T	D	G	V	G	R	V	V	D	1637
GTG	GAA	GCG	TTG	ACG	CAC	GAC	ATT	CGA	CGC	TTG	GAG	CTC	CAG	ATC	GAG	TCT	CCT	4966
V	E	A	L	T	H	D	I	R	R	L	E	L	Q	I	E	S	P	1655
CAG	GGC	TTC	GGA	TTT	CTT	CCC	GGT	CAA	TTC	GTC	GAC	ATC	TGG	ATC	CCC	GGG	ACC	5020
Q	G	F	G	F	L	P	G	Q	F	V	D	I	W	I	P	G	T	1673
GAG	CAG	CGG	CGA	TCG	TTC	TCG	ATG	GCA	AAC	CTT	CCT	AGC	GAC	GGG	CGC	CTT	GAG	5074
E	Q	R	R	S	F	S	M	A	N	L	P	S	D	G	R	L	E	1691
TTC	ATC	ATC	AAG	CAG	TAT	CCG	GGC	GGT	CGG	TTC	GGG	GCG	ATG	CTC	GAC	GAG	GGC	5128
F	I	I	K	Q	Y	P	G	G	R	F	G	A	M	L	D	E	G	1709
CTG	ACG	GTG	GGT	GAT	TCA	GTG	AAG	TTC	ACC	GGG	CCT	TAT	GGT	ACA	TGC	TAC	CTC	5182
L	T	V	G	D	S	V	K	F	T	G	P	Y	G	T	C	Y	L	1727
CGT	GAT	ACC	GGC	GGG	AGT	CGT	TCG	GCG	TTA	CTC	ATC	GCC	GGT	GGT	TCG	GGT	ATG	5236
R	D	T	G	G	S	R	S	A	L	L	I	A	G	G	S	G	M	1745
GCG	CCG	ATT	CTT	TCT	CTG	CTG	CGC	CAG	ATG	TCA	GAG	GAC	GGT	CAG	GGC	CGC	ACC	5290
A	P	I	L	S	L	L	R	Q	M	S	E	D	G	Q	G	R	T	1763
GTG	TCG	GTG	TTC	TAC	GGT	GGA	CGT	GCG	AGA	CGC	GAT	CTT	TTC	TAT	ACC	GAG	CTC	5344
V	S	V	F	Y	G	G	R	A	R	R	D	L	F	Y	T	E	L	1781
GTT	CAG	TCC	CTC	GGA	AAA	CGA	ATC	GAG	CAG	TTC	GAG	TTC	ATC	CAA	GTA	GTG	TCG	5398
V	Q	S	L	G	K	R	I	E	Q	F	E	F	I	Q	V	V	S	1799
GAT	GAA	TCC	GAT	AGT	GAC	GGT	GAC	GGT	GAC	GAT	GTA	CGA	TAC	GGA	TTC	GTG	CAT	5452
D	E	S	D	S	D	G	D	G	D	D	V	R	Y	G	F	V	H	1817
GAC	GCC	GTT	GAT	CAG	TGG	ATA	GAG	ACT	TCC	GGG	TTC	CGC	CTG	GAT	GCA	TGT	GAC	5506
D	A	V	D	Q	W	I	E	T	S	G	F	R	L	D	A	C	D	1835
GTC	TAT	ATG	GCA	GGC	CCG	CCA	CCG	ATG	GTT	GAT	GCG	GTG	AAC	GAT	GTT	CTG	ACG	5560
V	Y	M	A	G	P	P	P	M	V	D	A	V	N	D	V	L	T	1853
CTC	AGG	CAT	CAG	GTG	GAG	CAG	AAT	CGG	ATC	TTC	GTA	GAC	AAG	TTC	ACG	TCG	ACC	5614
L	R	H	Q	V	E	Q	N	R	I	F	V	D	K	F	T	S	T	1871
GGC	CCT	GAG	GAA	TCT	GCC	GAT	TCC	GAT	TCT	GTA	TCG	TCG	CTT	TAA	GAT	TTG	TTC	5668
G	P	E	E	S	A	D	S	D	S	V	S	S	L	*	D	L	F	1889
β-UE (Monooxygenase)																		
TCC	AGA	GAG	GAG	ATC	TGC	GCA	ATG	AGT	GCA	TCA	GCT	GCC	GAG	CGG	CGT	GAG	CTG	5722
S	R	E	E	I	C	A	M	S	A	S	A	A	E	R	R	E	L	1907
CGA	GAG	CTC	GAG	CGG	ACA	CAG	CAC	TGG	TTC	ATC	CCG	GAG	CGG	AAA	CGT	TCG	TCG	5776
R	E	L	E	R	T	Q	H	W	F	I	P	E	R	K	R	S	S	1925
CTC	TAC	GAG	GAC	GTG	ACT	ATC	GAC	GTC	CAG	CCG	AGC	GTC	CAC	CGG	CAT	ACC	AGG	5830
L	Y	E	D	V	T	I	D	V	Q	P	S	V	H	R	H	T	R	1943
TTC	GGC	TAT	CCT	ATC	GCA	TTT	CCA	AAC	GGG	CGT	CAG	TCA	TTC	TGG	GAT	GAC	TCC	5884
F	G	Y	P	I	A	F	P	N	G	R	Q	S	F	W	D	D	S	1961

ACT	GCG	ATC	CGG	TCC	AGC	GAC	TGG	TAT	GCG	TTT	CGT	GAT	CCG	GCC	GGG	CTT	TGG	5938
T	A	I	R	S	S	D	W	Y	A	F	R	D	P	A	G	L	W	1979
GAG	CGC	ACG	TTC	TTC	CAG	ACT	GGC	TCA	ACT	CAT	GAG	CGC	GAG	ATC	GAG	AAT	GAT	5992
E	R	T	F	F	Q	T	G	S	T	H	E	R	E	I	E	N	D	1997
CTC	CAG	GTG	GCG	CGG	GAC	AAC	AAT	CTG	TTC	GTT	GCG	GCA	AGC	AAG	GAG	TGG	GTT	6046
L	Q	V	A	R	D	N	N	L	F	V	A	A	S	K	E	W	V	2015
GAC	TTC	TTG	TCT	GCT	CAG	CTT	CTG	CCG	ATC	AGC	CTT	ACC	GAG	TAT	GGT	CTG	GTT	6100
D	F	L	S	A	Q	L	L	P	I	S	L	T	E	Y	G	L	V	2033
GCC	CCG	CAG	TCG	GCG	GCA	CTC	CGG	CCC	GCC	CTG	GGT	GAT	GCC	ATC	GCG	AAC	TGC	6154
A	P	Q	S	A	A	L	R	P	A	L	G	D	A	I	A	N	C	2051
CTC	GGC	TAC	AGC	GCC	GGT	TAC	AAA	CTT	CGC	CAG	GCT	CAG	GCA	CTT	GTT	CTC	TAC	6208
L	G	Y	S	A	G	Y	K	L	R	Q	A	Q	A	L	V	L	Y	2069
GGG	GGA	GAG	CTG	GAG	CGG	GAG	ATT	CCC	GGA	TTT	TCG	ACC	GCA	GAC	GGG	AAG	CGT	6262
G	G	E	L	E	R	E	I	P	G	F	S	T	A	D	G	K	R	2087
CGT	TTC	CTG	GAG	GAT	CCC	GAA	TGG	CAG	CCG	ACA	CGT	CGC	TAC	CTT	GAA	CGG	CTG	6316
R	F	L	E	D	P	E	W	Q	P	T	R	R	Y	L	E	R	L	2105
GGC	TCG	ATC	ACG	GAC	TGG	GCG	GAG	ACC	GTC	GTC	GCA	GCC	AAC	ATC	TGC	TTC	GAA	6370
G	S	I	T	D	W	A	E	T	V	V	A	A	N	I	C	F	E	2123
CCG	CTC	ATT	GGT	AAT	CTG	CTG	CGC	CGC	GAT	GTG	CTG	ATC	CGA	CTC	GCC	GGC	TCC	6424
P	L	I	G	N	L	L	R	R	D	V	L	I	R	L	A	G	S	2141
TAC	GGC	GAC	GCC	ACC	ACA	CCG	ACC	CTC	GGC	CAG	GTT	GCT	CAA	GCC	GAG	TGG	GGT	6478
Y	G	D	A	T	T	P	T	L	G	Q	V	A	Q	A	E	W	G	2159
TGG	GTG	CGT	GAC	TGG	TCC	GTG	GCC	CTC	GTT	CGC	TTT	ATC	CTG	AAT	GAC	GCT	ACT	6532
W	V	R	D	W	S	V	A	L	V	R	F	I	L	N	D	A	T	2177
CAT	TCC	GAG	GCC	AAC	ACC	CAG	AAG	GTC	CAG	GAG	TGG	CTG	GAG	GAC	TGG	GGA	ACG	6586
H	S	E	A	N	T	Q	K	V	Q	E	W	L	E	D	W	G	T	2195
ATG	GCT	CGC	GAG	GCG	ATC	GAT	GCG	CTG	GAG	CCC	GTC	TTC	AGC	TCG	ATC	GAC	CCC	6640
M	A	R	E	A	I	D	A	L	E	P	V	F	S	S	I	D	P	2213
GCC	TAC	TCT	GAG	ACC	CGT	CAG	CGT	CTC	AAC	CAA	GAT	CAT	GCC	GAC	CTG	CTT	CAG	6694
A	Y	S	E	T	R	Q	R	L	N	Q	D	H	A	D	L	L	Q	2231
GAA	TGC	GGC	CTC	AAG	TCG	AGC	GAG	GTG	ACG	GTC	TGA	TGA	CGG	ATG	CCA	CGG	CTG	6748
E	C	G	L	K	S	S	E	V	T	V	*	*	R	M	P	R	L	2249
CGC	CGG	CGG	CTG	CGC	AGG	GGA	GCG	GCG	ACG	TCG	CTT	ATG	ATT	ATG	TGG	GGC	TGG	6802
R	R	R	L	R	R	G	A	A	T	S	L	M	I	M	W	G	W	2267
TTA	TGC	AGC	GCA	CTC	CGG	AAG	GCG	AAG	CGG	TCG	GCC	GGG	TGT	GCT	CGC	AGA	CTC	6856
L	C	S	A	L	R	K	A	K	R	S	A	G	C	A	R	R	L	2285
CTG	GTG	TCG	AGG	TCA	TCA	CGA	ACA	CAA	CTT	TCC	TCG	ATG	TCA	GGG	CCA	AGG	ATC	6910
L	V	S	R	S	S	R	T	Q	L	S	S	M	S	G	P	R	I	2303
GGC	TGA	TCG	TCA	ACT	TCG	ACG	CGG	TCG	GCG	AAG	AAC	TCG	GCA	GCG	ACA	TGG	ACG	6964
G	*	S	S	T	S	T	R	S	A	K	N	S	A	A	T	W	T	2321
GTT	ACG	TTC	TTC	AGG	AAC	ACA	TGA	CCA	CTC	ACT	ATG	GCC	GGA	TGG	CAA	TGA	CCG	7018
V	T	F	F	R	N	T	*	P	L	T	M	A	G	W	Q	*	P	2339
ATG	ACT	CGT	TCA	TCC	TGG	TCG	CCG	ATC	CTC	TCG	AGC	TGA	TCG	AGC	TGA	TCA	ACT	7072
M	T	R	S	S	W	S	P	I	L	S	S	*	S	S	*	S	T	2357
CTG	AGT	CGT	AGG	AAG	GGA	TCA	TCA	AGG	TGA	TCT	CGC	CTC	TCG	GGT	GAG	TGA	CGC	7126
L	S	R	R	K	G	S	S	R	*	S	R	L	S	G	E	*	R	2375

																		rP2	
AGT	TTT	TCA	CTC	CTT	GAT	ATG	TGG	GGA	GCC	TCA	TTG	GGG	TGG	TGT	GTT	GCT	CCC	7180	
S	F	S	L	L	D	M	W	G	A	S	L	G	W	C	V	A	P	2393	
CTG	CAC	CAT	CCT	TGC	TCT	CGG	GCC	GGC	CGG	AGT	TCG	TGC	CGG	CCC	GAG	AGC	GGG	7234	
L	H	H	P	C	S	R	A	G	R	S	S	C	R	P	E	S	G	2411	
GCT	GTG	GTA	TTT	GGG	AGG	CTT	CGG	GGT	ATT	GGA	TTG	ATG	TTA	TCT	GTT	CCC	TAG	7288	
A	V	V	F	G	R	L	R	G	I	G	L	M	L	S	V	P	*	2429	
TGT	CCT	GAG	TCG	TTA	ATT	GTT	TTA	TTG	ATG	CGG	GTG	CAG	TAG	CGG	GCG	AGG	CTG	7342	
C	P	E	S	L	I	V	L	L	M	R	V	Q	*	R	A	R	L	2447	
GCG	AGG	ATC	TCA	TCC	GCG	GTT	TTG	GTC	CAC	ACG	AAG	GGC	TTC	GGG	TCG	TCG	TTC	7396	
A	R	I	S	S	A	V	L	V	H	T	K	G	F	G	S	S	F	2465	
CAC	GCG	GCG	ATC	CAG	GCA	TTG	ACG	TCG	TCC	TCG	AGA	GCC	TGG	ACG	CTG	CGG	TGC	7450	
H	A	A	I	Q	A	L	T	S	S	S	R	A	W	T	L	R	C	2483	
GAC	GAG	CGG	CGT	AGT	TTG	CGG	GTG	GTC	AAC	TCG	GCG	AAC	CAG	CGC	TCG	ACC	AGG	7504	
D	E	R	R	S	L	R	V	V	N	S	A	N	Q	R	S	T	R	2501	
TTG	AGC	CAA	CTA	CCC	GAG	GTA	GGG	GTG	AAG	TGC	AGG	TGG	AAT	CGC	GGG	TGA	CCG	7558	
L	S	Q	L	P	E	V	G	V	K	C	R	W	N	R	G	*	P	2519	
GCT	AAC	CAC	TTC	TTG	ATC	GCC	GGG	GTC	TTG	TGG	GTG	GCG	TAG	TTG	TCG	CAG	ATC	7612	
A	N	H	F	L	I	A	G	V	L	W	V	A	*	L	S	Q	I	2537	
AGG	TGC	AGG	TCC	AGC	TCG	GCC	GGG	GTG	TTG	GCG	TCG	ATG	GTC	TTG	AGG	AAC	CGC	7666	
R	C	R	S	S	S	A	G	V	L	A	S	M	V	L	R	N	R	2555	
AGG	AAC	TCC	TGG	TGC	CGG	TGG	CGT	CGC	TGG	TGC	TGG	CCG	ATG	ACC	TTG	CCG	GTG	7720	
R	N	S	W	C	R	W	R	R	W	C	W	P	M	T	L	P	V	2573	
GCG	ATA	TCC	AAC	GCC	GCG	AAC	AGG	CTC	GTG	GTG	CCG	TAT	CGG	ACG	TAG	TCG	TGC	7774	
A	I	S	N	A	A	N	R	L	V	V	P	Y	R	T	*	S	C	2591	
GTC	CGG	CGT	TCG	GGT	GTA	CCC	GGC	ATC	ATC	GGC	AAC	ATG	GGT	GCG	GTG	CGA	TCG	7828	
V	R	R	S	G	V	P	G	I	I	G	N	M	G	A	V	R	S	2609	
AGC	GCC	TGC	ATC	TGC	GAC	TTC	TCG	TCC	ACC	GCC	AGC	ACC	ATC	GCC	TTG	TCC	GGC	7882	
S	A	C	I	C	D	F	S	S	T	A	S	T	I	A	L	S	G	2627	
GGA	TCC	AGG	TAC	AGC	CCC	ACC	ACG	TCC	CGG	ACC	TTG	TCG	ATG	AAC	AGC	GGA	TCG	7936	
G	S	R	Y	S	P	T	T	S	R	T	L	S	M	N	S	G	S	2645	
GTC	GAC	AGC	TTC	CAT	GTG	TCC	ACC	AGG	TGC	GGC	TGC	AGG	CCG	AAT	GCC	CGC	CAG	7990	
V	D	S	F	H	V	S	T	R	C	G	C	R	P	N	A	R	Q	2663	
ATC	CGC	GAG	ATC	GCG	GTC	TGG	GAC	ATC	CCG	GTC	GCC	GCG	GCC	ATG	GAC	CGG	GTC	8044	
I	R	E	I	A	V	W	D	I	P	V	A	A	A	M	D	R	V	2681	
GAC	CAG	TGA	CTG	TCA	CCG	CCC	GCC	GGC	AGC	TCC	TCG	AGG	GTC	ATG	GTG	ATC	ACC	8098	
D	Q	*	L	S	P	P	A	G	S	S	S	R	V	M	V	I	T	2699	
CTC	TCG	ACC	TGG	GCG	TCG	CCG	ATC	TTC	CGC	GGC	GCG	CCC	GGC	CGG	GGC	TCG	TCA	8152	
L	S	T	W	A	S	P	I	F	R	G	A	P	G	R	G	S	S	2717	
CTG	AGC	CCG	TCG	AGC	CGA	TCT	TCC	ACA	AAT	CGC	TTG	CGC	CAC	TTG	CCC	ACA	GTG	8206	
L	S	P	S	S	R	S	S	T	N	R	L	R	H	L	P	T	V	2735	
GGC	AGC	GAC	ACC	TGC	AAC	TGT	CGC	GAG	ACC	TCA	CTG	TTG	GAC	AAG	CCC	TCT	GCA	8260	
G	S	D	T	C	N	C	R	E	T	S	L	L	D	K	P	S	A	2753	
CAC	GCC	AGC	ACG	ATC	CGC	GCC	CGC	ATC	GCC	AAC	GCC	TGA	GCG	GTC	TTA	CCG	CGT	8314	
H	A	S	T	I	R	A	R	I	A	N	A	*	A	V	L	P	R	2771	

Literatur

- [1] Warhurst, A. and C.-A. Fewson, *Biotransformations catalyzed by the genus Rhodococcus*. Crit Rev Biotechnol., 1994. **14**(1): p. 29-73.
- [2] Sokolovská, I., et al., *Carbon Source-Induced Modifications in the Mycolic Acid Content and Cell Wall Permeability of Rhodococcus erythropolis E1*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(12): p. 7019-7027
- [3] Hofrichter, M. and W. Fritsche, *Aerobic degradation by Microorganisms*. Biotechnology. H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler and J. Klein. Weinheim, Wiley-VCH. Environmental Process II. Soil Decontamination, 2000. **11b**(6): p. 147-167.
- [4] Reid, M.-F. and C.-A. Fewson, *Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases*. Crit Rev Microbiol., 1994. **20**(1): p. 13-56.
- [5] Danielsson, O., et al., *Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**(11): p. 4980-4984.
- [6] Korkhin, Y., et al., *NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of Clostridium beijerinckii and Thermoanaerobacter brockii*. J Mol Biol., 1998. **278**(5): p. 967-981.
- [7] Guy, J.-E., M.-N. Isupov, and J.-A. Littlechild, *The structure of an alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix*. J Mol Biol., 2003. **331**(5): p. 1041-1051.
- [8] Guy, J.-E., M.-N. Isupov, and J.-A. Littlechild, *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a novel alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix*. Acta Cryst., 2003. **D59**: p. 174-176.
- [9] Esposito, L., et al., *Crystal structure of the alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus at 1.85 Å resolution*. J Mol Biol, 2002. **318**: p. 463-477.
- [10] Eklund, H., et al., *Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution*. J. Mol. Biol., 1976. **102**: p. 27-59.
- [11] Fiorentino, G., et al., *Decreasing the stability and changing the substrate specificity of the Bacillus stearothermophilus alcohol dehydrogenase by single amino acid replacements*. Protein Engineering, 1998. **10**: p. 925-930.
- [12] Antoine, E., et al., *Cloning and over-expression in Escherichia coli of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from Thermococcus hydrothermalis. Characterization and comparison of the native and the recombinant enzymes*. Eur J Biochem., 1999. **264**(3): p. 880-889.

- [13] Cannio, R., et al., *Cloning and overexpression in Escherichia coli of the genes encoding NAD-dependent alcohol dehydrogenase from two Sulfolobus species*. J Bacteriol., 1996. **178**(1): p. 301-305.
- [14] Holt, P.-J., et al., *Cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of the primary alcohol dehydrogenase gene from Thermoanaerobacter ethanolicus JW200*. FEMS Microbiology Letters, 2000. **190**: p. 57-62.
- [15] Peretz, M., et al., *Molecular Cloning, Nucleotide sequencing, and Expression of Genes Encoding Alcohol Dehydrogenase from the Thermophile Thermoanaerobacter brokii and the Mesophile Clostridium beijerinckii*. Anaerobe, 1997. **3**: p. 259-270.
- [16] Tani, A., et al., *Thermostable NADP(+)-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from Acinetobacter sp. strain M-1: purification and characterization and gene expression in Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(12): p. 5231-5235.
- [17] Kreit, J. and A. Elalami, *Substrate characterization of a NAD-dependent secondary alcohol dehydrogenase from Rhodococcus sp. GK1 (CIP 105335)*. J Mol Catalysis B: Enzymatic, 2002. **19-20**: p. 253-259.
- [18] Ludwig, B., A. Akundi, and K. Kendall, *A long-Chain Secondary Alcohol dehydrogenase from Rhodococcus erythropolis ATCC 4277*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(10): p. 3729-3733.
- [19] Hummel, W., *Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments*. Trends Biotechnol., 1999. **17**(12): p. 487-492.
- [20] Radianingtyas, H. and P.-C. Wright, *Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria*. FEMS Microbiol Rev., 2003. **27**(5): p. 593-616.
- [21] Leonida, M.-D., *Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration*. Curr Med Chem., 2001. **8**(4): p. 345-369.
- [22] Schütte, H., et al., *Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from Candida boidinii*. Eur J Biochem., 1976. **62**(1): p. 151-160.
- [23] Galkin, A., et al., *Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with Escherichia coli cells expressing heterologous genes*. Appl Environ Microbiol., 1997. **63**(12): p. 4651-4656.
- [24] Kataoka, M., et al., *Escherichia coli transformant expressing the glucose dehydrogenase gene from Bacillus megaterium as a cofactor regenerator in a chiral alcohol production system*. Biosci Biotechnol Biochem., 1998. **62**(1): p. 167-169.
- [25] Nakamura, K. and T. Matsuda, *Asymmetric Reduction of Ketones by the Acetone Powder of Geotrichum candidum*. J Org Chem, 1998. **63**: p. 8957-8964.

- [26] Sandoval, C.-A., et al., *Mechanism of asymmetric hydrogenation of ketones catalyzed by BINAP/1,2-diamine-rutheniumII complexes*. J Am Chem Soc., 2003. **125**(44): p. 13490-13503.
- [27] Bradshaw, C.-W., J.-J. Lalonde, and C.-H. Wong, *Enzymatic synthesis of (R) and (S) 1-deuterohexanol*. Appl Biochem Biotechnol., 1992. **33**(1): p. 15-24.
- [28] Nakamura, K., et al., *Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts*. Tetraedron: Asymmetry, 2003. **14**(18): p. 2659-2681.
- [29] Keinan, E., S.-C. Sinha, and A. Sinha-Bagchi, *Thermostable enzymes in organic synthesis. 7. Total synthesis of the western corn rootworm sex pheromone 8-methyldec-2-yl propanoate using a TBADH-generated C2-bifunctional chiron*. J Org Chem, 1992. **57**: p. 3631-3636.
- [30] Bradshaw, C.-W., et al., *A Pseudomonas sp. alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity and unusual stereospecificity for organic synthesis*. J Org Chem, 1992. **57**(4): p. 1526-1532.
- [31] Bradshaw, C.-W., W. Hummel, and C.-H. Wong, *Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis*. J Org Chem, 1992. **57**(4): p. 1532-1536.
- [32] Itoh, N., et al., *Chiral alcohol production by NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase coupled with in situ regeneration of NADH*. Eur J Biochem., 2002. **269**(9): p. 2394-2402.
- [33] Kizaki, N., et al., *Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by Escherichia coli transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes*. Appl Biochem Biotechnol., 2001. **55**(5): p. 590-595.
- [34] Wada, M., et al., *Purification and characterization of an aldehyde reductase from Candida magnoliae*. J Mol Catalysis B: Enzymatic, 1999a. **6**: p. 333-339.
- [35] Kita, K., et al., *Cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, Sporobolomyces salmonicolor, and characterization of the gene and its product*. Appl. Envir. Microbiol., 1996. **62**(7): p. 2303-2310.
- [36] Yamamoto, H., A. Matsuyama, and Y. Kobayashi, *Synthesis of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate with recombinant Escherichia coli cells expressing (S)-specific secondary alcohol dehydrogenase*. Biosci Biotechnol Biochem., 2002. **66**(2): p. 481-483.
- [37] Hirohara, H. and M. Nishizawa, *Biochemical Synthesis of Several Chiral Insecticide Intermediates and Mechanisms of Action of Relevant Enzymes*. Biosci Biotechnol Biochem., 1998. **62**(1): p. 1-9.
- [38] Hummel, W., *New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds*. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 1997. **58**: p. 146-184.

- [39] Harayama, S., M. Kok, and E.L. Neidle, *Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases*. *Annu Rev Microbiol*, 1992. **46**: p. 565-601.
- [40] Palfey, B.A., et al., *Substrate recognition by "password" in p-hydroxybenzoate hydroxylase*. *Biochemistry*, 1999. **38**(4): p. 1153-8.
- [41] Galan, B., et al., *Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of Escherichia coli W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(3): p. 627-36.
- [42] Rosche, B., et al., *2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase: phylogenetic relationship to other multicomponent nonheme iron oxygenases*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(11): p. 3549-54.
- [43] Wallar, B.J. and J.D. Lipscomb, *Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters*. *Chem Rev*, 1996. **96**(7): p. 2625-2658.
- [44] Miles, C.S., et al., *Protein engineering of cytochromes P-450*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1543**(2): p. 383-407.
- [45] van Beilen, J.B., et al., *Practical issues in the application of oxygenases*. *Trends Biotechnol*, 2003. **21**(4): p. 170-7.
- [46] Panke, S., et al., *Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of Pseudomonas sp. strain VLB120*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(6): p. 2032-43.
- [47] Panke, S., et al., *Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continuous two-liquid-phase applications*. *Appl Environ Microbiol*, 1999. **65**(12): p. 5619-23.
- [48] Panke, S., et al., *Production of enantiopure styrene oxide by recombinant Escherichia coli synthesizing a two-component styrene monooxygenase*. *Biotechnol Bioeng*, 2000. **69**(1): p. 91-100.
- [49] Buhler, B., et al., *Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in Escherichia coli JM101*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(14): p. 10085-92.
- [50] Buhler, B., et al., *Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis*. *Appl Environ Microbiol*, 2002. **68**(2): p. 560-8.
- [51] Bernhardt, D. and H. Diekmann, *Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental Rhodococcus strain*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991. **36**(1): p. 120-3.
- [52] Spallek, R., *Charakterisierung der Tetrahydrofuran-Monooxygenase aus Rhodococcus ruber 219*. Dissertation Universität Hannover, 1998.

-
- [53] Thiemer, B., J.R. Andreesen, and T. Schraeder, *Cloning and characterization of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in Pseudonocardia sp. strain K1*. Arch Microbiol, 2003. **179**: p. 266-277.
- [54] Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [55] Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
- [56] Smith, G.L., S.S. Socransky, and C.M. Smith, *Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms*. Oral Microbiol Immunol, 1989. **4**(1): p. 47-51.
- [57] Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**: p. 557-580.
- [58] Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986. **51**: p. 263-273.
- [59] Abokitse, K. and W. Hummel, *Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from Rhodococcus erythropolis DSM 43297*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003. **62**(4): p. 380-386.
- [60] Siebert, P.D., et al., *An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(6): p. 1087-1088.
- [61] Ho, S.N., et al., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, 1989. **77**(1): p. 51-59.
- [62] Chang, A.C. and S.N. Cohen, *Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid*. J Bacteriol, 1978. **134**(3): p. 1141-56.
- [63] Hummel, W. and M.R. Kula, *Simple method for small scale disruption of bacteria and yeast*. J Microbial Methods, 1989. **9**: p. 201-209.
- [64] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- [65] Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
- [66] Blum, H., H. Berier, and H.J. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 1987. **8**: p. 93-99.

- [67] Becker, J.-S., et al., *Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry*. J Anal At Spectrom, 2004. **19**(1): p. 149-152.
- [68] Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 411-21.
- [69] Makrides, S.-C., *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*. Microbiol Rev., 1996. **60**(3): p. 512-538.
- [70] Carrea, G., et al., *Synthetic applications of NAD(P)(H)-dependent enzymes*. Ann N Y Acad Sci., 1996. **799**(642-649).
- [71] Burdette, D.-S., C. Vieille, and J.-G. Zeikus, *Cloning and expression of the gene encoding the Thermoanaerobacter ethanolicus 39E secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme*. Biochem J., 1996. **316**(1): p. 115-122.
- [72] Raia, C.-A., A. Giordano, and M. Rossi, *Alcohol dehydrogenase from Sulfolobus solfataricus*. Methods Enzymol., 2001. **331**: p. 176-195.
- [73] Boyd, D., et al., *Towards single-copy gene expression systems making gene cloning physiologically relevant: lambda InCh, a simple Escherichia coli plasmid-chromosome shuttle system*. J Bacteriol., 2000. **182**(3): p. 842-847.
- [74] Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 60-89.
- [75] Carrier, T., K.L. Jones, and J.D. Keasling, *mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system*. Biotechnol Bioeng, 1998. **59**(6): p. 666-72.
- [76] Kane, J.F., *Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(5): p. 494-500.
- [77] Chen, G.T. and M. Inouye, *Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in Escherichia coli*. Genes Dev, 1994. **8**(21): p. 2641-52.
- [78] Joernvall, H., B. Persson, and J. Jeffery, *Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases*. Eur. J. Biochem., 1987. **167**: p. 195-201.
- [79] Wang, J.C., et al., *Cloning, sequence analysis, and expression in Escherichia coli of the gene encoding phenylacetaldehyde reductase from styrene-assimilating Corynebacterium sp. strain ST-10*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **52**(3): p. 386-92.
- [80] Tamak, C., et al., *Thermostable NAD⁺-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase in tetrahydrofuran metabolism in Rhodococcus ruber strain 219*. gene accession number, AJ491307, 2002.

-
- [81] Bottoms, C.A., P.E. Smith, and J.J. Tanner, *A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains*. Protein Science, 2002. **11**: p. 2125-2137.
- [82] Wierenga, R.K. and W.J.G. Hol, *Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer associated variant*. Nature (Lond.), 1983. **302**: p. 842-844.
- [83] Auld, D.S., *Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites*. BioMetals, 2001. **14**: p. 271-313.
- [84] Hughes, J., Y.-C. Armitage, and K.-C. Symes, *Application of whole cell rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998. **74**(1-3): p. 107-118.
- [85] Oldfield, C., et al., *Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus Rhodococcus, and related taxa*. Antonie van Leeuwenhoek, 1998. **74**(1-3): p. 119-132.
- [86] Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler, *Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from Pseudomonas sp. strain CF600*. J Bacteriol, 1990. **172**(12): p. 6826-33.
- [87] Shine, J. and L. Dalgarno, *Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes*. Nature, 1975. **254**(5495): p. 34-8.
- [88] Park, D.W., et al., *Chloroplast-type Ferredoxin Involved in Reactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from Pseudomonas sp. S-47*. Biochemistry and Molecular Biology, 2002. **35**(4): p. 432-436.
- [89] Johnson, G.-R. and R.-H. Olsen, *Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from Pseudomonas sp. strain JS150*. Appl Environ Microbiol., 1995. **61**(9): p. 3336-3346.
- [90] Hino, S., K. Watanabe, and N. Takahashi, *Phenol hydroxylase cloned from Ralstonia eutropha strain E2 exhibits novel kinetic properties*. Microbiology, 1998. **144**: p. 1765-1772.
- [91] Takeo, M., et al., *Molecular cloning and sequencing of the phenol hydroxylase gene from Pseudomonas putida BH*. J. Ferment. Bioeng., 1995. **79**: p. 485-488.
- [92] Saeki, H. and K. Furuhashi, *Cloning and characterization of a Nocardia corallina B-276 gene cluster encoding alkene monooxygenase*. J. Ferment. Bioeng., 1994. **78**: p. 339-406.
- [93] Deuschle, U., et al., *Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures*. EMBO J, 1986. **5**(11): p. 2987-2994.
- [94] Mayer, M.-P., et al., *A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript*. Gene, 1995. **163**(1): p. 41-46.

- [95] McNulty, D.E., et al., *Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in Escherichia coli*. Protein Expr. Purif., 2003. **27**(2): p. 365-374.
- [96] Vallee, B.-L., J.-E. Coleman, and D.-S. Auld, *Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**(3): p. 999-1003.
- [97] Lipscomb, N.W. and N. Sträter, *Recent Advances in Zinc Enzymology*. Chem Rev, 1996. **96**: p. 2375 - 2434.
- [98] Ridderstrom, M. and B. Mannervik, *Optimized heterologous expression of the human zinc enzyme glyoxalase I*. Biochem J., 1996. **314**(2): p. 463-467.
- [99] Itoh, N., N. Mizuguchi, and M. Mabuchi, *Production of chiral alcohols by enantioselective reduction with NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase from Corynebacterium strain, ST-10*. Journal of Molecular Catalysis B:, 1999. Enzymatic **6**: p. 41-50.
- [100] Albalat, R., et al., *Involvement of the C-terminal tail in the activity of Drosophila alcohol dehydrogenase, Evaluation of truncated proteins constructed by site-directed mutagenesis*. Eur. J. Biochem., 1995. **233**: p. 498-505.
- [101] Suzuki, K., et al., *Overexpression of salicylate hydroxylase and the crucial role of lys(163) as its NADH binding site*. J Biochem (Tokyo)., 2000. **128**(2): p. 293-299.
- [102] Dym, O. and D. Eisenberg, *Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins*. Protein Sci., 2001. **10**(9): p. 1712-1728.
- [103] Smilda, T., P. Reinders, and J.-J. Beintema, *Modeling studies of conformational changes in the substrate-binding loop in Drosophila alcohol dehydrogenase*. Biochem Genet, 1998. **36**(1-2): p. 37-49.
- [104] Jörnvall, H., J.-O. Höög, and B. Persson, *SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature, Pages 261-264*. FEBS Letters, 1999. **445**(2-3): p. 261-264.
- [105] Kleifeld, O., et al., *Active site electronic structure and dynamics during metalloenzyme catalysis*. Nat Struct Biol., 2003. **10**(2): p. 75-77.
- [106] Penner-Hahn, J.-E., *Snapshots of transition states? nature structural biology*, 2003. **10**(2): p. 75-77.
- [107] Riveros-Rosas, H., et al., *Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily*. Eur. J. Biochem., 2003. **270**: p. 3309-3334.
- [108] Jörnvall, H., et al., *Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family*. Adv Exp Med Biol., 1993. **328**: p. 533-544.
- [109] Nordling, E., H. Jörnvall, and B. Persson, *Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR)*

- Family characterizations including genome comparisons and active site modelling.* Eur J Biochem., 2002. **269**: p. 4267-4276.
- [110] Baker, M.-E., *Evolution of Mammalian 11- and 17-Hydroxysteroid Dehydrogenases-type 2 and Retinol Dehydrogenases from Ancestors in Caenorhabditis elegans and Evidence for Horizontal Transfer of a Eukaryote Dehydrogenase to E. coli.* J Steroid Biochem Molec Biol, 1998. **66**(5-6): p. 355-363.
- [111] Watanabe, K., K. Kitamura, and Y. Suzuki, *Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from Bacillus coagulans ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues.* Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(6): p. 2066-73.
- [112] Vieille, C. and J.-G. Zeikus, *Thermozymes: identifying molecular determinants of proteins structural and functional stability.* TIBTECH, 1996. **14**: p. 183-190.
- [113] Stafford, D.-E., K.-S. Yanagimachi, and G. Stephanopoulos, *Metabolic engineering of indene bioconversion in Rhodococcus sp.* Adv Biochem Eng Biotechnol., 2001. **73**: p. 85-101.
- [114] Beard, T.-M. and M.-I. Page, *Enantioselective biotransformations using rhodococci.* Antonie Van Leeuwenhoek, 1998. **74**: p. 99-106.
- [115] O'Connor, M., et al., *Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**(16): p. 8973-8978.
- [116] Suske, W.-A., et al., *Purification and characterization of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a novel NADH-dependent, FAD-containing aromatic hydroxylase from Pseudomonas azelaica HBPI.* J Biol Chem., 1997. **272**(39): p. 24257-24265.
- [117] Divari, S., et al., *The oxygenase component of phenol hydroxylase from Acinetobacter radioresistens S13.* Eur J Biochem., 2003. **270**(10): p. 2244-2253.
- [118] Barbieri, P., et al., *Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in Pseudomonas stutzeri OX1.* Antonie van Leeuwenhoek, 2001. **79**: p. 135-140.
- [119] Arber, W., *Involvement of gene products in bacterial evolution.* Ann N Y Acad Sci., 1999. **870**: p. 36-44.
- [120] van der Meer, J.R., et al., *Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.* Microbiol Rev, 1992. **56**(4): p. 677-94.
- [121] Poelarends, G.-J., et al., *Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1,3-dichloropropene- and 1,2-dibromoethane-degradative pathways.* J Bacteriol., 2000. **182**(8): p. 2191-2199.
- [122] Davison, J., *Genetic exchange between bacteria in the environment.* Plasmid, 1999. **42**(2): p. 73-91.

- [123] Mishra, V., R. Lal, and Srinivasan., *Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria*. Crit Rev Microbiol., 2001. **27**(2): p. 133-166.
- [124] Lawrence, J.-G. and H. Ochman, *Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange*. J Mol Evol., 1997. **44**(4): p. 383-387.
- [125] Daubin, V., E. Lerat, and G. Perriere, *The source of laterally transferred genes in bacterial genomes*. Genome Biol., 2003. **4**(9): p. R57.
- [126] Meinhardt, F., R. Schaffrath, and M. Larsen, *Microbial linear plasmids*. Appl Microbiol Biotechnol., 1997. **47**(4): p. 329-336.
- [127] Bertoni, G., et al., *Analysis of the gene cluster encoding toluene/o-xylene monooxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 3626-32.
- [128] Tan, H.M., *Bacterial catabolic transposons*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **51**(1): p. 1-12.

Danksagung

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

Insbesondere Herrn Prof Dr. Werner Hummel für die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft, die immer freundliche Unterstützung und für die insgesamt ausgezeichnete Betreuung;

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Übernahme des Korreferats und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie;

Frau Dr. Birgit Geueke, Frau Dipl.-Chem. Andrea Weckbecker und Herrn Dipl.-Biol. Mutlu Kuzu für die schöne Zeit im gemeinsamen Büro sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit bei allen wissenschaftlichen Fragen;

Herrn Dr. Harald Gröger, Fa. Degussa AG, für sein Interesse an dieser Arbeit und zahlreiche wertvolle Diskussionsbeiträge und der Fa. Degussa für die Unterstützung dieser Arbeit;

Frau Dipl.-Biol. Anne Lammerding und Herr Alaoui M' Hammedi Abdelmalek für die gute kollegiale Zusammenarbeit;

Frau Vera Ophoven und Frau Bea Paschold für technische Hilfestellungen und die freundliche Atmosphäre;

Meiner Frau Valerie Akouto;

allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie, die mir mit fachlichen Ratschlägen zur Seite standen.

