

**Molekulargenetische, biochemische, strukturelle und mechanistische
Charakterisierung mikrobieller Oxidasen**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Mutlu Kuzu
aus Balıkesir

Jülich, 2005

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

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2003 bis November 2005 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Hummel durchgeführt.

Die Deutsche Bundesstiftung für Umwelt (DBU) unterstützte diese Arbeit als Projekt „Entwicklung von Expressionssystemen für bakterielle Oxidasen und einer Analysetechnologie für die Optimierung industrieller, oxidativer enzymatischer Prozesse“ im Rahmen der „ICBio-Initiative“.

Teile dieser Arbeit wurde veröffentlicht:

- [1] W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2003) "An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-*tert*-leucine." *Org. Lett.* 5 (20): 3649-50.
- [1] W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke (2004) "Oxidative resolution of racemic mixtures by the coupled use of dehydrogenases and NADH oxidase." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- [1] M. Kuzu, W. Hummel (2004) "Preparation of D-amino acids by enantioselective oxidation catalyzed by recombinant *Escherichia coli* cells expressing L-leucine dehydrogenase and NADH oxidase." *ChemBioChem* (submitted).
- [4] M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*." *Acta Crystallographica Section F* 61: 528-30.
- [5] M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Influence of the expression conditions on the formation of apo- and holoenzyme from *Lactobacillus brevis* NADH oxidase." *Biochimica et Biophysica Acta* (submitted).
- [6] Z. Findrik, D. Vasić-Rački, M. Kuzu, W. Hummel (2005) "Application of a new D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*" *Engineering in Life Sciences* (in press).
- [7] M. Kuzu, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg (2005) "Structure of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* refined at 2.7 Å Resolution." *Biochemistry* (submitted).

Patentanmeldung:

Hummel W, Kuzu M, Geueke B, Gröger H (2003) Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren (Internationale Patentanmeldung Nr. PCT/EP2004/009000).

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Enzyme in der Biotechnologie	1
2	Enzymatische Wege zur Darstellung von chiralen Feinchemikalien.....	1
2.1	Am Beispiel von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Alkoholen	1
2.2	Am Beispiel von D-Aminosäuren	2
3	NADH-Oxidasen (NOX) und NADH-Peroxidasen (NPOX)	4
3.1	Vorkommen der NOXs und NPOXs	4
3.2	Biotechnologische Anwendung der NOXs	5
3.3	Klonierung und Expression der NOX und NPOXs	5
4	L- und D-Aminosäureoxidasen (L-AAO und D-AAO).....	6
4.1	Vorkommen der AAOs	7
4.2	Biotechnologische Anwendung der AAOs	7
4.3	Klonierung und Expression der AAOs.....	8
4.4	Kristallisation und Strukturaufklärung von bekannten Oxidasen	9
5	Aufgabenstellung und Zielsetzung	11
II	Material und Methoden.....	13
1	Material	13
1.1	Materialien, Geräte und EDV-Systeme	13
1.2	Chemikalien	15
1.3	Enzyme	15
1.4	Vektoren	16
1.5	Mikroorganismen	16
2	Methoden	17
2.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	17
2.2	Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung.....	18
2.3	Reinigung der NOX und SeMetNOX.....	18
2.4	Reinigung der ApDAAO	19
2.5	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	20
2.6	Enzymimmobilisierung	20
2.7	Proteinanalytik	20
2.8	Elektrophoretische Methoden und Proteinfärbungen	23
2.9	Molekularbiologische Methoden	24
2.10	Kristallisation der NOX und SeMetNOX.....	26
2.11	Röntgendiffraktometrie.....	27
2.12	Reduktion der Rohdaten	28
2.13	Strukturlösung durch molekularen Ersatz	28
2.14	Modellbau und Verfeinerung.....	28
2.15	Computergrafik	29

2.16 Validierung der Modelle	29
2.17 Proteinmodellierung	29
2.18 Präparation von D- und L-Aminosäuren und chiralen Alkoholen	30
III Ergebnisse	33
1 NADH-Oxidase aus <i>Lactobacillus brevis</i> (NOX)	33
1.1 Heterologe Expression der NOX und SeMetNOX	33
1.2 Reinigung der NOX und SeMetNOX	40
1.3 Biochemische Charakterisierung der NOX und SeMetNOX	41
1.4 Proteinchemische Charakterisierung der NOX und SeMetNOX	48
1.5 Klassifizierung und Alignment der NOX	54
1.6 Kristallisation der NOX und SeMetNOX	55
1.7 Reduzierte und oxidierte Zustände der NOX	58
1.8 Röntgendiffraktometrie	59
1.9 Test auf merohedrische Verzwillingung	60
1.10 Untersuchungen der Kristallpackung	61
1.11 Rechnungen zum molekularen Ersatz	61
1.12 Verfeinerung und Qualität der Struktur	69
1.13 3D-Struktur der NOX	72
1.14 Biotechnologische Bedeutung der NOX	77
2 D-Aminosäureoxidase aus <i>Trigonopsis variabilis</i> (TvDAAO)	91
2.1 Heterologe Expression der TvDAAO	92
2.2 Präparation von ungewöhnlichen L-Aminosäuren durch die TvDAAO	96
3 D-AAO aus <i>Arthrobacter protophormiae</i> (ApDAAO)	98
3.1 Heterologe Expression der ApDAAO	98
3.2 Aufreinigung der ApDAAO	101
3.3 Biochemische Charakterisierung der ApDAAO	102
3.4 Proteinchemische Charakterisierung der ApDAAO	107
3.5 Klassifizierung und Alignment der ApDAAO	110
3.6 Strukturmodell der ApDAAO	111
3.7 Präparation ungewöhnlicher L-Aminosäuren durch die ApDAAO	113
4 L-Aminosäureoxidase aus <i>Rhodococcus opacus</i> (RoLAAO)	115
4.1 Heterologe Expression der RoLAAO	116
4.2 Präparation von D-Aminosäuren durch die RoLAAO	121
IV Diskussion	123
1 Heterologe Expression der NOX und SeMetNOX	124
2 Reinigung und biochemische Charakterisierung der NOX und SeMetNOX	125
3 Sequenzauswertung und Strukturlösung der NOX	127
4 Biotechnologischer Einsatz der NOX	133
4.1 Kopplung von Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) und NOX	134
4.2 Kopplung von Aminosäure-Dehydrogenasen (AADHs) und NOX	135

4.3	Ganzzellbiotransformation	137
5	Heterologe Expression der TvDAAO und ApDAAO	137
6	Reinigung und biochemische Charaktisierung der ApDAAO	138
7	Strukturaufklärung der ApDAAO	140
8	Biotechnologischer Einsatz der TvDAAO und ApDAAO.....	140
9	Heterologe Expression der RoLAAO	142
10	Biotechnologischer Einsatz der RoLAAO	145
V	Zusammenfassung	147
VI	Literaturverzeichnis.....	149
VII	Anhang.....	163
1	Reinigungsschmatogramme	163
2	Hochzelldichte-Fermentation.....	164
2.1	Fermentationsverlauf der rekombinanten ApDAAO	164
2.2	Fermentationsverlauf der rekombinanten RoLAAO	165
3	Primer.....	165
3.1	Klonierungunsprimer	165

Abkürzungen

AADH	Aminosäure-Dehydrogenase
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
amp	Ampicillin
ApDAAO	D-Aminosäureoxidase aus <i>Arthrobacter protophormiae</i>
au	Asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls oder atomic units in der Massenspektrometrie
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
D-AAO	D-Aminosäureoxidase
D-AspAO	D-Aspartatoxidase
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI	Electrosprayionisation
F_c, F_{calc}	berechnete Strukturfaktoramplitude
F_o, F_{obs}	gemessene Strukturfaktoramplitude
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
FMN	Flavin-Mononucleotid
GC	Gaschromatographie
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMET	Institut für molekulare Enzymtechnologie
IPTG	β -D-Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Kpi	Kaliumphosphat
L-AAO	L-Aminosäureoxidase
LB	Luria-Bertani
LeuDH	Leucin-Dehydrogenase
MAD	multiple anomale Dispersion
MALDI	matrix assisted laser desorption and ionization
MCS	multiple cloning site
MES	2-(N-morpholino)ethan sulfonic acid
MIR	isomorpher Ersatz (multiple isomorphous replacement)
MIRAS	multipler isomorpher Ersatz unter Verwendung des anomalen Signals

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MR	molekularer Ersatz (molecular replacement)
MS	Massenspektrum
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert)
NOX	NADH Oxidase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
NPOX	NADH Peroxidase
OD	optische Dichte
OPA	o-Phtaldialdehyd
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEGMME	Polyethylenglykolmonomethylether
POX	Peroxidase
<i>rac</i>	racemisch
rep	repetitive
rpm	Umdrehung pro Minute
R _{free}	freier R-Wert
R _{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
R _{sym}	linearer R-Wert
Rha	Rhamnose
RoLAAO	L-Aminosäureoxidase aus <i>Rhodococcus opacus</i>
RT	Raumtemperatur
SAD	einfache anomale Dispersion (single anomalous dispersion)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeMet	Selenomethionin
SIR	einfacher isomorpher Ersatz (single isomorphous replacement)
SIRAS	einfacher isomorpher Ersatz unter Verwendung des anomalen Signals
TAT	twin-arginine translocation
TB	Terific Both
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TvDAAO	D-Aminosäureoxidase aus <i>Trigonopsis variabilis</i>
TOF	time of flight
US-Spitze	Ultraschall-Spitze
UV	Ultraviolett
ZFM	Zellfeuchtmasse

I Einleitung

1 Enzyme in der Biotechnologie

Enzyme sind Biokatalysatoren, die für sämtliche Stoffwechselwege in allen Lebewesen verantwortlich sind. Sie sind überwiegend Proteine. Durch Absenkung der Aktivierungsenergie der biochemischen Reaktionen beschleunigen sie deren Geschwindigkeit um den Faktor 10^7 bis 10^{14} und müssen – da sie durch die Reaktion nicht verändert werden – nur in geringen Konzentrationen der Reaktion zugegeben werden. Im Gegensatz zur chemischen Katalyse besteht bei der enzymatischen Katalyse eine hohe Spezifität bezüglich der Reaktion und der Substrate. Meist laufen die Reaktionen mit nahezu vollständiger Regio- und Stereospezifität ab; das ist eine wesentliche Voraussetzung zur Steuerung komplexer Vorgänge in der Zelle.

Enzyme beschleunigen in der Regel unter milden Reaktionsbedingungen im Gegensatz zu vielen chemisch katalysierten Reaktionen. Dies vermindert den Energieeinsatz und reduziert unerwünschte Nebenreaktionen, wodurch die Umweltverträglichkeit dieser Prozesse gesteigert wird.

Die Tatsache, dass viele enzymatische Reaktionen enantioselektiv ablaufen, macht Enzyme für die organische Chemie interessant. Die weltweite Jahresproduktion von enantiomerenreinen Aminosäuren betrug zum Beispiel 0,5 Millionen Tonnen, das entspricht einem Umsatz von 2 Millionen Dollar [2].

Die Nutzung von Enzymen in der Synthese von Pharmazeutika, Feinchemikalien und Lebensmittelzusätzen gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung im Vergleich zu den traditionellen Anwendungsgebieten der Enzyme in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie. Beschleunigt wurde diese Entwicklung durch den Fortschritt in der Biochemie und Molekularbiologie zur Entwicklung von neuen Technologien in der enzymatischen Synthese.

Der Einsatz dieser Verfahren ermöglicht die rekombinante Herstellung vieler Enzyme und senkt somit die Produktionskosten drastisch.

Das Potenzial der Biokatalysatoren ist noch längst nicht ausgeschöpft. Von mehr als 3500 bekannten Enzymen sind nur ca. 10 % kommerziell erhältlich [3].

2 Enzymatische Wege zur Darstellung von chiralen Feinchemikalien

2.1 Am Beispiel von (R)- und (S)-Alkoholen

Aufgrund der großen Relevanz enantiomerenreiner Verbindungen insbesondere im pharmazeutischen Bereich aber auch in der Agrochemie, im Bereich von Geschmacks- und Riechstoffen, Pheromonen etc., werden enantiomerenreine Bausteine in immer größerem Ausmaß auf enzymatischem Wege präpariert. Ein größerer Teil dieser Produkte enthält chirale Alkoholfunktionen, so dass das Interesse insbesondere an Alkohol-Dehydrogenasen in den letzten Jahren stark angestiegen ist.

Durch die Vielfalt an verfügbaren Biokatalysatoren und deren Kombinationsmöglichkeiten sind bisher schon unterschiedlichste Methoden zur enzymatischen Produktion von (R)- und (S)-Alkoholen entwickelt worden.

Im Folgenden sind einige Beispiele zur enzymatischen Synthese von (R)- oder (S)-Alkoholen aufgeführt.

- Mit Hilfe der Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, einer Lyase, wird (*R*)-Phenylacetylcarbinol, eine wichtige Zwischenstufe bei der Synthese von L-Ephedrin, enantioselektiv hergestellt [4].
- Eine NADH-abhängige Reductase, die Phenylacetaldehyd Reduktase (PAR), wurde aus *Corynebacterium* ST-10 nach Anreicherung auf Styren isoliert und für die Produktion von chiralen Alkoholen verwendet. Die erzielten Enantiomerenüberschüsse liegen bei 87 - 100 % [5].
- Akinobu et al. konnten (*R*)-1,3-Butandiol durch enzymatische Racemat-trennung mit (*S*)-1,3-Butandiol-Dehydrogenase aus *Candida parapsilosis* im industriellen Maßstab präparieren [6].
- Enantiomerenreine sekundäre Aryl-Alkohole, wie Indanol wurden nach Faller und Lavoie durch enzymatische Racematspaltung mit ee-Werte bis zu 99 % synthetisiert [7].
- *Nocardia salmonicolor* katalysiert die enantioselektive Reduktion eines Ketons zum korrespondierenden Alkohol, welcher das Schlüsselintermediat in der Synthese des Calciumkanalblockers SQ31765 darstellt [8]. Durch die Reduktion mit *N. salmonicolor* entstand lediglich eins von vier Stereoisomeren mit 96 % Ausbeute und > 99,9 % ee.

Das bekannteste Enzym, welches die enantioselektive Reduktion von Ketonen katalysiert, ist die thermostabile Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Thermoanaerobicum brockii*. Während kurzkettige Ketone zu den (*R*)-Enantiomeren reduziert werden, katalysiert das Enzym die Umsetzung von höheren Ketonen zu den (*S*)-Alkoholen [9]. Das Enzym wird bei zahlreichen Synthesen von biologisch aktiven Verbindungen eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist die Darstellung des β_2 -Agonisten Broxaterol. Der Schlüsselschritt der Synthese ist die Reduktion des Isoxazols zum korrespondierenden (*R*)-Alkohol durch ADH mit ee > 98 % [10].

2.2 Am Beispiel von D-Aminosäuren

Aminosäuren sind wichtige Grundstoffe in der chemischen Industrie und bei der Lebens- und Futtermittelherstellung. Die chemische Synthese optisch reiner Aminosäuren ist nur begrenzt möglich. Viele der proteinogenen L-Aminosäuren werden nach Optimierung der mikrobiellen Produktionsstämme und der Anzuchtbedingungen fermentativ hergestellt [11, 12]. D-Aminosäuren lassen sich nicht auf diese Weise produzieren.

Das Interesse an D-Aminosäuren ist jedoch hoch, da sie als Bausteine für halbsynthetische Antibiotika, Pestizide und Peptidhormone verwendet werden. D-Phenylglycin wird beispielsweise als Seitenkette in den β -Lactamantibiotika Ampicillin und Amoxycillin eingebaut, D-Valin ist Bestandteil des Insektizids Fluvalinate [13].

Aufgrund der oft hohen Anforderungen bezüglich der Enantiomerenreinheit sind enzymatische Prozesse zur Darstellung von D-Aminosäuren besonders geeignet. Durch die Vielfalt an verfügbaren Biokatalysatoren und deren Kombinationsmöglichkeiten sind bisher schon unterschiedlichste Methoden zur enzymatischen Produktion von D-Aminosäuren entwickelt worden.

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

- Zur Racematspaltung von DL-Aminosäuren wurden verschiedene *Proteus*-Arten eingesetzt, sie lieferten als Produkt enantiomerenreine D-Aminosäure [14, 15]. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym ist eine membranständige L-Aminosäure-desaminase.
- Galkin et al. klonierten die Gene der D-Alanin-Dehydrogenase, der D-Aminosäure-transferase, der Alaninracemase und der Formiat-Dehydrogenase in einen *E. coli*-Stamm [16]. Ausgehend von der Ketosäure konnten mit diesen Zellen dann die entsprechenden D-Aminosäuren enantiomerenrein hergestellt werden.
- Zur Präparation von *tert*-Leucin sind Methoden der Racematspaltung oder der enantioselektiven Synthese berichtet worden [17, 18, 19, 20]. Eine Synthese von L-*tert*-Leucin im industriellen Maßstab, entwickelt durch die Degussa AG [21], basiert auf der NADH-abhängigen reduktiven Aminierung der entsprechenden Ketosäure, die durch die Leucin-Dehydrogenase [21] katalysiert wurde. Um eine komplette Umsetzung zu erreichen, muss das Enzym (Dehydrogenase) mit einem leistungsfähigen NADH-Regenerationsschritt gekoppelt werden, der durch das Formiat/Formiat-Dehydrogenasesystem gegeben ist [22, 23].
- D-Aminoacylasen katalysieren die stereospezifische Deacylierung von N-Acetyl-D-Aminosäuren [24, 25]. In Kombination mit N-Acylaminosäureracemasen [26] lassen sich N-Acetyl-DL-Aminosäuren vollständig in die gewünschte D-Aminosäure umsetzen.
- Zur Präparation von L- und D-Aminosäuren aus dem Racematgemisch mit L- und D-Aminosäureoxidasen gibt es zwei Beispiele. Die L-Aminosäureoxidase aus *Rhodococcus opacus* ist hoch enantioselektiv und oxidiert ausschließlich L-Aminosäuren zu α -Ketosäuren unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Ammoniak [27]. Die D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* und *Rhodotorula gracilis* oxidieren nur D-Aminosäuren zu α -Ketosäuren [28, 29]. Durch Oxidation der L- oder D-Aminosäuren können enantiomerenreine Aminosäuren aus dem Racematgemisch hergestellt werden.

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

3 NADH-Oxidasen (NOX) und NADH-Peroxidasen (NPOX)

NADH-Oxidasen können in zwei Gruppen von NADH-abhängigen Oxidasen unterteilt werden; in die H₂O₂-bildenden und die H₂O-bildenden NADH-Oxidasen.

Die H₂O₂-bildenden NADH-Oxidasen katalysieren die Oxidation von NADH zu NAD⁺ und das Nebenprodukt dieses Enzyms ist Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das durch Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) entsteht (Abb. 1 (Reaktion 1)).

Die H₂O-bildenden NADH-Oxidasen oxidieren NADH zu NAD⁺ wie die H₂O₂-bildenden NADH-Oxidasen (Abb. 1 (Reaktion 2)). Im Unterschied zur Reaktion der H₂O₂-bildenden NADH-Oxidasen entsteht hier als reduziertes Nebenprodukt H₂O [30].

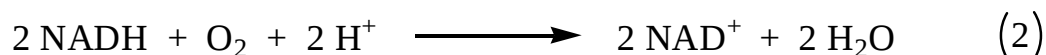
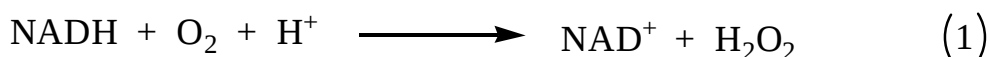


Abb. 1: Reaktionsschema der H₂O₂-bildenden (1) und H₂O-bildenden (2) NADH-Oxidase.

Die NADH-Peroxidasen sind wie die NADH-Oxidasen NADH-abhängig und katalysieren die Oxidation von NADH zu NAD⁺, wobei das Nebenprodukt dieses Enzyms wie bei den H₂O-bildenden NADH-Oxidasen Wasser (H₂O) ist (Abb. 2). Im Unterschied zur Reaktion der H₂O-bildenden NADH-Oxidasen entsteht das gebildete H₂O durch Reduktion von H₂O₂, nicht von O₂.



Abb. 2: Reaktionsschema der H₂O-bildenden NADH-Peroxidase.

NADH-Oxidasen und NADH-Peroxidasen enthalten einen zweiten Cofaktor, vermutlich kovalent oder fest gebundenes FAD [31, 32] und gehören somit zu den FAD-abhängigen Pyridin-Nukleotid-Reduktasen (FADPNR) [33].

3.1 Vorkommen der NOXs und NPOXs

Die ersten NADH-Oxidasen, die beschrieben wurden, waren H₂O₂-bildende NADH-Oxidasen und die Zahl beschriebener Enzyme dieser Gruppe ist größer als die der H₂O-bildenden NADH-Oxidasen. Die H₂O₂-bildenden NADH-Oxidasen kommen in Bakterienstämmen wie *Thermus thermophilus* [34], *Lactococcus lactis* [35], *Amphibacillus xylanus* [36, 37, 38], *Sporolactobacillus inulinus* [30] und *Lactobacillus delbrueckii* [39] vor.

In den letzten Jahren wurden verstärkt H₂O-bildende NADH-Oxidasen isoliert. Bisher wurden H₂O-bildende NADH-Oxidasen aus verschiedenen Organismen wie *Serpulina hyodysenteriae* [40], *Leuconostoc mesenteroides* [41, 30, 42], *Streptococcus faecalis* [43, 44], *Lactobacillus brevis* [45, 33], *Borrelia burgdorferi* und *Lactobacillus sanfranciscensis* [31] beschrieben.

Darüber hinaus wurde auch über NADH-Oxidasen in Bakterien berichtet, die sowohl über H_2O_2 - als auch über H_2O -bildende NADH-Oxidasen zugleich verfügen. In der Literatur werden Bakterienstämme wie *Streptococcus pneumoniae* [46], *Streptococcus mutans* JC2 [47, 48] und *Pyrococcus furiosus* [49] beschrieben.

NADH-Peroxidasen sind in der Natur weit verbreitet. Die meisten NPOXs wurden aus Streptokokken beschrieben, wie z.B. aus *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* [50]. Dieses Enzym stellt zugleich den am besten untersuchten Vertreter der NPOX dar. Außerdem wurden NPOXs aus *Desulfovibrio vulgaris* [51], *Treponema hyodysenteriae* [52] und Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis* nachgewiesen [53].

3.2 Biotechnologische Anwendung der NOXs

Die H_2O_2 -bildenden NADH-Oxidasen fanden bisher keine Anwendung zur Regeneration von NAD^+ , wahrscheinlich weil bei der Oxidation von NADH zu NAD^+ als reduziertes Nebenprodukt H_2O_2 entsteht, das für die Zelle und auch für isolierte Enzyme toxisch ist. Trotzdem wird in der Literatur ausführlich auf die Isolierung, Überexpression und Charakterisierung der H_2O_2 -bildenden NADH-Oxidasen eingegangen.

Die H_2O -bildenden NADH-Oxidasen wurden in wenigen Fällen zur Regeneration von NAD^+ angewendet. Durch Klonierung und Überexpression des *nox-2* aus *Streptococcus mutans* (H_2O -bildende NOX) in *Lactococcus lactis* konnte die NADH-Oxidase als Regenerierungsmittel für NAD^+ zur Produktion von Diacetyl oder Acetoin aus Glucose genutzt werden [54, 55, 56]. Außerdem konnte durch Kopplung der NADH-Oxidase aus *Leuconostoc mesenteroides* (H_2O -Bildner) mit der 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase eine stereospezifische Steroid-Oxidation erreicht werden [42]. Beide Anwendungen wurden nicht in einen größeren Produktionsmaßstab gebracht.

Kürzlich konnte eine H_2O -bildende NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* als neuer Katalysator zur Regeneration von NAD^+ eingesetzt werden, so dass enantiomerenreine Alkohole durch Kopplung mit einer (*R*)-spezifischen Alkohol-Dehydrogenase hergestellt werden konnten [31]. Die Reaktion kann durch die NADH-Oxidase als irreversibel betrachtet werden, so dass die Antriebskraft einer gekoppelten Methode unabhängig vom Gleichgewicht der Oxidationsreaktion ist.

In der Darstellung von D-Aminosäuren hingegen fanden bisher NADH-Oxidasen zur NAD^+ -Regeneration keine Anwendung.

3.3 Klonierung und Expression der NOX und NPOXs

Die Sequenzen vieler NOXs sind bekannt und die heterologe Expression wurde in den letzten Jahren für die Enzyme aus *Thermus thermophilus* [34], *Amphibacillus xylanus* [36, 37], *Streptococcus mutans* [48, 57], *Pyrococcus furiosus* [49], *Streptococcus pneumoniae* [46], *Lactobacillus brevis* [33], *Streptococcus faecalis* [44], *Borrelia burgdorferi* und *Lactobacillus sanfranciscensis* [31] durchgeführt. Auf diesem Wege wurde die Produktion der NADH-Oxidasen deutlich vereinfacht. Durch die Expression der *Amphibacillus xylanus* NOX in *E. coli* kann aus einem Liter Zellkultur 150-mal mehr homogenes Enzym isoliert werden als im Wildtyp [36]. Modifikationen, wie das Einfügen eines His-Tags, wurden erfolgreich für die *Streptococcus*

pneumoniae durchgeführt und erlauben eine einstufige Reinigung mit sehr guten Ausbeuten [46].

Außerdem wurde untersucht, welche NADH-Oxidasen durch Zugabe von FAD zusätzlich aktiviert werden können. Die H_2O -bildende NOX aus *Leuconostoc mesenteroides* wird durch Zugabe von FAD nicht aktiviert [41], wohingegen die H_2O_2 -bildende NOX aus *Thermus thermophilus* durch Zugabe von FAD aktiviert werden kann [34].

In den Datenbanken sind viele Sequenzen von NPOXs abgelegt, doch bisher wurde nur die heterologe Expression einer NPOX aus *Enterococcus faecalis* beschrieben.

4 L- und D-Aminosäureoxidasen (L-AAO und D-AAO)

L-AAOs (EC 1.4.3.2) katalysieren die oxidative Desaminierung von L-Aminosäuren zu Ketosäuren unter Freisetzung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid (Abb. 3). Sowohl der erste Reaktionsschritt, die Oxidation der L-Aminosäure zur Iminosäure, als auch die Hydrolyse der Imino- zur Ketosäure werden durch die L-AAO katalysiert [58]. Der Cofaktor FAD wird durch molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid regeneriert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt vollständig auf der Seite der Ketosäure.

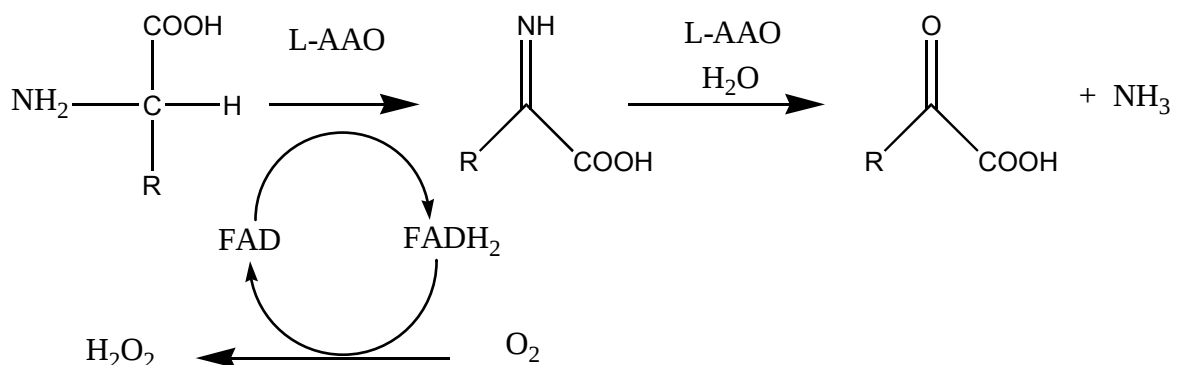


Abb. 3: Reaktionsschema der L-AAO.

Die D-AAOs (EC 1.4.3.3) oxidieren D-Aminosäuren enantioselektiv zu den entsprechenden Iminosäuren (Abb. 4). Im Unterschied zur Reaktion der L-AAO läuft die Hydrolyse der Iminosäure zur Ketosäure und zu Ammoniak spontan ab [58]. Die Regeneration der Cofaktors FAD erfolgt wie bei den L-AAOs durch molekularen Sauerstoff unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid.

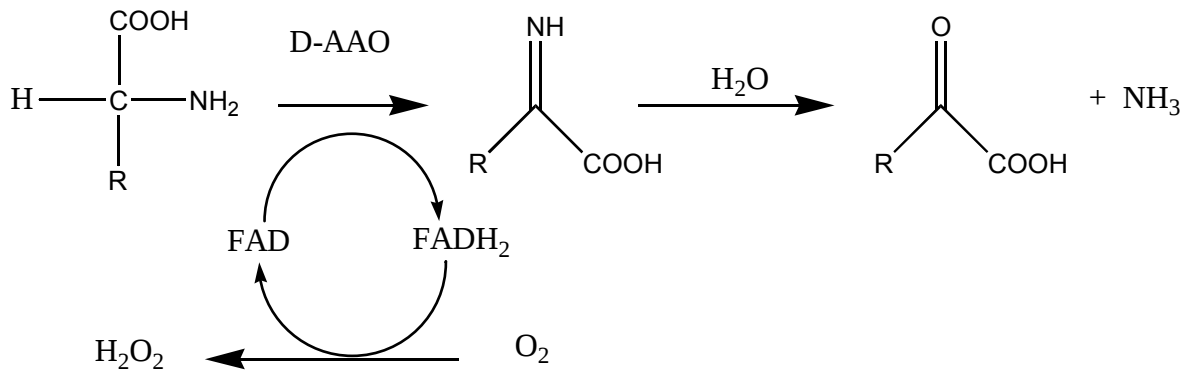


Abb. 4: Reaktionsschema der D-AAO.

4.1 Vorkommen der AAOs

Die L-Aminosäureoxidasen sind in der Natur weit verbreitet. Die ersten L-AAOs wurden von Zeller beschrieben und stammten aus Schlangengift [59]. Bis heute sind die L-AAOs aus Schlangengift die am besten untersuchten Vertreter dieser Enzymklasse [60, 61, 62]. Weitere Quellen für L-AAOs sind verschiedene Insektengifte [63], Bakterien [64, 65], Algen [66], Schimmelpilze [67, 68], Miesmuscheln [69], Mäusmilch [70] und Mäusehirn [71]. Die meisten der hier aufgeführten L-AAOs akzeptieren eine Vielzahl an L-Aminosäuren als Substrate.

Einige L-AAOs werden aufgrund ihres eingeschränkten Substratspektrums unter einem Namen geführt, der ihre Funktion genauer spezifiziert. Beispielsweise bilden verschiedene *Streptomyces*-Arten L-Glutamatoxidasen, die fast ausschließlich Glutamat als Substrat akzeptieren [72, 73, 74]. Einige *Trichoderma*-Arten bilden eine L-Lysinoxidase [75, 68, 76].

Eine Sonderstellung nehmen die L-AAOs aus der Familie der Enterobacteriaceae ein, denn sie sind membranständig und bilden bei der Regenerierung des FADs Wasser anstelle von Wasserstoffperoxid [15]. In der Literatur ist die Nomenklatur nicht eindeutig, oft werden diese Enzyme auch als L-Aminosäuredesaminasen bezeichnet [77, 78].

Erstmals wurde D-AAO-Aktivität in Säugetiergewebe detektiert [79]. In den folgenden Jahrzehnten wurden D-AAOs aus Reptilien, Vögeln, Fischen und verschiedenen Säugetiergeweben nachgewiesen [80, 81, 82, 83]. Mikrobielle D-AAOs sind bisher nur aus Eukaryoten charakterisiert worden. Zu den D-AAO-Produzenten gehören die Hefen *Rhodotorula gracilis* [84], *Trigonopsis variabilis* [85] und mehrere *Candida*-Arten [86] und die Schimmelpilze *Neurospora crassa* [87], *Verticillium luteoalbo* und verschiedene *Fusarium*-Arten [86, 88].

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

4.2 Biotechnologische Anwendung der AAOs

Bislang haben die L-AAOs in der Darstellung von D-Aminosäuren oder Ketosäuren kaum eine Rolle gespielt. Lediglich die L-Aminosäuredesaminase aus *Providencia alcalifaciens* wurde bei der Synthese von Carbobenzoxy(CBZ)-L-oxylysin aus *Nε*-CBZ-L-Lysin eingesetzt [89]. Andere

L-Aminosäure-desaminasen aus *Proteus*-Arten wurden zur Racemattrennung von DL-Aminosäuren verwendet [14, 15]. Darüber hinaus werden L-AAOs als Biosensoren, im Aminosäurenachweis in Lebensmitteln [90, 91] und zur Proteinbestimmung [92] eingesetzt. In diesem Zusammenhang wurden durch Sarkar et al. auch erste Untersuchungen zur Immobilisierung der L-AAO durchgeführt [93].

D-AAOs werden technisch in Form von ganzen Zellen, als lösliches Enzym oder im immobilisiertem Zustand für biotechnologische Anwendungen genutzt. So werden sie für die qualitative und quantitative Analyse von D-Aminosäuren [94], in Biosensoren [95], zur Herstellung von L-Aminosäuren [96] und α -Ketosäuren [97] sowie der Umsetzung von Cephalosporin C zu Glutaryl-7-aminocephalosporansäure [98] eingesetzt.

Der letztgenannte Prozess stellt momentan die wichtigste industrielle Anwendung der D-AAO dar. Das Folgeprodukt, die 7-Aminocephalosporansäure, ist ein Zwischenprodukt für die Herstellung vieler halbsynthetischer β -Lactamantibiotika [99, 100].

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für die D-AAO ist die Darstellung von L-6-Hydroxynorleucin, einem Intermediat für das blutdrucksenkende Mittel Omapatrilat, aus dem entsprechenden Racemat [101, 102].

4.3 Klonierung und Expression der AAOs

Für die technische Anwendung von Enzymen muss ein Herstellungsverfahren entwickelt werden, das die kostengünstige Produktion des Biokatalysators ermöglicht. Diese Aufgabe kann durch heterologe Expression im Allgemeinen gelöst werden. Trotz der Veröffentlichung mehrerer neuer *laao*-Gene in den letzten Jahren [103, 104, 105] wurden kürzlich erst drei dieser L-AAOs aktiv in Zellkultur exprimiert [106, 107, 108], mikrobielle Expressionssysteme wurden bisher nur durch Geueke et al. beschrieben [27, 109]. Da die eukaryotischen L-AAOs prozessiert und glycosyliert vorliegen [106, 110, 111], ist die funktionelle Expression dieser Enzyme in Bakterien sehr unwahrscheinlich. Jedoch ließen sich die membranständigen L-Aminosäure-desaminasen aus *Proteus* erfolgreich in *E. coli* exprimieren [15, 77, 112].

Die Sequenzen verschiedener D-AAOs sind bekannt und die heterologe Expression wurde in den letzten Jahren für die Enzyme aus Schweineniere [113], *Trigonopsis variabilis* [114, 115, 116], *Rhodotorula gracilis* [117, 118] und *Fusarium solani* [88] beschrieben. Auf diesem Wege wurde die Produktion der D-AAO deutlich vereinfacht. Durch die Expression der *Trigonopsis variabilis* D-AAO in *E. coli* kann die spezifische Aktivität im Rohextrakt um den Faktor 23 gesteigert werden [114], die rekombinante D-AAO aus *Fusarium solani* macht bis zu 8 % der löslichen *E. coli*-Proteine aus [88]. Modifikationen, wie das Einfügen eines His-Tags, wurden erfolgreich für die *Rhodotorula gracilis* D-AAO durchgeführt und erlauben eine einstufige Reinigung mit sehr guten Ausbeuten [118]. Weiterhin ermöglicht die Existenz funktioneller Expressionssysteme Mutationsstudien. So wurde beispielsweise die Oxidationsstabilität der D-AAO aus *Trigonopsis variabilis* über Austausch von Methionin-Resten gegen Leucin-Reste verbessert [119]. Die Rolle einiger konservierter Aminosäurereste der *Trigonopsis variabilis* und der *Rhodotorula gracilis* D-AAOs konnte ebenfalls über gezielte Mutagenese geklärt werden [120, 121, 122].

4.4 Kristallisation und Strukturaufklärung von bekannten Oxidasen

Die einzige 3D-Struktur einer NPOXs, die zugleich die am besten charakterisierte NPOX darstellt, wurde aus *Enterococcus faecalis* mit einer Auflösung von bis zu 2,16 Å gelöst [123, 124, 125]. Zur Lösung des Reaktionsmechanismus wurden verschiedene Mutationen eingeführt, insbesondere C42A, C42S [126], H10Q, H10A [127] und R303M [128] und kinetische Untersuchungen [129, 128] mit diesen Mutanten durchgeführt. Das Cys42 ist ein wesentlicher Teil des aktiven Zentrums der NPOX und ist damit essentiell für die katalytische Aktivität. Das Schwefel-Atom im Cys42 wechselt zwischen Thiolat (Cys42-SOH) und Sulfonsäure (Cys42-SO₃H) im engen Charge-Transfer-Komplex mit FAD. His10 im aktiven Zentrum ist hingegen nicht essentiell für die katalytische Aktivität der NPOX, wie die schon oben erwähnten Mutationsuntersuchungen zeigen [127]. Demnach erfolgt die Oxidationsreaktion über einen Hydridtransfer vom N5-Stickstoff des Isoalloxazinteils des FAD auf das Cys42-S[⊖]-Nucleophil formal nach folgendem Schema (Abb. 5):

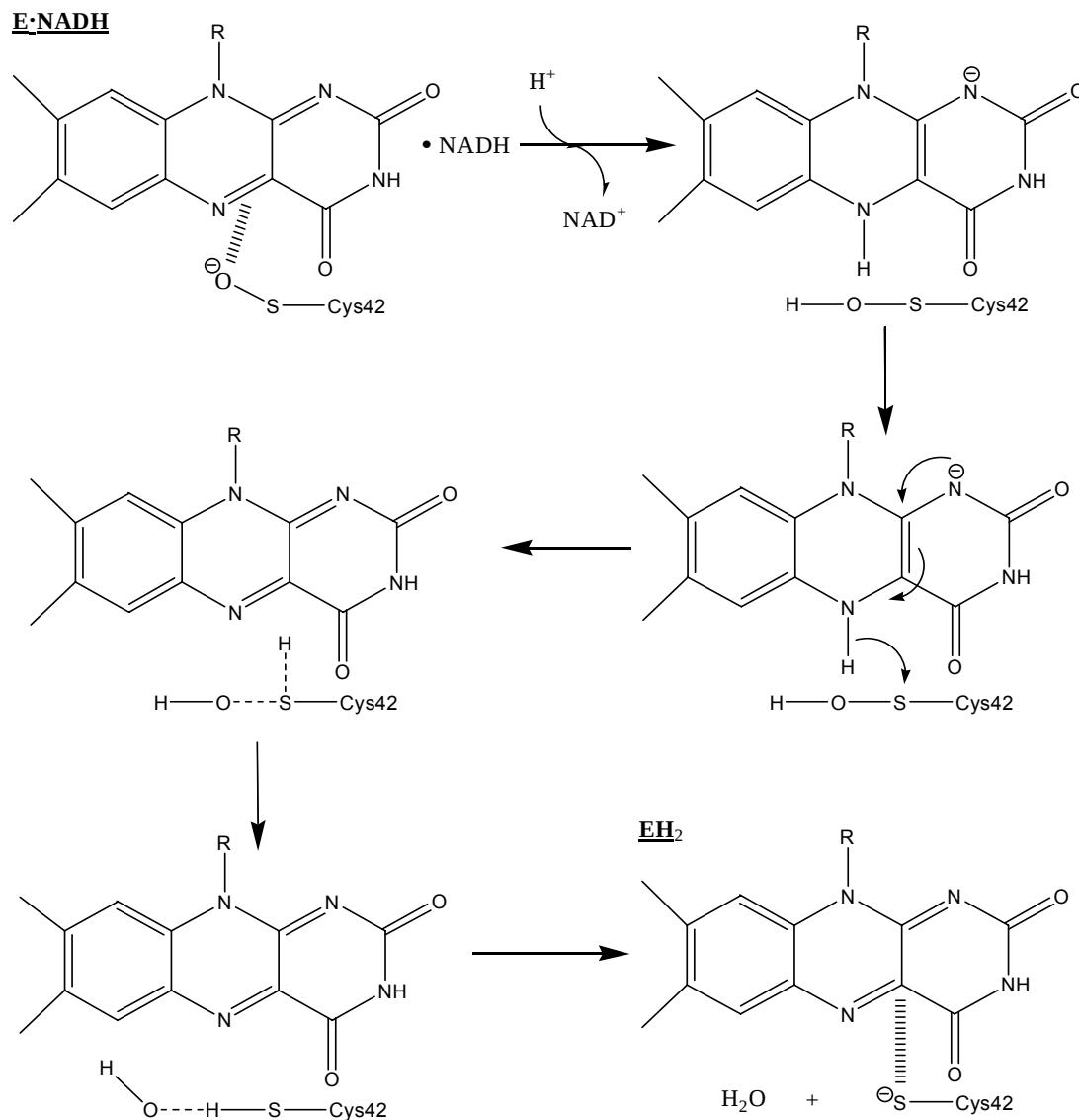


Abb. 5: NPOX aus *Enterococcus faecalis*: Hydridtransfer vom N5-Atom des Flavins auf das Cys42-S[⊖]-Nucleophil. Die Aminosäure Cystein42 ist verkürzt als Cys42 gezeichnet, vom FAD ist nur der Isoalloxazinring dargestellt.

In Abbildung 5 ist schematisch der einleitende Hauptschritt der Oxidationsreaktion dargestellt, welcher die Thiolat-Form des Cys42 erzeugt und für die EH_2 Charge-Transfer Interaktion erforderlich ist. Der Hydrid-Transfer vom FAD-N(5) auf das $\text{Cys42-S}^\ominus$ liefert das oxidierte FAD während der Reduktion von Cys-42-SOH zu Cys42-SH und der Eliminierung von OH^- . Durch die Protonenaufnahme der Abgangsgruppe OH^- entsteht das Produkt H_2O und die Thiolat-Form des Cys42 wird wieder erzeugt.

Die erste Struktur einer NADH-Oxidase wurde im Jahre 1995 aus einem thermostabilen Bakterium *Thermus thermophilus* mit einer sehr hohen Auflösung von bis zu 1,59 Å beschrieben [130, 131]. Diese NOX ist ein H_2O_2 -Bildner und bildet ein Dimer aus 22,7 kDa gleich großen Untereinheiten aus. Aufgrund der räumlichen Anordnung des NAD(P)H, FAD bzw. FMN und des Trp47 im aktiven Zentrum wurde auch für die H_2O_2 -bildende NOX der Mechanismus des Hydridtransfers angenommen. Die Reaktion läuft wahrscheinlich in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wird das gebundene FAD bzw. FMN durch NAD(P)H reduziert und im zweiten Schritt wird das gebundene FADH_2 bzw. FMNH_2 reoxidiert durch exogenes Flavin, welches dann nach Dissoziation von der Bindungsstelle weitere Reaktionen (nicht katalysiert durch das Enzym) eingehen kann.

Neben der Struktur der H_2O_2 -bildenden NOX aus *T. thermophilus* wurde 1999 durch Mac Sweeney et al. eine H_2O_2 -bildende NOX aus *Thermus aquaticus* [132] und neuerdings durch Lountos et al. eine H_2O -bildende NOX aus *Lactobacillus sanfranciscensis* [133] kristallisiert und erste Diffraktionsmessungen durchgeführt. Eine 3D-Struktur einer H_2O -bildende NOX wurde aber bisher nicht veröffentlicht.

Die Aufklärung der Kristallstrukturen der D-AAO aus Schweineniere [134, 135], *Fusarium solani* [88], *Rhodotorula gracilis* [136] und der L-AAO aus *Calloselasma rhodostoma* [58] erbrachte viele wertvolle Hinweise zum Reaktionsmechanismus der Aminosäureoxidasen.

Im Jahre 1996 konnte unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen die 3D-Struktur der D-AAO aus Schweineniere gelöst werden [135, 134]. Im Zuge der 3D-Strukturaufklärung konnten eingehende mechanistische Untersuchungen durchgeführt werden [137]. Demnach erfolgt die Oxidationsreaktion über einen Hydridtransfer vom C_α -Kohlenstoff des Substrates auf den N5-Stickstoff des Isoalloxazinteils des FAD (Abb. 6). Die Reaktion läuft formal nach folgendem Schema ab:

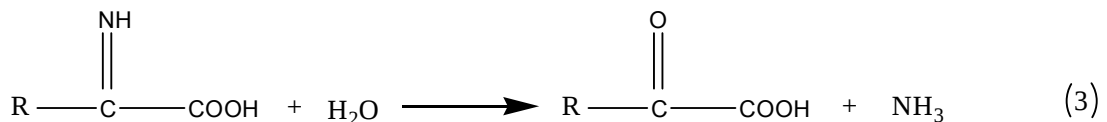
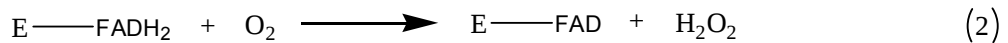
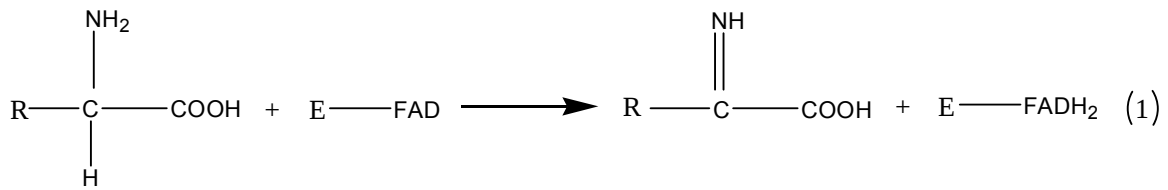


Abb. 6: Reaktionsschema der D-Aminosäureoxidasen. (1): Oxidation des C_α-Kohlenstoff und Reduktion des FAD. (2): Reoxidation des FADH₂ durch molekularen Sauerstoff. (3): Hydrolyse des α-Iminosäure-intermediats zur α-Ketosäure.

Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation des C_α-Kohlenstoffs und die Reduktion des enzymgebundenen Kosubstrates FAD (s. Reaktionsgleichung 1), das durch molekularen Sauerstoff wieder in den oxidierten Zustand überführt wird (s. Reaktionsgleichung 2). Im zweiten Schritt der Reaktion wird das α-Iminosäure-Zwischenprodukt spontan zur α-Ketosäure hydrolysiert (s. Reaktionsgleichung 3). Das intermediär gebildete H₂O₂ wird durch eine Katalase abgebaut, die wie die D-AAO in den Peroxisomen oder den Mikrosomen lokalisiert ist [138].

Die Struktur der D-AAO aus *Rhodotorula gracilis* wurde mit einer sehr hohen Auflösung von bis zu 1,2 Å bestimmt [136]. Auch Umhau et al. kamen zu der Schlussfolgerung, dass der Reaktionsmechanismus nach dem Prinzip des Hydridtransfers abläuft. Als Besonderheit dieses Mechanismus wird hervorgehoben, dass die funktionellen Gruppen der proteineigenen Aminosäuren nicht an der Katalyse beteiligt sind, sondern nur zur Substraterkennung und -bindung beitragen.

Die Röntgenstruktur der L-AAO aus *Calloselasma rhodostoma* wurde im Jahre 2000 veröffentlicht [58]. Aufgrund der räumlichen Anordnung des Inhibitors Aminobenzoat im aktiven Zentrum wurde auch für die L-AAO der Mechanismus des Hydridtransfers angenommen. Die basische Aminosäure His223 unterstützt eventuell die Bindung des Substrats als Zwitterion. Die Base könnte ein Proton von der geladenen Aminogruppe abstrahieren und so den Hydridtransfer erst ermöglichen. Alternativ dazu wurde überlegt, dass die Substrate nur in der anionischen Form gebunden und umgesetzt werden können.

5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Hauptziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Expressionssystemen für vier technisch interessante Oxidasen (NOX, TvDAAO, ApDAAO und RoLAAO). Nach erfolgreicher Klonierung und Expression der Oxidase-Gene sollen diese Enzyme bis zur Homogenität gereinigt und umfassend biochemisch und proteinchemisch charakterisiert werden. Die Klonierung und die

Sequenzierung der Oxidase-Gene soll die Grundlage für die heterologe Expression der Enzyme in bakteriellen Systemen schaffen. Für alle dieser FAD-abhängigen Oxidasen soll untersucht werden, inwieweit und unter welchen Kultivierungsbedingungen die Enzyme als Holoenzym exprimiert werden und ob die FAD-Synthese des Wirtsorganismus einen limitierenden Schritt bei der heterologen Expression darstellt. Als ergänzender Ansatz sollen auch die Fermentationsbedingungen für die neu entwickelten rekombinanten Mikroorganismen optimiert werden, um bestmögliche Enzymausbeuten zu erhalten. Die Klonierungstechnik bietet außerdem die Möglichkeit, Mutationen in das Protein einzuführen, die die Proteineigenschaften verändern, oder die helfen, den Mechanismus aufzuklären.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Universität Köln soll die Kristallisation und die Röntgenstrukturaufklärung der NOX durchgeführt werden. Für die Untersuchung der NOX in der Racematspaltung von Alkoholen und Aminosäuren als Regenerationssystem für NAD^+ in Kopplung mit NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen sollen verschiedene Enzympräparationen getestet werden. Ganze Zellen, freie oder coexprimierte Enzyme sollen zur Racemattrennung von Alkoholen und Aminosäuren eingesetzt werden.

Die L-AAOs bzw. D-AAOs oxidieren die L-Aminosäure bzw. D-Aminosäure direkt während der Racemattrennung von DL-Aminosäuren (s. Abb. 3 und 4). Für die Untersuchung der L-AAO und D-AAO in der Racematspaltung von Aminosäuren sollen Enzympräparate, wie ganze Zellen, freies und immobilisiertes Enzym getestet werden.

NADH-Oxidase aus *L. brevis* dient hingegen als Regenerationssystem für NAD^+ bei der Kopplung mit einer NAD^+ -abhängigen L-spezifischen Dehydrogenase während der Racematspaltung. Die Oxidation der L-Aminosäure wird hier durch die NAD^+ -abhängige L-spezifische Dehydrogenase übernommen.

Als Reaktionsbeispiel ist die Racematspaltung von Aminosäuren durch NAD^+ -abhängige L-spezifische Dehydrogenasen in Kopplung mit der NOX, die das entstehende NAD^+ regenerieren soll, in Abbildung 7 dargestellt.

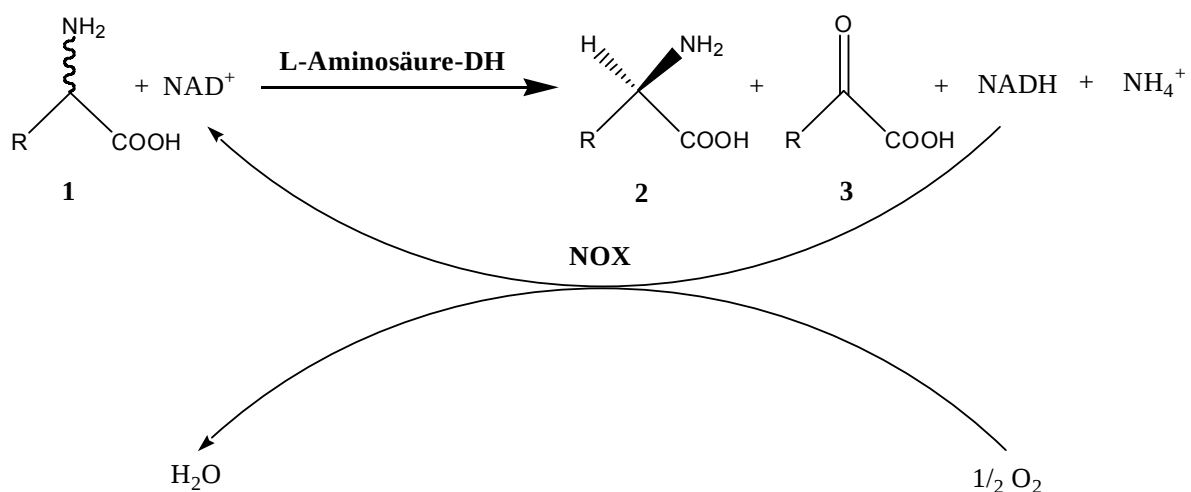


Abb. 7: Die Darstellung von D-Aminosäuren (2) oder Ketosäuren (3) wird mit L-Aminosäure-Dehydrogenasen durch selektive Oxidation von racemischen Aminosäuren katalysiert (1). NAD^+ wird simultan durch die NADH-Oxidase regeneriert.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Tab. 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu
CD-Spektropolarimeter J-810	Jasco Germany
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems
Drehanoden (Cu)	
FR 591	Nonius
Rotaflex RU-200B	Rigaku
EDV-Systeme	
Indigo2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI)
Octane mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI)
O2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI)
PC mit ReHat Linux 6.2	SL Datentechnik
Flächenzähler	
MAR 300 und 345	MAR Research
Massenspektrometrie	
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Monochromator	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon
HPLC (Gina 50, M 480, UVD 170S, DG 1310)	Gynkotec
Chromatographie	
Biocad-Sprint Perfusion Chromatography System	Applied Biosystems
GC-17A	Shimadzu
Disintegration	
Sonoplus HD60	Bandelin Electronic
Elektrophorese	
EI9001-Xcell™, Mini Cell	Novex
PCR-Cycler	
Primus 96 ^{plus}	MWG-Biotech
Zentrifugen	
Sorvall RC-5B	Du Pont
KA06	Westfalia
Rotina 35R	Hettich
Mikro 22R	Hettich

Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Speedvac Univapo 150H	Uniequip
Eagle-Eye II	Stratagene
Fermenter Techfors I	INFORS
Fermenter Labfors	INFORS
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermostat 5320	Eppendorf

Tab. 2: Sonstige Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
Cryoloops	Hampton Research
Sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research
Gelelektrophorese	
NuPAGE 4-12 % Bis/Tris Gel	Invitrogen
IEFGele	Invitrogen
Ultrafiltration	
Amicon Ultra-4 und -15	Millipore

Tab. 3: Computerprogramme.

Programm (-Paket)	Referenz
Auswertung von Röntgendaten	
CCP4-suite	[139]
CNS-suite	[140]
HKL-suite	[141]
SOLVE	[142]
REPLACE	[143]
Grafikprogramme	
O	[144]
BRAGI	[145]
SPDBV	[146]
Auswertung von Röntgenstrukturen	
CCP4-suite	[139]
DSSP	[147]
ProFit	[148]
TOPS	[149]
SHELX-97	[150]
CNS-suite	[140]

Sonstige Programme

CONTIN	[151]
Yang	[152]
SELCON	[153]
PREDATOR	[154]
SWISS-MODEL	[155]
BOBSCRIPT	[156]
MOLSCRIPT	[157]
RASTER3D	[158]
GNUPLOT	[159]
EPMR	[160]

1.2 Chemikalien

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

Die Nährmedienbestandteile stammen von Merck, Difco oder Oxoid. Die Kristallisationskits wurden von Hampton Research, Eupergit C ® und Eupergit C 250L ® von Röhm und 2'I-ATP von der Firma Jena Bioscience bezogen.

1.3 Enzyme

L-Leucin-Dehydrogenase	aus <i>Bacillus cereus</i> , rekombinant, IMET, Universität Düsseldorf
L-Glutamat-Dehydrogenase	aus Rinderleber (EC 1.4.1.2), Sigma
(S)-Alkohol-Dehydrogenase	aus <i>Rhodococcus erythropolis</i> , rekombinant, IMET, Universität Düsseldorf
(R)-Alkohol-Dehydrogenase	aus <i>Lactobacillus kefir</i> , rekombinant, IMET, Universität Düsseldorf
Peroxidase	aus Meerrettich (EC 1.11.1.7), Merck
Lactat-Dehydrogenase	aus Rinderherz (EC 1.1.1.27), Sigma
Katalase	aus Rinderleber (EC 1.11.1.6), Fluka

1.3.1 Präparation rekombinanter (S)-ADH, (R)-ADH und LeuDH

a) (S)-ADH

Nach Abokitse und Hummel [161] wurde die (S)-ADH aus *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297 (erworben von der DSMZ) (EC 1.1.1.1) rekombinant aus *E. coli* gewonnen. Das verwendete Konstrukt sah folgendermaßen aus: *E. coli* BL21(DE3)/pKA1/(S)-ADH.

b) (R)-ADH

Die Präparation der (R)-ADH (EC 1.1.1.1) erfolgte nach den Publikationen (NAD⁺-abhängige Mutante (ADHG38D) aus *Lactobacillus brevis*) von Hummel und Riebel [162] [163]. Hier wurde das *r-adh*-Gen in den Expressionvektor pKK177 kloniert und in *E. coli* HB101-Zellen exprimiert. Das rekombinante Konstrukt sah somit so aus: *E. coli* HB101/ pKK177/(R)-ADH.

c) LeuDH

Nach Ansorge und Kula wurde die L-Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus cereus* (EC1.4.1.9) exprimiert und aufgereinigt [164, 165]. Sie klonierten das *leudh*-Gen in den pTrc99a-Vektor von Pharmacia und exprimierten die LeuDH in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (BL21(DE3)/pTrc99a/LeuDH).

1.4 Vektoren

pET21a	Novagen
pET26b	Novagen
pET32a	Novagen
pETDuet-1	Novagen
pKK223-3	Amersham-Pharmacia Biotech
pJOE4036	J. Altenbuchner, Institut für Industrielle Mikrobiologie, Universität Stuttgart

1.5 Mikroorganismen

<i>E. coli</i> JM105	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21-Codon Plus (DE3)-RP	Stratagene
<i>E. coli</i> Tuner (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> B834 (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)pLacI	Novagen
<i>E. coli</i> Origami (DE3α)pLysS	Novagen

2 Methoden

2.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde in Luria-Bertani-Medium (LB) kultiviert. Standardmäßig wurden 20 ml Medium einprozentig aus einer 5 ml Vorkultur angeimpft und bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurden dem Medium die dazu notwendigen Antibiotika hinzugefügt (Ampicillin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sterilfiltriert, Chloramphenicol 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 70 % Ethanol, Kanamycin 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sterilfiltriert).

2.1.1 Expression der Oxidasen

E. coli-Stämme mit den Plasmiden pKK223-3, pJOE4036, pET26b, pET21a, pET32a und pETDuet-1 wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit 100 μM IPTG induziert und für Aktivitätsuntersuchungen eingesetzt. Sowohl die Vorkultur (5 ml) als auch die Hauptkultur (20 ml) wurden bis zur Induktion bei 37°C und 120 rpm inkubiert.

2.1.1.1 Expression der SeMetNOX

Die SeMetNOX wurde in Methionin-auxotrophen *E. coli* B834(DE3) Zellen exprimiert. 20 ml LB-Vorkultur wurden aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und bei 37°C im 100 ml Erlenmeyerkolben über Nacht angezogen. Die Vorkultur wurde dann drei mal 5 Minuten bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert und in je 20 ml kaltem M9 Minimalmedium resuspendiert. Die Hauptkultur von 3 x 1000 ml M9 Minimalmedium wurde mit je 50 mg/ml Seleno-L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Valin und mit je 100 mg/ml L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Threonin versetzt. Außerdem wurden zu der Hauptkultur die Spurenelemente 10 mg/l Thiamin (Vitamin B1), 8,4 mg/l Fe(II)SO_4 und 0,4 % Glucose (w/v) hinzugegeben. Die Hauptkulturen wurden mit je 10 ml in M9 Minimalmedium gewaschener Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 120 rpm kultiviert. Die Proteinexpression wurde bei $\text{OD}_{550} = 0,5$ mit 100 μM IPTG induziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen für 20 Minuten bei 5900 x g und 4°C zentrifugiert und für den weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.1.2 Hochzelldichte-Fermentation von rekombinanter *E. coli*

2.1.2.1 Rekombinante ApDAAO

Rekombinante BL21(DE3) mit pEapdaao wurde in 10 L HZD-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin in einem 40 L-Techfors Bioreaktor bei 30°C kultiviert. Die erste Vorkultur wurde für 1 Tag in 5 ml Medium inkubiert, die zweite Vorkultur wurde 1 %ig in zwei 500 ml-Kolben mit zwei Schikanen mit 100 ml Medium angeimpft und für 7 $\frac{1}{2}$ h kultiviert. Die Hochzelldichte-Fermentation wurde durch Zugabe von 1 % Vorkultur gestartet. Das feed-Volumen betrug 5 L und das gesamte batch-Volumen 15 L. Der pO_2 wurde durch Anpassung der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl auf einen minimalen Wert von 30 % und maximalen von 40 % eingestellt. Während der Fermentation wurde der pH konstant bei 7,0 durch Zugabe von 3 M H_3PO_4 beziehungsweise 25 % Ammoniak geregelt. Die Zellen wurden nach 28 h Kultivierung mit 5 mM IPTG induziert. Während der gesamten Fermentationsdauer wurden regelmäßig Proben entnommen

und analysiert. Die Fermentation wurde nach 39 h beendet, die Zellen wurden durch Zentrifugation mit einem Separator KA06 für 15 min bei 8000 x g und 4°C vom Überstand getrennt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.1.2.2 Rekombinante RoLAAO

Die Hochzelldichte-Fermentation der rekombinanten Rosetta 2 (DE3)pLacI mit pE3laao wurde bis auf kleine Änderungen wie die Hochzelldichte-Fermentation der rekombinanten ApDAAO durchgeführt (siehe 2.1.2.1). Folgende Punkte wurden verändert: Die rekombinante Rosetta 2 (DE3)-Zellen wurden im HZD-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol fermentiert. Die Zellen wurden nach 27 h Kultivierung mit 1 mM IPTG induziert und die Fermentation wurde nach 39,6 h beendet.

2.1.3 Konservierung

E. coli-Stämme wurden bis zur log-Phase in LB-Medium kultiviert. 0,7 ml-Aliquots wurden entnommen und nach Zugabe von 0,3 ml Glycerin (86 %) bei -80°C gelagert.

2.2 Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung

2.2.1 Für analytische Zwecke

Die rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die aus einer 20 ml-Kultur geernteten Zellen in 1 ml 100 mM TEA- oder Kpi-Puffer suspendiert und für 2 min auf Eis mit Ultraschall behandelt (power 80 %, cycles 80, US-Spitze MS 62). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 24100 x g für 5 min bei 4°C entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml 6 M Harnstoff resuspendiert und bei -20°C gelagert. Der geklärte Rohextrakt wurde für die Aktivitätsmessung eingesetzt.

2.2.2 Für präparative Zwecke

3 g Bakterienzellen wurden in 50 mM TEA- oder Kpi-Puffer in einem Verhältnis von 1 g Zellen (Nassgewicht) zu 3 ml Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis mit Ultraschall behandelt (power 80 %, cycles 80, US-Spitze MS 64). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4444 x g für 20 min bei 4°C entfernt und der geklärte Rohextrakt wurde für die Aufreinigung eingesetzt.

2.3 Reinigung der NOX und SeMetNOX

Alle im Folgenden beschriebenen Chromatographieschritte wurden bei Raumtemperatur unter Nutzung des Biocad Chromatography Systems ausgeführt. Das dreistufige Reinigungsprotokoll wurde für die Aufreinigung der NOX und SeMetNOX aus 3g Zellen verwendet. Die NOX wurde nach diesem Verfahren aus dem rekombinanten *E. coli*-Stamm (Tuner(DE3)/pET21a/*nox*) und die SeMetNOX aus dem rekombinanten *E. coli*-Stamm (B834(DE3)/pET21a/*nox*) aufgereinigt.

Während der SeMetNOX-Aufreinigung wurden in alle Puffer 3 mM DTT hinzugegeben, um einer eventuellen Oxidation des Selenomethionins im SeMetNOX-Protein vorzubeugen.

2.3.1 Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Q-Sepharose FF (Pharmacia) gepackte Säule (h 7,5 x Ø 1,6 cm) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml·min⁻¹ aufgetragen. Der Ionenaustauscher war zuvor mit 50 mM Kpi-Puffer pH 6,5 equilibriert worden. Nach der Beladung wurde die Säule mit diesem Puffer gewaschen und anschließend wurde das Enzym innerhalb des Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in Startpuffer eluiert. Die aktiven Fraktionen (je 2 ml) wurden vereinigt und mit 3,5 M (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration an Ammoniumsulfat 1,2 M betrug.

2.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Der Pool wurde auf eine Phenylsepharose FF-Säule (Pharmacia, h 7,5 x Ø 2,6 cm) aufgetragen, die mit 50 mM Kpi, 1,2 M (NH₄)₂SO₄, pH 6,5 equilibriert war. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1,5 ml·min⁻¹. Das Enzym eluierte unterhalb einer Salzkonzentration 0,18 mol/l. Die aktiven Fraktionen (je 2 ml) wurden anschließend vereinigt.

2.3.3 Gelfiltrationschromatographie

Eine mit Superdex 200 PG gefüllte Säule (h 61,5 x Ø 1,6 cm) wurde mit 50 mM Kpi, 150 mM NaCl, pH 6,5 equilibriert. Die Flussrate betrug während des gesamten Säulenlaufs 1 ml·min⁻¹.

2.4 Reinigung der ApDAAO

Die D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* wurde mit Hilfe eines zweistufigen Reinigungsprotokolls aus dem rekombinanten *E. coli*-Stamm (BL21(DE3)/pET21a/apdaao) isoliert.

2.4.1 Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt wurde auf eine Säule (h 2,6 x Ø 10 cm) aufgetragen, die mit Q-Sepharose FF gepackt und mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 equilibriert war. Die Flussrate betrug 1 ml·min⁻¹. Nach einem Waschschrift mit 0,2 M NaCl in 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 wurde die ApDAAO durch eine weitere stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,35 M NaCl eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration wurde ein Pufferwechsel nach 10 mM Kpi, 150 mM NaCl, pH 6,5 durchgeführt.

2.4.2 Hydroxylapatitchromatographie

Eine mit keramischem MacroPrep Hydroxylapatit, Typ I (Biorad) gefüllte Säule (h 8,3 x Ø 1,6 cm) wurde mit Startpuffer (10 mM Kpi, 150 mM NaCl, pH 6,5) equilibriert und die Probe wurde mit einer Flussrate von 1 ml·min⁻¹ aufgetragen. Die ApDAAO-Aktivität wurde im Durchlauf detektiert, während ein Großteil der Fremdproteine durch eine lineare Erhöhung der Kpi-

Konzentration auf 400 mM eluierte. Die NaCl-Konzentration wurde während der gesamten Chromatographie konstant gehalten.

2.5 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Nach der Aufreinigung können die Proteinlösungen verdünnt vorliegen. Zur Aufkonzentrierung der Proteinlösung wurde eine Amicon Ultrafiltrationseinheit (Amicon Ultra-4 und Amicon Ultra-15) verwendet. Die Ultrafiltrationseinheit besitzt ein Ausschlussvolumen von 10 kDa und wurde maximal mit 3000 x g bei 4°C ultrazentrifugiert. Die Filtration wurde bis zu einem Endvolumen der Proteinlösung von 1,5 ml durchgeführt.

2.6 Enzymimmobilisierung

Die ApDAAO wurde auf die Trägermaterialien Eupergit C® und Eupergit C 250L® immobilisiert. Das Enzym lag während der Immobilisierung in Kpi-Puffer pH 8,0 vor. 0,2 g Trägermaterial wurden mit 1,2 ml ApAAO-Lösung für 4 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trägermaterial wurde anschließend auf einem Filter mit 5 x 10 ml Wasser gewaschen. Vor jeder Einwaage wurde das Immobilisat auf die gleiche Weise filtriert, so dass die Bestimmung des Feuchtgewichts möglichst reproduzierbar war.

2.7 Proteinanalytik

2.7.1 Bestimmung der NOX und SeMetNOX-Aktivität

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

$$\text{Volumenaktivität (U / ml)} = \frac{\Delta E * V_{\text{Ges}}}{V_{\text{Enzym}} * \epsilon * d}$$

ΔE = Extintionsänderung

V_{Ges} = Gesamtvolumen des Ansatzes in der Küvette (ml)

V_{Enzym} = Enzymvolumen (ml)

ϵ = Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [$\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22$]

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Standardmäßig wurde die Aktivität der NOX und SeMetNOX in einem Reaktionsvolumen von 1 ml bestimmt. Als Substrat diente NADH. Nach 2 - 5 minütiger Vorinkubation bei 30 °C wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Zusätzlich enthielt der Reaktionspuffer für die SeMetNOX-Aktivitätsmessung in allen Ansätzen 3 mM DTT.

Reaktionsansatz:

980 μl 50 mM Kpi-Puffer pH 6,0 (+ 3 mM DTT)

10 μl 20 mM NADH (0,2 mM im Test)

10 μl Enzymlösung

Um den Einfluss von FAD und Inhibitoren auf die Aktivität der NOX und SeMetNOX zu bestimmen, wurden zu dem Standardtest unterschiedliche Konzentrationen an FAD und Inhibitoren hinzugegeben.

2.7.2 Bestimmung der L-AAO-Aktivität

2.7.2.1 POX/o-Dianisidin

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

2.7.2.2 LDH-gekoppelter Enzymtest

Alternativ wurde die L-AAO-Aktivität mit einem zweiten gekoppelten Enzymtest, der Lactat-Dehydrogenase enthielt, gemessen. Hierbei konnte ausschließlich L-Alanin als Substrat eingesetzt werden. Die Produktion von Lactat aus NADH und dem gebildeten Pyruvat wurde photometrisch bei 340 nm und 30°C verfolgt ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für NADH). Der Testansatz enthielt 10 mM L-Alanin, 0,2 M TEA/HCl-Puffer pH 7,6, 20 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ Katalase, 0,2 mM NADH, 9 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ LDH und L-AAO in limitierenden Mengen.

2.7.3 Bestimmung der D-AAO-Aktivität

D-AAO-Aktivität wurde analog zu dem Enzymtest für die L-AAO gemessen (siehe 2.7.2.1). Als Standardsubstrat wurden 10 mM D-Methionin eingesetzt.

Der Einfluss von FAD auf die Aktivität der L- und D-AAO wurde durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an FAD zu den Standardtests bestimmt.

2.7.4 Bestimmung der Katalase-Aktivität

Der Wasserstoffperoxidabbau durch Katalase wurde in einer Quarzküvette photometrisch bei 240 nm und 30°C gemessen ($\epsilon = 0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für H_2O_2). Der Testansatz enthielt 50 mM Kpi-Puffer pH 7,5, 0,3 % H_2O_2 und Katalase in limitierenden Mengen.

2.7.5 Proteinbestimmung

Durch die photometrische Messung nach Bradford wurde der Proteingehalt der Proben ermittelt [166]. Dazu wurden 100 µl Proteinlösung mit 900 µl Bradfordreagenz versetzt und mindestens 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei $\lambda = 595$ nm gemessen und mit einer Eichkurve (0,1 - 1 mg BSA; Absorptionsbereich 0,05 - 0,5 [595 nm]) verglichen. Das Bradfordreagenz wurde wie folgt hergestellt: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden mit 50 ml Ethanol versetzt und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85 %) und Auffüllen mit Wasser auf 1 L wurde die fertige Lösung eine Stunde gerührt und anschließend filtriert. Die OD_{595} der Lösung sollte für die Eichung und Messung geringer als 0,6 sein.

Während der Chromatographien wurde der Proteingehalt über Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt.

2.7.6 Massenspektrometrie

Massenspektroskopische Analysen sind eine sensitive Methode zur Molekulargewichtsbestimmung und Reinheitskontrolle von Proteinproben. Dabei kann mit den hier verwendeten Methoden ESI-MS und MALDI/TOF-MS eine Auflösung von ca. ± 1 au respektive ± 10 au in einem Massenbereich bis 100 kDa erreicht werden. Alle massenspektroskopischen Messungen wurden im Institut für Biochemie der Universität Köln (AG Prof. Schomburg) durchgeführt.

2.7.6.1 ESI-MS

Zur ESI-Massenspektrometrie wurden die Proteinproben gegen ein Methanol-Wasser-Gemisch 1:1 (v/v) mit 0,1 % Essigsäure dialysiert. Es wurden ca. 100 µl mit einer Konzentration von 10 pmol/µl benötigt.

2.7.6.2 MALDI/TOF-MS

Die ca. 100 µl Proteinprobe mit 10 - 100 pmol/µl wurden gegen 0,1 % TFA dialysiert. 5 µl davon wurden gemischt mit 15 µl 0,1 % TFA und 30 µl einer mit Sinapinsäure gesättigten Acetonitril-Wasser-Lösung 1:1 (v/v). Die Spots auf dem Target wurden mit einer Ethanol-Dünnschicht (0,5 µl in Ethanol gesättigte Sinapinsäure) benetzt und nach dem Trocknen mit 0,5 µl Probe versehen. Nach dem Trocknen wurde die Probe direkt vermessen. Als Standard für die externe Kalibrierung wurde Trypsinogen, Protein A und BSA verwendet.

2.7.7 CD-Spektrometrie

Die CD-Spektroskopie kann zur Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten in Proteinen verwendet werden. Neben den Sekundärstrukturanteilen können auch Denaturierungen durch Temperaturveränderungen, pH-Verschiebungen oder andere Substanzen (z.B. Harnstoff) detektiert werden. Die CD-spektroskopischen Messungen wurden im Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1) im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

2.7.7.1 Messen von CD-Spektren

Für die Messungen wurden die Proteinproben im Amicon Ultra-4 in 10 mM Kpi-Puffer pH 6,5 umgepuffert. Es wurden jeweils Proteinkonzentrationen von 50 - 100 µg/ml verwendet. Die Messungen fanden bei folgenden Standardbedingungen statt:

Wellenlängenbereich:	195 - 270 nm
Auflösung:	0,1 nm
Geschwindigkeit:	50 nm/min
Akkumulationen:	10 Spektren
Bandweite:	1 nm
Temperatur:	20°C
Stickstofffluss:	4 l/min

Zur Auswertung wurden die Programme CONTIN, SELCON, Yang und PREDATOR verwendet [151, 153, 152, 154].

2.8 Elektrophoretische Methoden und Proteinfärbungen

2.8.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE diente zur Reinheitskontrolle, zur Bestimmung des Molekulargewichts und zur Kontrolle der Expressionsleistung. Die Elektrophorese wurde mit 4 - 12 %igen Bis/Tris-Gelen des NuPAGE-Systems (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung wurden der pI und das Apo-/Holoenzym-Verhältnis der homogenen NOX mit nativen pH 3 - 10 IEF Gelen (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Gel wurde anschließend in 12 %iger TCA für 30 min fixiert und mit Coomassie Blau gefärbt.

2.8.3 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Blau

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

2.8.4 Konservierung der SDS- und IEF-Gele

Alle SDS- und IEF-Gele wurden zwischen zwei Cellophanmembranen (Invitrogen), die in der Lösung Gel-Dry Drying Solution (1x) von Invitrogen aufgeweicht wurden, mit Hilfe der Einspannvorrichtung des Herstellers 16 - 20 h bei RT getrocknet.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers unter Nutzung einer Mikrozentrifuge. Die Elution der Plasmid-DNA wurde standardmäßig mit 50 µl zehnfach verdünntem Elutionspuffer (EB) durchgeführt.

2.9.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Doppelsträngige DNA wurde zur Analyse und für präparative Zwecke über 0,8 %ige Agarosegele aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in der gewünschten Prozentigkeit in 0,5 x TBE-Puffer (0,045 M Tris-Borat, 0,001 M EDTA pH 8,0) gelöst, nach dem Abkühlen der Lösung auf 50°C wurde sie unter Zugabe von 0,05 % Ethidiumbromid in die Gelkammern gegossen. Laufpuffer in den Elektrophoresekammern war 0,5x TBE-Puffer. DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (6x DNA-Probenpuffer: 6x TAE, 50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt, so dass dessen Endkonzentration 1x war. Die Trennung erfolgte typischerweise bei 100 Volt. Marker IV von Roche und die DNA-Leiter (GeneRuler™) von MBI Fermentas wurden als interne Größenstandards benutzt. Die DNA-Gele wurden mit dem Eagle-Eye II Videosystem bei 312 nm dokumentiert.

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

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

2.9.4 Aufkonzentrieren von DNA-Proben

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

2.9.5 DNA-Restriktion

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

2.9.6 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

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

2.9.7 Ligation mittels T4-Ligase

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

2.9.8 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Hanahan hergestellt [167]. *E. coli*-Stämme wurden über Nacht in einer 5 ml-Vorkultur bei 37°C in LB-Medium angezogen. Die Hauptkultur wurde 0,1 %ig in 25 ml LB-Medium in einem 100 ml-Schüttelkolben angeimpft und bis zu einem OD₅₅₀ von 0,3 - 0,5 bei 37°C kultiviert. Danach wurde die Kultur in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, einige Minuten auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8,3 ml einer Lösung bestehend aus 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 11 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8, resuspendiert und anschließend für 1 - 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 2 ml Puffer bestehend aus 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 85 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,8, resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden in vorgekühlte Eppendorf-Caps gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erzeugten kompetenten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.9.9 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Kompetente Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz oder die Plasmid-DNA wurde hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 60 s auf 42°C erhitzt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen sofort auf Eis gekühlt. 300 µl LB-Medium wurden hinzugegeben und der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C für 16 - 18 h inkubiert. Je nach Plasmid enthielten die Agarplatten die dazu notwendigen Antibiotika (siehe II 2.1), um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

2.9.10 Herstellung der Primer

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

2.9.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifizierung des *nox*-, *apdaao*-, *tvdaao*-, *hplI*-, und *tora*-Gens aus genomischer DNA verwendet. Für alle Reaktionen wurde die Titanium-Taq-Polymerase von Clontech eingesetzt. Die Konzentrationen der Komponenten im Reaktionsansatz waren, wenn nicht anders erwähnt, 0,2 mM pro dNTP, 1 µM pro Primer und 1x Polymerase-Puffer. PCRs wurden standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Denaturierung	94°C	3 min	
2. Denaturierung	94°C	45 s	
3. Annealing	x °C	30 s	- T abhängig vom T _m der Primer
4. Extension	72°C	2 min	30 x zurück zu 2.
5. Endextension	72°C	10 min	

Zur Amplifizierung des *rolaao*-Gens wurde genomische DNA aus *R. opacus* verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 0,2 mM pro dNTP, 1 µM pro Primer und 1x Polymerase-Puffer. Außerdem wurden 10 % DMSO zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben, um die Zugänglichkeit der DNA zu erleichtern. Für die Fusion der RoLAAO- und torA-Sequenz wurde bei der PCR die Denaturierungstemperatur von 94 auf 96°C erhöht und die Primerkonzentration wurde auf 20 pM erniedrigt.

Die PCR wurde standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Denaturierung	94°C	3 min	
2. Denaturierung	94°C	45 s	
3. Annealing und Extension	68°C	2,5 min	30 x zurück zu 2.
4. Endextension	72°C	10 min	

2.9.12 Sequenzierung

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

2.10 Kristallisation der NOX und SeMetNOX

2.10.1 Enzympräparation und Vorbereitung der Probe

Die NOX und SeMetNOX aus *Lactobacillus brevis* wurde nach dem dreistufigen Standard-Reinigungsprotokoll aufgereinigt (II 2.3). Die Reinheit der Probe wurde routinemäßig mittels SDS-Gel, in Einzelfällen auch noch mit ESI-MS und MALDI/TOF-MS überprüft. Nach der Reinigung wurde die Probe mittels Ultrafiltration in 10 mM MES pH 6,5 umgepuffert.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration, die üblicherweise im Bereich von 0,6 mg/ml lag, unter Nutzung einer Amicon Ultra-4 auf 1,2 mg/ml erhöht. Die Proteinproben konnten in diesem Puffer bei -20°C über ein Jahr gelagert werden.

2.10.2 Kristallisationsbedingungen

Alle Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit „sitzenden Tropfen“ in Linbro-Platten (Hampton Research) mit jeweils 24 Reservoirs durchgeführt. Das Volumen der eingesetzten Reservoirlösungen betrug jeweils 300 µl. Auf dem Steg wurden 5 µl der Probe mit 1 µl der Reservoirlösung und gegebenenfalls mit 0,5 - 1 µl Additiven vorsichtig vermischt. Die Platten wurden mit durchsichtigem Klebeband luftdicht verschlossen und bei Temperaturen zwischen 12 und 25°C inkubiert. Die eingesetzten Reservoir- und Detergenzienlösungen

wurden entweder verschiedenen Screening Kits von Hampton Research entnommen oder unter Zusatz von 1 mM Natriumazid aus hochkonzentrierten Stammlösungen hergestellt.

2.10.3 Impfkristallisation

Aufgrund der zum Teil langen Wachstumszeiten der Kristalle und zur Züchtung kompakterer Kristalle wurden, neben den Kristallisationsansätzen, Impftechniken (*micro seeding*) nach der von Scheffzek et al. [168] beschriebenen Methode verwendet. Dabei wurden die Kristallisationsbedingungen so gewählt, dass die Fällungsmittelkonzentrationen keine Kristallkeimbildung mehr zuließen, vorhandene Kristalle sich jedoch nicht auflösten und weiter wachsen konnten (Fällungsmittelkonzentration um 5 bis 20 % verringert).

Zur Herstellung der Impfkeime wurden aus einem Kristallisationstropfen, in dem Kristallstrukturen entstanden waren, drei Verdünnungen (1:50, 1:200, 1:500) mit der Reservoirolösung des gleichen Ansatzes hergestellt. Diese Suspensionen wurden für einige Minuten auf höchster Stufe gevortext, um möglichst kleine Kristallbruchstücke zu erzeugen.

Ein Tag zuvor war eine Kristallisationsplatte (II 2.10.2) vorbereitet und zur Äquilibration bei 19°C inkubiert worden. Von den drei Kristallverdünnungen wurden jeweils 0,5 µl zu den sitzenden Tropfen pipettiert und die Platte erneut bei 19°C inkubiert.

2.11 Röntgendiffraktometrie

2.11.1 Kristallmontage und Diffraktionsmessungen

Alle Diffraktionsmessungen mit NOX-Kristallen wurden unter Cryobedingungen, d.h. bei 100 K durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden die Kristalle mit einem Nylonloop aus dem Kristallisationstropfen gefischt, in flüssigen Stickstoff getaucht und dort bis zur Messung gelagert. Die Kristalle konnten direkt aus dem Tropfen montiert und eingefroren werden, da die Kristallisationslösung selbst als Cryolösung geeignet war, d.h. sie erstarrt beim Schockgefrieren glasig und bildete keine Eiskristalle. Bei jeder Messung wurde der jeweilige Kristalle in seiner Nylonschleife mit Hilfe einer Cryozange auf den Goniometerkopf aufgesetzt und anschließend zentriert, so dass er zu jedem Zeitpunkt der Messung genau am Schnittpunkt zwischen Röntgenstrahl und Drehachse des Goniometers lag.

Die NOX-Kristalle wurden am Institut für Biochemie der Universität zu Köln mit einer Nonius-Drehanode (Typ FR591) bei 100K vermessen. Die Beugungsmuster wurden auf einem Bildspeicherplattendetektor der Firma MacScience (Typ Dip2030) aufgezeichnet. Folgende Parameter wurden standardmäßig bei den Messungen eingestellt:

Spannung der Röntgenröhre	45 kV
Stromstärke der Röntgenröhre	100 mA
Wellenlänge	1,5418 Å (CuK _α)
Monochromator	Doppelspiegel
Rotationswinkel pro Bild	1°
Kollimator	0,5 mm

Von ausgewählten Kristallen wurden Datensätze unter Verwendung von Synchrotronstrahlung an der Außenstation des EMBL in Hamburg gemessen. Die Messungen wurden an der Beamline BW7A (Multipol Wiggler, DORIS-Speicherring) bei 100K durchgeführt. Die Daten wurden mit einem CCD-Detektor der Firma MarResearch aufgezeichnet. Folgende Einstellungen wurden standardmäßig bei den Messungen gewählt:

Wellenlänge	1,078 Å
Detektorabstand	200 mm
Monochromator	Vorspiegel, Dreiwinkelmonochromator und gekrümmter Spiegel
Rotationswinkel	0,2°/Bild
Blenden	0,3 mm * 0,3 mm

2.12 Reduktion der Rohdaten

Die Diffraktionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket [141] indiziert, prozessiert und skaliert.

Die Strukturfaktoramplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE [139] aus den gemessenen Intensitäten berechnet. Zur Berechnung des freien R-Wertes wurden 5 % der gemessenen Reflexe mit UNIQUE [139] zufällig ausgewählt. Die Packungsdichte im Kristall und die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit wurde mit MATTHEWS_COEFF [139] berechnet. Die Selbstrotationsfunktion wurde mit GLRF [143] und native Pattersonfunktionen mit FFT [139] bestimmt.

2.13 Strukturlösung durch molekularen Ersatz

Die Struktur der NOX wurde durch molekularen Ersatz mit dem Programm AMORE [139] gelöst. Als Startmodell diente die Struktur der NADH-Peroxidase mit einer Auflösung von 2,45 Å (PDB-Kürzel 1F8W) [3]. Das Modell wurde für die Rechnungen auf das Poly-Alanin-Grundgerüst des Enzyms reduziert, d.h. alle Heteroatome (Wasser, FAD, NAD) und Seitenkettenatome wurden gelöscht. Die Rechnungen wurden in einem Auflösungsbereich von 4 Å - 20 Å durchgeführt. Die besten der von AMORE [139] ausgegebenen Lösungsvorschläge (Rotationswinkel und Translationsvektoren) wurden mit dem Programm LSQKAB [139] auf das Suchmodell angewendet. Anschließend wurden die Kristallpackungen mit dem kristallographischen Graphikprogramm O [144] auf Plausibilität überprüft. Die korrekte Kristallpackung ließ sich in der geschilderten Weise eindeutig identifizieren.

2.14 Modellbau und Verfeinerung

Ein erstes theoretisches Strukturmodell eines NOX-Monomers wurde aus der Struktur der NADH-Peroxidase per Internet mit SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) erstellt [155]. Dieses NOX-Modell wurde mit O [144] auf die Polyalaninkette des Suchmodells in seiner durch molekularen Ersatz gefundenen Orientierung und Position gefittet. Die übrigen sieben Monomere der asymmetrischen Einheit wurden entsprechend erstellt, so

dass schließlich ein in der Aminosäuresequenz korrektes Anfangsmodell der NOX-Kristallstruktur, bestehend aus acht Monomeren, vorlag.

Die weitere Verfeinerung erfolgte gegen den 2,9-Å-Synchrotrondatensatz im Wechsel mit den Programmen CNS [140] für rechnerische Anpassungen und O [144] für den manuellen Modellbau. Sie begann mit einer Starre-Körper-Verfeinerung aller acht Monomere. Anschließend wurde strenge nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) angewendet („NCS strict“-Strategie in CNS [140]), d.h. das ganze Optimierungsproblem wurde auf ein Monomer beschränkt, während die übrigen sieben Monomere im reziproken Raum in Form ihrer partiellen Strukturfaktoren berücksichtigt wurden. Ein FAD- und ein NAD⁺-Molekül sowie einige Wassermoleküle wurden eingebaut (Wassereinbau automatisch mit dem entsprechenden CNS-Modul). Außerdem wurden Fehler im Hauptkettenverlauf und in den Seitenketten korrigiert. Auf diese Weise konnte der freie R-Wert auf unter 28 % gesenkt werden (Auflösungsbereich 25 bis 2,9 Å).

Anschließend wurde aus dem optimierten Referenzmonomer erneut die komplette asymmetrische Einheit (acht Monomere) erzeugt, um im weiteren Verlauf individuelle Konformationsunterschiede zwischen den Monomeren zuzulassen. Bei den nachfolgenden Verfeinerungsrechnungen, mit denen die Verfeinerung abgeschlossen wurde, wurde weiterhin nicht-kristallographische Symmetrie berücksichtigt, allerdings nicht mehr streng, sondern flexibel („NCS restraint“-Strategie in CNS [140]). Der freie R-Wert konnte so schließlich auf 24,5 % gesenkt werden.

2.15 Computergrafik

Mit interaktiver Computergrafik wurden Molekülstrukturen und Elektronendichtekarten räumlich dargestellt. Das Programm BRAGI [145] diente in diesem Zusammenhang zur Visualisierung, Vergleich und Analyse von Proteinstrukturen. O [144] ist ein speziell für die Proteinkristallographie geschriebenes Programm. Wie bereits erwähnt, wurde es bei der Verfeinerung eingesetzt, um manuelle Anpassungen der Struktur an die Elektronendichtekarten vorzunehmen.

2.16 Validierung der Modelle

Während der Verfeinerung der Strukturen wurden die Modelle durch Validierungsroutinen der verwendeten Programme auf ihre stereochemische Validität überprüft. Ramachandran-Plots wurden mit PROCHECK angefertigt [169]. Die Sekundärelemente der Strukturen wurden mit DSSP bestimmt [147].

2.17 Proteinmodelling

Die räumliche Struktur der ApDAAO wurde mit der Methode der vergleichenden Modellierung (*homology modelling*) vorhergesagt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Proteine mit einer Sequenzidentität von über 25 % eine ähnliche Struktur aufweisen, d.h. der gleichen Faltungsfamilie angehören [170]. Die Versuche zur Homologiemodellierung der dreidimensionalen Struktur der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO wurden mit Hilfe des Programms SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) durchgeführt. Die Strukturen wurden mit dem Programm Swiss-Pdb Viewer (Version 3.7) bearbeitet.

2.18 Präparation von D- und L-Aminosäuren und chiralen Alkoholen

2.18.1 Einsatz ganzer Zellen

Tiefgefrorene BL21(DE3)/pDleu_nox, BL21(DE3)/pEtvdaao und BL21(DE3)/pEtvdaao_hpII-Zellen wurden aufgetaut. Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml suspendiert. Der Reaktionsansatz für die BL21(DE3)/pDleu_nox-Zellen enthielt 10 mM DL-Leucin und 0,2 mM NAD^+ in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0. Der Reaktionsansatz für die BL21(DE3)/pEtvdaao- und BL21(DE3)/pEtvdaao_hpII-Zellen hingegen enthielt 10 mM DL-Methionin in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0.

2.18.2 Einsatz freier Enzyme

2.18.2.1 ADHs und NOX

Partiell aufgereinigte NOX und ADHs wurden zur Racematspaltung von (*R,S*)-Alkoholen eingesetzt. Die Versuche wurden, wenn nicht anders erwähnt, im 1,5 ml-Maßstab in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM NAD^+ bei 30°C und 700 rpm durchgeführt. Da die Löslichkeit vieler verwendeter Alkohol-Substrate sehr schlecht ist, wurden die jeweiligen Substratlösungen vor dem Pipettieren auf die gewünschte Konzentration, sowohl bei den Umsetzungen, als auch bei der Bestimmung von kinetischen Daten, sehr gut gevortext.

2.18.2.2 AADHs und NOX

Zur Racematspaltung von DL-Aminosäuren wurden partiell aufgereinigte NOX und AADHs eingesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde die Racematspaltung im 1 ml-Maßstab in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM NAD^+ bei 30°C und 700 rpm durchgeführt.

2.18.2.3 AAOs

Partiell aufgereinigte ApDAAO und RoLAAO wurden zur Racemattrennung von DL-Aminosäuren verwendet. Die Versuche wurden im 1,5 - 10 ml-Maßstab in 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 7,6 durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 800 rpm auf einem Eppendorf-Schüttler.

2.18.3 Chirale Aminosäureanalytik mittels HPLC

Die Trennung und quantitative Analyse der Aminosäureenantiomere erfolgte über HPLC. Direkt nach der Probenahme wurde die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt und die Probe durch Zentrifugation geklärt. 20 µl einer geeignet verdünnten Probe wurden mit 180 µl 100 mM Natriumborat-Puffer pH 10,4 gemischt.

Die Probe wurde durch Zugabe von 20 µl Derivatisierungslösung (260 mM *N*-Isobutyryl-L-Cystein und 170 mM *o*-Phthaldialdehyd in 100 mM Natriumborat-Puffer pH 10,4) modifiziert (Abb. 8).

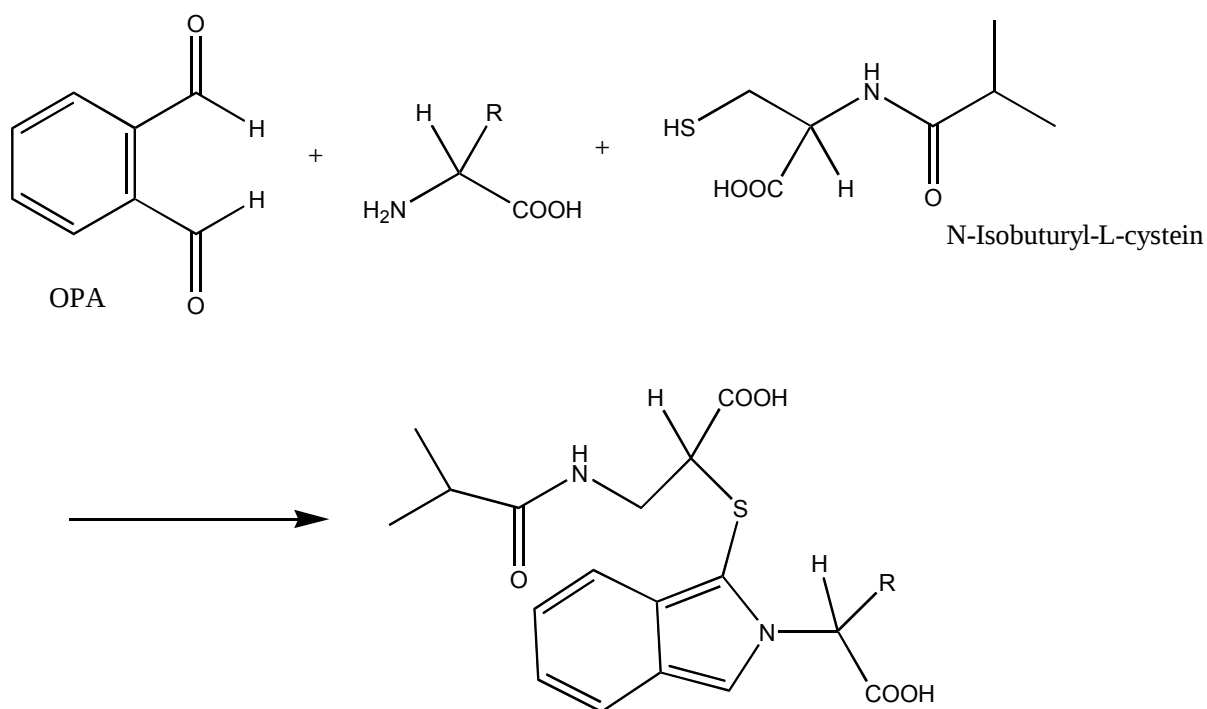


Abb. 8: Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA und N-Isobuturyl-L-Cystein.

Mit diesem Verfahren können bis zu 17 verschiedene D,L-Aminosäurepaare nach Derivatisierung (mit OPA und IBLC als chiralem Hilfsreagenz) zu diastereomeren Isoindol-derivaten getrennt und detektiert werden.

Die Analyse erfolgte unter Nutzung einer RP-18-Säule (h 250 x Ø 4 mm), die mit Kromasil, 5 µm, gepackt war (Phenomenex). Folgende Laufpuffer wurden zur Trennung der derivatisierten Aminosäuren eingesetzt: A - 23 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0, B - Acetonitril:Wasser (10:1,5). Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung (Ex. 340 nm, Em. 440 nm).

2.18.3.1 Berechnung des ee [%]-Wert

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

$$ee[\%]_D = \frac{D - L}{D + L} * 100$$

Wobei (D) > (L); (L) und (D) die Enantiomeranteile der Verbindung sind.

2.18.4 Chirale Alkoholanalytik mittels GC

Die Gaschromatographie ist für gasförmige bzw. flüchtige Proben anwendbar oder für solche, die sich durch Derivatisierung (v. a. Silanisierung) in flüchtige Substanzen überführen lassen. Aufgrund der sehr schnellen Gleichgewichtseinstellung ist die Gaschromatographie ein chromatographisches Verfahren, das sehr kurze Analysenzeiten ermöglicht. Die Nachweisgrenzen liegen bei 1 pg und sind als sehr genau einzustufen. Über eine CP-Enantiocyclodextrin-Säule ist auch eine Enantiomerentrennung möglich, da auf Grund der Chiralität der Cyclodextrinmoleküle die verschiedenen Isomere unterschiedliche lange an dem Säulenmaterial verweilen und somit die Retentionszeiten variieren, was durch die Chromatogramme dokumentiert wird.

Durch die Gaschromatographie kann deshalb auch die Enantiomersetzung von (S)-*p*-Cl-Phenylethanol zu *p*-Cl-Acetophenon, (S)-1-Phenylethanol zu Acetophenon, (S)-2-Octanol zu 2-Octanon und (S)-2-Hexanol zu 2-Hexanon mit der ADH aus *Rhodococcus erythropolis* ((S)-ADH), sowie die Enantioselektivität der ADH aus *Rhodococcus species* ((R)-ADH) detektiert werden, in dem die Retentionszeiten der Substanzen in den Proben über ein lineares Temperaturprogramm von 60°C - 180°C in 35 min bestimmt wurden. Als mobile Phase diente das inerte Trägergas Helium. Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden Proben eingesetzt, die die organischen Substanzen *p*-Cl-Acetophenon, Acetophenon, 2-Octanon und das racemische Gemisch (R,S)-*p*-Cl-Phenylethanol, (R,S)-1-Phenylethanol, (R,S)-Hexanol, (R,S)-Octanol in Essigsäureethylester gelöst enthielten.

Probenvorbereitung:

Direkt nach 100 µl Probenahme wurde 100 µl Essigsäureethylester hinzu gegeben und für 1 min gevortext. Anschließend wurde die Probe 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Esterphase für die GC-Analyse verwendet.

III Ergebnisse

1 NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (NOX)

Die ersten NADH-Oxidasen, die beschrieben wurden, waren H₂O₂-bildende NADH-Oxidasen und die Zahl beschriebener Enzyme dieser Gruppe ist größer als die der H₂O-bildenden NADH-Oxidasen.

In den letzten Jahren wurden verstärkt H₂O-bildende NADH-Oxidasen isoliert und auch heterolog exprimiert. Allerdings waren die erreichten Enzymaktivitäten relativ schlecht gegenüber anderen heterologen Expressionssystemen. Aus den Stämmen *Streptococcus faecalis*, *Serpulina hyodysenteriae* und *Leuconostoc mesenteroides* wurden heterolog zum Beispiel spezifische Aktivitäten von max. 6,0 U/mg erzielt [43, 40, 41].

Die H₂O-bildenden NADH-Oxidasen wurden in wenigen Fällen zur Regeneration von NAD⁺ angewendet. Durch Klonierung und Überexpression des *nox-2* aus *Streptococcus mutans* (H₂O-bildende NOX) in *Lactococcus lactis* konnte die NADH-Oxidase als Regenerierungsmittel für NAD⁺ zur Produktion von Diacetyl oder Acetoin aus Glucose genutzt werden [54, 55, 56]. Außerdem konnte durch Kopplung der NADH-Oxidase aus *Leuconostoc mesenteroides* (H₂O-Bildner) mit der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase eine stereospezifische Steroid-Oxidation erreicht werden [42]. Beide Anwendungen wurden nicht in einen größeren Produktionsmaßstab gebracht.

Da bislang eine H₂O-bildende NADH-Oxidase nicht überexprimiert werden konnte und auch in wenigen Fällen zur Regeneration von NAD⁺ angewendet wurde (s. oben), soll in dieser Arbeit eine neue H₂O-bildende NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* heterolog exprimiert, umfassend charakterisiert und als Regenerationsenzym für NAD⁺ in Kopplung mit NAD⁺-abhängigen Dehydrogenasen in der Racematspaltung von Alkoholen und Aminosäuren eingesetzt werden. Da bisher auch keine Struktur einer H₂O-bildenden NOX beschrieben wurde, soll die NOX aus *L. brevis* anschließend kristallisiert und die 3D-Struktur gelöst werden. Abschließend soll auch der Reaktionsmechanismus der H₂O-bildenden NOX aufgeklärt werden und mit anderen Reaktionsmechanismen verglichen werden.

1.1 Heterologe Expression der NOX und SeMetNOX

Die Restriktionskarte des *nox*-Gens (GI: 22653411) wurde erstellt, um die Auswahl geeigneter Schnittstellen für die Klonierung des Gens in verschiedene Expressionsvektoren zu ermöglichen.

1.1.1 Klonierung des *nox*-Gens in *E. coli*-Expressionsvektoren

Über PCR wurden Restriktionsschnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *nox*-Gens eingefügt. Die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors wurde jeweils so ausgesucht, dass die Entfernung zwischen dem Startcodon des Gens und der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors 6 bis 8 Basen betrug. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sind in Abbildung 9 dargestellt.

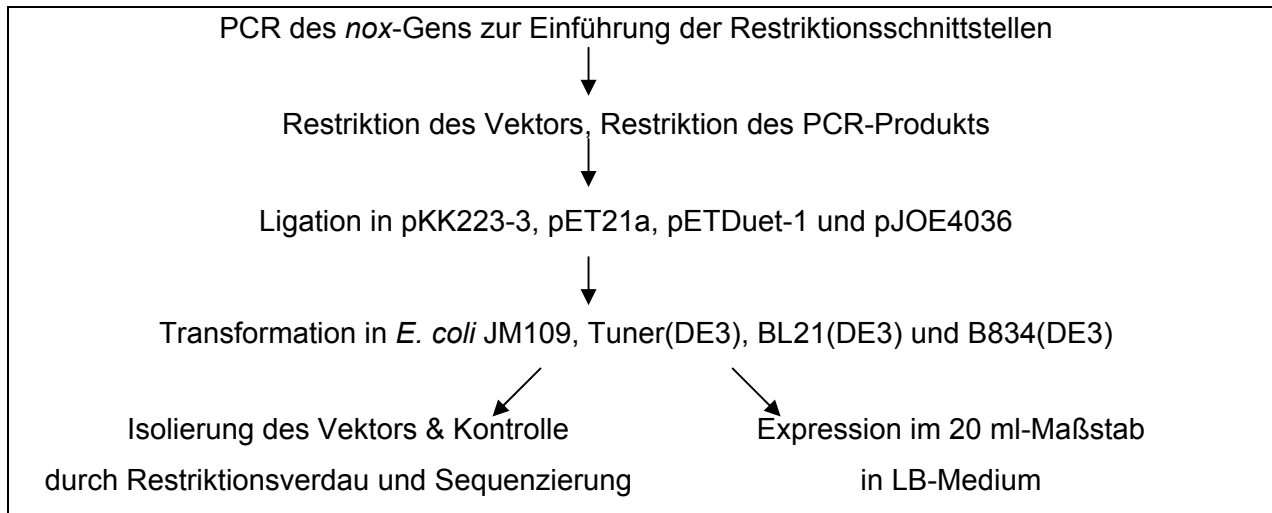


Abb. 9: Fließschema zur Klonierung des *nox*-Gens in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren.

Zur Expression der NOX wurde das Gen jeweils in die vier *E. coli*-Expressionsvektoren pKK223-3, pET21a, pETDuet-1 und pJOE4036 kloniert (Tab. 4).

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

Der Vektor pET21a enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Ampicillin-Resistenz, eine Ribosomenbindungsstelle für das Capsid-Gen des Phagen T7 und eine 'multiple cloning sites' mit 11 Schnittstellen.

Der Vektor pETDuet-1 enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Ampicillin-Resistenz, eine Ribosomenbindungsstelle für das Capsid-Gen des Phagen T7 und zwei 'multiple cloning sites' mit 12 (MCS1) und 13 (MCS2) Schnittstellen, die eine Coklonierung von zwei Genen ermöglichen.

Der Expressionsvektor pJOE4036 enthält den *rhaPBAD*-Promotor, der durch Rhamnose induziert wird. Die Ribosomenbindungsstelle stammt aus dem Capsidgen des Phagen T7. Weiterhin sind der Transkriptionsterminator *rrnB*, eine Ampicillin-Resistenz und eine 'multiple cloning site' mit 9 Schnittstellen Bestandteil des Vektors. Um eine Expression in *Rec*⁺-Stämmen zu ermöglichen, enthält der Vektor die *cer*-Region aus dem Plasmid ColE1 [171].

Tab. 4: Zusammenfassung der neuerstellten *E. coli*-Vektoren.

Name	Vektor	Insert	Restriktion		Primer	
			5'	3'	5'	3'
pKnox	pKK223-3	<i>nox</i>	EcoRI	PstI	EcoRIfor	PstIrev
pEnox	pET21a	<i>nox</i>	NdeI	BamHI	NdeIfor	BamHIrev
pDnox	pETDuet-1	<i>nox</i>	NdeI	EcoRV	NdeIfor	EcoRVrev
pJnox	pJOE4036	<i>nox</i>	NdeI	BamHI	NdeIfor	BamHIrev

1.1.2 Untersuchung der Expressionsbedingungen in *E. coli*

Umfassende Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen für die NOX in *E. coli*-Stämmen wurden durchgeführt. Der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, die Induktionstemperatur und -dauer wurden dabei variiert. Unterschiedliche *E. coli*-Stämme und Expressionsvektoren wurden eingesetzt. In allen der zellfreien Rohextrakte wurde NOX-Aktivität gemessen.

Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tabelle 5 zu sehen.

Tab. 5: Variation der Induktions- und Kultivierungsbedingungen für verschiedene Vektor-Wirt-Systeme.

Plasmid	<i>E. coli</i>	Induktor-konz. (IPTG/Rha*)	Induktions-dauer (h)	Induktions-zeitpunkt OD ₅₅₀	Induktions-temp. (°C)	NOX-Aktivität
pKnox	JM109	0 - 300 µM	3,5	0,5	30 - 37	+
pEnox	Tuner(DE3)	0 - 600 µM	2 - 10	0,3 - 1,0	25 - 37	+
pDnox	BL21(DE3)	100 µM	2,5 - 5	0,5	25 - 37	+
pDnox	Tuner(DE3)	100 µM	2,5 - 5	0,5	25 - 37	+
pJnox	BL21(DE3)	0,2 % *	3 - 4	0,5	37	+
pJnox	JM109	0,2 % *	3 - 4	0,5	37	+

Tab. 6 zeigt, dass spezifische Aktivitäten im Bereich von 40 bis zu 115 U/mg in den zellfreien Rohextrakten mit optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden.

Berücksichtigt man, dass das hochgereinigte, homogene NOX-Enzym eine spezifische Aktivität von 350 U/mg hat, bedeutet dies, dass die Stämme durchweg hohe Expressionsleistungen zeigen, zwischen 11 und 33 % des löslichen intrazellulären Proteins bestehen aus NOX.

Zur Expression der SeMetNOX wurde das rekombinante Expressionssystem mit den höchsten spezifische Aktivitäten (pEnox) in Methionin-auxotrophen *E. coli* B834(DE3) transformiert. Nach 16 Stunden Induktionsdauer und mit 100 µM IPTG wurde eine spezifische Aktivität von 27 U/mg im zellfreien Rohextrakt bestimmt (Tab. 6).

In keinem der Ansätze wurde weder die NOX noch die SeMetNOX als deutliche Bande im SDS-Gel in der unlöslichen Fraktion sichtbar.

Tab. 6: Heterologe Expression der NOX bzw. SeMetNOX. Die Induktion wurde bei 37°C und einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,5$ durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten wurden in den zellfreien Rohextrakten gemessen.

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor	Induktor-konzentration	Induktions-dauer (h)	spez. Aktivität (U/mg)
pKnox	JM109	IPTG	50 μ M	3	87
pEnox	Tuner(DE3)	IPTG	100 μ M	2	115
pDnox	BL21(DE3)	IPTG	100 μ M	2.5	81
pDnox	Tuner(DE3)	IPTG	100 μ M	5	67
pJnox	BL21(DE3)	Rhamnose	0,2 %	4	39
pJnox	JM109	Rhamnose	0,2 %	4	43
pEnox	B834(DE3)	IPTG	100 μ M	16	27

1.1.3 Untersuchung der FAD-Abhängigkeit der NOX und SeMetNOX

Für die NOX wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Expression sowohl des Holo- als auch des Apoenzyms mit *E. coli* Tuner(DE3)/pET21a/nox untersucht. Die Aussagen zur Synthese des Apo- und Holoenzym wurden anhand der Reaktivierung (Aktivitätstests) der NOX durch FAD-Zugabe in den Assay gemacht. Während der Anzucht der Zellen wurde die IPTG-Konzentration zwischen 0 - 600 μ M, die Induktionstemperatur zwischen 25 - 37°C variiert und der Induktionszeitpunkt wurde bei OD_{550} 0,5 beibehalten. Anschließend wurde die Aktivität der NOX im Rohextrakt in Gegenwart von 0-15 μ M FAD bestimmt. Die Aktivitätsmessungen sind in Abb. 10 und 11 zusammengefasst und zeigen folgende Ergebnisse:

Zum einen ist hervorzuheben, dass bei Verwendung der Tuner(DE3)-Stammes insgesamt ein sehr hohes Expressionsniveau mit einer Aktivität von 120 bis 150 U/mg (Abb. 10 und 11) im Rohextrakt erreicht wurde. Bei einer spezifischen Aktivität des homogenen Enzyms von ca. 350 U/mg bedeutet dies, dass bsi zu 43 % des löslichen intrazellulären Proteins als NOX-Enzym vorliegen.

Zum anderen zeigen die Versuche, dass die intrazelluläre Konzentration an FAD nicht mehr ausreicht, das Enzym vollständig mit dem Coenzym zu versorgen. Wird der Stamm während der Induktionsphase bei 25°C und 30°C (600 μ M IPTG) kultiviert, misst man eine Enzymaktivität von ca. 20 U/mg. Offensichtlich ist aber die Proteinexpression weitaus höher, allerdings wird dann inaktives Protein (Apo-Protein) gebildet. Interessanterweise lässt sich dieses Protein durch nachträglichen FAD-Zusatz *in vitro* dann auf das ca. 5 bis 6^{1/2}-fache aktivieren, man erreicht dann ca. 120 U/mg oder 130 U/mg (Abb. 10). Bei einer Anzucht bei 37°C und 100 μ M IPTG wird mehr FAD in das Enzymprotein eingebaut, man erreicht dann 80 statt 20 U/mg

(Abb. 11 A). Allerdings liegt auch hier noch ein Teil des Enzyms als Apo-Protein vor, ein *in vitro*-Zusatz von FAD ergibt eine Steigerung auf ca. 150 U/mg.

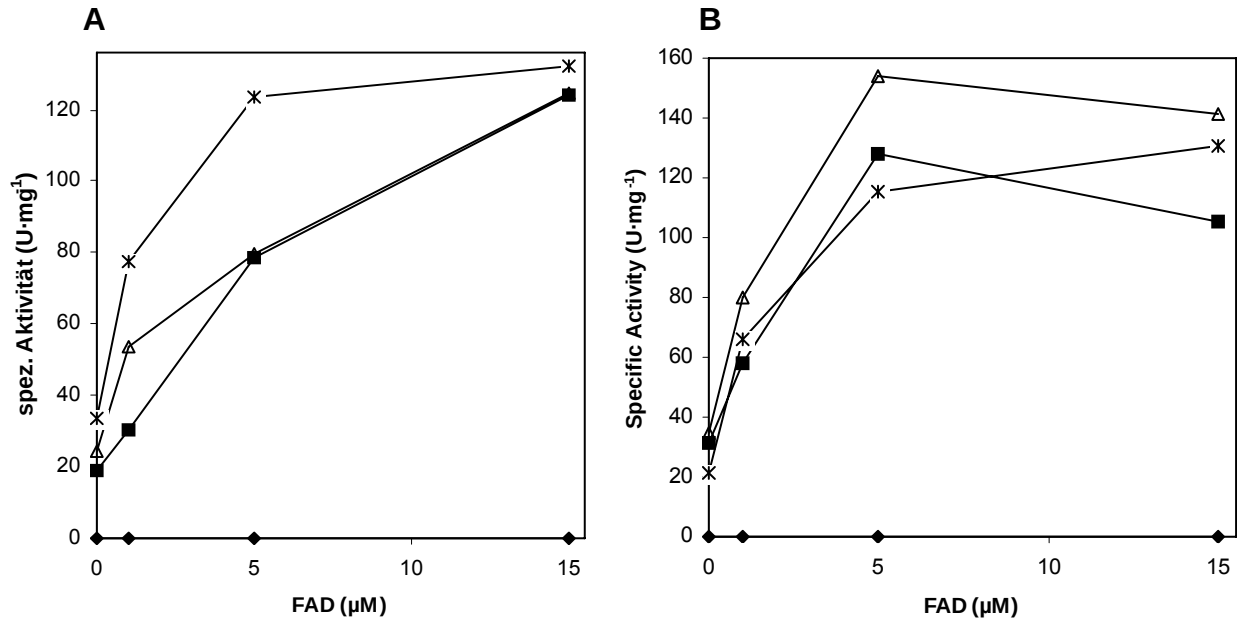


Abb. 10: FAD-Abhängigkeit der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox mit Variation der Induktorkonzentration bei **(A)** 25°C und **(B)** 30°C Induktionstemperatur, (◆) 0 μM IPTG, (■) 100 μM IPTG, (△) 300 μM IPTG, (*) 600 μM IPTG (Induktionsdauer 4 h). Die FAD-Zugabe erfolgte in den Rohextrakt.

Dieselben Versuche zur Synthese von Apo- und Holoenzym wurden mit der SeMetNOX durchgeführt. Abbildung 11 B zeigt, dass die SeMetNOX-Aktivität durch Zugabe von bis zu 15 μM FAD in den Assay um das 3-fache von 24 U/mg auf 68 U/mg erhöht wird. Da das NOX-Protein eine ähnliche Aktivitätssteigerung durch Zugabe von FAD zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass der Einbau von 13 Selenomethioninen in das NOX-Protein keinen anderen Effekt bezüglich der FAD-Abhängigkeit (s. oben) bewirkt.

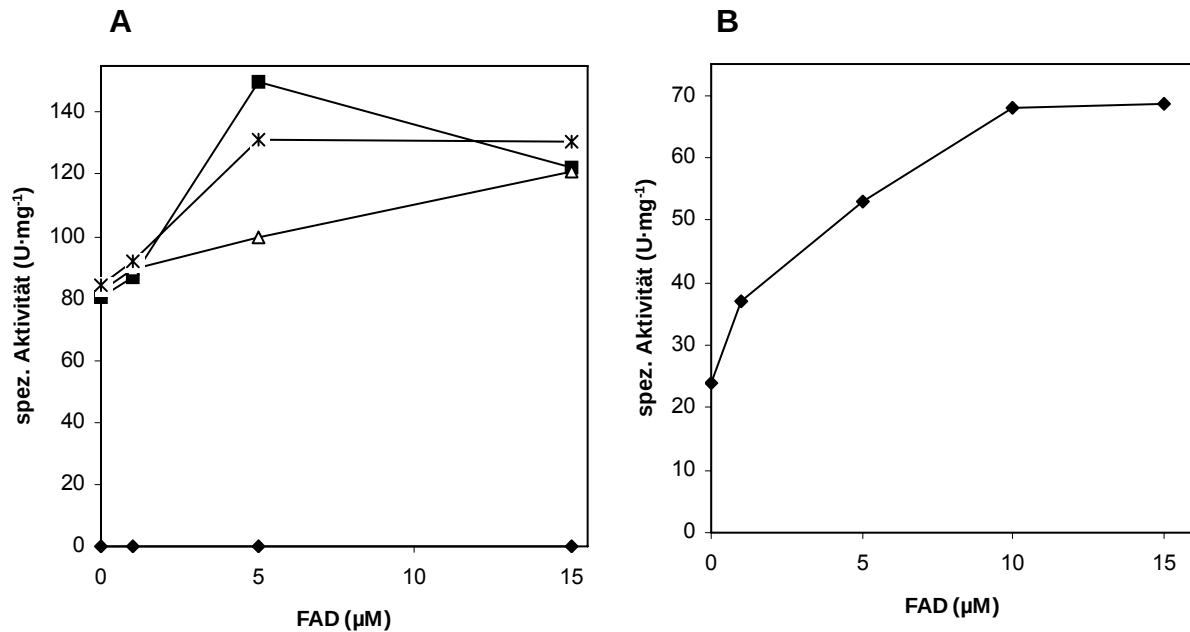


Abb. 11: (A) FAD-Abhängigkeit der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox mit Variation der Induktorkonzentration bei 37°C Induktionstemperatur, ($\blacklozenge$) 0 μM IPTG, ($\blacksquare$) 100 μM IPTG, ($\triangle$) 300 μM IPTG, ($\times$) 600 μM IPTG (B) FAD-Abhängigkeit der SeMetNOX aus B834(DE3)/pEnox (Induktionsdauer 4 h bei 37°C Induktionstemperatur). Unterschiedliche FAD-Konzentrationen wurden in den Rohextrakt gegeben.

Neben der FAD-Abhängigkeit im Assay wurde auch der Einfluss von FAD und Riboflavin (Vorstufe von FAD) im Medium auf die Bildung von NOX-Holo- und Apoenzym untersucht. Die Aktivitätsmessungen sind in Abb. 12 zusammengefasst und zeigen folgende Ergebnisse: Ein Zusatz von FAD zum Medium hat keinen Einfluss auf die Bildung von NOX-Holo- oder Apoenzym, während Riboflavin als Vorstufe der FAD-Biosynthese einen steigernden Einfluss zeigt (Erhöhung auf ca. 160 %).

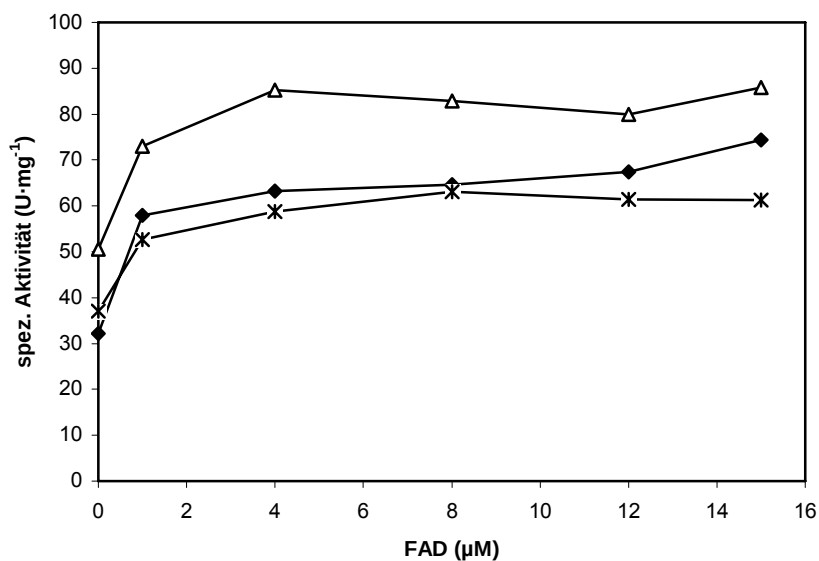


Abb. 12: Einfluss von FAD und Riboflavin auf die Bildung von NOX-Holoenzym ohne Additive ($\blacklozenge$), in Anwesenheit von 50 μM FAD ($\times$) oder 50 μM Riboflavin ($\triangle$) im Medium (Induktionsdauer 4 h).

1.1.4 Expression von FAD-defizienter NOX

Aufbauend auf den Ergebnisse aus Abschnitt 1.1.3 sollte versucht werden, durch Auswahl geeigneter Expressionsbedingungen NOX als Apoenzym, möglichst ohne Holoenzym zu exprimieren. Für technische Zwecke ist die Expression von Holoenzym von großem Vorteil, da annähernd die komplette Enzymaktivität für die Biokatalyse genutzt werden kann. Hingegen durch die Gewinnung von Apoenzym können Redoxvorgänge mit Cofaktor-Analogons wie z.B. 2-thio-FAD [172] detaillierter und umfassender untersucht werden.

Während der Anzucht der Zellen wurde die IPTG-Konzentration zwischen 100 - 600 μM , die Induktionstemperatur zwischen 28 - 37°C, das Medium zwischen LB und TB variiert und der Induktionszeitpunkt wurde bei OD_{550} 0,5 beibehalten. Danach wurde die NOX-Aktivität im Rohextrakt in Gegenwart von 0 - 15 μM FAD bestimmt. In Abb. 13 sind die Expressions-ergebnisse dargestellt, bei denen die höchste NOX-Apoenzym-Bildung beobachtet wurde.

Wird der Stamm während der Induktionsphase bei 28°C oder 30°C in LB-Medium (Hefeextrakt, Trypton und NaCl) mit 100 μM IPTG kultiviert, misst man eine Enzymaktivität von ca. 38 U/mg bzw. 18 U/mg. Durch nachträgliche FAD-Zugabe *in vitro* lässt sich dieses Protein auf das 4-fache bzw. sogar auf das 8-fache aktivieren, man erreicht dann ca. 136 U/mg bzw. 145 U/mg. Hingegen wurde bei der Expression von NOX-Apoenzym bei 28°C oder 30°C in TB-Medium (Hefeextrakt, Trypton, Kpi und Glycerol) durch FAD-Zusatz nur eine $3\frac{1}{2}$ - bis 4-fache Aktivierung des NOX-Apoenzym erreicht.

Durch Optimierung der Expressionsbedingungen für das NOX-Apoenzym konnte Enzympräparat erhalten werden, das zu ca. 90 % aus Apoenzym besteht.

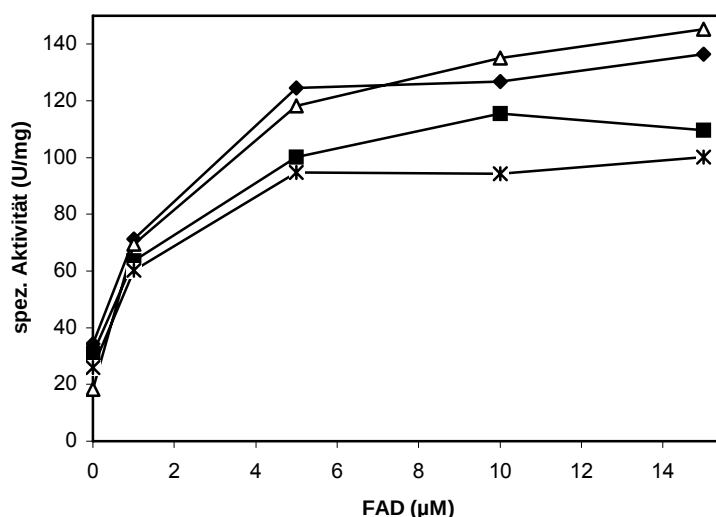


Abb. 13: FAD-Abhängigkeit der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox mit Variation der Induktionstemperatur mit 100 μM Induktorkonzentration, (◆) LB-Medium, 28°C, (△) LB-Medium, 30°C, (■) TB-Medium, 28°C, (*) TB-Medium, 30°C (Induktionsdauer 4 h).

1.2 Reinigung der NOX und SeMetNOX

Für die NOX aus *E. coli* wurde ein Aufreinigungsprotokoll im Labormaßstab entwickelt.

Isolierung aus 3 g Zellfeuchtmasse

Die rekombinante NOX (Tuner (DE3) Zellen mit pEnox) und SeMetNOX (B834(DE3) Zellen mit pEnox) wurden durch drei verschiedene säulenchromatographische Trennverfahren gereinigt (Tab. 7 und 8). Die Chromatogramme dieser einzelnen Reinigungsschritte sind im Anhang (VII1, Abb. 85 - 87) dargestellt. Da sich während der Aufreinigung der NOX und SeMetNOX kaum Unterschiede ergaben, wird im Anhang nur die Reinigungschromatogramme der NOX dargestellt.

Die spezifische Aktivität der NOX von 40 U/mg im Rohextrakt konnte fast auf das 9-fache auf 350 U/mg nach drei chromatographischen Schritten gesteigert werden. Es wurde eine Gesamtaktivität von 2098 U aus 3 g Zellen (Nassgewicht) erzielt, welches 41 % der Aktivität im Rohextrakt entspricht.

Tab. 7: Reinigungsschema der NOX nach heterologer Expression in *E. coli* Tuner (DE3).

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (ml)	spez. Aktivität (U/mg)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	5080	125	10	40,7	1,0	100
Q-Sepharose	6052	77	8,6	78,4	1,9	119
Phenylsepharose	2238	9,6	40	233	5,7	44
Glefiltration	2098	6	13	350	8,6	41

Gleichzeitig konnte die spezifische Aktivität der SeMetNOX von 30 U/mg im Rohextrakt um das 9-fache auf 275 U/mg nach den drei chromatographischen Schritten erhöht werden.

Tab. 8: Reinigungsschema der SeMetNOX nach heterologer Expression in *E. coli* B834(DE3).

	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- protein (mg)	Volumen (ml)	spez. Aktivität (U/mg)	Reinigungs- faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	3120	104	12	30	1,0	100
Q-Sepharose	3311	55	9,5	60,2	2,0	106
Phenylsepharose	1404	8,5	36	165	5,5	45
Glefiltration	1217	4,4	10	275	9,2	39

Die Reinheitskontrolle in einem coomassiegefärbten SDS-Gel zeigte eine homogene NOX- bzw. SeMetNOX-Präparation (Abb. 14).

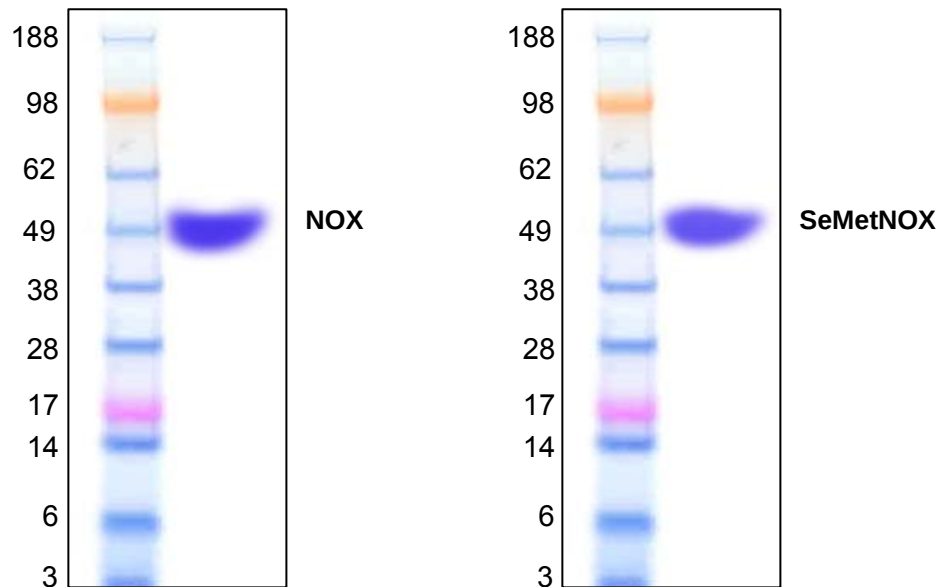


Abb. 14: SDS-PAGE der aufgereinigten NOX aus Tuner(DE3)/pEnox und SeMetNOX aus B834(DE3)/pEnox.

1.3 Biochemische Charakterisierung der NOX und SeMetNOX

1.3.1 Lagerstabilität

Die NOX ließ sich über ca. 7 Wochen bei -20°C und 4°C in 50 mM Kpi-Puffer pH 6,5 mit geringen Aktivitätsverlust lagern (Abb. 15). Eingesetzt wurde für die Versuche ein Präparat, das chromatographisch (nach IEC und HIC) gereinigt worden ist, der Proteingehalt betrug 9,5 mg/ml. Abbildung 15 zeigt, dass eine Lagerung der NOX mit geringem Aktivitätsverlust bei -20°C am besten geeignet ist.

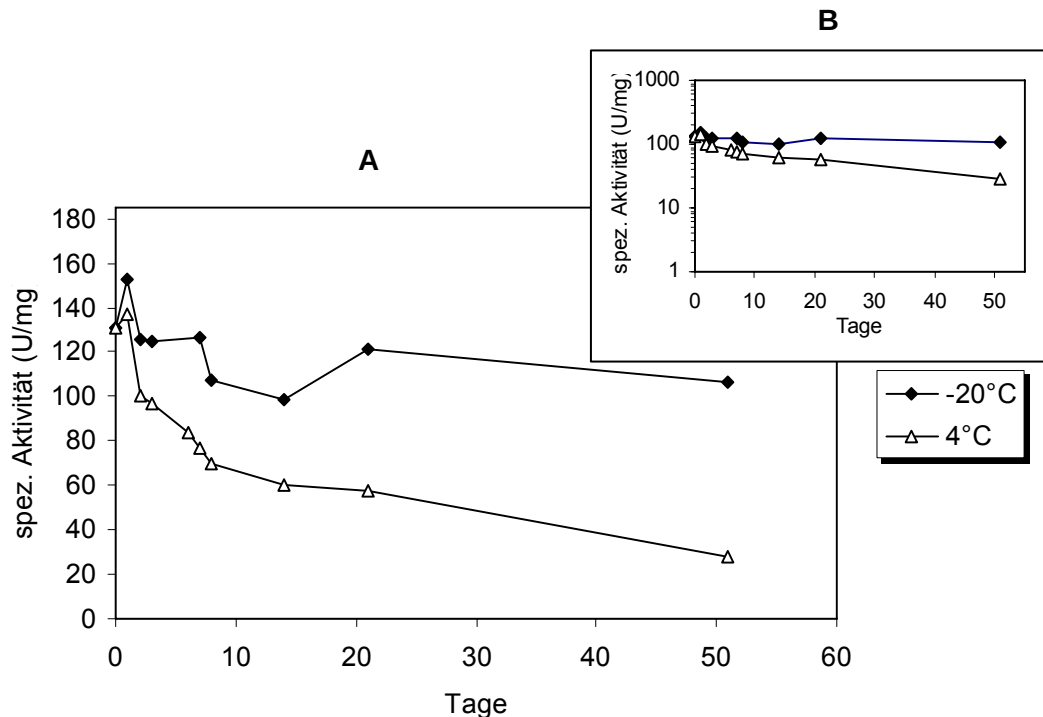


Abb. 15: Lagerstabilität der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox über 7 Wochen **(A)** spez. Aktivität gegen die Zeit aufgetragen; **(B)** log spez. Aktivität gegen die Zeit aufgetragen, (♦) -20°C, (△) 4°C.

Außerdem wurde die Stabilität der NOX mit unterschiedlichen Zusätzen untersucht, um festzustellen, welche Reagenzien die NOX stabilisieren (Abb. 16). DTT und β -Mercaptoethanol schützen viele Enzyme, die ein Cystein im aktiven Zentrum enthalten, vor Oxidation. NAD^+ und FAD sind die Cofaktoren der NOX, die eventuell auch stabilisierende Effekte zeigen könnten. Die Lagerung mit 5 mM DTT, 0,5 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mM FAD und 10 mM NAD^+ wurde bei 4°C durchgeführt. Bei -20°C wurde die Stabilität der NOX mit 50 % Glycerin untersucht. Keiner der Zusätze bringt eine verbesserte Lagerstabilität der NOX im Vergleich zur Lagerung ohne Zusätze bei -20°C (s. Abb. 15). Auffallend ist, dass mit den SH-Reagenzien (DTT und β -Mercaptoethanol) die höchsten Aktivitätswerte zum Zeitpunkt Null erhalten wurden. Anscheinend wird das Cystein im aktiven Zentrum der NOX zu Beginn der Lagerung durch die beiden SH-Reagenzien gut vor Oxidation geschützt.

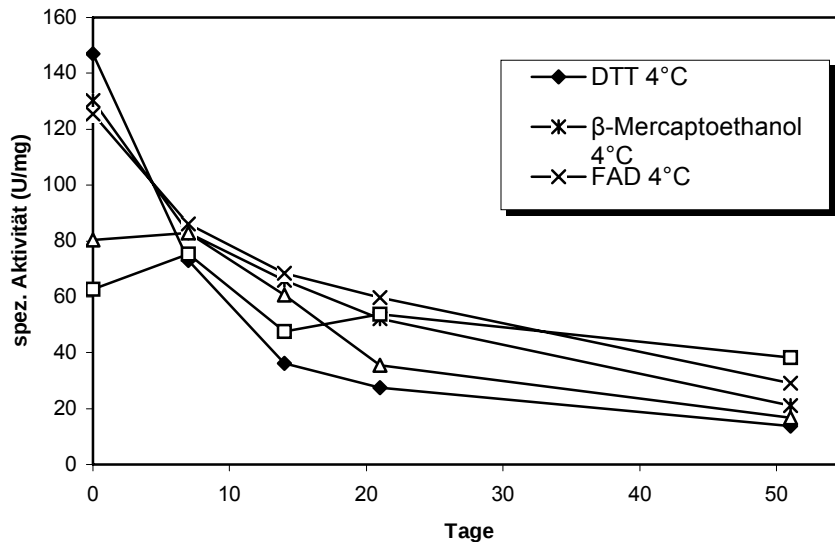


Abb. 16: Lagerstabilität der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox über 7 Wochen bei -20°C und 4°C mit unterschiedlichen Zusätzen.

Die SeMetNOX ließ sich wie die NOX über ca. 7 Wochen bei -20°C und 4°C in 50 mM Kpi-Puffer/ 3 mM DTT pH 6,5 mit geringem Aktivitätsverlust lagern (Abb. 16). Eingesetzt wurde für die Versuche ein Präparat, das chromatographisch (nach IEC und HIC) gereinigt worden ist, der Proteingehalt betrug 8,4 mg/ml. Abb. 17 zeigt, dass eine Lagerung der SeMetNOX mit geringem Aktivitätsverlust bei -20°C am besten geeignet ist. Eine drastische Verbesserung der Lagerstabilität wurde im Vergleich zur NOX ohne FAD bei 4°C (s. oben), durch Zugabe von 15 µM FAD in die SeMetNOX-Lösung bei -20°C Lagertemperatur erzielt. Hingegen bei 4°C Lagertemperatur zeigte die FAD-Zugabe nur eine geringe Verbesserung der SeMetNOX-Lagerstabilität.

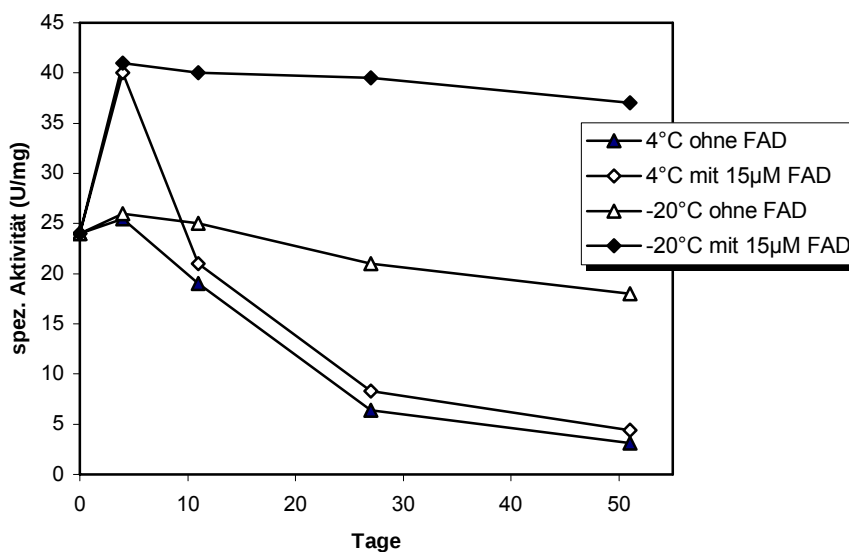


Abb. 17: Lagerstabilität der SeMetNOX aus B834(DE3)/pEnox über 7 Wochen bei -20°C und 4°C mit und ohne 15 µM FAD-Zugabe.

1.3.2 pH-Optimum

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der NOX und SeMetNOX gegenüber dem Substrat NADH wurde in zwei verschiedenen Puffern untersucht (50 mM Kpi/HCl pH 5,6 - 8,0, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 - 9,0). Das pH-Optimum lag für das Substrat NADH im schwach sauren Bereich bei pH 6,0 (Abb. 18). Die eingesetzten Puffer und Salze beeinflussten die Enzymaktivität unterschiedlich stark.

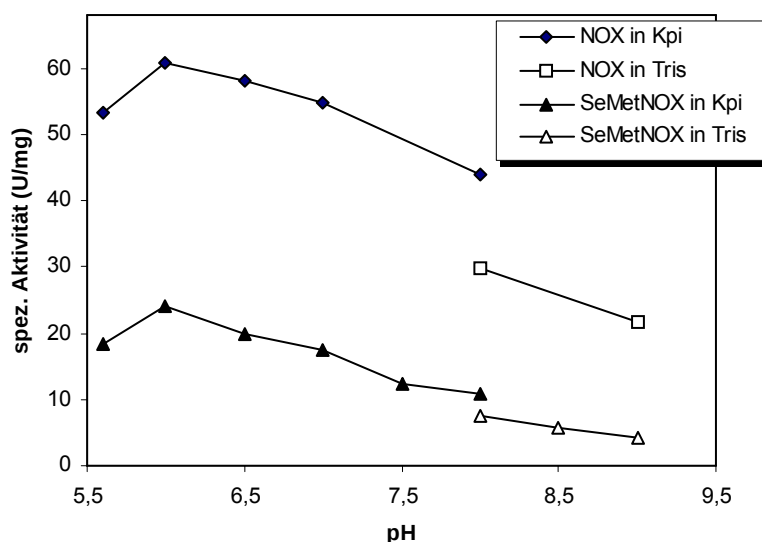


Abb. 18: pH-Optimum der rekombinanten NOX aus Tuner(DE3)/pEnox und SeMetNOX aus B834(DE3) in verschiedenen Puffern und Salzen.

In den oben genannten Puffern und Salzen wurde auch das pH-Optimum der sechs NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen untersucht, die im Folgenden für präparativen Anwendungen eingesetzt wurden. Mit diesen Untersuchungen sollte ein gemeinsamer pH-Wert der NOX und der Dehydrogenasen gefunden werden, um die Kopplung beider Enzyme für eine Racematspaltung zu nutzen.

Da ein eingeschränkter pH-Bereich von 5,6 - 9,0 für die NOX ermittelt wurde, war es schwierig, einen pH-Wert zu finden, bei dem auch die Dehydrogenasen aktiv sind. Untersuchungen im Messbereich von pH 6,0 - 9,0 zeigten, dass die GluDH und die LeuDH ihr pH-Optimum in Tris/HCl-Puffer pH 9,0 haben. Die (*R*)-ADH hatte ihr pH-Optimum in Kpi-Puffer pH 8,0 und die (*S*)-ADH in Tris/HCl-Puffer pH 8,0. Um den pH-Überschneidungsbereich der beiden Enzyme deutlich zu sehen, wurden die pH-Messungen der NOX und der Dehydrogenasen in eine Graphik aufgetragen (Abb. 19 und 20).

Anhand der Abb. 19 und 20 wurde der optimale pH-Bereich für die NOX und die Dehydrogenasen (Oxidationsreaktion) bestimmt. Für die NOX und die GluDH, LeuDH und die (*S*)-ADH wurde als pH-Überschneidungsbereich Tris/HCl-Puffer pH 8,0 ausgewählt. Für die NOX und die (*R*)-ADH wurde Kpi-Puffer pH 8,0 als optimaler pH-Wert für beide Enzyme bestimmt.

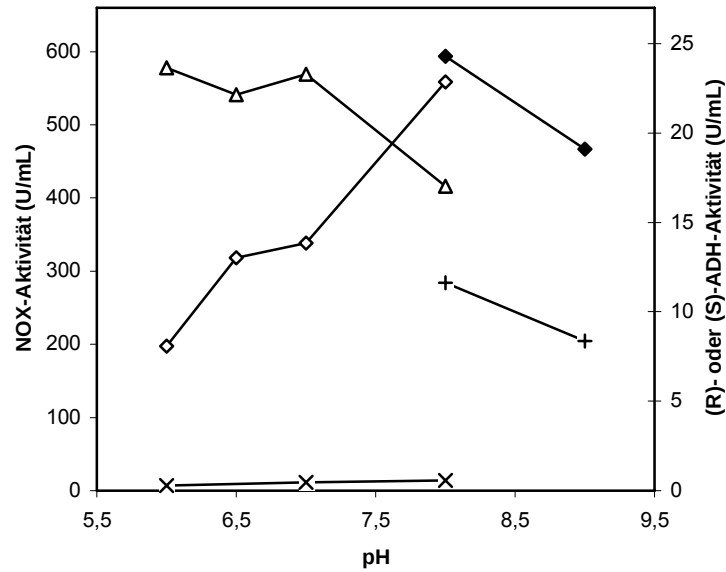


Abb. 19: Aktivität der NOX, der (S)-ADH und der (R)-ADH in verschiedenen Puffersystemen (NOX-Aktivität in Kpi-Puffer ($\triangle$) und in Tris/HCl-Puffer (+), (S)-ADH-Aktivität in Kpi-Puffer ($\square$) und in Tris/HCl-Puffer ($\blacksquare$), (R)-ADH-Aktivität in Kpi-Puffer (x)).

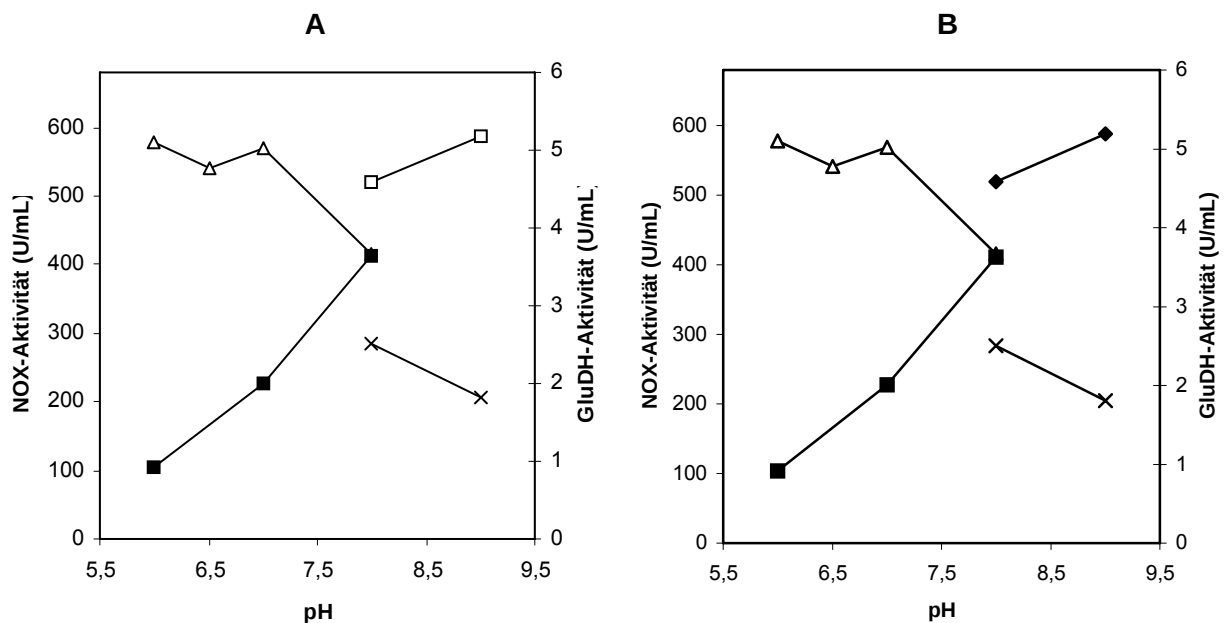


Abb. 20: Aktivität der NOX, GluDH und der LeuDH in verschiedenen Puffersystemen (NOX-Aktivität in Kpi-Puffer ($\triangle$) und in Tris/HCl-Puffer (x), **(A)** GluDH-Aktivität in Kpi-Puffer ($\blacksquare$) und in Tris/HCl-Puffer ($\square$), **(B)** LeuDH-Aktivität in Kpi-Puffer ($\blacksquare$) und in Tris/HCl-Puffer ($\blacklozenge$)).

1.3.3 Kinetische Konstanten

Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt, indem man die verschiedenen Substrate in unterschiedlichen Konzentrationen im Standard-Enzymtest einsetzte.

In der Modellierung mit dem MicroMath Scientist Programm wurde die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) oder die Erweiterung dieser Gleichung für eine Substratüberschussinhibierung (Gl. 2) eingesetzt.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Gl. 1: V = Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, $V_{\max}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit,
 S = Substratkonzentration, K_M = Michaelis-Menten-Konstante.

$$V = V_{\max} * \frac{[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}}$$

Gl. 2: K_i = Inhibitionskonstante des Substrates.

Die kinetischen Konstanten der NOX und SeMetNOX wurden für das Standardsubstrat NADH gemessen (Abb. 21).

Für die rekombinante NOX wurde ein $V_{\max}$ -Wert von 194 ± 7 U/mg und ein K_M -Wert von $0,018 \pm 0,003$ mM bestimmt. Hingegen für die rekombinante SeMetNOX wurde ein $V_{\max}$ -Wert von 278 ± 9 U/mg und ein K_M -Wert von $0,014 \pm 0,004$ mM bestimmt. Im Messbereich bis 0,3 mM NADH wurde keine Substratüberschussinhibierung beobachtet.

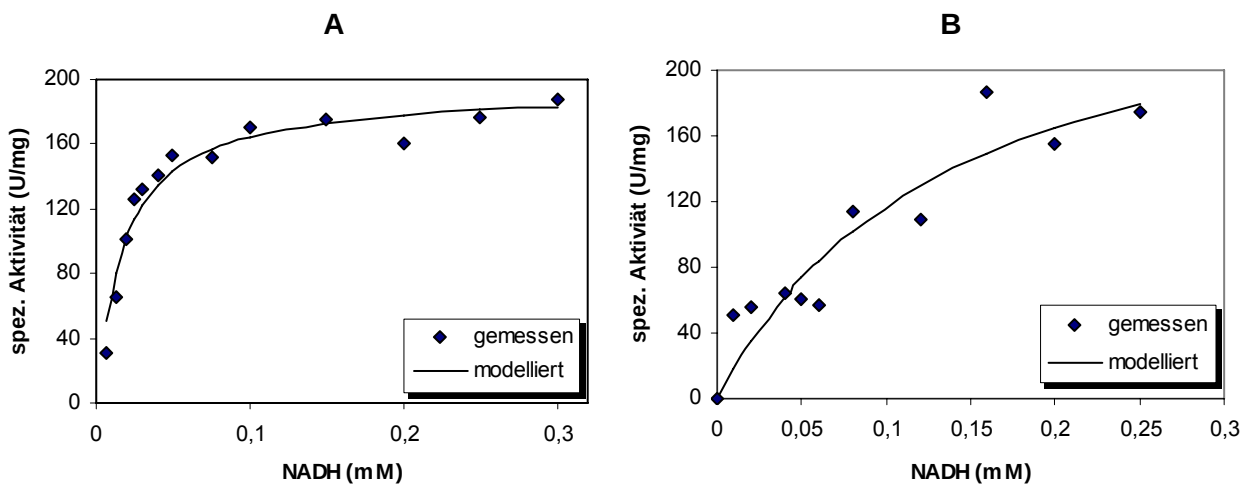


Abb. 21: Michaelis-Menten-Kinetik für **(A)** die NOX aus Tuner(DE3)/pEnox und **(B)** die SeMetNOX aus B834(DE3)/pEnox zur Bestimmung von K_M und $V_{\max}$.

1.3.4 Inhibitions- und Inaktivierungsstudien

Da unter anderem die 3D-Struktur und der Reaktionsmechanismus der NOX in dieser Arbeit aufgeklärt werden soll, wurden in diesem Zusammenhang auch NOX-Inhibitor-Komplexe untersucht. Mit Hilfe der NOX-Inhibitor-Komplexe bzw. NOX-Inhibitor-Strukturen können zusätzliche Informationen zur 3D-Struktur und zu dem Reaktionsmechanismus der NOX

gewonnen werden. Aufgrund dessen wurde nach einigen Inhibitoren gesucht und der Einfluss dieser Inhibitoren auf die NOX-Aktivität wurde untersucht. Für die NADH-Oxidasen werden in der Literatur generell drei Inhibitoren (ATP, DCP und Quinacrin) [173, 41] beschrieben. Für die Inhibierungsexperimente wurden auch diese Reagenzien ATP, DCP und Quinacrin verwendet. Um den genauen Einfluss dieser Reagenzien auf die NOX-Aktivität zu untersuchen, wurden kinetische Daten der NOX nur mit NADH als Substrat und NADH mit konstant 10 μM ATP, 20 μM DPI oder 125 μM Quinacrin bestimmt. Die kinetischen Messungen sind in Abb. 22 dargestellt und zeigen folgende Ergebnisse (Tab. 9):

Sowohl das ATP, DPI als auch das Quinacrine inhibieren die NOX deutlich. Die $V_{\max}$ -Werte für NADH werden durch DPI, ATP stark und durch Quinacrin geringer erniedrigt. Die K_M -Werte für NADH mit ATP, DPI und Quinacrin hingegen verändern sich nur geringfügig gegenüber dem K_M -Wert für NADH ohne Inhibitor.

Da sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht die K_M -Werte, sondern nur die $V_{\max}$ -Werte ändern, spricht diese Art der Hemmung für einen nicht-kompetitiven Mechanismus.

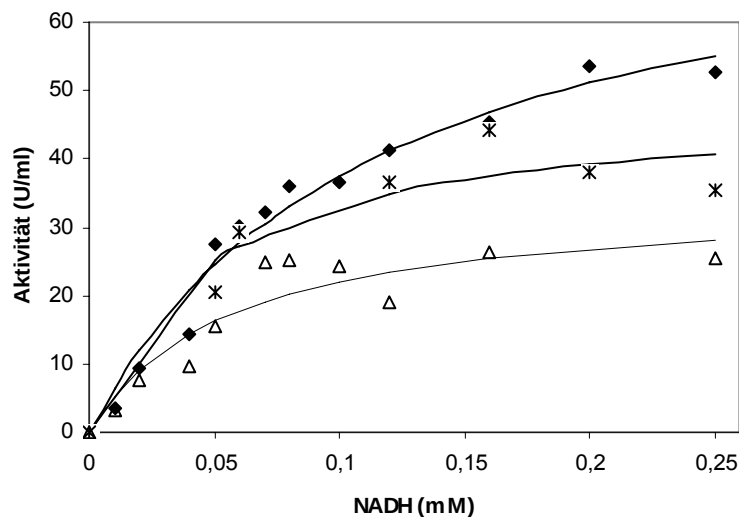


Abb. 22: Einfluss von ATP und DPI auf die NOX-Aktivität. Enzymaktivität ohne Inhibitor (◆) und in Anwesenheit von 10 μM ATP (*) oder 20 μM DPI (△).

Tab. 9: Kinetische Daten der NOX bestimmt für das Substrat NADH in An- und Abwesenheit von Inhibitoren. 100 % entspricht 80,3 U/ml.

Substrat	Gemessen in Anwesenheit von	K_M (mM)	$V_{\max}$ (%)
NADH	-	0,18	100
NADH	10 μM ATP	0,17	60
NADH	10 μM 2'-I-ATP	0,19	62
NADH	20 μM DPI	0,20	43
NADH	125 μM Quinacrin	0,16	93

Neben ATP wurde auch das halogenierte 2^3I -ATP als Inhibitor getestet. Das 2^3I -ATP zeigte ähnliche inhibitorische Eigenschaften gegenüber der NOX wie das ATP. Mit Hilfe des 2^3I -ATP-NOX-Komplexes könnte alternativ zum molekularen Ersatz die 3D-Struktur der NOX durch anormale Dispersion (SAD, MAD) gelöst werden.

1.4 Proteinchemische Charakterisierung der NOX und SeMetNOX

1.4.1 Molekulargewicht der NOX und SeMetNOX

Das Molekulargewicht der nativen NOX wurde mittels Gelfiltration bestimmt und lag nach dieser Methode bei 196 kDa (Abb. 23).

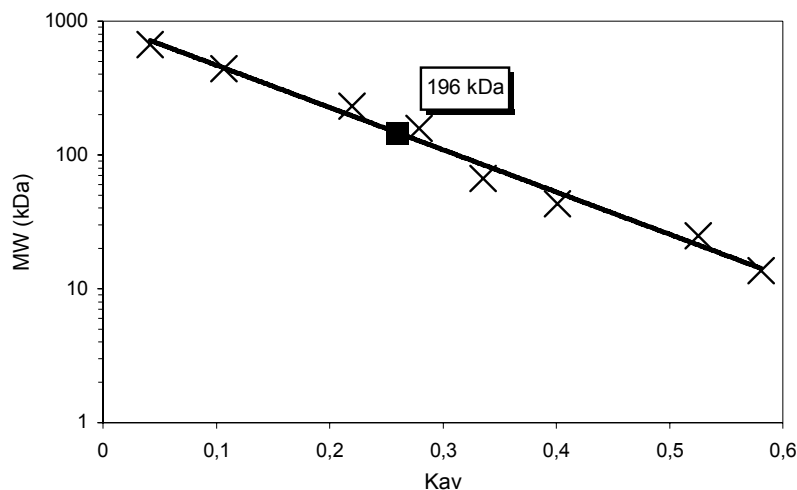


Abb. 23: Bestimmung des Molekulargewichts der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox über Gelfiltration mit Superdex G200 (x: Eichproteine, ■ NOX).

Nach Analyse der SDS-PAGE mit homogen aufgereinigter NOX wurde für die NOX ein Molekulargewicht von 49 kDa bestimmt, welches dem aus der Primärsequenz berechneten Molekulargewicht von 48985 Da nahe kommt. Daraus folgt, dass das Enzym als Homotetramer aus vier gleichen 49 kDa großen Untereinheiten vorlag (Abb. 24).

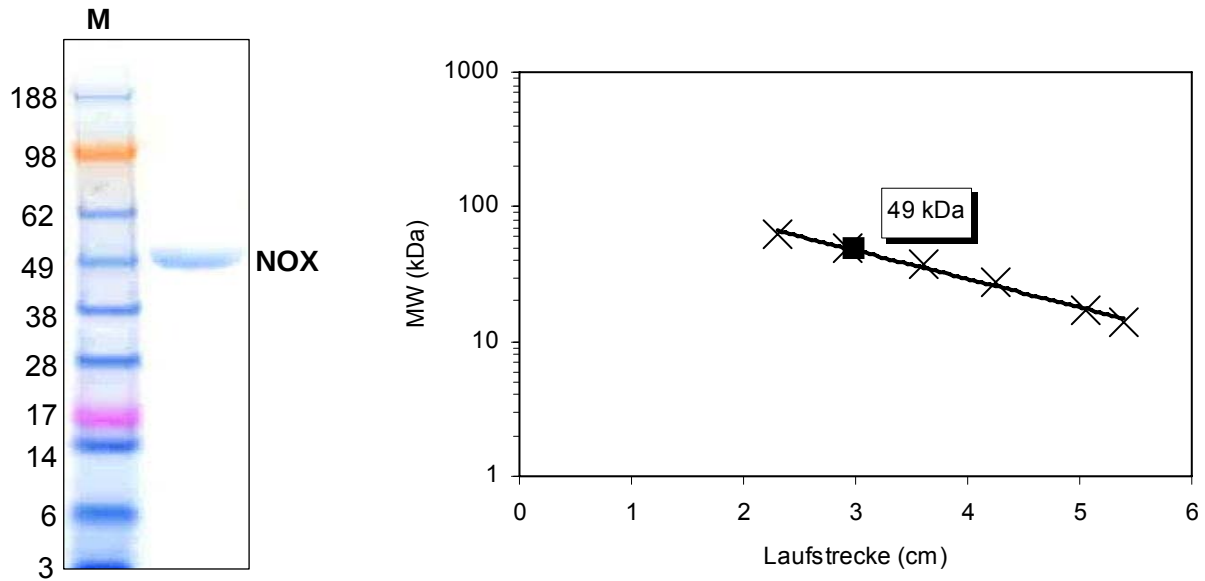


Abb. 24: SDS-PAGE der aufgereinigten NOX aus Tuner(DE3)/pEnox und Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheit (M: Marker, x: Markerproteine, ■ NOX).

Diese Beobachtung wurde durch die Vermessung des hochgereinigten, homogenen Enzyms mittels MALDI/TOF-MS bestätigt. Mit dieser Methode wurde ein Molekulargewicht von 48830 Da für das Monomer ohne FAD und 49614 Da für das Monomer mit FAD gemessen (Abb. 25).

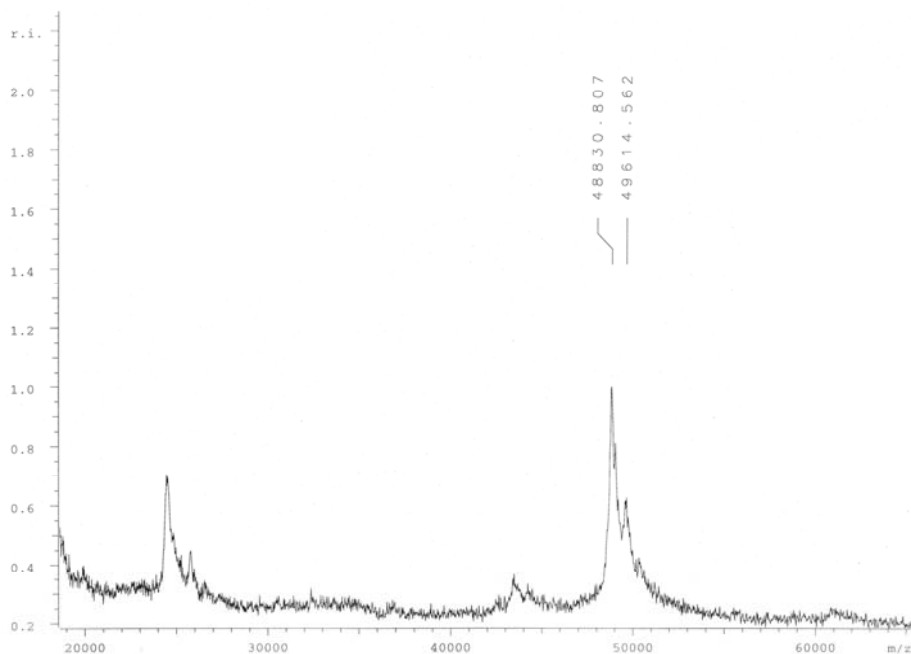


Abb. 25: MALDI/TOF-MS der NOX.

Während der Enzymreinigung verhalten sich NOX-Apo- und Holoenzym offensichtlich identisch, eine Auftrennung ist nicht möglich. Eine detaillierte Analyse von gereinigtem Enzym mittels MALDI-Massenspektrometrie (Abb. 26 A und B) bestätigt die Vorstellung von Apo- und Holoenzym. Zum einen kann man in Proteinpräparaten, die beide Enzymformen enthalten sollten,

tatsächlich auch zwei Peaks nachweisen, wobei sich die zugehörigen Massen um die Masse des FAD unterscheiden (784 Da). Zum anderen verhalten sich auch die Peakflächen beim Vergleich der Enzymgewinnungen (Induktionstemperatur) bei 25 und 37°C genau so, wie es aus den Aktivitätsdaten zu erwarten ist (Abschnitt 1.1.3 und 1.1.4).

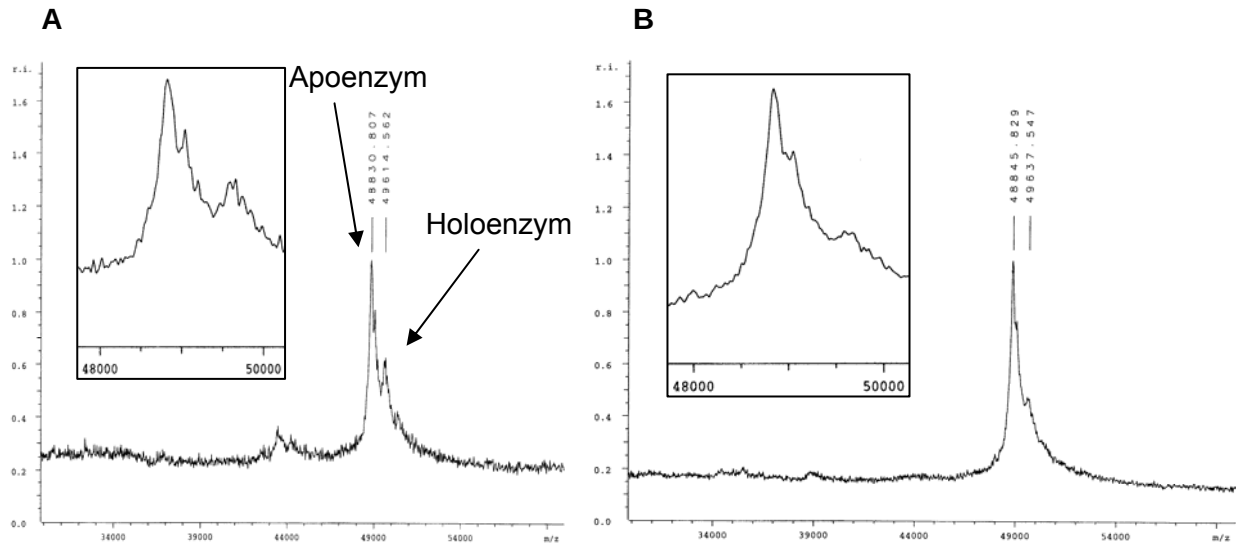


Abb. 26: MALDI/TOF-MS Untersuchungen: Homogene NOX exprimiert **(A)** bei 37°C und **(B)** bei 25°C.

Mittels ESI-Massenspektrometrie wurden die Molmassen der nativen NOX und SeMetNOX ermittelt und der Einbau von Selen kontrolliert. In Abb. 27 ist das ESI-Massenspektrum der SeMetNOX dargestellt.

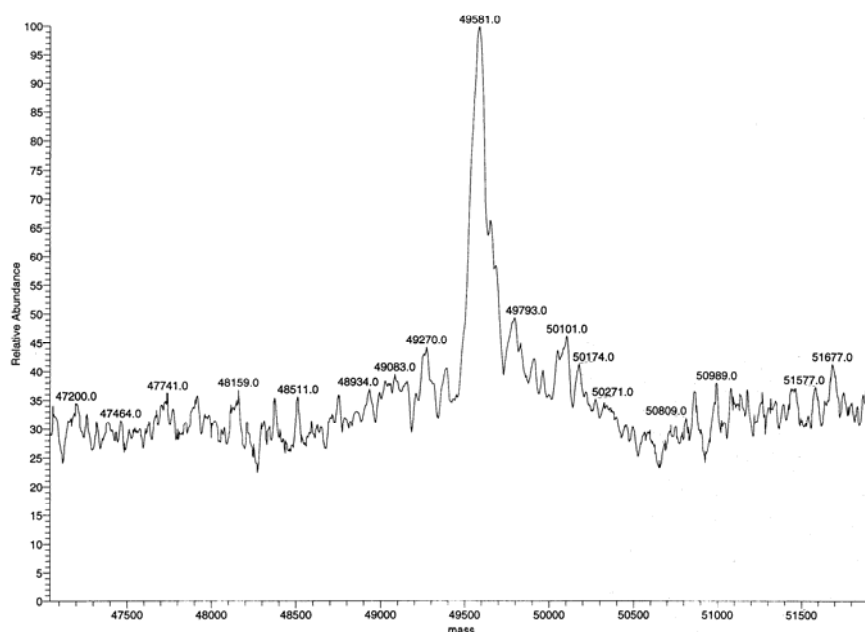


Abb. 27: ESI-Massenspektrometrie der SeMetNOX.

In der folgenden Tab. 10 sind die gemessenen und die aus der Sequenz berechneten Massen gegenübergestellt. Der Austausch von 13 Methioninen gegen 13 Selenomethionine würde einen theoretischen Massenunterschied von ca. 611 Da ergeben. Nach den ermittelten ESI-MS-Daten beträgt der Massenunterschied zwischen NOX und SeMetNOX ca. 736 Da. Innerhalb der Fehlergrenzen des ESI-Massenspektrometers in diesem Massenbereich ($\pm 0,1 \%$) entspricht die gemessene Masse der erwarteten. Der Massenshift durch den vollständigen Einbau von Selen ist deutlich belegbar.

Tab. 10: Ergebnisse der ESI-Massenspektrometrie im Vergleich mit den aus der Sequenz berechneten Massen für die NOX und SeMetNOX.

	native NOX	SeMetNOX
ESI-Masse	48845 Da	49581 Da
berechnete Masse	48942 Da	49553 Da

1.4.2 Spektroskopische Eigenschaften

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Spektrum von FAD-enthaltenden Enzymen zwei charakteristische Absorptionsmaxima, häufig bei 370 und bei 440 nm zeigt, die auch bei der NOX zu finden sind. Bei Vorliegen der NOX in der Holoform zeigte das Enzym ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit zwei Maxima bei $\lambda = 372$ nm und 446 nm (Abb. 28 (1)).

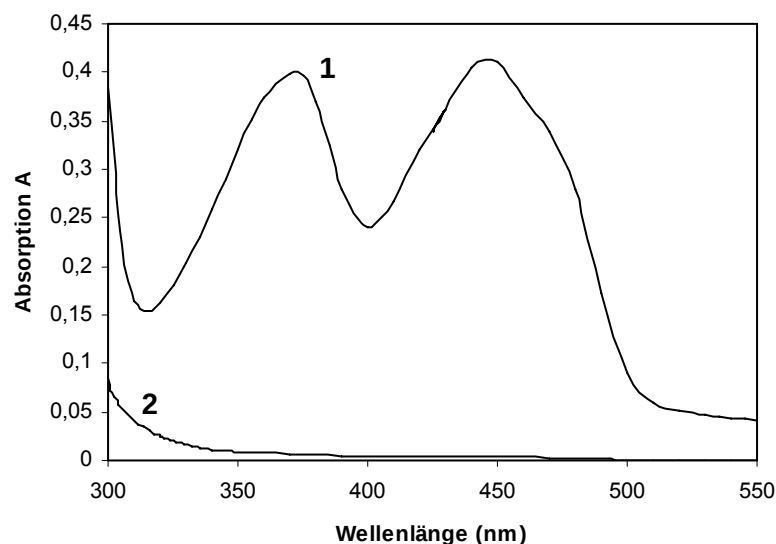


Abb. 28: Absorptionsspektrum des Holo- (1) und des Apoproteins (2) der NOX. Eingesetzt wurde ein hochgereinigtes, homogenes Enzympräparat mit einer Proteinkonzentration von 2,1 mg/ml. Das Apoprotein wurde durch viertägige Lagerung in 3 M KBr erhalten.

Nach der viertägigen Lagerung der NOX in KBr-Puffer und erneutem Umpuffern, wurde ein weiteres Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 28 (2)). Die zwei charakteristischen Maxima waren nicht mehr messbar. Bei der Aktivitätsbestimmung der Probe konnte keine Aktivität detektiert werden. Die ursprüngliche Aktivität betrug 329 U/mg. Eine Aktivierung der Probe durch die Zugabe von 20 μ M FAD, FMN oder Riboflavin wurde nicht beobachtet. Das bedeutet, dass der Cofaktor FAD durch Lagerung der NOX in 3 M KBr vollständig herausgelöst wurde und somit keine kovalente Bindung zwischen Cofaktor und Enzym vorlag. Die Rekonstitution des Holoenzym durch FAD-, FMN- oder Riboflavin-Zugabe zum Apoenzym war nicht möglich.

1.4.3 Darstellung von NOX-Apo- und Holoenzym per IEF

Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung konnte die homogene rekombinante NOX exprimiert bei 37°C und 25°C (Abb. 29) in das Holoenzym bzw. Apoenzym aufgetrennt werden. Wie in Abb. 29 zu sehen ist, wurde bei einer Expressionstemperatur von 37°C (Spur 1) hauptsächlich NOX-Holoenzym gebildet, während bei einer Expressions-temperatur von 25°C (Spur 2) ein Gemisch aus NOX-Holo-/Apoenzym gebildet wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Nettoladungen der NOX-Holo- und Apoenzyme, welche durch die Anzahl der gebundenen FAD-Moleküle zustande kommt, konnte anscheinend die Auftrennung des homogenen NOX-Holo-Apoenzym-Gemisches in die einzelnen NOX-Holo- bzw. Apoenzyme durchgeführt werden. Außerdem wurden die Nettoladungen der einzelnen NOX-Zustände mittels des Markerproteins bestimmt (Abb. 29). Der experimentell bestimmte pI von 4,76 für das NOX-Holoenzym mit 4 FAD's war identisch mit dem kalkulierten pI aus Expasy.

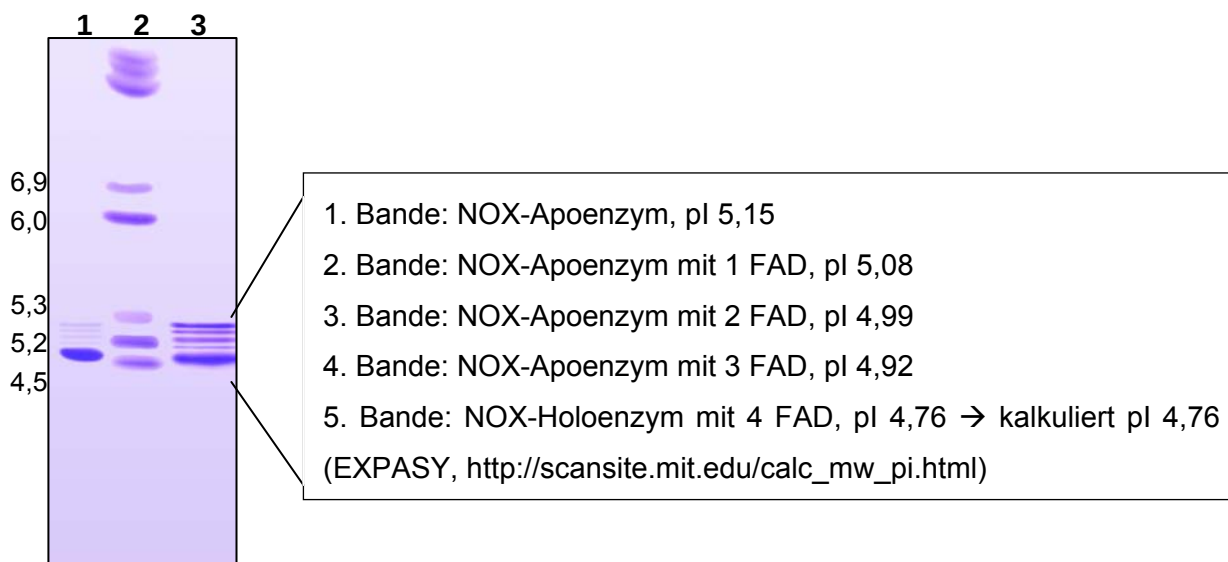


Abb. 29: IEF-Gelelektrophorese und Bestimmung des isoelektrischen Punkts der aufgereinigten NOX. Spur 1: homogene NOX exprimiert bei 37°C, Spur 2: Markerprotein, Spur 3: homogene NOX exprimiert bei 25°C. Die Zellen wurden mit 100 μ M IPTG bei OD₅₅₀ = 0.5 induziert.

1.4.4 Circulardichroismus (CD-Spektrometrie)

CD-Spektroskopie wird eingesetzt, um an hochgereinigten Proteinen Informationen über den Anteil an β -Faltblatt- und α -Helix-Sekundärstrukturen zu erhalten. Das CD-Spektrum der NOX ist in Abb. 30 zu sehen.

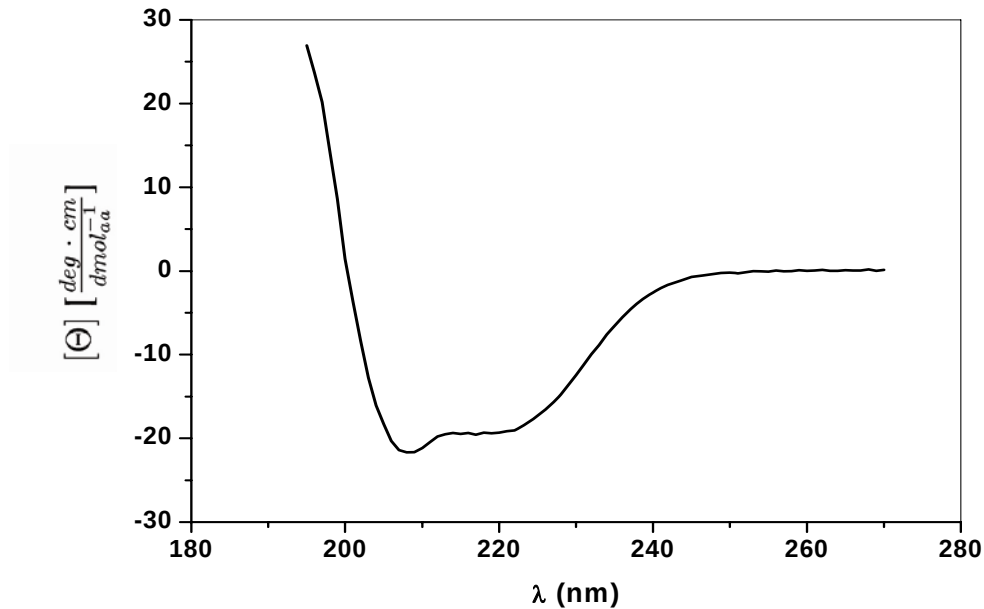


Abb. 30: CD-Spektrum der NOX bei 20°C.

Da von der NOX die Sequenz bekannt ist, wurden – neben der Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus dem CD-Spektrum – auch Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt, die auf der Sequenz beruhen. Desweiteren wurden die aus der Struktur der NOX bestimmten Sekundärstrukturanteile zum Vergleich herangezogen. Die rechnerische Auswertung des CD-Spektrums mit den Programmen CONTIN, SELCON und Yang ergab die in Tab. 11 zusammengefassten Sekundär-strukturanteile.

Tab. 11: Mittels CD-Spektroskopie ermittelte Sekundärstrukturelemente der NOX. Die Vorhersage wurde mit dem Programm PREDATOR durchgeführt. Die Sekundärstrukturanteile der durch RSA ermittelten Struktur wurden mit dem Programm DSSP ermittelt. Alle Angaben sind in % angegeben.

	CONTIN	SELCON	Yang	Vorhersage	RSA
α-Helix	17	16	29	21	28
β-Faltblatt	31	37	36	21	34
Rest	52	47	35	58	38

Im Rahmen der Genauigkeit der CD-Spektroskopie sind die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Programmen berechnet wurden, in sich konsistent. Die Genauigkeit wurde allerdings durch die Verwendung mehrerer Programme nicht erhöht, weil die übliche Auswertung von CD-Spektren an sich schon fehlerbehaftet ist. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss dies mit berücksichtigt werden. Die NOX hat einen 28 % igen Anteil an α -Helices und einen 34 % igen Anteil an β -Faltblättern (Tab. 11). Die Sekundärstrukturanteile sind für die α -helikalen Anteile aus den CD-Spektren mit den Programmen CONTIN und SELCON berechnet eher zu niedrig und die β -Faltblattanteile fast identisch. Hingegen weisen die mit Yang ermittelten Daten eine sehr gute Übereinstimmung mit denen der Röntgenstrukturanalyse auf.

Die sequenzbasierten Verfahren geben eine ganz andere Verteilung der Sekundärstrukturen an. Sowohl die α -helikalen Anteile als auch β -Faltblattanteile sind zu niedrig gegenüber den Resultaten aus der Röntgenstruktur. Dennoch ist das Verfahren der CD-Spektroskopie, trotz der ungenauen Methoden zur Proteinbestimmung, bei der Vorhersage der α -helikalen und β -Faltblatt Sekundärstrukturanteilen der sequenzbasierten Vorhersage deutlich besser.

1.5 Klassifizierung und Alignment der NOX

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der *Lactobacillus brevis* NOX mit der PFAM-HMM-Datenbank, die die Alignments und Modelle von 7868 Proteinfamilien enthält (August 2005) (<http://pfam.wustl.edu>), ergab eine Zuordnung zur Familie der flavinhaltigen Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen (PF07992). Vertreter dieser Familie sind: Oxidoreduktasen der Klasse 1 und 2, NADH-Oxidasen und NADH-Peroxidasen. Die Zuordnung des Enzyms zu dieser Familie war anhand der hochkonservierten FAD-/NAD(P)⁺-Sequenzmotive möglich. Ein partielles Alignment zwischen der *Lactobacillus brevis* NOX, 3 weiteren NOXs, 2 NADH-Peroxidasen (NPOX) und 2 Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen (PNDO) wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt und zeigt drei dieser konservierten Bereiche (Abb. 31). Sämtliche Sequenzen enthalten zum einen das hochkonservierte FAD-Bindungsmotiv (1):

oVhVhGooHxGxx

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

Zum anderen weisen alle diese Sequenzen ein charakteristisches Sequenzmotiv auf, das das katalytisch aktive Cys42 oder Cys43 (2) enthält:

xhSFLS**C**Gxx

Neben diesen beiden Sequenzmotiven enthalten diese Sequenzen auch ein drittes Sequenzmotiv, und zwar das hochkonservierte NAD(P)⁺-Bindungsmotiv (3):

xVhGxGYIGxEhhE

	1	10	43	160
NOX				
<i>Lactobacillus brevis</i>	-MkVTVVGCTHAGTF...VISFLS C GIA...TVIGAGYIGAEIAE...			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-MkVIVIGCTHAGTA...NVSFLS C GIA...IVIGGGYIGTELVE...			
<i>Bifidobacterium longum</i>	MTTVAVIGCTHAGTF...TLSFLS C GIA...VVISGGYIGAEIAE...			
<i>Enterococcus faecalis</i>	-MkVVVGCTHAGTS...NISFLS C GIA...VVVGGGYIGIELVE...			
NPOX				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-MkVIVVGSSHGGYE...FLSFLS C GMQ...VVISGGYIGIEAAE...			
<i>Enterococcus faecalis</i>	-MkVIVLGGSSHGGYE...FISFLS C GMQ...VVISGGYIGIEAAE...			
	. * * . : * . * : * * * * * : * : * . * * * * * . * . *			
Consensus	MMoVhVhGooHxGxx xhSFLS C Gxx xVhGxGYIGxEhhe			
PNDO				
<i>Exiguobacterium sp.</i>	-MKVAVIGCTHAGTA...NVSFLS C GIA...TVVGAGYIGAEIAE...			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-MKYIVVGTSHS GGYE...QPSFLS C GIQ...VVVGGGYIGIEAAE...			
	. * : * : * . * * * * * * : * : * . * * * * * . *			
Consensus	MMohhVhGooHxGxx xhSFLS C Gxx xVhGxGYIGxEhhe			

Abb. 31: Partielles Sequenzalignment der *Lactobacillus brevis* NOX mit 3 weiteren NOXs, 2 NADH-Peroxidasen (NPOX) und 2 Pyridin-Nucleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen (PNDO). Die Sequenzinformationen stammen aus der NCBI-Datenbank (Sequenz-Homologie zwischen 38 - 64 %). Nach dem Alignment der NOXs mit den NPOXs ist die daraus folgende Consensus-Sequenz dargestellt und in der letzten Zeile ist die Consensus-Sequenz aller aufgeführten Proteinsequenzen aufgeführt; **C** = katalytisch aktives Cystein, o = polarer Rest, h = hydrophober Rest, x = beliebiger Rest. * identische Aminosäuren, : hohe Ähnlichkeit, . geringe Ähnlichkeit.

1.6 Kristallisation der NOX und SeMetNOX

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

24 mg NOX wurden homogen aufgereinigt und für Kristallisationsversuche verwendet. Die drei Kristallisationskits Crystal Screen, Crystal Screen 2 und Ammoniumsulfat Screen (Hampton Research) wurden bei 19°C eingesetzt, um geeignete Kristallisationsbedingungen für die NOX zu finden. In vielen der 124 Ansätze bildete die NOX ein Präzipitat, in wenigen Tropfen waren sehr kleine, nadelförmige Kristalle zu sehen und einige Ansätze blieben über Wochen klar.

Unter drei Kristallisationsbedingungen entstanden auffällige Kristalle:

- Crystal Screen, Lösung 10
(30 % w/v PEG4000, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat, pH 4,6):
kleine Kristalle, unregelmäßig, gelb, verschiedene Formen
- Crystal Screen, Lösung 20
(25 % w/v PEG4000, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat, pH 4,6):
kleine verwachsene Kristalle, unregelmäßig, gelb

- Crystal Screen 2, Lösung 13
(30 % PEGMME 2000, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat, pH 4,6):
mehrere große, spitze, gelbe Kristalle (> 1 mm)

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

- das Molekulargewicht des PEGs (1500 - 35000),
- die PEG-Konzentration (10 - 38 %),
- der pH-Wert (4,0 - 6,5),
- die Puffer-Konzentration (0,05 M - 0,2 M Na-acetat und 0,05 M - 0,2 M Ammoniumsulfat) und der Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M Hepes) und
- die Temperatur (12°C, 19°C, 25°C) variiert wurden.

Die NOX bildete in 24 bis 38 % PEG kristalline Strukturen aus, bei höheren PEG-Konzentrationen präzipitierte das Enzym. Der pH-Wert beeinflusst die Kristallisationseigenschaften der NOX (Abb. 32). Die meisten der in diesen Versuchsreihen erhaltenen Kristalle waren aber entweder zu unregelmäßig gewachsen (Abb. 32 B-D) oder zu klein (Abb. 32 A), um eine Diffraktionsmessung durchführen zu können.

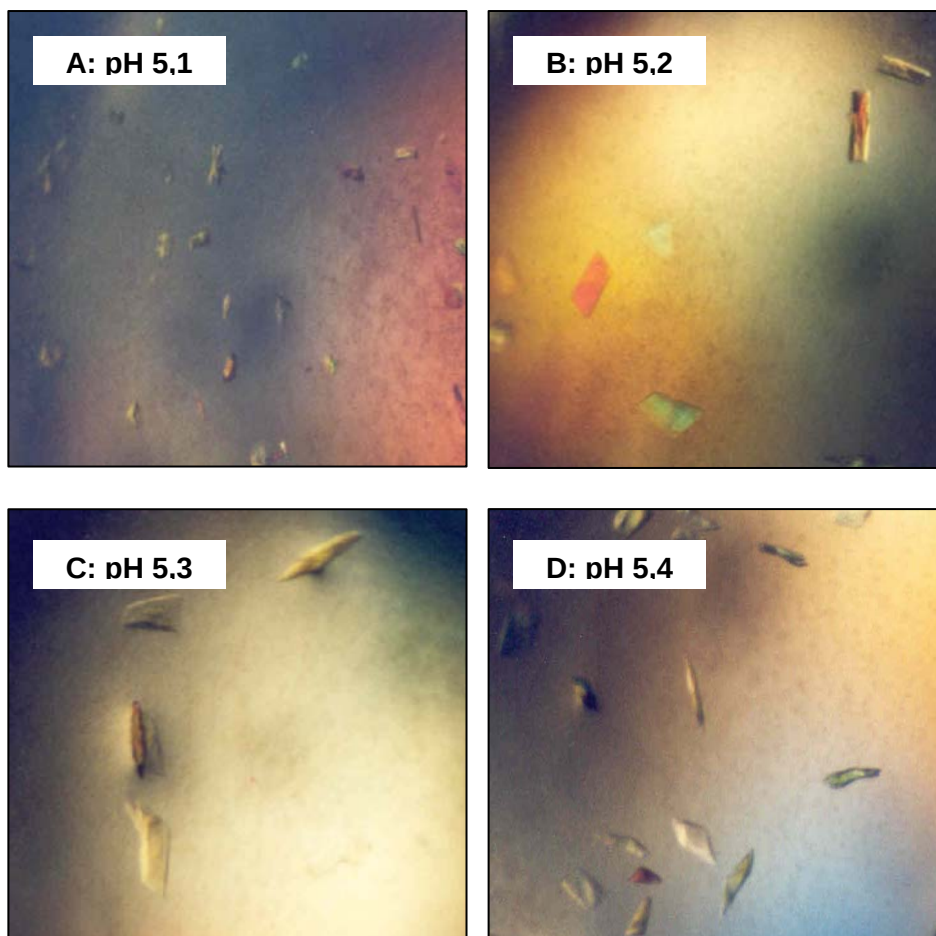


Abb. 32: NOX-Kristalle, Bedingungen: 28 % PEG MME 2000, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat pH 5,1 - 5,4; 19°C.

Der Kristallisationstropfen, der in Abb. 32 B dokumentiert ist, wurde für die Impfkristallisation verwendet. Die vorbereitete Kristallisationsplatte enthielt eine Reservoirolösung mit 28 bis 34 % PEG MME 2000, 0,1 M Na-acetat und 0,2 M Ammoniumsulfat, pH 5,4 und im Tropfen $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ NOX. Da schon gute Kristallisationsbedingungen für die NOX gefunden wurde, konnte parallel die Kristallisation der SeMetNOX mit den gleichen Bedingungen wie für die NOX durchgeführt werden. Schon durch einmaliges Seeding konnte die Form der NOX-Kristalle erheblich verbessert werden. Außerdem wurden die ersten SeMetNOX-Kristalle in den gleichen Reservoirolösungen wie für die NOX erhalten. Je nach Animpfkonzentration bildeten sich Kristalle in unterschiedlicher Größe und Anzahl (Abb. 33). Mit diesen ersten verbesserten Kristallen wurden im Institut für Biochemie in Köln Röntgendiffraktionsexperimente durchgeführt. Die Diffraktionseigenschaften der Kristalle waren bei 100 K unzureichend (Auflösungsgrenze $\geq 4 \text{ \AA}$).

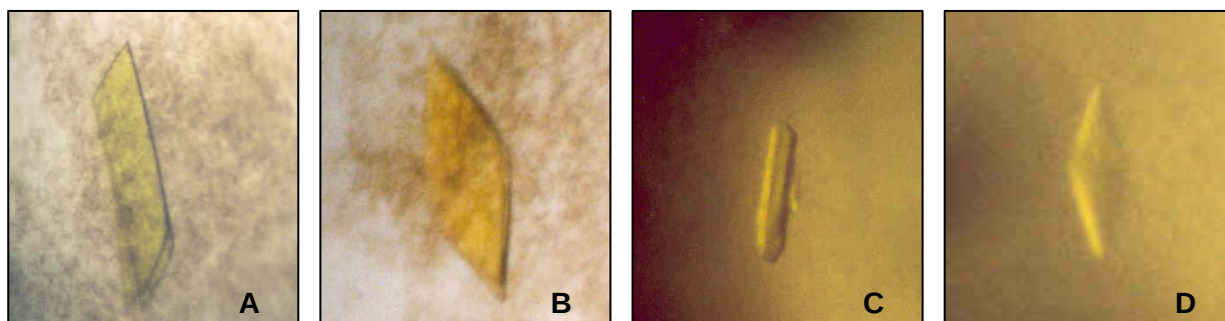


Abb. 33: NOX-Kristalle. **(A)** & **(B)** große Einkristalle mit Fehlbildungen nach einmaliger Impfkristallisation ($> 1 \text{ mm}$), **(C)** kleiner Einkristall mit geringeren Fehlbildungen ($> 0,2 \text{ mm}$), SeMetNOX-Kristall. **(D)** kleiner Einkristall ohne Fehlbildungen ($> 0,2 \text{ mm}$).

Sowohl durch sequentielle Wiederholung der Impfkristallisation als auch durch die Zugabe von 15 % Glycerin wurden die Eigenschaften der NOX-Kristalle hinsichtlich ihrer Handhabbarkeit, Größe und ihres Diffraktionsvermögens optimiert. Innerhalb von 1 - 2 Wochen konnten reproduzierbare NOX-Einkristalle hergestellt werden, die vermutlich der tetragonalen Raumgruppe zuzuordnen sind (Abb. 34). Die SeMetNOX-Kristalle hingegen wurden vorerst nicht weiter optimiert, da eine Strukturlösung der NOX mittels molekularem Ersatz mit nativen NOX-Kristallen bereits zu sehr guten Ergebnissen führte.



Abb. 34: Tetragonale NOX-Kristalle, Bedingungen: 34 % PEG MME 2000, 15 % Glycerin, 0,1 M Na-acetat, 0,2 M Ammoniumsulfat pH 5,4, 19°C , Kristallgröße: $0,1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \times 0,45 \text{ mm}$.

Von den Kristallen wurden Röntgenbeugungsdatensätze mit Synchrotronstrahlung am DORIS Speicherring des DESY (Hamburg) an Messplätzen der EMBL-Außenstation bis zu einer Auflösung von $2,7 \text{ \AA}$ ($\lambda = 0,915 \text{ \AA}$) vermessen.

1.7 Reduzierte und oxidierte Zustände der NOX

Zur Darstellung von reduzierter NOX wurden den nativen NOX-Kristallen aus Abschnitt 1.6 1 mM NADH in den Kristallisationstropfen zugeführt. Nach etwa 20 Sekunden konnte eine deutliche Entfärbung der nativen NOX-Kristalle unter dem Stereomikroskop beobachtet werden. Abb. 35 A zeigt die nativen NOX-Kristalle vor und nach Behandlung mit 1 mM NADH. Die Entfärbung der nativen NOX-Kristalle, die durch die Reduktion des FADs hervorgerufen wird, wird drastisch verlangsamt, wenn die NOX-Kristalle vor der Behandlung mit NADH in 10 mM ATP inkubiert werden (Abb. 35 B). Die Inhibierung der NOX durch das ATP hat zur Folge, dass das fest gebundene FAD in der NOX schlechter reduziert wird (s. a. Abschnitt 1.3.4).

Durch Behandlung von nativen NOX-Kristallen mit NADH kann die reduzierte Form der NOX dargestellt werden.

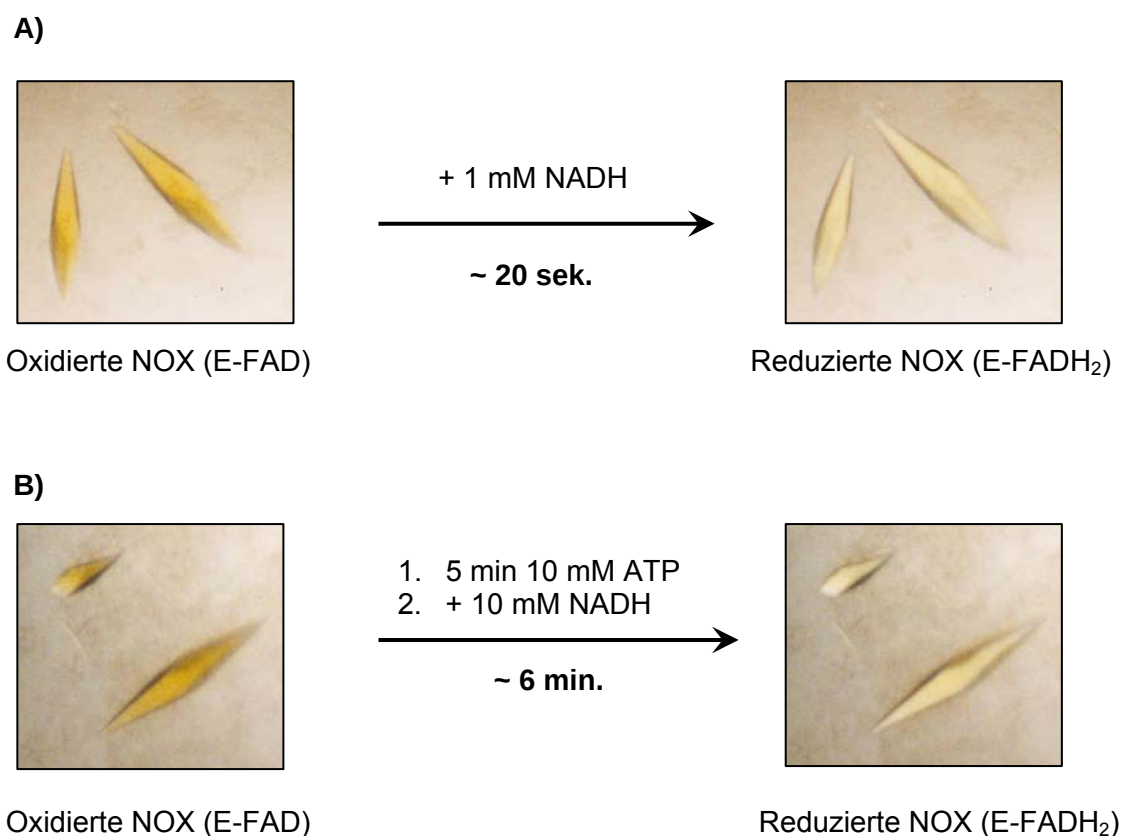


Abb. 35: Darstellung von NOX-Zuständen. **(A)** Behandlung von nativen NOX-Kristallen mit 1 mM NADH. **(B)** Inkubation von nativen NOX-Kristallen für 5 min mit 10 mM ATP und anschließend Behandlung mit 10 mM NADH. Die Entfärbung der NOX-Kristalle, die durch Reduktion des FADs hervorgerufen wird, ist deutlich zu erkennen.

1.8 Röntgendiffraktometrie

Ein kompletter Röntgendiffraktionsdatensatz wurde bei 100 K mit einem Kristall des NOX-Holoenzym an der EMBL-Außenstation am DESY in Hamburg gemessen. Ein Bild einer Beugungsaufnahme ist in Abb. 36 dargestellt.

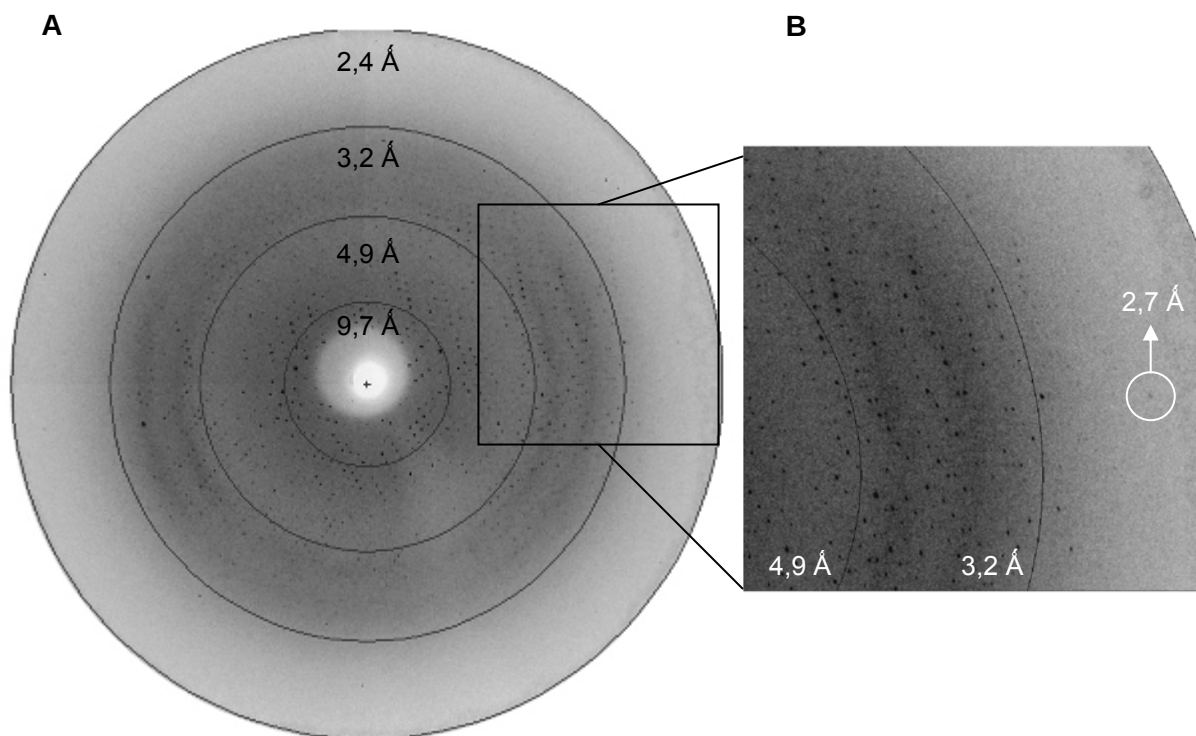


Abb. 36: Röntgenbeugungsaufnahme der tetragonalen Kristalle der NOX. **(A)** Gesamtansicht, **(B)** Ausschnitt im hochauflösten Bereich. Die Daten wurden mit Synchrotronstrahlung ($\lambda = 1,078 \text{ \AA}$) am BW7A-Strahl an der EMBL-Außenstelle des DESY (Hamburg) gemessen. Die Detektion erfolgte mit einem MAR-CCD-Detektor. Messbedingungen: Temperatur: 100 K, Kristall-Detektor-Abstand: 180 mm, Drehung pro Aufnahme: $0,2^\circ$, maximale Auflösung: $2,7 \text{ \AA}$.

Die Daten ließen sich mit dem Programm DENZO indizieren und integrieren. Die Skalierung und das Vereinigen der Beugungsaufnahmen erfolgten mit dem Programm SCALEPACK. Dabei wurden folgende Gitterparameter ermittelt:

Kristallsystem: tetragonal
scheinbare Punktgruppe: 422
Gitterkonstanten: $a = b = 141,85 \text{ \AA}$, $c = 247,62 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Die Statistik des skalierten Datensatzes NOX-DESY ist in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12: Charakteristische Daten des NOX-DESY-Datensatzes. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die höchsten Auflösungsschalen. $R_{\text{sym}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl}) - [I_i(\text{hkl})] / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$.

	NOX-DESY
Wellenlänge (Å)	1,078
Auflösungsbereich (Å)	25 – 2,9
Temperatur der Datensammlung (K)	100
Zahl der Observationen	1232211
Zahl der nicht-redundanten Reflexe	133936
Vollständigkeit (%)	100 (100)
Durchschnitt $I/\sigma(I)$	9,5 (2,1)
R_{sym} (%)	14,7 (62,2)

1.9 Test auf merohedrische Verzwillingung

Unter Verzwillingung versteht man die Verwachsung von verschiedenen orientierten Kristalldomänen ein und derselben Struktur zu einem Zwillingkristall [174]. In der Sichtweise des reziproken Raumes bedeutet dies, dass die Beugungsgitter der beiden Domänen ganz oder teilweise überlappen [175]. Unter der Zwillingsregel versteht man das Symmetrieelement, welches den einen Zwillingsteil (Domäne) in den anderen überführt.

Generell unterscheidet man zwei Zwillingstypen. Bei epitaxialen, nicht-merohedrischen Zwillingen kommt es zu keiner vollständigen Überlagerung der Reflexe, da die Gitter der beiden Zwillingspartner nicht vollständig überlappen. Derartige Zwillinge kann man häufig an Verwachsungen der Kristalle erkennen. Bei merohedrischen Zwillingen kommt es zu verschiedenen Orientierungen der Domänen im Kristall, was an der äußeren Form der Kristalle nicht zu erkennen ist, da die beiden Gitter exakt übereinander liegen. Sind die Volumina der Domänen ungleich, so spricht man von partiell merohedrischen Zwillingen. Bei gleichen Volumina der Domänen spricht man von perfekt merohedrischen Zwillingen.

Merohedrische Zwillingkristalle zu erkennen, ist meistens schwierig, insbesondere wenn es sich um perfekt merohedrische Zwillinge handelt. In diesem Falle ist die obengenannte Zwillingsregel zunächst (d.h. bei der Skalierung der Diffraktionsdaten) nicht von einem normalen kristallographischen Symmetrieelement zu unterscheiden. Typischerweise geben sich perfekte merohedrische Zwillinge erst im weiteren Verlauf einer Strukturaufklärung als solche zu erkennen. Charakteristische Hinweise sind z.B., wenn die Suchrechnungen des molekularen Ersatzes trotz hoher Sequenzidentität des Suchmodells erfolglos bleiben oder wenn trotz offensichtlich erfolgreicher molekularer-Ersatz-Suche der freie R-Wert bei der Verfeinerung nicht sinkt.

Der letztgenannte Fall trat auch bei den NOX-Kristallen auf: Die Skalierung und die anschließenden Suchrechnungen des molekularen Ersatzes deuteten zunächst auf die Raumgruppe $P4_32_12$ hin. Unter der Annahme dieser Raumgruppe ließ sich eine plausible Kristallpackung bestimmen. Die anschließende Verfeinerung blieb jedoch bei einem freien R-Wert von ca. 50 % hängen. Daraufhin wurden die Skalierungs- und Suchrechnungen wiederholt, und

zwar mit der Raumgruppe $P4_3$. Wiederum ergab sich eine sinnvolle Kristallpackung. Sie ließ sich mit CNS verfeinern, sofern die CNS-Module für Zwillingsverfeinerung angewendet wurden. Zunächst wurde das Modul „detect_twinning.inp“ [140] auf den $P4_3$ -skalierten Datensatz angewendet. Es ergab – wie mittlerweile erwartet – einen Zwillingsgrad von nahezu 50 % sowie die Zwillingsregel (h,-k,-l), d.h. einer scheinbaren zweizähligen Drehachse senkrecht zur tetragonalen Hauptsymmetrieachse. Diese Zwillingsregel sowie der Zwillingsgrad 50 % wurden bei allen anschließenden Verfeinerungsrechnungen angewendet. Diese Vorgehensweise führte zu einer gut verfeinerten Endstruktur der NOX. Sie lässt sich normal interpretieren, d.h. das geschilderte Zwillingsproblem ist eine ausschließlich methodische Schwierigkeit der Röntgenstrukturanalyse, die jedoch – sofern sie richtig erkannt und gehandhabt wurde – auf das Endergebnis keinen Einfluss mehr hat.

1.10 Untersuchungen der Kristallpackung

Bei der Berechnung der Packungsdichte der NOX-Kristalle mit dem Programm MATTHEWS_COEF [139] wurden die oben angegebenen Zellparameter, die Raumgruppe $P4_3$ und ein Molekulargewicht von 49,6 kDa verwendet [176]. Der plausibelste V_M -Wert ergab sich unter der Annahme, dass die asymmetrische Einheit der NOX-Kristalle acht Monomere enthält. Dieser V_M -Wert beträgt $3,2 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, was einem Lösungsmittelanteil am Kristallvolumen von 60,3 % entspricht.

1.11 Rechnungen zum molekularen Ersatz

Die Elektronendichte ist für den Kristallographen der entscheidende Leitfaden im direkten Raum zur Modellierung von Strukturen. Das Diffraktionsmuster und die Elektronendichte stehen durch die Fouriertransformation (s. Abb. 37) im folgenden Zusammenhang:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{\infty} F_{hkl} \cdot e^{i\alpha_{hkl}} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Elektronendichte Amplitude Phase Basisfunktion

Die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} lassen sich direkt aus den Diffraktionsmessungen bestimmen und den reziproken Gitterpunkten hkl zuordnen, während sich die Phaseninformation α_{hkl} nicht detektieren lässt. Dies stellt das kristallographische Phasenproblem dar. Folgende Verfahren zur experimentellen und rechnerischen Ermittlung der Phasen stehen generell zur Verfügung, wobei sich die einzelnen Verfahren gegenseitig ergänzen können:

Beim **isomorphen Ersatz** (MIR, SIR), werden zusätzlich zu den Diffraktionsdaten nativer Kristalle Datensätze von Kristallen benötigt, die mit schweren Atomen (Schwermetalle, Halogenide, Edelgase) derivatisiert wurden. Aus den isomorphen Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden des nativen und eines Derivat-Datensatzes lassen sich über Pattersonfunktionen die Lagen der Schweratome bestimmen. Ausgehend von diesen

Positionen können erstere Phasen berechnet werden. Da für jeden Phasenwinkel zwei Lösungen möglich sind (Phasenambiguität), müssen zur eindeutigen Bestimmung der Phasenwinkel mehrere Derivate oder anomale Differenzen (SIRAS, MIRAS) verwendet werden.

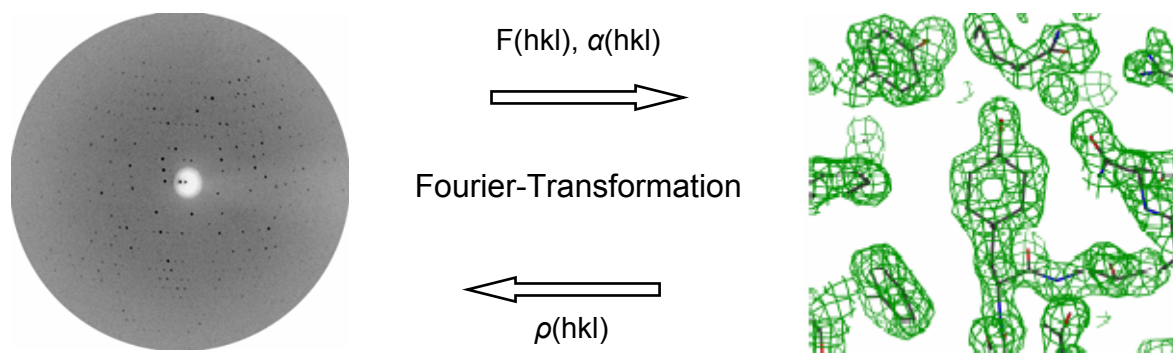


Abb. 37: Schematischer Zusammenhang zwischen Röntgenbeugung und Elektronendichte über die Fourier-Transformation. Für die Berechnung der Elektronendichte sind sowohl die Strukturfaktoramplituden $F(hkl)$ als auch die Phasen $\alpha(hkl)$ nötig (Phasenproblem).

Bei den in der Kleinmolekülkristallographie üblichen **direkten Methoden** werden strukturinvariante Phasenbeziehungen verwendet, um aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden die Phasen direkt berechnen zu können. Dafür ist eine hohe Überbestimmung der gemessenen Daten im Vergleich zu den zu bestimmenden Parametern notwendig, die erst bei atomaren Auflösungen erreicht wird. Aufgrund der zumeist geringeren Streufähigkeit von Proteinkristallen ist dies nur in sehr wenigen Fällen gegeben. Deshalb lassen sich die direkten Methoden bislang nur bei kleinen Proteinen anwenden [177]. Als ein Grenzfall des derzeit möglichen ist die Strukturlösung von triklinem Lysozym (1001 nicht-Wasserstoff-Atome und ca. 200 gebundene Wasser) bei 0,85 Å Auflösung [178] mit dem Programm SnB [179] anzusehen. Sind zusätzlich Schweratome im Protein vorhanden, so können auch noch größere Strukturen mit den direkten Methoden berechnet werden. Beispiele dafür sind die Lösung der Strukturen von OppA bei 1,2 Å Auflösung (4189 nicht-Wasserstoff-Atome, 1 Uran) [180] oder von Cytochrom c_3 bei 1,2 Å Auflösung (2024 nicht-Wasserstoff-Atome, 8 Eisen) [181].

Anomale Dispersion (SAD, MAD) tritt bei Kristallen im Röntgenstrahl auf, wenn die Energie der Röntgenstrahlung in der Nähe der Absorptionskanten der im Kristall vorhandenen *anormalen Streuer* liegt. Die atomaren streuwinkelabhängigen Streufaktoren ($f^0(\theta)$) der betreffenden Atome werden in solchen Fällen durch wellenlängenabhängige Terme modifiziert:

$$f = f^0(\theta) + \Delta f'(\lambda) + i\Delta f''(\lambda)$$

Die anomalen Beiträge $i\Delta f''(\lambda)$ führen zu den Bijvoet-Differenzen, so dass die Friedel-Paare nicht mehr dieselben Strukturfaktoramplituden haben ($F_{hkl} \neq F_{-h-k-l}$). Die dispersiven Differenzen

$i\Delta f'(\lambda)$ führen zu Unterschieden zwischen Datensätzen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wurden.

Die verwendbare Röntgenstrahlung von durchstimmbaren Synchrotrons liegt im Bereich zwischen ca. 0,6 - 2 Å. Eine Absorptionskante einer Vielzahl von Metallen liegt in diesem Bereich. Weiterhin können Nichtmetalle wie Selen oder Brom in MAD-Experimenten verwendet werden [182, 183]. In Einzelfällen konnten sogar die schwachen anomalen Beiträge von Schwefel (K-Kante: 5,016 Å) bei Cu-K_α-Strahlung (1,54178 Å) erfolgreich zur Strukturlösung kleinerer Proteine wie Cambrin (5 kDa) [184] oder Lysozym (14 kDa) [185] verwendet werden. Selen ist trotz relativ kleiner anomaler und dispersiver Streubeiträge ($f'_{\text{max.}} = 7,5e^-$ und $f'' = 6,0 e^-$, K-Kante bei 0,979 Å) der beliebteste anomale Streuer [186, 187]. Durch Protein-expression in Methionin-auxotrophen Organismen oder durch Inhibition des Methionin-Anabolismus unter Zugabe von Selenomethionin lassen sich gezielt Seleno-Methionin-Derivate produzieren [188] [189]. Der große Vorteil diese Methode ist, dass hier im Gegensatz zum Isomorphen Ersatz keine Isomorphie zu den nativen Kristallen notwendig ist. Die Strukturlösung kann ausschließlich mit den Daten des Derivates durchgeführt werden ohne Verwendung von Daten der nativen Kristalle. Allerdings ist das anomale Signal im Vergleich zur isomorphen Differenz sehr klein und daher schwierig zu detektieren.

Molekularer Ersatz

Zur Bestimmung der Phaseninformation in der Proteinkristallographie bietet sich neben dem isomorphen Ersatz, der direkten Methode und der anomalen Dispersion eine weitere wichtige Methode an. Diese Methode, die ohne die Bestimmung experimenteller Phaseninformation auskommt, ist die Methode des molekularen Ersatzes (MR). Hierfür ist die Existenz einer homologen Struktur für das gesuchte Modell erforderlich. Diese Methode soll im Folgenden näher besprochen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde.

Man macht sich bei der MR-Methode die Tatsache zu Nutze, dass Proteine mit einer ähnlichen Sequenz (~ 30 % Sequenzidentität) auch eine ähnliche Faltung aufweisen und daher eine ähnliche Fouriertransformierte der Dichtefunktion besitzen. Mit dieser Annahme wird dem unbekannten Protein sozusagen die Phaseninformation des Suchmodells „ausgeliehen“. Dazu ist es notwendig, das Suchmodell möglichst genau in der Elementarzelle der unbekannten Struktur zu positionieren. Auf diese Weise erhält man ein Startmodell, das noch sehr stark von der Struktur des Suchmodells geprägt ist. Nach und nach im Laufe der Verfeinerung versucht das Suchmodell, sich der gesuchten Struktur anzunähern und es schließlich komplett mit ihr zu ersetzen.

Um die Orientierung und Position des Suchmodells in der Elementarzelle zu bestimmen, ist theoretisch eine sechsdimensionale Suche mit Variation dreier Rotations- und dreier Translationsfreiheitsgraden nötig. Praktisch ist eine solche Suche jedoch erst durchführbar, wenn man das Rotations- vom Translationsproblem trennt, wenn man also das sechsdimensionale Suchproblem auf zwei aufeinanderfolgende dreidimensionale Suchen reduziert. Auf diese Weise wird sehr viel Rechenzeit eingespart.

Rotationssuche

Im ersten Schritt wird die Orientierung des Suchmodells in der asymmetrischen Einheit der Einheitszelle der gesuchten Struktur bestimmt. Befinden sich mehrere Moleküle in der asymmetrischen Einheit der gesuchten Struktur, so muss für jedes Molekül die Orientierung bestimmt werden.

Die Suche nach der richtigen Orientierung des Suchmodells im Verhältnis zum Kristall (gesuchte Struktur) erfolgt durch die Drehung der Pattersonfunktion des Suchmodells gegen die Pattersonfunktion des Kristalls der gesuchten Struktur. Die Pattersonfunktion erhält man durch Fouriertransformation der Intensitätsfunktion. Bei der Drehung der Pattersonfunktion des Suchmodells gegen die Pattersonfunktion des Kristalls der gesuchten Struktur werden durch geeignete Wahl des Pattersonradius nur die intramolekularen Vektoren (Selbstvektoren) berücksichtigt.

$$R(C) = \int_V P_1(\vec{u}) \cdot P_2(C, \vec{u}) du$$

$P_1(\vec{u})$ ist die Pattersonfunktion des Kristalls, $P(C, \vec{u})$ die mit der Rotationsmatrix C gedrehte Pattersonfunktion des Suchmodells und V das durch die Länge des Selbstvektors bestimmte Volumen der Pattersonfunktion. Dieses Volumen ist von der Größe des Suchmodells abhängig und muss individuell vom Anwender definiert werden.

Die Maxima der Rotationsfunktion $R(C)$ entsprechen den bestmöglichen Orientierungen der beiden Vektorsätze zueinander. Diese Lösung wird nicht in Form von Eulerwinkel ($\theta_1, \theta_2, \theta_3$) [190] oder Polarwinkeln (κ, Φ, Ψ) als Vorinformation in die folgende Translationssuche hineingesteckt.

Patterson-Korrelationsverfeinerung

Zur Verbesserung der Rotationslösungen kann eine PC-Verfeinerung (*patterson correlation refinement*) als Vorbereitung auf die Translationssuche durchgeführt werden. Dabei wird das annähernd richtig orientierte Modell in eine triklinische Zelle mit exakt den Gitterkonstanten des Kristalls gelegt. Ein auf dieser Grundlage berechneter Datensatz wird mit den gemessenen Daten korreliert. Durch eine Starre-Körper-Verfeinerung wird untersucht, den Korrelationswert zu maximieren. Da für das Modell eine unsymmetrische Zelle definiert worden ist, wirken sich nur Rotationsparameter auf die Zielfunktion aus, während die Position (Translation) beliebig ist. Die PC-Verfeinerung ist eine sehr schnelle Methode zur Rotationsverfeinerung, die insbesondere dazu dienen soll, aus der Liste der Rotationspeaks die wirklich signifikanten zu identifizieren sowie die Modellstruktur durch Freigabe einzelner Domänen und Struktur motive so zu verfeinern, dass die Erfolgsaussichten für die nachfolgende Translationssuche deutlich besser werden.

Translationssuche

Bei der Translationssuche wird das richtig orientierte Suchmodell unter Verwendung der kristallographischen Symmetrie bewegt, um die korrekte Position im Kristall, also eine maximale Übereinstimmung mit den Diffraktionsdaten, zu finden. Dabei wird die Pattersonfunktion des

Kristalls mit der Pattersonfunktion des Suchmodells an einer spezifizierten Stelle in der Einheitszelle des Kristalls verglichen. Im Gegensatz zur Rotationssuche werden hier nur intermolekulare Vektoren berücksichtigt.

$$R(r) = \int_V P_1(\vec{u}) \cdot P_2(\vec{r}, u) du$$

Dabei ist $P_1(\vec{u})$ die Pattersonfunktion des Kristalls, $P(\vec{r}, u)$ die mit der Translationsmatrix r bewegte Pattersonfunktion des Suchmodells und V das durch die Länge des Translationsvektors bestimmte Volumen der Pattersonfunktion. Dieses Volumen ist von der Größe des Suchmodells abhängig und muss individuell vom Anwender definiert werden.

Die Translationssuche ist der kritische Schritt beim molekularen Ersatz, denn der Erfolg ist sowohl von den Fehlern im Suchmodell als auch von der Exaktheit der Rotationslösung abhängig. Hinzu kommt ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis, da nur die intermolekularen Vektoren einen Beitrag leisten und die intramolekularen Vektoren ein starkes Hintergrundrauschen erzeugen.

1.11.1 Selbstrotationsfunktion

Abbildung 38 zeigt die $\kappa = 180^\circ$ -Ebene einer Selbstrotationsfunktion von NOX. Die Rechnung wurde mit einem Diffraktionsdatensatz durchgeführt, der unter der Annahme der Punktgruppe 422 skaliert worden war, als das obengenannte Zwillingsproblem noch nicht erkannt worden war. Daher zeigt die in Abb. 38 dargestellte (a,b)-Ebene insgesamt neun Maxima, die kristallographische zweizählige Symmetrieachsen markieren (gekennzeichnet mit dem Symbol *).

Darüber hinaus zeigt das Bild sogenannte nichtkristallographische zweizählige Drehachsen (Symbol +): Sie gehen nicht auf die Kristallsymmetrie, sondern auf die Punktsymmetrie des NOX-Oligomers zurück. Die Existenz dieser nichtkristallographischen Maxima beweist, dass die NOX zumindest Dimere bildet.

1.11.2 Suche der Modellsequenz

Durch Sequenzanalyse und Alignments (s. Abschnitt 1.5) wurde ermittelt, dass die NOX zur Familie der flavinhaltigen Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen angehört. Zu Beginn der Arbeit waren die 3D-Strukturen von der NADH-Oxidase aus *Thermus thermophilus* und NADH-Peroxidase aus *Enterococcus faecalis* dieser Familie aufgeklärt [131, 123, 125]. Um eine Strukturlösung mit Hilfe des molekularen Ersatzes zu versuchen, wurde hierzu in der PDB eine Recherche mit FASTA durchgeführt [191].

Das Protein mit der höchsten Sequenzidentität zur NOX ist die NADH-Peroxidase aus *E. faecalis* [123, 125] (PDB-Kürzel 1F8W). Abbildung 39 zeigt das Sequenzalignment der NOX mit der 1F8W.

Die Sequenzidentität mit der 1F8W beträgt nach dem Sequenzalignment 42,3 %. Zudem sind die Identitäten über das gesamte Molekül verteilt, was auf einen identischen Faltungstyp schließen lässt. Das Modell konnte erfolgreich für die Strukturlösung mittels molekularen Ersatzes verwendet werden.

NOX	1	MKVTTVVGCTHAGTFAIKQILAEHPDAEVTVYERNDVISFLSCGIALYLGG	50
		. : .:. . .:. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	1	MKVIVLGSSSHGGYEAVEELLNLHPDAEIQWYEKGDFISFLSCGMQLYLEG	50
NOX	51	KVADPQGLFYSSPEELQKLGANVQMNHNVLAIDPDQKTVTVEDLTSHAQT	100
		. .:. .:. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	51	KVKDVNSVRYMTGEKMESRGVNVFSNTEITAIQPKHQVTVKDLVSGEER	100
NOX	101	TESYDKLVMTSGSWPIVPKIPGIDSDRVKLC--KNWAHAQALIEDAKEAK	148
		. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	101	VENYDKLIISPGAVPFELDIPGKDLDNIYLMRGRQWAIKQKQKTVDPEVN	150
NOX	149	RITVIGAGYIGAELAEAYSTTGHDTVTLIDAMDRVMPKYFDADFTDVIEQD	196
		.: . :: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	151	NVVVIGSGYIGIEAAEAFKAGKKVTVIDILDRPLGVYLDKEFTDVLTEE	198
NOX	199	YRDHGVQLALSETVESFTDSATGLTIKTDKNSYETDLAILCIGFRPNTDL	248
		.:.:.:. .: . . .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	201	MEANNITIATGETVERYEGDGRVQKVVTDKNAYDADLVVVAVGVRPNTAW	250
NOX	249	LKGKVDMAPNGAIITDDYMRSSNPDIFAAGDSAAVHYNPTHQNAYIPLAT	298
		.:.:. . . .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	251	LKGTLELHPNGLIKTDEYMRTPSEPVDFAVGDATLIKYNPADTEVNIALAT	300
NOX	299	NAVRQGILVGKNLVKPTVKYMGQTQSSGLALYDRTIVSTGLTLAAKQQG	348
		.: . .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	301	NARKQGRFAVKNLEEPVKPFPGVQSSGLAVFDYKFASTGINEVMAQKLG	350
NOX	349	VNAEQVIVEDNYRPEFMPSTEPVLMFLVDFDPDTHRILGGALMSKYDVSQS	398
		.:.:. . .:. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	351	KETKAVTVVEDYLMDFNPDQKQAWFKLVYDPETTQILGAQLMSKADLTAN	400
NOX	399	ANTLSVCIQNENTIDDLAMVDMLFQPNFDRPFNYLNILAQAAQAKVAQSVNA	450
		. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
NPOX	401	INAIQLAIQAKMTIEDLAYADFFFFQPAFDKPWNIINTAAALEAVKQER	447

Abb. 39: Sequenzalignment von der NOX und PDB mit FASTA (PDB) nach dem Smith-Waterman Algorithmus [192], (I) identische Aminosäuren, (:) hohe Ähnlichkeit, (.) geringe Ähnlichkeit.

1.11.3 Kreuzrotations- und Translationsrechnungen

Zur Bestimmung der Kreuzrotationsrechnungen wurde AMORE eingesetzt. Als Suchmodell diente ein Monomer der 1F8W, das auf einen Poly-Ala Strang reduziert wurde (Glycine wurden nicht ausgetauscht). Die Suche wurde mit einem Pattersonradius von 25 Å und einer Schrittweite von 5° im Auflösungsbereich von 20 - 4 Å durchgeführt. Die Rotationssuche lieferte an erster Stelle eine Lösung, die von der zweithöchsten Lösung deutlich abgehoben war.

Die Liste der möglichen Rotationslösungen wurde in die Translationssuche eingespeist, die der korrekten Positionierung des Suchmoleküls in der Einheitszelle dient. Die Rechnung erfolgte ebenfalls mit AMORE im Auflösungsbereich von 20 - 4 Å. An dieser Stelle wurden alle zur Punktgruppe 4 gehörenden Raumgruppen (P4, P4₁, P4₂ und P4₃) getestet. Eine deutlich herausragende Translationslösung, die obendrein zu einer plausiblen Kristallpackung führte, gab es nur mit der Raumgruppe P4₃.

1.12 Verfeinerung und Qualität der Struktur

Zu Beginn der Strukturverfeinerung wurden aus dem Reflexdatensatz mit Hilfe eines Zufallsgenerators 5 % der Reflexe als Testdatensatz (freie Reflexe) zur Berechnung des freien R-Wertes (*cross validation*, [193]) ausgewählt. Danach wurde das korrekt positionierte Suchmodell mit dem Programm CNS unter Verwendung einer Moleküldynamik (*simulated annealing*), beginnend bei 5000 K, energieminiert.

Die Modellierung der Seitenketten – es wurde mit einem Poly-Ala-Modell begonnen – und die Strukturverfeinerung erfolgte im wesentlichen in zwei alternierenden Schritten. Zunächst wurde die maximale Auflösung auf 4 Å begrenzt und die Poly-Ala-Seitenketten mit dem Programm O [144] gegen die korrekten Reste ausgetauscht. Da nicht für alle Aminosäurereste zu Beginn eine interpretierbare Elektronendichte vorhanden war, musste der Austausch schrittweise erfolgen. Zwischen den Modellbauschritten in O [144] wurde die Struktur mit dem Programm CNS [140] mit einer Moleküldynamik beginnend bei einer Temperatur von 5000 K minimiert. Nachdem alle Ala-Seitenketten ausgetauscht worden waren, wurden lokalisierte Wassermoleküle in das Strukturmodell eingebaut und auch die hochaufgelösten Reflexe bis zu einer maximalen Auflösung von 2,7 Å in die Verfeinerung integriert.

Die manuelle Korrektur der Seitenketten und der Einbau von definierten Wassermolekülen führte zu einer weiteren Verbesserung der R-Werte.

Da die NOX eine NADH-abhängige Oxidase mit einem FAD (Cofaktor) pro Untereinheit ist, konnte in der 3D-Struktur der Cofaktor FAD je Monomer auch deutlich nachgewiesen werden. Auch das NAD⁺, welches bei der Aufreinigung der NOX anscheinend mitgeführt wurde, konnte in der NOX-Struktur beobachtet werden.

Die Tab. 13 fasst die R-Werte nach der Starre-Körper-Verfeinerung und der endverfeinerten NOX-Struktur zusammen. Die endverfeinerte Struktur der NOX zeigte einen R_{work}-Wert von 18,9 % und R_{free}-Wert von 27,6 %.

Tab. 13: Übersicht über die R-Werte nach der Starre-Körper-Verfeinerung und der endverfeinerten NOX-Struktur. Alle Verfeinerungsschritte wurden mit dem Programm CNS ausgeführt.

Modell- und Verfeinerungsparameter	Programm	R _{work} (%)	R _{free} (%)
Starre-Körper-Verfeinerung (25 - 2,7 Å)	CNS	27,9	30,9
Moleküldynamik, Modellbau, Wassersuche, NAD ⁺ und FAD ⁺	CNS	18,9	27,6

Das Ramachandran-Diagramm [194] veranschaulicht die Korrelation zwischen den Torsionswinkeln Φ und Ψ der Proteinhauptkette. Es gilt als bester Indikator für die „globale Korrektheit“ einer Struktur, da die Hauptkettentorsionswinkel während der Verfeinerung normalerweise nicht beschränkt werden [195]. Die Winkel werden nach sterisch günstigen (erlaubten) bis sterisch ungünstigen (verbotenen) Winkelbereichen differenziert. Eine Ausnahme bildet Glycin (Gly), das wegen seiner kleinen Seitenkette sterisch sehr flexibel ist.

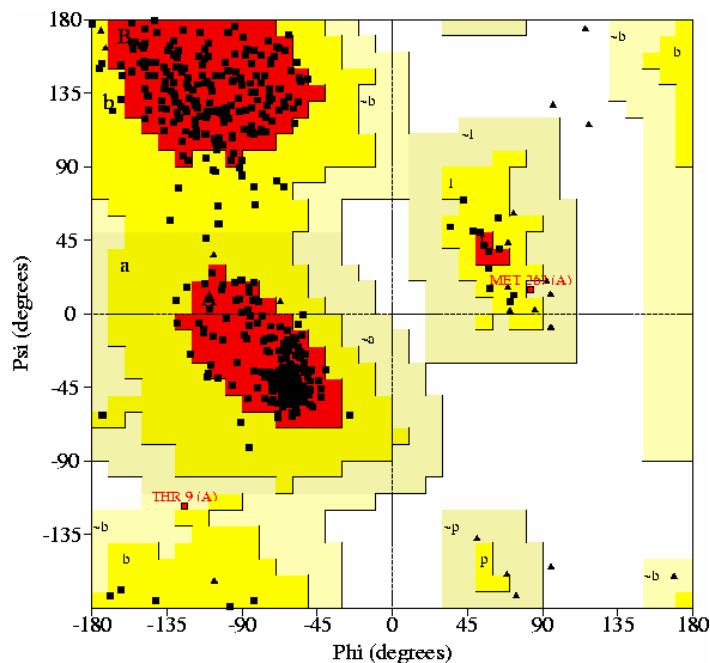


Abb. 40: Ramachandran-Diagramm der mit CNS verfeinerten 3D-Struktur der NOX erzeugt mit PROCHECK. A, B, L: günstige Regionen; a, b, l, p: erweitert erlaubte Regionen, ~a, ~b, ~l, ~p: großzügig erlaubte Regionen, Glycine sind als Dreiecke dargestellt.

Die Auftragung in Abb. 40 unterstreicht die gute stereochemische Qualität des Strukturmodells. Alle Nicht-Gly- und Nicht-Pro-Aminosäuren liegen in erweitert erlaubten Regionen. Die Statistik der Torsionswinkelverteilung ist in Tab. 14 zusammengestellt. Die Darstellung stammt von der mit CNS endverfeinerten Struktur.

Tab. 14: Statistik der ϕ / ψ -Torsionswinkelverteilung (Ramachandran-Diagramm). Die Statistik wurde mit dem Programm PROCHECK für die CNS endverfeinerte Struktur berechnet.

AS in erlaubten Regionen [A, B, L]	345	(87,1 %)
AS in erweitert erlaubten Regionen [a, b, l, p]	49	(12,4 %)
AS in großzügig erlaubten Regionen [$\sim$ a, $\sim$ b, $\sim$ l, $\sim$ p]	2	(0,5 %)
AS in verbotenen Regionen	0	(0,0 %)
Anzahl Nicht-Gly- und Nicht-Pro-AS	396	(100 %)
Anzahl Gly (dargestellt als Dreiecke)	27	
Anzahl Pro	20	
Gesamtzahl der AS	445	

Die Elektronendichten des FAD und NAD waren in allen Monomeren sehr gut zu erkennen. Der Einbau des FAD-Cofaktors und des NADs erfolgte manuell in O. In Abb. 41 ist ein FAD-Molekül einer Untereinheit der NOX und das katalytisch aktive Cys42 mit den zwei flankierenden Aminosäuren Ser41 und Gly43 dargestellt. Man kann deutlich sehen, dass die Struktur der NOX gut definiert ist, da die Elektronendichte mit $1,5 \sigma$ über dem Mittelwert skaliert, die Moleküle sehr gut abdeckt.

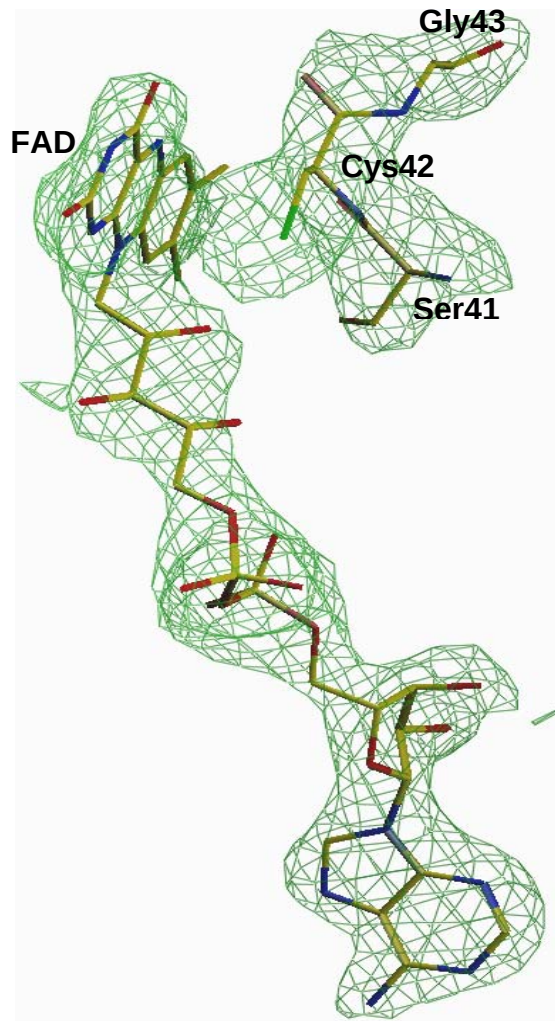


Abb. 41: FAD-Molekül aus einer Untereinheit der NOX und die Aminosäure Cys42 mit den zwei flankierenden Aminosäuren Ser41 und Gly43. Die Elektronendichte ist grün dargestellt und wurde mit $1,5 \sigma$ über dem Mittelwert skaliert.

1.13 3D-Struktur der NOX

Übersicht

Die Struktur der NOX wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst und bis zu einer Auflösung von $2,9 \text{ \AA}$ verfeinert. Die asymmetrische Einheit enthält acht Monomere, die zur vier Dimeren gruppiert sind (Beschreibung der Quartärstruktur s. unten).

Das NOX-Monomer besitzt eine konische Form mit Maßen von ca. $62 \times 60 \times 45 \text{ \AA}^3$. Die Tertiärstruktur besteht aus gemischten 29 Strängen β -Faltblättern und 11 α -Helices (Abb. 42). Diese Strukturelemente bilden im Zentrum des NOX-Proteins einen Tunnel, der die katalytischen Aminosäureresten, den FAD-Cofaktor enthält und in den das „Substrat“ NADH von der einen Seite sowie das Reduktionsmittel O_2 von der anderen Seite des Tunnels bindet.

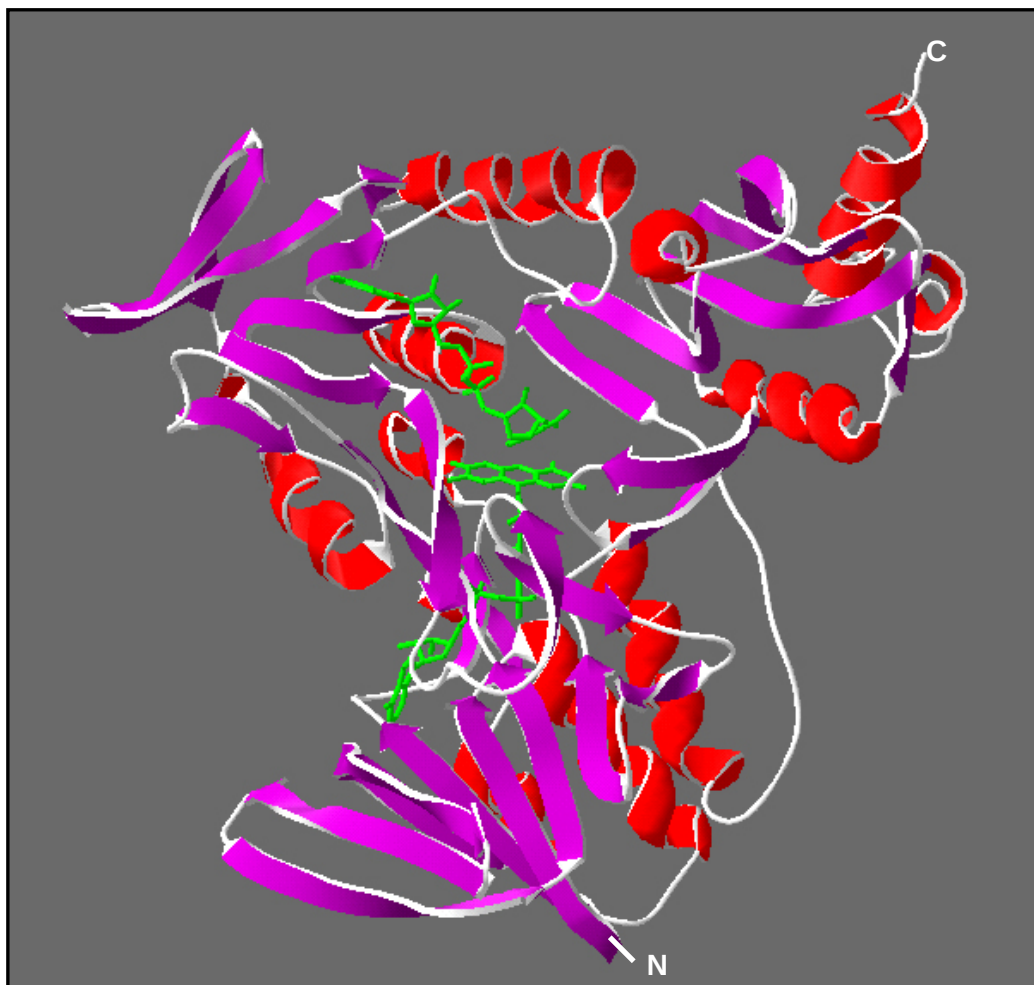


Abb. 42: Monomer A der NOX nach der Endverfeinerung. Die α -Helices sind rot, die β -Faltblätter violett, das FAD und NAD grün dargestellt. N kennzeichnet den N-Terminus und C den C-Terminus des NOX-Proteins.

Um den Tunnel im Zentrum der NOX exakt darzustellen, wurde eine Oberflächenberechnung des NOX-Monomers nach BRAGI [145] durchgeführt. In Abb. 43 ist die nach Hydrophobizität gefärbte Oberfläche (von rot nach blau) des NOX-Monomers einmal von der NADH-Bindungsseite und zum anderen von der O_2 -Bindungsseite gezeigt. Aus beiden Abbildungen bzw. Perspektiven kann deutlich ein Tunnel-System nachgewiesen werden. Außerdem wurde anhand der Oberflächenberechnung des NOX-Monomers festgestellt, dass die NADH-Bindungsseite eher hydrophil und die O_2 -Bindungsseite sowie der ganze Tunnelbereich hydrophob ist.

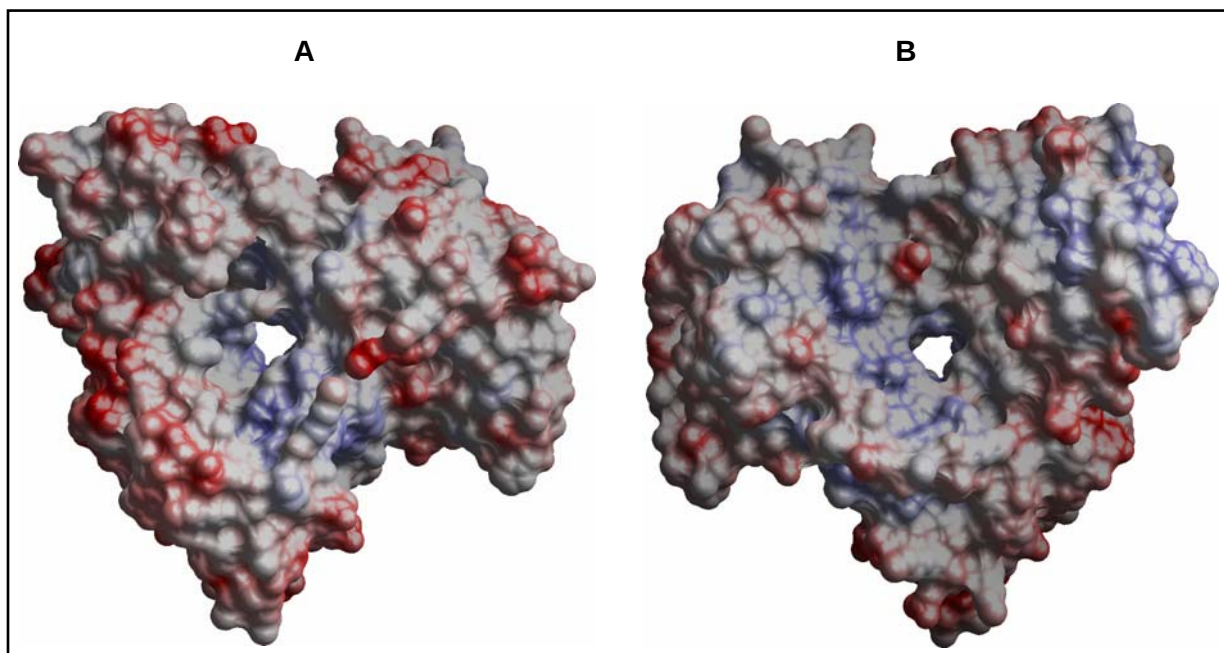


Abb. 43: Die nach Hydrophobizität (von rot nach blau) gefärbte Oberfläche des NOX-Monomers nach BRAGI verdeutlicht den Tunnel, in dessen Mitte das katalytische Zentrum befindet. **(A)** Sicht auf die NADH-Bindungsseite und **(B)** Sicht auf die O₂-Bindungsseite.

Das FAD-Bindungsmodul von NOX ist strukturell demjenigen von flavinabhängigen Monooxygenasen [196, 197] und von flavinabhängigen Halogenasen [198] sehr ähnlich, auch wenn die Reste der Strukturen deutlich voneinander abweichen.

Quartärstruktur

Vor der Strukturlösung gab es zwei sich widersprechende Ergebnisse zur Quartärstruktur der NOX: Aus der Gelfiltration (s. auch Abschnitt 1.4.1) folgte, dass die NOX als Homotetramer vorliegt, während die Kombination aus Selbstrotations- und nativer Pattersonfunktion gegen ein Tetramer und für ein Dimer sprach (s. Abschnitt 1.11.1). Dass NOX im Kristall tatsächlich als Dimer vorliegt, ließ sich mit der gelösten Struktur eindeutig zeigen. Ein komplettes NOX-Dimer ist in Abb. 44 dargestellt. Überlagert man diesem Dimer ein NPOX-Tetramer aus *Enterococcus faecalis* (Abb. 45) so zeigt sich, dass entsprechende Tetramerisierungskontakte in der NOX-Kristallstruktur nicht vorhanden sind.

Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass sich diese Analyse auf den kristallinen Zustand bezieht. Es ist keineswegs ausgeschlossen, dass es Lösungsbedingungen gibt, unter denen sich NOX-Dimere in ähnlicher Weise wie das NPOX-Tetramer (Abb. 45) zusammenlagern. Umgekehrt ist die Tetramerisierungsfläche in den NPOX-Tetramere so klein, dass deren Dissoziation zu Dimeren unter gewissen Bedingungen gut möglich erscheint.

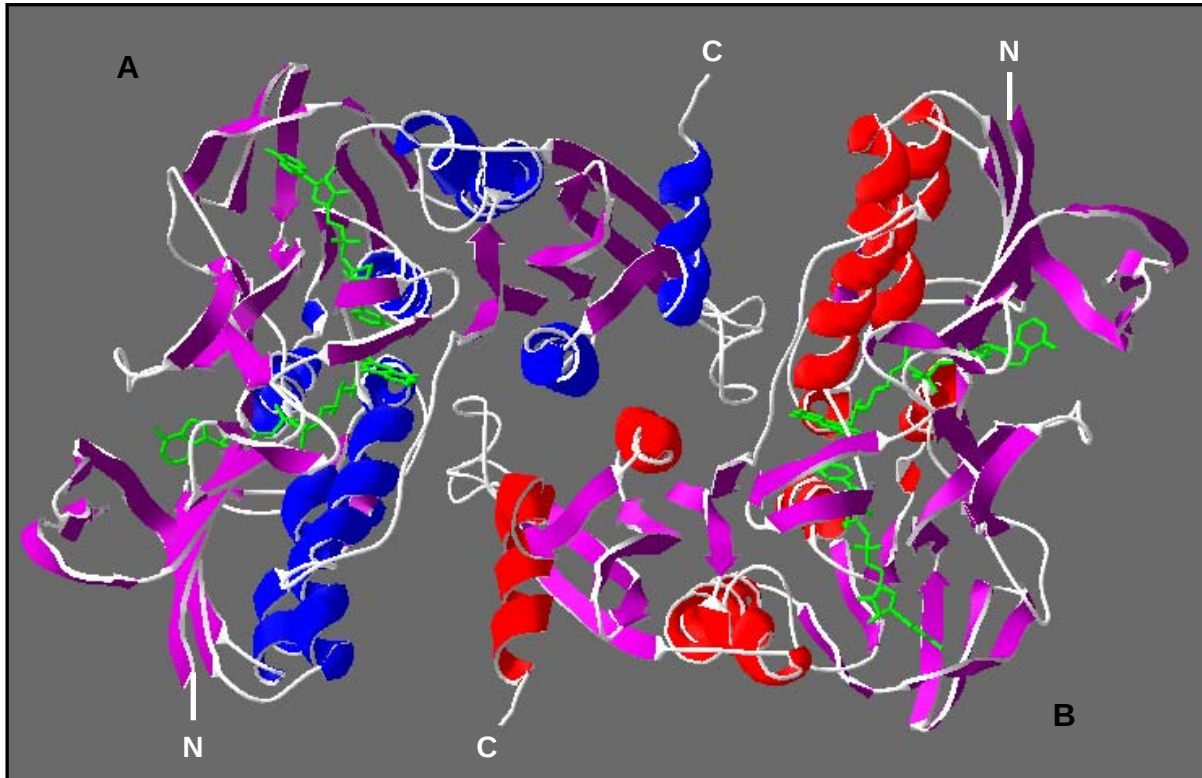


Abb. 44: Dimer der NOX. Monomer **A**: die α -Helices sind blau, die β -Faltblätter violett. Monomer **B**: die α -Helices sind rot, die β -Faltblätter violett. Das FAD und NAD sind grün dargestellt. N kennzeichnet den N-Terminus und C den C-Terminus des NOX-Proteins.

Eine interessante Beobachtung konnte am NOX-Dimer gemacht werden: Der hydrophile Teil der O_2 -Eintrittsstelle wird durch die zweite Untereinheit so überdeckt, dass insgesamt ein hydrophober Tunnel entsteht. Es sind drei Proline (Pro362, Pro424 und Pro429), die die zweite Untereinheit zur Tunnelwandung beisteuert. Bemerkenswerterweise besitzt NPOX aus *E. faecalis* ebenfalls einen solchen Tunnel, jedoch ist er in diesem Falle geladen.

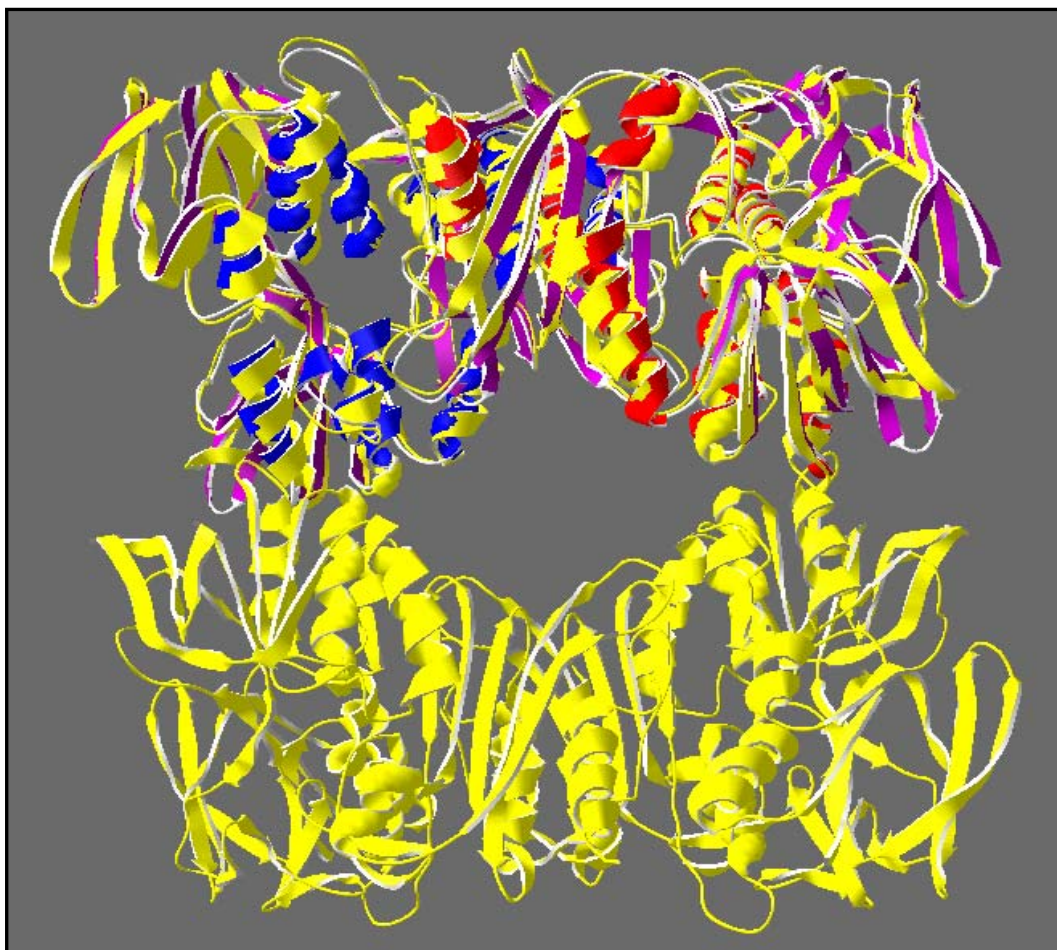


Abb. 45: NOX-Dimer, um 90° gedreht gegenüber Abb. 44 und mit dem NADH-Peroxidase-Tetramer überlagert. NOX-Dimer: NOX-Monomer A, die α -Helices sind rot, die β -Faltblätter violett. NOX-Monomer B, die α -Helices sind blau, die β -Faltblätter violett. NPOX-Tetramer: Alle vier Monomere sind gelb dargestellt. Eine entsprechende Tetramerisierung in der NOX-Kristallstruktur ist nicht vorhanden.

Lokalisation des aktiven Zentrums

Wie bereits angedeutet, befindet sich das aktive Zentrum der NOX im Mittelpunkt der NOX-Kristallstruktur. An dieser Stelle, die gleichzeitig Teil des Tunnel ist, läuft auf der NADH-Bindungsseite der oxidative Teil der NOX-Reaktion und auf der O_2 -Bindungsseite der reduktive Teil ab. Beide Teilreaktionen werden mit dem katalytisch aktiven Cys42, dessen Schwefel-Atom zwischen dem Thiolat (Cys42-SOH) und der Sulfonsäure (Cys42-SO₃H) wechselt, über einen teilweise engen Charge-Transfer-Komplex mit FAD zur einer Gesamtreaktion vereinigt. In der Kristallstruktur der NOX wurde bisher kein „durchoxidiertes“ Schwefel (Cys42-SO₃[⊖]) entdeckt, stattdessen wurde entweder ein Cys42-SH oder ein Cys42-SOH beobachtet. Da die aktiven Zentren der acht NOX-Monomere in der asymmetrischen Einheit verschieden vorliegen, kann eindeutig eine Asymmetrie der NOX-Monomere festgestellt werden.

Die bei der Gesamtreaktion der NOX beteiligten Residuen His10, Phe14, Ser41, Cys42, Val301, Ile305 und die beiden Cofaktoren NADH und FAD sind in Abb. 46 dargestellt.

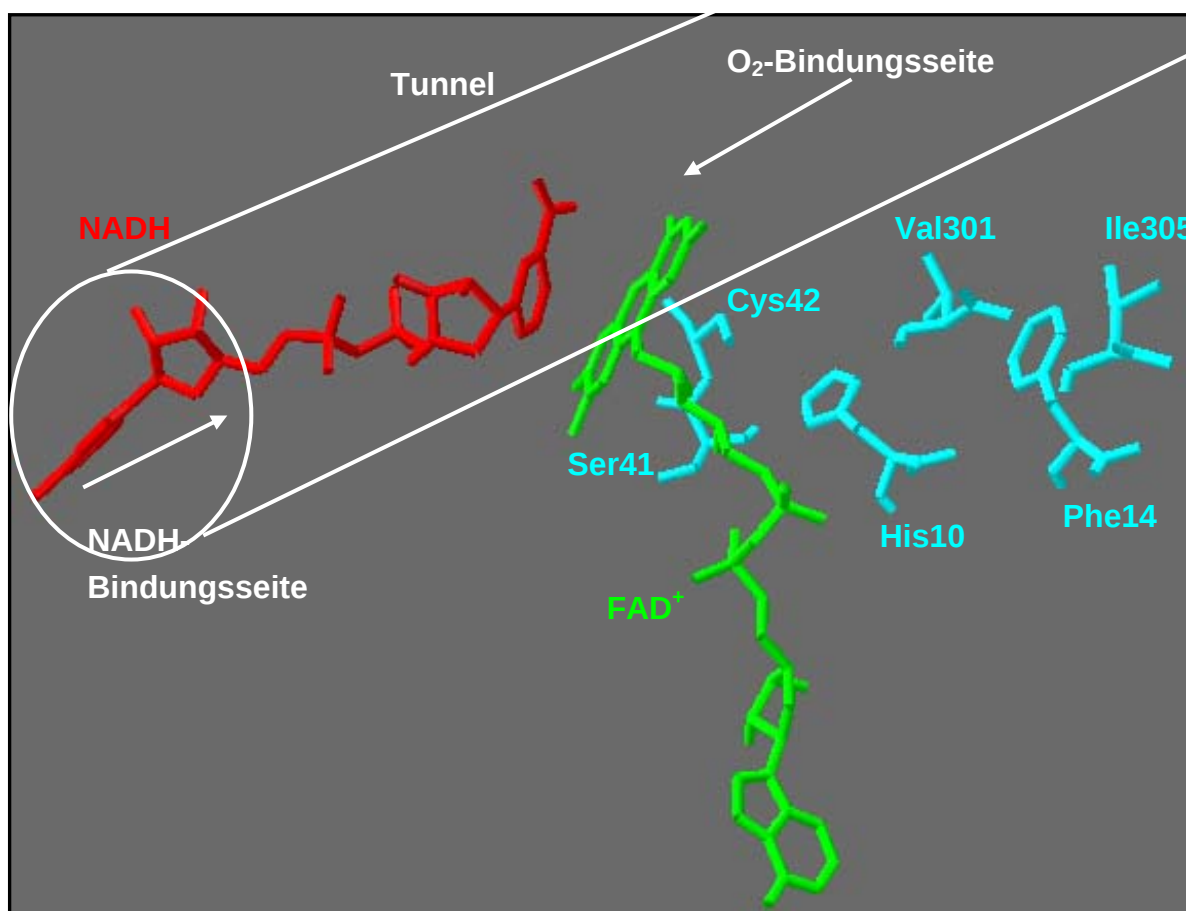


Abb. 46: Aktives Zentrum der NOX: Residuen des aktiven Zentrums der NOX und die ungefähre Lage des Tunnels mit der NADH- und O₂-Bindungsseite sind dargestellt. Das komplette NADH-Molekül und der Isoalloxazin-Teil des FADs liegen im Tunnel. Das katalytisch aktive Cys42 liegt dicht am Isoalloxazinring und somit auch an dem Tunnel. Außerdem sind die Residuen His 10, Phe14, Val301 und Ile305 dargestellt, da sie auch eine wichtige Rolle bei der Katalyse einnehmen.

1.14 Biotechnologische Bedeutung der NOX

1.14.1 Kopplung von Alkohol-Dehydrogenasen und NOX

Mithilfe der Kopplung partiell gereinigter ADHs und NOX sollte eine Racematspaltung von Alkoholen entsprechend Schema 1 durchgeführt werden, wodurch enantiomerenangereicherte oder enantiomerenreine Alkohole gewonnen werden sollten.

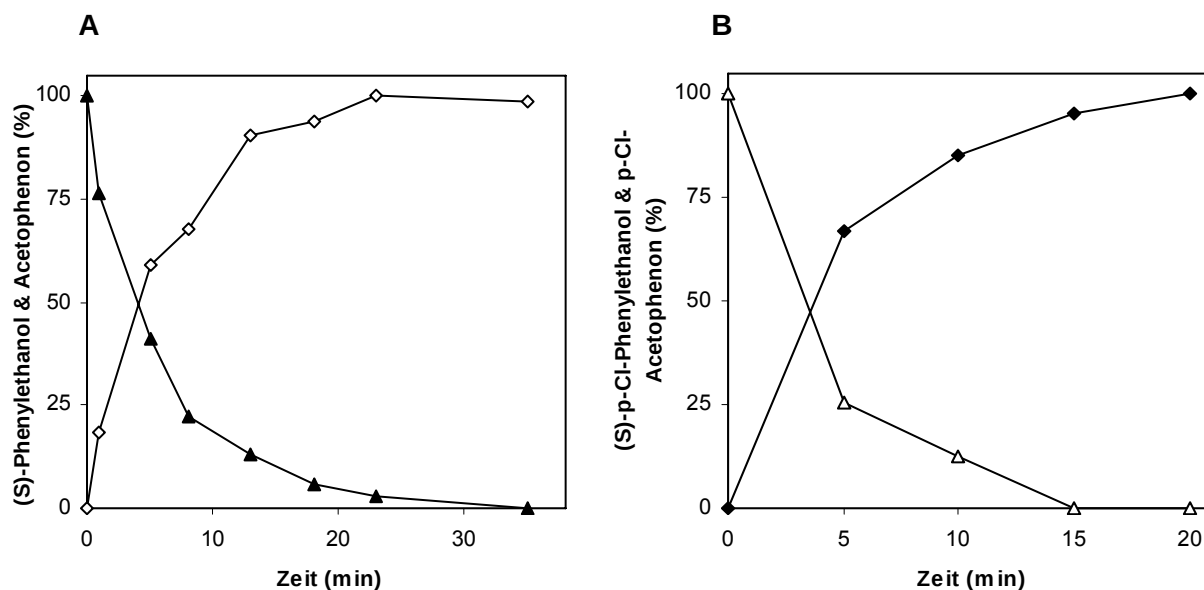


Abb. 47: Zeitabhängigkeit der oxidativen Racemattrennung (10 mM Racemat, 0,2 mM NAD^+) eines racemischen Alkohol-Gemischs durch Alkohol-Dehydrogenase. **(A)** NAD^+ -abhängige (S)-spezifische ADH zur Produktion von (R)-Phenylethanol mit 0,34 U ADH und 3 U NOX aus (R,S)-Phenylethanol (▲ Acetophenon-Zunahme, ◇ (S)-Phenylethanol-Abnahme), **(B)** NAD^+ -abhängige (S)-spezifische ADH zur Produktion von (R)-p-Cl-Phenylethanol mit 1 U ADH und 1,1 U NOX aus (R,S)-p-Cl-Phenylethanol (◆ Acetophenon-Zunahme, △ (S)-p-Cl-Phenylethanol-Abnahme).

Außerdem wurden oxidative Racemattrennungen mit den Racematen (R,S)-2-Octanol und (S)-2-Hexanol durchgeführt. Das Enantiomer (S)-2-Octanol wurde durch die (S)-ADH und die NOX, welche zur Regenerierung von NAD^+ diente, nach 25 Minuten vollständig zu 2-Octanon umgesetzt. Auch eine vollständige Umsetzung des Enantiomers (S)-2-Hexanol zu 2-Hexanon mit dem Racemat (R,S)-2-Hexanol als Eingangssubstrat konnte nachgewiesen werden. 5 mM des Enantiomers (S)-2-Hexanol wurde nach 10 Minuten, sowohl mit 0,2 mM NAD^+ als auch mit 0,2 mM NADH, durch 0,99 U (S)-ADH und 2,5 U NOX komplett umgesetzt.

Bestimmung der kinetischen Konstanten

Um die Auswirkung der (R)-Komponente und der Ketosäure, die sich im Verlauf der Umsetzung anhäuft, zu untersuchen, wurden kinetische Konstanten ermittelt.

Dabei wurden kinetische Daten der (S)-ADH mit (S)-Phenylethanol in An- und Abwesenheit von (R)-Phenylethanol und mit (S)-2-Octanol in An- und Abwesenheit von (R)-2-Octanol oder 2-Octanon bestimmt. Aus der Tab. 15 kann deutlich entnommen werden, dass (R)-Phenylethanol die (S)-ADH deutlich in ihrer Aktivität inhibiert. Der K_M -Wert wurde durch die Anwesenheit des (R)-Phenylethanol um ca. das 8-fache von 1,13 mM auf 8,55 mM erhöht. Für die Umsetzung von *rac*-Octanol konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die (R)-Komponente (R)-2-Octanol inhibiert, in diesem Fall konnte auch eine deutliche Inhibierung der (S)-ADH durch die Ketosäure (2-Octanon) nachgewiesen werden (Tab. 15). Für das Substrat (S)-2-Octanol allein wurde ein K_M -Wert von 0,05 mM bestimmt, dieser wurde durch die Anwesenheit von (R)-2-Octanol um ca. das 4-fache auf 0,21 mM und durch die Anwesenheit von 2-Octanon sogar um das 7-fache auf 0,36 mM erhöht.

Tab. 15: Kinetische Daten der (S)-ADH bestimmt für die Substrate in An- und Abwesenheit des entsprechenden Enantiomers oder der Ketosäure. 100 % entsprechen 12,3 U/mg für (S)-Phenylethanol und 74,8 U/mg für (S)-2-Octanol.

Substrate	Gemessen in	K_M (mM)	V_{max} (%)
	Anwesenheit von		
(S)-Phenylethanol	-	1,13	100
(S)-Phenylethanol	10 mM (R)-Phenylethanol	8,55	81
(S)-2-Octanol	-	0,054	100
(S)-2-Octanol	2 mM (R)-2-octanol	0,21	85
(S)-2-Octanol	2 mM 2-Octanon	0,36	70

Tab. 15 zeigt, dass sowohl (R)-Alkohole als auch Ketone die (S)-ADH aus *R. erythropolis* hemmen. Der Haupteinfluss betrifft den K_M -Wert. Trotzdem zeigen die Ergebnisse zur Racemat-trennung, dass eine vollständige Oxidation des (S)-Alkohols möglich ist.

1.14.1.2 Kopplung (R)-ADH aus *Lactobacillus kefir* und NOX

In gleicher Weise wie vorab für die (S)-ADH gezeigt wurde eine Reihe von Umsetzungen von racemischen Alkohol-Gemischen mit einer (R)-ADH zur Gewinnung von (S)-Alkoholen durchgeführt. Da die NOX nur NADH, aber kein NADPH umsetzt, wurde als (R)-ADH eine NAD-Mutante der natürlicherweise NADP-abhängigen ADH aus *Lactobacillus kefir* eingesetzt.

Umsetzung

(R,S)-*p*-Cl-Phenylethanol und (R,S)-Phenylethanol wurden im 1,5 ml-Maßstab durch die NAD⁺-abhängige (R)-spezifische ADH aus *L. kefir* (EC 1.1.1.1) umgesetzt. Die (R)-ADH wurde direkt aus dem Rohextrakt und die NOX nach Reinigung über eine Q-Sepharose-Säule verwendet. Der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von (R,S)-Phenylethanol und (R,S)-*p*-Cl-Phenylethanol:

Enzymquelle	0,18 - 0,3 U (R)-ADH (Aktivität für das jeweilige Substrat bestimmt) 2,4 - 4 U NOX
Substrat	10 mM (R,S)-Alkohol
Ansatzvolumen	1,5 ml
Volumen	Eppendorf Reaktionsgefäß 2 ml
Cofaktor	0,2 mM NAD ⁺
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
Art der Durchmischung	Thermomixer 700 rpm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde die (*R*)-Komponente der Substrate (*R,S*)-Phenylethanol und (*R,S*)-*p*-Cl-Phenylethanol zu 100 % umgesetzt (Abb. 48):

Die 100 %ige Umsetzung des Enantiomers (*R*)-Phenylethanol zu Acetophenon aus dem Racemat (*R,S*)-Phenylethanol wurde nach 120 Minuten erreicht. Die vollständige Umsetzung des Enantiomers (*R*)-*p*-Cl-Phenylethanol zu *p*-Cl-Acetophenon aus dem Racemat (*R,S*)-*p*-Cl-Phenylethanol wurde nach 85 Minuten erzielt. Beide Umsetzungen wurden mit verschiedenen Enzymaktivitäten der (*R*)-ADH und der NOX durchgeführt.

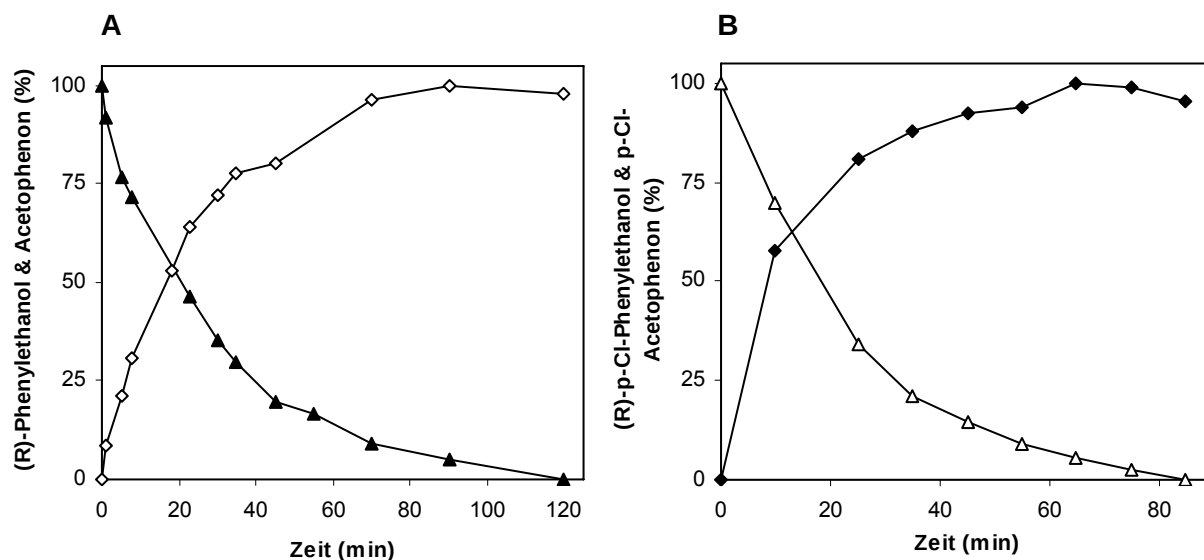


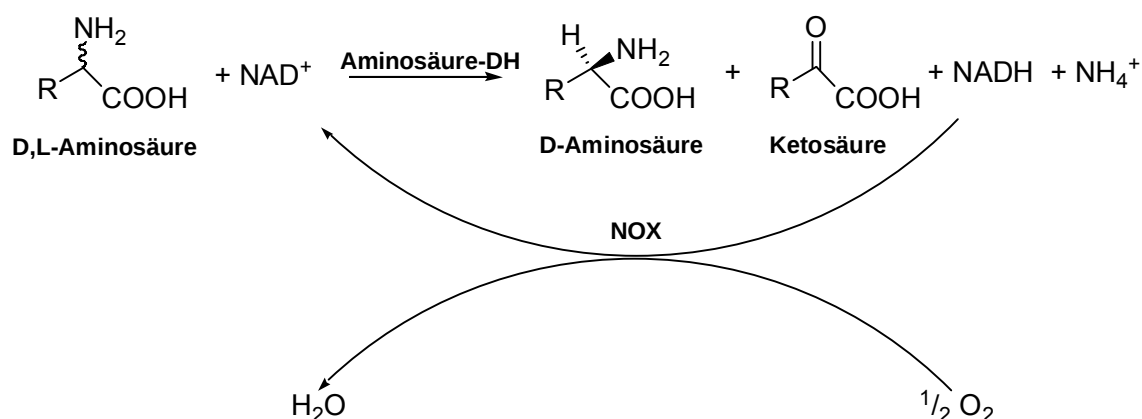
Abb. 48: Oxidative Racemattrennung (10 mM Racemat, 0,2 mM NAD^+) durch eine Alkohol-Dehydrogenase. **(A)** NAD^+ -abhängige (*R*)-spezifische ADH aus *L. kefir* zur Produktion von (*S*)-Phenylethanol mit 0,3 U ADH und 4 U NOX aus (*R,S*)-Phenylethanol (◇ Acetophenon, ▲ (*R*)-Phenylethanol), **(B)** NAD^+ -abhängige (*R*)-spezifische ADH aus *L. kefir* zur Produktion von (*S*)-*p*-Cl-Phenylethanol mit 0,18 U ADH und 2,4 U NOX aus (*R,S*)-*p*-Cl-Phenylethanol (◆ *p*-Cl-Acetophenon, △ (*S*)-*p*-Cl-Phenylethanol).

Aktivitätsvergleich

Um die Auswirkung des (*S*)-Phenylethanol auf die Aktivität der (*R*)-ADH aus *L. kefir* zu untersuchen, wurde eine Kinetik der (*R*)-ADH für (*R*)-Phenylethanol in An- und Abwesenheit von 10 mM (*S*)-Phenylethanol aufgenommen. Es wurde festgestellt, dass (*S*)-Phenylethanol die (*R*)-ADH nicht in ihrer Aktivität inhibiert.

1.14.2 Kopplung von Aminosäure-Dehydrogenasen und NOX

Durch die Kopplung von Aminosäure-Dehydrogenasen (AADHs) und NOX sollte eine Racematspaltung von DL-Aminosäuren durchgeführt werden. Ziel der Racemattrennung war es enantiomeren-angereicherte oder enantiomerenreine Aminosäure-Lösungen zu erzielen (Schema 2). Da nahezu alle bislang bekannte Aminosäure-Dehydrogenasen L-spezifisch sind, können auf diesem Weg D-Aminosäuren hergestellt werden. Das ist allerdings gleichzeitig auch die wirtschaftlich wertvollere Komponente.



Schema 2: Schematische Darstellung der Gewinnung von D-Aminosäuren durch selektive enzymkatalysierte Oxidation der L-Aminosäure eines Racemats. Eingesetzt wird eine L-Aminosäure-Dehydrogenase in Kopplung mit der NADH-Oxidase (NOX) zur Regenerierung des Coenzym NAD^+ . Bei vollständigem Ablauf der Reaktion erhält man enantiomerenreine D-Aminosäure und die entsprechende Ketosäure als Oxidationsprodukt.

1.14.2.1 Lösliche Enzyme

Zur Racematspaltung von DL-Aminosäuren wurden die L-Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) aus Rinderleber und die L-Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus cereus* mit der NOX gekoppelt.

A) Kopplung von GluDH und NOX

Umsatz von DL-Glutaminsäure

DL-Glutamat wurde im 1 ml-Maßstab durch die L-Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) aus Rinderleber (EC 1.4.1.2) und die NOX umgesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Glutaminsäure:

Enzymquelle	0,24 U GluDH und 4 U NOX
Substrat	10 mM DL-Glutaminsäure
Ansatzvolumen	1 ml
Volumen	Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml
Cofaktor	0,2 mM NAD^+
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
Art der Durchmischung	Thermomixer 700 rpm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde ein ee-Wert von 100 % für D-Glutaminsäure erreicht (Abb. 49).

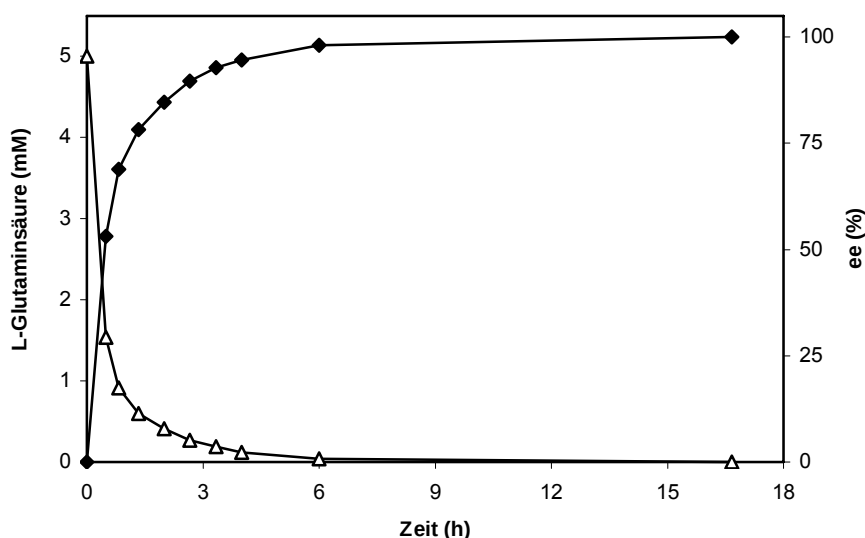


Abb. 49: Oxidative Deaminierung von L-Glutaminsäure (Δ) und ee-Wert für D-Glutaminsäure (◆) während der Racemattrennung von DL-Glutaminsäure durch die GluDH und die NOX in Abhängigkeit von der Zeit.

Bestimmung der kinetischen Konstanten

a) Kinetische Daten der GluDH für DL-Glutaminsäure

Zur Bestimmung der kinetischen Daten der GluDH für das Substrat DL-Glutaminsäure (L-Glu) wurde eine Kinetikmessung aufgenommen. Nach der Auswertung der Daten wurden ein $V_{\max}$ -Wert von 0,19 U/mg und ein K_M -Wert von 0,36 mM für DL-Glu bestimmt.

b) Einfluss der D-Komponente und der Ketosäure

Um die Auswirkung von D-Glutamat und des Ketoglutarats auf die Aktivität der GluDH zu untersuchen, wurden Kinetiken der GluDH mit L-Glu als Substrat und mit L-Glu in Gegenwart von 5 mM an D-Glu oder 3 mM an Ketoglutarat aufgenommen. Die kinetischen Daten sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Aus der Tab. 16 kann entnommen werden, dass sowohl D-Glu als auch Ketoglutarat die GluDH stark in ihrer Aktivität inhibieren. Die Inhibierung betrifft im wesentlichen die $V_{\max}$ -Werte; der K_M -Wert für L-Glu wird durch die Anwesenheit von 5 mM D-Glu lediglich um 3 % und in Anwesenheit von 3 mM Ketoglutarat um 15 % erhöht, wobei der K_M -Wert für L-Glu ohne Zusatz den 100 %-Wert darstellt.

Tab. 16: Kinetische Daten der GluDH mit L-Glu als Substrat in An- und Abwesenheit von 5 mM D-Glu oder 3 mM Ketoglutarat.

Enzym	Substrat	Gemessen in Anwesenheit von	$V_{\max}$ (U/mg)	K_M (mM)
GluDH aus Rinderleber	L-Glu	-	1,30	1,33
		5 mM D-Glu	0,27	1,37
		-	1,58	1,59
		3 mM Ketoglutarat	0,35	1,83

B) Kopplung von LeuDH und NOX

Umsatz von DL-Leucin und DL-*tert*-Leucin

Für die Umsetzung von DL-Leucin und DL-*tert*-Leucin wurde die L-Leucin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.9) aus *Bacillus cereus* (LeuDH) verwendet.

DL-Leucin und DL-*tert*-Leucin wurden im 1 ml-Maßstab durch die LeuDH und die NOX umgesetzt, der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Leucin und DL-*tert*-Leucin:

Enzymquelle	0,5 U LeuDH für DL-Leu und 0,25 U für DL- <i>tert</i> -Leu 4,2 U NOX
Substrat	10 mM DL-Leu und DL- <i>tert</i> -Leu
Ansatzvolumen	1 ml
Volumen	Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml
Cofaktor	0,2 mM NAD ⁺
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
Art der Durchmischung	Thermomixer 700 rpm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde ein *ee*-Wert von 95,5 % für DL-Leucin nach 4 h erreicht und nach 6 h betrug die restliche L-Leucin-Konzentration in dem Ansatz 0,11 mM (Abb. 50 A). Mit 0,25 U LeuDH und 4,2 U NOX wurde für die Umsetzung von L-*tert*-Leucin während der Racemattrennung von 10 mM DL-*tert*-Leucin ein *ee*-Wert von 99,3 % erreicht (Abb. 50 B). Das L-*tert*-Leucin wurde schon nach 5 h bis zu einer restlichen Menge von 0,01 mM umgesetzt.

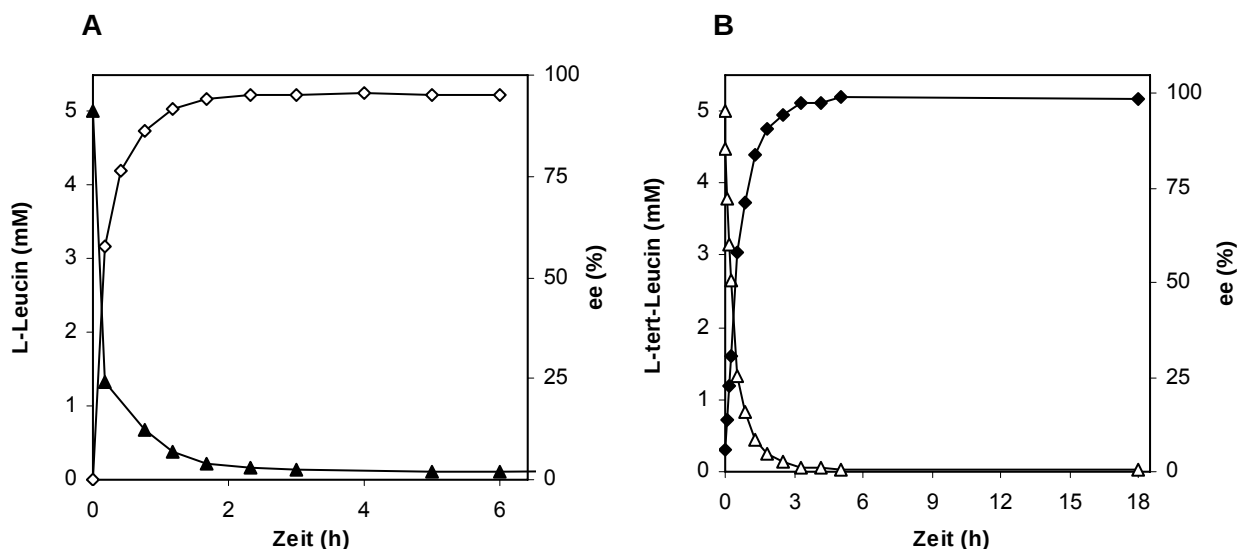


Abb. 50: Oxidative Racemattrennung durch die L-Leucin-Dehydrogenase aus *Babillus cereus* und die NOX in Abhängigkeit von der Zeit. Desaminierung (A) von L-Leu (▲) und ee-Wert für D-Leu (◇) (B) von L-tert-Leu (△) und ee-Wert für D-tert-Leu (◆).

Bestimmung der kinetischen Konstanten

a) Kinetikmessungen der LeuDH für DL-Leucin

Für die Substrate L-Leucin und DL-Leucin wurden Kinetikmessungen von der LeuDH zur Bestimmung von kinetischen Daten durchgeführt. Nach der Auswertung der Daten wurden ein $V_{\max}$ -Wert von 24,3 U/mg und ein K_M -Wert von 0,88 mM für L-Leucin bestimmt. Für DL-Leucin wurden ein $V_{\max}$ -Wert von 12,5 U/mg und ein K_M -Wert von 1,0 mM ermittelt (Tab. 17).

Um die Auswirkung von D-Leucin auf die Aktivität der LeuDH zu untersuchen, wurde eine Kinetik mit der LeuDH für das Substrat L-Leucin und L-Leucin mit konstant 10 mM an D-Leucin aufgenommen. Aus der Tabelle 1 kann entnommen werden, dass D-Leucin die LeuDH stark in ihrer Aktivität inhibiert, aber der K_M -Wert bleibt für L-Leucin und L-Leucin mit 10 mM D-Leucin fast gleich. Diese Art der Inhibierung, wo der K_M -Wert nicht verändert wird, deutet auf einen nicht-kompetitiven Mechanismus.

Tab. 17: Kinetische Daten der LeuDH mit L-Leucin als Substrat in An- und Abwesenheit von 10 mM D-Leucin.

Enzym	Substrat	D-Leucin	$V_{\max}$ (U/mg)	K_M (mM)
LeuDH aus <i>Bacillus cereus</i>	L-Leu	-	29,5	2,0
		10 mM	11,7	2,2

b) Kinetikmessungen der LeuDH für DL-*tert*-Leucin

Die Racemattrennung von DL-*tert*-Leu wurde ausführlich kinetisch charakterisiert, es wurden Kinetikmessungen mit der LeuDH für die Substrate L-*tert*-Leu, DL-*tert*-Leu und L-*tert*-Leu in Anwesenheit von D-*tert*-Leu durchgeführt.

Anhand der Ergebnisse aus der Tab. 18 wird deutlich, dass die LeuDH einen deutlich geringeren K_M -Wert für L-*tert*-Leu besitzt als für DL-*tert*-Leu. Der K_M -Wert ist für DL-*tert*-Leu (16,6 mM) fast doppelt so hoch wie für L-*tert*-Leu (8,9 mM). Daraus folgt, dass das D-*tert*-Leu einen inhibierenden Effekt auf die LeuDH-Aktivität hat. Wie in Tab. 18 zu sehen ist, wurde anschließend untersucht, welche Auswirkungen das D-*tert*-Leu auf die Aktivität der LeuDH für das Substrat L-*tert*-Leu mit konstant 20 mM und 37 mM D-*tert*-Leu hat. Man kann anhand der Erniedrigung der V_{max} -Werte aus der Tab. 18 deutlich entnehmen, dass durch Erhöhung der D-*tert*-Leucin-Konzentration eine immer stärker werdende Inhibierung der LeuDH-Aktivität zu verzeichnen ist. Die Auswertung zeigt aber, dass sich die K_M -Werte im Rahmen der Messgenauigkeit nicht ändern, eher hat D-*tert*-Leu Einfluss auf den V_{max} -Wert. Diese Art der Hemmung spricht für einen nicht-kompetitiven Mechanismus.

Die kinetischen Daten sind in Tab. 18 zusammengefasst.

Tab. 18: Kinetische Daten der LeuDH aus *Bacillus cereus* für *tert*-Leucin.

Enzym	Substrat	D- <i>tert</i> -Leucin	V_{max} (U/mg)	K_M (mM)
LeuDH aus <i>Bacillus cereus</i>	DL- <i>tert</i> -Leu	-	0,28	16,6
	L- <i>tert</i> -Leu	-	0,34	8,9
	L- <i>tert</i> -Leu	0 mM	0,35	10,2
		20 mM	0,32	12,6
		37 mM	0,27	10,7

1.14.3 Coexpression LeuDH und NOX

Ein anderer Ansatz als bei der Verwendung isolierter Enzyme wurde als Ganzzell-System verfolgt. Biochemisch sollten dieselben gekoppelten Reaktionen der Oxidation von L-Leucin und der Regenerierung von NAD^+ durch die NOX ablaufen, in diesem Fall allerdings nicht mit isolierten Enzymen, sondern mit ganzen *E. coli*-Zellen, die die beiden Enzyme überexprimieren. Vorteile in der Anwendung wären, dass die Enzyme nicht gereinigt werden müssen und dass auf den Zusatz von Coenzymen verzichtet werden könnte. Ein möglicher weiterer Vorteil wäre, dass die ganzen Zellen relativ leicht von der Produktlösung abgetrennt werden und gegebenenfalls wiederverwendet werden können.

1.14.3.1 Coklonierung des *leudh*-Gens in *E. coli*-Expressionsvektor pDnox

Über PCR wurden Restriktionsschnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *leudh*-Gens (GI: 6741939) eingefügt. Die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors wurde jeweils so ausgesucht, dass die Entfernung zwischen dem Startcodon des Gens und der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors 6 bis 8 Basen betrug. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sind in Abb. 51 dargestellt.

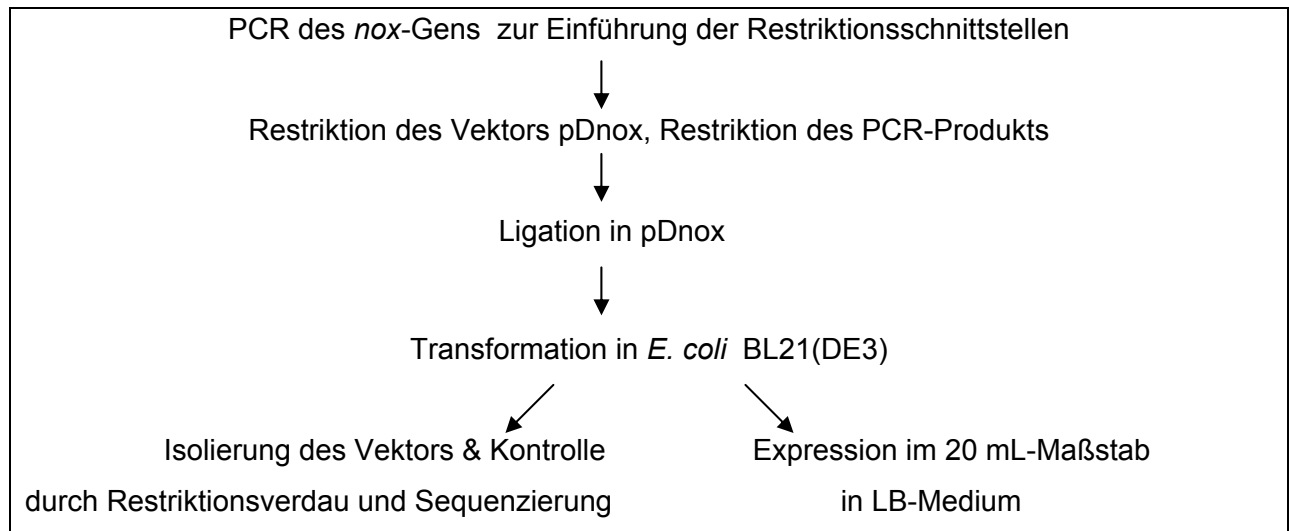


Abb. 51: Fließschema zur Coklonierung des *leudh*-Gens in den *E. coli*-Vektor pDnox.

Zur Coexpression der LeuD_H und der NOX wurde das *leudh*-Gen in den *E. coli*-Vektor pDnox (pETDuet-1/NOX) kloniert (Tab. 19).

Das *leudh*-Gen wurde in die erste 'multiple cloning site' (MCS1) des pDnox-Vektors kloniert (Tab. 19), da sich in der zweiten 'multiple cloning site' (MCS2) das *nox*-Gen befindet.

Tab. 19: Zusammenfassung des neuerstellten *E. coli*-Vektors pETDuet-1.

Name	Vektor	Insert	Restriktion		Primer	
			5′	3′	5′	3′
pDleunox	pDnox	<i>leudh</i>	NcoI	SacI	NcoIfor	SacIrev

In Abbildung 52 ist der neuerstellte *E. coli*-Vektor (pDleunox) zur Coexpression der LeuD_H und NOX dargestellt.

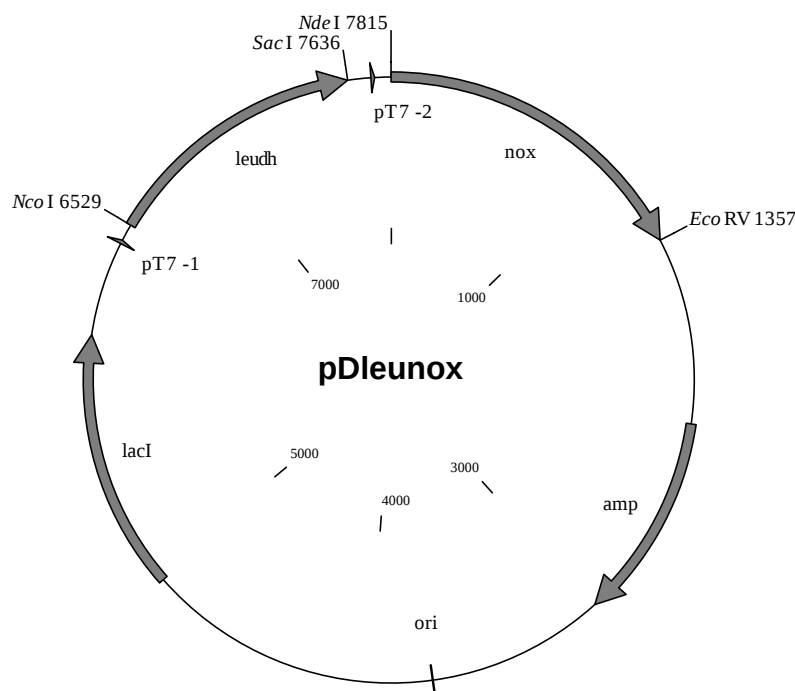


Abb. 52: Plasmidkarte der in den Expressionsvektor pETDuet-1 klonierten LeuDH und NOX (amp = Ampicillin-Resistenz, pT7-1 und pT7-2 = Promotoren, leudh und nox kloniertes Gen, NcoI und SacI = Restriktionsschnittstellen).

1.14.3.2 Untersuchung der Coexpressionsbedingungen in *E. coli*

Nach Transformation des Vektors pDleunox in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurden die Bedingungen zur Expression der beiden Enzyme LeuDH und die NOX optimiert. Dabei wurden die Induktionstemperatur und die Induktorkonzentration variiert. Die Charakterisierung konnte allerdings nur für die Expression der NOX eindeutig quantitativ durchgeführt werden, während die LeuDH-Aktivität in Gegenwart von NOX nicht photometrisch gemessen werden konnte, da das NADH von der NOX sofort wieder oxidiert wird. Die SDS-Gele zeigen aber, dass LeuDH mit guter Ausbeute überexprimiert vorliegen muss, in der löslichen Fraktion ist dieses Enzym eindeutig gut nachweisbar. Photometrisch konnte in allen zellfreien Rohextrakten NOX-Aktivität gemessen werden. Die SDS-Gele zeigen zudem, dass beide Enzyme, insbesondere die NOX, in deutlichem Ausmass noch Inclusionbodies bilden (Abb. 53).

Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tab. 20 zu sehen.

Tab. 20: Variation der Induktionstemperatur und der IPTG-Konzentration für das Vektor-Wirt-System.

Coexpressions-system	Induktor-konz. (µM)	Induktions-dauer (h)	Induktions-zeitpunkt OD ₅₅₀	Induktions-temp. (°C)
BL21(DE3)/pDleunox	IPTG 100-500	3	0,5	30-37

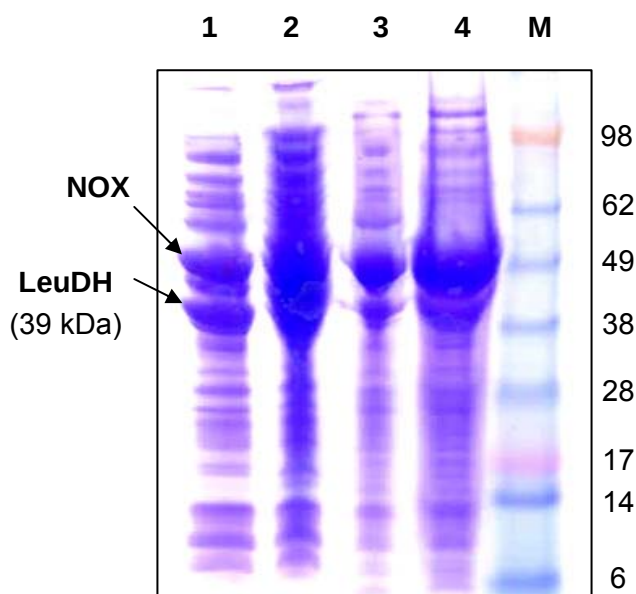


Abb. 53: Coomassiegefärbte SDS-PAGE der LeuDH- und NOX-haltigen Proben nach den jeweiligen Coexpressionsbedingungen (Induktion mit 100µM IPTG, Induktionsdauer 3h, Induktionszeitpunkt OD₅₅₀ 0,5, Induktionstemperatur 37°C) aus BL21(DE3)/pDleunox (Tab. 2), (Spur 1: Überstand 10 µL Probenauftrag, Spur 2: Überstand 25µL Probenauftrag, Spur 3: Pellet 10 µL Probenauftrag, Spur 4: Pellet 25µL Probenauftrag, Spur M: Marker SeeBluePlus2).

1.14.3.3 Umsatz von DL-Leucin mit Rohextrakt (LeuDH/NOX)

Bevor die Verwendbarkeit dieses neuen Ganzzell-Biokatalysators für die Racemattrennung von Aminosäuren getestet wurde, wurde als Referenz ein Versuch durchgeführt mit den freien bzw. freigesetzten Enzymen dieses rekombinanten Stamms. Dazu werden die Zellen aufgeschlossen, von nicht-aufgeschlossenen Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und ohne weitere Zusätze als Katalysatorgemisch eingesetzt. Da die aktiven rekombinanten Enzyme in der ganzen Zelle auch gelöst im Cytoplasma vorliegen, erhält man mit diesen Ersatzdaten einen Anhaltspunkt für die maximale Syntheserate. Im Vergleich zu ganzen Zellen kommt bei der Verwendung ganzer Zellen dann noch der Transport durch die Zellmembran hinzu, der eher die Umsatzrate reduzieren kann.

Für diesen Referenzversuch wurde die Racemattrennung von DL-Leucin im 1 ml-Maßstab mit dem coexprimierten Enzymen LeuDH NOX untersucht, der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Leucin:

Enzymquelle	390 µL Rohextrakt aus 20 %iger Zellsuspension: 95 U NOX und LeuDH (keine Aktivität im Photometertest messbar)
Substrat	10 mM DL-Leucin
Ansatzvolumen	1 ml
Volumen	Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml
Cofaktor	0,2 mM NAD ⁺
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
Art der Durchmischung	Thermomixer 700 rpm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde nach 30 Minuten ein ee-Wert von 91,9 % für DL-Leucin erreicht (Abb. 54). Das DL-Leucin wurde nach 30 Minuten bis zu einer restlichen Menge von 0,2 mM umgesetzt. Mit dem Reaktionsverlauf stellte sich ein Gleichgewicht nach ca. 23 h mit einem ee-Wert von 48,5 % und einer Konzentration an L-Leucin mit 1,7 mM ein.

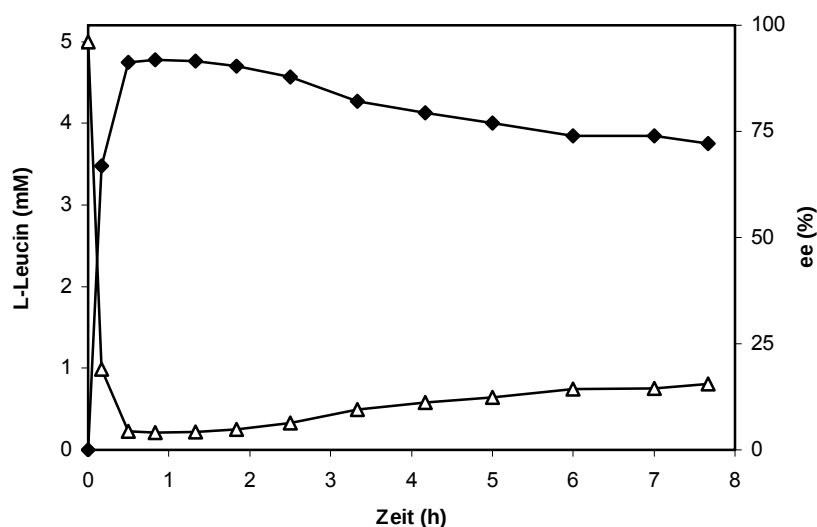


Abb. 54: Oxidative Deaminierung von L-Leucin (Δ) und ee-Wert für D-Leucin (◆) während der Racemattrennung von DL-Leucin durch die LeuDH und die NOX in Abhängigkeit von der Zeit.

1.14.4 Ganzzellbiotransformation

BL21(DE3)/pDleunox-Zellen wurden zur Racemattrennung von DL-Leucin eingesetzt. Vorteile einer solchen Ganzzellbiotransformation sind im Allgemeinen der geringe Arbeitsaufwand, da kein Enzym präpariert werden muss, und die Möglichkeit, den Katalysator nach der Umsetzung einfach abzutrennen und erneut zu verwenden. Limitierend könnte sein, dass die volumetrische Aktivität begrenzt ist und die Reaktionsgeschwindigkeit möglicherweise aufgrund von Transportprozessen reduziert sein kann.

Reaktionsbedingungen zur Racemattrennung von DL-Leucin:

Enzymquelle	3,6 % BL21(DE3)/pDleunox-Zellen
Substrat	10 mM DL-Leucin
Ansatzvolumen	1 ml
Reaktionsgefäß	Eppendorf Reaktionsgefäß mit Deckel
Volumen d. Reaktionsgefäßes	1,5 ml
Cofaktor	ohne NAD ⁺ 0,2 mM NAD ⁺
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
Art der Durchmischung	Thermomixer 900 rpm
Temperatur	30°C

Mit 3,6 % Zellen und 0,2 mM NAD⁺ in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 wurde nach 3 h ein ee-Wert von 96,6 % für D-Leucin erzielt, ohne NAD⁺ wurde nach 4 h ein ee-Wert von 75,7 %

erreicht (Abb. 55). Die Abb. 55 zeigt, dass der Zusatz von NAD^+ den Umsatz und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht.

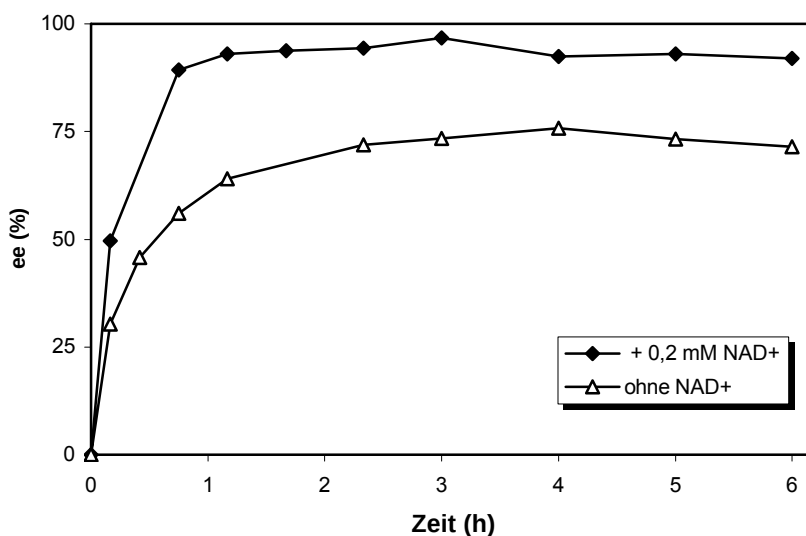


Abb. 55: Einfluss von 0,2 mM NAD^+ auf die Ganzzell-Umsetzung von L-Leucin und ee-Wert für D-Leucin mit 3,6 % BL21(DE3)/pDleunox-Zellen in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 während der Racemattrennung von DL-Leucin in Abhängigkeit von der Zeit.

Eine generelle Erhöhung der Zellkonzentration zeigte eine drastische Beschleunigung der Umsetzung von L-Leucin, aber es wurden nur ee-Werte von max. 88 % erreicht. Auch eine pH-Veränderung und Erhöhung der NAD^+ -Konzentration auf 10 mM führten nicht zur Verbesserung des ee-Wertes für D-Leucin (Daten nicht gezeigt).

2 D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO)

D-Aminosäureoxidase wurde 1935 erstmals in Säugetiergewebe detektiert [79]. In der Folge wurden D-AAOs aus Reptilien, Vögeln, Fischen und verschiedenen Säugetiergeweben nachgewiesen [80, 81, 82, 83]. Mikrobielle D-AAOs sind bisher nur aus Eukaryoten charakterisiert worden. Zu den D-AAO-Produzenten gehören die Hefen *Rhodotorula gracilis* [84], *Trigonopsis variabilis* [85] und mehrere *Candida*-Arten [86] und die Schimmelpilze *Neurospora crassa* [87], *Verticillium luteoalbo* und verschiedene *Fusarium*-Arten [86, 88].

Die D-AAO aus *Trigonopsis variabilis* wurde in dieser Arbeit eher als Modellenzym ausgesucht, da dieses literaturbekannte Enzym kurzfristig verfügbar war und einen sofortigen Start in die Etablierung eines Expressionssystems für neue D-Aminosäureoxidasen ermöglicht. Das eigentlich neue, präparativ interessante Enzym, die D-Aminosäureoxidase aus *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO), wird dann im Folgenden beschrieben, wobei die aus der Expression der TvDAAO gewonnen Ergebnisse auf die ApDAAO übertragen werden sollen.

2.1 Heterologe Expression der TvDAAO

Um die Auswahl geeigneter Schnittstellen für die Klonierung des Gens in verschiedene Expressionsvektoren zu ermöglichen, wurde zuerst eine Restriktionskarte des *tvdaao*-Gens (GI: 1616634) erstellt.

2.1.1 Klonierung des *tvdaao*-Gens in *E. coli*-Expressionsvektoren

Über PCR wurden Restriktionsschnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *tvdaao*-Gens eingefügt. Die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors wurde jeweils so ausgesucht, dass die Entfernung zwischen dem Startcodon des Gens und der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors 6 bis 8 Basen betrug. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sind in Abb. 56 dargestellt.

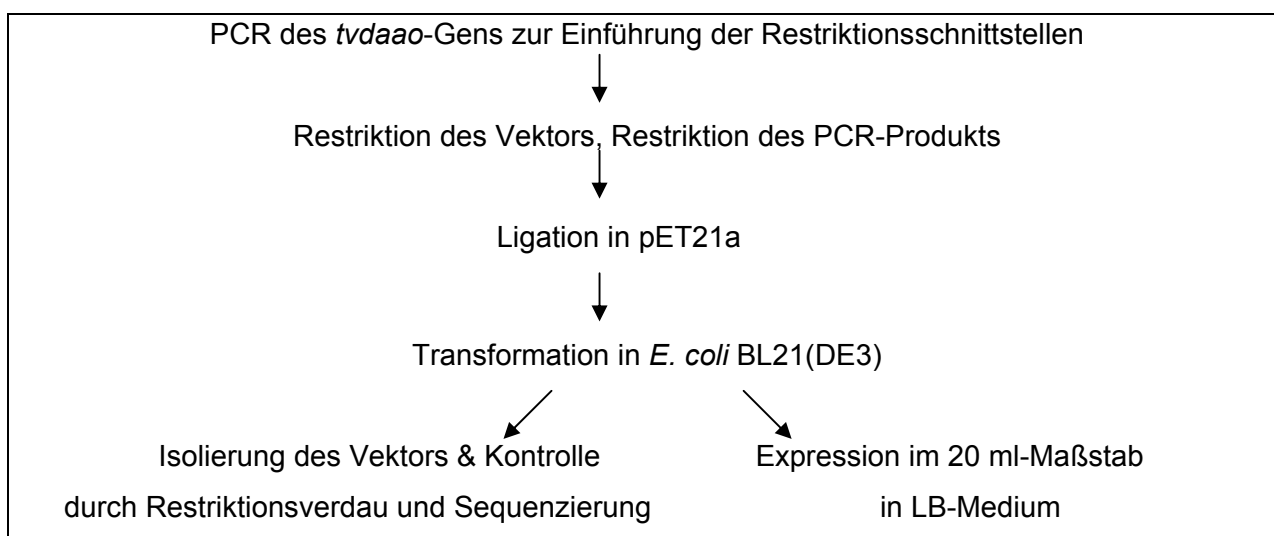


Abb. 56: Fließschema zur Klonierung der *tvdaao* in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren.

Zur Expression der TvDAAO wurde das Gen jeweils in den *E. coli*-Expressionsvektor pET21a kloniert (Tab. 21).

Da absehbar ist, dass das Reaktionsprodukt der Aminosäureoxidase, das H_2O_2 , sowohl für das eigene Enzym, als auch für andere intrazelluläre Enzyme, Coenzyme und für Substrate und Produkte schädigend sein kann, sollte für Ganzzell-Systeme das Enzym Katalase zusätzlich plasmidgebunden in *E. coli* kloniert werden. Zur Coexpression der TvDAAO und der Katalase wurde das Katalase-Gen *hplI* aus *E. coli* K12 (GI: 146532) in den *E. coli* Vektor pETvdaao (pET21a/TvDAAO) kloniert (Tab. 21).

Tab. 21: Zusammenfassung der neu erstellten *E. coli*-Vektoren.

Name	Vektor	Insert	Restriktion		Primer	
			5′	3′	5′	3′
pEtvdaao	pET21a	<i>tvdaao</i>	NdeI	BamHI	NdeI _{tvf}	BamHI _{tvr}
pEtvdaaohpII	pEtvdaao	<i>hpII</i>	SacI	NotI	SacI _{hpf}	NotI _{hpr}

Das *hpII*-Gen wurde dabei 8 bp hinter das *tvdaao*-Gen des pEtvdaao-Vektors kloniert, beide Gene unterliegen der Kontrolle durch den T7-Promotor. Zwischen beiden Genen befindet sich eine Terminator-Sequenz. In Abb. 57 ist der neu erstellte *E. coli*-Vektor (pEtvdaaohpII) zur Coexpression der TvDAAO und HP II dargestellt.

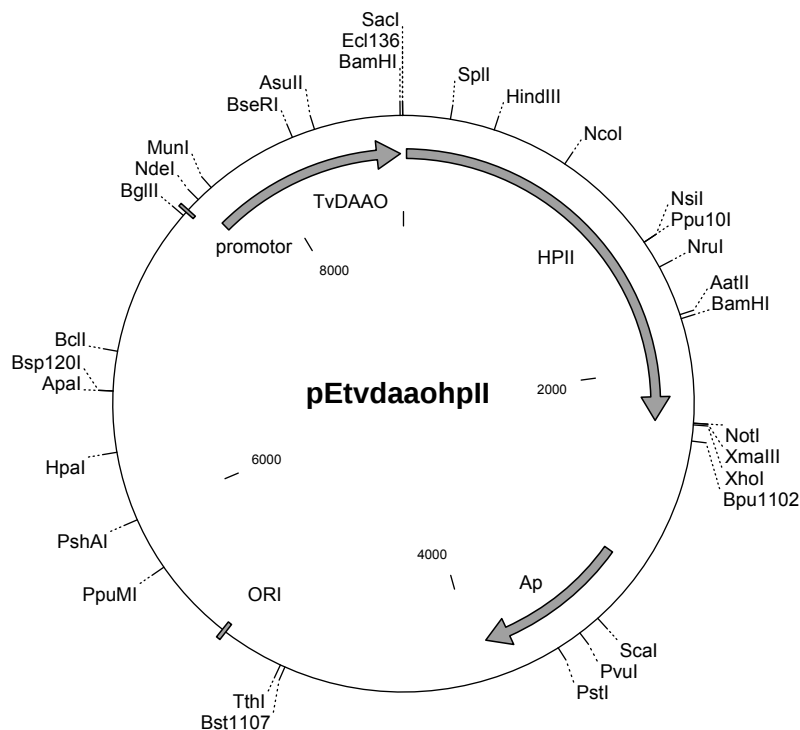


Abb. 57: Plasmidkarte der in den Expressionsvektor pET21a klonierten TvDAAO und HP II (Ap = Ampicillin-Resistenz, Promotor = T7-Promotor, TvDAAO und HP II kloniertes Gen; NcoI, BamHI, SacI und NotI = Restriktionsschnittstellen).

2.1.2 Untersuchung der Expressionsbedingungen in *E. coli*

Umfassende Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen für die TvDAAO in *E. coli*-Stämmen wurden durchgeführt. Der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, die Induktionstemperatur und -dauer wurden dabei variiert. Unterschiedliche *E. coli*-Stämme und Expressionsvektoren wurden eingesetzt. In allen der zellfreien Rohextrakte wurde TvDAAO-Aktivität gemessen. Der Coexpressionsstamm BL21(DE3)/pEtvdaaohpII zeigte sowohl TvDAAO-Aktivität als auch Katalase-Aktivität.

Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tab. 22 zu sehen.

Tab. 22: Variation der Induktions- und Kultivierungsbedingungen für verschiedene Vektor-Wirt-Systeme.

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor Konz.	Induktionsdauer (h)	Induktionszeitpunkt OD ₅₅₀	Induktions-temp. (°C)
pEtvdaao	BL21(DE3)	0 -1 mM IPTG	2,5 - 21	0,3 - 0,7	26 - 37
pEtvdaaohpII	BL21(DE3)	0 -1 mM IPTG	2,5 - 8	0,3 - 0,7	26 - 37

Die Tab. 23 zeigt, dass spezifische TvDAAO-Aktivitäten von bis zu 11 U/mg in den zellfreien Rohextrakten mit optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden. Der entsprechende Coexpressionsstamm BL21(DE3)/pEtvdaaohpII zeigte außerdem eine Katalase-Aktivität von bis zu 50 U/mg, ohne dass die TvDAAO wesentlich in ihrer Aktivität beeinträchtigt wurde.

Tab. 23: Heterologe Expression der TvDAAO mit und ohne Katalase. Die Induktion wurde bei 30°C und einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten wurden in den zellfreien Rohextrakten gemessen.

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor-konzentration	Induktionsdauer (h)	TvDAAO-Aktivität (U/mg)	Katalase-Aktivität (U/mg)
pEtvdaao	BL21(DE3)	50 µM IPTG	6	11	-
pEtvdaaohpII	BL21(DE3)	100 µM IPTG	4	10	50

In allen Ansätzen wurde die TvDAAO als deutliche Bande im SDS-Gel in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion sichtbar (Abb. 58). Die coexprimierte Katalase (84 kDa) wurde in der unlöslichen Fraktion als deutliche Bande im SDS-Gel beobachtet.

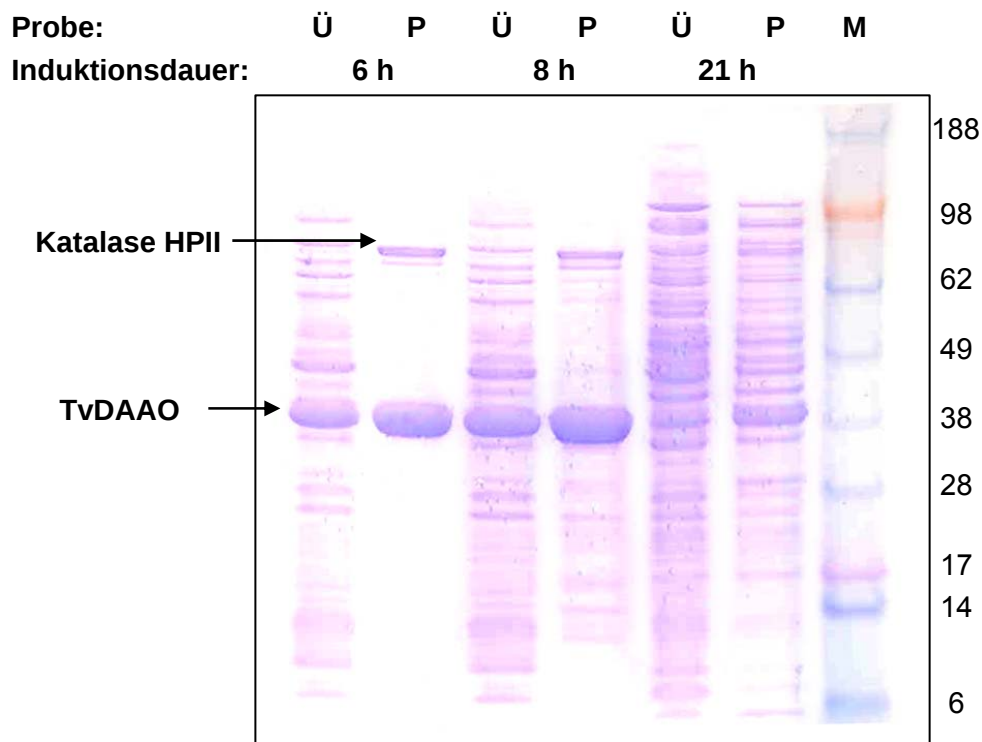


Abb. 58: SDS-PAGE der TvDAAO aus BL21(DE3)/pEtvdaao. Die Induktion wurde bei einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,5$ bei 30°C für 6 – 21 Stunden durchgeführt. Ü = Überstand (lösliche Fraktion), P = Pellet (unlösliche Fraktion), M = Marker.

2.1.3 Untersuchung der FAD-Abhängigkeit der TvDAAO

Für die TvDAAO wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Expression sowohl des Holo- als auch des Apoenzyms mit *E. coli* BL21(DE3)/pET21a/tvdaao untersucht. Während der Anzucht der Zellen wurde die IPTG-Konzentration zwischen 1 - 500 μ M und die Induktionstemperatur zwischen 30 - 37°C variiert, der Induktionszeitpunkt wurde bei OD_{550} 0,5 beibehalten. Anschließend wurde die Aktivität der TvDAAO im Rohextrakt in Gegenwart von 0 - 15 μ M FAD bestimmt. Die Aktivitätsmessungen sind in Abb. 59 zusammengefasst und zeigen folgende Ergebnisse:

Die Versuche zeigen, dass die intrazelluläre Konzentration an FAD in aller Regel nicht ausreicht, das Enzym vollständig mit dem Coenzym zu versorgen. Wird der Stamm während der Induktionsphase bei 30°C und 500 μ M IPTG kultiviert, misst man eine Enzymaktivität von ca. 4 U/mg. Offensichtlich ist aber die Proteinexpression weitaus höher, allerdings wird dann inaktives Protein (Apo-Protein) gebildet. Dieses Protein lässt sich durch nachträglichen FAD-Zusatz *in vitro* dann auf das ca. 3-fache aktivieren, man erreicht so ca. 12 U/mg (Abb. 59 A). Bei einer Anzucht bei 37°C und 10 μ M IPTG wird nicht mehr FAD in das Enzymprotein eingebaut, die spezifische Aktivität bleibt unverändert bei 4 U/mg (Abb. 59 B). Allerdings liegt auch hier noch ein Teil des Enzyms als Apo-Protein vor, ein *in vitro*-Zusatz von FAD ergibt eine 2-fache Steigerung der spezifischen Aktivität von 4 U/mg auf ca. 8 U/mg.

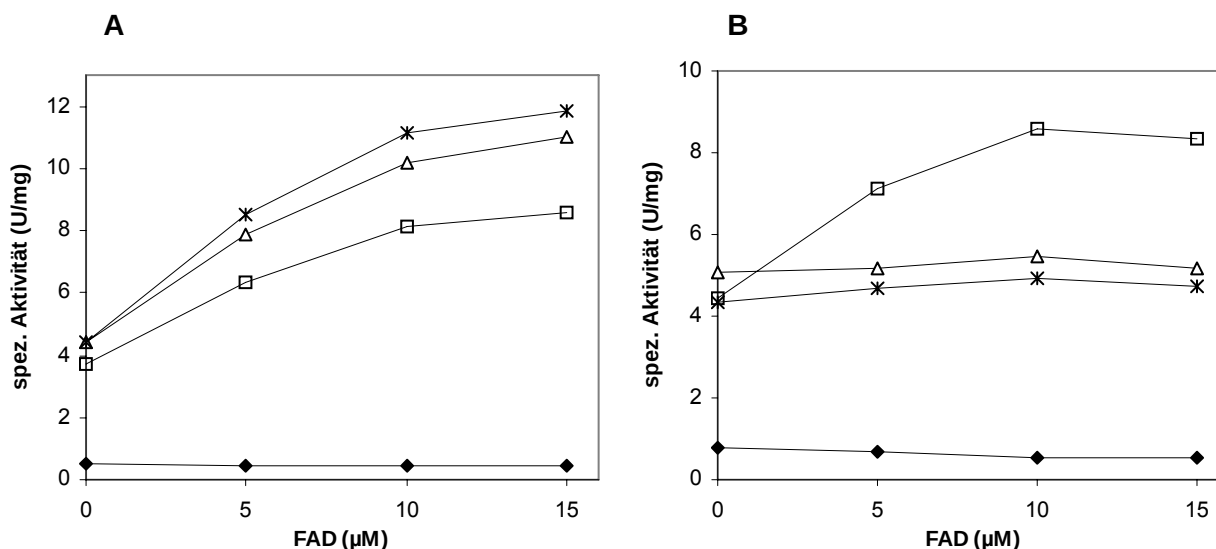


Abb. 59: FAD-Abhängigkeit der TvDAAO aus BL21(DE3)/pEtvd_{aa} mit Variation der Induktorkonzentration bei **(A)** 30°C und **(B)** 37°C Induktionstemperatur. Zur Induktion des Enzyms wurden den Zellen bei einer OD= 0,5 verschiedene Konzentrationen an IPTG zugesetzt: (◆) 1 µM IPTG, (□) 10 µM IPTG, (△) 300 µM IPTG, (*) 500 µM IPTG.

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von FAD und Riboflavin bei 30°C und 37°C im Medium auf die Bildung von TvDAAO-Holo- und Apoenzym untersucht.

Die Aktivitätsmessungen zeigten, dass ein Zusatz von FAD oder Riboflavin zum Medium keinen Einfluss auf die Bildung von TvDAAO-Holo- oder Apoenzym hat.

2.2 Präparation von ungewöhnlichen L-Aminosäuren durch die TvDAAO

2.2.1 Lösliche TvDAAO

Für die Umsetzung von DL-Methionin und DL-Phenylalanin wurde partiell gereinigte TvDAAO verwendet.

DL-Leucin und DL-Phenylalanin wurden im 1 ml-Maßstab durch die TvDAAO umgesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Methionin und DL-Phenylalanin:

Enzymquelle	1 U TvDAAO
Substrat	10 mM DL-Methionin oder DL-Phenylalanin
Ansatzvolumen	1 ml
Volumen	Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml
Puffer	50 mM TEA/HCl pH 7,6
Art der Durchmischung	Thermomixer 700 rpm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde nach ca. 4 h ein ee-Wert von 99,8 % für DL-Methionin und 99,6 % für DL-Phenylalanin erreicht (Abb. 60).

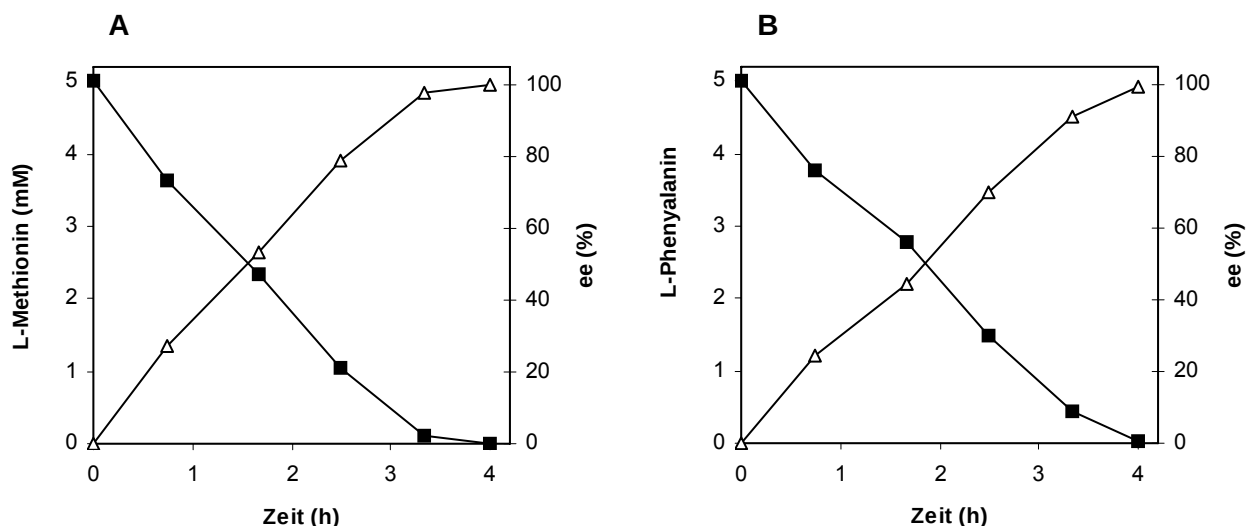


Abb. 60: Oxidative Desaminierung von **(A)** D-Methionin und **(B)** D-Phenylalanin, während der Racemattrennung von DL-Methionin und DL-Phenylalanin durch die TvDAAO in Abhängigkeit von der Zeit, (△) ee-Wert für L-Methionin bzw. L-Phenylalanin (■) Umsatz von D-Methionin bzw. D-Phenylalanin. Die Aminosäure-Konzentrationen wurden mittels HPLC gemessen.

2.2.2 Ganzzellbiotransformation

In Abb. 61 sind die Ergebnisse der Racematspaltung mit ganzen Zellen dargestellt. Dabei wurden die Konstrukte BL21(DE3)/pEtvdaao (TvDAAO ohne Katalase) und BL21(DE3)/pEtvdaao/hpII (TvDAAO mit Katalase) verwendet. In allen Ansätzen konnte ein ee-Wert von $\geq 99,6\%$ mit und ohne Katalase bzw. Toluol zur Permeabilisierung der Zellmembran erzielt werden. Weder Katalase noch der Zusatz von Toluol zeigten einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der oxidativen Reaktion.

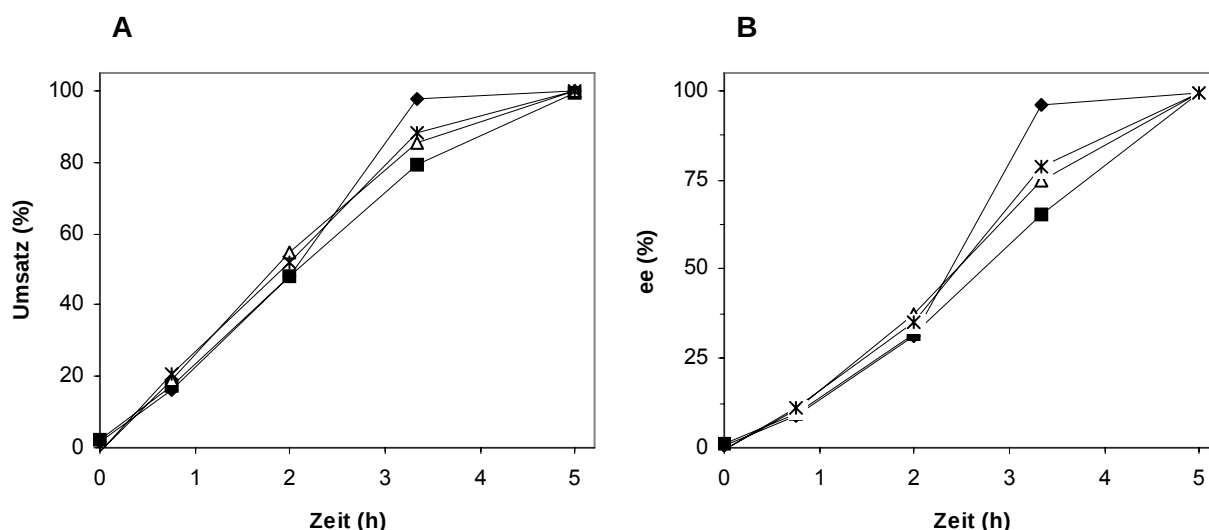


Abb. 61: **(A)** Ganzzell-Umsetzungen von D-Methionin und **(B)** ee-Wert für L-Methionin während der Racemattrennung von DL-Methionin durch die TvDAAO bzw. TvDAAO/HPII mit/ohne Toluol-Behandlung in Abhängigkeit von der Zeit, (mit der TvDAAO mit und ohne Katalase, (◆) TvDAAO – Toluol, (■) TvDAAO + Toluol, (△) TvDAAO/HPII – Toluol, (*) TvDAAO/HPII + Toluol.

3 D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO)

Wie in der Einleitung zusammengefaßt ist, sind bislang nur D-Aminosäureoxidasen aus Eukaryoten beschrieben worden. Wir haben kürzlich ein bakterielles (aus *A. protophormiae*) gefunden, die im Folgenden heterolog in *E. coli* exprimiert und umfassend charakterisiert werden soll. Außerdem soll ein Strukturmodell dieser neuen bakteriellen D-AAO erstellt werden und sowohl biochemisch, strukturell als auch mechanistisch mit der TvDAAO und anderen D-AAOs verglichen werden. Abschließend soll der biotechnologische Einsatz der ApDAAO zur Herstellung von L-Aminosäuren und α -Ketosäuren untersucht werden.

3.1 Heterologe Expression der ApDAAO

Die Restriktionskarte des *apdaao*-Gens (GI: 32140774) wurde zuerst erstellt, um die Auswahl geeigneter Schnittstellen für die Klonierung des Gens in verschiedene Expressionsvektoren zu ermöglichen.

3.1.1 Klonierung des *apdaao*-Gens

Über PCR wurden Restriktionsschnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *tvdaao*-Gens eingefügt. Die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors wurde jeweils so ausgesucht, dass die Entfernung zwischen dem Startcodon des Gens und der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors 6 bis 8 Basen betrug. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sind in Abb. 62 gezeigt.

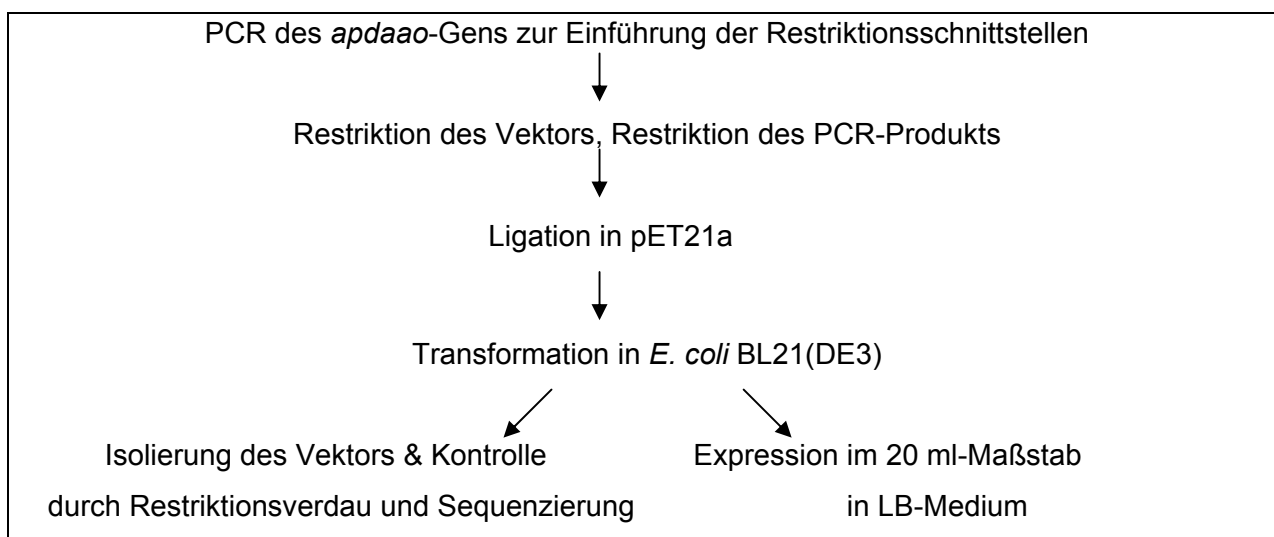


Abb. 62: Fließschema zur Klonierung der *apdaao* in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren.

Zur Expression der ApDAAO wurde das Gen in den *E. coli*-Expressionsvektor pET21a kloniert (Tab. 24).

Tab. 24: Zusammenfassung des neuerstellten *E. coli*-Expressionsvektors.

Name	Vektor	Insert	Restriktion		Primer	
			5′	3′	5′	3′
pEapdaao	pET21a	<i>apdaao</i>	NdeI	BamHI	Ndelapf	BamHlapr

3.1.2 Untersuchung der Expressionsbedingungen in *E. coli*

Für die ApDAAO in *E. coli* BL21(DE3)-Stamm wurden umfassende Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen durchgeführt. Der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, die Induktionstemperatur und -dauer wurden dabei variiert. Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tab. 25 zu sehen.

Tab. 25: Variation der Induktions- und Kultivierungsbedingungen für das Vektor-Wirt-System BL21(DE3)/pEapdaao.

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor Konz.	Induktionsdauer (h)	Induktionszeitpunkt OD ₅₅₀	Induktionstemp. (°C)
pEapdaao	BL21(DE3)	0 - 500 µM	4 - 8	0,3 - 0,7	30 - 37

Die Tab. 26 zeigt, dass spezifische ApDAAO-Aktivitäten im Bereich von bis zu 30 U/mg in den zellfreien Rohextrakten mit optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden.

Tab. 26: Heterologe Expression der ApDAAO. Die Induktion wurde bei 30°C und einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 durchgeführt. Die spez. Aktivitäten wurden in den zellfreien Rohextrakten gemessen.

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor	Induktorkonzentration	Induktionsdauer (h)	ApDAAO-Aktivität (U/mg)
pEapdaao	BL21(DE3)	IPTG	100 µM	4	30

Die ApDAAO wurde in allen Ansätzen als deutliche Bande im SDS-Gel sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion sichtbar (Abb. 63).

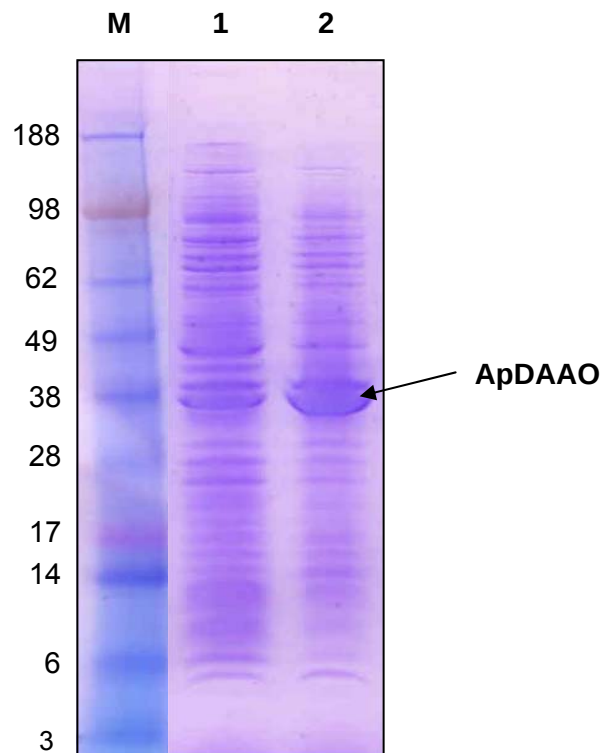


Abb. 63: SDS-PAGE der ApDAAO aus BL21(DE3)/pEapdaao. Expression der ApDAAO mit optimierten Induktionsbedingungen wie in Tabelle 4. Spur M: Marker, Spur 1: löslicher Überstand aus Rohextrakt, Spur 2: unlöslicher Überstand aus Rohextrakt, durch Harnstoffzugabe solubilisiertes Pellet.

3.1.3 Untersuchung der FAD-Abhängigkeit der ApDAAO

Für die ApDAAO wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Expression des Holo- und Apoenzyms mit *E. coli* BL21(DE3)/pET21a/apdaao untersucht. Dabei wurde die IPTG-Konzentration zwischen 0 - 600 μM und die Induktionstemperatur zwischen 30-37°C variiert, der Induktionszeitpunkt wurde bei OD_{550} 0,5 beibehalten. Anschließend wurde die Aktivität der ApDAAO im Rohextrakt in Gegenwart von 0 - 15 μM FAD bestimmt. Die Aktivitätsmessungen sind in Abb. 64 zusammengefasst und zeigen folgende Ergebnisse:

Die Versuche zeigen, dass das gebildete ApDAAO-Protein nur als Holoenzym vorliegt, da sich die ApDAAO-Aktivität durch nachträglichen FAD-Zusatz *in vitro* in allen Ansätzen nicht erhöhen lässt. Anders als bei der Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* ist hier eine ausreichende intrazelluläre Konzentration an FAD vorhanden, um das Enzym vollständig mit dem Coenzym zu versorgen.

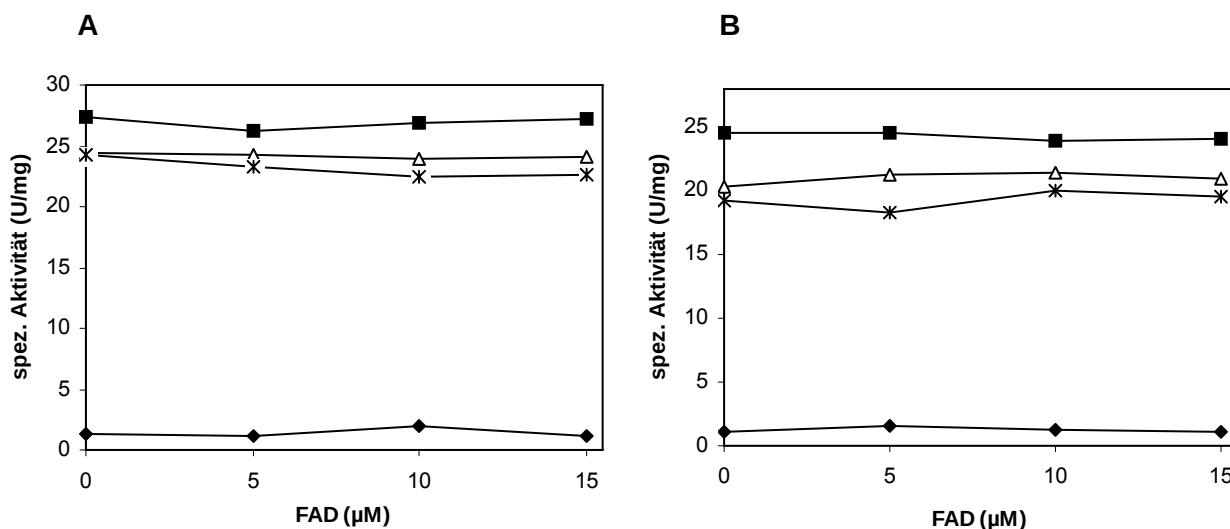


Abb. 64: FAD-Abhängigkeit der ApDAAO aus BL21(DE3)/pEapdaao mit Variation der Induktorkonzentration bei **(A)** 30°C und **(B)** 37°C Induktionstemperatur, (◆) 0 μM IPTG, (■) 100 μM IPTG, (△) 300 μM IPTG, (*) 500 μM IPTG.

Außerdem wurde der Einfluss von FAD und Riboflavin im Medium auf die Bildung von ApDAAO-Holo- und Apoenzym untersucht. Die Aktivitätsmessungen zeigten, dass der Zusatz von FAD oder Riboflavin zum Medium keinen Einfluss auf die Bildung von ApDAAO-Holo- oder Apoenzym haben.

3.1.4 Hochzelldichte-Fermentation

Der rekombinante *E. coli* BL21(DE3)-Stamm mit dem Plasmid pEapdaao wurde zur Produktion der ApDAAO in HZD-Medium im 15 L-Maßstab fermentiert. Der Fermentationsverlauf ist im Anhang (VII2, Abb. 88) dargestellt.

Die Zellen wurden nach 28 h Fermentationsdauer mit 5 mM IPTG induziert. Durch Anpassung der Rührergeschwindigkeit, des Drucks und der Begasungsrate wurde der pO_2 auf 30 % während der Fermentation eingestellt. Der pH wurde durch Zugabe von NH_4OH auf 7,0 eingestellt und die Temperatur wurde konstant bei 30°C gehalten. Nach 39 Stunden Fermentationsdauer wurden 1,9 kg Zellen (Feuchtgewicht) mit einem Separator KA06 geerntet. Die Aktivitätsmessungen ergaben, dass man pro Gramm Zellen (Feuchtgewicht) eine Aktivität von 1200 U erhalten kann. Die spezifische Aktivität lag bei 15 U/mg. Durch eine 15 L-Fermentation wurden insgesamt 2,29 Millionen Units ApDAAO erzielt.

3.2 Aufreinigung der ApDAAO

Die rekombinante ApDAAO wurde in zwei Chromatographieschritten aufgereinigt. Die *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pET21a/apdaao wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss daran folgte eine Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF. Die ApDAAO eluierte durch Erhöhung der NaCl-Konzentration bei 0,35 M. Nach der zweiten Chromatographie an Hydroxylapatit lag die ApDAAO homogen vor (Abb. 65).

Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tab. 27 wiedergegeben. Die ApDAAO wurde um den Faktor 6 angereichert, die Ausbeute lag nach dem zweiten Reinigungsschritt bei 56 %. Die spezifische Aktivität der ApDAAO für D-Methionin lag bei $180 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

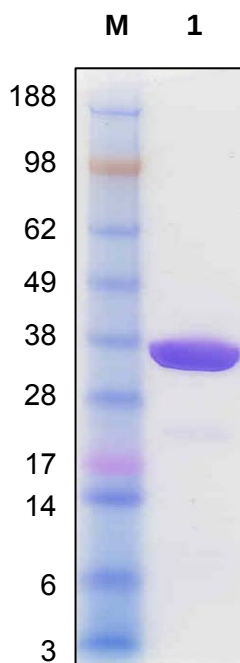


Abb. 65: SDS-PAGE der homogenen ApDAAO (Spur 1); Spur M: Marker.

Tab. 27: Reinigungsschema der ApDAAO nach heterologer Expression in *E. coli*.

	Gesamt- aktivität	Gesamt- protein	Volumen	spez. Aktivität	Reinigungs- faktor	Ausbeute
	(U)	(mg)	(ml)	(U/mg)	(-fach)	(%)
Rohextrakt	2556	85	10	30	1,0	100
Q-Sepharose	1909	24	9,7	80	2,7	75
Hydroxylapatit	1434	8	12	180	6,0	56

3.3 Biochemische Charakterisierung der ApDAAO

3.3.1 Lagerstabilität

Die freie ApDAAO zeigte bei einer Lagerung über 15 Tage bei 4°C in 50 mM TEA/HCl-Puffer pH 6,5 hohe Aktivitätsverluste (Abb. 66 A). Durch Immobilisierung der ApDAAO auf Eupergit C und Eupergit C 250L wurde die Lagerstabilität der ApDAAO allerdings drastisch verbessert. Bei 4°C zeigte die immobilisierte ApDAAO über 15 Tage praktisch keinen Aktivitätsverlust mehr.

Neben der Lagerung bei 4°C wurde auch die Stabilität der freien ApDAAO bei 30°C untersucht, um festzustellen, wie stabil die ApDAAO bei einer Prozesstemperatur von 30°C ist (Abb. 66 B). Wie zu erwarten war, verlor die freie ApDAAO ihre Aktivität nach 24 Stunden bei 30°C vollständig. Auch die auf Eupergit C und Eupergit C 250L immobilisierte ApDAAO zeigt nicht mehr die hohe Stabilität wie bei 4°C, sie verliert ca. 40 % der ursprünglichen Aktivität. Mit Hilfe der Immobilisierung wurde die Lagerstabilität der ApDAAO bei 4°C und 30°C drastisch verbessert.

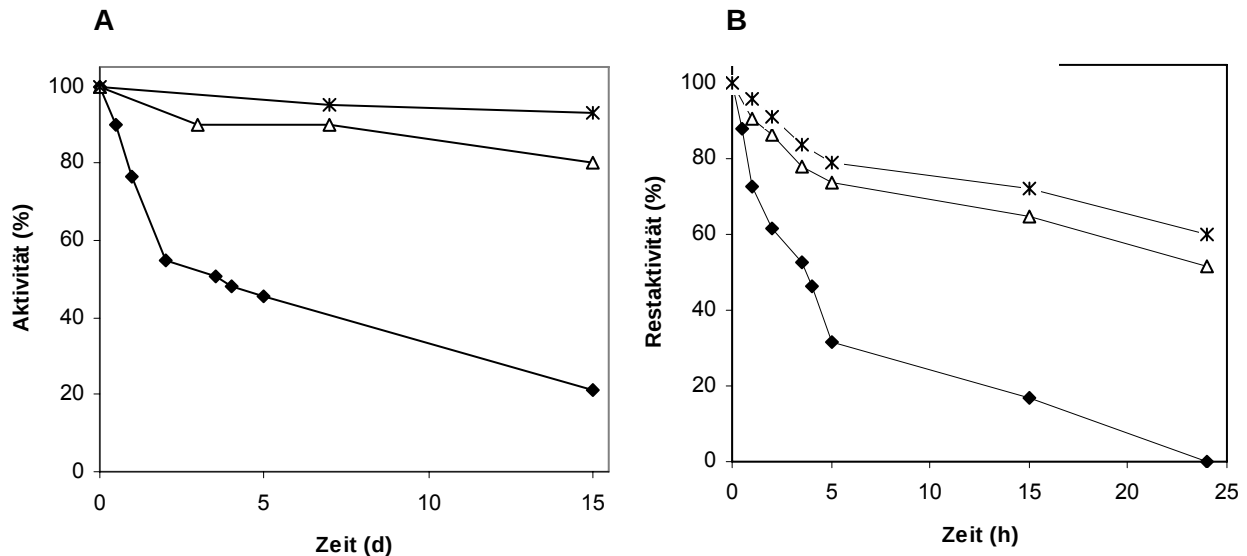


Abb. 66: Lagerstabilität der ApDAAO aus BL21(DE3)/pEapdaao über **(A)** 15 Tage bei 4°C und **(B)** über 24 Stunden bei 30°C. Die Rest-Aktivität der ApDAAO ist gegen die Zeit aufgetragen, (◆) freie ApDAAO, immobilisierte ApDAAO auf (△) Eupergit C in 0,25 M Kpi-Puffer pH 8,0 und auf (*) Eupergit C 250L in 0,1 M Kpi, 0,5 M Na₂SO₄ pH 8,0).

3.3.2 pH-Optimum

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der ApDAAO gegenüber den Substraten D-Methionin und D-Phenylalanin wurde in drei verschiedenen Puffern untersucht (Citronensäure-Natriumphosphat pH 4 - 7, TEA/HCl pH 7,0 - 8,5, Glycin/NaOH pH 8,5 - 11). Das pH-Optimum lag für beide Substrate im schwach basischen Bereich zwischen pH 7,5 - 8,5 (Abb. 67). Die eingesetzten Puffer beeinflussten die Enzymaktivität nicht wesentlich.

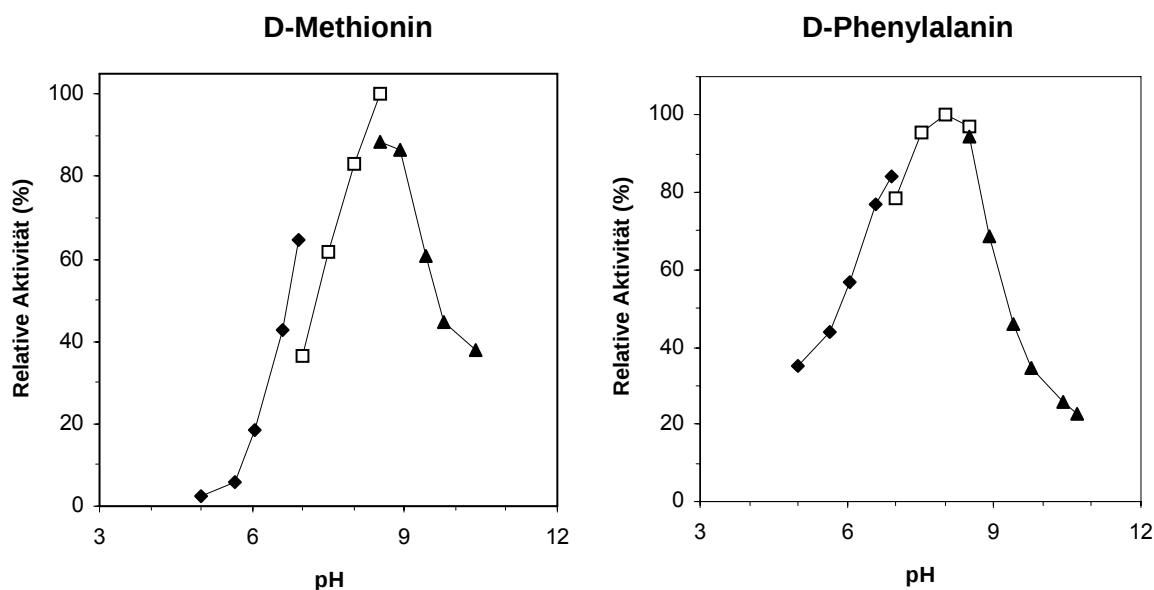


Abb. 67: Effekt des pH-Wertes auf die ApDAAO-Aktivität. Die Enzymaktivität wurde mit drei verschiedenen Substraten in den folgenden 80 mM Puffern gemessen: (◆) Citronensäure-Natriumphosphat, pH 5-7; (□) TEA/HCl, pH 7-8.5; (▲) Glycin/NaOH, pH 8.5-11. Jede getestete D-Aminosäure wurde in einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt.

3.3.3 Kinetische Daten der ApDAAO und Inhibitionsstudien

Da die ApDAAO in der Racematspaltung eingesetzt werden soll, wurde der Einfluss von L-Enantiomeren, deren Konzentration während der Racematspaltung stetig ansteigt, auf die ApDAAO-Aktivität untersucht. In Abb. 68 A und B sind die kinetischen Messungen für die ApDAAO mit den Substraten D-Methionin und D-Phenylalanin in Anwesenheit mit der korrespondierenden L-Komponente dargestellt. Die kinetischen Messungen zeigen inhibitorischen Einfluss sowohl von L-Methionin als auch von L-Phenylalanin. L-Phenylalanin inhibiert dabei stärker die ApDAAO als L-Methionin. Für beide Fälle wurde der inhibitorische Einfluss auf den K_M und V_{max} beobachtet, was für einen gemischten Mechanismus der Inhibierung spricht. Der K_M -Wert für D-Methionin ($K_M \sim 1$ mM) ist 5-fach besser als für D-Phenylalanin ($K_M \sim 5$ mM). Die Ergebnisse der kinetischen Messungen sind in Tab. 28 aufgelistet.

Neben dem Einfluss von L-Enantiomeren auf die ApDAAO-Aktivität wurde auch der Einfluss von 2 mM Zimtsäure (Phenylalanin-Analogon) und 2 mM Anthranilsäure (Inhibitor für DAAOs) mit dem Standardsubstrat D-Methionin analysiert (Abb. 69). Die kinetischen Messungen zeigen, dass sowohl Zimtsäure als auch Anthranilsäure die ApDAAO stark inhibieren. In Anwesenheit von 2 mM Zimtsäure ist nur noch eine Restaktivität von 61 % für die Oxidation von 10 mM D-Methionin zu beobachten und 22 % Restaktivität in Anwesenheit von 2 mM Anthranilsäure. Die Ergebnisse der kinetischen Messungen sind in Tab. 28 zusammengefasst.

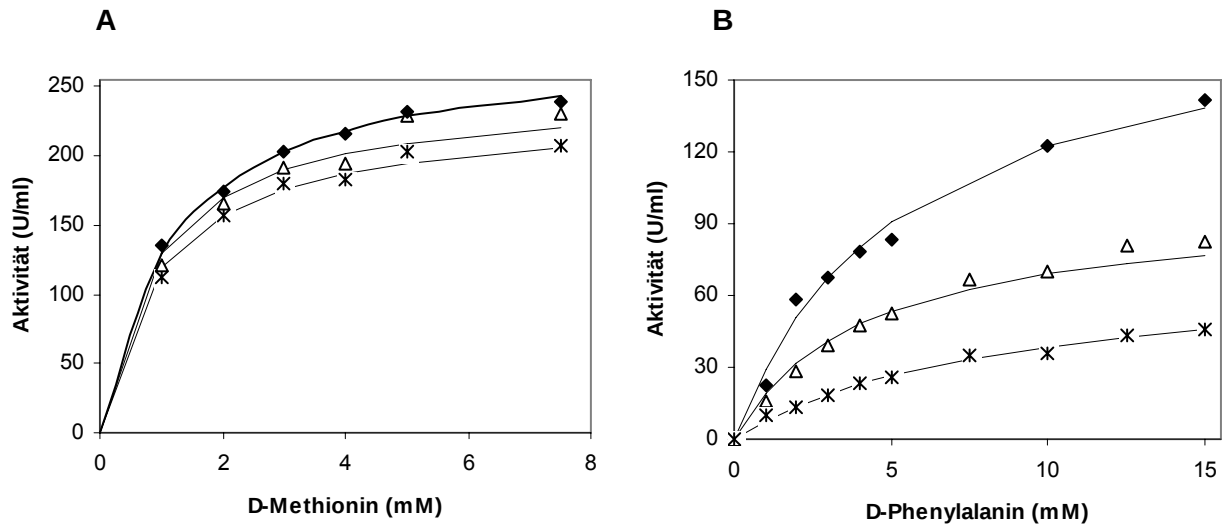


Abb. 68: Einfluss von **(A)** L-Methionin und **(B)** L-Phenylalanin auf die oxidative Desaminierung von D-Methionin **(A)** oder D-Phenylalanin **(B)** durch die ApDAAO. ApDAAO-Aktivität ohne Effektor (◆) und in Anwesenheit von 15 mM L-Methionin bzw. L-Phenylalanin (△) oder 30 mM L-Methionin bzw. L-Phenylalanin (*).

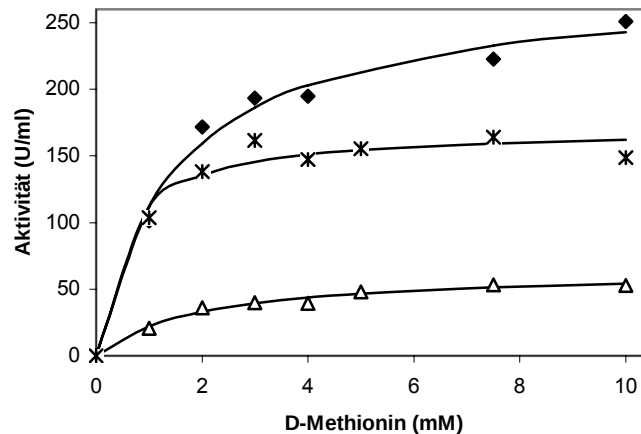


Abb. 69: Einfluss von Zimtsäure und Anthranilsäure auf die ApDAAO-Aktivität. Enzymaktivität ohne Inhibitor (◆) und in Anwesenheit von 2 mM Zimtsäure (*) oder 2 mM Anthranilsäure (△).

Ein weiteres interessantes Substrat in der Racematspaltung mit der ApDAAO ist das D-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-D-alanin). Aufgrund der großen Bedeutung dieses Substrats wurden kinetische Daten für das D-DOPA aufgenommen. Dabei wurde der Einfluss des L-DOPA, die aus D-DOPA gebildete Ketosäure DHPP (3,4-Dihydroxyphenylpyruvat) und das DOPAC (3,4-Dihydroxyphenyllactat), welches das Produkt der oxidativen Decarboxylierung von DHPP ist, untersucht. In der letzten Zeile der Tab. 28 sind die kinetischen Daten der ApDAAO für D-DOPA gezeigt. Dabei fällt auf, dass die ApDAAO das Substrat D-DOPA ($K_M = 1,07 \text{ mM}$) ~ 10-fach schlechter oxidiert als D-Methionin ($K_M = 9,33 \text{ mM}$). Die einzelnen Aktivitätsmessungen in Abb. 70 zeigen, dass DHPP die ApDAAO stark inhibiert, während L-DOPA und DOPAC hingegen die ApDAAO-Aktivität nicht beeinflussen.

Tab. 28: Kinetische Daten der ApDAAO für die Substrate D-Methionin und D-Phenylalanin in An- und Abwesenheit des L-Enantiomers oder von Inhibitoren. 100 % entspricht 275,2 U/ml für D-Methionin, 188 U/ml für D-Phenylalanin und 153 U/ml für D-DOPA als Substrat.

Substrat	Gemessen in	K_M (mM)	V_{max} (%)
	Anwesenheit von		
D-Methionin	-	1,07	100
D-Methionin	15 mM L-Methionin	1,27	98
D-Methionin	30 mM L-Methionin	0,95	84
D-Methionin	2 mM Zimtsäure	0.52	61
D-Methionin	2 mM Anthranilsäure	1,88	22
D-Phenylalanin	-	5,41	100
D-Phenylalanin	15 mM L-Phenylalanin	6,01	62
D-Phenylalanin	30 mM L-Phenylalanin	8,32	37
D-DOPA	-	9,33	100

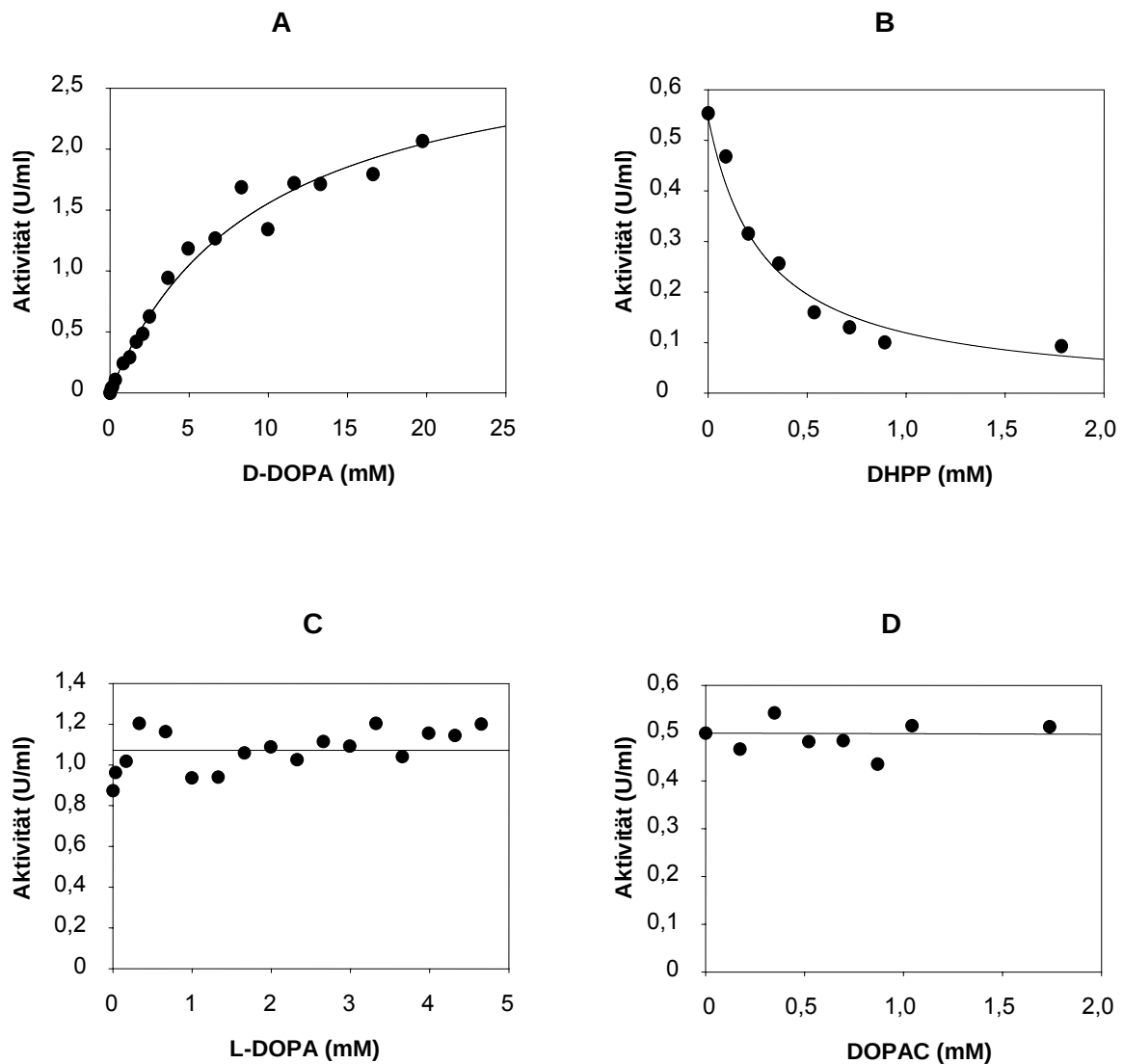


Abb. 70: Einfluss von L-DOPA, DHPP und DOPAC auf die oxidative Desaminierung von D-DOPA durch die ApDAAO. ApDAAO-Aktivität für D-DOPA **(A)** ohne Effektor **(B)** in Anwesenheit von DHPP **(C)** in Anwesenheit von L-DOPA und **(D)** in Anwesenheit von DOPAC.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von 0,1 mM Cephalosporin C auf ApDAAO-Aktivität untersucht. Es wurde festgestellt, dass Cephalosporin C die ApDAAO stark inhibiert, die Inhibition liegt in der Größenordnung wie die von 2 mM Anthranilsäure.

3.4 Proteinchemische Charakterisierung der ApDAAO

3.4.1 Molekulargewicht

Anhand des SDS-Gels der homogenen ApDAAO wurde ein Molekulargewicht von 35 kDa für eine Untereinheit bestimmt (Abb. 71).

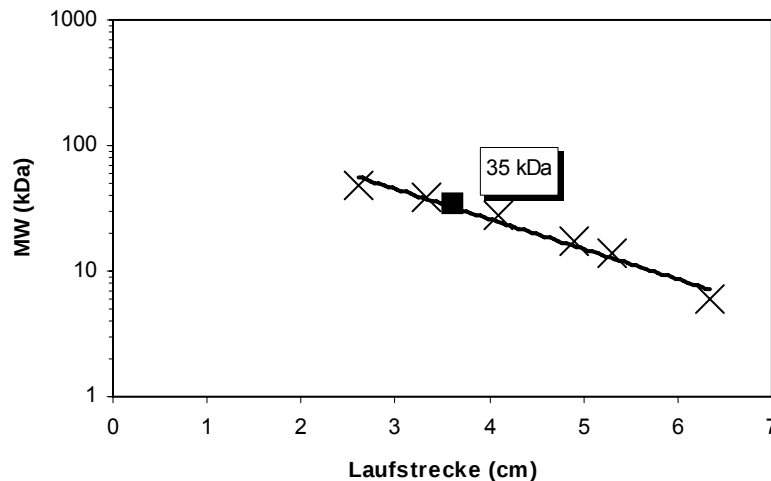


Abb. 71: Bestimmung des Molekulargewichts der ApDAAO-Untereinheit mittels SDS-Gelelektrophorese (x: Markerproteine, ■ ApDAAO).

Diese Beobachtung wurde durch die Vermessung des Enzyms mittels MALDI/TOF-MS bestätigt. Mit dieser Methode wurde ein Molekulargewicht von 34408 Da für das Monomer gemessen (Abb. 72).

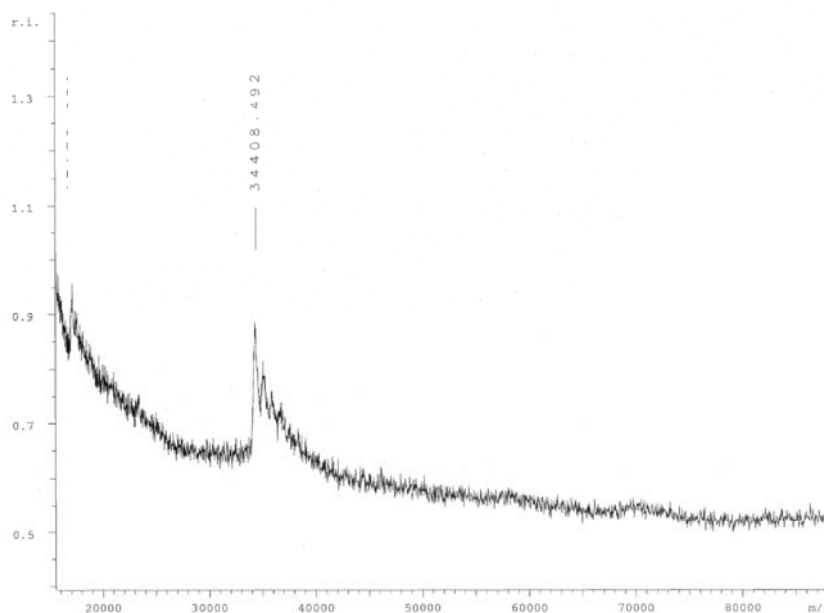


Abb. 72: MALDI/TOF-MS der ApDAAO.

3.4.2 Spektroskopische Eigenschaften

Die ApDAAO zeigte in der Holoform ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit zwei Maxima bei $\lambda = 379 \text{ nm}$ und 457 nm (Abb. 73 (1)).

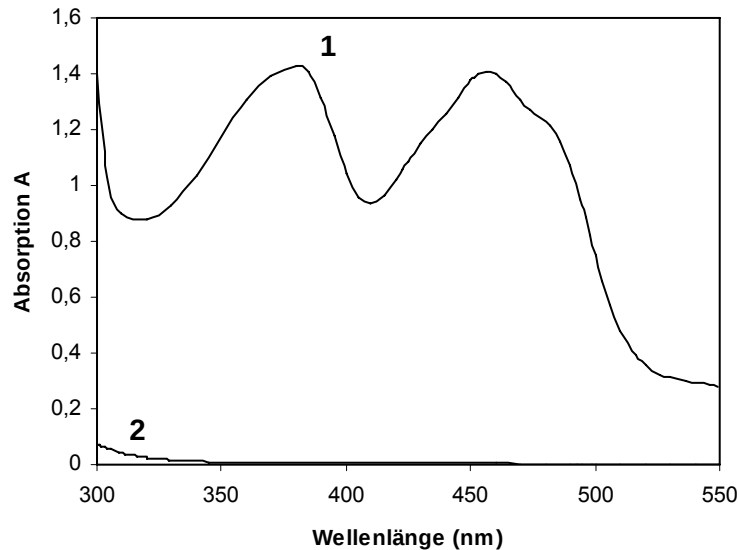


Abb. 73: Absorptionsspektrum des Holo- (**1**) und des Apoproteins (**2**) der ApDAAO. Eingesetzt wurde ein hochgereinigtes, homogenes Enzympräparat mit einer Proteinkonzentration von 1,8 mg/ml. Das Apoprotein wurde durch viertägige Lagerung in 3 M KBr erhalten.

Nach viertägiger Lagerung der ApDAAO in KBr-Puffer und erneutem Umpuffern wurde ein weiteres Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 73 (2)). Die zwei charakteristischen Maxima waren wie bei der NOX (1.4.2) nicht mehr messbar. Auch enzymatische Aktivität der Probe konnte nicht detektiert werden. Die ursprüngliche Aktivität betrug vor KBr-Behandlung 175 U/mg. Durch Zugabe von bis zu 20 μM FAD, FMN oder Riboflavin konnte keine Re-Aktivierung beobachtet werden. Das bedeutet, dass der Cofaktor FAD durch Lagerung der ApDAAO in 3 M KBr vollständig herausgelöst wurde und somit keine kovalente Bindung zwischen Cofaktor und Enzym vorlag.

3.4.3 CD-Spektrometrie

Das CD-Spektrum der ApDAAO ist in Abb. 74 zu sehen.

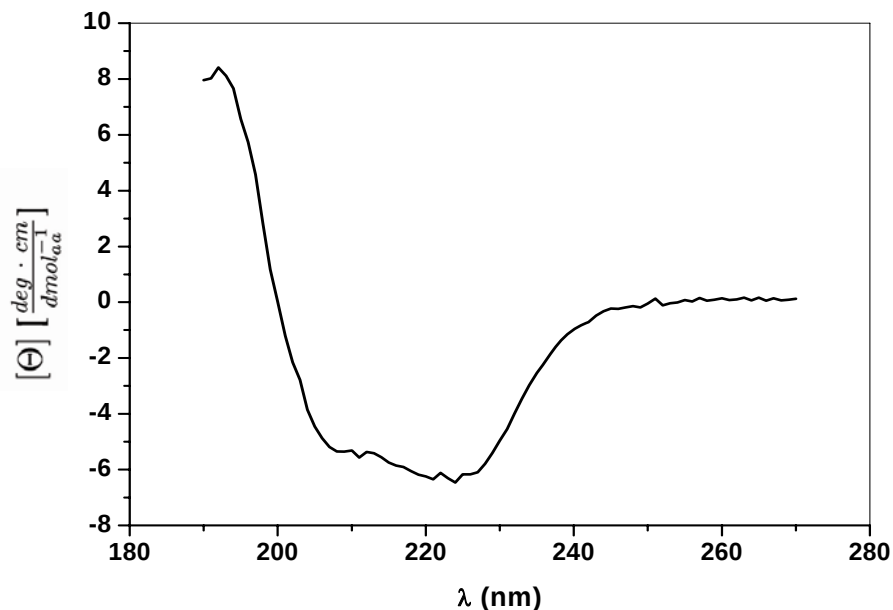


Abb. 74: CD-Spektrum der ApDAAO bei 20°C.

Da von der ApDAAO die Sequenz bekannt ist, wurden – neben der Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus dem CD-Spektrum – auch Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt, die auf der Abfolge der Aminosäuren beruhen. Desweiteren wurden zum Vergleich Sekundärstrukturanteile herangezogen, die aus der durch Modellierung erhaltene 3D-Struktur der ApDAAO abgeleitet werden konnten. Die rechnerische Auswertung des CD-Spektrums mit den Programmen CONTIN, SELCON und Yang ergab die in Tab. 29 zusammengefassten Sekundärstrukturanteile.

Tab. 29: Mittels CD-Spektroskopie ermittelte Sekundärstrukturelemente der ApDAAO. Die Vorhersage wurde mit dem Programm PREDATOR durchgeführt. Die Sekundärstrukturanteile der gemodelten 3D-Struktur wurden mit dem Programm DSSP ermittelt. Alle Angaben sind in % angegeben.

	CONTIN	SELCON	Yang	Vorhersage	Strukturmodell
α-Helix	18	16	26	33	26
β-Faltblatt	30	34	25	20	28
Rest	52,2	50	49	47	46

Die obige Tab. 29 zeigt für die ApDAAO einen signifikanten Anteil an α -Helices und β -Faltblättern, der laut Strukturmodell jeweils bei etwa 28 % liegt. Die mit CONTIN und SELCON aus den CD-Spektren ermittelten Sekundärstrukturanteile sind für die α -helikalen Anteile eher zu hoch und für die β -Faltblattanteile zu niedrig. Hingegen weisen die mit Yang ermittelten Daten eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Strukturmodell auf. Obwohl die Bestimmung der Proteinkonzentration sicher nur ungenau war, konnten die Sekundärstrukturgehalte recht genau bestimmt werden.

Die sequenzbasierte Vorhersage liefert eine andere Verteilung der Sekundärstrukturen. Die α -helikalen Anteile sind zu hoch und die β -Faltblattanteile sind zu niedrig gegenüber den Resultaten aus dem Strukturmodell.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei der Referenz nur um ein Modell der 3D-Struktur handelt und sich in der tatsächlichen Struktur Abweichungen von den hier verwendeten Sekundärstrukturanteilen ergeben können.

3.5 Klassifizierung und Alignment der ApDAAO

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO mit der PFAM-HMM-Datenbank, die die Alignments und Modelle von 7868 Proteinfamilien enthält (August 2005) (<http://pfam.wustl.edu>), ergab die Klassifizierung zur Familie der flavinhaltigen Oxidoreduktasen (PF01266). Vertreter dieser Familie sind: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenasen, Sarcosinoxidasen (β subunit) und D-Aminosäureoxidasen wie D-Alaninoxidasen oder D-Aspartatoxidasen. Die Zuordnung des Enzyms zu dieser Familie war anhand einiger hochkonservierter Sequenzmotive der FAD-/NAD(P)⁺-bindenden Proteine möglich. Ein partielles Alignment zwischen der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO, 4 weiteren

D-AAOs und 2 D-Aspartatoxidasen wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt und zeigt zwei dieser konservierten Bereiche (Abb. 75). Sämtliche Sequenzen enthalten das hochkonservierte Dinucleotid-Bindungsmotiv (DBM):

hhhGxGVxGxoxAxxh

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

Alle H₂O₂-produzierenden D-AAOs weisen außerdem ein zweites, charakteristisches Sequenzmotiv auf, das ~ 280 Aminosäuren (C-Terminus) strangabwärts des DBM liegt:

oxxGhRPxRoxhRho

D-AAO		
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	9	...TVI GSGVIGLSAA HELAA...HKV GLRPARETIR LEH...
<i>Streptomyces coelicolor</i>	14	...VVV GGGVIGLTTAV VLAEL...HLV GLRPARDAVR LER...
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	13	...VVV GCGVAGLSAA IALRE...HRA GLRPGRPEVR LEL...
<i>Anopheles gambiae</i>	13	...VVV GAGVSGLSVAV QLAE...EWV GLRPGRDSVR LEM...
<i>Caenorhabditis elegans</i>	6	...AII GEGVIGCSTAL QVAQ...EWS GLRPARKTIR IEK...
Schwein	3	...VVI GAGVIGLSTAL CIHE...EYT GFRPVRPQVR LER...
D-AspAO		
Mensch	35	...AVV GAGVVG LSTAVCISK...EKV GLRPYRPGVR LQT...
Rind	7	...AVV GAGVMG LSTAVCISK...EKV GLRPTRPSVR LEK...
		. : * * * * : * : . * : * * * : * :
Consensus		hhhGxGVxGxoxAxxhxx oxxGhRPxRoxhRho

Abb. 75: Partielles Sequenzalignment der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO mit 4 weiteren D-AAOs und 2 D-Aspartatoxidasen (Mensch und Rind). Die Sequenzinformationen stammen aus der NCBI-Datenbank (Sequenz-Homologie zwischen 30 – 46 %). In der ersten Zeile ist die Consensus-Sequenz dargestellt; o = polarer Rest, h = hydrophober Rest, x = beliebiger Rest. * identische Aminosäuren, : hohe Ähnlichkeit, . geringe Ähnlichkeit.

3.6 Strukturmodell der ApDAAO

Das Programm SWISS-MODELL vergleicht die Sequenz eines Zielmoleküls mit den Sequenzen von Proteinen, deren dreidimensionale Struktur schon bekannt ist. Homologe Bereiche werden dann automatisch in iterativen Schritten unter Verwendung der bereits bekannten Struktur(en) als Templat modelliert [146, 199, 200].

Die Struktur der Schweineniere D-AAO wurde aufgrund der Ähnlichkeiten zu der Primärstruktur der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO durch das Programm als Templat ausgewählt. Die Modellierung der ApDAAO-Struktur wurde mit einer guten Sequenzidentität von ca. 30 %

durchgeführt. Aufgrund der hohen Homologie kann von einer ähnlichen Faltung der beiden Proteine ausgegangen werden, da funktions- und strukturbestimmende Sequenz- und damit auch Strukturbereiche konserviert sind. So sind z.B. die Reste des aktiven Zentrums oder der Dinucleotid-Bindungsstelle stark konserviert. Das FAD und der Inhibitor Aminobenzoat aus der Struktur der Schweineniere-D-AAO konnte unverändert in das Modell der ApDAAO integriert werden. In Abb. 76 ist die Templat-Struktur der D-AAO aus Schweineniere und das Strukturmodell der D-AAO aus *A. protophormiae* dargestellt.

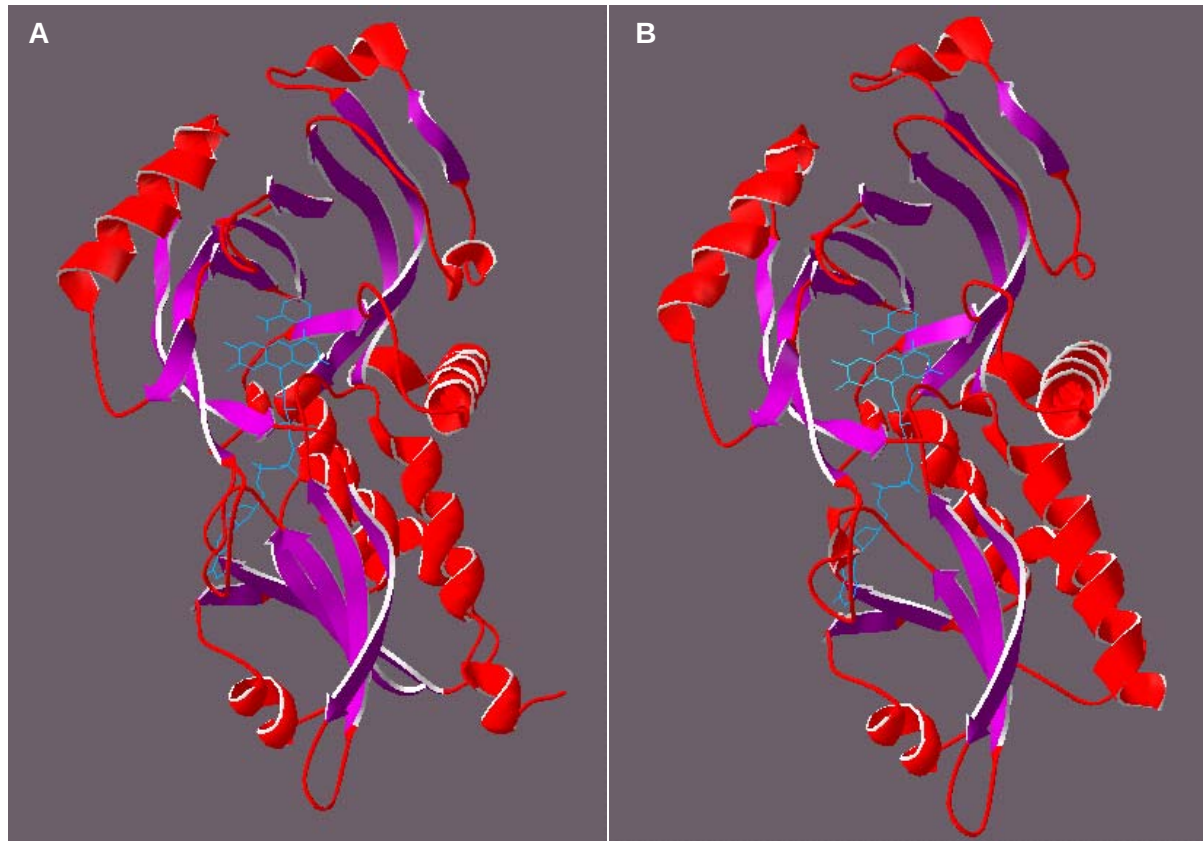


Abb. 76: (A) Dreidimensionale Struktur der Schweinenieren-D-AAO (1kif). Gezeigt ist eine Untereinheit des Holoenzym. Die α -Helices sind rot, die β -Faltblätter violett und die Inhibitormoleküle (Aminobenzoat) sowie das FAD blau dargestellt. **(B)** Modellierung der dreidimensionalen Struktur der *Arthrobacter protophormiae* D-AAO. Als Templat wurde die Struktur der Schweineniere D-AAO eingesetzt. Das Inhibitormolekül und das FAD wurden aus dem Modell der D-AAO aus Schweineniere übernommen, das durch Strukturalignment erhalten wurde.

Aufgrund der hohen Homologien zwischen den Primärstrukturen des Zielproteins und des Templats konnte auch eine Vorhersage über das aktive Zentrum gemacht werden. Nach Mattevi et al. [134, 137, 135] bilden die Aminosäuren Ala49, Leu51, Tyr224, Tyr228, Arg283, Gly313 und das FAD das katalytische Zentrum der D-AAO aus Schweineniere. Ein Vergleich dieser Aminosäuren mit dem Strukturmodell der ApDAAO zeigte, dass bis auf zwei Aminosäuren (Leu51, Tyr224) alle anderen Aminosäuren identisch sind. Statt Leu51 ist in dem Strukturmodell der ApDAAO eine sehr ähnliche Aminosäure Ile50 und statt Tyr224 (AS mit aromatischer Seitenkette) liegt eine saure Aminosäure Asp215 vor.

Da sich die katalytisch essentiellen Aminosäuren auch in dem Strukturmodell der ApDAAO befinden, kann davon ausgegangen, dass die Oxidationsreaktion wie bei der D-AAO aus Schweineniere über einen Hydridtransfer vom C α -Kohlenstoff des Substrates auf den N5-Stickstoff des Isoalloxazinteils des FAD erfolgt [134, 137, 135]. In Abb. 77 ist der Vergleich der aktiven Zentren der D-AAO aus Schweineniere und der ApDAAO gezeigt.

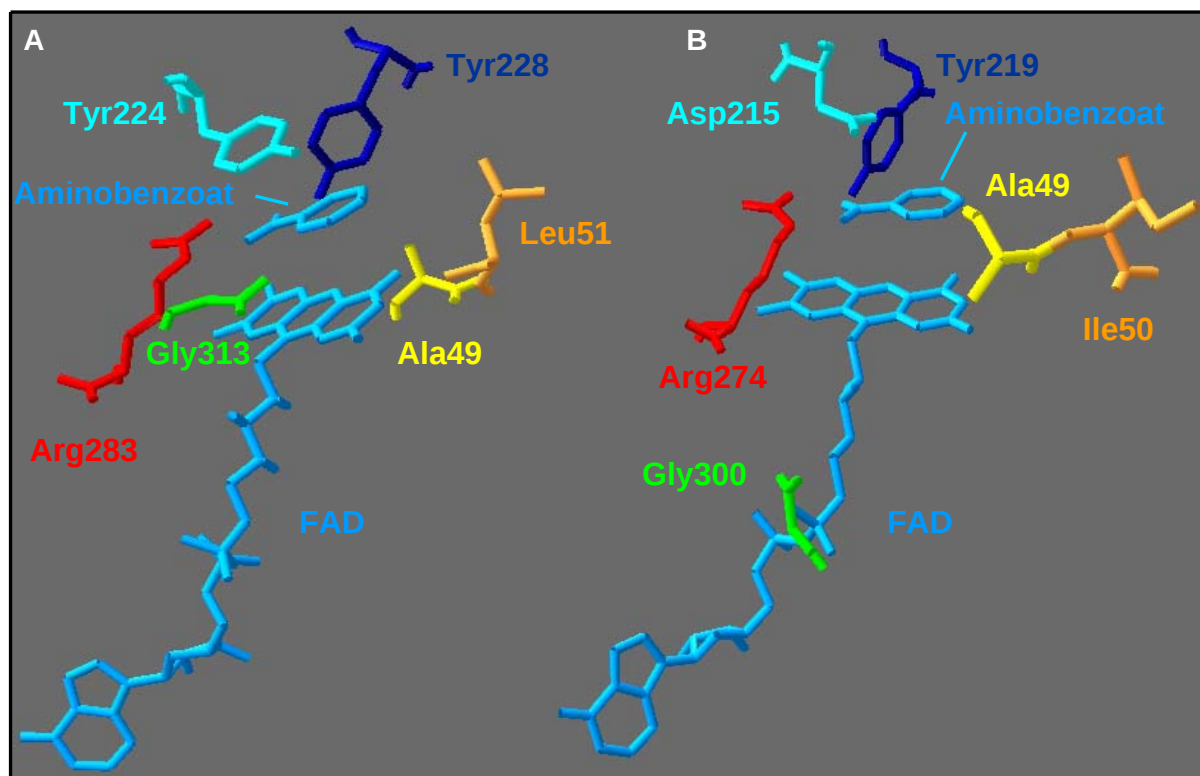


Abb. 77: Vergleich der aktiven Zentren **(A)** der D-AAO aus Schweineniere und **(B)** der ApDAAO. Das Inhibitor-molekül (Aminobenzoat) und das FAD wurden aus dem Modell der D-AAO aus Schweineniere übernommen, das durch Strukturalignment erhalten wurde.

3.7 Präparation ungewöhnlicher L-Aminosäuren durch die ApDAAO

3.7.1 Batch- und repetitive-batch-Experimente

Der Anwendungsbereich der ApDAAO entspricht prinzipiell dem der TvDAAO. Unterschiede ergeben sich im wesentlichen aus den unterschiedlichen Substratspektren beider Enzyme. Mit der TvDAAO als Modellenzym konnte im kleinen Maßstab (1ml) die Racematspaltung von DL-Aminosäuren erfolgreich demonstriert werden (Abschnitt 2.2). Dies konnte ebenso im 1 ml Maßstab mit der ApDAAO gezeigt werden (*ee*-Werte $\geq 99,6$ % für D-Methionin und D-Phenylalanin). Im Folgenden sollte daher die Racematspaltung mit der ApDAAO im größeren Maßstab an den Beispielen von DL-Methionin und DL-DOPA durchgeführt werden, eingesetzt wurde partiell gereinigte ApDAAO.

DL-Methionin wurde im batch-Verfahren und DL-DOPA im repetitive-batch-Verfahren (10 ml-Maßstab) durch die ApDAAO umgesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt. In Tabelle 30 sind die Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Methionin und DL-DOPA zusammengefasst:

Tab. 30: Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Methionin und DL-DOPA im batch- und repetitive-batch-Verfahren.

	Batch-Experiment	Repetitive- batch-Experiment
Enzymquelle	3,5 U ApDAAO (D-Met) 48 U ApDAAO (D-DOPA)	3,5 U ApDAAO (D-Met) 67 U ApDAAO (D-DOPA)
Substrat	28 mM DL-Methionin und 10 mM DL-DOPA	20 mM DL-Methionin bzw. 10 mM DL-DOPA
Ansatzvolumen	10 ml	10 ml
Volumen	25 ml Reaktor	25 ml Reaktor
Puffer	0,2 M Kpi-Puffer pH 7,6	0,2 M Kpi-Puffer pH 7,6
Katalase	-	2110 U/ml
Art der Durchmischung	Magnetrührer	Magnetrührer
Temperatur	30°C	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde ein *ee*-Wert von ≥ 95 % für D-Methionin und ca. 75 % für D-DOPA nach 4 h im batch-Ansatz ohne Katalase erreicht (Abb. 78). In Abbildung x A ist auffällig, dass die D-Methionin-Konzentration zwar abnimmt, das Primärprodukt 2-Oxo-methylthiobutyrat nimmt dagegen nicht equimolar zu. Dies liegt daran, dass die gebildete Ketosäure, wie viele auch andere 2-Ketosäuren, relativ instabil ist.

In den repetitive-batch-Versuchen mit Katalase wurde im ersten batch ein *ee*-Wert von $\geq 99,9$ % für DL-Methionin nach ~ 4 h und $\geq 99,2$ % für DL-DOPA nach $1\frac{1}{2}$ h erreicht (Abb. 79). Mit der Zunahme der batch-Zyklen wurde ein schlechterer *ee*-Wert erzielt. Dies liegt anscheinend daran, dass das bei der Oxidation von D-Methionin sich akkumulierende Primärprodukt 2-Oxo-methylthiobutanoat mit Zunahme der batch-Zyklen zunehmend stärker die ApDAAO inhibiert. Bei der Oxidation von D-DOPA durch die ApDAAO häuft sich als Primärprodukt die Ketosäure DHPP soweit an, dass durch die starke Inhibierung durch das DHPP nur eine unvollständige Umsetzung von DL-DOPA erfolgt (siehe auch Inhibitionsstudien Abschnitt 3.3.3).

Beim Vergleich zwischen batch-Versuchen ohne Katalase und repetitive-batch-Versuchen mit Katalase wird deutlich, dass in den Ansätzen mit Katalase höhere *ee*-Werte erreicht wurden. Das bedeutet, dass das gebildete H_2O_2 während der Oxidation der D-Aminosäure anscheinend auch einen inhibierenden Einfluss auf die ApDAAO hat.

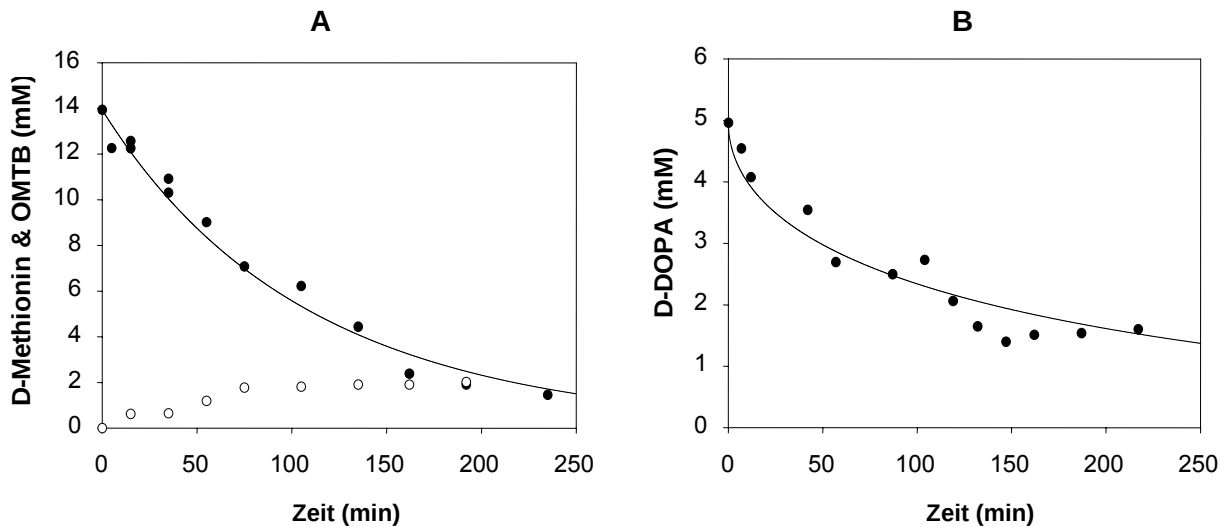


Abb. 78: Batch-Experimente zur oxidativen Desaminierung von **(A)** D-Methionin (●) (OMTB = 2-oxo-4-methylthiobutyrat) (○) und **(B)** D-DOPA (●) während der Racemattrennung von DL-Methionin und DL-DOPA durch die ApDAAO ohne Katalase in Abhängigkeit von der Zeit im 10 ml-Maßstab.

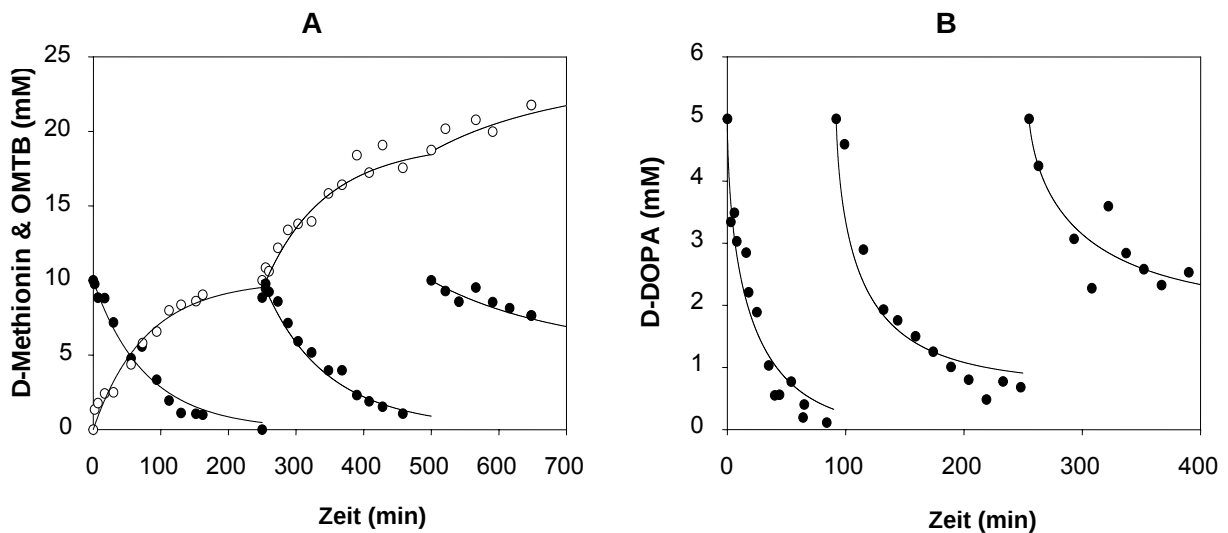


Abb. 79: Repetitive-Experimente zur oxidativen Desaminierung von **(A)** D-Methionin (●) (OMTB = 2-oxo-4-methylthiobutyrat) (○) und **(B)** D-DOPA (●) während der Racemattrennung von DL-Methionin und DL-DOPA durch die ApDAAO mit Katalase in Abhängigkeit von der Zeit im 10 ml-Maßstab.

4 L-Aminosäureoxidase aus *Rhodococcus opacus* (RoLAAO)

Die meisten der bisher beschriebenen L-AAOs stammen aus Schlangengift. Die präparative Anwendung dieser Enzyme ist aufgrund ihrer Herkunft umstritten. Zusätzlich ist die Verfügbarkeit verschiedenster, auch bakterieller L-AAOs für die technische Anwendung limitiert, da es bislang nicht gelungen ist, eine mikrobielle L-AAO heterolog zu exprimieren. Lediglich für die im Arbeitskreis entwickelte neue L-AAO aus *Rhodococcus opacus* gelang erfolgreich eine

Expression in *Streptomyces lividans*. Allerdings ist die erreichbare Aktivitätsausbeute relativ gering, technische Anwendungen sind damit nicht möglich. Aus diesen Gründen soll diese L-AAO aus *R. opacus* heterolog in *E. coli* exprimiert, umfassend charakterisiert und für biotechnologische Anwendungen, wie zur Herstellung von D-Aminosäuren und α -Ketosäuren verfügbar gemacht werden.

4.1 Heterologe Expression der RoLAAO

Um die Auswahl geeigneter Schnittstellen für die Klonierung des Gens in verschiedene Expressionsvektoren zu ermöglichen, wurde zuerst eine Restriktionskarte des *rolaao*-Gens (GI: 18026225) erstellt.

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

Über PCR wurden Restriktionsschnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *rolaao*-Gens eingefügt. Die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors wurde jeweils so ausgesucht, dass die Entfernung zwischen dem Startcodon des Gens und der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors 6 bis 8 Basen betrug. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sind in Abb. 80 dargestellt.

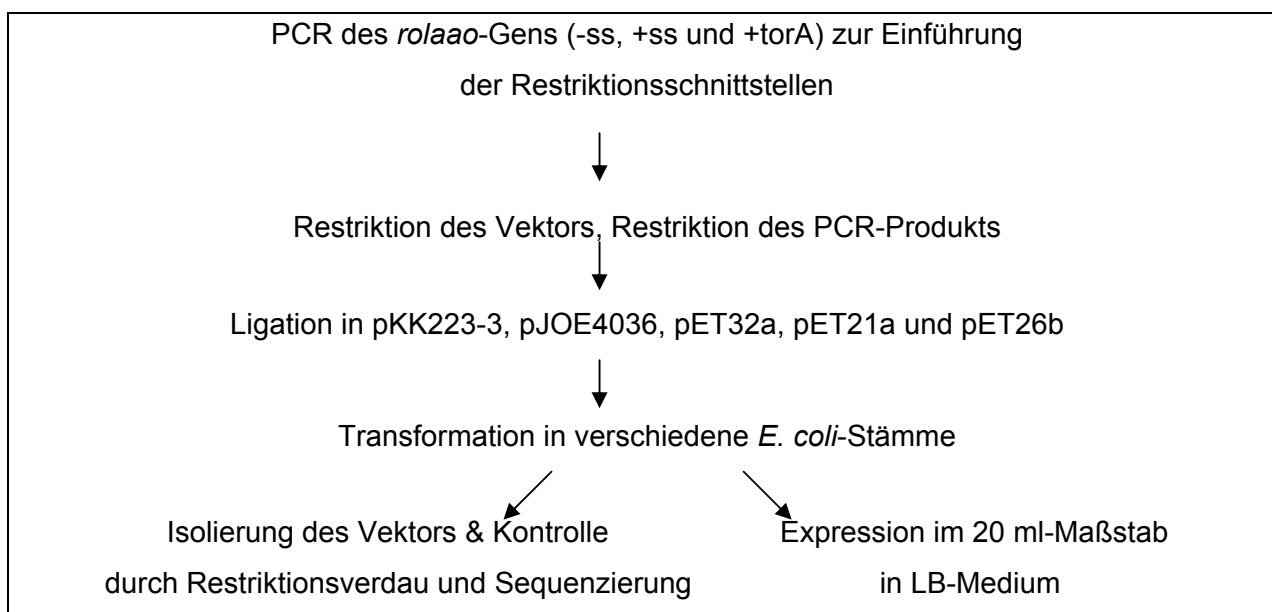


Abb. 80: Fließschema zur Klonierung der *rolaao* in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren (mit (+) und ohne (-) ss = Signalsequenz aus *Rhodococcus opacus*, torA = torA Signalsequenz aus *E. coli* K12).

Zur Expression der RoLAAO wurde das Gen mit eigener Signalsequenz jeweils in die drei *E. coli*-Expressionsvektoren pKK223-3, pJOE4036 und pET32a kloniert. Das *rolaao*-Gen wurde außerdem mit der torA-Signalsequenz aus *E. coli* K12 (GI: 556701) jeweils in die zwei *E. coli*-Expressionsvektoren pET21a und pET26b kloniert (Tab. 31).

Der Vektor pET32a enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Ampicillin-Resistenz, eine Ribosomenbindungsstelle für das Capsid-Gen des Phagen T7 und eine 'multiple cloning site' mit 11 Schnittstellen [201]. Über eine geeignete Auswahl der Restriktionsschnittstellen kann das

Zielprotein N-terminal mit Thioredoxin fusioniert werden. Das Fusionsprotein lässt sich aufgrund einer internen Enterokinase-Schnittstelle wieder spalten. Die Fusion mit Thioredoxin und die Expression in *trxB*- und *gor*-defizienten *E. coli* Origami-Stämmen soll die Löslichkeit von Proteinen erhöhen, die möglicherweise Disulfidbrücken enthalten und unter allgemeinen Expressionsbedingungen hauptsächlich als Inclusion Bodies vorliegen [202].

Der Expressionsvektor pET26b enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Kanamycin-Resistenz, eine Ribosomenbindungsstelle für das Capsid-Gen des Phagen T7 und eine 'multiple cloning sites' mit 9 Schnittstellen. Außerdem besitzt dieser Vektor N-Terminal eine *pelB* Signalsequenz aus *Erwinia carotovora* zur Protein-Sekretion ins Periplasma über den Sec-Weg (secretion pathway).

Die Rosetta-Expressionsstämme enthalten zusätzlich das Plasmid pRARE mit den Genen seltener tRNAs (7 tRNAs) und dem Chloramphenicol-Resistenzgen. Die CodonPlus-Stämme hingegen enthalten außerdem das Plasmid pACYC mit den Genen seltener tRNAs (3 - 5 tRNAs). Dieses pACYC-Plasmid enthält wie das pRARE-Plasmid eine Chloramphenicol-Resistenz.

Tab. 31: Zusammenfassung der neuerstellten *E. coli*-Vektoren (Ro = Signalsequenz aus *Rhodococcus opacus*, torA = Signalsequenz aus *E. coli* K12).

Name	Vektor	Signal-sequenz	Insert	Restriktion		Primer	
				5'	3'	5'	3'
pK1laao	pKK223-3	-	<i>rolaao</i>	EcoRI	HindIII	EcoRIrof	HindIIIror
pK2laao	pKK223-3	Ro	<i>rolaao</i>	EcoRI	HindIII	EcoRIrof	HindIIIror
pJlaao	pJOE4036	Ro	<i>rolaao</i>	NdeI	HindII	NdeIrof	HindIIIror
pE1laao	pET32a	Ro	<i>rolaao</i>	NcoI	HindIII	NcoIrof	HindIIIror
pE2laao	pET21a	torA	<i>rolaao</i>	XbaI	HindIII	XbaIrof	HindIIIror
pE3laao	pET26b	torA	<i>rolaao</i>	XbaI	HindIII	XbaIrof	HindIIIror

4.1.2 Untersuchung der Expressionsbedingungen in *E. coli*

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen für die RoLAAO in *E. coli*-Stämmen wurden umfassende Versuche durchgeführt. Der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, die Induktionstemperatur und -dauer wurden dabei variiert. Unterschiedliche *E. coli*-Stämme, Expressionsvektoren und Signalsequenzen wurden eingesetzt. Bis auf eine Kombination wurden in allen zellfreien Rohextrakten RoLAAO-Aktivität gemessen.

Eine Zusammenfassung der getesteten Bedingungen ist in Tab. 32 zu sehen.

Tab. 32: Variation der Induktions- und Kultivierungsbedingungen für verschiedene Vektor-Wirt-Systeme.

Plasmid	<i>E. coli</i>	Induktor Konz. (IPTG/Rha*)	Induktions		Induktions- temp. (°C)
			- dauer (h)	-zeitpunkt OD ₅₅₀	
pK1laao	JM105	0,1 mM	5	0,7	30-37
pK2laao	JM105	1 mM	6 - 20	0,8	30
pJlaao	JM109	0,2 % *	6	0,5	30 - 37
pE1laao	Origami (DE3 α)pLysS	1 mM	6	0,5	30 - 37
pE2laao	Rosetta (DE3)	0,1 mM	6	0,7	30 - 37
	Rosetta 2 (DE3)pLacI	0,1 mM	6	0,7	30 - 37
	BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	0,1 mM	6	0,7	30 - 37
pE3laao	BL21-Codon Plus (DE3)-RP	0,1 mM	6	0,7	30 - 37
	Rosetta (DE3)	0,1 - 0,3 mM	5 - 7	0,5	30 - 37
	Rosetta 2 (DE3)pLacI	0,05 - 0,3 mM	4 - 20	0,3 - 1,5	25 - 37
	BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	0,1 - 1 mM	5 - 7	0,5 - 1,0	30 - 37
	BL21-Codon Plus (DE3)-RP	0,1 - 1 mM	5 - 7	0,5 - 1,0	30 - 37

Die Tab. 33 zeigt, dass spezifische RoLAAO-Aktivitäten im Bereich von 230 bis zu 1100 mU/mg in den zellfreien Rohextrakten mit optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden. Bei den drei Expressionsstämmen JM105/pK2rolaao, JM109/ pJrolaao und Origami(DE3 α)pLysS/ pE1laao, welche die eigene Signalsequenz aus *R. opacus* besitzen, wurde außerdem die Bildung von unlöslichem Protein (Inclusion Bodies) beobachtet. Hingegen wurde bei den Expressionsstämmen mit den Plasmiden pE2laao und pE3laao, welche die torA Signalsequenz aus *E. coli* K12 besitzen, keine Bildung von Inclusion Bodies beobachtet. In Abb. 81 sind die löslichen und unlöslichen Fraktionen aus einem Expressionsstamm mit der *R. opacus*- und torA-Signalsequenz mittels SDS-PAGE vergleichend dargestellt.

Tab. 33: Heterologe Expression der RoLAAO. Die spez. Aktivitäten wurden in den zellfreien Roh-extrakten gemessen.

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktor-konz. IPTG/Rha*	OD ₅₅₀ / Temp. (°C)	Induktions-dauer (h)	spez. Aktivität (mU/mg)/ Inclusion Bodies
pK1laao	JM105	0,1 mM	0,7 / 30	5	290 / -
pK2laao	JM105	1 mM	0,8 / 30	20	230 / +
pJlaao	JM109	0,2 % *	0,5 / 37	6	451 / +
pE1laao	Origami (DE3α) pLysS	1 mM	0,5 / 30	6	438 / +
pE2laao	Rosetta(DE3)	0,1 mM	0,7 / 37	6	424 / -
	Rosetta 2 (DE3)pLacI	0,1 mM	0,7 / 30	6	256 / -
	BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	0,1 mM	0,7 / 37	6	346 / -
	BL21-Codon Plus (DE3)-RP	0,1 mM	0,7 / 37	6	334 / -
pE3laao	Rosetta (DE3)	0,3 mM	0,5 / 37	5	362 / -
	Rosetta 2 (DE3)pLacI	0,1 mM	0,7 / 30	6	1100 / -
	BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	0,1 mM	1,0 / 30	6	522 / -
	BL21-Codon Plus (DE3)-RP	1 mM	1,0 / 30	6	663 / -

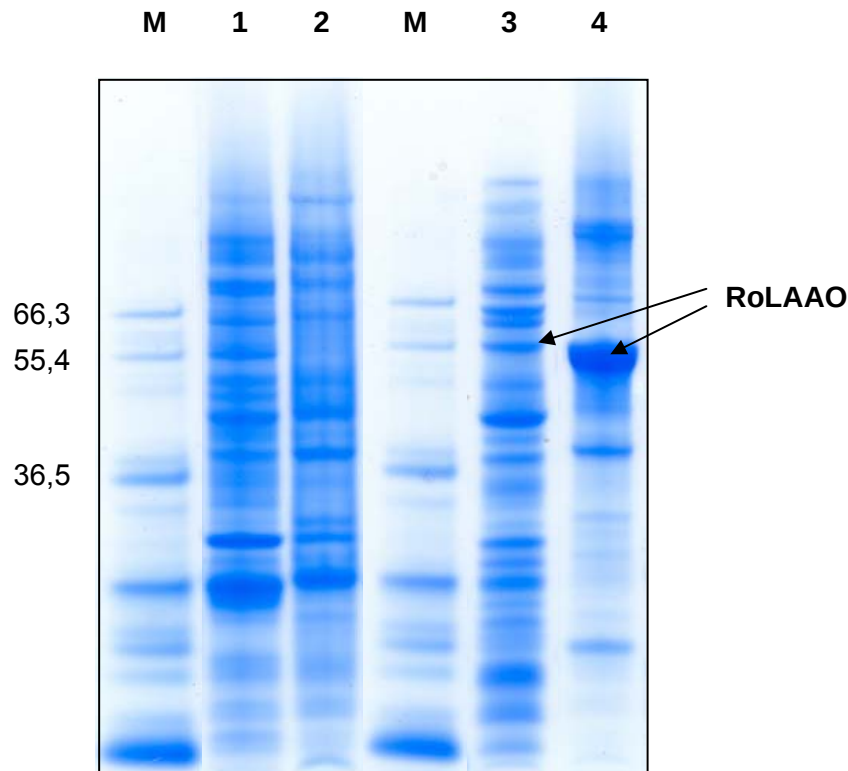


Abb. 81: SDS-PAGE der RoLAAO aus Rosetta 2 (DE3)pLacI/pE2laao (1-2) und JM105/pK2laao (3-4). Die Induktion wurde bei einer optischen Dichte zwischen $OD_{550} = 0,5$ und $0,7$ bei 30°C für 6 – 20 Stunden durchgeführt. M = Marker, 1 = Überstand (lösliche Fraktion) und 2 = Pellet (unlösliche Fraktion) aus Rosetta 2 (DE3)pLacI/pE2laao, 3 = Überstand und 4 = Pellet aus JM105/pK2laao.

4.1.2.1 Untersuchung der FAD-Abhängigkeit der RoLAAO

Für die RoLAAO wurde der Einfluss von FAD auf die Aktivität der RoLAAO im Rohextrakt untersucht. Dabei wurde die RoLAAO-Aktivität in Gegenwart von 0 - 15 μM FAD bestimmt. In allen Ansätzen konnte weder eine Erhöhung noch eine Erniedrigung der RoLAAO-Aktivität beobachtet werden. Anscheinend liegt die RoLAAO hauptsächlich als Holoenzym vor oder möglicherweise auftretende Apoformen können kein FAD aufnehmen.

Neben der FAD-Abhängigkeit im Assay wurde auch der Einfluss von FAD und Riboflavin im Medium auf die Bildung von RoLAAO-Holo- und Apoenzym untersucht.

Die Aktivitätsmessungen zeigten, dass ein Zusatz von 50 μM FAD und Riboflavin zum Medium keinen Einfluss auf die Bildung von Holo- oder Apoenzym hat.

4.1.2.2 Hochzelldichte-Fermentation

Der rekombinante *E. coli* Rosetta 2 (DE3)pLacI-Stamm mit dem Plasmid pE3laao wurde zur Produktion der RoLAAO in HZD-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol im 15 L-Maßstab fermentiert. Der Fermentationsverlauf ist im Anhang (VII2, Abb. 89) dargestellt.

Die Zellen wurden nach 27 h Fermentationsdauer mit 1 mM IPTG induziert. Die Temperatur wurde konstant bei 30°C gehalten und der pH wurde durch Zugabe von NH_4OH auf 7,0 eingestellt. Durch Anpassung der Rührergeschwindigkeit, des Drucks und der Begasungsrate wurde der pO_2 auf 30 % während der Fermentation eingestellt. Nach 39,6 Stunden Fermen-

tationsdauer wurden 2,3 kg Zellen (Feuchtgewicht) mit einem Separator KA06 geerntet und pro Gramm Zellen (Feuchtgewicht) wurde eine Aktivität von 22 U bestimmt. Die spezifische Aktivität lag bei 0,4 U/mg. Durch eine 15 L-Fermentation wurden insgesamt 50550 Units RoLAAO erzielt.

4.2 Präparation von D-Aminosäuren durch die RoLAAO

4.2.1 Lösliche RoLAAO

DL-Serin und DL-Leucin wurden im 1 ml-Maßstab durch die L-AAO umgesetzt und der Reaktionsverlauf wurde zeitlich verfolgt.

Versuchsbedingungen zur Umsetzung von DL-Serin und DL-Leucin:

Enzymquelle	0,1 U L-AAO
Substrat	10 mM DL-Serin und DL-Leucin
Ansatzvolumen	1 ml
Reaktionsgefäß	Eppendorf Reaktionsgefäß 2 ml
Volumen Reaktionsgefäß	2 mL
Puffer	50 mM TEA/HCl pH 7,6
Katalase	2000 U/ml
Art der Durchmischung	Thermomixer 600 rpm
Temperatur	30°C

Unter diesen Bedingungen wurde ein ee-Wert von 99,2 % für D-Serin und 99,7 % für D-Leucin erreicht (Abb. 82). In beiden Umsetzungen konnte nach ca. 24 h eine vollständige Oxidation der D-Aminosäure erzielt werden.

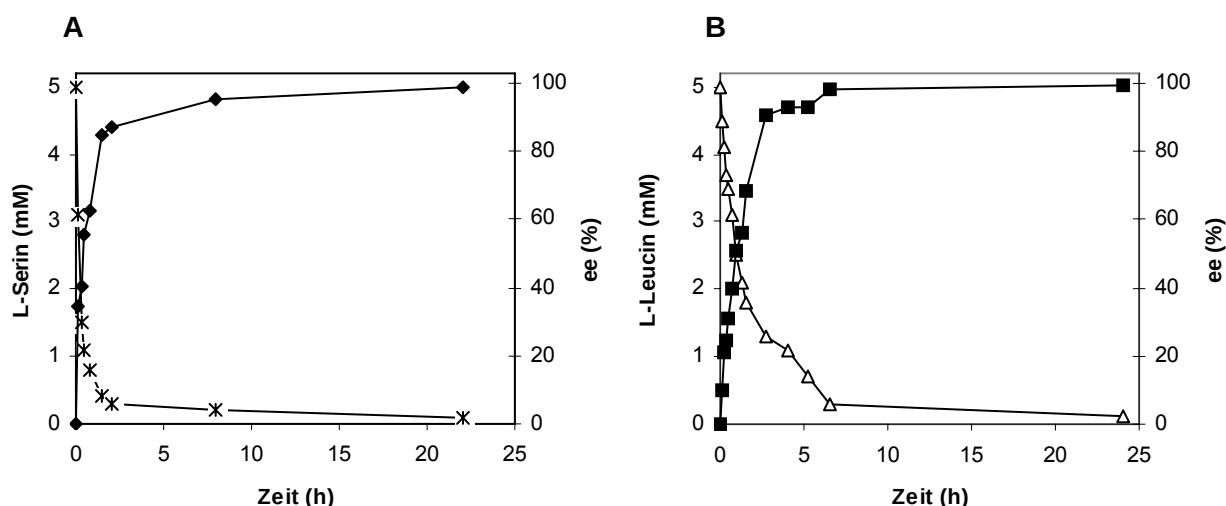


Abb. 82: Oxidative Racemattrennung durch die RoLAAO. Umsetzung von **(A)** L-Serin (*) und ee-Wert für D-Serin (♦), **(B)** L-Leucin (Δ) und ee-Wert D-Leucin (■) während der Racemattrennung von DL-Serin und DL-Leucin durch die RoLAAO in Abhängigkeit von der Zeit.

4.2.2 Ganzzellbiotransformation

Rosetta 2 (DE3)pLacI/pE3laao-Zellen wurden zur Racemattrennung von DL-Leucin eingesetzt. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

Enzymquelle	4 % Rosetta 2 (DE3)pLacI/pE3laao-Zellen
Substrat	10 mM DL-Leucin
Ansatzvolumen	1 ml
Reaktionsgefäß	Eppendorf Reaktionsgefäß mit Deckel
Volumen d. Reaktionsgefäßes	1,5 ml
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
Art der Durchmischung	Thermomixer 900 rpm
Temperatur	25°C, 30°C, 37°C

In allen Ansätzen konnte nach maximal 4 h ein kompletter Umsatz der L-Komponente beobachtet werden, so dass ee-Werte für D-Leucin von > 99 % erreicht wurden. Generell schien eine Erhöhung der Temperatur bis 37°C die Reaktionsgeschwindigkeit zu beschleunigen, ohne eine signifikante Inaktivierung des Enzyms während der Messzeit hervorzurufen.

IV Diskussion

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl biotechnologischer Verfahren zur Produktion von enantiomerenreinen Verbindungen wie Aminosäuren, Alkoholen, Hydroxysäuren oder auch Aminen entwickelt. Natürliche L-Aminosäuren werden häufig fermentativ mit genetisch veränderten Hochleistungsstämmen hergestellt, unnatürliche L-Aminosäuren können beispielsweise durch die reduktive Aminierung einer Ketosäure, katalysiert durch eine L-Aminosäure-Dehydrogenase enantiomerenrein synthetisiert werden [164]. Diese Methoden können nicht zur Herstellung von D-Aminosäuren eingesetzt werden, da bislang keine D-Aminosäure-Dehydrogenase beschrieben sind. Chirale Alkohole werden chemisch oder enzymatisch, zum Beispiel durch Racemattrennung mit Lipasen oder durch Reduktion von Keto-Verbindungen mit spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen präpariert [203].

Die in dieser Arbeit beschriebenen Redoxenzyme haben für mehrere Stoffgruppen Bedeutung:

- *L-Aminosäureoxidase*: Dieses Enzym hat vor allem zur Synthese von D-Aminosäuren aus den Racematen Bedeutung. Bislang gibt es kein Standardverfahren zur Synthese dieser Verbindungen, so dass die Racemattrennung ein durchaus attraktives Verfahren darstellt. Des weiteren kann man mit diesem Enzym Ketosäuren herstellen, wobei man von den preisgünstigen L-Aminosäuren ausgehen kann.
- *D-Aminosäureoxidase*: Diese Enzyme können durch Racemattrenn-Verfahren zur Synthese unnatürlicher L-Aminosäuren eingesetzt werden.
- *NADH-Oxidase*: Dieses Enzym hat selbst keine präparative Bedeutung, es kann aber zur Regenerierung von NAD^+ eingesetzt werden und bekommt damit großen präparativen Wert. Es kann gekoppelt mit NAD-abhängigen Dehydrogenasen verwendet werden, wobei vorteilhaft ist, dass sehr viele Dehydrogenasen, kommerziell erhältlich bzw. in der Literatur beschrieben sind. In Verbindung beispielsweise mit L-Aminosäure-Dehydrogenasen können so auf oxidativen Weg durch Racemattrennung D-Aminosäuren präpariert werden.

Obwohl bereits einige enzymatische Prozesse zur Produktion von D-Aminosäuren oder chiralen Alkoholen beschrieben wurden, schien die Verwendung der NOX aus *L. brevis* als Regenerationssystem für NAD^+ , mit Kopplung einer NAD^+ -abhängigen Dehydrogenase, eine interessante Alternative zu sein. Neben diesem neu entwickelten System wurde durch den Einsatz von Aminosäureoxidasen auch ein weiterer alternativer Weg zur Synthese von D- oder L-Aminosäuren und Ketosäuren eröffnet. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit einmal die NOX aus *L. brevis* heterolog exprimiert, dann kristallisiert und die 3D-Kristallstruktur gelöst. Anschließend wurde die NOX auch zur Regeneration von NAD^+ in präparativen Anwendungen verwendet. Zum anderen wurden zwei D-Aminosäureoxidasen (TvDAAO und ApDAAO) und eine L-Aminosäureoxidase (RoLAAO) heterolog exprimiert und der biotechnologische Einsatz untersucht.

Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte dieser vier Oxidasen diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer biochemischen, strukturellen Eigenschaften und ihres Anwendungspotentials untersucht wurden.

1 Heterologe Expression der NOX und SeMetNOX

Das *nox*-Gen wurde in vier unterschiedliche *E. coli*-Expressionsvektoren (pKnox basiert auf pKK223-3, pEnox auf pET21a, pDnox auf pETDuet-1, und pJnox auf pJOE4036) kloniert und in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert. Die Tab. 6 zeigt, dass spezifische Aktivitäten für die NOX im Bereich von 40 bis zu 115 U/mg im Rohextrakt unter optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden, die für hohe Expressionsausbeuten spricht. Auch die SeMetNOX wurde trotz des Minimalmediums bei Verwendung eines Methionin auxotrophen *E. coli*-Stamms (B834(DE3)) mit spezifischer Aktivität von ca. 27 U/mg erfolgreich überexprimiert (Tab. 6). Im Vergleich mit NOX-Enzymen aus anderen Bakterien, die in der Größenordnung von 0,35 - 6,0 U/mg) exprimiert worden sind [36, 43, 40, 41, 47] liegen die hier erreichten spezifischen Aktivitäten (in Rohextrakten) außerordentlich hoch. Die höchste spezifische Aktivität der NOX, die erreicht wurde, lag bei 115 U/mg; das bedeutet unter Berücksichtigung, dass das homogene Enzym eine spezifische Aktivität von 350 U/mg aufweist, dass mehr als 40 % des löslichen intrazellulären Proteins als NOX-Enzym vorliegen.

Des weiteren wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Apo-/Holoenzymbildung der NOX aus Tuner(DE3)/pEnox untersucht. Dabei wurden die IPTG-Konzentration und die Induktionstemperatur während der heterologen Expression variiert. Eine Aussage über die Quantität der Apoenzym-Bildung wurde dadurch erreicht, dass die Aktivierbarkeit der NOX-Aktivität in den einzelnen Rohextrakten durch Zugabe von FAD untersucht wurde. Dabei wird angenommen, dass das Apoenzym im wesentlichen durch extern und *in vitro* angebotenes FAD voll rekonstituierbar ist. Das wird in erster Annäherung durch die Anfärbung von IEF-Gelen bestätigt, auch die MALDI-Ergebnisse spiegeln die biochemischen Reaktivierungsergebnisse wieder, wobei bei dieser Methode nur die Untereinheit des Apo- bzw. Holoenzym nachgewiesen werden kann.

Unter dieser Annahme, dass man mit der Aktivierbarkeit durch FAD-Zusatz ein Maß für die Menge an Apoenzym hat, zeigt sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit des *in vivo* FAD-Einbaus. Bei einer Wachstums- bzw. Induktionstemperatur von 37°C ohne FAD-Zugabe wurde die höchste NOX-Aktivität beobachtet, gleichzeitig ist hier die Apoenzym-Bildung, also die nachträgliche Aktivierbarkeit am geringsten. Bei niedrigen Temperaturen war die Steigerung der Enzymaktivität im Assay durch Zugabe von FAD am höchsten. Durch nachträglichen FAD-Zusatz wurden bei niedrigen Temperaturen vergleichbare Endaktivitäten erreicht wie bei 37°C. Das bedeutet, dass die Expression des Enzymproteins weitgehend von der Temperatur unabhängig verlief, allerdings wird bei niedrigen Temperaturen deutlich weniger FAD in das Enzymprotein eingebaut als bei 37°C.

In der Literatur sind solche Experimente bzw. vergleichbare Ergebnisse von anderen FAD-abhängigen Enzymen nicht bekannt. Man kann vermuten, dass nicht der Einbau des Coenzym selbst temperaturabhängig ist, sondern eher die Biosynthese des FADs betroffen ist. Durch die starke Überexpression der Oxidase ist auch die Biosynthese des Coenzym gefordert, dies gelingt aber nur bei höheren Temperaturen in ausreichendem Maß. Vermutlich ist ein Schritt in der Biosynthesekette des FADs beträchtlich temperaturabhängig. Dies trifft im übrigen in vollem

Umfang auch auf das SeMethionin-Enzym zu, d.h., der Einbau von 13 Selenomethionin-Molekülen in das NOX-Protein hat keinen Einfluss auf den Einbau des Coenzym.

In der Literatur findet man keine vergleichbaren Daten zum Einfluss der Expressionsbedingungen auf den Einbau von FAD bei anderen Oxidaseenzymen. Diese Daten sind insofern interessant, da man offensichtlich durch geeignete Anzuchtbedingungen FAD-freies Enzym gewinnen kann. In der Literatur sind zahlreiche andere Methoden beschrieben, um Apoenzym von Oxidasen zu gewinnen, häufig relativ drastische Methoden der FAD-Entfernung, die dann zu denaturiertem Enzym oder zumindest zu nicht mehr rekonstituierbarem Enzym führen [204]. Interessant sind solche Apoenzyme, da man damit versucht, Coenzym-Derivate in das Enzym einzuführen und dann den Einfluss dieser Coenzym-Derivate auf die Eigenschaften des Enzyms untersuchen kann. Mit der hier dargestellten Vorgehensweise hat man eine sehr einfache Methode, Coenzym-freie Oxidasen zu gewinnen. Wir haben dies bei der NOX auch aufzeigen können: Bei einer Induktionstemperatur von 30°C und einer Induktorkonzentration von 100 µM IPTG wurde in LB-Medium eine ca. 90 %ige NOX-Apoenzym-Lösung exprimiert. Durch anschließende chromatographische Reinigung könnte dann reines NOX-Apoenzym einfach präpariert werden.

2 Reinigung und biochemische Charakterisierung der NOX und SeMetNOX

Die rekombinante NOX (Tuner(DE3)-Zellen mit pEnox) und SeMetNOX (B834(DE3) Zellen mit pEnox) ließen sich in drei Chromatographieschritten mit einer Ausbeute von 41 % bis zur Homogenität aufreinigen. Die homogene NOX zeigte eine spezifische Aktivität von 350 U/mg und die SeMetNOX 275 U/mg.

Aufgrund der weiten Verbreitung der NOX-Enzyme in Bakterien und aufgrund des großen Interesses an der Erforschung der NOX und der NOX als Coenzym-Regenerationssystem, das H₂O als Nebenprodukt bildet, sind bereits einige dieser Enzyme isoliert worden. Die zur Reinigung am häufigsten verwendeten Techniken sind Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie [31, 43, 47]. Aber auch Verfahren wie Hydrophobe Interaktionschromatographie [45], Gelfiltration [41] und Ultrazentrifugation [40] wurden zur Reinigung H₂O-bildender NOX-Enzyme aus Bakterien angewandt worden. Bei sämtlichen Protokollen waren mindestens 3 Chromatographieschritte für die Reinigung erforderlich. Ein zweistufiges Protokoll existiert nur für die NOX aus *Streptococcus faecalis* [43], die in zwei Reinigungsschritten durch Affinitätschromatographie an Sepharose 6B isoliert wurde.

Die NOX aus *Lactobacillus brevis* machte 11 bis zu 43 % des löslichen Gesamtproteins aus (100 % entsprechen 350 U/mg der homogenen NOX). Auffällig während der Reinigung war, dass nach der Q-Sepharose die Gesamtaktivität von ca. 5000 auf 6000 U anstieg, obwohl im Verlauf der Reinigungen meist Verluste verzeichnet werden. Höchstwahrscheinlich wurde durch die Q-Sepharose-Aufreinigung neben Fremdproteinen auch Inhibitoren abgetrennt, die vorher einen Einfluss auf die Gesamtaktivität im Rohextrakt zeigten.

Der Cofaktor FAD blieb während aller Chromatographieschritte fest am Enzym gebunden. Die spezifische Aktivität der NOX ließ sich nach der Q-Sepharose durch Zugabe von 15 µM FAD

um fast das Doppelte von 78,4 auf 146 U/mg steigern. Eine solche starke Steigerung der spezifische Aktivität der NOX konnte hingegen nach der Phenylsepharose nicht beobachtet werden. Dennoch wurde eine Steigerung der spezifische Aktivität der NOX nach der Phenylsepharose durch Zugabe von 15 μM FAD um das 1,4-fache von 233 auf 324 U/mg beobachtet. Auch nach der Gelfiltration konnte, wenn auch geringer, die spezifische Aktivität der NOX durch Zugabe von 8 μM FAD um das 1,1-fache von 350 auf 381 U/mg gesteigert werden. Dieses Phänomen wurde auch beispielsweise für die NADH-Oxidase aus *Sporolactobacillus inulinus* während der Reinigung beobachtet [30]. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die NOX durch Inkubation in 3 M Kaliumbromid in ihre Apoform überführt wurde. Das FAD lag somit nicht kovalent vor, wie es bei vielen anderen Oxidasen der Fall ist [134, 205, 206].

Die NOX aus *Lactobacillus brevis* liegt nach der Gelfiltration als Homotetramer mit 49 kDa großen Untereinheiten vor. Diese Molmasse der Untereinheit wurde auch durch die Vermessung des Enzyms mittels MALDI/TOF-MS bestätigt. Mit dieser Methode wurde ein Molekulargewicht von 48830 Da für das Monomer ohne FAD und 49614 Da für das Monomer mit FAD gemessen. Bezüglich der Quartärstruktur kommen verschiedene Formen von NOX-Enzymen vor: Als Homotetramer kommt ebenfalls die NOX aus *Amphibacillus xylanus* vor, deren Untereinheiten aber 56 kDa groß sind [36]. Die NADH-Oxidasen aus anderen Bakterien liegen als Homodimere [48, 31, 44] oder als Monomere [40] vor. Mittels ESI-Massenspektrometrie wurden die Molmassen der nativen NOX und SeMetNOX ermittelt und der Einbau von Selen kontrolliert. Innerhalb der Fehlergrenzen des ESI-Massenspektrometers in diesem Massenbereich ($\pm 0,1\%$) entspricht die gemessene Masse des Monomers (SeMetNOX 49581 Da) der erwarteten (49553 Da). Der vollständige Einbau von Selen wurde erfolgreich durchgeführt. Auch der experimentell bestimmte isoelektrische Punkt von 4,7 für die NOX stimmt mit dem theoretischen pI von 4,7 exakt überein. Bei der isoelektrischen Fokussierung der homogenen NOX wurden außerdem 4 weitere Banden oberhalb des pI von 4,7 beobachtet. Aufgrund der unterschiedlichen Nettoladungen der NOX-Holo- und Apoenzyme, welche durch die Anzahl der gebundenen FAD-Moleküle zustande kommt, konnte anscheinend die Auftrennung des homogenen NOX-Holo-Apoenzym-Gemisches in das einzelne NOX-Holoenzym bzw. die Apoenzyme gezeigt werden.

Die rekombinante NOX hat einen K_M -Wert von 18 μM (SeMetNOX $K_M = 14\ \mu\text{M}$) für NADH, die innerhalb der Fehlerrate dem K_M -Wert der NOX aus dem Wildtypstamm (*L. brevis*) mit 24 μM für NADH sehr nahe kommt [45]. Das pH-Optimum der rekombinanten NOX und SeMetNOX lag im schwach sauren Bereich bei pH 6,0 wie bei der NOX aus dem Wildtypstamm (*L. brevis*) [45]. In dieser Arbeit wurde der Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert über einen weiten Bereich, insbesondere im alkalischen untersucht, da für Kopplungen bzw. Umsetzungen mit Dehydrogenasen ein gemeinsamer pH-Wert im alkalischen Bereich gefunden werden musste, bei dem sowohl die NOX als auch die Dehydrogenasen aktiv sind. Außerdem wurde beobachtet, dass die Aktivität der NOX und SeMetNOX in Tris/HCl-Puffer deutlich geringer ist. Da unter anderem die 3D-Struktur und der Reaktionsmechanismus der NOX in dieser Arbeit aufgeklärt werden soll, wurden in diesem Zusammenhang auch NOX-Inhibitor-Komplexe untersucht. Mit Hilfe der NOX-Inhibitor-Komplexe bzw. NOX-Inhibitor-Strukturen können zusätzliche Informationen zur 3D-Struktur und zum Reaktionsmechanismus der NOX gewonnen

werden. Für die Inhibitions- und Inaktivierungsstudien wurden die drei Reagenzien ATP, DPI und Quinacrin näher untersucht. Alle drei Reagenzien inhibieren die NOX stark. Da sich die K_M -Werte dieser drei Reagenzien im Rahmen der Messgenauigkeit nicht ändern und die V_{max} -Werte sich verändern, spricht diese Art der Hemmung für einen nicht-kompetitiven Mechanismus.

Außerdem konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie und dem Programm Yang, trotz der ungenauen Methoden zur Proteinbestimmung, die α -helikalen und β -Faltblatt Sekundärstrukturanteile aus den Resultaten der Röntgenstruktur gut bestätigt werden. Hingegen ergab das sequenzbasierte Verfahren eine ganz andere Verteilung der Sekundärstrukturen, anscheinend ist dieses Programm noch unausgereift.

3 Sequenzauswertung und Strukturlösung der NOX

Die homogene NOX wurde kristallisiert und durch Impfkristallisation wurden schnell reproduzierbar Kristalle hergestellt, die ein gutes Streuverhalten zeigten. Alle NOX-Kristalle zeigten – wie die Kristalle vieler anderer Oxidasen [114, 84, 133, 131, 109] – eine charakteristische Gelbfärbung. Durch Behandlung mit einem großen Überschuss an NADH wurden sie entfärbt, weil vermutlich die reduzierte Form der NOX (E-FADH₂) entstanden war. Offenbar also ist NOX auch im Kristall katalytisch aktiv.

Da die optimierten NOX-Kristalle ein gutes Streuverhalten in der Anlage des Instituts für Biochemie in Köln zeigten, wurde mit einem Kristall ein kompletter Datensatz mit Synchrotronstrahlung bis zu einer Auflösung von 2,9 Å gemessen. Die Daten ließen sich mit dem Programm DENZO indizieren und integrieren. Durch Skalierung und Vereinigen der Beugungsaufnahmen mit dem Programm SCALEPACK wurde für die NOX ein tetragonales Kristallsystem mit den Gitterkonstanten $a = b = 141,85 \text{ Å}$, $c = 247,62 \text{ Å}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ermittelt. In der asymmetrischen Einheit befanden sich acht NOX-Monomere.

Außerdem wurde für den NOX-DESY-Datensatz eine perfekte Verzwillingung ermittelt, d.h. die Punktgruppe der Kristalle ist nicht 422 – wie ursprünglich nach der Skalierung vermutet –, sondern 4. In der Sichtweise des reziproken Raumes bedeutet dies, dass die Beugungsmuster der beiden Zwillingsdomänen vollständig überlappen [175].

Durch Sequenzanalyse und Alignments (siehe Abschnitt 1.5) wurde anhand der hochkonservierten Sequenzmotive (FAD- und NAD⁺-Bindungsstelle, Sequenzmotiv mit dem katalytisch aktiven Cystein) ermittelt, dass die NOX zur Familie der flavinhaltigen Disulfid-Oxidoreduktasen angehört. Zu Beginn der Arbeit waren 3D-Strukturen der Glutathion-Reduktasen [207, 208], der Quecksilber-Reduktasen [209], Dihydroliponamid-Dehydrogenasen [210, 211] und Thioredoxin-Reduktasen [212, 213] dieser Familie aufgeklärt. Eine 3D-Struktur einer H₂O-bildenden NOX wurde aber bisher nicht veröffentlicht.

Eine FASTA-Recherche [191] in der PDB ergab, dass die NADH-Peroxidase aus *Enterococcus faecalis* [123, 125] (PDB-Kürzel 1F8W) die höchste Sequenzidentität zur NOX mit 42,3 % zeigt. Um eine Strukturlösung mit Hilfe des molekularen Ersatzes zu versuchen, wurde hierzu in der PDB eine Recherche mit FASTA durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität konnte die 3D-Struktur der NOX erfolgreich mittels molekularem Ersatzes gelöst werden.

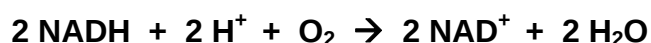
Das NOX-Monomer besitzt eine konische Form mit Maßen von ca. $62 \times 60 \times 45 \text{ Å}^3$. Die Tertiärstruktur besteht aus gemischten 29 Strängen β -Faltblättern und 11 α -Helices. Diese Strukturelemente bilden im Zentrum des NOX-Proteins einen Tunnel, der die katalytischen Aminosäure-

resten, den FAD-Cofaktor enthält und in der das „Substrat“ NADH von der einen Seite sowie das Reduktionsmittel O₂ von der anderen Seite des Tunnels bindet (s. Abb. 42 und 43). Innerhalb der NPOX aus *E. faecalis* konnte ebenfalls ein klarer Tunnelbereich beobachtet werden [123, 124, 125].

Bis zur Lösung der NOX-3D-Struktur wurde anhand der Ergebnisse aus der Gelfiltration (s. a. Abschnitt 1.4.1) angenommen, dass die NOX als Homotetramer vorliegt. Mit der Lösung der Struktur ließ sich die Frage der Quartärstruktur eindeutig lösen. Im Kristall liegt die NOX als Dimer vor. Ein solches Dimer ist in Abb. 44 dargestellt. Eine anschließende Überlagerung der NOX mit dem NPOX-Tetramer aus *Enterococcus faecalis* [123, 124, 125] zeigt, dass eine entsprechende Tetramerisierung bei der NOX-Kristallstruktur nicht möglich ist (Abb. 45).

Reaktionsmechanismus der NOX

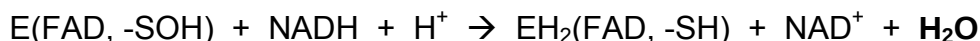
NOX katalysiert die folgende Gesamtreaktion



Es handelt sich um eine Übertragung von insgesamt vier Elektronen, während H₂O₂-produzierende NADH-Oxidasen nur zwei Elektronen pro Formelumsatz übertragen und in Form von FADH₂ zwischengelagern können. Allein dieser Umstand lässt darauf schließen, dass das Reaktionsgeschehen am aktiven Zentrum von NOX aus einer komplexen Abfolge mehrerer Schritte besteht.

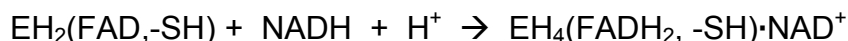
In der Tat lassen sich aufgrund enzymologischer und spektroskopischer Befunde [32, 214], aufgrund von Mutationsstudien [215] sowie nicht zuletzt aufgrund der hier vorgestellten Struktur vier grundlegende Reaktionsschritte unterscheiden:

1. Schritt: NADH-Oxidation und Bildung des ersten H₂O-Moleküls



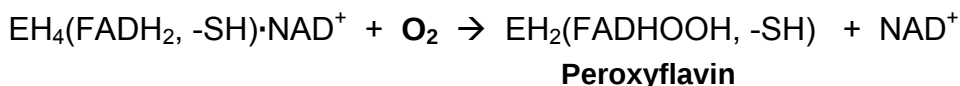
Ausgangspunkt ist also ein Grundzustand von NOX, in dem beide Reaktionszentren (FAD und Cys42) im oxidierten Zustand vorliegen (Cys42 also als Sulfensäure). Da Cys42-SOH das stärkere Oxidationsmittel als FAD ist, ist anzunehmen, dass die beiden Elektronen des ersten NADH-Moleküls Cys42 reduzieren, während FAD weiterhin oxidiert bleibt. Aufgrund der räumlichen Gegebenheiten, dass sich nämlich NADH dem FAD von der *re*-Seite nähert, während Cys42 an der *si*-Seite lokalisiert ist (Abb. 46), bedeutet das, dass die beiden Elektronen nicht direkt von NADH auf Cys42-SOH übergehen können, sondern von FAD weitergeleitet werden müssen.

2. Schritt: NADH-Oxidation und Reduktion des FADs



Während das FAD die beiden Elektronen des ersten NADH-Moleküls zum Cys42-SOH weitergeleitet hat, wird es durch das zweite NADH-Molekül zu FADH₂ reduziert. Durch diese beiden Reaktionsschritte gelingt es der NOX, vier Elektronen kurzzeitig zu speichern und sie für die Reduktion von O₂ bereit zu halten. Wie in der obigen Reaktionsgleichung angedeutet, bleibt das oxidierte Substrat (d.h. NAD⁺) nach Abgabe der Elektronen am Enzym gebunden, während das vorab gebildete NAD⁺ vom Enzym abdissoziierte.

3. Schritt: O₂-Angriff auf das FAD und Bildung des Peroxyflavins



Wie bereits erwähnt, ist das FAD-Bindungsmodul in NOX strukturell ähnlich wie in flavin-abhängigen Monooxygenasen und Halogenasen. Diese strukturelle Ähnlichkeit lässt die Hypothese zu, dass es auch mechanistische Ähnlichkeiten gibt und dass die Erkenntnisse von jenen Enzymen zu einem gewissen Maße auf NOX übertragbar sind. Speziell bei den Monooxygenasen sind viele Details des Reaktionsmechanismus bekannt [196]. Insbesondere ist bei ihnen gesichert, dass – wie bei vielen anderen Oxidasen – intermediär durch den Angriff von O₂ auf FADH₂ ein hochreaktives Peroxyflavin entsteht. Der Sauerstoff bindet dabei an das C4A-Atom des Isoalloxazinsystems, das anschließend einen Peroxy-Substituenten (-O-O-H) trägt. Im Gegensatz dazu bildet sich bei NADH-Peroxidase (NPOX) intermediär kein Peroxyflavin [124, 125].

4. Schritt: Nucleophiler Angriff des Cys42-S[⊖] auf das Peroxyflavin und Abspaltung der zweiten H₂O-Moleküls



Generell gibt es zwei Möglichkeiten für das weitere Schicksal eines zwischenzeitlich entstandenen Peroxyflavinmoleküls: Es kann sich zu FAD stabilisieren, indem es H₂O₂ eliminiert, was in der großen Mehrheit der Oxidasen geschieht. Oder es kann durch einen nucleophilen Angriff auf das terminale O-Atom der Peroxygruppe gespalten werden, was in allen flavin-abhängigen Monooxygenasen und Halogenasen geschieht (Bei Tryptophan-7-Halogenase z.B. ist ein Chloridion das angreifende Nucleophil [198]). Eines der O-Atome wird dann vom Nucleophil abstrahiert, während das andere zunächst am C4A-Atom verbleibt. Es wird schließlich als Wasser eliminiert, wobei wiederum FAD zurückbleibt. Genau dies geschieht aller Wahrscheinlichkeit nach bei der NOX, bei der der Schwefel von Cys42 (möglicherweise nach Deprotonierung durch His10) das angreifende Nucleophil ist. Somit steht NOX in

mechanistischer Hinsicht den flavinabhängigen Monooxygenasen und Halogenasen viel näher als der H_2O_2 -freisetzenden NADH-Oxidase oder auch der NADH-Peroxidase.

Der wichtigste mechanistische Unterschied zwischen NOX und NPOX aus *E. faecalis* liegt also im Schritt 3: H_2O_2 , das NPOX als Oxidationsmittel nutzt, greift im Gegensatz zu O_2 das FADH_2 nicht an, so dass kein Peroxyflavin [124, 125] entsteht. Da in diesem Schritt 3 und dem nachfolgenden Schritt 4 außerdem der Unterschied zwischen H_2O_2 - und H_2O -freisetzender NADH-Oxidase begründet liegt, sollen beide Schritte noch genauer graphisch dargestellt werden (Abb. 83).

Abbildung 83 illustriert zunächst die Bildung von Peroxyflavin durch den Angriff von O_2 auf die C4-Position von FADH_2 . Anschließend findet ein nucleophiler Angriff des Schwefels von Cys42 auf die Peroxygruppe statt. Vermutlich wird in NOX (im Gegensatz zu NPOX) Cys42 durch die Base His10 deprotoniert, so dass $\text{Cys42-S}^\ominus$ das entscheidende Nucleophil ist.

Da $\text{Cys42-S}^\ominus$ ein starkes Nucleophil ist, läuft diese Reaktion gegenüber den anderen Teilreaktionen sehr schnell ab. Die Konsequenz ist, dass das hochreaktive Peroxyflavin nicht durch H_2O_2 -Eliminierung wie in anderen Oxidasen stabilisiert wird, sondern nur durch jenen nucleophilen Angriff von $\text{Cys42-S}^\ominus$. Für diesen Mechanismus spricht, dass eine Cys42Ser-Mutante von NOX aus *E. faecalis* durch die Mutation zu einer „normalen“, d.h. H_2O_2 -produzierenden Oxidase geworden ist [215]. Offensichtlich reicht die Nucleophile des eingebauten Serins nicht aus, um das Peroxyflavin anzugreifen.

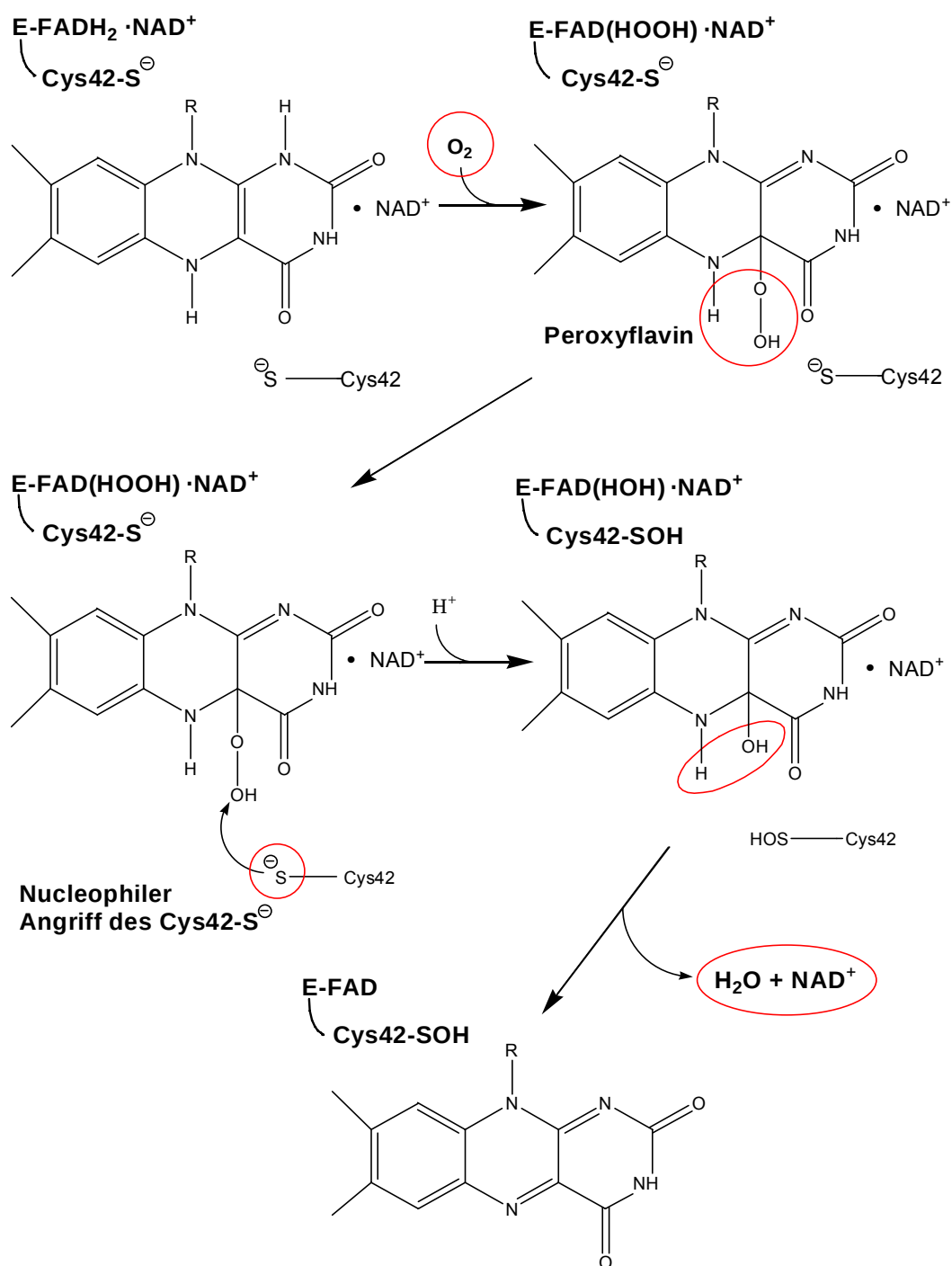


Abb. 83: Bildung des Peroxyflavins durch O₂-Angriff auf das FAD, Nucleophiler Angriff des Cys42-S[−] auf die OH-Gruppe an der C4-Position des FADs und Abspaltung von H₂O zum Ende der Reaktion. Die Aminosäure Cystein42 ist verkürzt als Cys42 gezeichnet, vom FAD ist nur der Isoalloxazinring dargestellt und E steht für das komplette NOX-Enzym.

Die Gesamtreaktion der NOX stellt eine Bisubstratreaktion dar, die zwei Substrate (NADH und O₂) und zwei Produkte (NAD⁺ und H₂O) beinhaltet, wie ca. 60 % aller bekannten biochemischen Reaktionen [216].

Multiple Substratreaktionen lassen sich in zwei Klassen unterteilen: sequentielle Verdrängung und doppelte Verdrängung. Bei der NOX-Reaktion handelt es sich um eine doppelte Verdrängung (Pingpong-Reaktion), da ein oder mehrere Produkte freigesetzt werden, noch

bevor alle Substrate an das Enzym gebunden sind. Die definierende Eigenschaft von Pingpong-Reaktionen ist das Vorhandensein eines substituierten Enzym-Zwischenprodukts, in dem das Enzym zeitweilig modifiziert ist [217, 218, 219]. Klassische Beispiele für den Pingpong-Mechanismus sind die Acetyl-CoA-Carboxylase [220] und die Aspartat-Aminotransferase [216]. In der Cleland-Schreibweise scheinen sich die Substrate analog zu einem Pingpong-Ball, der auf einem Tisch aufspringt, zum Enzym hin und von ihm weg bewegen. Hingegen müssen beim sequentiellen Mechanismus zuerst alle Substrate an das Enzym binden, ehe das Produkt gebildet wird.

Warum NOX keine H_2O_2 -produzierende Oxidase ist, wurde durch die obengenannte Diskussion plausibel erklärt. Es stellt sich aber obendrein die Frage, warum NOX trotz hoher Sequenzidentität zu NPOX aus *E. faecalis* (42,3 %) vermutlich keine NPOX-Aktivität zeigt, warum NOX also kein H_2O_2 anstelle von O_2 als Oxidationsmittel akzeptiert. Umgekehrt ist ebenso rätselhaft, warum NPOX O_2 nicht als Oxidationsmittel nutzen kann. Dieser Unterschied zwischen NOX und NPOX ist umso überraschender, als nicht nur Cys42, sondern auch die unmittelbar benachbarten Aminosäuren in beiden Enzymen identisch sind. Ein systematischer Strukturvergleich zwischen ihnen liefert dennoch mögliche Antworten auf die aufgeworfene Frage:

- Zugang zum aktiven Zentrum: Aufgrund des hydrophoben Tunnels in der NOX wird der Eintritt von O_2 begünstigt, da das Sauerstoff-Molekül membrangängig ist. H_2O_2 dagegen ist deutlich weniger gut membrangängig wie das O_2 und kann somit auch den Tunnelbereich schlechter überwinden. Innerhalb der NPOX ist hingegen im Vergleich zur NOX der Tunnelbereich in stärkerem Ausmaß geladen. Deshalb kann auch H_2O_2 in der NPOX ohne Hindernisse als „Substrat“ akzeptiert werden.
- Reaktivität des Nicht-Flavin-Redoxzentrums (Cys42): Cys42 liegt in NPOX immer protoniert vor und ist in dieser Form reaktiv gegenüber H_2O_2 . In der NOX dagegen wird Cys42 durch His10 zum Thiolat deprotoniert. Dieses Thiolat ist weniger reaktiv gegenüber H_2O_2 , dafür aber ein stärkeres Nukleophil als die protonierte SH-Gruppe und somit besser für den Angriff auf Peroxyflavin geeignet.
Dieser Unterschied zwischen NOX und NPOX im Protonierungszustand von Cys42 geht letzten Endes auf die Umgebung von His10 zurück. In der NOX ist His10 eine Base, wird also selbst zwischenzeitlich durch Abstraktion eines Protons von Cys42 geladen, so dass ein Ionenpaar $\text{His10}^{\text{p}}/\text{Cys42}^{\text{s}}$ entsteht. In NPOX wird die Protonierung von His10 (und somit die Deprotonierung von Cys42) dadurch verhindert, dass His10 in unmittelbarem Kontakt zum positiv geladenen Arg303 steht. Zu diesem Arginin ist in NOX ein Valin (Val301) äquivalent.
- Verfügbarkeit der Oxidationsmittel: Ein Verbrauch von H_2O_2 durch die NOX findet vielleicht auch deshalb nicht statt, weil in der Zelle eine viel höhere O_2 -Konzentration vorliegt und die NOX das als Reduktionsmittel nimmt, was am meisten in der Zelle vorliegt. Damit hätte die NPOX aus *E. faecalis* die besondere Fähigkeit, nur das H_2O_2 als Reduktionsmittel aus dem Milieu herauszugreifen.

Um die Unterschiede im katalytischen Zentrum der NOX und NPOX deutlicher zu sehen, sind die beiden aktiven Zentren mit den oben beschriebenen Residuen überlagernd in Abbildung 84 dargestellt.

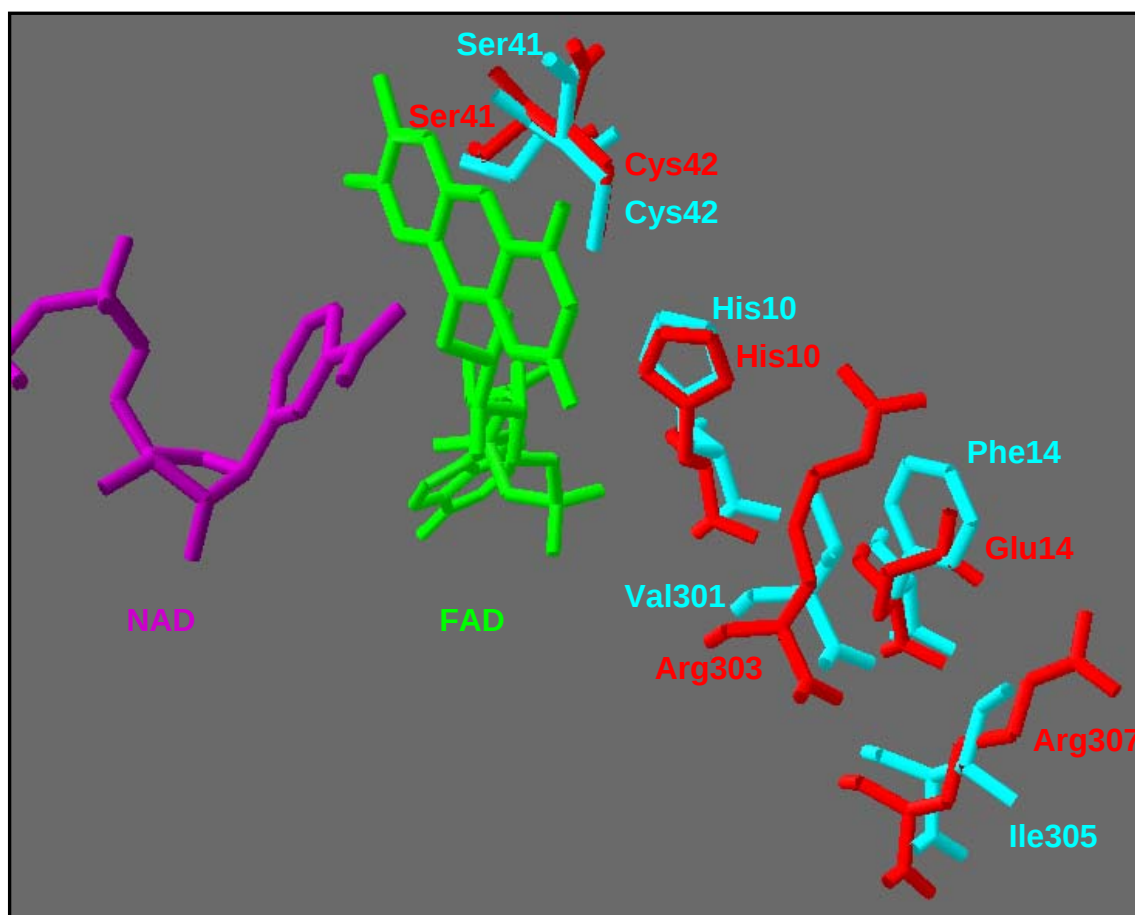


Abb. 84: Aktives Zentrum der NOX und der NPOX: Die Überlagerung der aktiven Zentren der beiden Enzyme verdeutlichen noch mal die hohe Homologie und die unterschiedlichen Residuen des aktiven Zentrums. Das NAD^+ -Molekül (lila) ist nicht komplett abgebildet und das FAD-Molekül ist grün dargestellt. Die Residuen aus dem aktiven Zentrum der NOX sind türkis und die Residuen aus dem aktiven Zentrum der NPOX sind rot dargestellt.

Innerhalb dieser Arbeit wurden erstmals die Struktur und der Reaktionsmechanismus einer H_2O -bildenden NADH-Oxidase gelöst. Außerdem konnten strukturelle und mechanistische Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen NADH-Peroxidasen und zwischen H_2O_2 - und H_2O -bildenden NADH-Oxidasen beschrieben werden.

4 Biotechnologischer Einsatz der NOX

Die oxidative Racemattrennung kann durch simultane Kopplung von NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen mit der NADH-Oxidase aus *L. brevis* durchgeführt werden. Diese Oxidase ist sehr gut für dieses Vorhaben geeignet. Es oxidiert NADH mit einem sehr niedrigen K_M -Wert, welcher mit $18 \mu\text{M}$ bestimmt wurde. Überdies besitzt die NADH-Oxidase noch den Vorteil, dass sie H_2O statt H_2O_2 als Produkt bildet [34, 221]. Beide charakteristischen Merkmale sind wichtig

für die präparative Anwendung, wenn dieses Enzym für die Regeneration von NADH verwendet wird.

Die H₂O-bildenden NADH-Oxidasen wurden in wenigen Fällen zur Regeneration von NAD⁺ angewendet. Durch Klonierung und Überexpression des *nox-2* aus *Streptococcus mutans* (H₂O-bildende NOX) in *Lactococcus lactis* konnte die NADH-Oxidase als Regenerierungsmittel für NAD⁺ zur Produktion von Diacetyl oder Acetoin aus Glucose genutzt werden [54, 55, 56]. Außerdem konnte durch Kopplung der NADH-Oxidase aus *Leuconostoc mesenteroides* (H₂O-Bildner) mit der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase eine stereospezifische Steroid-Oxidation erreicht werden [42]. Doch beide Anwendungen wurden nicht in einen größeren Produktionsmaßstab gebracht.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Anwendungen wurde die Kopplung der NADH-Oxidase mit zwei verschiedenen Aminosäure-Dehydrogenasen und zwei Alkohol-Dehydrogenasen untersucht.

4.1 Kopplung von Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) und NOX

Bei der Verwendung partiell gereinigter ADHs und NOX zur Racematspaltung kann aufgrund der hohen Löslichkeit der Enzyme die Katalysatorkonzentration besser angepasst werden als beim Einsatz ganzer Zellen.

Der oxidative Weg zur Racemattrennung, die durch Kopplung einer (*S*)- oder (*R*)-spezifischen Dehydrogenase mit der NADH-Oxidase zugänglich ist, kann zur Produktion von enantimerenreinen chiralen Alkoholen genutzt werden. Hier wurde die Anwendbarkeit des oxidativen Weges mit zwei unterschiedlichen Enzymen, (*S*)-ADH aus *Rhodococcus erythropolis* und (*R*)-ADH aus *Lactobacillus kefir* demonstriert.

(*R*)-ADH aus *L. kefir* ist fähig, ein breites Spektrum von Ketonen und Ketoestern mit einer hohen Enantioselektivität in ihre jeweiligen Hydroxy-Komponenten zu reduzieren. Die oxidative Rückreaktion wurde dementsprechend mit (*R,S*)-Phenylethanol und (*R,S*)-*p*-Cl-Phenylethanol als Modellschubstanzen durchgeführt. In beiden Fällen wurde die (*R*)-Komponente in kurzer Zeit komplett oxidiert, somit konnte ein *ee*-Wert von 100% erreicht werden. Durch den jeweiligen (*S*)-Alkohol konnte keine Inhibierung beobachtet werden, die Aktivität während der Oxidation von (*R*)-Phenylethanol war identisch in Anwesenheit (10 mM) oder Abwesenheit von (*S*)-Phenylethanol.

Vier racemische Alkohole wurden mit der (*S*)-ADH aus *Rhodococcus erythropolis* stereospezifisch oxidiert, Phenylethanol, *p*-Cl-Phenylethanol, 2-Hexanol und 2-Octanol. Aus allen Racematen wurde die (*S*)-Komponente vollständig oxidiert und (*R*)-Produkte mit 100% *ee* erreicht. Die kinetischen Daten für die Substrate (*S*)-Phenylethanol und (*S*)-2-Octanol sind in Tab. 34 zusammengefasst. Deutlich auffallend ist, dass die (*R*)-Alkohole sowie die Ketone diese ADH stark inhibieren, besonders betroffen sind die *K_M*-Werte.

In Tab. 34 ist eine Übersicht der umgesetzten Substrate mit der ADH aus *R. erythropolis* oder aus *L. kefir* und der NOX dargestellt.

Tab. 34: Übersicht über die Umsetzungen mit der ADH aus *R. erythropolis* oder aus *L. kefir* und der NOX (n. b. = nicht bestimmt).

Enzyme	Substrat	100 % Umsetzung der (S)- (R)- Komponente		Inhibierung durch das Produkt	Inhibierung durch das andere Enantiomer
(S)-ADH aus <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> und NOX	(R,S)- <i>para</i> -Cl- Phenylethanol	+	-	n. b.	n. b.
	(R,S)-1- Phenylethanol	+	-	n. b.	n. b.
	(S)-1- Phenylethanol	+	-	n. b.	Ja
	(R,S)-2-Octanol	+	-	Ja	Ja
	(R,S)-2-Hexanol	+	-	n. b.	n. b.
(R)-ADH aus <i>Lactobacillus</i> <i>kefir</i> und NOX	(R,S)- <i>para</i> -Cl- Phenylethanol	-	+	n. b.	n. b.
	(R,S)-1- Phenylethanol	-	+	n. b.	Nein

Für die Präparation von enantiomerenreinen Alkoholen führt der oxidative Weg trotz der beobachteten Inhibierungen zu 100 % Umsatz und 100 % ee.

Die (S)-ADH aus *R. erythropolis* zeigte eine Abnahme der Aktivität in Anwesenheit von verschiedenen (R)-Alkoholen und des Ketons, aber nach der Oxidationsreaktion wurden dennoch ee-Werte > 99 % erzielt.

4.2 Kopplung von Aminosäure-Dehydrogenasen (AADHs) und NOX

D-Aminosäuren können aus dem jeweiligen Racemat durch Kopplung einer NAD⁺- abhängigen L-spezifischen Aminosäure-Dehydrogenase mit der NADH-Oxidase, welches das NAD⁺ regeneriert, präpariert werden. Die Verwendung von Aminosäure-Dehydrogenasen für die oxidative Anwendung ist nur möglich, wenn eine höchst effiziente Methode zur NAD⁺-Regeneration verfügbar ist, weil diese Richtung durch die Lage des Reaktionsgleichgewichts weniger begünstigt ist.

Glutamat-Dehydrogenasen sind verfügbar aus verschiedenen pro- und eukaryotischen Quellen. Die Substrat-Spezifität ist gewöhnlich begrenzt auf das natürliche Substrat L-Glutamat. Wir verwendeten ein kommerziell erhältliches Enzym aus Rinderleber, um deren Anwendbarkeit für die Oxidation von L-Glutamat aus dem Racemat zu demonstrieren. Eine komplette Oxidation von L-Glutamat mit einem ee-Wert von 100 % wurde erreicht, obwohl die GluDH-Aktivität sowohl durch 5 mM D-Glutamat, als auch durch 3 mM Ketoglutarat stark inhibiert wurde.

Auffallend ist, dass die Inhibierung den K_M -Wert nicht beeinflusst, was für eine nicht-kompetitive Hemmung spricht.

Hohe Enzymaktivitäten für Leucin-Dehydrogenasen (LeuDHs) wurden in mehreren *Bacillus*-Stämmen gefunden. LeuDHs aus verschiedenen bakteriellen Quellen zeigen ähnliche biochemische und enzymatische Eigenschaften. Mehrere aliphatische Aminosäuren wurden bisher durch reduktive Aminierung mit diesen Enzymen präpariert, das bekannteste Beispiel ist L-*tert*-Leucin, das von der Fa. Degussa jährlich im Tonnen-Maßstab nach diesem Verfahren hergestellt wird. Wir verwendeten das rekombinante Enzym aus *B. cereus* zur Studie ihrer Anwendbarkeit für die Präparation von D-Aminosäuren. L-Leucin ist das beste Substrat für die oxidative Deaminierung, gefolgt von L-Valin (61 % Aktivität im Vergleich zu L-Leucin), L-Isoleucin (61 %), L-Norvalin (28 %) und L-Aminobuttersäure (24 %) [222]. Der oxidative Abbau von L-Leucin aus dem Racemat durch die LeuDH aus *B. cereus* führte zu einem ee-Wert von 95,5 % für D-Leucin. Die komplette Oxidation konnte nicht erreicht werden, wahrscheinlich wegen der Inhibierung durch die verbleibende D-Aminosäure. Die kinetischen Daten für die oxidative Deaminierung von L-Leucin in Anwesenheit der D-Komponente zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit stark durch D-Leucin verringert wurde.

Außerdem wurde eine oxidative Umsetzung von L-*tert*-Leucin aus dem Racemat DL-*tert*-Leucin (10 mM) durchgeführt. Beginnend mit 0,25 U/ml LeuDH und mit einem Überschuss an NADH-Oxidase (4,2 U/ml) wurde die Racematspaltung nach 5 h beendet. Es wurde ein ausgezeichneter Enantiomerenüberschuss von > 99 % durch die oxidative Umsetzung aus dem Racematgemisch von DL-*tert*-Leucin erreicht.

Basierend auf der linearen Abnahmerate des L-*tert*-Leucins innerhalb der ersten 30 Minuten wurde eine Reaktionsrate von 0,12 μmol pro Minute beobachtet, die einer Aktivität von 0,12 U/ml entspricht.

Anhand der Kinetikmessungen für die LeuDH mit verschiedenen Enantiomeren von *tert*-Leucin als Substrat wurde deutlich, dass die LeuDH einen viel geringeren K_M -Wert für L-*tert*-Leucin besitzt als für DL-*tert*-Leucin. Für DL-*tert*-Leucin ist der K_M -Wert ($K_M = 16,6 \text{ mM}$) fast doppelt so groß wie für L-*tert*-Leucin ($K_M = 8,9 \text{ mM}$). Durch Erhöhung der D-*tert*-Leucin-Konzentration im Verhältnis zum eigentlichen Substrat L-*tert*-Leucin wurde eine immer stärker werdende Inhibierung der LeuDH-Aktivität beobachtet, während sich die K_M -Werte nicht verändern. Diese Art der Inhibierung spricht für eine nicht-kompetitive Hemmung.

Die Tab. 35 gibt eine Übersicht über die Umsetzungen mit den AADHs und der NOX.

Tab. 35: Übersicht über die Umsetzungen mit den AADHs und der NOX (n. b. = nicht bestimmt).

Enzymsystem	Substrat	Umsetzung von L-AS (%)	Inhibierung durch das Produkt	Inhibierung durch das andere Enantiomer
GluDH aus Rinderleber und NOX aus <i>L. brevis</i>	10 mM DL-Glutamat	100	Ja	Ja
LeuDH aus <i>B. cereus</i> und NOX aus <i>L. brevis</i>	10 mM DL-Leucin	95,5	n. b.	Ja
	10 mM DL- <i>tert</i> -Leucin	99,3	n. b.	Ja
Rohextrakt: LeuDH und NOX	10 mM DL-Leucin	91,9	n. b.	Ja
Ganzzellbiotransformation (LeuDH und NOX)	10 mM DL-Leucin	96,6	n. b.	Ja

4.3 Ganzzellbiotransformation

Aufgrund der Vorteile von Ganzzellumsetzung wurden BL21(DE3)/pDleunox-Zellen zur Racemattrennung von DL-Leucin eingesetzt. Nach einigen Vorversuchen wurden optimierte Reaktionsbedingungen festgestellt, bei denen eine oxidative Umsetzung von L-Leucin aus dem racemischen Gemisch DL-Leucin bis zu einem Enantiomerenüberschuss von 96,6 % für D-Leucin erzielt wurde (Tab. 35). Im Vergleich zur Umsetzung von L-Leucin aus dem Racemat durch die löslichen Enzyme LeuDH und NOX (ee -Wert = 95,5 %) wurde mit der Ganzzellumsetzung sogar ein höherer ee -Wert für D-Leucin erreicht. Der Vorteil der Ganzzellbiotransformation, wie der geringe Arbeitsaufwand, da kein Enzym präpariert werden muss, kann zur Umsetzung von L-Leucin aus dem Racemat ausgenutzt werden. Generell schien eine Erhöhung der Zellmenge und die Zugabe von NAD^+ die Reaktionsgeschwindigkeit zu beschleunigen. Der bevorzugte Puffer war Tris/HCl pH 8,0.

5 Heterologe Expression der TvDAAO und ApDAAO

Das *tvdaao*-Gen aus der Hefe *Trigonopsis variabilis* wurde in einen *E. coli*-Expressionsvektor (pEtvdaao basiert auf pET21a) und das *hplI*-Gen in den neu erstellten pEtvdaao-Vektor kloniert. Auch das neue bakterielle *apdaao*-Gen aus *Arthrobacter protophormiae* wurde in den Expressionsvektor pET21a (pEapdaao) kloniert. Anschließend wurden diese in den *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstamm transformiert. Die Tab. 22 zeigt, dass spezifische Aktivitäten für die TvDAAO von bis zu 11 U/mg und für die Katalase (HPII) von 50 U/mg im Rohextrakt unter optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden. Die erreichten spezifischen TvDAAO-

Aktivitäten liegen ca. 16-mal höher als die publizierten Werte von max. 0,7 U/mg [114] und zeigen, dass insgesamt ein sehr hohes Expressionsniveau mit einer Aktivität von 10 - 11 U/mg im Rohextrakt erreicht wurde. Bei einer spezifischen Aktivität des homogenen Enzyms von ca. 21,7 U/mg bedeutet dies, dass ca. 51% des löslichen intrazellulären Proteins als TvDAAO-Enzym vorliegen [223].

Für die bakterielle ApDAAO wurde eine spezifische Aktivität von 30 U/mg im Rohextrakt schon im ersten Klonierungsansatz erreicht. Somit liegt die spezifische Aktivität der ApDAAO dreimal höher als für die TvDAAO aus dieser Arbeit und 42-mal höher im Vergleich zu publizierten Daten für die TvDAAO [114]. Im Vergleich mit D-AAOs aus anderen Eukaryoten (spez. Aktivitäten von 0,7 - 8,8 U/mg) [114, 88, 113, 116, 117, 118] ist auch festzustellen, dass die ermittelte spezifische Aktivität in dem Rohextrakt außerordentlich hoch ist. Somit überschreitet die spezifische Aktivität der ApDAAO im Rohextrakt aus rekombinanten Zellen die publizierten Aktivitätsdaten aller bekannter DAAOs bemerkenswert [224].

Der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Apo- bzw. Holoenzymbildung der TvDAAO aus BL21(DE3)/pEtvdaao und ApDAAO aus BL21(DE3)/pEapdaao wurden untersucht. Dabei wurden die Induktionstemperatur und die IPTG-Konzentration während der heterologen Expression variiert. Wie vorab schon für die NOX beschrieben wurde die Veränderung der D-AAO-Aktivität in den einzelnen Rohextrakten durch Zugabe von FAD untersucht, um das Verhältnis von Apo- zu Holoenzym abzuschätzen. Die TvDAAO-Aktivität konnte bei einer Induktionstemperatur von 37°C durch Zugabe von FAD in den Assay verdoppelt und bei einer Induktionstemperatur von 30°C sogar auf das dreifache gesteigert werden. Das bedeutet, dass die FAD-Biosynthese (wie auch bei der NOX) bei 37°C am besten abläuft und somit optimal zur Bildung von Holoenzym geeignet ist. Hingegen konnte die ApDAAO-Aktivität durch Zugabe von FAD in den Assay nicht gesteigert werden. Offensichtlich wurde die ApDAAO komplett als Holoenzym mit einer sehr kleinen Dissoziationskonstante für FAD exprimiert. Möglich ist aber auch, dass die ApDAAO partiell als Apoenzym exprimiert wurde, aber kein von außen zugesetztes FAD binden kann. Dieses Verhalten unterscheidet dieses Enzym von anderen D-AAOs, die in *E. coli* exprimiert wurden. Neben der TvDAAO, die bis zu 33 % als Apoenzym vorliegt (s. a. oben) [114], wird zum Beispiel mehr als 62 % der D-AAO aus *Rhodotorula gracilis* als Apoenzym in *E. coli* exprimiert [225].

Neben der FAD-Abhängigkeit im Assay wurde auch der Einfluss von FAD und Riboflavin im Medium auf die Bildung von TvDAAO/ApDAAO-Holo- und Apoenzym untersucht. Die Aktivitätsmessungen zeigten, dass ein Zusatz von FAD und Riboflavin zum Medium keinen Einfluss auf die Bildung von TvDAAO/ApDAAO-Holo- oder Apoenzym hat.

Größere Mengen an ApDAAO können problemlos durch Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* BL21(DE3) mit pEapdaao erreicht werden, in dieser Arbeit wurden 153.000 U/L Fermentationsbrühe gewonnen. Dieser Wert ist weit höher als alle Aktivitäten, die für die Expression von rekombinanter oder Wildtyp DAAOs publiziert wurden [224].

6 Reinigung und biochemische Charaktisierung der ApDAAO

Die rekombinante ApDAAO (BL21(DE3)-Zellen mit pEapdaao) ließ sich in nur zwei Chromatographieschritten mit einer guten Ausbeute von 56 % bis zur Homogenität aufreinigen. Die homogene ApDAAO zeigte dabei eine spezifische Aktivität von 180 U/mg.

Aufgrund der weiten Verbreitung der DAAOs in Eukaryoten und aufgrund der Einsatzmöglichkeit in der Biotechnologie sind in der Literatur für eine Reihe von Enzymen Daten zur Präparation zu finden. Die zur Reinigung am häufigsten verwendeten Techniken sind Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration [117, 88, 226, 227, 228]. Bis auf ein Reinigungsprotokoll, bei der eine His-„getagte“ D-AAO durch einen Aufreinigungsschritt aufgereinigt wurde, waren bei sämtlichen Protokollen mindestens 3 Chromatographieschritte für die Reinigung der D-AAOs nötig. Ein- oder zweistufige Protokolle zur Aufreinigung einer D-AAO mit konventionellen Aufreinigungsmethoden wurde bisher noch nicht beschrieben.

Die D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* machte bis zu 17 % des löslichen Gesamtproteins aus. Der Cofaktor FAD blieb während aller Chromatographieschritte fest am Enzym gebunden. Die Aktivität der ApDAAO ließ sich zu keinem Zeitpunkt der Aufreinigung durch FAD-Zugabe steigern. Hingegen die eukaryotischen D-AAOs aus *Rhodotorula gracilis* [229] und *Trigonopsis variabilis* (s. oben) zeigen dieses Phänomen der Reaktivierung durch FAD-Zusatz nicht. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die ApDAAO durch Inkubation in 3 M Kaliumbromid in ihre Apoform überführt wurde. Das FAD lag somit nicht kovalent gebunden vor, wie es bei vielen anderen Oxidasen der Fall ist [205, 230, 231, 232].

Die ApDAAO liegt als Dimer vor. Das Molekulargewicht von 69 kDa nach MALDI/TOF-MS und nach der Berechnung aus den Sequenzdaten ist vergleichbar mit den Molekulargewichten von bisher beschriebenen D-AAOs aus Pilzen und Schweineniere. Diese Enzyme liegen als Homodimer mit einer Größe von 79-90 kDa vor [233, 234, 235] und weisen hohe Homologien auf. Zum einen zeigen alle D-AAOs das hochkonservierte Dinucleotid-Bindungsmotiv (DBM) auf, zum anderen besitzen sie alle ein zweites, charakteristisches Sequenzmotiv, das ca. 280 Aminosäuren strangabwärts des DBM liegt (Abb. 75). Aufgrund dieser Sequenzmotive werden die H₂O₂-bildenden D-AAOs nach der PFAM-HMM-Datenbank zu den flavinhaltigen Oxidoreduktasen klassifiziert.

Die Lagerstabilität und die Temperaturstabilität der ApDAAO wurden stark vom Zustand des Proteins beeinflusst. Die Halbwertszeit der freien ApDAAO lag bei ca. 4 Tagen bei 4°C und bei 4 Stunden bei 30°C. Durch Immobilisierung der ApDAAO an Eupergit wurde die Halbwertszeit sowohl bei 4°C als auch bei 30°C stark verbessert. Aufgrund der Verbesserung der Stabilität der ApDAAO kann dieses Enzym in dieser Form als Katalysator für industrielle Synthesen eingesetzt werden.

Die rekombinante ApDAAO hat einen K_M-Wert von 1,07 µM für D-Methionin, 5,41 µM für D-Phenylalanin und 9,33 µM für D-DOPA. Alle L-Enantiomere zeigen einen inhibitorischen Effekt auf K_M und V_{max}, diese Art der Hemmung spricht für einen gemischten Mechanismus. Neben dem inhibitorischen Einfluss der L-Enantiomere wurde auch eine starke Inhibierung der ApDAAO durch Zimtsäure (Phenylalanin-Analogon) und Anthranilsäure (Inhibitor für DAAOs) beobachtet. Das pH-Optimum lag für die beiden Substrate D-Methionin und D-Phenylalanin im schwach basischen Bereich zwischen pH 7,5 - 8,5, wie bei der ApDAAO aus dem Wildtypstamm (*A. protophormiae*) [236].

Trotz dieser vergleichbaren Proteineigenschaften unterscheidet sich die D-AAO aus *Arthrobacter protophormiae* in ihrem Substratspektrum von vielen literaturbekannten Enzymen, da sie einige aliphatische Substrate wie D-Valin und D-Alanin gar nicht umsetzt, dagegen basische D-Aminosäuren wie D-Arginin und D-Lysin offensichtlich gut oxidieren kann [236]. Gerade die letzte Beobachtung steht im Kontrast zu den Substratspektren der D-AAOs aus

Rhodotorula gracilis [84], Schweineniere und *Fusarium oxysporum* [86], da diese Enzyme mit basischen D-Aminosäuren gar nicht oder nur sehr langsam reagieren.

7 Strukturaufklärung der ApDAAO

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie (Programm Yang) konnten, trotz der ungenauen Methoden zur Proteinbestimmung, die α -helikalen und β -Faltblatt Sekundärstrukturanteile aus den Resultaten der Modellstruktur (26 % α -Helices und 28 % β -Faltblätter) gut reproduziert werden.

Da bisher drei Kristallstrukturen von D-AAOs gelöst wurden, und zwar die D-AAO aus Schweineniere [134, 135], *Fusarium solani* [88] und *Rhodotorula gracilis* [136], konnte ohne weiteres das Strukturmodell der ApDAAO erstellt werden. Die höchste Homologie mit 32 % zeigte die ApDAAO mit der D-AAO aus *Rhodotorula gracilis*. Mit der D-AAO aus Schweineniere wurde eine Sequenzidentität von 30 % und mit der D-AAO aus *Fusarium solani* eine Sequenzidentität von ca. 28 % bestimmt. Als Templat für das ApDAAO-Strukturmodell wurde die Struktur der Schweineniere-D-AAO, erstellt mit dem Modellierungsprogramm SWISS-MODELL, ausgewählt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität kann von einer ähnlichen Faltung der beiden Proteine ausgegangen werden, da funktions- und strukturbestimmende Sequenz- und damit auch Strukturbereiche konserviert sind. So sind z.B. die Reste des aktiven Zentrums oder der Dinucleotid-Bindungsstelle stark konserviert. Das FAD und der Inhibitor Aminobenzoat aus der Struktur der Schweineniere-D-AAO konnte unverändert in das Modell der ApDAAO integriert werden. In Abb. 76 ist die Templat-Struktur der D-AAO aus Schweineniere und das Strukturmodell der D-AAO aus *A. protophormiae* dargestellt.

Da zwischen den Primärstrukturen des Zielproteins und des Templats eine hohe Homologie zu finden ist, konnte außerdem auch eine Vorhersage über das aktive Zentrum der bakteriellen DAAO aus *A. protophormiae* gemacht werden. Nach Mattevi et al. [134, 137, 135] bilden die Aminosäuren Ala49, Leu51, Tyr224, Tyr228, Arg283, Gly313 und das FAD das katalytische Zentrum der Schweineniere-D-AAO. Ein Vergleich dieser Aminosäuren mit dem Strukturmodell der ApDAAO zeigte, dass bis auf zwei Aminosäuren (Leu51, Tyr224) alle anderen Aminosäuren identisch sind. Statt Leu51 ist in dem Strukturmodell der ApDAAO eine sehr ähnliche Aminosäure Ile50 und statt Tyr224 (AS mit aromatischer Seitenkette) liegt eine saure Aminosäure Asp215 vor.

Da sich die katalytisch essentiellen Aminosäuren auch in dem Strukturmodell der ApDAAO befinden, kann davon ausgegangen, dass die Oxidationsreaktion wie bei der eukaryotischen D-AAO aus Schweineniere über einen Hydridtransfer vom C α -Kohlenstoff des Substrates auf den N5-Stickstoff des Isoalloxazinteils des FAD erfolgt [134, 137, 135]. Ein genauer Vergleich der aktiven Zentren der D-AAO aus Schweineniere und der ApDAAO ist in Abb. 77 dargestellt.

8 Biotechnologischer Einsatz der TvDAAO und ApDAAO

Durch die erfolgreiche heterologe Expression und der guten Verfügbarkeit der D-AAO aus *Trigonopsis variabilis* und *Arthrobacter protophormiae* wurde ein alternativer Weg zur Synthese von L-Aminosäuren und Ketosäuren eröffnet. D-AAOs sind aufgrund ihrer Gleichgewichtslage, die die Bildung der Oxidationsprodukte unterstützt, sowohl für die Racematspaltung als auch für

die direkte Desaminierung von D-Aminosäuren zu Ketosäuren sehr gut geeignet. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass in diesen Prozessen nur maximal zwei Enzyme erforderlich sind, die D-AAO und bei oxidationsempfindlichen Substraten und Produkten auch Katalase.

Für die präparative Anwendung der TvDAAO wurden zwei verschiedene Enzympräparationen untersucht, freies Enzym und rekombinante ganze Zellen (BL21(DE3)-Zellen mit pEtvdaao oder pEtvdaao/hplI), beide wurden vergleichend in batch-Verfahren eingesetzt.

In allen Ansätzen konnte ein ee-Wert von $\geq 99,6$ % mit und ohne Katalase bzw. Toluol zur Permeabilisierung der Zellmembran erzielt werden. Weder Katalase noch der Zusatz von Toluol zeigten einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der oxidativen Reaktion. Trotz der unterschiedlichen TvDAAO-Präparationen zeigten sich keine Qualitätsunterschiede.

Der Anwendungsbereich der ApDAAO entspricht prinzipiell dem der TvDAAO. Unterschiede ergeben sich im wesentlichen aus den unterschiedlichen Substratspektren beider Enzyme [223, 236]. Da die hervorragenden ee-Werte (1ml-Maßstab) mit der TvDAAO auch nach kurzer Zeit mit der ApDAAO erreicht wurden, wurde die Racematspaltung mit der ApDAAO im größeren Maßstab von 10 ml durchgeführt. Dabei wurde freie ApDAAO im batch (ohne Katalase) oder repetitive-batch Verfahren (mit Katalase) eingesetzt und strukturell unterschiedliche Substrate, aliphatisches D-Methionin und aromatisches D-DOPA, verwendet.

Im batch Verfahren ohne Katalase wurde ein ee-Wert von ≥ 95 % für D-Methionin und ca. 75 % für D-DOPA erreicht. Deutlich bessere Werte wurden in den repetitive-batch-Versuchen mit Katalase erreicht, im ersten batch wurde ein ee-Wert von $\geq 99,9$ % für L-Methionin erreicht bei Verwendung von DL-Methionin als Substrat und $\geq 99,2$ % für die L-Komponente bei der Trennung von DL-DOPA. Wird dagegen nur D-DOPA durch die ApDAAO oxidiert, häuft sich das Primär-Produkt Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP) soweit an, dass durch die starke Inhibierung des DHPP nur eine unvollständige Umsetzung von DL-DOPA erfolgt (s. a. Inhibitionsstudien Abschnitt 3.3.3).

Beim Vergleich zwischen batch-Versuchen ohne Katalase und repetitive-batch-Versuchen mit Katalase wird deutlich, dass in den Ansätzen mit Katalase höhere ee-Werte erreicht wurden. Das bedeutet, dass das gebildete H_2O_2 während der Oxidation der D-Aminosäure anscheinend auch einen inhibierenden Einfluss auf die ApDAAO hat. Dieser inhibierende Einfluss des H_2O_2 auf die ApDAAO konnte aber durch Immobilisierung der ApDAAO auf Eupergit C 250L fast vollständig aufgehoben werden.

Die Tab. 36 gibt eine Übersicht über die Umsetzungen mit der TvDAAO und ApDAAO.

Tab. 36: Übersicht über die Umsetzungen mit der TvDAAO und ApDAAO (n. b. = nicht bestimmt).

Enzympräparation	Substrat	ee (%)	Inhibierung durch das Produkt	Inhibierung durch das L-Enantiomer
Freie TvDAAO (batch)	10 mM DL-Methionin	> 99	n. b.	Ja
	10 mM DL-Phenylalanin	> 99	n. b.	Ja
BL21(DE3)/pEtvdAAO-Zellen (batch)	10 mM DL-Methionin	> 99	n. b.	Ja
BL21(DE3)/pEtvdAAO/hpII-Zellen (batch)		> 99	n. b.	Ja
Freie ApDAAO (batch ohne Katalase)	10 mM DL-Methionin	> 95	n. b.	Ja
	10 mM DL-DOPA	> 75	Ja	Nein
Freie ApDAAO (rep. batch mit Katalase)	10 mM DL-Methionin	> 99	n. b.	Ja
	10 mM DL-DOPA	> 99	Ja	Nein

9 Heterologe Expression der RoLAAO

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* ist die erste H₂O₂-bildende L-AAO, die aktiv in *E. coli* exprimiert wurde. Bisher konnte die RoLAAO nur in dem Bakterium *Streptomyces lividans* heterolog exprimiert werden. Doch aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit sowohl in Schüttelkolben als auch im Fermenter, die auch geringe spezifische Aktivitäten mit sich brachten und der sehr schlechten Konservierbarkeit des rekombinanten *Streptomyces lividans* konnte dieser Stamm für weiterführende Arbeiten nicht stabil aufbewahrt und genutzt werden. Trotz der Kenntnis einer relativ hohen Anzahl anderer L-AAO-Sequenzen aus verschiedenen Eukaryoten wurden bisher erst drei dieser Enzyme heterolog in Zellkultur exprimiert, die L-AAOs aus dem Giftsekret von *Crotalus atrox*, aus Mäusmilch und aus dem Fisch *Scomber japonicus* [70, 107, 108]. Viele der eukaryotischen L-AAOs sind glykosyliert [62, 237, 106, 108, 111, 238]. Aus diesem Grund sind prokaryotische Systeme für die Expression dieser Proteine grundsätzlich problematisch, falls die Glycosylierung Einfluss auf biochemische Eigenschaften des Enzyms hat.

Zur heterologen Expression prokaryotischer L-AAOs existieren, bis auf die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* bislang noch keine Angaben.

Das *rolaao*-Gen wurde mit und ohne eigener Signalsequenz aus *R. opacus* in drei *E. coli*-Expressionsvektoren (pKrolaao, pJrolaao und pE1laao) kloniert und in verschiedene *E. coli*-

Stämme transformiert. Die Tab. 33 zeigt, dass spezifische Aktivitäten im Bereich von 230 - 450 mU/mg im Rohextrakt unter optimierten Induktionsbedingungen erreicht wurden. Bei genauer Betrachtung der unlöslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE wurde in allen drei rekombinanten Expressionsstämmen mit eigener Signalsequenz aus *R. opacus* die Bildung großer Mengen an Inclusion Bodies beobachtet, während der rekombinante Expressionsstamm ohne Signalsequenz (JM105/pK2rolaao) keine Bildung von Inclusion Bodies zeigte.

In weiteren Versuchen wurde das *rolaao*-Gen mit der torA TAT- (Twin-Arginine Translocation) Signalsequenz aus *E. coli* K12 in zwei *E. coli*-Expressionsvektoren (pE2laao und pE3laao) kloniert. Diese Expressionsvektoren wurden in spezielle *E. coli*-Stämme (Rosetta- und CodonPlus-Stämme), die zusätzlich seltene tRNAs exprimieren, transformiert. Das ist immer dann vorteilhaft, wenn das zu klonierende Gen einen hohen G+C-Gehalt zeigt und dadurch bedingt auch viele für *E. coli* seltenen Codons enthält. Das trifft auch für das *rolaao*-Gen zu, es besteht zu 66 % aus den Basen Guanin (G) und Cytosin (C). Jeder Organismus exprimiert nur die tRNAs, die für die eigene Proteinbiosynthese notwendig sind. Da in *E. coli* die Basen Guanin und Cytosin nur zu 44 % vertreten sind, fehlen anscheinend tRNAs zur heterologen Expression von GC-reichen Genen. Um auch das GC-reiche *rolaao*-Gen aus *R. opacus* in *E. coli* gut exprimieren zu können, wurden diese speziellen *E. coli*-Stämme, die zusätzlich seltene tRNAs exprimieren, zur Expression der RoLAAO verwendet. Dabei wurde die Codon Usage der verschiedenen Expressionsstämmen so angepasst, dass eine optimale Expression von GC-reichen Genen auch in *E. coli* möglich ist. In der Tab. 37 ist ein Überblick über die zusätzlichen Basentriplets der *E. coli*-Stämme, die für seltene tRNAs codieren und deren Verteilung im *rolaao*-Gen gezeigt.

Tab. 37: Übersicht über die zusätzlichen Basentriplets der *E. coli*-Stämme, codierend für seltene tRNAs und deren Verteilung im *rolaao*-Gen. Die Basentriplets AUA und CUA, welche auch seltene tRNAs in den unten aufgeführten *E. coli*-Stämmen codieren, sind in der *laao*-Gen nicht vorhanden, deshalb wurden diese nicht gezeigt.

<i>E. coli</i> -Stamm	AGG Arg	AGA Arg	CCC Pro	GGA Gly	CGG Arg
Rosetta(DE3)	x	x	x	x	
Rosetta 2 (DE3)pLacI	x	x	x	x	x
BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	x	x			
BL21-Codon Plus (DE3)-RP	x	x	x		
Gehalt im <i>rolaao</i> -Gen (%)	0,2 (= 3 bp)	0,2 (= 3 bp)	1,3 (= 18 bp)	1,3 (= 18 bp)	1,5 (= 24 bp)

Unter optimierten Induktionsbedingungen wurde spezifische Aktivitäten im Bereich von 260 - 1100 mU/mg im Rohextrakt erreicht (Tab. 33). Auffällig ist, dass der *E. coli*-Stamm (Rosetta 2 (DE3)pLacI) mit pE3laao, der auch die meisten tRNAs codiert, die höchste spezifische Aktivität mit 1100 mU/mg zeigt. Bei genauer Betrachtung sieht man, dass der *E. coli*-Stamm Rosetta 2 (DE3)pLacI gegenüber dem Rosetta(DE3)-Stamm nur eine tRNA mehr exprimiert. Offensichtlich zeigt gerade das Basentriplett CGG, das mit einem Gehalt von 1,5 % im *rolaao*-Gen vorkommt, eine erhebliche Verbesserung der RoLAAO-Expression. Die spezifische Aktivität wurde um das 3-fache von ca. 360 auf 1100 mU/mg gesteigert. Die höchste spezifische Aktivität mit 1100 mU/mg im Rohextrakt liegt 6-mal höher als diejenige, die in *Streptomyces lividans* erreicht wurde und 34-mal höher als im *Rhodococcus opacus* Wildtyp (32 mU/mg) (Tab. 38) [109] [33]. Die rekombinante RoLAAO machte bis zu 20 % des löslichen Gesamtproteins aus (100 % entsprechen 5,4 U/mg der homogenen RoLAAO).

Im Vergleich zu den rekombinanten Expressionsstämmen mit der eigenen Signalsequenz aus *R. opacus* wurden in den Rosetta- und Codon Plus-Stämmen mit der *torA*-Signalsequenz aus *E. coli* keine Bildung von Inclusion Bodies beobachtet, wie bei dem rekombinanten Expressionsstamm JM105/pK2rolaao ohne Signalsequenz. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass zur Expression aktiver RoLAAO eine Signalsequenz nicht unbedingt erforderlich ist. Doch da die höchsten RoLAAO-Aktivitäten mit der *torA*-Signalsequenz aus *E. coli* K12 in dem Rosetta-Stamm erzielt wurden, kann angenommen werden, dass eine weitere Optimierung der Expression nur über eine gute Signalsequenz und zum anderen nur über ein optimiertes *rolaao*-Gen möglich ist. Anscheinend wird die *torA*-Signalsequenz gegenüber der Signalsequenz aus *R. opacus* durch das *E. coli* TAT-System besser erkannt. Die Twin-Arginine Signalsequenzen aus anderen Organismen können offensichtlich nicht problemlos vom *E. coli* TAT-Systemen erkannt werden [239].

Da aus den Klonierungsarbeiten ein leistungsstarker rekombinanter *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta 2 (DE3)pLacI/pE3laao zur Bildung von L-AAO entwickelt wurde, wurde dieser *E. coli*-Stamm auch für die fermentative Gewinnung größerer Enzymmengen durch Hochzelldichte-Fermentation geprüft, es zeigte sich, dass der Stamm dabei genetisch stabil geblieben ist und sehr hohe Enzymmengen lieferte. Die letztendlich aus der Fermentation erhaltenen Enzymausbeuten entscheiden, ob ein solcher Expressionsstamm weiterentwickelt und auch biotechnologisch eingesetzt werden kann. Aus einer 15 L-Fermentation wurden insgesamt ca. 50000 Units RoLAAO erzielt. Dabei wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von über $85 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erzielt. Wie in Tab. 38 zu sehen ist, liegt dieser Wert für die Raum-Zeit-Ausbeute mehr als 170-mal höher als für den *Rhodococcus opacus* Wildtyp ($0,5 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) oder auch für den rekombinanten *Streptomyces lividans* ($0,5 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Schon anhand der außerordentlichen Enzymausbeute im Hochzelldichte-Fermenter von 50000 und der Raum-Zeit-Ausbeute von über $85 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ kann entnommen werden, dass der in dieser Arbeit entwickelte rekombinante *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta 2 (DE3)pLacI/pE3laao zur Bildung von L-AAO sehr leistungsstark ist.

Tab. 38: Vergleich der RoLAAO-Expressionsausbeuten in *Rhodococcus opacus*, *Streptomyces lividans* (p_{llao}+) und *Escherichia coli* (pE3_{llao}) (ZFM = Zellfeuchtmasse, Akt./Vol. = volumetrische Aktivitätsausbeute, RZA = Raum-Zeit-Ausbeute).

	<i>Rhodococcus opacus</i> (Wildtyp) [236]		<i>Streptomyces lividans</i> (p _{llao} +) [236]		<i>Escherichia coli</i> (pE3 _{llao})	
	Schüttel -kolben	Fermenter	Schüttel -kolben	Fermenter	Schüttel -kolben	Fermenter
Max. spez. Akt. im Rohextrakt [mU·mg ⁻¹]	32	20-70	180	40	1100	400
Dauer [h]	48	24	33	35	5	39,6
ZFM [g·l ⁻¹]	34	15	15	30	15	153
Akt./ZFM [U·g ⁻¹]	2,8	0,8	3	0,6	26	22
Akt./Vol. [U·l ⁻¹]	95	12	45	18	390	3370
RZA [U·l ⁻¹ ·h ⁻¹]	2	0,5	1,4	0,5	78	85

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit das erste *E. coli*-Expressionssystem für eine L-AAO etabliert werden. Durch weitere Optimierung der heterologen Expression kann in Zukunft die Verfügbarkeit des Enzyms für technische Anwendungen verbessert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt besteht aber schon die Möglichkeit, das komplette *rolaao*-Gen auf die Codon Usage von *E. coli* zu optimieren, die eine viel bessere Expression der RoLAAO ermöglicht. Außerdem könnten Mutationen in das *rolaao*-Gen eingeführt werden, die eine Erweiterung des Substratspektrums, eine Optimierung der biochemischen Eigenschaften oder die Aufklärung des Reaktionsmechanismus ermöglichen.

10 Biotechnologischer Einsatz der RoLAAO

Die umfangreichen molekularbiologischen Arbeiten zur heterologen Expression der neuen RoLAAO wurden durchgeführt, um alternative Wege zur Synthese von D-Aminosäuren und Ketosäuren zu eröffnen. L-AAOs sind aufgrund ihrer Gleichgewichtslage, die die Bildung der Oxidationsprodukte unterstützt, sowohl für die Racemattrennung als auch für die direkte Desaminierung von L-Aminosäuren zu Ketosäuren sehr gut geeignet. Als weiterer Vorteil ist zu erwähnen, dass in diesen Prozessen nur maximal zwei Enzyme erforderlich sind, die L-AAO und bei Oxidationsempfindlichen Substraten und Produkten auch Katalase. Möglicherweise können die umfangreichen verfahrenstechnischen und kinetischen Erkenntnisse über die D-AAOs gut auf die L-AAOs übertragen werden und so eine Prozessentwicklung erleichtern [28].

Die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* verspricht aufgrund der hohen Affinität für eine hohe Anzahl an L-Aminosäuren, der sehr guten Enantioselektivität und ihres breiten Substratspektrums [27] ein guter Katalysator für die präparative Anwendung zu sein.

Für die präparative Anwendung der RoLAAO wurden freies Enzym oder ganze Zellen in batch-Verfahren untersucht. Sämtliche Enzympräparationen erzielten im batch-Ansatz mit DL-Leucin und/oder DL-Serin als Substrat Umsatz- und ee-Werte von über 99 %.

V Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden für vier technisch interessante Oxidasen, NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (NOX), L-Aminosäureoxidase aus *Rhodococcus opacus* (RoLAAO) und D-Aminosäureoxidase aus *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO) sowie die D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) Expressionssysteme entwickelt und strukturelle sowie mechanistische Untersuchungen durchgeführt. Mit diesen Enzymen sollen neue Syntheserouten für die Herstellung eines breiten Spektrums an D- und L-Aminosäuren, Ketosäuren, Alkoholen und Ketoverbindungen eröffnet werden.

Die NOX aus *L. brevis* katalysiert die Oxidation von NADH zu NAD⁺, wobei Nebenprodukt dieses Enzyms Wasser (H₂O) ist, das durch Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) entsteht. Im Gegensatz dazu bilden die H₂O₂-bildenden NADH-Oxidasen als reduziertes Nebenprodukt Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welches für die Zellen toxisch ist. Aufgrund dieser Besonderheit der NOX wurde das *nox*-Gen in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren kloniert und in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert. Es wurden außerordentlich hohe spezifische Aktivitäten sowohl für die NOX als auch für die SeMetNOX erzielt. Anschließend wurden die NOX und SeMetNOX umfassend protein- und biochemisch charakterisiert. Da bisher keine Struktur einer H₂O-bildenden NOX beschrieben wurde, sollte die gut verfügbare NOX aus *L. brevis* kristallisiert und die 3D-Struktur gelöst werden. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Universität Köln wurde die NOX in kürzester Zeit kristallisiert. Ein kompletter Datensatz wurde mit einem Kristall des NOX-Holoenzym mit Synchrotronstrahlung am DORIS Speicherring des DESY (Hamburg) bis zu einer Auflösung von 2,7 Å gemessen. Aufgrund der hohen Sequenzidentität der NOX zur NADH-Peroxidase aus *Enterococcus faecalis* mit 42,3 % konnte die 3D-Struktur der NOX erfolgreich mittels molekularem Ersatz gelöst werden. Nach dem Vorliegen der 3D-Struktur wurde in der Folge auch der Reaktionsmechanismus aufgeklärt und mit anderen Oxidasen verglichen.

Da die NOX sehr gut verfügbar ist und einen relativ kleinen K_M-Wert für NADH besitzt, wurde die NOX als Regenerationssystem für NAD⁺ bei der Kopplung mit NAD⁺-abhängigen L-, (R)- oder (S)-spezifischen Dehydrogenase während der Racematspaltung eingesetzt. Durch die Kopplung der NOX mit verschiedenen Dehydrogenasen (Aminosäure- u. Alkohol-Dehydrogenasen) wurden verschiedene (R)- und (S)-Alkoholen und diverse D-Aminosäuren mit hoher Enantiomerenreinheit (95 bis praktisch 100 %) erreicht.

L-AAOs katalysieren die oxidative Desaminierung von L-Aminosäuren zu Ketosäuren unter Freisetzung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid. L- und D-spezifische AAOs sind aufgrund ihrer Gleichgewichtslage, die die Bildung der oxidierten Produkte unterstützt, sowohl für die Racemattrennung als auch für die direkte Desaminierung von L- und D-Aminosäuren zu Ketosäuren sehr gut geeignet. Als weiterer Vorteil ist zu erwähnen, dass in diesen Prozessen nur maximal zwei Enzyme erforderlich sind, die L-AAO und bei oxidationsempfindlichen Verbindungen zusätzlich Katalase.

Die wesentliche Limitierung bei der Anwendung dieser Enzyme ist bislang die Verfügbarkeit. In dieser Arbeit wurde daher als weiterer Schwerpunkt die Expression einer L-AAO (aus *Rhodococcus opacus*) und zweier D-AAOs (aus *Trigonopsis variabilis* und aus *Arthrobacter protophormiae*) bearbeitet.

Erstmals konnte eine aktive L-AAO aus *R. opacus* erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Durch umfassende Klonierungsarbeiten wurde ein leistungsstarker rekombinanter *E. coli*-

Expressionsstamm zur Bildung von L-AAO entwickelt. Durch anschließende Fermentation dieses *E. coli*-Stammes wurden sehr hohe Enzymmengen gewonnen. Aufgrund der guten Verfügbarkeit der RoLAAO wurden präparative Ansätze mit verschiedenen Enzympräparationen untersucht. Sämtliche Enzympräparationen erzielten im batch-Ansatz mit verschiedenen DL-Aminosäuren Enantiomerenüberschüsse von über 99 % für die D-Aminosäure. Zum anderen wurden zwei D-Aminosäureoxidasen (TvDAAO und ApDAAO) in *E. coli* erfolgreich heterolog exprimiert. Auch für diese Enzyme konnten sehr gute Überexpressionssysteme entwickelt werden. Beide D-AAOs wurden umfassend biochemisch charakterisiert. Für die ApDAAO wurde außerdem ein Strukturmodell erstellt und der Reaktionsmechanismus untersucht.

Durch die erfolgreiche heterologe Expression von D- und L-spezifischen Aminosäureoxidasen wurden damit neue enzym-katalysierte Wege zur Synthese von D- und L-Aminosäuren und Ketosäuren eröffnet. In der Anwendung konnte mit verschiedenen Substraten gezeigt werden, dass sowohl Verfahren mit isolierten Enzymen als auch mit rekombinanten Ganzzell-Systemen hohe Enantiomerenüberschüsse (> 99 %) für die verbleibenden Aminosäuren ergeben.

VI Literaturverzeichnis

- [1] Abendroth, J., et al., Crystallization, preliminary X-ray analysis of a native and selenomethionine D-hydantoinase from *Thermus* sp. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. 56(9): p. 1166-9.
- [2] Takahashi, E., M. Furui, and T. Shibatani, D-amino acid production from racemic amino acids by a microbial asymmetric degradation. Biotechnology Techniques, 1997. 11(12): p. 913-6.
- [3] Crane 3Rd, E.J., et al., Analysis of the Kinetic and Redox Properties of the NADH Peroxidase R303M Mutant: Correlation with the Crystal Structure. Biochemistry, 2000. 39: p. 10353.
- [4] Patel, R.N., et al., Stereospecific Microbial Reduction of 4,5-Dihydro-4-(4-Methoxyphenyl)-6-(Trifluoromethyl-1H-1)-Benzazepin-2-One. Enzyme and Microbial Technology, 1991. 13(11): p. 906-12.
- [5] 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-Enzymatic, 1999. 6(1-2): p. 41-50.
- [6] Akinobu, M., et al., Industrial production of (R)-1,3.butanediol by new biocatalysis. J Mol Catal B: Enzymatic, 2001. 11: p. 513-21.
- [7] Faller, J.W. and A.R. Lavoie, Enantioselective routes to both enantiomers of aryl alcohols with a single catalyst antipode: Ru and Os transfer hydrogenation catalysts. Org Lett, 2001. 3: p. 3703-6.
- [8] Breuer, M., et al., High-throughput assay of (R)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002. 374(6): p. 1069-73.
- [9] Keinan, E., et al., Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium Brockii*. Journal of the American Chemical Society, 1986. 108(1): p. 162-9.
- [10] De Amici, M., et al., Chemoenzymatic synthesis of chiral isoxazole derivatives. J Org Chem, 1989. 54: p. 2646-50.
- [11] Kusumoto, I., Industrial production of L-glutamine. Journal of Nutrition, 2001. 131(9): p. 2552S-5S.
- [12] de Graaf, A.A., L. Eggeling, and H. Sahm, Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2001. 73: p. 9-29.
- [13] Kamphuis, J., et al., New developments in the synthesis of natural and unnatural amino acids. Ann N Y Acad Sci, 1992. 672: p. 510-27.
- [14] Takahashi, E., et al., D-methionine preparation from racemic methionines by *Proteus vulgaris* IAM 12003 with asymmetric degrading activity. Appl Microbiol Biotechnol, 1997. 47(2): p. 173-9.
- [15] Pantaleone, D.P., A.M. Geller, and P.P. Taylor, Purification and characterization of an L-amino acid desaminase used to prepare unnatural amino acids. J Mol Catal B: Enzymatic, 2001. 11: p. 795-803.

-
- [16] Galkin, A., et al., Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63(12): p. 4651-4656.
- [17] Grabley, S., R. Keller, and M. Schlingmann, Hoechst. Vol. EP 0141223, EP 0141223, 1987.
- [18] Bommarius, A.S., K. Drauz, and M. Kottenhahn, Degussa. Pat. Appl. DE 19529211.1, 1995.
- [19] Turner, N.J., et al., Synthesis of homochiral L-(S)-tert-leucine via a lipase-catalyzed dynamic resolution process. Tetrahedron Lett, 1995. 36: p. 1113-6.
- [20] Laumen, K., O. Ghisalpa, and K. Auer, Enzyme-assisted preparation of D-tert.-leucine. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. 65(9): p. 1977-80.
- [21] Bommarius, A.S., M. Schwarm, and K. Drauz, Comparison of different chemoenzymatic process routes to enantiomerically pure amino acids. Chimia, 2001. 55: p. 50-9.
- [22] Shaked, Z. and G.M. Whitesides, Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase. J Am Chem Soc, 1980. 102: p. 7104-5.
- [23] Wichmann, R., C. Wandrey, and M.R. Kula, Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. Biotechnol Bioeng, 1981. 23: p. 2789-802.
- [24] Tsai, Y.C., et al., Production and immobilization of D-aminoacylase of *Alcaligenes faecalis* DA1 for optical resolution of N-acyl-DL-amino acids. Enzyme Microb Technol, 1992. 14: p. 384-9.
- [25] Yang, Y.B., et al., Characterization of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* DA181. Biosci Biotechnol Biochem, 1992. 56: p. 1392-5.
- [26] Verseck, S., A.S. Bommarius, and M.R. Kula, Screening, overexpression and characterization of an N-acylamino acid racemase from *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. 55: p. 354-61.
- [27] Geueke, B. and W. Hummel, A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. Enzyme and Microbial Technology, 2002. 31(1-2): p. 77-87.
- [28] Pilone, M.S. and L. Pollegioni, D-amino acid oxidase as an industrial biocatalyst. Biocatalysis and Biotransformation, 2002. 20(3): p. 145-59.
- [29] Trost, E.M. and L. Fischer, Minimization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution Of D/L-amino acids. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2002. 19: p. 189-195.
- [30] Sakamoto, M., T. Uchimura, and K. Komagata, Comparison of H₂O-forming NADH oxidase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541^T and H₂O₂-forming NADH oxidase from *Sporolactobacillus inulinus* NRIC 1133^T. J Ferment Bioeng, 1996. 82(6): p. 531-7.
- [31] Riebel, B.R., et al., Cofactor Regeneration of NAD from NADH: Novel Water-Forming NADH Oxidases. Advanced Synthesis & Catalysis, 2002. 344: p. 1156 -68.
- [32] Ahmed, S.A. and A. Claiborne, Active-site structural comparison of streptococcal NADH peroxidase and NADH oxidase. Reconstitution with artificial flavins. J Biol Chem, 1992. 267(6): p. 3832-40.

-
- [33] Geueke, B., B. Riebel, and W. Hummel, NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: A new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme Microb Technol*, 2003. 32: p. 205-11.
- [34] Park, H.J., et al., Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a H₂O₂-forming NADH oxidase from the extreme thermophilic *Thermus thermophilus* HB8 and its expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1992. 205(3): p. 875-9.
- [35] Jiang, R.R. and A.S. Bommarius, Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (nox-1) from *Lactococcus lactis*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004. 15(18): p. 2939-44.
- [36] Ohnishi, K., et al., Purification and Analysis of a Flavoprotein Functional as NADH Oxidase from *Amphibacillus xylanus* Overexpressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(50): p. 31418-23.
- [37] Niimura, Y., et al., A hydrogen peroxide-forming NADH oxidase that functions as an alkyl hydroperoxide reductase in *Amphibacillus xylanus*. *Journal of Bacteriology*, 2000. 182: p. 5046-51.
- [38] Niimura, Y. and V. Massey, Reaction mechanism of *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase/alkyl hydroperoxide reductase flavoprotein. *J Biol Chem*, 1996. 271(48): p. 30459-64.
- [39] Marty-Teyssset, C., F. de la Torre, and J. Garel, Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66(1): p. 262-7.
- [40] Stanton, T.B. and N.S. Jensen, Purification and Characterization of NADH Oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Journal of Bacteriology*, 1993. 175: p. 2980-7.
- [41] Koike, K., et al., Purification and characterization of NADH oxidase from a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biochem (Tokyo)*, 1985. 97(5): p. 1279-88.
- [42] Ergon, F., D. Thomas, and T.M. Chang, Selection and microencapsulation of an "NADH-oxidizing" bacterium and its use for NAD regeneration. *Appl Biochem Biotechnol*, 1984. 10: p. 61-71.
- [43] Schmidt, H.L., et al., Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. *Eur J Biochem*, 1986. 156(1): p. 149-55.
- [44] Ross, R.P. and A. Claiborne, Molecular-Cloning and Analysis of the gene encoding the NADH oxidase from *Streptococcus-faecalis* 10C1 - Comparison with NADH peroxidase and the flavoprotein disulfide reductases. *Journal of Molecular Biology*, 1992. 227: p. 658-71.
- [45] Hummel, W. and B. Riebel, Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 2003. 25: p. 51-54.
- [46] Yu, J., et al., Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* NADH oxidase that is required for infection. *Microbiology*, 2001. 147(Pt 2): p. 431-8.
- [47] Higuchi, M., et al., Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H₂O₂-forming oxidase and H₂O-forming oxidase induced in *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*, 1993. 139(Pt 10): p. 2343-51.
- [48] Matsumoto, J., et al., Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus mutans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996. 60: p. 39-43.

-
- [49] Ward, D.E., et al., The NADH oxidase from *Pyrococcus furiosus*. Implications for the protection of anaerobic hyperthermophiles against oxidative stress. *Eur J Biochem*, 2001. 268(22): p. 5816-23.
- [50] Parsonage, D., et al., Purification and analysis of streptococcal NADH peroxidase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1993. 268(5).
- [51] Coulter, E.D., N.V. Shenvi, and D.M.J. Kurtz, NADH peroxidase activity of rubrerythrin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 255(2): p. 317-23.
- [52] Stanton, T.B., Glucose metabolism and NADH recycling by *Treponema hyodysenteriae*, the agent of swine dysentery. *Appl Environ Microbiol*, 1989. 55(9): p. 2365-71.
- [53] Talwalkar, A., et al., An improved method for the determination of NADH oxidase in the presence of NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods*, 2003. 52(3).
- [54] Boumerdassi, H., et al., Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. *Applied and environmental Microbiology*, 1997. 63(No. 6): p. 2293–2299.
- [55] Lopez de Felipe, F., et al., Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J Bacteriol*, 1998. 180(15): p. 3804-8.
- [56] Hugenholtz, J., et al., *Lactococcus lactis* as a Cell Factory for High-Level Diacetyl Production. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66: p. 4112-4.
- [57] Higuchi, M., et al., Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 1999. 181(19): p. 5940-7.
- [58] Pawelek, P.D., et al., The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *European Molecular Biology Organization*, 2000. 19(16): p. 4204-15.
- [59] Zeller, A., Enzymes of snake venoms and their biological significance, in *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, F.F. Nord, Editor. 1948, Interscience: New York. p. 459-95.
- [60] Ponnudurai, G., M.C. Chung, and N.H. Tan, Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 313(2): p. 373-8.
- [61] Tan, N.H. and S. Swaminathan, Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. *Int J Biochem*, 1992. 24(6): p. 967-73.
- [62] Sanchez, E.O. and A. Magalhaes, Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (*Surucucu Pico de Jaca*) *Lachesis muta muta* venom. *Braz J Med Biol Res*, 1991. 24(3): p. 249-60.
- [63] Ahn, M.Y., et al., Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Arch Pharm Res*, 2000. 23(5): p. 477-81.
- [64] Brearley, G.M. and C.P. Price, Isolation, identification and characterisation of a soil bacterium producing an enzyme with L-phenylalanine oxidase activity. *Arch Microbiol*, 1994. 161: p. 409-13.
- [65] Coudert, M., Characterization and physiological function of a soluble L-amino acid oxidase in *Corynebacterium*. *Archives of Microbiology*, 1975. 102(2): p. 151-3.

-
- [66] Piedras, P., et al., Purification and characterization of an L-amino-acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 1992. 188: p. 13-8.
- [67] Le, K.H. and V.R. Villanueva, Purification and characterization of epsilon-N-trimethyllysine L-amino oxidase from *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta*, 1978. 524(2): p. 288-96.
- [68] Kusakabe, H., et al., A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *J Biol Chem*, 1980. 255(3): p. 976-81.
- [69] Blaschko, H. and D.B. Hope, The oxidation of L-amino acids by *Mytilus edulis*. 1955. 62: p. 335-9.
- [70] Sun, Y., et al., Characterization and expression of L-amino acid oxidase of mouse milk. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(21): p. 19080-6.
- [71] Murthy, S.N. and M.K. Janardanasarma, Identification of L-amino acid/L-lysine alpha-amino oxidase in mouse brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999. 197(1-2): p. 13-23.
- [72] Böhmer, A., et al., A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. *Eur J Biochem*, 1989. 182: p. 327-32.
- [73] Kamei, T., et al., L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* I Production, isolation and some properties. *Chem Pharm Bull*, 1983. 31(4): p. 1307-14.
- [74] Kamei, T., et al., L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* II Properties. *Chem Pharm Bull*, 1983. 31: p. 3609-16.
- [75] Lukasheva, E.V. and T.T. Berezov, L-Lysine alpha-Oxidase: Physicochemical and Biological Properties. *Biochemistry (Mosc)*, 2002. 67(10): p. 1152-8.
- [76] Smirnova, I.P. and S.K. Khaduev, L-lysine-alpha-oxidase activity of some *Trichoderma* species. *Mikrobiologiya*, 1984. 53(1): p. 163-5.
- [77] Massad, G., H. Zhao, and H.L. Mobley, *Proteus mirabilis* amino acid deaminase: cloning, nucleotide sequence, and characterization of aad. *J Bacteriol*, 1995. 177(20): p. 5878-83.
- [78] Bouvrette, P. and J.H.T. Luong, Isolation, purification, and further characterization of an L-phenylalanine oxidase from *Morganella morganii*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994. 48: p. 61-74.
- [79] Krebs, H.A., Metabolism of amino acids. Deamination of amino acids. *Biochem J*, 1935. 29: p. 77-93.
- [80] Konno, R., et al., Guinea pig D-amino-acid oxidase cDNA and phylogenetic position. *DNA Seq*, 1999. 10(2): p. 85-91.
- [81] Konno, R., Rat D-amino-acid oxidase cDNA: rat D-amino-acid oxidase as an intermediate form between mouse and other mammalian D-amino-acid oxidases. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1395(2): p. 165-70.
- [82] Koibuchi, N., et al., Localization of D-amino acid oxidase mRNA in the mouse kidney and the effect of testosterone treatment. *Histochem Cell Biol*, 1995. 104(5): p. 349-55.
- [83] Konno, R. and Y. Yasumura, Activity and substrate specificity of D-amino acid oxidase in kidneys of various animals. *Zool Mag (Tokyo)*, 1981. 90: p. 368-73.
- [84] Pilone, S.M., A. Vanoni, and P. Casalin, Purification and properties of D-amino acid oxidase, an inducible flavoenzyme from *Rhodotorula gracilis*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. 914: p. 136-42.

- [85] Berg, C.P. and F.A. Rodden, Purification of D-amino oxidase from *Trigonopsis variabilis*. Anal Biochem, 1976. 71(1): p. 214-22.
- [86] Gabler, M., M. Hensel, and L. Fischer, Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. Enzyme Microbial Technol, 2000. 27(8): p. 605-611.
- [87] Sikora, L. and G.A. Marzluf, Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*. Molecular and General Genetics, 1982. 186(1): p. 33-9.
- [88] Isogai, T., et al., Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. J Biochem (Tokyo), 1990. 108(6): p. 1063-9.
- [89] Hanson, R.L., et al., Transformation of N-epsilon-CBZ-L-lysine to CBZ-L-oxyllysine using L-amino acid oxidase from *Providencia alcalifaciens* and L-2-hydroxy-isocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992. 37(5): p. 599-603.
- [90] Lee, Y.C. and M.H. Huh, Development of a biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids. Journal of Food Biochemistry, 1998. 1999: p. 173-185.
- [91] Liu, J. and J. Wang, Remarkable thermostability of bioelectrodes based on enzymes immobilized within hydrophobic semi-solid matrices. Biotechnol Appl Biochem, 1999. 30(Pt 2): p. 177-83.
- [92] Setford, S.J., S.F. White, and J.A. Bolbot, Measurement of protein using an electrochemical bi-enzyme sensor. Biosens Bioelectron, 2002. 17(1-2): p. 79-86.
- [93] Sarkar, P., et al., Screen-printed amperometric biosensors for the rapid measurement of L- and D-amino acids. The Analyst, 1999. 124(6): p. 865-70.
- [94] Hikkanen, A. and K. Decker, D-amino acids. Methods of enzymatic analysis, 1985. 8: p. 329-40.
- [95] Gemeiner, P., et al., Direct determination of the cephalosporin transforming activity of immobilized cells with use of an enzyme thermistor. 1. verification of the mathematical model. Enzyme Microb Technol, 1993. 15(1): p. 50-6.
- [96] Nakajima, N.D., et al., Continuous conversion of optically pure L-methionine from D-enantiomer contaminated preparations by an immobilized enzyme membrane reactor. J Ferment technol, 1990. 70: p. 322-55.
- [97] Brodelius, P., K. Nilsson, and K. Mosbach, Production of alpha-keto acids Part I. Immobilized cells of *Trigonopsis variabilis* containing D-amino acid oxidase. Appl Biochem Biotechnol, 1981. 6: p. 293-308.
- [98] Pilone, S.M., S. Buto, and L. Pollegioni, A process of bioconversion of cephalosporin c by *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. Biotechnol Lett, 1995. 17: p. 199-204.
- [99] Justiz, O.H., R. Fernandez-Lafuente, and J.M. Guisan, One-pot chemoenzymatic synthesis of 3'-functionalized cephalosporines (cefazolin) by three consecutive biotransformations in fully aqueous medium. J Org Chem, 1997. 62: p. 9099-106.
- [100] Diez, B., et al., Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. Biotechnol Bioeng, 1996. 55(1): p. 216-26.
- [101] Hanson, R.L., et al., Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine. Bioorg Med Chem, 1999. 7(10): p. 2247-52.

-
- [102] Patel, R.N., Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomol Eng*, 2001. 17(6): p. 167-82.
- [103] Vallon, O. and F.A. Wollman, cDNA sequence of M(alpha), the catalytic subunit of the *Chlamydomonas reinhardtii* L-amino acid oxidase (Accession No. U78797). A new sequence motif shared by a wide variety of flavoproteins (PGR 97-171). *Plant Physiol*, 1997. 115: p. 1729.
- [104] Niedermann, D.M. and K. Lerch, Molecular cloning of the L-amino-acid oxidase gene from *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(28): p. 17246-51.
- [105] Raibekas, A.A. and V. Massey, Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. 248(3): p. 476-8.
- [106] Ahn, M.Y., B.M. Lee, and Y.S. Kim, Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. 29(6): p. 911-9.
- [107] Murakawa, M., et al., Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms. *Cell Death and Differentiation*, 2001. 8(3): p. 298-307.
- [108] Torii, S., et al., Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*, 2000. 39(12): p. 3197-205.
- [109] Geueke, B. and W. Hummel, Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* -amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*. *Protein Expression and Purification*, 2003. 28(2): p. 303-9.
- [110] Takatsuka, H., et al., Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1544(1-2): p. 267-77.
- [111] Geyer, A., et al., Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *European Journal of Biochemistry*, 2001. 268(14): p. 4044-53.
- [112] Takahashi, E., K. Ito, and T. Yoshimoto, Cloning of L-amino acid deaminase gene from *Proteus vulgaris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999. 63(12): p. 2244-7.
- [113] Ciccarelli, E., et al., Porcine D-amino acid oxidase: production of the biologically active enzyme in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 161(2): p. 865-72.
- [114] Lin, L., et al., Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 2000. 27(7): p. 482-91.
- [115] Gonzalez, F.J., et al., Molecular cloning of TvDAO1, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 1997. 13(15): p. 1399-408.
- [116] Alonso, J., et al., Engineering the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* to facilitate its overproduction in *Escherichia coli* and its downstream processing by tailor-made metal chelate supports. *Enzyme Microbial Technol*, 1999. 25: p. 88-95.
- [117] Molla, G., et al., Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Protein Expression and Purification*, 1998. 14(2): p. 289-94.

- [118] Faninato, S., L. Pollegioni, and S.M. Pilone, Engineering, expression and purification of a His-tagged chimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Enzyme Microb Technol*, 2001. 29: p. 407-12.
- [119] Ju, S.S., et al., Substitution of the critical methionine residues in *trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide. *FEMS Microbiology Letters*, 2000. 186(2): p. 215-2.
- [120] Lin, L.L., et al., The role of a conserved histidine residue, His324, in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase. *FEMS Microbiology Letters*, 1999. 176(2): p. 443-8.
- [121] Pollegioni, L., et al., Identification and role of ionizing functional groups at the active center of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *FEBS Lett.*, 2001. 507: p. 323-6.
- [122] Harris, C.M., et al., Studies on the reaction mechanism of *Rhodotorula gracilis* D-amino-acid oxidase. Role of the highly conserved Tyr-223 on substrate binding and catalysis. *J Biol Chem*, 1999. 274(51): p. 36233-36240.
- [123] Stehle, T., et al., The structure of NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis* at 3.3 Å resolution. *FEBS Letters*, 1990. 267(2): p. 186-8.
- [124] Yeh, J.I., A. Claiborne, and W.G. Hol, Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, 1996. 35(31): p. 9951-7.
- [125] Stehle, T., et al., Structure of NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1 refined at 2.16 Å resolution. *J Mol Biol*, 1991. 221(4): p. 1325-44.
- [126] Mande, S.S., et al., Crystallographic analyses of NADH peroxidase Cys42Ala and Cys42Ser mutants: active site structures, mechanistic implications, and an unusual environment of Arg 303. *Biochemistry*, 1995. 34(21): p. 6985-92.
- [127] Crane, E.J.r., D. Parsonage, and A. Claiborne, The active-site histidine-10 of enterococcal NADH peroxidase is not essential for catalytic activity. *Biochemistry*, 1996. 35(7): p. 2380-7.
- [128] Crane, E.J.r., et al., Analysis of the kinetic and redox properties of the NADH peroxidase R303M mutant: correlation with the crystal structure. *Biochemistry*, 2000. 39(34): p. 10353-64.
- [129] Parsonage, D. and A. Claiborne, Analysis of the kinetic and redox properties of NADH peroxidase C42S and C42A mutants lacking the cysteine-sulfenic acid redox center. *Biochemistry*, 1995. 34(2): p. 435-41.
- [130] Erdmann, H., et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a NADH oxidase from *Thermus thermophilus* HB8. *J Mol Biol*, 1993. 230(3): p. 1086-8.
- [131] Hecht, H.J., et al., Crystal structure of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Nature Structural Biology*, 1995. 2(12): p. 1109-14.
- [132] Mac Sweeney, A., et al., Crystallization and preliminary crystallographic analysis of an NADH oxidase that functions in peroxide reduction in *Thermus aquaticus* YT-1. *Acta Crystallographica Section D*, 1999. 55(1): p. 297-8.
- [133] Lountos, G.T., et al., Crystallization and preliminary analysis of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Acta Crystallographica Section D*, 2004. 60(11): p. 2044-7.
- [134] Mizutani, H., et al., Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. *J Biochem (Tokyo)*, 1996. 120: p. 14-7.

-
- [135] Mattevi, A., et al., Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996. 93(15): p. 7496-501.
- [136] Umhau, S., et al., The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. 97(23): p. 12463-12468.
- [137] Mattevi, A., M.A. Vanoni, and B. Curti, Structure of D-amino acid oxidase: new insights from an old enzyme. *Curr Opin Struct Biol*, 1997. 7(6): p. 804-10.
- [138] Van den Munckhof, R.J., In situ heterogeneity of peroxisomal oxidase activities: an update. *Histochem J*, 1996. 28(6): p. 401-29.
- [139] CCP4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1994. 50(Pt 5): p. 760-63.
- [140] Brünger, A.T., et al., Crystallography & NMR system: Anew software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1998. 54(Pt 5): p. 905-21.
- [141] Otwinowski, Z. and W. Minor, Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Meth Enzymol*, 1997. 276: p. 407-26.
- [142] Terwilliger, T.C. and J. Berendzen, Evaluation of macromolecular electron-density map quality using the correlation of local r.m.s. density. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. 55: p. 1872-7.
- [143] Tong, L. and M. Rossmann, Rotation Function Calculations with GLRF Program. *Meth Enzymol*, 1997. 276: p. 594-611.
- [144] Jones, T.A., et al., Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, 1991. 47(Pt 2): p. 110-9.
- [145] Schomburg, D. and J. Reichelt, BRAGI: A Comprehensive Protein Modeling Program System. *J Mol Graphics*, 1988. 6: p. 161-165.
- [146] Guex, N. and M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 1997. 18: p. 2714-23.
- [147] Kabsch, W. and C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 1983. 22: p. 2577-637.
- [148] McLachlan, A.D., Rapid comparison of protein structures. *Acta Crystallogr A Found Crystallogr*, 1982. 38: p. 871-3.
- [149] Westhead, D.R., et al., Protein structural topology: Automated analysis and diagrammatic representation. *Protein Sci*, 1999. 8: p. 897-904.
- [150] Sheldrick, G.M. and T.R. Schneider, Shelxl: high resolution refinement. *Meth Enzymol*, 1997. 277: p. 319-43.
- [151] Provencher, S.W. and J. Glöckner, Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 1981. 20(1): p. 33-7.
- [152] Yang, Institut für biologische Informationsverarbeitung (IBI), Forschungszentrum Jülich, Germany. 2001.

-
- [153] Sreerama, N. and R.W. Woody, A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem*, 1993. 209(1): p. 32-44.
- [154] Frishman, D. and P. Argos, Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng*, 1996. 9(2): p. 133-42.
- [155] Schwede, T., et al., An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 2003. 31: p. 3381-85.
- [156] Esnouf, R.M., An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J Mol Graph Model*, 1997. 15: p. 132-4, 112-3.
- [157] Kraulis, P.J., MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst*, 1991. 24: p. 946-50.
- [158] Merritt, E.A. and D.J. Cacon, Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Meth Enzymol*, 1997. 277: p. 505-24.
- [159] Williams, T. and C. Kelley, Gnuplot: An Interactive Plotting Program. The Manual, 1996. Version 3.6a.
- [160] Kissinger, C.R., D.K. Gehlhaar, and D.B. Fogel, Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. 55(Pt 2): p. 484-91.
- [161] 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. 380-6.
- [162] Hummel, W., New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997. 58: p. 146-84.
- [163] Hummel, W., B. Riebel, and A.S. Bommarius, Rekombinant hergestellte Enzyme mit verbesserter NAD(H)-Akzeptanz. Patentanmeldung 100 37 101.9 2000, 2000.
- [164] Ansorge, M.B. and M.R. Kula, Investigating expression systems for the stable large-scale production of recombinant L-leucine-dehydrogenase from *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000. 53(6): p. 668-73.
- [165] Ansorge, M.B. and M.R. Kula, Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli*[pLET98]. *Biotechnol Bioeng*, 2000. 68(5): p. 557-62.
- [166] 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.
- [167] Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983. 166(557).
- [168] Scheffzek, K., et al., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the Ras-GTPase-activating domain of human p120GAP. *Proteins*, 1997. 27: p. 315-8.
- [169] Laskowski, R.A., et al., PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 1993. 26(283-91).
- [170] Murzin, A.G., et al., Scop: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, 1995. 247(4): p. 536-40.
- [171] Stumpp, T., B. Wilms, and J. Altenbuchner, Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* 1.00, 1999: p. 33-36.

-
- [172] Ghisla, S. and V. Massey, New flavins for old: artificial flavins as active site probes of flavoproteins. *Biochem J*, 1986. 239(1): p. 1-12.
- [173] Morre, D.J., et al., Cyclic AMP-plus ATP-dependent modulation of the NADH oxidase activity of porcine liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1224(3): p. 566-74.
- [174] Massa, W., Kristallstrukturbestimmung. B.G. Teubner, Stuttgart, 1996. 2. Auflage.
- [175] Chandra, N., K.R. Acharya, and P.C. Moody, Analysis and characterization of data from twinned crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. 55: p. 1750-8.
- [176] Andersson, M.A. and S. Hovmöller, The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000. 56: p. 789-90.
- [177] Uson, I. and G.M. Sheldrick, Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, 1999. 9: p. 643-8.
- [178] Deacon, A.M., et al., The Shake-and-Bake structure determination of triclinic lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95: p. 9284-9.
- [179] Weeks, C.M. and R. Miller, Optimizing Shake-and-Bake for proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. 55(2): p. 492-500.
- [180] Tame, J.R.H., Ab initio phasing of a 4189-atom protein structure at 1.2Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000. 56: p. 1554-9.
- [181] Frazao, C., et al., Ab initio structure solution of a dimeric cytochrome c3 from *Desulfovibrio gigas* containing disulfide bridges. *J Biol Inorg Chem*, 1999. 4: p. 162-5.
- [182] Hendrickson, W.A. and C.M. Ogata, Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Meth Enzymol*, 1997. 276: p. 494-523.
- [183] Pappa, H.S., A.E. Stewart, and N.Q. McDonald, Incorporating anomalous scattering centres into macromolecules. *Curr Opin Struct Biol*, 1996. 6: p. 611-6.
- [184] Hendrickson, W.A. and M.M. Teeter, Structure of the hydrophobic protein crambin determined directly from the anomalous scattering of sulphur. *Nature*, 1981. 290: p. 107-13.
- [185] Dauter, Z., et al., Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? *J Mol Biol*, 1999. 289: p. 83-92.
- [186] Ogata, C.M., MAD phasing grows up. *Nat Struct Biol*, 1998. 5 Suppl: p. 638-40.
- [187] Walsh, M.A., et al., MAD data collection - current trends. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. 55(10): p. 1726-32.
- [188] Hendrickson, W.A., J.R. Horton, and D.M. LeMaster, Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J*, 1990. 9: p. 1665-72.
- [189] Doublet, S., Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth Enzymol*, 1997. 276: p. 523-29.
- [190] Rossmann, M.G. and D.M. Blow, The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst*, 1962. 15: p. 24-31.
- [191] Pearson, W.R. and D.J. Lipman, Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(8): p. 2444-8.

- [192] Smith, T.F. and M.S. Waterman, Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 1981. 147(1): p. 195-7.
- [193] Brünger, A.T., Free r value: Cross-validation in crystallography. *Meth Enzymol*, 1997. 277: p. 366-96.
- [194] Ramachandran, G.N. and V. Sasisekharan, Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem*, 1968. 23: p. 283-438.
- [195] Validation-Network, Who checks the checkers? four validation tools applied to eight atomic resolution structures. eu 3-d validation network. *J Mol Biol*, 1998. 276(2): p. 417-36.
- [196] Sheng, D., D.P. Ballou, and V. Massey, Mechanistic Studies of Cyclohexanone Monooxygenase: Chemical Properties of Intermediates Involved in Catalysis. *Biochemistry*, 2001. 40: p. 11156-67.
- [197] Schreuder, H.A., et al., Crystal structures of wild-type p-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with 4-aminobenzoate, 2,4-dihydroxybenzoate, and 2-hydroxy-4-aminobenzoate and of the Tyr222Ala mutant complexed with 2-hydroxy-4-aminobenzoate. Evidence for a proton channel and a new binding mode of the flavin ring. *Biochemistry*, 1994. 33(33): p. 10161-70.
- [198] Dong, C., et al., Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) Structure Suggests a Mechanism for Regioselective Chlorination. *Science*, 2005. 309: p. 2216-9.
- [199] Peitsch, M.C., ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans*, 1996. 24: p. 247-9.
- [200] Peitsch, M.C., Protein modelling by E-mail. *Bio/Technology*, 1995. 13: p. 658-60.
- [201] LaVallie, E.R., et al., A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology (N Y)*, 1993. 11(2): p. 187-93.
- [202] Stewart, E.J., R. Aslund, and J. Beckwith, Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for thioredoxins. *EMBO J*, 1998. 17(19): p. 5543-50.
- [203] Hummel, W., et al., 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: p. 153-9.
- [204] Hefti, M.H., J. Vervoort, and W.J. van Berkel, Deflavination and reconstitution of flavoproteins. *European Journal of Biochemistry*, 2003. 270(21): p. 4227-42.
- [205] Wohlfahrt, G., et al., 1,8 and 1,9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Cryst D Biol Crystallogr*, 1999. 55: p. 969-77.
- [206] Yue, Q.K., et al., Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry*, 1999. 38(14): p. 4277-86.
- [207] Savvides, S.N. and P.A. Karplus, Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthine inhibitor. *J Biol Chem*, 1996. 271: p. 8101-7.
- [208] Sarma, G.N., et al., Glutathione Reductase of the Malarial Parasite *Plasmodium Falciparum*: Crystal Structure and Inhibitor Development. *J Mol Biol*, 2003. 328: p. 893-907.

- [209] Ledwidge, R., et al., Nmera, the Metal Binding Domain of Mercuric Ion Reductase, Removes Hg(2+) from Proteins, Delivers It to the Catalytic Core, and Protects Cells Under Glutathione-Depleted Conditions. *Biochemistry*, 2005. 44: p. 11402-16.
- [210] Toyoda, T., et al., Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Pig E3, Lipoamide Dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1998. 54: p. 982-5.
- [211] Li de la Sierra, I., et al., Molecular structure of the lipoamide dehydrogenase domain of a surface antigen from *Neisseria meningitidis*. *J Mol Biol*, 1997. 269: p. 129-41.
- [212] Dai, S., et al., Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 1996. 264: p. 1044-57.
- [213] Waksman, G., et al., Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *J Mol Biol*, 1994. 236: p. 800-16.
- [214] Mallett, T.C., D. Parsonage, and A. Claiborne, Equilibrium analyses of the active-site asymmetry in enterococcal NADH oxidase: role of the cysteine-sulfenic acid redox center. *Biochemistry*, 1999. 38(10): p. 3000-11.
- [215] Mallett, T.C. and A. Claiborne, Oxygen reactivity of an NADH oxidase C42S mutant: evidence for a C(4a)-peroxyflavin intermediate and a rate-limiting conformational change. *Biochemistry*, 1998. 37(24): p. 8790-802.
- [216] Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. Wiley, 1995. 2 edition: p. 369-70.
- [217] Cleland, W.W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim Biophys Acta*, 1963. 67: p. 104-37.
- [218] Cleland, W.W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory. *Biochim Biophys Acta*, 1963. 67: p. 173-87.
- [219] Cleland, W.W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim Biophys Acta*, 1963. 67: p. 188-96.
- [220] Stryer, L., *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verl., 1996. 4. Auflage: p. 646-7.
- [221] Sakamoto, M. and K. Komagata, Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J Ferment Bioeng*, 1996. 82(3): p. 210-6.
- [222] Schuette, H., et al., L-Leucine Dehydrogenase from *Bacillus-cereus* - Production, Large-Scale Purification and Protein Characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985. 22(5): p. 306-17.
- [223] Kubicek-Pranz, E.M. and M. Rohr, D-amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis*. *J Appl Biochem*, 1985. 7(2): p. 104-13.
- [224] Yu, J., et al., High expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2002. 18: p. 291-7.
- [225] Pollegioni, L. and M.S. Pilone, On the holoenzyme reconstitution process in native and truncated *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996. 332(1): p. 58-62.
- [226] Yurimoto, H., et al., Characterization and High-level Production of D-Amino Acid Oxidase in *Candida boidinii*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001. 65(3): p. 627-33.

- [227] Nishiya, Y. and T. Imanaka, Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. FEBS Lett, 1998. 438(3): p. 263-6.
- [228] Setoyama, C., et al., Crystallization of expressed porcine kidney D-amino acid oxidase and preliminary X-ray crystallographic characterization. J Biochem (Tokyo), 1996. 119(6): p. 1114-7.
- [229] Alonso, J., et al., D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodosporidium toruloides*) ATCC 26217. Microbiology, 1998. 144(Pt 4): p. 1095-101.
- [230] Zhou, B.P., et al., Characterization of a highly conserved FAD-binding site in human monoamine oxidase B. J Biol Chem, 1998. 273(24): p. 14862-8.
- [231] Muller, Y.A., et al., The refined structures of a stabilized mutant and of the wild-type pruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. J Mol Biol, 1994. 237: p. 315-35.
- [232] Motteran, L., et al., Cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum*. J Biol Chem, 2001. 276(21): p. 18024-30.
- [233] Pilone, S.M., et al., Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. Eur J Biochem, 1989. 180(1): p. 199-204.
- [234] Curti, B., et al., Improved purification, amino acid analysis and molecular weight of homogenous D-amino acid oxidase from pig kidney. Biochim Biophys Acta, 1973. 327: p. 266-73.
- [235] Swzajcer, E. and K. Mosbach, Isolation and partial characterization of a D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. Eur J Biochem, 1985. 180: p. 199-204.
- [236] Geueke, B., Neue Aminosäureoxidasen aus *Rhodococcus opacus* und *Arthrobacter protophormiae*: Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung, Klonierung und Expression. Dissertation Universität Düsseldorf, 2002.
- [237] Suhr, S.M. and D.S. Kim, Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 224(1): p. 134-9.
- [238] Vallon, O., et al., Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem, 1993. 215(2): p. 351-60.
- [239] Blaudeck, N., et al., Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation. Journal of Bacteriology, 2001. 183(2): p. 604-10.

VII Anhang

1 Reinigungschromatogramme

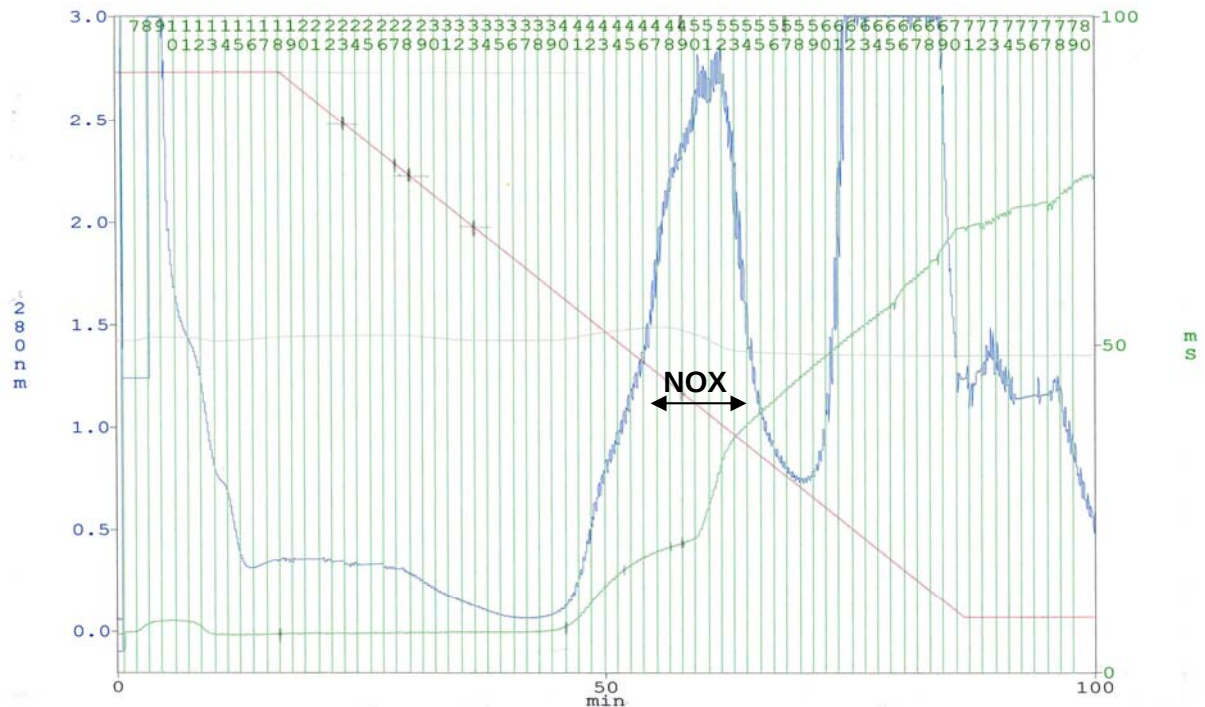


Abb. 85: Elutionsprofil des Gesamtproteins (—) im NaCl-Gradienten (— [%]) während der IEC an Q-Sepharose. Der Gradient wurde über die Zunahme der Leitfähigkeit (— [mS]) verfolgt.

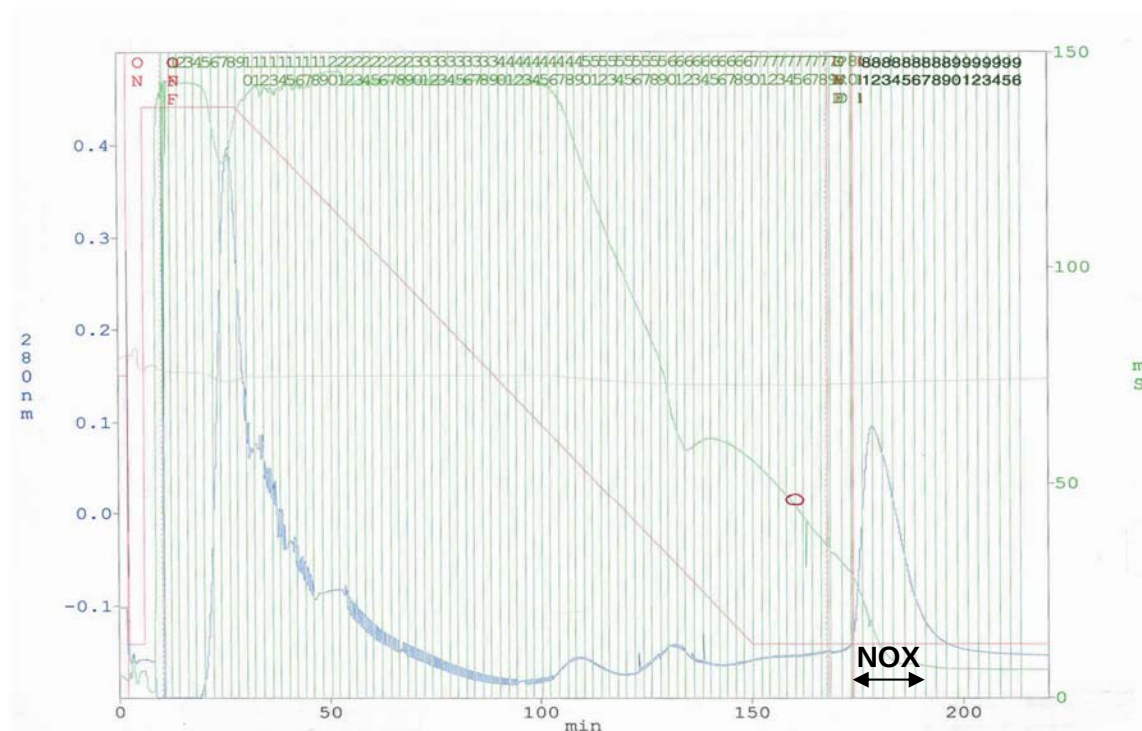


Abb. 86: Elutionsprofil des Gesamtproteins (—) im $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten (— [%]) während der HIC an Phenylsepharose FF. Der Gradient wurde über die Abnahme der Leitfähigkeit (— [mS]) verfolgt. Aufgetragen wurden die aktiven NOX-Fractionen nach IEC.

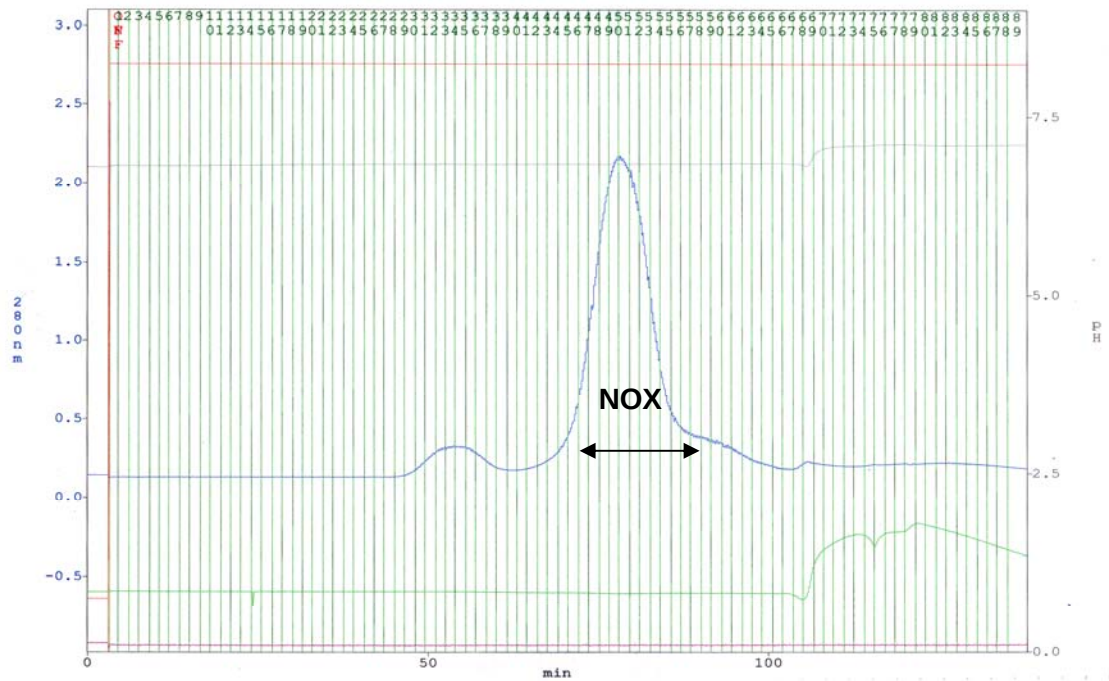


Abb. 87: Elutionsprofil des Gesamtproteins (—) während der Gelfiltration mit Superdex 200 PG. Konstante Puffer-Konzentration (— [%]), Leitfähigkeit (— [mS]). Aufgetragen wurden die aktiven NOX-Fractionen nach HIC.

2 Hochzelldichte-Fermentation

2.1 Fermentationsverlauf der rekombinanten ApDAAO

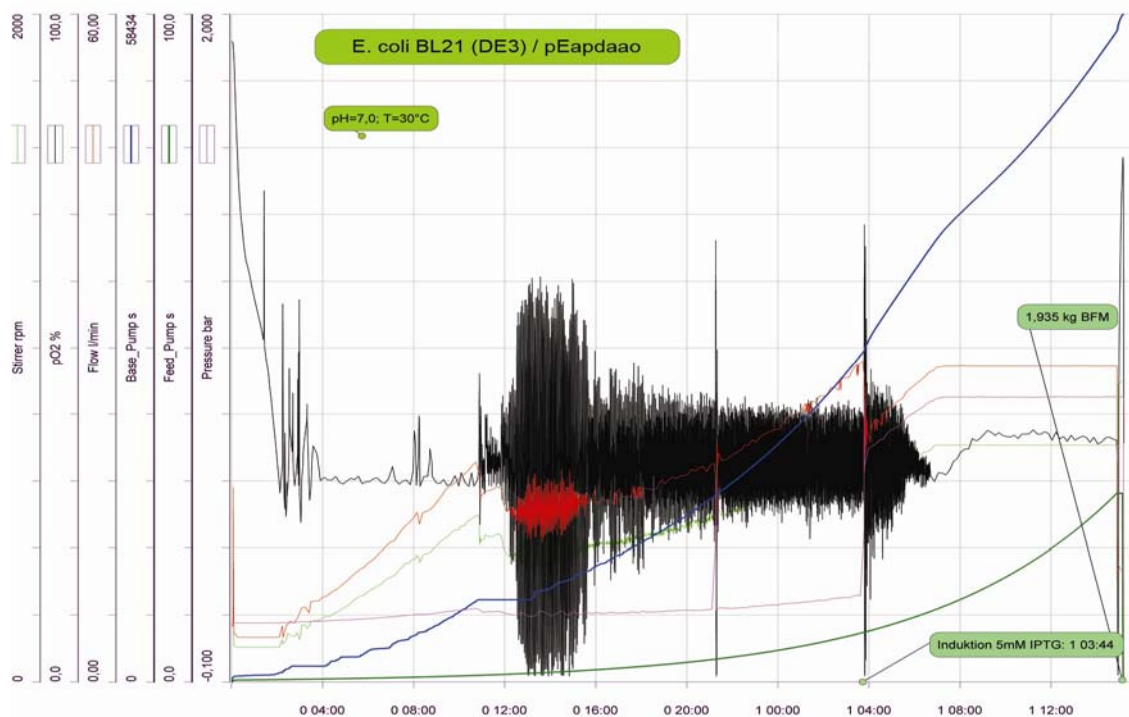


Abb. 88: Ergebnis der Fermentation von *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pEapdaao im 15 L-Maßstab.

2.2 Fermentationsverlauf der rekombinanten RoLAAO

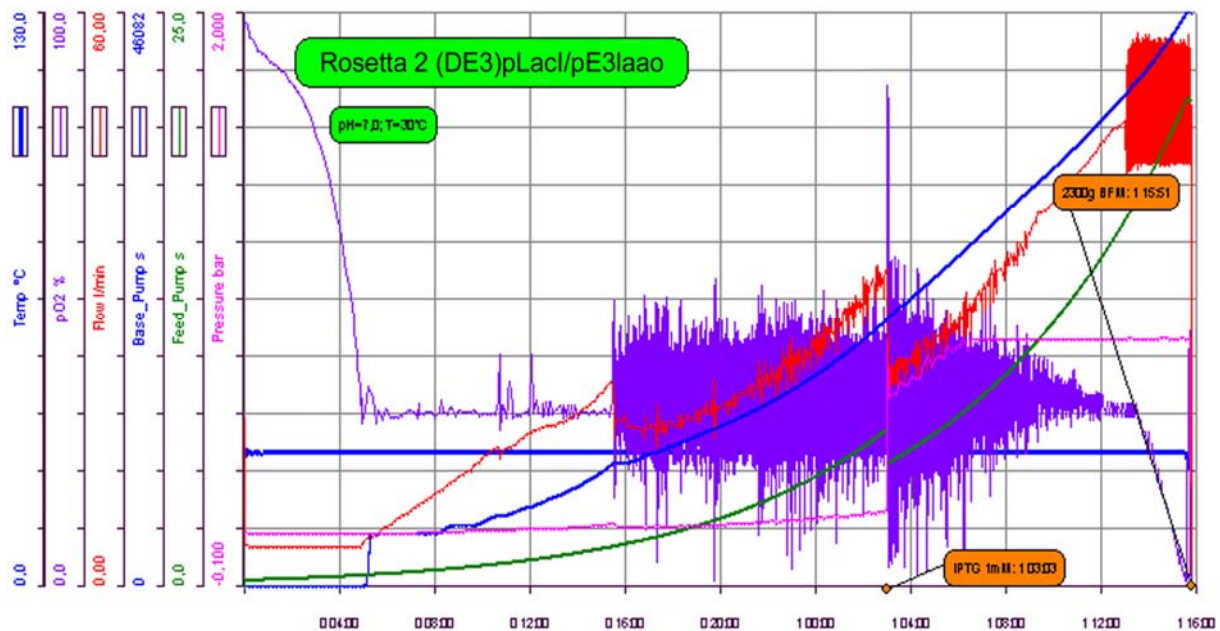


Abb. 89: Ergebnis der Fermentation von *E. coli* Rosetta 2 (DE3)/pLacI mit dem Plasmid pE3laao im 15 L-Maßstab.

3 Primer

3.1 Klonierungsprimer

3.1.1 Für *E. coli*-Vektoren

EcoRIfor	5' GCG CGA ATT CAT GAA AGT CAC AGT TGT TGG 3'
PstIrev	5' GCG CCT GCA GTT AAG CGT TAA CTG ATT G 3'
NdeIfor	5' GGA ATT CCA TAT GAA AGT CAC AGT TGT TGG 3'
BamHIrev	5' GCG CGG ATC CTT AAG CGT TAA CTG ATTG 3'
EcoRVrev	5' GCG CGA TAT CTT AAG CGT TAA CTG ATTG 3'
NcoIfor	5' GCG CCC ATG GGA AAG GCA ATC CAG TAC 3'
SacIrev	5' GCG CGA GCT CCT ACA GAC CAG GGA CCAC 3'
NdeItrf	5' GGA ATT CCA TAT GGC TAA AAT CGT TGT TAT TGG TGC CGG TGT TGC CGG TTT AAC TAC AGC TCT T 3'
BamHItrv	5' CGG GAT CCC TAA AGG TTT GGA CGA GTA AGA GCT CTTTC 3'
SacIhpf	5' GCGCGAGCTCATGTGCAACATAAC 3'
NotIhpr	5' GAGGCGGCCGCTCAGGCAGGAA 3'
NdeIapf	5' GGA ATT CCA TAT GCC CAC AGC ACC GTT GAG 3'
BamHIapf	5' CGG GAT CCC TAG CTG GCC GGC TCG CCA 3'
EcoRIrof	5' GCG CGA ATT CAT GGC ATT CAC ACG TAG ATC TTT CA 3'
HindIIIror	5' GCG CAA GCT TTC AGG CTT CCT GG CCA CG 3'
NdeIrof	5' GCG CCA TAT GGC ATT CAC ACG TAG ATC TTT CA 3'
NcoIrof	5' GCG CCC ATG GCA TT C ACA CGT AGA TCT TT CA 3'
XbaIrof	5' CGC TCTAGA ATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGG 3'

Danksagung

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

Herrn 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. Dieter Willbold für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Kofi Abokitse, Frau Dr. Andrea Weckbecker, Frau Dipl.-Biol. Julia Schümers und Herrn Dipl.-Biol. Latif Aydin für die schöne Zeit im gemeinsamen Büro sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit bei allen wissenschaftlichen Fragen;

Herrn PD Dr. Karsten Niefind, Frau Sabine Lohmar und Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg, Universität zu Köln, für die gute Zusammenarbeit bei der Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der NOX.

Frau Claudia Jonik und Annika Sterlein für die technische Unterstützung und die freundliche Atmosphäre.

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

Frau Dipl.-Biol. Anne Lammerding für die Unterstützung bei den CD-Messungen.

Herrn Dipl.-Ing. Holger Gieren für die Unterstützung bei den Fermentationen.

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.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Frau Semra für das unerschütterliche Vertrauen, das sie mir stets entgegenbringen bedanken.