

**Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen
durch Wachstum-basierte Selektion**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Helge Henning

aus

Oberhausen

Düsseldorf, Mai 2007

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent: Prof. Dr. Hermann Sahm

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2007

für Nadine

Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des Interessanten und aktuellen Themas und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Zudem möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortschritt meiner Arbeit, die Unterstützung und die regen Diskussionen in den letzten Jahren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hermann Sahn danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Kompetenznetzwerkes Göttingen „Genomforschung an Bakterien zur Analyse der Biodiversität und ihrer Nutzung zur Entwicklung neuer Produktionsverfahren“.

Bei Herrn Dr. Christian Leggewie bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeiten und konstruktiven Diskussionen sowie die Durchsicht des Manuskriptes. Frau Dr. Martina Pohl und Herrn Dr. Thorsten Eggert danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Michael Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, danke ich für die gute Kooperation und für die Durchführung der Chiralen HPLC- und GC/MS-Messungen durch Frau Dr. Katja Gauchenova.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Hilfsbereitschaft im Laufe meiner Promotion bedanken. Für die experimentelle Unterstützung bei der Aufreinigung der BfdC danke ich Frau Ilona Frindi-Wosch und für die Unterstützung zur Bestimmung des Substratspektrums der Carboligase-Reaktion der BfdC Frau Dörte Gocke.

Bei Herrn Dr. Denis Tielker und Herrn Alexander Schulz bedanke ich mich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Familie, Nadines Familie und meinen Freunden möchte ich für die großartige Unterstützung in den letzten Jahren besonders danken.

Mein herzlichster Dank gilt Nadine, die mich jederzeit liebevoll unterstützt hat und immer für mich da ist.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

Henning, H., Leggewie, C., Pohl, M., Müller, M., Eggert, T., Jaeger, K.-E. (2006) Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7510-7517

Weitere Veröffentlichungen:

Leggewie, C., **Henning, H.**, Schmeisser, C., Streit, W.R., Jaeger, K.-E. (2006) A novel transposon for functional expression of DNA libraries. *J Biotechnol* **123**: 281-287

Posterpräsentationen:

Henning, H., Leggewie, C., Kötter, M., Jaeger, K.-E., Eggert, T. (2004) Metagenomic screening of thiamine diphosphate dependent enzymes using a *Pseudomonas putida* growth selection system. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2004, Braunschweig, p. 116

Henning, H., Wendorff, M., Eggert, T., Jaeger K.-E., Leggewie, C. (2005) Development of a growth selection system for benzoylformate decarboxylase (BFD) activity useful in high throughput screening of metagenome libraries. Tagungshandbuch, BioPerspectives 2005, Wiesbaden, p. 224

Wendorff, M., Dresen, C., Gocke, D, **Henning, H.**, Jaeger, K.-E., Köhl, S., Lütz, S., Müller, M., Pohl, M., Eggert, T. (2005) Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*: improvement of substrate specificity by directed evolution. Book of abstracts, 9. Symposium des SFB 380, Aachen, p. 241

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen IV

Abkürzungen VI

1. Einleitung..... 1

1.1 Enzyme in der Biotechnologie 1

1.2 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme als Biokatalysatoren 3

1.3 Benzoylformiatdecarboxylasen (BFD) 5

 1.3.1 Vorkommen der BFD 5

 1.3.2 Struktur der BFD 7

 1.3.3 Das aktive Zentrum der BFD 8

 1.3.4 Der Katalysemechanismus 9

 1.3.5 Biotechnologisches Potenzial der BFD 10

1.4 Ressourcen für neue Biokatalysatoren 12

1.5 Der Metagenomansatz 13

 1.5.1 Isolierung von metagenomischer DNA 14

 1.5.2 Sequenz- kontra Funktions-basiertem Screening 15

 1.5.3 Screening-Methoden 17

 1.5.4 Bilanz des Metagenomsansatz 19

1.6 Aufgabenstellung 20

2. Material und Methoden 22

2.1 Chemikalien und Enzyme 22

2.2 Bakterienstämme und Plasmide 22

2.3 Oligonukleotide 25

2.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien 26

 2.4.1 Selektionsmedium für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität 27

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren 27

 2.5.1 Plasmid-DNA 27

 2.5.2 Chromosomale DNA 28

 2.5.3 Metagenom DNA 28

2.6 Präzipitation von Nukleinsäuren 28

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 28

2.8 *In vitro*-Rekombination von DNA 28

2.9 Konstruktion von Genomgenombibliotheken von *P. putida* ATCC12633 und *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* und Metagenombibliotheken 29

2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA 29

 2.10.1 Chemische Transformation von *E. coli* 29

 2.10.2 Elektroporation von *E. coli* 29

 2.10.3 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation 29

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 30

2.12 Konstruktion des Benzoylformiatdecarboxylasen defizienten Stammes *P. putida* ATCC12633 30

2.13 Sequenzierung von DNA 31

2.14 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 31

2.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.16	Gewinnung von Gesamtzellextrakten	31
2.17	Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen	31
2.18	Chromatographische Reinigung von BfdC	32
2.19	Nachweis und Bestimmung von Decarboxylaseaktivität	32
2.19.1.	Gekoppelter Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität	32
2.19.2	Direkter Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität	33
2.19.3	Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Decarboxylase-Reaktion	33
2.19.4	Bestimmung des pH-Einflusses auf die Enzymstabilität	34
2.19.5	Temperaturabhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität	34
2.19.6	Bestimmung der Aktivierungsenergie für Decarboxylierung	34
2.19.7	Bestimmung der Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ der thermischen Inaktivierung	34
2.19.8	Substratspektrum der Decarboxylierung	34
2.19.9	Bestimmung der kinetischen Konstante: K_m	35
2.19.10	High throughput Screening (HTS) Assay zum Nachweis von Decarboxylaseaktivität	35
2.20	Nachweis von Carboligaseaktivität	36
2.20.1	Chirale HPLC	36
2.20.2	GC/MS	36
2.20.3	TTC-Assay zum Nachweis von Carboligaseaktivität	36
2.21	Computerprogramme und Online-Datenbanken	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	Entwicklung eines Wachstum-basierten Selektionssystems zur Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen	38
3.1.1	Konstruktion des BFD-defizienten Stamm <i>Pseudomonas putida</i> $\Delta mdIC$	38
3.1.2	Identifizierung eines alternativen Selektionstammes	40
3.1.3	Eignung der <i>P. putida</i> Stämme KT2440 und DSM50198 für das Selektionssystem	43
3.2	Adaption des Selektionssystem auf Benzaldehydlyasen (BAL)	44
3.3	Konstruktion einer Genom-Bibliothek von <i>P. putida</i> ATCC12633 und <i>P. putida</i> ATCC12633 $\Delta mdIC$ und Screening	45
3.3.1	Konstruktion der Genom-Bibliotheken von <i>P. putida</i> ATCC12633 und <i>P. putida</i> ATCC12633 $\Delta mdIC$	46
3.3.2	Durchmusterung der Genom-Bibliotheken von <i>P. putida</i> ATCC12633 und <i>P. putida</i> ATCC12633 $\Delta mdIC$ auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität	47
3.4	Identifizierung der neuen Benzoylformiatdecarboxylase-Gene	48
3.5	Konstruktion von Metagenom-Bibliotheken und Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität	51
3.5.1	Konstruktion von Plasmid-basierten Metagenom-Bibliotheken	51
3.5.2	Screening von Metagenom-Bibliotheken auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität mit dem Wachstums-basierten Selektionssystems	52
3.6	Identifizierung der neuen Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität aus dem Metagenom	54
3.7	Analyse der Primärstrukturen der neu identifizierten Benzoylformiat-decarboxylasen	55
3.8	Heterologe Expression der neuen Benzoylformiatdecarboxylasen	57
3.8.1	Überexpression von BfdB aus <i>P. putida</i> ATCC12633	57
3.8.2	Produktion von BfdM im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	59
3.8.3	Überexpression von BfdC im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	60
3.9	Aufreinigung der BfdC mittels Affinitätschromatographie	62
3.10	Biochemische Charakterisierung der BfdC aus <i>P. putida</i> ATCC12633	65
3.10.1	Bestimmung der kinetischen Konstanten der BfdC	65
3.10.2	Bestimmung des pH-Optimums der BfdC bei der Decarboxylierung	66
3.10.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der BfdC	66
3.10.4	Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der BfdC	67
3.10.5	Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der BfdC	69
3.10.6	Das Substratspektrum der Decarboxylase-Reaktion von BfdC	70

3.11	Untersuchung der Carboligase-Aktivität der BfdC aus <i>P. putida</i> ATCC12633	72
3.11.1	Substratspektrum der Carboligase-Reaktion der BfdC	72
3.11.2	Bestimmung der Chemo- und Enantioselektivität der Carboligation der BfdC	74
4.	Diskussion	75
4.1	Entwicklung und Etablierung des Wachstum-basierten Selektionssystems	76
4.2	Identifizierung neuer BFDs im Genom von <i>P. putida</i> ATCC12633	78
4.3	Konstruktion von Metagenom-Bibliotheken und Screening auf BFD-Aktivität	82
4.4	Vergleich der Primärstruktur der neu identifizierten BFDs mit der BFD aus <i>P. putida</i> ATCC12633	85
4.5	Produktion der neuen Benzoylformiatdecarboxylasen	87
4.6	Das katalytische Potenzial der BfdC	90
4.7	Identifizierung weiterer Enzym-Aktivitäten mit Hilfe des Selektionssystems	93
4.8	Ausblick	95
5.	Zusammenfassung	97
6.	Summary	98
7.	Literaturverzeichnis	99
8.	Anhang	i

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Struktur des Thiamindiphosphats (A) und allgemeines Reaktionsschema der ThDP-abhängigen Enzymreaktion (B)	3
Abb. 2	Mandelat- und β -Keto adipatabbauweg von <i>Pseudomonas putida</i> ATCC12633	7
Abb. 3	Das Homotetramer der BFD aus <i>P. putida</i> ATCC12633	8
Abb. 4	Das aktive Zentrum der BFD aus <i>P. putida</i> ATCC 12633	9
Abb. 5	Mögliche Anwendung von 2-Hydroxyketonen zur Synthese pharmakologisch aktiver Wirkstoffe (Stillger, 2004)	11
Abb. 6	Phylogenetischer Stammbaum der Bakterien von kultivierten und bisher unkultivierten Gruppen (Schloss & Handelsman, 2004)	14
Abb. 7	Wachstum-basiertes Selektionssystem in <i>P. putida</i> ATCC 12633	39
Abb. 8	Nachweis der Insertion der Ω Gm ^F -Kassette in das <i>mdlC</i> -Gen von <i>P. putida</i> ATCC12633	40
Abb. 9	Vorkommen des Mandelat- und β -Keto adipatweg in verschiedenen <i>P. putida</i> Stämmen	42
Abb. 10	Wachstum der <i>P. putida</i> Stämme KT2440 und DSM50198 mit Plasmid-kodierter BFD auf dem Selektionsmedium	43
Abb. 11	BAL katalysierte Spaltung der Acyloin-Bindung von Benzoin	44
Abb. 12	Wachstum der rekombinanten <i>P. putida</i> KT2440 pBBRBfd ⁺ und pBBR60106 auf Selektivagarplatten	48
Abb. 13	Organisation der ORFs im Insert des Plasmids pBBRbfd ⁺ , welches Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität vermittelt und Datenbank-Homologien	49
Abb. 14	Organisation der ORFs im Insert des Plasmids pBBR60106, welches Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität vermittelt und Datenbank-Homologien	50
Abb. 15	Wachstum des rekombinanten <i>P. putida</i> KT2440 pBBR8.4 auf Selektivagarplatten	53
Abb. 16	Organisation der ORFs im Insert des Plasmids pBBR8.4, welches Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität vermittelt und Datenbank-Homologe	54
Abb. 17	Sequenzvergleich von BfdA (MdlC), BfdB, BfdC aus <i>Pseudomonas putida</i> ATCC12633 (gekennzeichnet als Pp), BFD aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) und BfdM isoliert aus einer Metagenom-Bibliothek	56
Abb. 18	SDS-Page Analyse der Überexpression von BfdB aus <i>P. putida</i> ATCC12633 im heterologen Wirt <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	58
Abb. 19	SDS-Page Analyse der Überexpression von BfdM im heterologen Wirt <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	59
Abb. 20	SDS-PAGE Analyse der Expression von BfdC mit Chaperonen und Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung	62
Abb. 21	SDS-PAGE Analyse der Reinigung von BfdC über eine Ni ²⁺ -NTA-Säule	63
Abb. 22	SDS-PAGE Analyse der Reinigung der BfdC mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie und Sephadex G-25	64
Abb. 23	Bestimmung der kinetischen Konstanten V_{max} und K_m der BfdC mittels des gekoppelten Enzymtests	65
Abb. 24	Abhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität der BfdC vom pH-Wert	66
Abb. 25	Stabilität der BfdC in Abhängigkeit vom pH-Wert	67
Abb. 26	Temperaturabhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität der BfdC	68
Abb. 27	Bestimmung der Aktivierungsenergie der BfdC für die Decarboxylierung von Benzoylformiat nach Arrhenius	68
Abb. 28	BfdC-Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur und Ermittlung der Halbwertszeit der thermischen Inaktivierung	70
Abb. 29	TTC-Test zur Bestimmung des Substratspektrums der Carboligase-Reaktion der BfdC	73
Abb. 30	Analyse der Carboligation von Benzaldehyd mit Acetaldehyd und der Selbstligation von Benzaldehyd durch die BfdC	74
Abb. 31	Schematische Darstellung der BFD umgebenden Genomregion einiger ausgewählter Bakterien	81
Abb. 32	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure und Benzoylformiat	83
Abb. 33	Modell des Homotetramers der BfdC	86
Abb. 34	Vergleich des C-Terminus verschiedener BFDs	90
Abb. 35	Mutmaßliche Katalyse durch die BfdC der gemischten Ligation von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und Acetaldehyd zum (<i>S</i>)-Enantiomer des HPP-Analogen	93
Abb. 36	Möglichkeiten des Wachstum-basierten Selektionssystems zur Identifizierung von Enzym-Aktivitäten durch Einsatz von verschiedenen Substraten als einzige C-Quelle	94
Abb. 37	Konstruktion des BFD-defizienten Stamm	i

Abb. 38	Karte des rekombinanten Plasmid pET22bfdC	iv
Tab. 1	Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme	5
Tab. 2	Übersicht einiger aus dem Metagenomansatz identifizierter Enzyme mit industrieller Anwendungsmöglichkeit	19
Tab. 3	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	22
Tab. 4	Übersicht der verwendeten Vektoren	23
Tab. 5	Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide	24
Tab. 6	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	25
Tab. 7	Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika	27
Tab. 8	Überblick über einige erstellte Metagenombibliotheken aus einer Bodenprobe nahe Jülich	52
Tab. 9	Ausbeute bei der Reinigung der BfdC	63
Tab. 10	Substratspektrum der BfdC und BfdA für die Decarboxylasereaktion	71
Tab. 11	Übersicht über das Carboligation-Substratspektrum der BfdA und BfdC	73
Tab. 12	Übersicht einiger kinetischer Parameter von BfdC und BfdA	91

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstabencode abgekürzt.

A. dest	Aqua destillata
Abb.	Abbildungen
ADH	Alkoholdehydrogenase
Ap	Ampicillin
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
Cm	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Cs	Cycloserin
C-terminus	Carboxyterminus
d	Tag(e)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
GC	Gaschromatografie
Gm	Gentamycin
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde(n)
HIADH	Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
2-HPP	2-Hydroxypropiofenon
HTS	High throughput Screening
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
KPi	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria-Bertani <i>broth</i>
NADH	Nicotinamidadenosindinukleotid (reduzierte Form)
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
N-terminus	Aminoterminus
O.D.	Optische Dichte

<i>orf</i>	<i>open reading frame(s)</i> , offene(r) Leserahmen
PAC	Phenylacetylcarbinol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Pyruvatdecarboxylase
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
ScPDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
ThDP	Thiamindiphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid
U	Unit
ÜK	Übernachtskultur
ü.N	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
ZmPDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>

1. Einleitung

1.1 Enzyme in der Biotechnologie

Enzyme setzen in Zellen ein gegebenes Substrat mit hoher Aktivität, Spezifität sowie Regio- und Enantioselektivität um. Jedoch auch außerhalb der Zelle können viele Enzyme aktiv sein. Bei der industriellen Anwendung werden Enzyme auch als Biokatalysatoren bezeichnet. Es wird bei der Biokatalyse oder Biotransformation zwischen der Anwendung von Ganz-Zell-Systemen und isolierten Enzymen unterschieden. Die industrielle Nutzung von Biokatalysatoren wird auch als „weiße Biotechnologie“ bezeichnet (Schepens *et al.*, 2003). Biokatalysatoren haben gegenüber chemischen Katalysatoren oft Vorteile. So arbeiten sie bei gemäßigter Temperatur und normalem Druck und können sowohl in wässrigem Milieu als auch in Lösungsmitteln aktiv sein. Biokatalytische Prozesse sind daher meist ökologisch und ökonomisch effizienter als chemische Verfahren, die dieselbe Reaktion katalysieren. Zudem weisen sie in der Regel höhere Reaktionsgeschwindigkeiten auf und besitzen weitere Vorzüge bezüglich ihrer Stereo- und Regioselektivität. Die chemische Industrie hat begonnen, zunehmend mehr Biokatalysatoren für hydrolytische und synthetische Reaktionen einzusetzen.

Schon lange werden Enzyme, wenn auch unbewusst, bei verschiedenen Verfahren eingesetzt. So werden seit mehr als 5000 Jahren Mikroorganismen und deren Enzyme für die Herstellung von Bier, Wein und Brot genutzt (Ulber & Soyes, 2004). Im Jahr 1810 entdeckte Joseph Gay-Lussac Ethanol und CO₂ als Hauptprodukte des Zuckerabbaus durch die Hefe. Jacob Berzelius fand 1835 heraus, dass die Hydrolyse von Stärke besser durch isolierten Malzextrakt, die sogenannte Diastase (Amylase), katalysiert wird als durch Schwefelsäure. Dass Mikroorganismen für viele Umwandlungen verantwortlich sind, wurde dann erst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhundert, unter anderem von Louis Pasteur, postuliert (Pasteur, 1858). Aus dem griechischen Wort für in (*en*) und Hefe (*zyme*) prägte Wilhelm Friedrich Kühne 1878 den Begriff „Enzym“, um darzustellen, dass die Hefe etwas zu produzieren vermag, was die Fermentationsreaktionen katalysiert. 1897 konnte dann Eduard Buchner einen zellfreien Hefeextrakt gewinnen, mit dem die Synthese von Ethanol aus Glucose möglich war. Der erste Fermentationsprozess zur Herstellung chemischer Verbindungen erfolgte dann 1921 von Neuberg und Hirsch. Sie entdeckten die hefekatalysierte Kondensreaktion von Pyruvat und Benzaldehyd zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-Pac), eine Vorstufe des (*L*)-Ephedrin. (*L*)-Ephedrin wird als Wirkstoff in Husten- und Asthmaarzneimitteln verwendet. Dieses Verfahren wurde seit 1930 von der Knoll AG

industriell genutzt (Hildebrandt & Klavehn, 1930). Bis heute wird (*L*)-Ephedrin durch dieses Verfahren hergestellt.

Heutzutage werden Vorstufen für enantiomerenreine Pharmazeutika, Feinchemikalien, zahlreiche chirale Zwischenprodukte und Lebensmittelzusätze mit Hilfe von Biokatalysatoren produziert. Andere Industriezweige, die Biokatalysatoren nutzen, sind unter anderem: Lebensmittel-, Textil-, Waschmittel- und Papierindustrie sowie bei der Produktion von Biokraftstoffen. In der Pharmaindustrie tragen Biokatalysatoren zur Synthese von einer Vielzahl von Präparaten bei, wie z. B. antiinfektiöse und cholesterinsenkende Wirkstoffe, Psychopharmaka und Zytostatika (Patel, 2006; Pollard & Woodley, 2007). Ein Beispiel für den Einsatz von Biokatalysatoren in der Pharmaindustrie ist die Bereitstellung von semi-synthetischem Penicillin, katalysiert durch die Penicillin-Amidase (Boesten *et al.*, 1996). Biokatalysatoren werden zur Synthese von Feinchemikalien und Polymeren von der chemischen Industrie angewendet (Kaplan *et al.*, 1998; Schulze *et al.*, 1998; Panke *et al.*, 2004). Zum Beispiel werden Peroxidasen industriell in der Synthese von phenolischen Harzen genutzt, die als Ersatz für den herkömmlichen Phenol-Formaldehyd dienen (Pokora & Cyrus, 1987). Weiterhin ist die Nitril-Hydratase zu nennen, welche die Hydrierung von Acrylonitril zu Acrylamid katalysiert (Nagasawa & Yamada, 1990). Der Konzern DSM benutzt Ammoniak-Lysase für die Produktion von (*L*)-Asparaginsäure. Das Chemieunternehmen Degussa stellt mit Hilfe von Biokatalysatoren mehrere Aminosäuren her (Drauz *et al.*, 2002). So werden durch die Acylase und Hydantoinase enantiomerenreine Aminosäuren produziert und die Leucin-Dehydrogenase wird zur Produktion von (*L*)-*tert*-Leucin angewendet. Die Produktion einiger Prozesse beläuft sich auf mehrere tausend Tonnen pro Jahr, was die technologischen Möglichkeiten und die steigende Akzeptanz von Biokatalysatoren in der organischen Chemie demonstriert (Schmid *et al.*, 2002; Soetaert & Vandamme, 2006). Nach einer Marktstudie von Festel Capital (2004) betrug 2001 der Anteil biotechnologisch hergestellter Chemikalien 2,5 % des Gesamtmarktes. Bis 2010 wird ein Anstieg auf ca. 20 % prognostiziert. Bei Feinchemikalien, vor allem enantiomerenreinen Pharmawirkstoffen, liegt die Wachstumsprognose deutlich höher: von 16 % in 2001 auf 60 % im Jahr 2010 (Festel *et al.*, 2004).

Eine der zentralen und bedeutendsten Reaktionen in der synthetischen organischen Chemie ist die enantioselektive Knüpfung von C-C-Bindungen. (Faber & Kroutil, 2005) Unter den Enzymen, die in der chemoenzymatischen Synthese für die Bildung von chiralen aliphatischen und aromatischen Verbindungen genutzt werden, sind vor allem die Aldolasen, Oxynitrilasen und Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Enzyme zu nennen.

1.2 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme als Biokatalysatoren

Neben Aldolasen oder Aldehydlyasen (EC 4.1.2) und Oxynitrilasen oder Hydroxynitril-Lyasen (EC 4.1.2.10) sind vor allem Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme in der Lage, sowohl C-C-Bindungen zu spalten als auch zu knüpfen (Jordan, 2003). Sie spielen deshalb eine zunehmend wichtige Rolle in der chemoenzymatischen Synthese. Bei der Spaltung und Knüpfung von C-C-Bindungen aktiviert der Co-Faktor Thiamindiphosphat Aldehyde und Ketone (R-CO-X) und überträgt diese dann auf ein anderes Molekül (Abb. 1). Dabei entsteht durch Bindung des Substrats und unter Abspaltung der Gruppe X ein „aktiver Aldehyd“ am ThDP. Durch verschiedene Reagenzien (Y) kann der „aktivierte Aldehyd“ wieder vom ThDP freigesetzt werden. Das Protein, welches das ThDP als Cofaktor bindet, bestimmt die Substratspezifität, Produktspektrum und Stereoselektivität.

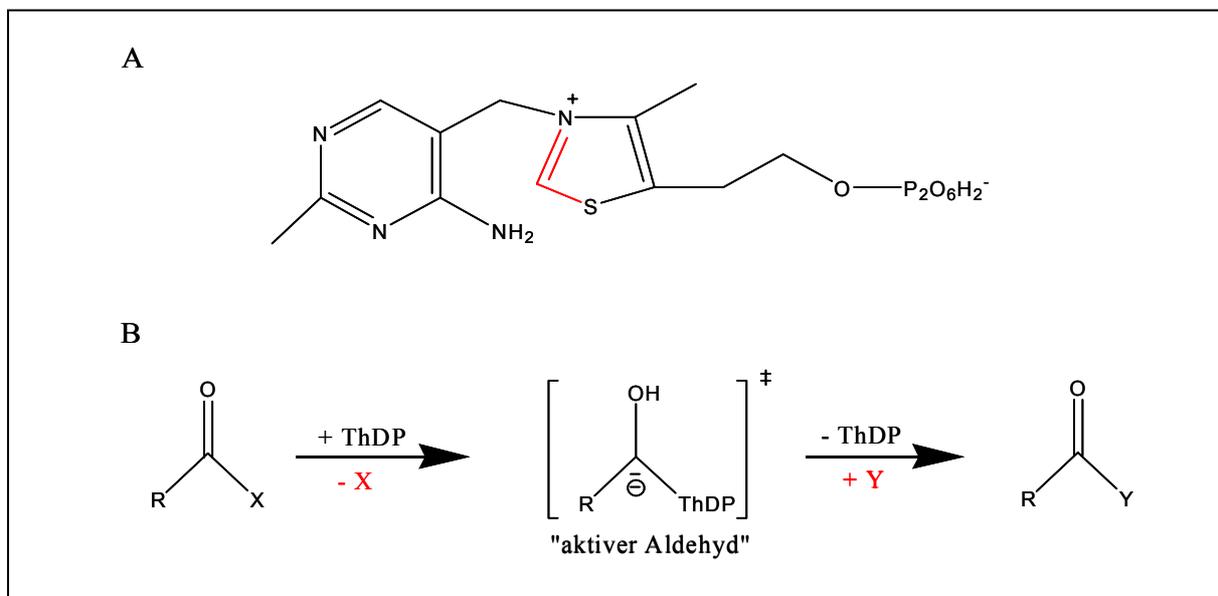


Abb. 1: Struktur des Thiamindiphosphats (A) und allgemeines Reaktionsschema der ThDP-abhängigen Enzymreaktion (B). **A:** Der Cofaktor Thiamindiphosphat besteht aus einem Aminopyrimidin- und einem Thiazolring, sowie einem Phosphatrest. **B:** Bei der durch Thiamindiphosphat katalysierten Reaktion wird im Allgemeinen ein „aktiver Aldehyd“ am ThDP als reaktives Intermediat gebildet. Die Bindung des „aktivierten Aldehyds“ erfolgt am C2-Atom des Thiazolrings.

Von besonderer Bedeutung sind vor allem Transketolasen und 2-Ketosäuredecarboxylasen. Transketolasen (EC 2.2.1.1) kommen im Pentosephosphatweg von unterschiedlichen Organismen vor, z. B. bei Hefen, Pflanzen und Säugetieren (Schenk *et al.*, 1998). Interessant ist die Transketolase für die Biokatalyse, da sie ein breites Spektrum an aromatischen und aliphatischen Aldehyden akzeptiert. Ebenfalls werden auch nicht hydroxylierte Aldehyde von der Transketolase umgesetzt (Schorken & Sprenger, 1998). Die 2-Ketosäuredecarboxylasen katalysieren die nicht oxidative Decarboxylierung von 2-Ketocarbonsäuren zu den

entsprechenden Aldehyden. Zu den bekanntesten Vertretern der 2-Ketosäuredecarboxylasen gehören die Pyruvatdecarboxylasen und die Benzoylformiatdecarboxylasen. Die Pyruvatdecarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1) ist ein weit verbreitetes, ThDP-abhängiges Enzym, das in Hefen, Pflanzen und im obligat anaeroben Bakterium *Zymomonas mobilis* vorkommt. Sie katalysiert die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd, welches im weiteren Verlauf durch eine Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert wird. Neben dieser Hauptreaktion hat die PDC auch die Fähigkeit zur C-C-Verknüpfung in Form einer Acyloinkondensation. Hierbei wird der ThDP-gebundene „aktive Aldehyd“, welcher sich nach der Abspaltung des Kohlendioxids vom Pyruvat bildet, unter Entstehung eines 2-Hydroxyketons auf das zweite Aldehydmolekül übertragen. Chirale 2-Hydroxyketone sind wichtige Synthons in der organischen Synthese (Dünkelmann *et al.*, 2004). Die erste bekannte Biotransformation mit Hilfe von ThDP-abhängigen Enzymen, die im industriellen Maßstab etabliert wurde und eines der ersten großtechnischen biotechnologischen Verfahren überhaupt darstellt, ist das Herstellungsverfahren von (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) mittels Hefezellen, das bis in die Gegenwart betrieben wird (Hildebrandt & Klavehn, 1930). (*R*)-PAC ist ein 2-Hydroxyketon, das sich durch reduktive Aminierung in (*L*)-Ephedrin (einen Wirkstoff in Husten- und Asthmaheilmitteln) überführen lässt. Die Ligasereaktion zwischen Acetaldehyd und Benzaldehyd, die zur Bildung von (*R*)-PAC führt, wird von der Pyruvatdecarboxylase katalysiert.

In Tabelle 1 ist eine Übersicht einiger ThDP-abhängiger Enzyme, der von ihnen katalysierten Reaktionen, der entsprechenden Stoffwechselwege und deren Vorkommen in den unterschiedlichsten Organismen dargestellt.

Tab.1: Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme. (X= Abgangsgruppe; Y= Übertragene Gruppe)

Enzyme (E.C. Nummer)	Stoffwechselweg	X	Y	Referenz
Acetohydroxysäuresynthetase [4.1.3.18]	Synthese verzweigt- kettiger Aminosäuren	CO ₂	CH ₃ -CO-CO ²⁻	Duggleby <i>et al.</i> , 2003
Transketolase [2.2.1.1]	Pentosephosphatweg	R ¹ -CHO	R ² -CHO	Schörken & Sprenger, 1998
Pyruvatoxidase [1.2.3.3]	Atmungskette	CO ₂	PO ₄ ³⁻	Tittmann <i>et al.</i> , 2000
Benzaldehydlyase [4.1.2.38]	Unbekannt	PhCHO	H ⁺	Mosbacher <i>et al.</i> , 2005
Pyruvatdehydrogenase [1.2.4.1]	Citratzyklus	LipSH	CO ₂	Jordan, 2003
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
<i>Decarboxylasen</i>				
Pyruvatdecarboxylase [4.1.1.1]	Alkoholische Gärung	CO ₂	H ⁺	König, 1998
Benzoylformiatdecarboxylase [4.1.1.7]	Mandelsäureabbau	CO ₂	H ⁺	McLeish <i>et al.</i> , 2004
Indolpyruvatdecarboxylase [4.1.1.74]	Phytohormonsynthese	CO ₂	H ⁺	Schütz <i>et al.</i> , 2003

1.3 Benzoylformiatdecarboxylasen (BFD)

Die Benzoylformiatdecarboxylasen (BFD, EC 4.1.1.7) gehören ebenfalls zu den ThDP-abhängigen 2-Ketosäuredecarboxylasen. Die BFD katalysiert die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO₂. Dabei wird durch die Protonierung des ThDP der aktivierte Aldehyd freigesetzt (Abb. 1). Ebenso wie die PDC ist die BFD in der Lage, 2-Hydroxyketone durch Carboligation zu bilden.

1.3.1 Vorkommen der BFD

Die erste BFD-Aktivität wurde in *Pseudomonas putida* ATCC12633 nachgewiesen (Hegeman *et al.*, 1966a, b; 1970). Pseudomonaden sind ubiquitär verbreitete Bakterien, die zu der γ -Unterklasse der Proteobakterien gehören (Palleroni, 1984). Es handelt sich bei ihnen um Gram-negative, aerobe, chemoorganotrophe Bakterien. *P. putida* kann eine große Vielfalt an organischen Verbindungen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Der

P. putida Stamm ATCC12633 besitzt einen Stoffwechselweg, der es ermöglicht (*R*)-Mandelat zu metabolisieren und als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die BFD ist das dritte Enzym des Mandelatabbauweges. (*R*)-Mandelat wird durch die Mandelatracemase (*mdlA*) in sein Enantiomer (*S*)-Mandelat umgewandelt (Abb. 2). Dieses wird durch eine (*S*)-Mandelatdehydrogenase (*mdlB*) zu Benzoylformiat oxidiert, welches dann durch die BFD (*mdlC*) unter Abspaltung von CO₂ zu Benzaldehyd reduziert wird. Der entstandene Benzaldehyd wird durch die NAD⁺ und NADP⁺-abhängige Benzaldehyddehydrogenase (*mdlD*, *mdlE*) zu Benzoat umgewandelt. (Tsou *et al.*, 1990). Schließlich wird das Benzoat im β -Ketoacidat-Weg über mehrere Zwischenprodukte zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA umgewandelt und im Citrat-Zyklus verstoffwechselt (Stanier & Ornston, 1973). *P. putida* ATCC12633 ist daher in der Lage auf Benzoylformiat als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Des Weiteren wurde BFD-Aktivität in *Pseudomonas aeruginosa* (Barrowman *et al.*, 1986) und *Acinetobacter calcoaceticus* (Barrowman & Fewson, 1985) nachgewiesen. *P. aeruginosa* verfügt jedoch über kein Mandelatoperon und über die Lokalisation der BFD im Genom von *A. calcoaceticus* gibt es keine Informationen. Aufgrund der zahlreichen Sequenzierungsprojekte sind mehrere putative BFDs in den Datenbanken veröffentlicht, jedoch ohne den Nachweis der Aktivität. Von Wendorff wurden 2006 die BFDs von *P. aeruginosa* PAO1 und *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 kloniert. Die BFD von *P. aeruginosa* PAO1 konnte erfolgreich in *E. coli* heterolog exprimiert und BFD-Aktivität nachgewiesen werden. Bei der BFD von *B. japonicum* USDA 110 konnte keine Aktivität, aufgrund der Bildung von „inclusion bodies“ bei der Expression in *E. coli*, nachgewiesen werden. Tsou *et al.* klonierten 1990 das korrespondierende Gen *mdlC* der BFD von *P. putida* ATCC12633 und die in den nächsten Kapiteln beschriebenen Ergebnisse gehen aus den Untersuchungen dieser BFD hervor.

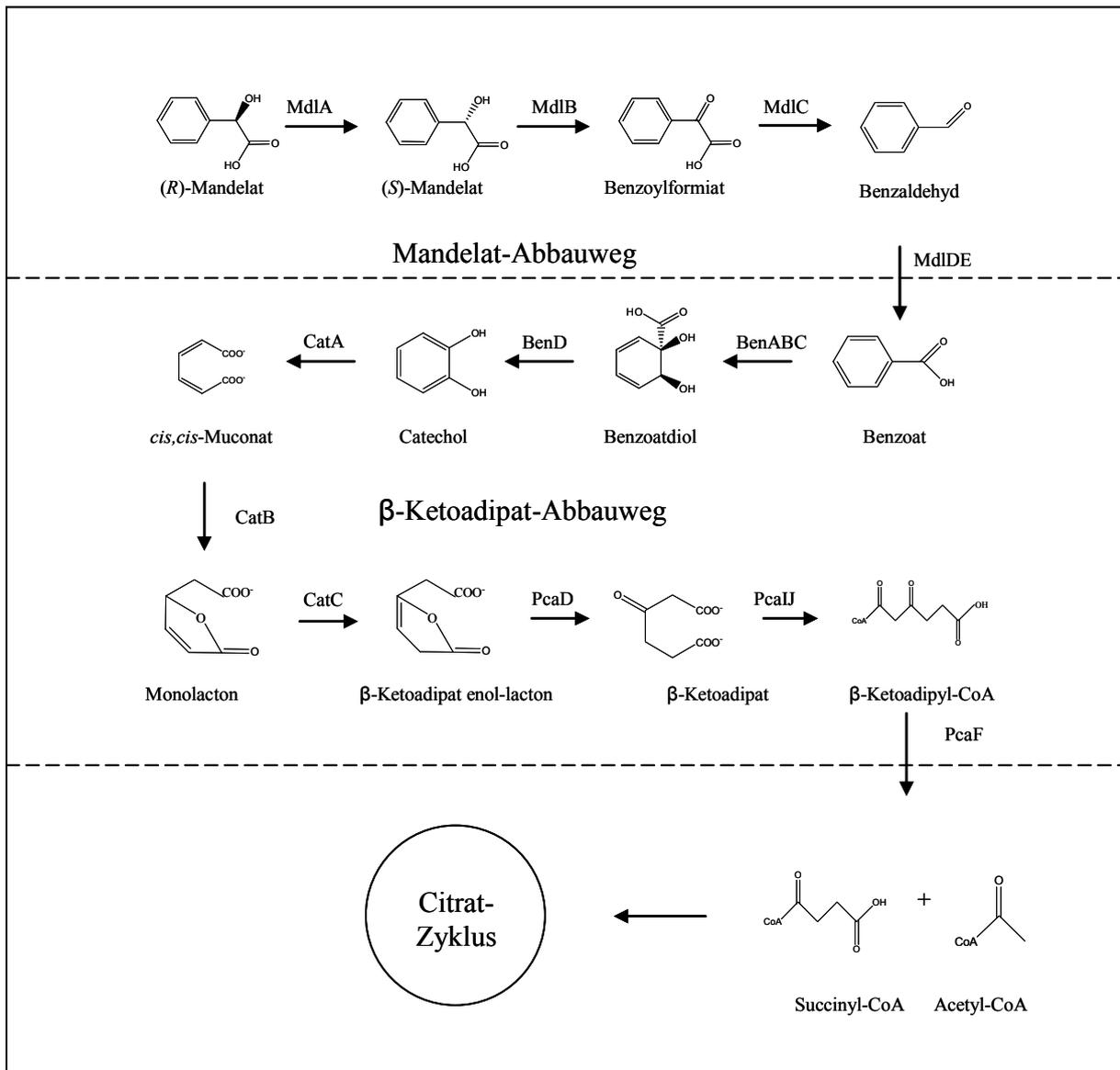


Abb. 2: Mandelat- und β-Ketoadipatabbauweg von *Pseudomonas putida* ATCC12633. Dargestellt ist der Abbau von *R*-Mandelat über Benzoylformiat bis schließlich zum Succinyl-CoA und Acetyl-CoA, welches dann im Citrat-Zyklus verstoffwechselt wird. MdlA: Mandelatracemase, MdlB: *S*-Mandelatdehydrogenase, MdlDE: NAD⁺- und NADP⁺-abhängige Benzaldehyddehydrogenase, BenABC: Benzoatdioxxygenase, BenD: 2-Hydro-1,2-Dihydroxybenzoatdehydrogenase, CatA: Catechol-1,2-dioxygenase, CatB: *cis,cis*-Muconatlacton Enzym (Cycloisomerase), CatC: Muconolactonisomerase, PcaD: β-Ketoadipatenolaktonehydrolase I, PcaIJ: β-Ketoadipat-Succinyl-CoA Transferase Untereinheit, PcaF: β-Ketoadipyl-CoA Thiolase.

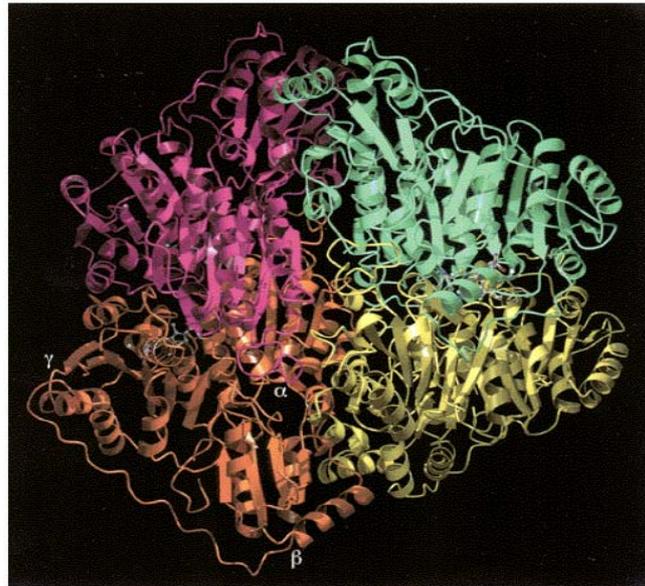
1.3.2 Struktur der BFD

Für die BFD von *Pseudomonas putida* ATCC12633 liegt die Kristallstruktur vor und wurde erstmalig von Hasson *et al.* 1998 veröffentlicht (Abb. 3). Es handelt sich bei der aktiven BFD um ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 224 kDa. (Hasson *et al.*, 1998; Polovnikova *et al.*, 2003). Zur katalytischen Aktivität sind als Cofaktoren je ein Mg²⁺-Ion und ein ThDP pro Untereinheit erforderlich. Die vier identischen Untereinheiten bestehen aus je 528 Aminosäuren. Jede Untereinheit ist aus jeweils drei Domänen zusammengesetzt, der

aminoterminalen α -Domäne, der mittleren β -Domäne und der carboxyterminalen γ -Domäne. Während α - und γ -Domäne topologisch gleichartig sind, unterscheidet sich die β -Domäne geringfügig durch eine abweichende Faltung. Die α -Domäne bindet den Pyrimidinring des Cofaktors ThDP während die γ -Domäne den Diphosphatrest des ThDP über den zweiten Cofaktor, das zweiwertige Magnesiumion (Mg^{2+}) bindet. Zur Ausbildung eines der vier aktiven Zentren interagiert wechselweise die α -Domäne eines Monomers mit der γ -Domäne der benachbarten Untereinheit. Die β -Domäne garantiert den intermolekularen Kontakt zweier Dimere zum Homotetramer. Die Struktur der BFD ist trotz geringer Ähnlichkeiten der Primärstrukturen identisch mit der Struktur der ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDC) (Arjunan *et al.*, 1996) und *Zymomonas mobilis* (ZmPDC) (Dobritzsch *et al.*, 1998). Ebenfalls tritt sie bei anderen ThDP-abhängigen Enzymen auf, wie der Benzaldehydlyase (Mosbacher *et al.*, 2005) und Pyruvatoxidase (Müller & Schulz, 1993) auf.

Abb. 3: Das Homotetramer der BFD aus *P. putida* ATCC12633.

Die BFD besteht aus vier identischen Untereinheiten. Jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt. In der orange dargestellten Untereinheit sind die drei Domänen (α , β , γ) gekennzeichnet, in die jede Untereinheit aufgeteilt ist. Jeweils zwei Untereinheiten bilden zusammen zwei aktive Zentren in der BFD (grün und gelb, sowie magenta und orange). Die Abbildung wurde aus Hasson *et al.* 1998 übernommen.



1.3.3 Das aktive Zentrum der BFD

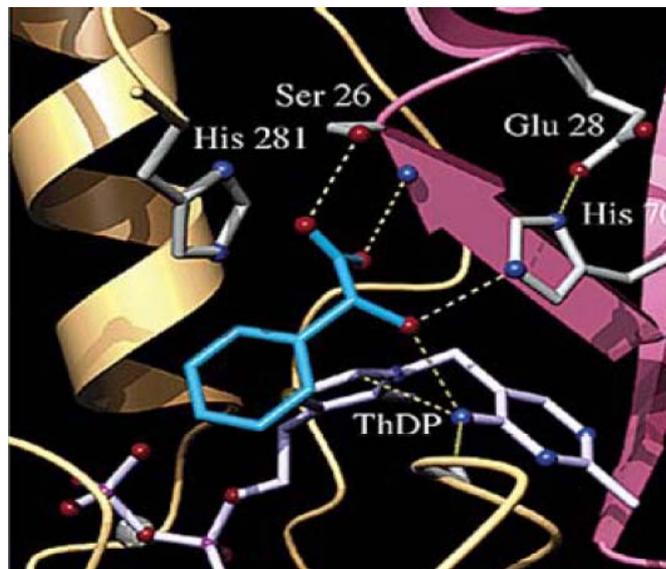
Im aktiven Zentrum liegt der Cofaktor ThDP vor, der über den Diphosphatrest von einem zweiwertigen Magnesiumion (Mg^{2+}) koordinativ gebunden ist. Die an der Metallionbindung beteiligten Aminosäuren der γ -Domäne sind hoch konserviert und bilden das für ThDP-abhängige Enzyme charakteristische Motiv (GDG X₂₆ NN) (Hawkins *et al.*, 1989). Über konservierte Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrimidinrings geht das ThDP Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung ein (Jordan, 2003) und wird zusätzlich mit einer

großen hydrophoben Aminosäureseitenkette (L403 in BFDpp) durch van-der-Waals Kräfte stabilisiert (Guo *et al.*, 1998). In dieser V-Konformation des ThDP (Shin *et al.*, 1977) ist die 4'-Aminogruppe des Pyrimidinrings, die an Deprotonierungs- und Protonierungsschritten der Katalyse beteiligt ist, dem reaktiven C-2-Atom des Thiazolrings direkt benachbart.

Für die Katalyse wichtige Aminosäuren sind außerdem das Serin an der Position 26 (S26), die beiden Histidinreste an den Positionen 70 und 281 (H70, H281) und ein Glutamatrest an Position 28 (E28). In Abb. 4 ist das aktive Zentrum mit einem gebundenen kompetitiven Inhibitor, dem (*R*)-Mandelat, dargestellt (Polovnikova *et al.*, 2003).

Abb. 4: Das aktive Zentrum der BFD aus *P. putida* ATCC 12633.

Dargestellt ist das aktive Zentrum, welches aus zwei Untereinheiten (gold und magenta) gebildet wird. Im aktiven Zentrum liegen der kompetitive Inhibitor (*R*)-Mandelat (blau) und der Cofaktor Thiamindiphosphat (grau) gebunden vor. Die für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste (S26, E28, H70 und H281) der BFD reichen in das aktive Zentrum hinein. Die Abbildung wurde aus Polovnikova *et al.* 2003 übernommen.



1.3.4 Der Katalysemechanismus

Die Decarboxylierung beginnt mit der Deprotonierung des C2-Atom durch die N4'-Iminogruppe des ThDPs. Durch den nukleophilen Angriff des C2-Ylids (Zwitterion) auf die Carbonylfunktion des Benzoylformiat entsteht durch Protonierung das erste Zwischenprodukt, das Mandelyl-ThDP. Als nächstes folgt die Decarboxylierung des Mandelyl-ThDP und es wird der „aktivierte Benzaldehyd“, ein Enamin-Carbanion, als Intermediat gebildet. Durch die Protonierung des aktivierten Benzaldehyd wird das Benzaldehyd abgespalten und mit der Regeneration des ThDP der Katalysezyklus geschlossen.

Aufgrund von Mutagenesestudien lassen sich Aussagen über die Funktion der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren treffen (Polovnikova *et al.*, 2003; McLeish *et al.*, 2004). So ist Serin 21 an der Substratbindung und bei der Decarboxylierung beteiligt. Das Histidin 70 ist in der

Protonenübertragung sowie bei der Freisetzung des Benzaldehyd involviert und wird dabei von Glutamat 28 unterstützt. Histidin 281 spielt eine Rolle bei der Protonierung des Enamins. Die Carboligation der BFD wurde erstmals von Wilcocks *et al.* 1992 beschrieben und seitdem intensiv untersucht (Demir *et al.*, 1999; Dünnwald *et al.*, 2000). Bei der Bildung von (*S*)-2-Hydroxypropiofenon ((*S*)-2 HPP) durch die Carboligation der BFD fungiert der Acetaldehyd anstelle des Protons im Decarboxylasezyklus als Acylakzeptor. Dabei wird das (*S*)-2 HPP mit einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von über 95 % gebildet (Iding *et al.*, 2000). Der Benzaldehyd fungiert als Donoraldehyd und kann bei der Carboligation durch ringsubstituierte Derivate (außer *ortho*-Position) ersetzt werden, wogegen der Acylakzeptor, Acetaldehyd nur begrenzt ersetzt werden kann (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000). Zwar funktionierte die Carboligation mit Benzaldehyd als Acylakzeptor zur Bildung (Demir *et al.*, 1999), jedoch war die Aktivität gegenüber Acetaldehyd als Acylakzeptor um ein Vielfaches geringer (Iding *et al.*, 2000). Mit Benzaldehyd als Acylakzeptor wird (*R*)-Benzoin durch die BFD gebildet (Demir *et al.*, 1999; Iding *et al.*, 2000).

1.3.5 Biotechnologisches Potenzial der BFD

Die beiden Decarboxylasen BFD und PDC bilden aus den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd zueinander tautomere Produkte mit entgegengesetzter Enantioselektivität. Die ThDP-abhängige Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens* ergänzt dieses Produktspektrum durch Bildung des zur BFD enantio-komplementären Produkts (*R*)-2-HPP (Demir *et al.*, 2002). Zusammen ermöglichen BFD, PDC und BAL den Zugang zu einer Vielzahl sich komplementierender 2-Hydroxyketone (Pohl *et al.*, 2002; 2004).

Anwendung finden chirale 2-Hydroxyketone als Synthesebausteine in der organischen-synthetischen Chemie. Durch die enantioselektive Reduktion der Ketogruppe bzw. reduktive Aminierung können chirale Dirole, bzw. Aminoalkohole hergestellt werden, die bei der Synthese von Liganden und chiralen Auxilliaren Verwendung finden (Kihumbu *et al.*, 2002). Ebenfalls können sie als chirale Bausteine für die Synthese von Pharmazeutika dienen, wie die von Stillger (2004) übernommene Abb. 5 zeigt. So ist es möglich aus 2-Hydroxyketonen unter anderem Antidepressiva (Fang *et al.*, 2000) und Lebermedikamente (Morazzoni & Bombardelli, 1995) herzustellen.

Die Anwendung der BFD-katalysierten Reaktionen konnte bereits im Großmaßstab durchgeführt werden (Kihumbu *et al.*, 2002), wodurch der Einsatz von enantiomerreinen 2-Hydroxyketonen in der Produktion von Pharmazeutika möglich ist, wie auch die Herstellung des Ephedrins durch BASF beweist.

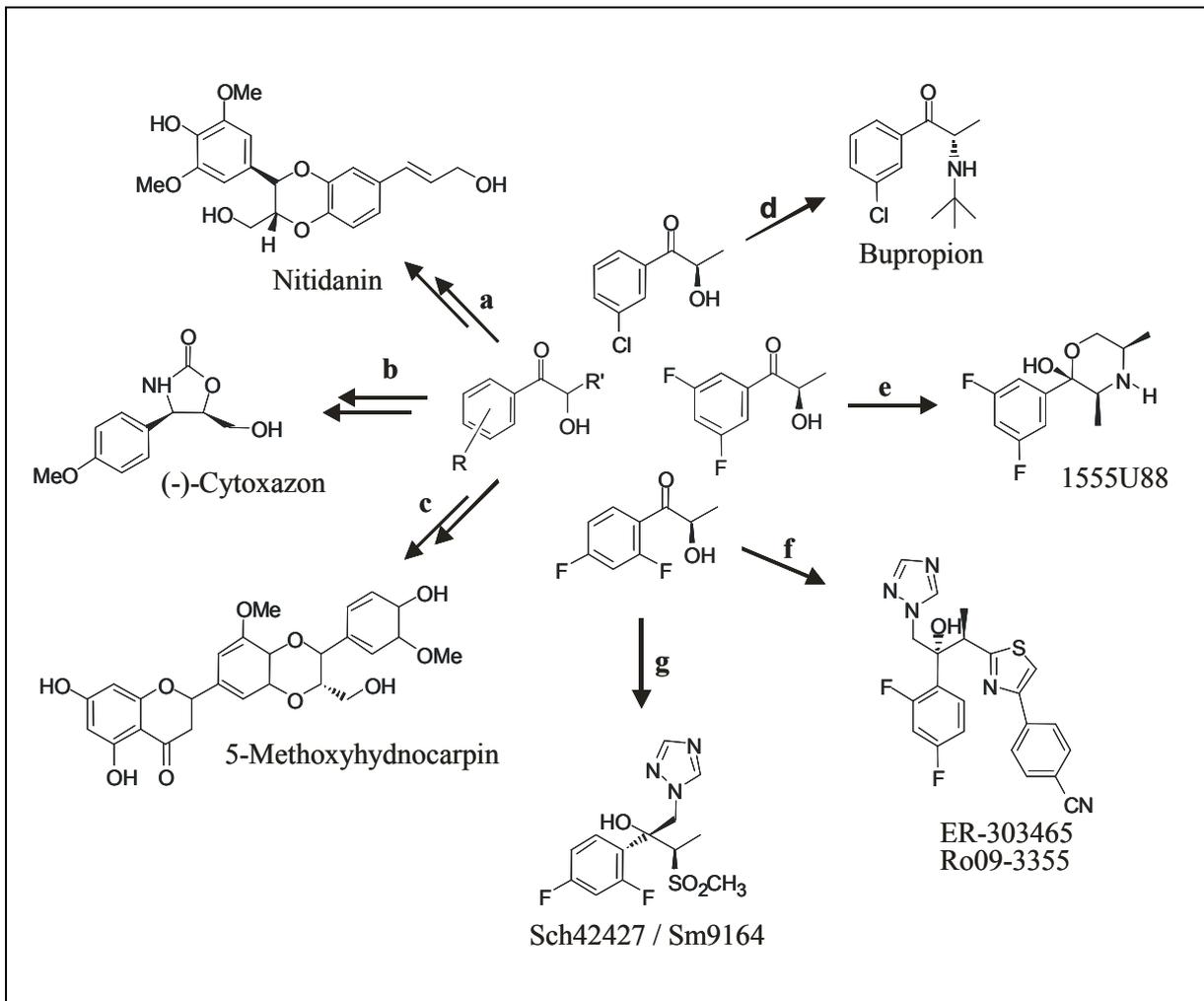


Abb. 5: Mögliche Anwendung von 2-Hydroxyketonen zur Synthese pharmakologisch aktiver Wirkstoffe (Stillger, 2004). a: Nitidanin dient als Wirkstoff in Lebermedikamenten (Morazzoni und Bombardelli, 1995). b: (-)-Cytosazon wird als Antiallergikum eingesetzt (Kakeya *et al.*, 1999). c: 5-Methoxyhydnocarpin unterstützt die Wirkung von Antibiotika, indem es als Inhibitor der MDR (multi drug pump) mikrobieller Zellen fungiert, die diesen Zellen Resistenz gegen Antibiotika verleiht (Stermitz *et al.*, 2000). d: Bupropion ist der aktive Wirkstoff in den Antidepressiva Wellburtin[®] und Zyban[®] (Glaxo Wellcome) (Fang *et al.*, 2000). e: 1555U88 ist ebenfalls ein Antidepressivum. f: Bei Ro 09-3355 handelt es sich um ein Fungizid (Leuenberger *et al.*, 1999). g: SM 8668 / Sch 39304 ist ebenfalls ein Fungizid (Gala *et al.*, 1996).

1.4 Ressourcen für neue Biokatalysatoren

Wie bereits beschrieben, werden Biokatalysatoren für die chemische Industrie immer interessanter. Viele Reaktionen können bisher jedoch nur schlecht oder noch gar nicht industriell genutzt werden. Für die multilateralen Anwendungen in der weißen Biotechnologie besteht daher ein enormer Bedarf an neuen Biokatalysatoren mit den entsprechenden Eigenschaften. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, werden unterschiedliche Ressourcen für neuartige Biokatalysatoren genutzt. Eine Methode um diesen Anforderungen gerecht zu werden, ist die gerichtete Evolution bereits bekannter Enzyme. Bei der gerichteten Evolution wird künstlich genetische Diversität erzeugt. Sie wird genutzt, um Biokatalysatoren bezüglich ihrer gestellten Anforderungen in der Biokatalyse zu optimieren. So wurde gerichtete Evolution zur Optimierung der Stereoselektivität (Jaeger & Eggert, 2004; Reetz, 2006), Veränderung der Substratspezifität (Cho *et al.*, 2004, Hancock *et al.*, 2006), Erhöhung der Aktivität (Ness *et al.*, 2002; Terao *et al.*, 2006) und Modifikation bezüglich ihrer pH-, Temperatur- und Lösungsmittelstabilität angewendet (Bessler *et al.*, 2003; Sriprapundh *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004; Stephens *et al.*, 2007). Jedoch müssen bei der gerichteten Evolution die zu modifizierenden Biokatalysatoren bereits verfügbar sein. Außerdem können durch diese Methode keine neuen Enzyme erzeugt werden.

Die Datenbankanalyse ermöglicht die Identifizierung neuer Biokatalysatoren (Wackett, 2004), wobei in Form von DNA-Sequenzen aus diversen Sequenzierungsprojekten eine große Anzahl an neuen Enzymen zu Verfügung steht. Die Datenbanken können auf Enzyme mit Ähnlichkeit zu den verlangten Eigenschaften durchmustert werden. Nachteil ist sicherlich die Verfügbarkeit der Enzyme und des Weiteren sollte man einen Anhaltspunkt haben, welche Art von Enzym die gesuchte Reaktion katalysiert. Enzyme, deren Reaktionspotential unbekannt ist, fallen durch das Raster. Auch mit dieser Methode können keine völlig neuen Enzyme identifiziert werden.

Mikroorganismen bergen das größte Potential an neuen Biokatalysatoren. Die Biosphäre wird durch Mikroorganismen dominiert (Whitman *et al.*, 1998), die sogar Umgebungen unter extremsten Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Druck besiedeln. Der größte Teil der Mikroorganismen ist bis heute noch nicht untersucht worden. So wird geschätzt, dass sich die globale Vielfalt an mikrobiellen Arten in einem Bereich von 10^6 - 10^7 bewegt (Cowan, 2000). Bisher wurden nur ca. 4500 Arten von Bakterien charakterisiert (Torsvik *et al.*, 2002). In einem Gramm einer Bodenprobe befinden sich bis zu 10 Milliarden Mikroorganismen, die zu über tausend verschiedenen Arten gehören können (Rondon *et al.* 1999; Hill *et al.* 2000; Roselló-Mora & Amann, 2001; Ward, 2002). Beim klassischen Ansatz werden die

Mikroorganismen kultiviert und auf die gesuchte Enzymaktivität untersucht. Jedoch sind weniger als 1 % der Mikroorganismen durch Standardkultivierungstechniken erfassbar und repräsentieren daher nur ein kleines Feld der mikrobiellen Diversität (Torsvik *et al.*, 2002). So liegt der vermutete Anteil an kultivierbaren Mikroorganismen im Boden bei nur 0,3 %, im Meerwasser sind es lediglich 0,001-0,1 % und im Seewasser bei 0,1 - 1 % (Amann *et al.*, 1995). Die Diskrepanz zwischen dem *in situ* beobachtetem mikrobiellen Reichtum und der durch Kultivierung *in vitro* erhaltenen Kolonienzahl wird auch als „great plate count anomalie“ bezeichnet (Staley & Konopka, 1985).

Eine Methode, die theoretisch die gesamte Vielfalt von Mikroorganismen zugänglich macht, ist der Kultivierungs-unabhängige Metagenomansatz.

1.5 Der Metagenomansatz

Als Metagenom wird die Gesamtheit der Genome einer mikrobiellen Population, die sich in einem gegebenen Habitat befinden, bezeichnet (Handelsman *et al.*, 1998). Beim Metagenomansatz oder Metagenomik erfolgt die Isolierung der genomischen DNA einer mikrobiellen Population (metagenomische DNA) direkt aus der Umweltprobe ohne vorherige Kultivierung der in der Umweltprobe enthaltenen Mikroorganismen. Theoretisch wird somit auch die genomische DNA der „unkultivierbaren“ Mikroorganismen, die ca. 99 % der Population ausmachen, zugänglich gemacht. In den späten 1970ern zeigten Torsvik und Goksoyr die Durchführbarkeit der Isolierung von metagenomischer DNA (Torsvik & Goksoyr, 1978). Der Weg für das direkte Klonieren vom Metagenom wurde durch Pace und Mitarbeiter bereitet (Schmidt *et al.*, 1991). Sie extrahierten die gesamte DNA von marinen Plankton und amplifizierten Gene, die für rRNAs kodieren, um einen Stammbaum des Habitats zu erstellen. Dadurch veranschaulichten sie die Möglichkeit der Isolierung von Genen jeder Art. Durch die Analyse von 16S-RNA-Genen von direkt isolierter DNA aus verschiedenen Lebensräumen wurde eine große Anzahl an neuen, bisher unkultivierten Mikroben entdeckt, die durch einen Kultivierungsansatz nicht hätten erfasst werden können (Schmidt *et al.*, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998; Rappe & Giovannoni, 2003; Harris *et al.*, 2004). In Abb. 6 ist ein von Schloss und Handelsman (2004) erstellter Stammbaum dargestellt, der die Vielfalt der Bakterien anhand der Analyse von ca. 17000 16S-RNA Sequenzen wiedergibt. Von den über 50 gezeigten Gruppen wird mindestens die Hälfte gänzlich durch Sequenzen von unkultivierten Bakterien charakterisiert (Hugenholtz *et al.*, 1998; Rappe & Giovannoni, 2003; Harris *et al.*, 2004).

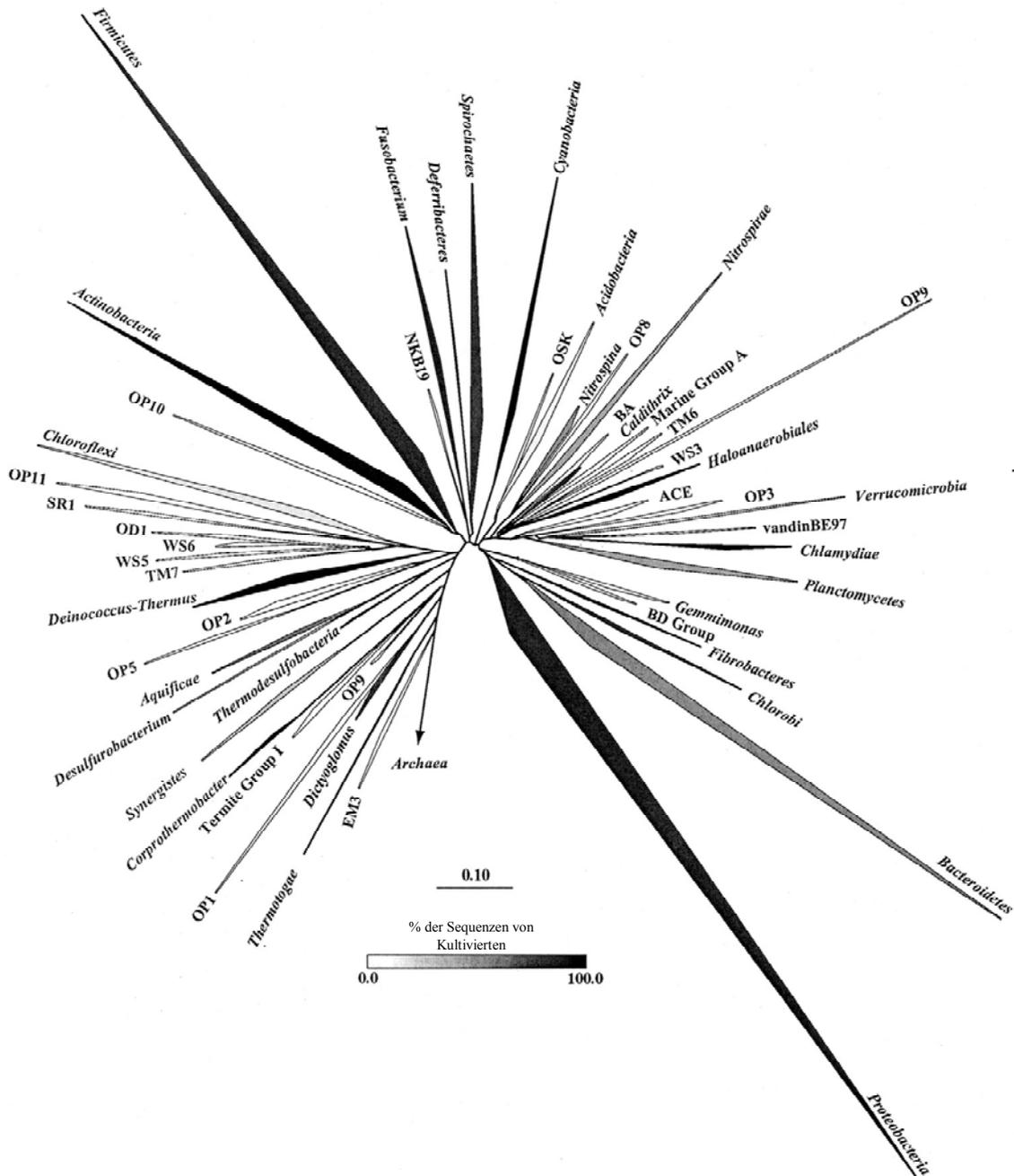


Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum der Bakterien von kultivierten und bisher unkultivierten Gruppen (Schloss & Handelsman, 2004). Die Länge und Breite der Keile reflektiert die Vielfalt der repräsentierten Gruppe. Die Intensität der Schattierung gibt die prozentuale Anzahl der Sequenzen an die von kultivierten Vertretern stammen. Mindestens die Hälfte der Gruppen wird nur durch Sequenzen von unkultivierten Organismen vertreten.

1.5.1 Isolierung von metagenomischer DNA

Seit Torsvik und Goksoyr in den späten 1970ern metagenomische DNA aus einer Bodenprobe isolierten (Torsvik & Goksoyr, 1978) sind zahlreiche Protokolle zur Isolierung von DNA aus dem Boden erschienen (Trevors & van Elsas 1995; Krsek & Wellington 1999; Courtois *et al.* 2001; Berry *et al.*, 2003; Gabor *et al.*, 2003). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei

Extraktionsmethoden für matrixreiche Umweltproben wie Boden oder Sediment (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001). Die erste Methode beruht auf einer direkten *in situ* Extraktion der DNA ohne vorherige Abtrennung der Zellen vom umgebenen Boden oder Sediment. Vorteil dieser Methode ist die einfache Durchführung und der hohe erzielte DNA-Gehalt. Nachteil ist sicherlich, dass die erhaltenen DNA-Fragmente, bedingt durch das Scheren der DNA bei der Aufreinigung, relativ klein sind (1 kb – 50 kb). Ebenfalls ist die Reinheit der erhaltenen DNA sehr schlecht. Die zweite Methode beruht auf dem vorherigen Trennen der Bakterien von dem sie umgebenden Material (*ex situ*) (Berry *et al.*, 2003; Gabor *et al.*, 2003). Bei sorgfältiger Durchführung können Fragmente zwischen 20 kb – 500 kb erreicht werden. Vorteil ist die hohe Ausbeute an großen Fragmenten durch Minderung der mechanischen Scherung und die hohe Reinheit der isolierten DNA. Bei dieser Methode ist der Anteil an nicht mikrobieller DNA und freier DNA, die sich in der Bodenprobe findet, geringer. Nachteil ist der Verlust von Mikroorganismen während der Trennung vom umgebenen Material und geringer DNA Ertrag. Zudem ist diese Methode aufwändiger als die zuvor beschriebene *in situ* Methode. Eine Isolierung der DNA kann durch beide Ansätze erreicht werden. Maßgeblich für die Wahl der Extraktionsmethode ist, ob man einen hohen DNA-Gehalt und eine einfache Durchführung, wie bei der direkten Extraktion (*in situ*), oder einen hohen Reinheitsgehalt und Unversehrtheit der DNA (*ex situ*) anstrebt (Courtois *et al.*, 2001).

Ein großes Problem bei der Isolierung metagenomischer DNA ist die Kontamination der gereinigten DNA mit polyphenolische Verbindungen, Humin- und Flavinsäuren. Diese Verbindungen sind schwierig von der DNA zu trennen und beeinträchtigen deren enzymatische Modifikation durch z. B. PCR, Restriktion, Ligation etc. (Tsai & Olsen, 1992).

1.5.2 Sequenz- kontra Funktions-basiertem Screening

Zwei Strategien werden für die Identifikation von neuen Biokatalysatoren oder Genen, die an der Produktion von chemischen Verbindungen beteiligt sind, aus metagenomischer DNA angewendet. Beide Vorgehen setzen, bis auf wenige Ausnahmen (Margulies *et al.*, 2005), die Konstruktion von Metagenombibliotheken voraus. Dazu wird die zuvor isolierte metagenomische DNA in entsprechende Vektoren und Wirtsstämme kloniert. Die erste Methode beruht auf einem Sequenz-basierten- und die zweite auf einem Funktions-basierten Screening von metagenomischer DNA auf Gene, die für Proteine mit der gesuchten Enzymaktivität kodieren. Beim Sequenz-basierten Screening wird die metagenomische DNA überwiegend durch „Shotgun“-Sequenzierungen analysiert (Schmeisser *et al.*, 2003; Tyson *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2006; Noguchi *et al.*, 2006). Weitere Sequenz-

basierte Methoden nutzen Microarraytechnologie (Sebat *et al.*, 2003) oder degenerierte PCR-Primer zur Isolierung von Genen, die für die entsprechenden Enzyme kodieren (Bell *et al.*, 2002; Marchesi & Weightman, 2003). Ein großer Nachteil des Sequenz-basierten Screenings ist, dass die Identifizierung von neuen Genen auf konservierten und bekannten Sequenzen beruht und die gefundenen Gene den zuvor bekannten sehr ähneln (Streit *et al.*, 2004). Vor allem neuartige Enzyme oder Enzyme mit Promiskuität, die die Fähigkeit besitzen alternative Reaktionen zu katalysieren (Bornscheuer & Kazlauskas, 2004; Carboni-Oerlemans *et al.*, 2006), können nicht identifiziert werden. Zusätzlich müssen die im Sequenz-basierten Screening identifizierten Enzyme erst ihre Funktionalität in biochemischen Tests beweisen.

Bei der Funktions-basierten Analyse werden die Metagenombibliotheken auf entsprechende Enzymaktivitäten mit Hilfe von Aktivitätsassays durchmustert. Wird die gesuchte Aktivität durch nur ein Gen kodiert, werden oft Expressionsbibliotheken („small-insert-libraries“) erstellt und diese auf die entsprechende Enzymaktivität durchmustert (Henne *et al.*, 1999). Dazu wird die metagenomische DNA partiell verdaut und Fragmente zwischen 2 kb – 10 kb in Vektoren mit einer hohen Kopienzahl und starkem Promotor kloniert. Meistens handelt es sich bei den Vektoren um handelsübliche Expressionsvektoren. Bei dieser Methode ist die Analyse von Enzymen, die noch andere Gene für ihre Funktionalität benötigen, nicht möglich. Diese evtl. in Operons oder Cluster strukturierten Gene übersteigen die Kapazität der Expressionsvektoren. Zur Identifikation solcher Operons werden Bibliotheken mit großen DNA-Fragmenten („large-insert-libraries“) benötigt. Für solche DNA-Bibliotheken eignen sich BACs oder Cosmide als Expressionssysteme. BACs („bacterial artificial chromosomes“) sind so genannte künstliche Bakterienchromosomen, die im wesentlichen Derivate des bakteriellen F-Faktors sind. Bei Cosmiden handelt es sich um Vektoren mit Cos-Sequenzen des Bakteriophagen λ , der nach *in vitro* Verpackung und Einschleusen in eine Wirtszelle ein Plasmid bildet. BACs und Cosmide besitzen die Eigenschaft, große Fragmente fremder DNA episomal stabil in *E. coli* zu integrieren. In BACs können Segmente bis zu 200 kb kloniert werden, bei Cosmiden sind es 25 kb – 35 kb. Durch die Größe der BAC Inserierung ist es möglich, Gencluster für komplette Synthesewege in einem BAC zu integrieren und dadurch sogar neue sekundäre Metabolite zu identifizieren (Rondon *et al.*, 2000). Ein Vorteil der BAC- oder Cosmid-Vektoren ist sicherlich die Fähigkeit große Fragmente von Fremd-DNA zu integrieren. Dadurch besteht die Möglichkeit metagenomische DNA im Megabasen-Maßstab mit relativ wenigen Klonen auf Enzymaktivität zu überprüfen. Ein Unterschied zwischen den „small-insert-libraries“ und dem Klonieren von großen Fragmenten in BACs oder Cosmide besteht nicht nur auf Ebene der Größe des eingefügten Segmentes, sondern

auch auf dem Level der Expression des funktionalen Genprodukts. So ist die Expression bei den „small-insert-libraries“ durch einen starken, vektorkodierten Promotor hoch, wogegen bei den BACs und Cosmiden die Expression aufgrund der Notwendigkeit der Erkennung der Wirts-Polymerasen von Promotoren innerhalb der metagenomischen DNA eher gering ist. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass einige Promotoren nicht erkannt werden und somit keine Expression stattfindet. Aufgrund seiner etablierten Genetik und der hervorragenden Transformationskompetenz ist *E. coli* für beide Arten von Expressionssystemen zur Erstellung von Metagenombanken der bevorzugte Stamm.

Für die Funktions-basierte Methode benötigt man geeignete Screenings, um die gesuchte Aktivität zu detektieren (Kap. 1.5.3). Jedoch ist die Screening-Effizienz beim Funktions-basierten Screening relativ gering. So können aus einigen Tausend analysierten Klonen oft weniger als 10 aktive Klone identifiziert werden (Henne *et al.*, 1999; Henne *et al.*, 2000; Majernik *et al.*, 2001). Potentielle Ursachen für die geringe Screening-Effizienz auf Biokatalysatoren sind: schwache Transkription der metagenomischen DNA, geringe Translationsraten, fehlerhaftes Falten des fremden Proteins aufgrund des Fehlens notwendiger Chaperone, unterschiedliche „Codon usage“ des heterologen Expressionsstamms, fehlende Cofaktor-Synthese und ausbleibende Sekretion (Streit *et al.*, 2004). Ein Lösungsansatz wären alternative Stämme zu *E. coli* als Expressionsstamm für die Metagenombibliotheken, jedoch zeigen nur wenige Stämme eine ähnliche Effizienz bezüglich Transformation von DNA und Promotor-Erkennung. Dennoch konnten verschiedene Aktivitäten, die in *E. coli* nicht identifiziert wurden, in anderen Stämmen identifiziert werden (Li *et al.*, 2005; Wexler *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2006). Zur Erhöhung der Transkriptions-Effizienz der metagenomischen DNA können sowohl Transposons mit integrierten Promotoren beitragen, die zufällig in die metagenomische DNA inseriert werden (Leggewie *et al.*, 2006), als auch im Vektor lokalisierte Promotoren, die die Initiation der Transkription der inserierten DNA von beiden Seiten aus einleiten (Lämmle *et al.*, 2007).

1.5.3 Screening-Methoden

Beim Funktions-basierten-Screening werden effiziente und sensible Methoden benötigt, um die gesuchte Enzymaktivität in den Metagenombibliotheken zu detektieren. Die Methoden müssen aufgrund der enormen Größe der Bibliotheken und der statistisch geringen Trefferwahrscheinlichkeit eines positiven Klons vor allem einen hohen Durchsatz gewährleisten („High-throughput“ Screening). Um die Trefferrate zu erhöhen, können die Mikroben in der Umweltprobe, wenn möglich, zuvor im Labor angereichert werden und somit

auf Mikroben mit der gesuchten Eigenschaft vorselektiert werden. Diese Methode führt aber zu einem großen Verlust an biologischer Diversität. Beim „stable isotope probing“ (SIP) wird die DNA der Mikroorganismen durch Wachstum auf einem bestimmten radioaktiv markierten Substrat, welches z. B. aus dem Isotop ^{13}C besteht, angereichert (Dumont & Murrell, 2005). Metabolisch aktive Organismen besitzen daraufhin eine ^{13}C -markierte DNA, die von der nicht angereicherten DNA von nicht metabolisch aktiven Organismen getrennt werden kann. Dadurch werden die Genome der Mikroorganismen selektiert, die das entsprechende Substrat umsetzen können.

Die meisten Screenings beruhen auf der Detektion der Aktivität, d. h. die Enzymaktivität wird durch ein nachweisbares Signal übermittelt. Bei dieser Art des Screenings müssen die Klone der Bibliothek vorher separiert und getrennt auf die Enzymaktivität analysiert werden. Die Assays können entweder in Agarplatten oder Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Besonders Farb- bzw. Wellenlängenänderungen sind einfach und schnell zu detektieren. Sie können durch den Einsatz von chromophoren oder fluorophoren Substraten erzeugt werden. Einen Überblick über solche Enzymassays bietet Goddard und Reymond (2004). Der Nachteil bei diesem Ansatz ist jedoch, dass es sich bei den Substraten meist nicht um jene Substrate handelt, die anschließend in der Biokatalyse eingesetzt werden. Ebenfalls kann eine enzymatische Reaktion durch pH-Änderungen mit Hilfe von pH-Indikatoren nachgewiesen werden (Deng & Chen, 2004; Liu *et al.*, 2006). Beim Substrat-induzierten Expressions-Screening („substrate-induced gene expression“, SIGEX) werden mit Hilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zell Sortierungs-Technologie („fluorescence activated cell sorting“ FACS) aktive Klone identifiziert (Uchiyama *et al.*, 2006). Dabei induziert das Substrat die Expression der entsprechenden katabolischen Enzyme, wodurch gleichzeitig ein stromabwärts gelegenes Fluoreszenz-Reporterprotein exprimiert wird. Anhand des Fluoreszenzsignals können Klone mit entsprechender Enzymaktivität mittels FACS identifiziert und isoliert werden.

Ein „High-throughput“ Screening ist oft schwierig durchzuführen, arbeitsintensiv und zudem kostenintensiv. Ein Screening basierend auf Selektion bietet höchsten Durchsatz und ist schnell durchführbar und kostengünstig. Bei der Selektion ist die gesuchte Enzymaktivität an das Überleben des entsprechenden Klons verknüpft, wenn beispielsweise das Substrat als einzige Kohlenstoff- (Knietsch *et al.*, 2003; Wexler *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2006), Stickstoff- (Gabor *et al.*, 2004, Robertson *et al.*, 2004) oder Sulfatquelle dient. Das Substrat kann nur genutzt werden, wenn ein Klon der untersuchten Metagenom-Bibliothek die gesuchte Enzymaktivität aufweist und das Substrat weiter metabolisiert werden kann. Andere Selektionssysteme nutzen Transkriptionsregulatoren, an die das Produkt der gesuchten

enzymatischen Reaktion bindet und somit dem Stamm das Wachstum unter selektiven Bedingungen ermöglichen (Mohn *et al.*, 2006; van Sint Fiet *et al.*, 2006). Eine ähnliche Methode wird als „chemische Komplementation“ bezeichnet (Baker *et al.*, 2002). Hier ist die gesuchte enzymatische Reaktion an die Transkription eines für ein „yeast-three-hybrid-system“ essentiellen Gens geknüpft.

1.5.4 Bilanz des Metagenomsansatz

Durch Screening von metagenomischer DNA wurden zahlreiche neue Enzyme mit biotechnologischen Hintergrund entdeckt: Einige sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Übersicht einiger aus dem Metagenomansatz identifizierter Enzyme mit industrieller Anwendungsmöglichkeit.

Funktion	Quellenangabe
Lipase/Esterase	Henne <i>et al.</i> , 2000; Rondon <i>et al.</i> , 2000; Bell <i>et al.</i> , 2002; Schmeisser <i>et al.</i> , 2003; Voget <i>et al.</i> , 2003
Amylase	Rondon <i>et al.</i> , 2000; Richardson <i>et al.</i> , 2002; Schmeisser <i>et al.</i> , 2003; Voget <i>et al.</i> , 2003
Amidase	Gabor <i>et al.</i> , 2004
Chitinase	Cottrell <i>et al.</i> , 1999
Cellulase	Rees <i>et al.</i> , 2003
Alkoholoxidoreduktase	Knietsch <i>et al.</i> , 2003b
4-Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase	Henne <i>et al.</i> , 1999
Protease	Gupta <i>et al.</i> , 2002
Nitrilase	DeSantis <i>et al.</i> , 2002; Robertson <i>et al.</i> , 2004
Oxidation von Polyolen	Knietsch <i>et al.</i> , 2003a

Neben kleinen und mittleren Firmen betreiben große Konzerne den Metagenomansatz um neue Enzyme zu erhalten, darunter Diversa (San Diego, USA)(DeSantis *et al.*, 2002; Robertson & Steer 2004), Genencor (Palo Alto, USA)(Knietsch *et al.*, 2003c), Henkel (Düsseldorf)(Breves *et al.*, 2003) und Degussa (Düsseldorf)(Verseck *et al.*, 2005).

Die meisten Versuche zeigten jedoch, dass die Effizienz der Isolierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom bisher nur gering war, d. h. es müssen sehr viele Klone (mindestens einige Hunderttausend) auf Enzymaktivität untersucht werden. Es ist daher von Vorteil das Screening zu optimieren, um erfolgreicher neue Biokatalysatoren zu isolieren. Dennoch ist der Metagenomansatz aufgrund seiner immensen Kapazität an neuen Enzymen mit

biokatalytischer Aktivität eine sehr attraktive Methode, um neue Biokatalysatoren für die weiße Biotechnologie zu gewinnen. Ein besonderer Reiz für die Industrie liegt zudem darin, dass es sich bei den aus dem Metagenomansatz erhaltenen Biokatalysatoren um Neuheiten handeln dürfte, die keinen patentrechtlichen Einschränkungen unterliegen (Langer *et al.*, 2006).

1.6 Aufgabenstellung

Die enantioselektive Knüpfung von C-C-Bindungen ist eine wichtige Reaktion in der synthetischen organischen Chemie (Faber & Kroutil, 2005). ThDP-abhängige Enzyme besitzen diese Fähigkeit und können in der chemoenzymatischen Synthese für die Bildung von aliphatischen und aromatischen Verbindungen genutzt werden. Vor allem die aromatischen Verbindungen in Form von chiralen 2-Hydroxyketonen, können als Vorstufen für organische Synthesen dienen (Abb. 4; Stillger, 2004; Dünkemann *et al.*, 2004). Die ThDP-abhängigen Enzyme BFD, PDC und BAL ermöglichen den Zugang zu einer Vielzahl enantioselektiver 2-Hydroxyketone (Pohl *et al.*, 2002; 2004), wovon nur die BFD eine (*S*)-selektive Katalyse zeigt. Jedoch ist bei der BFD der Acylakzeptor auf Acetaldehyd limitiert (Iding *et al.*, 2000). Benzaldehyd als Donoraldehyd kann durch ringsubstituierte Derivate zwar ersetzt werden, jedoch ist der Umsatz meist recht gering und *ortho* substituierte Verbindungen werden nicht ligiert (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000). Gerade jedoch die 2-Hydroxyketone mit funktionellen Seitenketten ermöglichen Folgereaktionen und sind daher von besonderem Interesse als Synthons.

Ziel der Arbeit ist es neue BFDs aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken zu identifizieren, die dann auf die Bildung relevanter 2-Hydroxyketone getestet werden. Sie würden das Synthespektrum an 2-Hydroxyketonen, welches bisher nur durch die drei bekannten, zur Carboligation befähigten Enzyme PDC, BFD und BAL verfügbar ist, erweitern. Zur Identifizierung neuer BFDs soll nach folgenden Punkten vorgegangen werden.

- (1) Entwicklung und Etablierung eines effektiven Screeningsystems für die Identifizierung neuer BFDs aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken. Dieses System soll einen hohen Durchsatz, hohe Effizienz und einfache Durchführung aufweisen. Am zweckmäßigsten ist die Entwicklung eines auf Selektion basierten Screenings. Es soll dazu dienen Genom- und Metagenom-Bibliotheken auf BFD-Aktivität zu durchmustern.
- (2) Konstruktion von Genom- und Metagenom-Bibliotheken. Von Bakterienstämmen die BFD-Aktivität aufweisen, jedoch nicht sequenziert sind, können Genom-Bibliotheken erstellt werden und BFD-Gene anhand des entwickelten Screeningsystems identifiziert

werden. Der Metagenomansatz bietet ein enormes Potential an neuen Enzymen und soll infolgedessen zur Identifizierung neuer BFDs genutzt werden.

(3) Produktion der neu identifizierten BFDs. Die neu identifizierten BFDs sollen in *E. coli* überexprimiert werden, um ausreichend Protein für die biochemische Charakterisierung zu erhalten.

(4) Bestimmung kinetischer Parameter und Analyse des katalytischen Potentials der neuen BFDs. Neben den kinetischen Parametern der Decarboxylierung soll auch das Substratspektrum der Carboligation bestimmt werden. Die Ergebnisse sollen mit den Eigenschaften der BFD aus *P. putida* verglichen werden.

Neu identifizierte BFDs könnten die bisherigen 2-Hydroxyketon bildenden Enzyme ergänzen und folglich das bisherige Produktspektrum erweitern. Sie könnten Bestandteil einer „Enzym-Toolbox“ sein, die bei der Suche nach einem Katalysator zur Bildung eines bestimmten 2-Hydroxyketons Anwendung findet.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Chemikalien: Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein), Amersham Pharmacia (Freiburg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Biomol (Hamburg)

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. T4-DNA-Ligasen wurden ebenfalls von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot), sowie von der Firma Roche (Mannheim) erworben, TurboPfu-Polymerasen von der Firma Stratagene (Heidelberg). Weitere Enzyme Lysozym, RNase, Proteinase K und Pferdeleber ADH (HIADH) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Medienkomponenten: Difco (Detroit, USA), Fluka (Sternheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und rekombinante Plasmide sind in Tab. 3, Tab. 4 und Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/ Bezugsquelle
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC12633	Wildtyp, katabolisiert Mandelat	ATCC; Stanier, 1947
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Wildtyp, Toluol-abbauender <i>P.</i> <i>putida</i> mt-2	Nelson <i>et al.</i> , 2002; Regenhardt <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> DSM50198	Wildtyp, der Mandelat Abbauweg fehlt	DSMZ, Braunschweig
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC12633 Δ <i>mdlC</i>		Henning <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>supE44 lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacU169 hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> λ ⁻	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal</i> <i>dcm</i> (λ <i>Cts857 ind1 Sam7 nin5</i> <i>lacUV5-T7 gene1</i>)	Studier & Moffatt, 1986; Studier, 1991
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Ec294::[RP4-2 (<i>Tc</i> :: <i>Mu</i>) (<i>Km</i> :: <i>Tn7</i>)], <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , <i>tra</i> ⁺ , <i>Tp</i> ^r , <i>Sm</i> ^r	Simon <i>et al.</i> , 1986

Tab. 3: Fortsetzung

<i>Escherichia coli</i> Rosseta™ (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1(λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1) pRARE (argU, argW, glyT, IleX, leuW, metT, proL, thrT, thrU, tyrU, Cm^r)</i>	Novagen, Madison (USA)
<i>Escherichia coli</i> Origami™ (DE3)	F ⁻ <i>gor522::Tn10(TcR) trxB::kan (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Novagen, Madison (USA)

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektoren	genetische Marken	Referenz/ Bezugsquelle
Vektoren für <i>Escherichia coli</i>		
pBlueskriptSK pRK2013 pET11b	P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZ'</i> Cm ^r Cole1 <i>tra</i> (RK2) ⁺ Km ^r Cole1 P _{T7} P _{lac} Ap ^r Cole1	Stratagene, Heidelberg Drepper <i>et al.</i> , 2003 Novagen, Madison (USA)
pET22b	P _{T7} P _{lac} Ap ^r Cole1 <i>pelB</i> -signalsequenz, His-tag	Novagen, Madison (USA)
pG-TF2	P _{Tc} <i>groES groEL tig</i> , Cm ^r	Takara Bio Inc., Shiga (Japan) ; Nishihara <i>et al.</i> , 2000
pTf16	P _{araB} <i>tig</i> , Cm ^r	Takara Bio Inc., Shiga (Japan) ; Nishihara <i>et al.</i> , 2000
pG-KJE8	P _{araB} P _{Tc} <i>dnak dnaJ grpE groES groEL</i> , Cm ^r	Takara Bio Inc., Shiga (Japan) ; Nishihara <i>et al.</i> , 2000
pGro7	P _{araB} <i>groES groEL</i> , Cm ^r	Takara Bio Inc., Shiga (Japan) ; Nishihara <i>et al.</i> , 2000
pKJE7	P _{araB} <i>dnak dnaJ grpE</i> , Cm ^r	Takara Bio Inc., Shiga (Japan) ; Nishihara <i>et al.</i> , 2000
Vektoren mit weitem Wirtsbereich		
pUCPKS pBBR1MCS-1 pBBR1MCS-2 pBBR1MCS-5 pSUP202 pWKR202	Cole1 P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZα</i> Ap ^r <i>rep mob lacZ'</i> Cm ^r <i>rep mob lacZ'</i> Km ^r <i>rep mob lacZ'</i> Gm ^r pBR325-Derivat, Ap ^r , Cm ^r , Tc ^r , <i>mob</i> pACY177-Derivat, Gm ^r	Stratagene, Heidelberg Kovach <i>et al.</i> , 1994 Kovach <i>et al.</i> , 1995 Kovach <i>et al.</i> , 1995 Simon <i>et al.</i> , 1983 Figurski & Helinski, 1979

Tab. 5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBFDPp	pBBR1MCS-1 mit <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633, kloniert über <i>Sma</i> I	Henning <i>et al.</i> , 2006
pBFDPa	pBBR1MCS-1 mit <i>mdlC</i> aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1, kloniert über <i>Sma</i> I	Henning <i>et al.</i> , 2006
pSUP Δ <i>mdlC</i>	pSUP202 für die Deletion von <i>mdlC</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633	Henning <i>et al.</i> , 2006
pET11bfdB	pET11b mit <i>bfdB</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633, kloniert über <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	diese Arbeit
pET11bfdC	pET11b mit <i>bfdC</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633, kloniert über <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	diese Arbeit
pET11bfdM	pET11b mit <i>bfdM</i> aus pBFDM, kloniert über <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	diese Arbeit
pET22bfdB	pET22b mit <i>bfdB</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633, kloniert über <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Henning <i>et al.</i> , 2006
pET22bfdC	pET22b mit <i>bfdC</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633, kloniert über <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III	Henning <i>et al.</i> , 2006
pET22bfdM	pET22b mit <i>bfdM</i> aus pBFDM, kloniert über <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Henning <i>et al.</i> , 2006
pBBRbfd+	pBBR1MCS-1 mit genomischer DNA aus <i>P. putida</i> ATCC12633, kloniert über <i>Bam</i> HI, besitzt BFD-Aktivität (<i>bfdB</i>)	Henning <i>et al.</i> , 2006
pBBR60106	pBBR1MCS-2 mit genomischer DNA aus <i>P. putida</i> ATCC12633 Δ <i>mdlC</i> , kloniert über <i>Bam</i> HI, besitzt BFD-Aktivität (<i>bfdC</i>)	Henning <i>et al.</i> , 2006
pBBR8.4	pBBR1MCS-5 mit metagenomischer DNA einer Bodenprobe nahe Jülich, kloniert über <i>Bam</i> HI, besitzt BFD-Aktivität (<i>bfdM</i>)	Henning <i>et al.</i> , 2006
pUCPbfdB	pUCPKS mit <i>bfdB</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633	diese Arbeit
pUCPbfdM	pUCPKS mit <i>bfdM</i> aus pBBR8.4	diese Arbeit
pBBRbfdB	pBBR1MCS-5 mit <i>bfdB</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633	diese Arbeit

Tab. 5: Fortsetzung

pBBRbfdC	pBBR1MCS-5 mit <i>bfdC</i> aus <i>P. putida</i> ATCC12633	diese Arbeit
pBBRbfdM	pBBR1MCS-5 mit <i>bfdM</i> aus pBFDm	diese Arbeit
pSKbfdanf	pBlueskriptSK mit 500 bp Fragment <i>mdlC'</i> aus <i>P.</i> <i>putida</i> ATCC12633	diese Arbeit
pSKbfdend	pBlueskriptSK mit 500 bp Fragment ' <i>mdlC</i> ' aus <i>P.</i> <i>putida</i> ATCC12633	diese Arbeit
pSK Δ <i>mdlC</i>	pBlueskriptSK mit <i>mdlC'</i> und ' <i>mdlC</i> '	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma THERMO (Ulm) bezogen und sind im Detail in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name	DNA-Sequenz (5'-3' Richtung)	Merkmale/ Modifikation
BFDanfup	ATATGGATCCAAGCTTACATGGCGATCAA AAAGGTGG	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III
BFDanfdown	ATATCTCGAGGTCGACGGCACCACATACG AACTCTT	<i>Xho</i> I, <i>Sal</i> I
BFDendup	ATATCCTAGAGTCGACGGCCTTTGGCAGAA AGCGCTT	<i>Sal</i> I,
BFDenddown	ATATGGATCCCCCGCGAAGGTTGACCAAGA CGCTGGC	<i>Bam</i> HI
GmBFDend	TTGTTGGTACTGTGGCCGTA	
GmBFDanf	CTGAGTGCTTGCGGCAGCGTG	
BFDppup	ATATCCATGGCTTCGGTACACGGCACCACA TAC	<i>Bam</i> HI
BFDppdown	ATATCTCGAGTCACTTCACCGGGCTTACG GTGCTTAC	<i>Xho</i> I
BFDpup	ATATCATATGAAAACCGTCCATTCCGCG	<i>Nde</i> I
BFDpdown	ATATAAGCTTTCAGGGTTCGATGGTTTGCG	<i>Hind</i> III
BFDB <i>Nde</i> pET	ATATCATATGAAAACCTGTTACGGCGCCAC	<i>Nde</i> I
BFDB <i>Bam</i> HI oStC	TGGCCTTGAGGATCCGCGGCTGCT	<i>Bam</i> HI
BFDC <i>Nde</i> pET	ATATCATATGAAAACCTGTTACGGCGCCAC	<i>Nde</i> I

Tab. 6: Fortsetzung

BFDCHind pET	ATAAAGCTTGGGCTCGATGGTCT	HindIII
BFDMNdepET	ATATCATATGCAAGAGAAACCCCCCAGAAT	NdeI
BFDMHind pET	ATAAAGCTTGGCCACTTCGACTTC	HindIII
BFDDBamHI mSTC	TGGCCTTGAGGATCCTCAGCGGCT	BamHI
BFDStC BamHI	ATATGGATCCTCAGGGCTCGATGGTCTGGG	BamHI
BFDMStC BamHI	ATAGGATCCGGCCACTTCGACGAGCACGGGC	BamHI
HindRBS pET	ATATAAGCTTAAGAAGGAGATATACATATG	HindIII, RBS
SalRBSpET	GGGGGTCGACAAGAAGGAGATATACATATG	SalI, RBS

2.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. putida* wurden in LB-Medium angelegt und bei 37 °C bzw. 30 °C bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina im Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH), bei 120–180 UpM kultiviert. Dabei entsprach das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 7) kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine O.D._{580 nm} = 0,05 beimpft. Zur Expression der heterologen Gene wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase bei dem Erreichen einer O.D._{580 nm} = 0,4 – 0,7 durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) induziert. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl; 5 g/l Hefextrakt, pH 7,0

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Hitzelabile Chemikalien wurden mit Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) sterilfiltriert und den autoklavierten Medien bei einer Temperatur von ≤ 60 °C zugesetzt.

Für den qualitativen Nachweis von Enzymen wurden folgende Indikatorplatten verwendet: α-Komplementationsagar (β-Galactosidaseaktivität) nach Sambrook *et al.* (1989).

Tab. 7: Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> [µg/ml]	Konzentration für <i>P. putida</i> [µg/ml]
Ampicillin (Ap)	100	-
Gentamycin (Gm)	15	30
Tetracyclin (Tc)	10	25
Chloramphenicol (Cm)	50	800
Cycloserin (Cs)	-	2500
Streptomycin (Sm)	50	250

2.4.1 Selektionsmedium für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität

Das Selektionsmedium für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität basiert auf dem Minimalmedium M9 (Sambrook *et al.*, 1989) mit 10 mM Benzoylformiat (Sigma-Aldrich) als alleinige Kohlenstoffquelle anstatt Glukose. Bakterien wurden mindestens 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Lösung 1: 1 M Benzoylformiat

Lösung 2: 2,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
ad 100 ml A. dest.

Lösung 3: 0,2 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
ad 100 ml A. dest.

Lösung 4: 35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
15 g KH_2PO_4
2,5 g NaCl
5 g NH_4Cl
ad 500 ml A. dest.

Lösungen 2 - 4 wurden für 20 min bei 120 °C autoklaviert und Lösung 1 sterilfiltriert. Für 1 l BFD-Medium wurden 10 ml Lösung 1, 10 ml Lösung 2, 10 ml Lösung 3 und 100 ml Lösung 4 auf 1 l mit sterilem A. dest. aufgefüllt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1. Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. putida* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Eppendorf (Hamburg) und Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

2.5.2 Chromosomale DNA

Chromosomale DNA aus Zellen von *P. putida* wurde nach der Standardmethode von Sambrook *et al.* (1989) oder mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden) isoliert.

2.5.3 Metagenom DNA

Die Isolierung von Metagenom DNA aus einer Bodenprobe basiert auf dem direkten Lyse Verfahren nach Zhou *et al.* (1996). 5 g der Probe wurden mit 13,5 ml DNA-Extraktions-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂EDTA, 100 mM Na₂PO₄, 1,5 M NaCl, 1 % (w/v) Acetyltrimethylammoniumbromid pH 8,0 und 1 ml Proteinase K (10 µg/µl) versetzt. Die Probe wurde 30 – 60 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 3 ml 10 % SDS zugegeben und für 2 h unter leichtem Schütteln bei 65 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (5000 UpM bei RT für 15 min) und der Überstand wurde aufgehoben. Das Pellet wurde erneut 2 mal extrahiert (4,5 ml DNA-Extraktions-Puffer + 1 ml 10 % SDS; 10 min bei 65 °C). Die Überstände wurden vereint und einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Danach wurde die DNA durch Isopropanol gefällt. Anschließend folgte noch eine Reinigung der metagenomischen DNA mit dem DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden), beginnend mit dem Waschschrift des Protokolls.

2.6 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3 M Kaliumacetat-Lösung und 900 µl Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei -80 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation (14000 UpM, 4 °C). Das gewonnene Pellet wurde mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 14000 UpM, RT) wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (Univapo 150). Das getrocknete Pellet wurde anschließend in A. dest. aufgenommen.

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) nach Sambrook *et al.* (1989) elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 × TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firmen Gibco-BRL (Eggenstein) und Fermentas eingesetzt. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „EagleEye II“ der Firma Stratagene (Heidelberg) zusammen mit der Software „Gel Jet Imager Plus“ der Firma Intas (Göttingen) genutzt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey und Nagel (Düren) sowie des „Gel Clean-up“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.8 *In vitro*-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Sambrook *et al.* (1989) sowie nach Angaben des Herstellers des jeweiligen Enzyms in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.9 Konstruktion von Genomgenombibliotheken von *P. putida* ATCC12633 und *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* und Metagenombibliotheken

Isolierte chromosomale DNA (2.7.2) bzw. metagenomische DNA (2.7.3) wurden partiell mit der Restriktionsendonuklease *Sau3AI* verdaut und in 2 – 10 kb großen Fragmenten aus Agarosegelen eluiert. Der Vektor pBBR1MCS mit weitem Wirtsbereich wurde mit *Bam*HI restringiert und mit der alkalischen Phosphatase aus *Pandalus borealis* [Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)] dephosphoryliert. Im Anschluß wurden die partiell verdaute DNA und der mit *Bam*HI linearisierte Vektor pBBR1MCS ligiert. Der Stamm *E. coli* DH5 α wurde mit dem Plasmiden transformiert bzw. ein Teil der erstellten Metagenombibliotheken direkt durch Elektroporation in *P. putida* KT2440 eingebracht. Die erhaltenen Bibliotheken wurden durch Restriktionsanalysen von 24 zufällig gewählten Klonen auf die durchschnittliche Insertgröße und den Anteil von „nur Vektor-DNA“ überprüft.

2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

2.10.1 Chemische Transformation von *E. coli*

Die Transformation sowie die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli* Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.10.2 Elektroporation von *E. coli*

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer ÜK inokuliert. Bei einer $O.D._{580\text{ nm}} = 0,4 - 0,7$ wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt und anschließend pelletiert (5000 UpM, 15 min, 4 °C). In zwei Schritten wurde das Pellet mit abnehmenden Volumina eiskaltem, 10 % Glycerol (v/v) gewaschen (250 ml, 20 ml) und nach einer letzten Zentrifugation in 2 ml eiskaltem, 10 % Glycerol (v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Elektroporation wurde mit Hilfe des MicroPulsers (BioRad, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen direkt in LB-Medium aufgenommen und nach der phänischen Expression bei 37 °C für 0,5 – 3 h, je nach Antibiotika, auf Agar-Selektivmedium ausplattiert.

2.10.3 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. putida* durch tri-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des Plasmidhaltigen Donorstamms *E. coli* DH5 α mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstamms von *P. putida* und 1 ml des Helferstamms *E. coli* DH5 α pRK2013 gemischt. Durch Zentrifugation (3 min; 10000 UpM; RT) wurden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 30 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 0,14 M NaCl suspendiert und in Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-6} auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstamms und Helferstamm enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 μ g/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, Schweiz).

Bei der Selektion auf Benzoylformiatdecarboxylaseaktivität diente Benzoylformiat als einzige Kohlenstoffquelle. Das Produkt der Decarboxylierung Benzaldehyd kann von Donor- und Helferstamm nicht verstoffwechselt werden.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 μ l angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol pro Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 \times (2 min: 95 °C); 35 \times (1 min: 95 °C; 0,5 min: 50–63 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5-3 min \times 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 \times (5 min: 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg). Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.12 Konstruktion von Benzoylformiatdecarboxylasen defizienten Stamms *P. putida* ATCC12633

Zur Erstellung der Insertions-/Deletionsmutante des Gens *mdlC* wurde ein Mutagenesevektor konstruiert, der auf dem mobilisierbaren Suizidvektor pSUP202 beruht. Zunächst wurden 500 bp Fragmente vom Anfang und Ende der 1584 bp langen Gensequenz mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der Oligonukleotide BFDanf/BFDanfup und BFDend/BFDendup wurden an die 5'-Enden der amplifizierten Fragmente Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Sal*I (BFDanf), bzw. *Bam*HI (BFDend) inseriert, während an den 3'-Enden Erkennungssequenzen für die Enzyme *Hind*III und *Bam*HI (BFDanf), bzw. *Sal*I (BFDend) eingefügt wurden. Die Klonierung des Mutagenesevektor erfolgte wie im Anhang dargestellt (Abb. 37). Der resultierende Mutagenesevektor wurde im Weiteren als pSUP Δ *mdlC* (Δ *mdlC*:: Ω Gm^r in pSUP202) bezeichnet. Nach der Transformation des *E. coli*-Stamm DH5 α mit dem Mutagenesevektor wurde dieser durch den tri-parentalen konjugativen Transfer in *P. putida* ATCC12633 überführt. Die Transkonjuganden, die auf Selektivagarplatten mit den Antibiotika Gm, Tc und dem zur Gegenselektion verwendeten Detergenz Irgasan (25 μ g/ml) wachsen konnten, enthielten den durch homologe Rekombination ins Genom integrierten Mutagenesevektor, da dieser als pSUP202-Derivat in *P. putida* nicht replizieren konnte. Für das zweite Rekombinationsereignis, das im Verlust des Vektoranteils aus dem Genom resultierte, wurden Tc-sensitive Transkonjuganden angereichert. Zur Anreicherung der Zellen ohne chromosomal integriertem Vektoranteil wurden die Tc-resistenten Transkonjuganden zweimal ü. N. in 5 ml LB-Medium mit Gm kultiviert. 10 ml LB-Medium wurden mit der Menge der zweiten ÜK beimpft, dass die Zelldichte einer OD_{580 nm} = 0,01 entsprach und die Kultur bei 30 °C und 200 UpM bis zu einer OD_{580 nm} = 0,1 bebrütet. Nach anschließender Zugabe von Tc wurde die Kultur weitere 1,5 h bebrütet. Tc ist ein bakteriostatisch wirkendes Antibiotikum, das die Bindung der Aminoacyl-tRNAs durch Blockierung der 30S-Untereinheit der Ribosomen hemmt und so die Proteinbiosynthese inhibiert. Darauf folgte die Zugabe von Cs und weitere 3 h Bebrütung bei 30 °C, um die teilungsfähigen Tc-resistenten Zellen zu lysieren, während die Tc-sensitiven Zellen aufgrund der bakteriostatischen Wirkung im Wachstum gehemmt wurden. Anschließend wurden 2 ml der Kultur zentrifugiert (2 min, 8000 UpM, RT), das Pellet mit 2 \times 1 ml 0,14 M NaCl gewaschen um Antibiotikareste zu entfernen und 100 μ l dieser Bakteriensuspension in den Verdünnungen 10⁻¹ bis 10⁻⁴ auf LB-Agarplatten mit Gm ausplattiert. Durch paralleles Überimpfen von Einzelkolonien auf Selektivagar mit und ohne Tc wurden die erhaltenen Klone auf den Verlust des pSUP202-Vektoranteils hin untersucht.

Die zur Identifizierung der *mdlC* defiziente Mutante durchgeführte PCR erfolgte bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C. Als Matrizen-DNA wurden jeweils 10 ng chromosomale DNA des Wildtyps oder der potentiellen Mutanten eingesetzt. Als Startermoleküle wurden die Oligonucleotide BFDPPup/GmBFDanf und BFDPPdw/GmBFDend zur Amplifizierung der flankierenden Bereiche der $\Omega\text{Gm}^{\text{r}}$ -Kassette verwendet. Die Primer BFDPPup/GmBFDanf und BFDPPdw/GmBFDend amplifizieren bei erfolgreicher Inserierung mit gleichzeitiger Deletion des Gens ein 520 bp Fragment. Die Primer BFDPPup/BFDPPdw binden in einem Bereich stromauf- und abwärts des zu vor für den Mutagenesevektor pSUP ΔmdlC verwendeten Fragmente des *mdlC*-gens und GmBFDanf/GmBFDend in der $\Omega\text{Gm}^{\text{r}}$ -Kassette. Der erzeugte *mdlC*-negative Stamm wurde als *P. putida* ATCC12633 ΔmdlC bezeichnet.

2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.14 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) oder nach der Methode von Bradford (1976) spektralphotometrisch (UV/VIS Spektrophotometer 16A, Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli *et al.* (1970) bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 12 % Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 99 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma BioRad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill (1990) mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt.

2.16 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Gesamtzellextrakt wurde durch Zentrifugation (15 min, 6.000 Upm, 4 °C) gewonnen. Das Zellsediment wurde entsprechend einer $\text{O.D.}_{580\text{ nm}} = 20$ in 1 ml Zellaufschlusspuffer (50 mM Kpi, pH 6.5) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 3 \times 2 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Die so erhaltenen Gesamtzellextrakte (GZE) wurden weiter fraktioniert oder bei -20°C gelagert.

2.17 Fraktionierung von *E. coli*-Zellen

Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 2 min bei 3.000 UpM aus dem GZE entfernt. Zur weiteren Aufteilung des GZE in lösliche und nicht-lösliche Fraktionen wurde für

weitere 30 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Die hierbei sedimentierten Proteine („inclusion bodies“) wurden direkt in 1 Vol. SDS-Probenpuffer oder Zellaufschlusspuffer aufgenommen, während die im Überstand lokalisierten löslichen Proteine direkt in Enzymtests eingesetzt oder mit ½ Vol. SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei -20°C.

2.18 Chromatographische Reinigung von BfdC

Die Reinigung der Proteine erfolgte nach der Expression des korrespondierenden Gens mit Hilfe des Vektors pET22bfdC im heterologen Wirt *E.coli* BL21(DE3) als C-terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) nach Porath *et al.* (1975). Nach der Expression im 3 l -Maßstab wurden die enzymhaltigen Zellen durch Zentrifugation geerntet (Sorvall „SLC-4000“, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, 5000 UpM, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde in Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP) resuspendiert, so dass eine 30%ige (w/v) Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (20 W, 15 min) und die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B, SS34, 16000 UpM, 30 min, 4°C) abgetrennt. Der dabei erhaltene Überstand wurde filtriert (Porengröße 5 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) und anschließend über eine mit mindestens 5 Säulenvolumen equilibrierte „Ni²⁺-NTA superflow“-Säule (40 ml Säulenvolumen, Qiagen, Hilden) mit einer Flußrate von 2-3 ml/min gepumpt. Die Säule wurde mit Wasch-Puffer (50 mM KPi pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP, 20 mM Imidazol) gewaschen bis die Extinktion bei 280 nm konstant blieb und anschließend mit Elutions-Puffer (50 mM KPi pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP, 250 mM Imidazol) bei einer Flussrate von 2-3 ml/min eluiert. Das BFD-haltige Eluat wurde zur Entsalzung direkt auf eine mit 2,5 Säulenvolumen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM, pH 6, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP) equilibrierte „Sephadex G-25 Medium“-Säule (1L Säulenvolumen, Amersham-Biosciences, Freiburg) gepumpt. Diese wurde mit dem Equilibrierungspuffer bei einer Flußrate von 5 ml/min gespült und die Proteinelutionsfraktion aufgefangen. Das Eluat wurde lyophilisiert und das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

2.19 Nachweis und Bestimmung von Decarboxylaseaktivität

2.19.1. Gekoppelter Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität

Die Bestimmung der Decarboxylaseaktivität erfolgte durch einen gekoppelten enzymatischen Test. Dabei wird von der BFD Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO₂ umgesetzt. Der entstehende Benzaldehyd wird durch ein Hilfsenzym, der ADH aus Pferdeleber (HIADH), unter NADH Verbrauch zum Alkohol reduziert (Weiss *et al.*, 1988). Die Abnahme des NADH wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt. Durch einen Überschuss an HIADH wurde gewährleistet, dass die Aktivität der Decarboxylase limitierend und somit die Abnahme der NADH-Konzentration direkt proportional zu dieser war. Die Messung erfolgte bei 30 °C, wobei der Ansatz (950 µl Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 6, Benzoylformiat 5 mM, NADH 0,35 mM, HIADH 5 U) 5 min vorinkubiert wurde. Der Test wurde durch Zugabe der BFD (50 µl) gestartet und die Änderung der Extinktion über 90 s verfolgt. Die Enzymaktivität [U/ml] berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot \frac{V_{ges}}{V_{Probe} \cdot d \cdot \epsilon_{NADH}} \cdot f$$

ΔE = Änderung der Absorption

V_{ges} = Gesamtvolumen (1 ml)

V_{Probe} = Probenvolumen (50 μ l)

f = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ϵ_{NADH} = molarer Extinktionskoeffizient für NADH ($6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bei $\lambda = 340 \text{ nm}$

Als 1 U ist die Enzymmenge definiert, die 1 μ mol Substrat pro Minute bei 30°C umsetzt. Die Konzentration der Enzymlösung wurde so eingestellt, dass die Abnahme der Absorption als Gerade über den gesamten Zeitraum von 90 s beobachtet werden konnte.

2.19.2 Direkter Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität

Benzoylformiat besitzt ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und hat in Kaliumphosphat-Puffer einen stoffspezifischen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon=0,032 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Iding, 1998). Die Aktivität kann durch die kontinuierliche Messung der Abnahme der Substratkonzentration im UV-Photometer bei 340 nm ermittelt werden. Die Substratlösung wird auf 30 °C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe der Enzymlösung gestartet. Eine Messung dauert 90 s, von denen nur die letzten 75 s zur Aktivitätsbestimmung herangezogen werden.

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\min} \cdot 625$$

ΔE = Änderung der Absorption

Testzusammensetzung: 950 μ l Substratlösung
50 μ l Enzymlösung

Zusammensetzung der Substratlösung: 25 mM Benzoylformiat, pH 6,5
50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5
2,5 mM Magnesiumchlorid
0,1 mM ThDP

Als 1 U ist die Enzymmenge definiert, die 1 μ mol Benzoylformiat pro Minute bei 30 °C umsetzt. Die Volumenaktivität berechnet sich nach der oben stehenden Gleichung. Um eine ausreichende Absorptionsänderung messen zu können, ist bei dem niedrigen Extinktionskoeffizienten für Benzoylformiat eine sehr konzentrierte Enzymlösung notwendig.

2.19.3 Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Decarboxylase-Reaktion

Mit dem direkten Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität wurde das pH-Optimum der BfdC untersucht. Die Aktivität wurde zwischen pH 3 und pH 8 bestimmt. Dabei wurde die Abnahme der Substratkonzentration innerhalb einer Messzeit von 90 s verfolgt. Die ersten 15 s wurden nicht mit zur Aktivitätsbestimmung herangezogen, da dieser Bereich häufig nicht linear ist.

2.19.4 Bestimmung des pH-Einflusses auf die Enzymstabilität

Dazu wurde das Enzym über einen längeren Zeitraum bei verschiedenen den pH-Werten inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten die Restaktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Decarboxylase-Aktivität wurde der gekoppelte Enzymtest angewendet.

2.19.5 Temperaturabhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität wurde der direkte Enzymtest verwendet, bei dem die Abnahme des Benzoylformiats in der Lösung direkt verfolgt wurde.

2.19.6 Bestimmung der Aktivierungsenergie für Decarboxylierung

Die Arrhenius-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion und der absoluten Temperatur:

$$k = A \times e^{\frac{E_a}{RT}}$$

k	Geschwindigkeitskonstante
E_a	Aktivierungsenergie
R	allgemeine Gaskonstante $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
T	absolute Temperatur [K]
A	präexponentieller Faktor

In der logarithmischen Form erkennt man den linearen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstante und der reziproken absoluten Temperatur.

$$\ln k = \ln A - E_a/(R \cdot T)$$

Unter der Annahme, dass die Aktivierungsenergie E_a über den verhältnismäßig engen Temperaturbereich einer enzymatischen Reaktion praktisch konstant ist, konnte die Aktivierungsenergie E_a aus der Steigung der Geraden bestimmt werden, die durch Auftragen von $\ln k$ über $1/T$ erhalten wurde.

2.19.7 Bestimmung der Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ der thermischen Inaktivierung

Es wurde die Stabilität der BFD bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Dazu wurde das Enzym über einen längeren Zeitraum bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten die Restaktivität bestimmt. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte in einem Standardassay bei einer definierten Temperatur (30 °C). Die Enzymaktivität wurde mit dem gekoppelten Enzymtest ermittelt.

2.19.8 Substratspektrum der Decarboxylierung

Die nicht natürlichen Substrate der BFD wurden ebenfalls mit Hilfe des gekoppelten Assays untersucht. Auch hier wurde die HIADH als Hilfsenzym eingesetzt. Die Substrate wurden mit einer Konzentration von 30 mM eingesetzt, mit Ausnahme von Benzoylformiat. Dieses

Substrat wurde mit 15 mM eingesetzt, da ansonsten die Eigenabsorption zu hoch gewesen wäre. Für die Messungen wurde in allen Fällen eine Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ ml eingesetzt. Für alle Substrate wurde eine parallele Blindmessung ohne Enzym durchgeführt, um etwaige nicht-enzymatische Effekte auszuschließen.

2.19.9 Bestimmung der kinetischen Konstante: K_m

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m wurde Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd gegen die Benzoylformiat-Konzentration aufgetragen. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit dem bereits beschriebenen gekoppelten Enzymtest zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität bestimmt. Mit Hilfe des Programms Origin 7G ließen sich sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} , als auch die Michaelis-Menten-Konstante K_m bestimmen.

2.19.10 High throughput Screening (HTS) Assay zum Nachweis von Decarboxylaseaktivität

Die in *E.coli* BL21 (DE3) pET11bfdM transformierte Chaperon „Toolbox“ wurde zunächst auf LB Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert. Einzelkolonien wurden in 96er Mikrotiterplatten übertragen (DWMTP, 2 ml Greiner Bio-one, Frickenhausen), welche zuvor mit 1,2 ml selbstinduzierendem Medium (TB-Medium: 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 24 g/l Hefeextrakt, 12 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Glycerol, 0,5 g/l Glucose, 2 g/l Lactose) pro Well befüllt worden waren. Sobald die Glucose durch die Zellen verbraucht war, wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase durch die Verstoffwechslung der Lactose induziert. Dies geschah in der Regel zwischen einer O.D._{580 nm} von 0,5 – 1. Die Platten wurden 2 Tage bei 25 °C und 600 UpM auf einem Mikrotiterplattenschüttler (TiMix 5, Edmund Bühler GmbH, Hechingen) inkubiert. Nachdem ein Aliquot der Klone genommen wurde als Replik, wurden die Zellen für den folgenden Zellaufschluß abzentrifugiert (Hettich Rotina 35R, 4000 UpM, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 200 µl Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) mit Cofaktoren (ThDP 0,1 mM, MgSO₄ 2,5 mM) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von Lysozym (1 mg/ ml Endkonzentration) und Inkubation bei 37 °C für 30 min auf dem Brutschüttler (600 UpM). Nach der Trennung der löslichen von der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation (4000 UpM, 20 min, 4 °C) wurden je 100 µl der löslichen Zellsuspension in eine neue Mikrotiterplatte (0,5 ml, Greiner Bio-one, Frickenhausen) transferiert. Zu jedem Well wurden zusätzlich 70 µl Substratlösung (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5, 5 mM Benzoylformiat, 0,1 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄) hinzugefügt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Decarboxylaseaktivität wurde durch den gekoppelten Enzymassay bestimmt. Im Gegensatz zum Standardassay wurden die Assaykomponenten konzentrierter eingesetzt, wohingegen der Anteil der Enzymlösung erhöht wurde. Es wurde keine Kinetik, sondern eine Endpunkt-Bestimmung durchgeführt, wobei die NADH-Abnahme photometrisch an einem Mikrotiterplattenphotometer überprüft wurde. Der Assay wurde durch die Zugabe von 20 µl NADH (3,5 mM) und 10 µl Pferdeleber ADH (5 U/ml) gestartet. Bei Decarboxylase-Aktivität sollte die Absorption nach 2 min stark, bei fehlender Aktivität nur leicht abfallen oder konstant bleiben.

2.20 Nachweis von Carboligaseaktivität

Die im Folgenden beschriebene chirale HPLC und GC/MS wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Müller, Institut für Pharmazeutische Chemie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, durchgeführt.

2.20.1 Chirale HPLC

200 µg bis 500 µg Enzym wurden in 1,2 - 1,5 ml Batch-Ansätzen (Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 7, 0,1 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄, 20 % DMSO) zusammen mit den entsprechenden Aldehyden (5 – 500 mM) bis zu 96 h bei 30 °C und 300 UpM auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion der Ansätze mit 200 - 300 µl Ethylacetat gestoppt. Die Konzentration der Produkte und deren *ee* wurden mittels chiraler HPLC bestimmt (Chiracel OD-H, Daicel, Düsseldorf). Als Laufmittel diente Hexan/ Isopropanol (90:10), die Flussrate betrug 0,5 ml/min, die Temperatur lag bei 40 °C. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Eichgeraden. Dabei wurde die Gesamtarea gemessen bei den Wellenlängen 254 nm, 210 nm und 280 nm berücksichtigt.

2.20.2 GC/MS

GC/MS-Spektren wurden mit dem Agilent Technologies 6890 N Series GC-System, sowie dem 5973 Network Mass Selective Detector aufgenommen. Es wurde die Säule CS 22545030 (FS-Supreme-5, ID 0,25 mm, Länge 30 m, df 0,25 µm) verwendet. Als Trägergas wurde Helium (1 ml/ min, konstanter Fluss) eingesetzt, der Injektor im Split-Modus (41,7:1, 250 °C), TGC (Injektor) = 250 °C, TMS. Das Temperaturprogramm M1-300 (19 min) lautete: T 0 min = 60 °C, T 3 min = 60 °C, T 14 min = 280 °C (Aufheizrate: 20 °C/ min), T 19 min = 280 °C. MS-Parameter: EI (70eV), Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, Transfer Line 300 °C, detektierter Massenbereich 50-300 amu (M-300). Für die Probenvorbereitung wurden 60 µl eines 0,5 – 1ml Ansatzes (s. HPLC-Ansätze) mit 300 µl Ethylacetat (und 100 µl gesättigter NaCl-Lösung) versetzt und gut geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation wurde die Probe der oberen organischen Phase entnommen. Die Retentionszeit für 2-HPP beträgt 8,05 min, für Benzoin 11,59 min.

2.20.3 TTC-Assay zum Nachweis von Carboligaseaktivität

Dieses Verfahren basiert auf der Reduktion von 2,3,5-Triphenyl-H-Tetrazoliumchlorid (TTC) zu seinem entsprechenden Triphenylformazan. Die Reduktion erfolgt dabei spezifisch durch das bei der Carboligase entstandene Produkt. Aus der Reduktion des TTCs resultiert der leicht zu detektierende Farbumschlag von farblos zu rot (Breuer *et al.*, 2002).

Zu 100 µl Enzymlösung (0,25 mg/ml) wurden 100 µl Substratlösung (Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 7, 20 % DMSO, 18 mM aromatisches Aldehyd, 18 mM aliphatisches Aldehyd) gegeben. Nach 20 h Inkubation bei 30 °C wurden 100 µl des Ansatzes in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, in dem zuvor bereits 10 µl 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (0,4 % in EtOH) vorgelegt wurden. Die sichtbare Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 30 µl 3 M NaOH gestartet.

2.21 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde durch die Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software), dem „DNASTAR“-Programmpaket (Lasergen), „BioEdit“ (Hall, 1999) und diversen Anwendungen des „Expert Protein Analysis“-Systems (<http://us.expasy.org/>) unterstützt.

Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Genom Datenbankanalysen wurden mit dem IMG-System (<http://img.jgi.doe.gov>; Markowitz *et al.*, 2006) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Hierbei handelt es sich um die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen, der Agarosegelelektrophorese und Indikatoragarplatten. Im Verlauf der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Veränderungen der Abbildungen vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines Wachstum-basierten Selektionssystems zur Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen

Benzoylformiatdecarboxylasen (BFD) sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung von chiralen 2-Hydroxyketonen für die chemische Industrie von besonderem Interesse. Chirale 2-Hydroxyketone können Anwendung finden als Synthesebausteine in der organischen-synthetischen Chemie z. B für die Synthese von Pharmazeutika (Demir *et al.*, 2002; Dünkelmann *et al.*, 2004). Von den bekannten 2-Hydroxyketon bildenden Enzymen [Pyruvatdecarboxylase (PDC), Benzaldehydlyase (BAL) und BFD], zeigt nur die BFD bezüglich der Carboligase-Aktivität eine (*S*)-selektive Katalyse. Jedoch weist die BFD ein enges Substratspektrum bei der Carboligase-Aktivität auf. So kann nur Acetaldehyd als Acylakzeptor und Benzaldehyd und einige *para* und *meta* substituierte Derivate als Donoraldehyd fungieren (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000). Um Benzoylformiatdecarboxylasen mit neuen Eigenschaften bezüglich des Substratspektrums der Carboligase zu erhalten, soll ein Wachstum-basiertes Selektionssystem entwickelt werden, mit dem die Identifikation von neuen BFDs aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken ermöglicht wird.

3.1.1 Konstruktion des BFD-defizienten Stamm *Pseudomonas putida* $\Delta mdIC$

P. putida ATCC 12633 kann Benzoylformiat als alleinige Kohlenstoffquelle (C-Quelle) nutzen (Tsou *et al.*, 1990). Benzoylformiat wird durch die BFD zu Benzaldehyd und CO₂ decarboxyliert. Der Benzaldehyd wird dann weiter über den β -Ketoacidweg zu Succinyl- und Acetyl-CoA abgebaut. Succinyl- und Acetyl-CoA dienen dann im Citrat-Zyklus als C-Quelle (Abb. 2). Die nahe liegende Methode einen geeigneten Selektionsstamm zu erhalten, ist die Inaktivierung der BFD in *P. putida* ATCC 12633. Wenn der Stoffwechselweg durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette in die BFD unterbrochen wird, steht Benzoylformiat als C-Quelle nicht mehr zur Verfügung und der Stamm kann theoretisch nicht mehr auf diesem Substrat wachsen. Somit kann dieser Stamm als Selektionsstamm zur Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylase-Gene genutzt werden, die in den Wirt in Form von Genom- und Metagenom-Bibliotheken eingebracht werden und die Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität komplementieren (Abb. 7). Das BFD-Gen *mdIC* soll durch die Insertion einer Gentamycin-Resistenz-Kassette (ΩGm^r) ausgeschaltet werden.

Dafür wurden homologe Bereiche vom Anfang und Ende des *mdlC* Gens amplifiziert und die Ω Gm^r-Kassette zwischen diese Bereiche eingefügt (Kap. 2.12). Diese Mutagenesekassette wurde in den Suizidvektor pSUP202 kloniert (pSUP Δ *mdlC*, Klonierungsschema im Anhang Abb. 37). Durch homologe Rekombination wurde die Ω Gm^r-Kassette in das *mdlC*-Gen inseriert und somit die Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität ausgeschaltet.

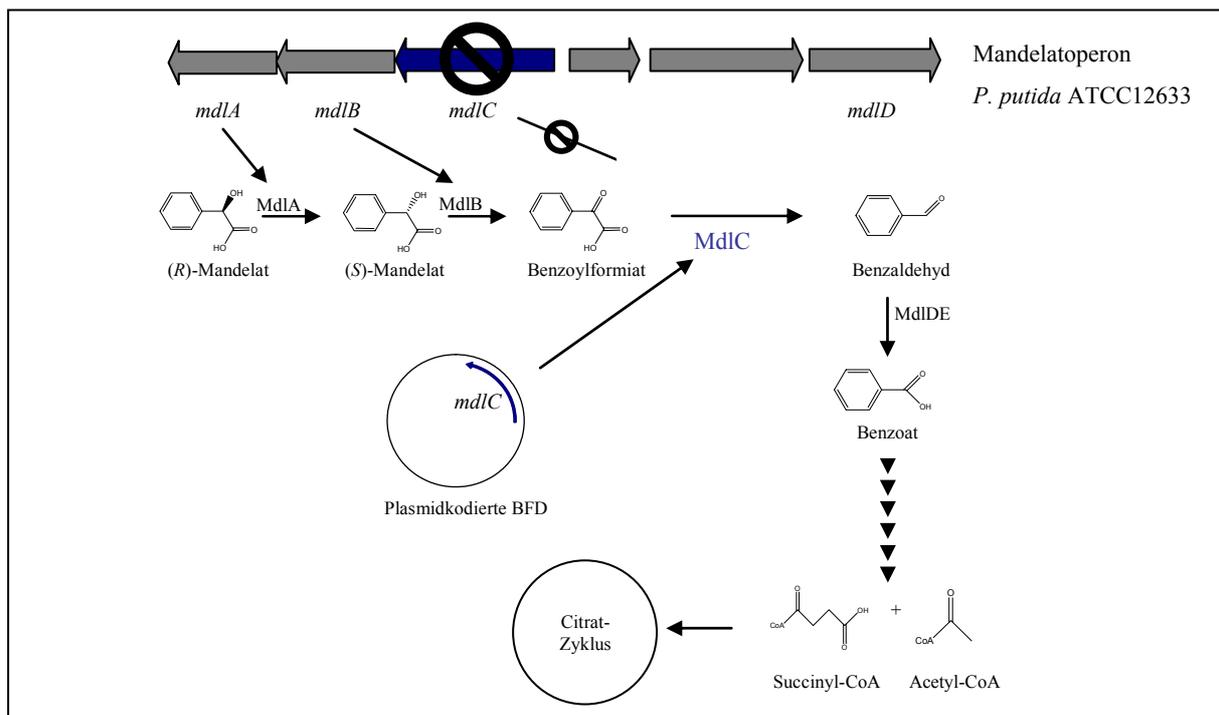


Abb. 7: Wachstum-basiertes Selektionssystem in *P. putida* ATCC 12633. Wenn das Gen für die Benzoylformiatdecarboxylase (*mdlC*) ausgeschaltet ist, kann der Stamm Benzoylformiat nicht weiter abbauen, welches somit nicht mehr als C-Quelle zur Verfügung steht. Der Stamm kann im Minimalmedium nicht mehr wachsen. Wird jedoch eine aktive BFD (MdlC) in Form eines Plasmids in den Stamm eingebracht, wird Benzoylformiat decarboxyliert und steht als C-Quelle zur Verfügung. MdlA: Mandelatracemase, MdlB: (S)-Mandelatdehydrogenase, MdlDE: NAD⁺- und NADP⁺-abhängige Benzaldehyddehydrogenase.

Die Identifizierung des *mdlC*-defizienten *P. putida* Stammes erfolgte durch Selektion auf Gentamycinresistenz und den Verlust der Vektor kodierenden Resistenzen, wodurch das zweite Rekombinationsereignis dokumentiert wurde. Zudem wurde die erfolgreiche Integration der Resistenz-Kassette in das *mdlC*-Gen durch PCR bestätigt (Abb. 8).

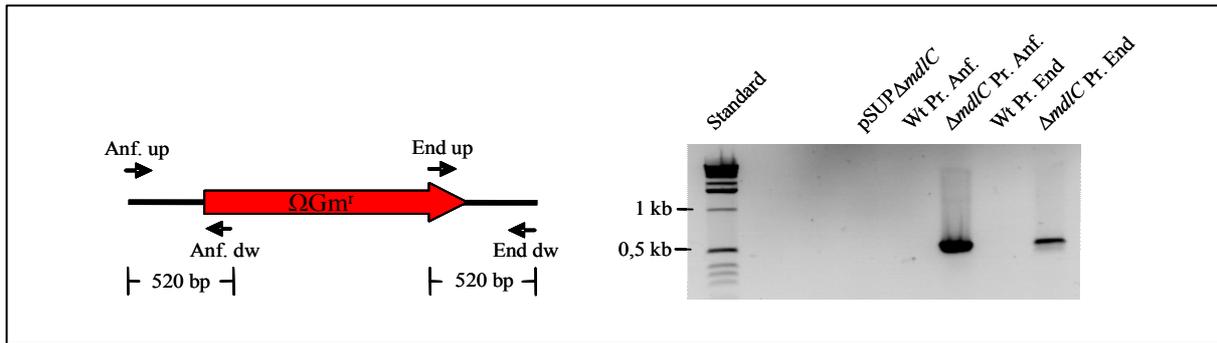


Abb. 8: Nachweis der Insertion der ΩGm^r -Kassette in das *mdlC*-Gen von *P. putida* ATCC12633. Links: Schematische Darstellung der inserierten ΩGm^r -Kassette in das *mdlC* Gen von *P. putida* ATCC12633 mit Bindungsstellen der verwendeten Startermoleküle für die PCR und Längenangaben der erwarteten Produkte. Rechts: Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte auf einem 1,5 % Agarosegel zum Nachweis der Insertion ΩGm^r -Kassette in das *mdlC*-Gen. Als Matrizen-DNA wurden 10 ng der genomischen DNA des Wildtyps bzw. der Mutante eingesetzt. Als Zusätzliche Negativkontrolle wurde 1 ng des Mutagenesekonstruktes pSUP ΔmdlC als Matrizen-DNA verwendet. Die Primer Anf. up und End dw sind nicht auf dem Mutagenesekonstrukt lokalisiert, daher wurde auch hier kein Produkt erwartet. Die Startermoleküle wurden so gewählt, dass nur bei korrekter Insertion der ΩGm^r -Kassette in das *mdlC* Gen ein Produkt entsteht.

Die Insertionsmutante *P. putida* ΔmdlC sollte nun nicht mehr in der Lage sein, auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als alleinige C-Quelle zu wachsen. Überraschenderweise zeigte die Mutante *P. putida* ΔmdlC Wachstum auf dem Selektionsmedium. Somit ist der Einsatz von *P. putida* ΔmdlC als Selektionswirt nicht möglich. Anscheinend besitzt *P. putida* ATCC12633 neben dem *mdlC*-Gen noch mindestens ein anderes Gen, welches BFD-Aktivität vermittelt oder einen alternativen Stoffwechselweg zum Abbau von Benzoylformiat.

3.1.2 Identifizierung eines alternativen Selektionsstammes

Da der BFD-defiziente Stamm *P. putida* ΔmdlC nicht als Selektionsstamm geeignet ist, musste nach einem alternativen Wirt gesucht werden, um das Selektionssystem zu etablieren. Der gesuchte Stamm sollte keine BFD besitzen, jedoch die Fähigkeit, das Produkt der Decarboxylierung Benzaldehyd als alleinige C-Quelle zu nutzen. Dafür musste der Stamm eine Benzaldehyddehydrogenase und den β -Ketoacidweg aufweisen, um Benzaldehyd zu Succinyl- und Acetyl-CoA zu metabolisieren, welche schließlich dem Citrat-Zyklus zugeführt werden. Es ist bekannt, dass Pseudomonaden aromatische Verbindungen über den β -Ketoacidweg als einzige C- und Energiequelle nutzen können. Also wurde nach einem *Pseudomonas*-Stamm in den Datenbanken gesucht, der zusätzlich zum β -Ketoacidweg eine Benzaldehyddehydrogenase besitzt. Als möglicher Kandidat erwies sich *P. putida* KT2440. Das *P. putida* KT2440-Genom ist komplett sequenziert und konnte dementsprechend auf die

notwendigen Enzyme hin analysiert werden (Nelson *et al.*, 2002). Sowohl der β -Ketoacidweg als auch die Benzaldehyddehydrogenase sind vorhanden (Abb. 9). Das Fehlen einer BFD macht diesen Stamm theoretisch zum geeigneten Selektionswirt. *P. putida* KT2440 metabolisiert eine große Anzahl an aromatischen Verbindungen, jedoch gehören Mandelat und Benzoylformiat nicht zu diesem Spektrum (Jimenez *et al.*, 2002). Allerdings musste noch überprüft werden, ob die putative Benzaldehyddehydrogenase funktional ist. Bisher gab es keine Studien diesbezüglich.

Eine weitere Alternative als Stamm für das Selektionssystem stellt *P. putida* DSM50198 dar. Diesem Stamm fehlt das Mandelatoperon und somit die Benzoylformiatdecarboxylase, er besitzt allerdings den β -Ketoacidweg (Tsou *et al.*, 1990). Jedoch ist im Mandelatoperon auch die für das Selektionssystem essentielle Benzaldehyddehydrogenase (MdlDE) enthalten (Abb. 9). Es muss daher überprüft werden, ob der Stamm *P. putida* DSM50198 eine zusätzliche funktionale Benzaldehyddehydrogenase besitzt.

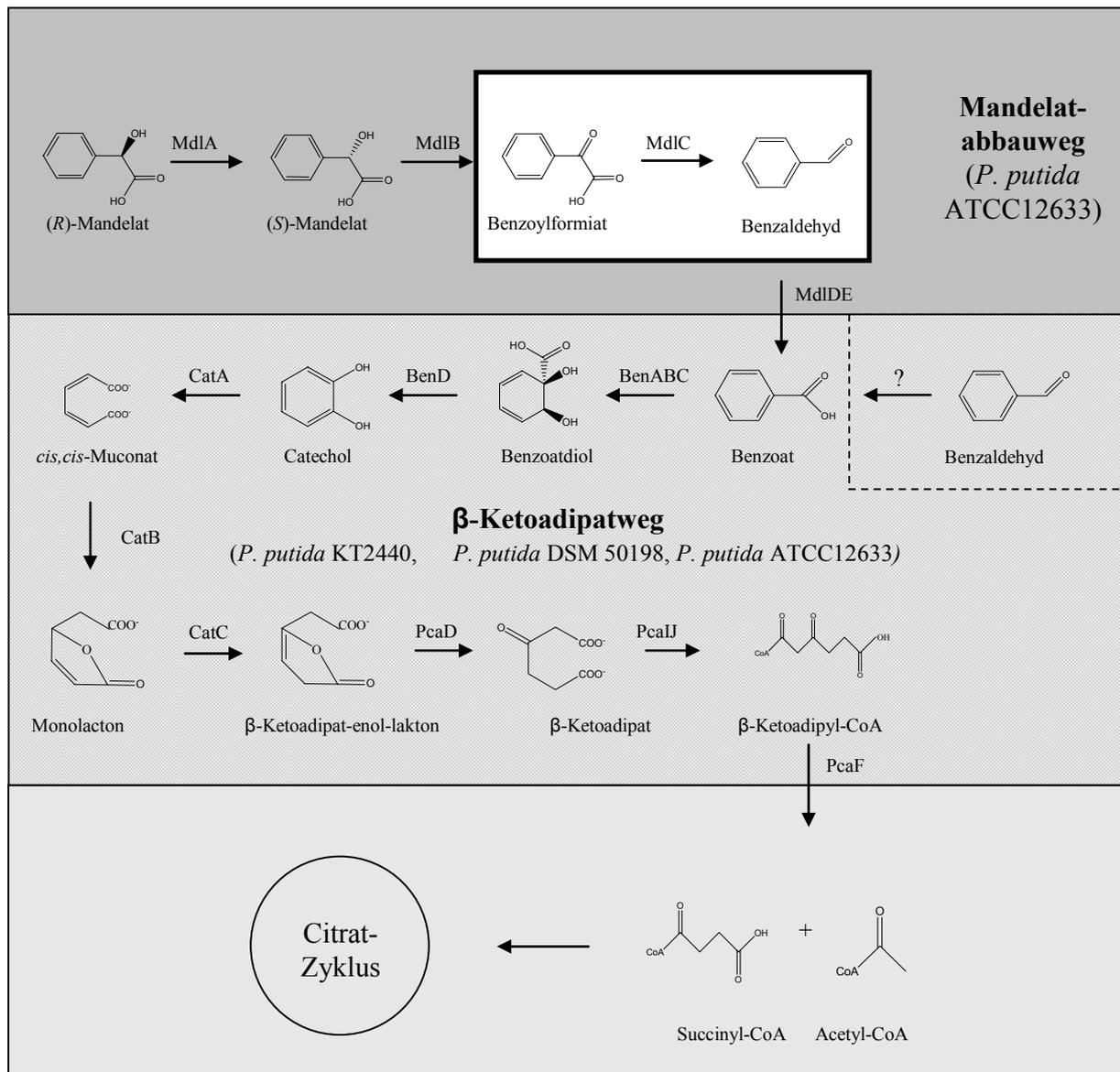


Abb. 9: Vorkommen des Mandelat- und β -Ketoadipatweg in verschiedenen *P. putida* Stämmen. Der Mandelatweg von *P. putida* ATCC12633 ist in dunkelgrau dargestellt und die im Selektionssystem gesuchte Umsetzung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd durch die Benzoylformiatecarboxylase (MdlC) ist in weiß hervorgehoben. Der β -Ketoadipatweg (grau) existiert in den meisten Pseudomonaden. Die Stämme *P. putida* KT2440 und *P. putida* DSM 50198 verfügen zusätzlich über eine Benzaldehyddehydrogenase mit unbekannter Funktion (markiert durch ein Fragezeichen). In hellgrau ist der Abbau von Succinyl- und Acetyl-CoA durch den Citrat-Zyklus dargestellt. MdlA: Mandelatracemase, MdlB: (*S*)-Mandelatdehydrogenase, MdlDE: NAD⁺- und NADP⁺- abhängige Benzaldehyddehydrogenase, BenABC: Benzoatdioxygenase, BenD: 2-Hydro-1,2-Dihydroxybenzoatdehydrogenase, CatA: Catechol 1,2-dioxygenase, CatB: *cis,cis*-Muconatlacton Enzyme (Cycloisomerase), CatC: Muconolactonisomerase, PcaD: β -Ketoadipat-enol-laktonhydrolase I, PcaJ: β -Ketoadipat Succinyl-CoA-transferase Untereinheit, PcaF: β -Ketoadipyl-CoA-thiolase.

3.1.3 Eignung der *P. putida* Stämme KT2440 und DSM50198 für das Selektionssystem

Zunächst wurde überprüft, ob die Stämme *P. putida* KT2440 und DSM50198 nicht in der Lage sind Benzoylformiat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Dafür wurden die Stämme auf entsprechenden Selektionsagarplatten mit Benzoylformiat als einziger C-Quelle ausgestrichen und mehrere Tage bebrütet. Weder *P. putida* KT2440 noch *P. putida* DSM50198 konnten Benzoylformiat metabolisieren und auf dem Selektionsmedium wachsen. Als zweite Voraussetzung sollte die Funktionalität der putativen Benzaldehyddehydrogenase getestet werden. Dazu sollten die Stämme mit Genen, die für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität kodieren, transformiert und auf die Komplementierung des Wachstumsdefizits hin überprüft werden. Hierzu wurden die Gene der Benzoylformiatdecarboxylasen (*mdlC*) aus *P. putida* ATCC12633 und *P. aeruginosa* PAO1 amplifiziert und in den Vektor pBBR1MCS-2 mit weitem Wirtsbereich kloniert. Die erhaltenen Plasmide pBfdPp und pBfdPa wurden dann in die beiden putativen Selektionsstämme *P. putida* KT2440 und DSM50198 transferiert. Die vier erhaltene *P. putida* Stämme KT2440 + pBfdPp, KT2440 + pBfdPa, DSM50198 + pBfdPp und DSM50198 + pBfdPa wurden dann auf dem Selektionsmedium (M9-Medium mit 10 mM Benzoylformiat als alleiniger C-Quelle, Kap. 2.4.1) ausgestrichen und mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Wachstum fand nur dann statt, wenn die Plasmid-kodierte BFD in aktiver Form exprimiert wird. Bei beiden Stämmen mit jeweils beiden Enzymen war dies der Fall (Abb. 10). Sowohl *P. putida* KT2440 als auch *P. putida* DSM50198 verfügen also über aktive Benzaldehyddehydrogenasen und eignen sich als Stämme für das Wachstum-basierte Selektionssystem auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität.

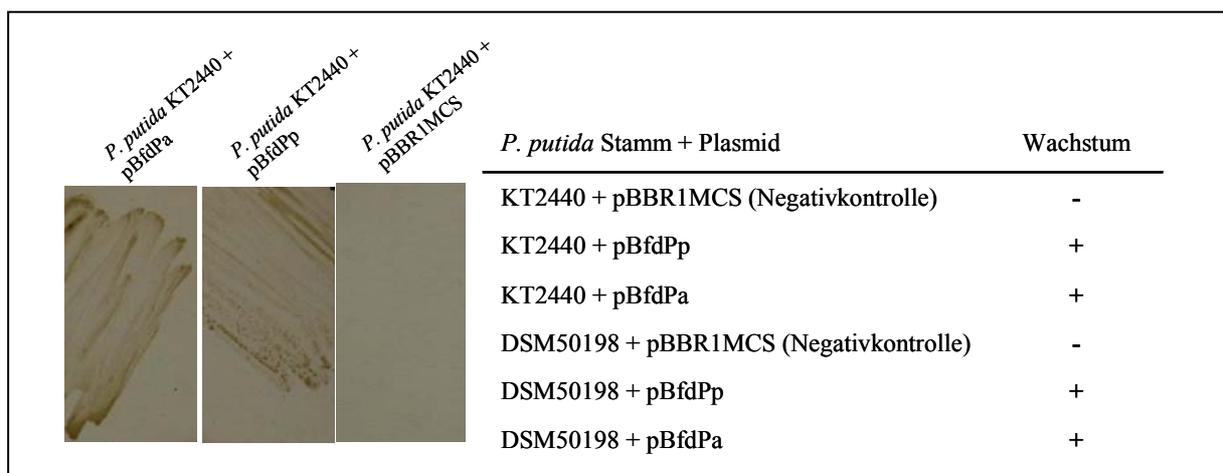


Abb. 10: Wachstum der *P. putida* Stämme KT2440 und DSM50198 mit Plasmid-kodierter BFD auf dem Selektionsmedium. Dargestellt sind Ausschnitte von M9-Mediumagarplatten mit Benzoylformiat als einzige C-Quelle von *P. putida* KT2440 mit klonierter BFD aus *P. putida* ATCC12633 und *P. aeruginosa* PAO1 im Vektor pBBR1MCS bzw. Leervektor pBBR1MCS als Negativkontrolle. Zudem ist eine tabellarische Übersicht des Wachstums auf dem Selektionsmedium der getesteten Stämme mit klonierter BFD bzw. Leervektorkontrolle abgebildet. (-) kein Wachstum; (+) Wachstum nach 2 Tagen

Mit den *P. putida* Stämmen KT2440 und DSM50198 stehen zwei Stämme zur Verfügung, mit denen ein erfolgreiches Wachstum-basiertes Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität durchgeführt werden kann. Der Stamm ATCC 12633 besitzt neben der bereits bekannten vermutlich noch eine weitere BFD.

3.2 Adaption des Selektionssystem auf Benzaldehydlyasen (BAL)

Mit Hilfe des Wachstum-basierten Selektionssystems sollten auch neue Benzaldehydlyasen (BAL) identifiziert werden. Benzaldehydlyasen sind ebenfalls ThDP-abhängige Enzyme und katalysieren die Spaltung von Benzoin zu zwei Molekülen Benzaldehyd. Als nicht natürliche Nebenaktivität kann auch die Rückreaktion stattfinden, die Carbolygation von zwei Molekülen Benzaldehyd zu Benzoin (Abb. 11).

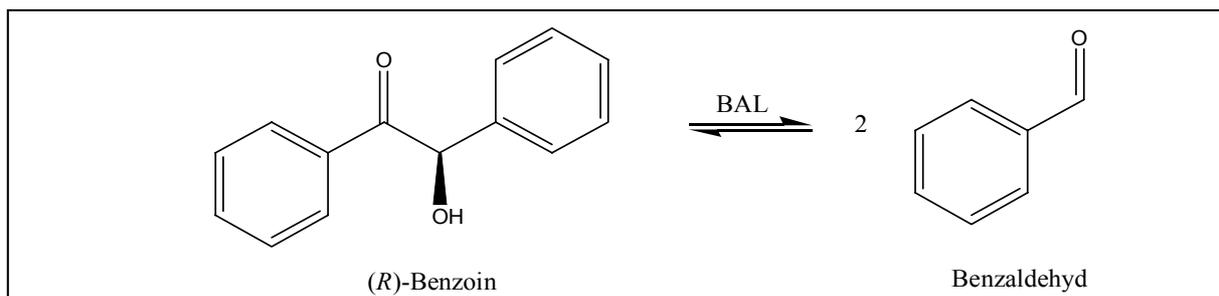


Abb. 11: BAL katalysierte Spaltung der Acyloin-Bindung von Benzoin

Dadurch sind sie in der Lage, die für die Industrie interessanten 2-Hydroxyketone zu synthetisieren. Die Benzaldehydlyase wurde bisher nur in einem Lignin-abbauenden Stamm von *P. fluorescens* gefunden und ermöglicht diesem Stamm das Wachstum mit Benzoin als einziger C-Quelle. Der Umsatz durch die BAL erfolgt sehr spezifisch, da sie außer Benzoin lediglich das 4,4'-Dimethoxyderivat (Anisoin) spaltet (González & Vicuna, 1989).

Gegenüber dem Wachstum-basierten Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität sollte beim Wachstum-basierten Screening auf Benzaldehydlyase-Aktivität nur das Substrat Benzoylformiat gegen Benzoin oder Anisoin ausgetauscht werden. Da bei beiden Reaktionen Benzaldehyd entsteht, kann dieses dann von den *P. putida* Stämmen KT2440 und DSM50198 über den β -Ketoacidweg abgebaut werden.

Um dies zu testen, wurde das Benzaldehydlyase Gen aus *P. fluorescens* Biovar I amplifiziert, in pBBR1MCS-2 kloniert und in *P. putida* KT2440 und DSM50198 transferiert. Als

Selektionsmedium wurde ein Minimalmedium nach Gonzáles und Vicuna (1989) mit 0,5 mM Anisoin als einzige C-Quelle verwendet. Die Stämme KT2440 und DSM50198 mit Plasmid-kodierter BAL (pBBRbal) wurden auf diesen Medium ausgestrichen und mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Jedoch konnte kein Wachstum festgestellt werden. Benzaldehydlyase-Aktivität konnte hingegen anhand des Carboligasetest (Kap. 2.20.3) nachgewiesen werden. Auch der Austausch des Substrates Anisoin gegen Benzoin und die Erhöhung der Substratkonzentration brachten keinen Erfolg. Benzoin und Anisoin sind wasserunlöslich und eine Erhöhung der Substratkonzentration führte zu einer Präzipitation des Substrates. Das Wachstum konnte auch nicht durch die Erhöhung der Löslichkeit der Substrate durch Lösungsmittelzusätze im Medium, wie DMSO oder PEG 500, erreicht werden. Bei Zusatz von DMSO bis zur Lösungsmitteltoleranz von *P. putida* KT2440 und DSM50198 konnte keine signifikante Steigerung der Löslichkeit von Benzoin und Anisoin erreicht werden. Andere Lösungsmittel dienten den Stämmen als C-Quelle und waren somit ungeeignet für ein Wachstum-basiertes Screening. Ebenfalls führte eine Variation des Minimalmediums auf M9-Basis zu keinem Ergebnis. Auch die Umklonierung der BAL in einen „high-copy“-Vektor (pUCPK) brachte kein Wachstum. Um die Stämme an Minimalmedium mit Anisoin bzw. Benzoin als alleiniger C-Quelle anzupassen, wurden sie mit geringen Mengen einer zweiten C-Quelle angezogen, die als Starter C-Quelle dienen sollte, jedoch stagnierte das Wachstum, nachdem die Ersatz C-Quelle aufgebraucht war.

Das Hauptproblem für das Scheitern des Wachstum-basierten Selektionssystems für Benzaldehydlyase-Aktivität liegt wahrscheinlich an der geringen Löslichkeit von Benzoin und Anisoin im wässrigen Medium. So konnten nur weniger als 0,5 mM Substrat im Selektionsmedium in Lösung gebracht werden, was vermutlich nicht ausreichend für ein Wachstum des Stammes war. Wenn es gelingen würde die Löslichkeit des Benzoins oder Anisoin im Selektionsmedium zu erhöhen und somit eine höhere Substratkonzentration erreicht wird, ist eventuell ein Wachstum des Selektionstammes mit klonierter BAL möglich und somit auch die Realisierung des Systems zur Identifizierung von BAL-Aktivität.

3.3 Konstruktion einer Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 und *P. putida* ATCC12633 Δ mdlC und Screening

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *P. putida* ATCC12633 mindestens ein unbekanntes Gen aufweist, welches für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität kodiert und so der Deletionssmutante *P. putida* ATCC12633 Δ mdlC noch das Wachstum auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als einziger C-Quelle ermöglicht. Daher soll geklärt

werden, ob eine weitere BFD in *P. putida* existiert. Des Weiteren sollte die Eignung des Wachstum-basierten Selektionssystems zur Identifizierung von BFD-Aktivität in DNA-Bibliotheken getestet werden.

3.3.1 Konstruktion der Genom-Bibliotheken von *P. putida* ATCC12633 und *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC*

Für die Konstruktion der DNA-Bibliotheken musste die chromosomale DNA von *P. putida* ATCC12633 und der Insertionsmutante *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* isoliert werden (Kap. 2.7.2 und 2.9). Dafür eignete sich die Standardmethode nach Sambrook *et al.* (1989) am besten, da eine größere Menge an genomischer DNA gegenüber der Anwendung mit kommerziellen Kits erzielt wurde.

Zunächst wurde die isolierte chromosomale DNA aus *P. putida* ATCC12633 partiell mit der Restriktionsendonuklease *Sau3AI* verdaut. *Sau3AI* ist ein so genannter „4 Basenpaar Cutter“ und hat als Erkennungssequenz „GATC“. Es entsteht bei der Restriktion mit *Sau3AI* ein AT-Überhang, der zu *Bam*HI-hydrolysierten Erkennungssequenzen kompatibel ist. Da „GATC“ ein sehr häufiges Motiv in einer DNA-Sequenz ist, entstehen bei vollständigen Verdau sehr kleine DNA-Fragmente von höchstens 200 bp. Deshalb führt man einen partiellen Verdau der chromosomalen DNA durch, bei der die Fragmentgröße durch die Zeit und die Enzymmenge limitiert wird. Für die Untersuchung der chromosomalen DNA aus *P. putida* ATCC12633 auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität sollte eine „small-insert“-Bibliothek erstellt werden, da die gesuchte Aktivität durch ein Gen kodiert ist. Die dafür benötigten Fragmente der chromosomalen DNA sollten eine Größe zwischen 2 kb und 10 kb haben, wobei die Größe bekannter BFD-Gene bei ca. 1,6 kb liegt. Fragmente der entsprechenden Größe wurden in den Vektor pBBR1MCS-1 kloniert. Die Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 wurde in *E. coli* DH5 α konstruiert. Das Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität wurde dann im Selektionsstamm durchgeführt. Es wurden 4500 Klone in *E. coli* generiert, die die Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 repräsentieren. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt etwa 5 kb, wodurch eine 4-fache Abdeckung des Genoms von *P. putida* ATCC12633 durch die erstellte Bibliothek erreicht wird.

Bei der Erstellung der Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* wurde wie bei der zuvor konstruierten Bibliothek vorgegangen. Jedoch wurde bei dieser Bibliothek mit pBBR1MCS-2 ein anderer Vektor verwendet. Dieser Vektor unterscheidet sich zum vorherigen verwendeten Vektor nur bezüglich der vermittelten Antibiotikaresistenz. Die Genom-Bibliothek wurde ebenfalls in *E. coli* DH5 α konstruiert und umfasst ca. 4000 Klone

mit einer Insertgröße von 5 kb, wodurch in etwa eine 4-fache Abdeckung des Genoms von *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* erreicht wird.

3.3.2 Durchmusterung der Genom-Bibliotheken von *P. putida* ATCC12633 und *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität

Zum einen soll in diesem Teil die Funktionalität des Wachstum-basierten Screenings bezüglich der Isolierung von Benzoylformiatdecarboxylasen aus DNA-Bibliotheken getestet werden. Zum anderen bestand das Ziel des Vorhabens in der Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen aus dem Genom von *P. putida* ATCC12633.

Zunächst wurde die Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 getestet. Dafür wurden die entsprechenden Plasmide der Bibliothek in den Selektionsstamm *P. putida* KT2440 *via* triparentaler Konjugation transferiert (Kap. 2.10.3). Der Konjugationsansatz wurde auf Selektionsagar mit Benzoylformiat als alleiniger C-Quelle ausplattiert. Überraschender Weise bildete sich nach 2 Tagen ein Bakterienrasen. Als Ursache für das Wachstum von *P. putida* KT2440 auf dem Selektionsmedium stellte sich Ethanol heraus, was zur Lösung des Antibiotikums Chloramphenicol verwendet und dem Medium zugefügt wurde. Die Chloramphenicol-Resistenz dient als Selektionsmarker für die Genom-Bibliothek und ist auf dem Vektor pBBR1MCS-1 lokalisiert. Das mit dem Chloramphenicol zugefügte Ethanol konnte *P. putida* KT2440 als C-Quelle dienen und wurde aus dem Medium entfernt.

Bei dem erneuten Transfer der Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 in *P. putida* KT2440 konnten mehrere Klone identifiziert werden, die in der Lage waren mit Benzoylformiat als einziger C-Quelle zu wachsen. Die Klone wurden isoliert, die entsprechende Plasmide aufgereinigt und durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Alle isolierten Plasmide zeigten das gleiche Restriktionsmuster und der Vektoranteil konnte als pBBR1MCS identifiziert werden. Anhand der Restriktionsanalyse wurde die Insertgröße auf ca. 6 kb geschätzt. Das isolierte Plasmid wurde als „pBBRbfd+“ bezeichnet. Als nächster Schritt galt es, das BFD-Gen im Insert zu lokalisieren und zu identifizieren, welches *P. putida* KT2440 die Verstoffwechselung von Benzoylformiat ermöglicht (Abb. 12).

Die ca. 4000 Klone umfassende Genom-Bibliothek von der Insertionsmutante *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* wurde ebenfalls zur Überprüfung auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität in den Selektionsstamm *P. putida* KT2440 überführt und auf dem Selektionsmedium getestet. Auch hier konnten einige Klone identifiziert werden, deren korrespondierende Plasmide *P. putida* KT2440 Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität verleihen und somit Wachstum auf dem Selektionsmedium ermöglichen. Von den positiven Klonen wurde

Plasmid-DNA isoliert und restringiert. Das Restriktionsmuster zeigte bei allen Klonen das gleiche Ergebnis und lässt auf einen einzigen positiven Klon schließen. Das Insert hatte eine geschätzte Größe von 3 kb. Auf dem Plasmid muss ein neues Benzoylformiatdecarboxylase-Gen kodiert sein, da in der Mutante *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* die bereits bekannte BFD ausgeschaltet ist. Das isolierte Plasmid wurde als pBBR60106 bezeichnet.

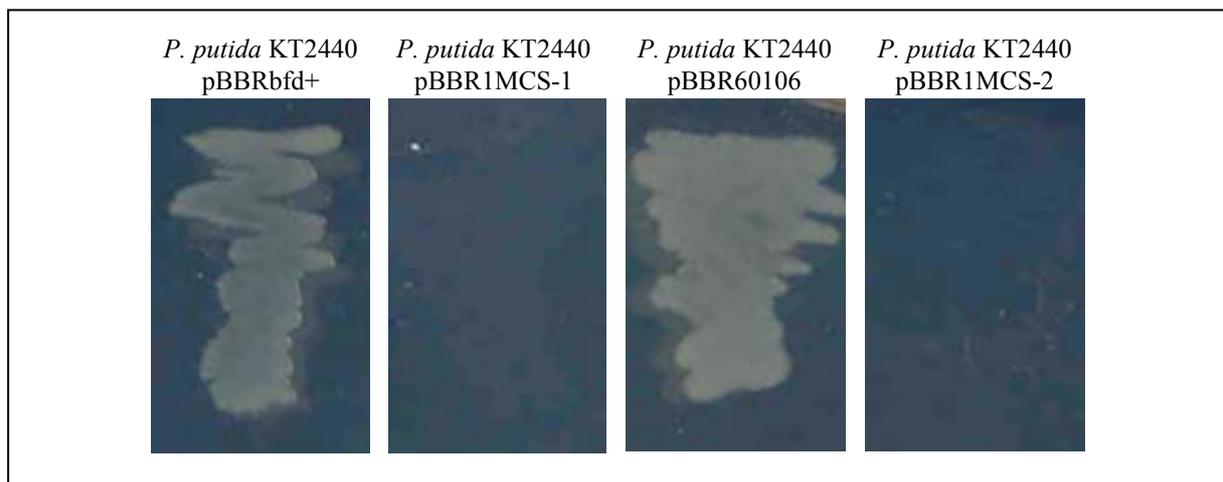


Abb. 12: Wachstum der rekombinanten *P. putida* KT2440 pBBRbfd+ und pBBR60106 auf Selektivagarplatten. *P. putida* KT2440 mit den Plasmiden pBBRbfd+ und pBBR60106 ist in der Lage auf dem Selektionsmedium zu wachsen. Die Kontrolle mit dem Leervektor zeigt kein Wachstum.

3.4 Identifizierung der neuen Benzoylformiatdecarboxylase-Gene

Das Plasmid pBBRbfd+ wurde aus der Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 isoliert. Die BFD-Aktivität konnte mittels des Wachstum-basierten Screenings detektiert werden. Das Insert wurde sequenziert und besteht aus 6234 bp. Auf dem DNA-Abschnitt sind 5 vollständige und ein unvollständiger offener Leserahmen (ORF) kodiert (Abb. 13). Bei dem unvollständigen ORF (*bkdA1*) handelt es sich um die α -Untereinheit der Ketosäuredehydrogenase E1. Der ORF *bkdR* kodiert für einen Transkriptionsregulator. ORF 3 kodiert für eine α/β -Hydrolase und ORF 4 für Glutaminsynthetase. Beide sind zu 95 % den entsprechenden Enzymen aus *P. putida* identisch. Ebenfalls war eine Benzoatdioxygenase (*benC*) auf dem Insert enthalten, die eine Übereinstimmung zu 85 % zu einem vergleichbaren Enzym in *P. putida* aufweist. Schließlich kodiert der Abschnitt auch eine Benzoylformiatdecarboxylase. Die DNA-Sequenz und Homologie ist nicht identisch mit der bereits bekannten BFD (*MdlC*) aus *P. putida* ATCC12633. Das Gen wurde als *bfdB* bezeichnet (Accession No. AM_284966), denn es ist die zweite BFD aus dem Organismus, ist jedoch nicht in dem Mandelatoperon lokalisiert, wofür die Abkürzung „*mdl*“ in dem bisher bekannten Benzoylformiatdecarboxylase-Gen *mdlC* (*bfdA*) steht.

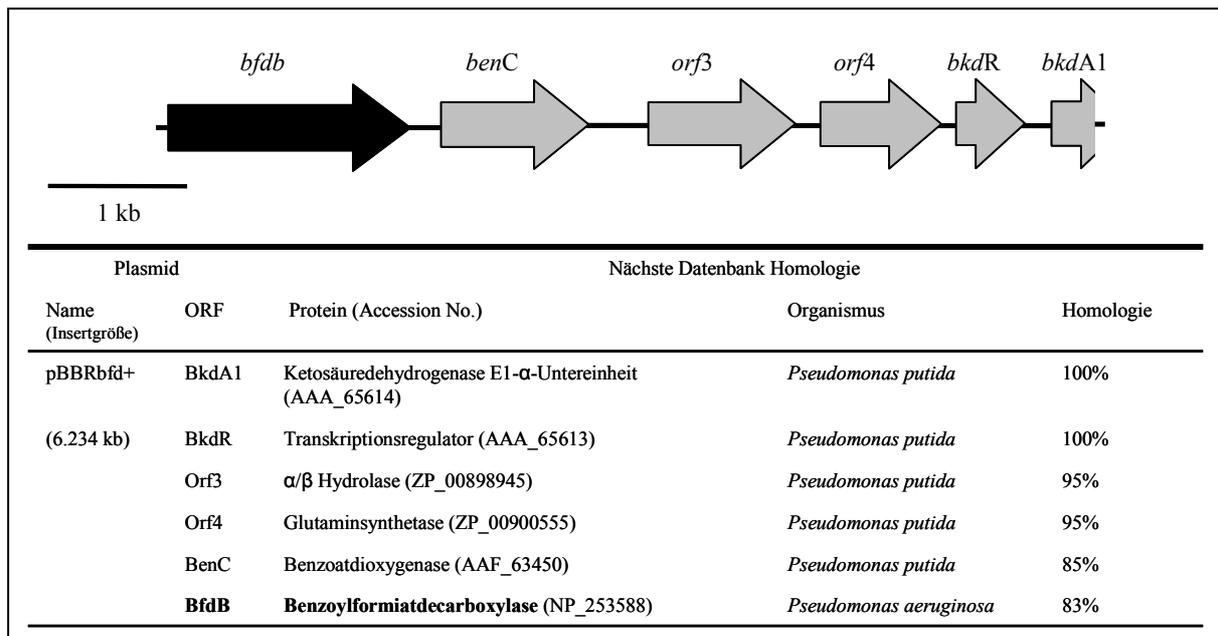


Abb. 13: Organisation der ORFs im Insert des Plasmids pBBRbfd+, welches Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität vermittelt und Datenbank-Homologien. Das Plasmid pBBRbfd+ trägt genomische DNA aus *P. putida* ATCC12633 und verleiht *P. putida* KT2440 Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität. Dargestellt ist die Verteilung der identifizierten ORFs der inserierten genomischen DNA und deren Übereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen, für die sie kodieren. Der ORF, der für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität kodiert, ist als schwarzer Pfeil abgebildet. Unvollständige Pfeile zeigen unvollständige ORFs.

Das *bfdB*-Gen ist 1575 bp lang und kodiert für ein Protein, welches aus 525 Aminosäuren besteht. Die Identität zur Aminosäuresequenz der bisherigen BFD (BfdA oder MdlC) beträgt 63 %, jedoch ist die BFD von *P. aeruginosa* ähnlicher (83 %).

Das Plasmid pBBR60106 wurde beim Wachstum-basierten Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität aus der Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* isoliert. Das Insert des Plasmids wurde vollständig sequenziert und ist 2952 bp lang. Der sequenzierte Abschnitt enthält zwei unvollständige und nur einen vollständigen ORF (Abb. 14). Bei den beiden unvollständigen ORFs handelt es sich um einen putativen LysR-Regulator (*orf1*), der zu 100 % identisch mit einem entsprechenden Regulator aus *P. putida* ist, und um einen möglichen MFS (*major facilitator superfamily*) Transporter (*orf3*), der 82 % Identität mit einem vergleichbaren Enzym aus *P. putida* aufweist. Bei dem einzigen vollständigen ORF, dem sequenzierten Insert, handelt es sich um das mutmaßliche Benzoylformiatdecarboxylase-Gen (*bfdC*, Accession No. AM_284967). Das Gen hat eine Länge von 1587 bp, was 528 Aminosäuren in der Proteinsequenz entspricht. Zu 63 % besteht eine Übereinstimmung zur der bisher bekannten Benzoylformiatdecarboxylase (MdlC) aus *P. putida* ATCC12633 und zu 83 % zur BFD aus *P. aeruginosa*. Eine hohe Identität besteht

zwischen der zuvor isolierten BfdB, die bei 99 % liegt. Nur die letzten 9 Aminosäuren sind unterschiedlich.

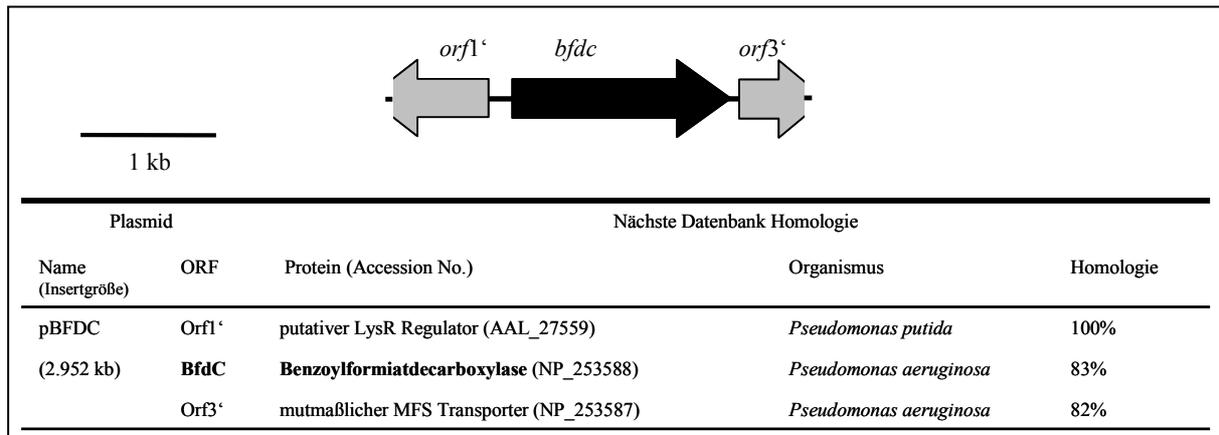


Abb. 14: Organisation der ORFs im Insert des Plasmids pBBR60106, welches Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität vermittelt und Datenbank-Homologien. Das Plasmid pBBR60106 trägt genomische DNA aus *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* und verleiht *P. putida* KT2440 Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität. Dargestellt ist die Verteilung der identifizierten ORFs der inserierten genomischen DNA und deren Übereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen, für die sie kodieren. Der ORF der für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität kodiert, ist als schwarzer Pfeil abgebildet. Unvollständige Pfeile zeigen unvollständige ORFs.

Es konnte gezeigt werden, dass *P. putida* KT2440 ein geeigneter Selektionsstamm für das Wachstum-basierte Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität ist. Zum anderen konnten mit diesem Selektionssystem in dem Stamm *P. putida* ATCC12633 zusätzlich zu der bereits Bekannten zwei bisher unbekannte Benzoylformiatdecarboxylasen identifiziert werden. Es liegt somit ein effektives Wachstums-basiertes Screeningverfahren für die Identifikation neuer Benzoylformiatdecarboxylasen vor.

3.5 Konstruktion von Metagenom-Bibliotheken und Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität

Das neue Wachstum-basierte Selektionssystem zur Identifizierung von BFD-Aktivität, wurde vor allem entwickelt, um das enorme Potenzial des Metagenomansatzes zur Auffindung neuer Biokatalysatoren zu nutzen. Es soll eine effiziente Identifizierung neuer Benzoylformiatdecarboxylasen aus Metagenom-Bibliotheken ermöglichen.

3.5.1 Konstruktion von Plasmid-basierten Metagenom-Bibliotheken

Als Quelle für die Erstellung von Metagenom-Bibliotheken wurden von landwirtschaftlich genutzten Feldern Bodenproben genommen. Zyklische Carbonsäuren werden in der Landwirtschaft als Herbizide eingesetzt. Es wurde angenommen, dass im Boden landwirtschaftlich genutzter Flächen ein großes Konsortium an Bakterien vorhanden ist, die diese zyklischen Carbonsäuren abbauen und eventuell auch Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität aufweisen. Die Bodenprobe stammt von einem Feld nahe Jülich. Neben der direkten Isolierung der metagenomischen DNA (Kap. 2.5.3) aus der Erdprobe wurde zudem eine Anreicherungskultur angesetzt. Zu dem flüssigen Selektionsmedium mit Benzoylformiat als alleinige C-Quelle wurde ein Gramm der Bodenprobe hinzugefügt und 2 Tage unter Schütteln bei 30 °C angezogen. Anschließend wurde der Ansatz sedimentiert und wie unter Kap. 2.5.3 beschrieben die metagenomische DNA isoliert. Die metagenomische DNA wurde partiell in 2 – 10 kb große Fragmente verdaut und in die Vektoren pBBR1MCS mit Chloramphenicol-, Kanamycin- und Gentamycin-Resistenz kloniert (Kap. 2.9). Des Weiteren wurden bereits vorhandene Metagenom-Bibliotheken partiell restringiert und in den Vektor pBBR1MCS ligiert. Es handelt sich um Cosmid- und BAC-basierte Bibliotheken, die aufgrund fehlenden Replikationsursprungs nicht in den Selektionsstamm transferiert werden konnten.

Die erstellten Bibliotheken wurden zur Identifikation von Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität entweder direkt in den Selektionsstamm *P. putida* KT2440 via Elektroporation transferiert (Kap. 2.10.2) oder erst in *E. coli* DH5 α generiert und dann mittels triparentaler Konjugation in *P. putida* KT2440 übertragen (Kap. 2.10.3). Bei der direkten Methode wurden die Zellen auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als einziger C-Quelle angezogen. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot auf LB-Medium inkubiert. Die erhaltenen Bibliotheken wurden durch Restriktionsanalysen von 24 zufällig gewählten

Klonen auf die durchschnittliche Insertgröße und den Anteil von „nur Vektor-DNA“ überprüft. Dabei stellte es sich als schwierig heraus, brauchbare Bibliotheken zu erhalten. Entweder waren die erhalten Bibliotheken sehr klein oder wiesen einen hohen Anteil an reiner Vektor-DNA auf. Bei erfolgreicher Konstruktion einer Bibliothek konnten pro Ligationsansatz 10000 – 20000 Klone erzielt werden, was jedoch nichts über die Qualität der Bank aussagte. Man spricht von einer guten Qualität, wenn die Frequenz der Plasmide, die ein Insert tragen, bei ca. 60 % liegt. In Tabelle 8 ist eine Übersicht über einige der in dieser Arbeit erstellten Metagenombibliotheken aufgelistet.

Tab. 8: Überblick über einige erstellte Metagenombibliotheken aus einer Bodenprobe nahe Jülich.

Name der Bibliothek	Herkunft	Anzahl der Klone	Ø Insertgröße [kb]	Anteil der Plasmide mit Insert [%]
Anr. 1	Anreicherung Bodenprobe	14000	4	10
Anr. 2	Anreicherung Bodenprobe	11000	3	10
Anr. 3	Anreicherung Bodenprobe	12000	4	< 10
Anr. 4	Anreicherung Bodenprobe	11500	5	70
Anr. 5	Anreicherung Bodenprobe	15000	4	80
Anr. 6	Anreicherung Bodenprobe	18000	5	< 10
Anr. 7	Anreicherung Bodenprobe	16000	3	10
Met. 8	Metagenom Bodenprobe	14000	5	60
Met. 9	Metagenom Bodenprobe	12000	3	50
Met. 10	Metagenom Bodenprobe	9500	4	10
Met. 11	Metagenom Bodenprobe	11000	5	30
Met. 12	Metagenom Bodenprobe	10000	5	30
Summe		154000	4	30

3.5.2 Screening von Metagenom-Bibliotheken auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität mit dem Wachstums-basierten Selektionssystem

Die erstellten Metagenom-Bibliotheken wurden anhand des Wachstum-basierten Selektionssystem auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität überprüft. Entweder wurden die Metagenom-Bibliotheken in Form von Ligationsansätzen direkt in den Selektionsstamm *P. putida* KT2440 transformiert oder die unter Kap. 3.6.1 in *E. coli* DH 5α erstellten Bibliotheken *via* triparentaler Konjugation transferiert. Bei der direkten Methode konnte kein positiver Klon identifiziert werden, jedoch war die Transformationsrate von *P. putida*

KT2440 sehr gering. Ein weiterer Vorteil bei der Generierung der Bibliothek in *E. coli* ist, dass die Banken für andere Assays zur Verfügung stehen, wogegen sie bei der direkten Methode nicht erhalten bleiben.

Auch durch das Umklonieren der bereits existierenden Cosmid- und BAC-basierten Metagenom-Bibliotheken in pBBR1MCS-basierte Banken und anschließendes Screening im Wachstum-basierten-Selektionssystem konnte keine Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine auf dem Cosmid pLAFR basierende Bibliothek getestet. Dieses Cosmid kann von *E. coli* nach *P. putida* KT2440 konjugiert werden, jedoch wurde beim Screening der Bank keine Aktivität detektiert.

Ebenfalls wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Bibliotheken in *P. putida* KT2440 transferiert und auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als einziger C-Quelle ausplattiert und mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Nach 2 Tagen konnte ein Klon identifiziert werden, der in der Lage war, auf dem Benzoylformiatselektionsmedium zu wachsen. Der positive Klon stammte aus der Bibliothek Met. 8. Es handelt sich hierbei um eine reine Metagenom-Bibliothek, die DNA aus einer Bodenprobe nahe Jülich enthält. Das entsprechende Plasmid, welches dem Stamm *P. putida* KT2440 Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität verleiht (Abb. 15), weist ein ca. 7 kb großes Insert auf. Weitere Klone mit Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität konnten beim Screening der Metagenom-Bibliotheken nicht beobachtet werden.

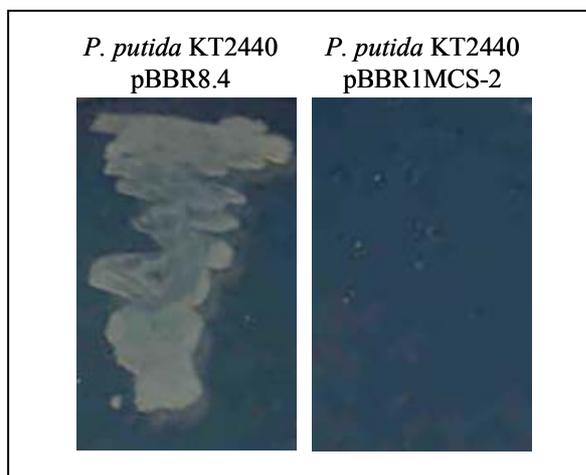


Abb. 15: Wachstum des rekombinanten *P. putida* KT2440 pBBR8.4 auf Selektivagarplatten. *P. putida* KT2440 mit dem Plasmid pBBR8.4 ist in der Lage auf dem Selektionsmedium zu wachsen. Die Kontrolle mit dem Leervektor zeigt kein Wachstum.

3.6 Identifizierung der neuen Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität aus dem Metagenom

Das Plasmid pBRR8.4 wurde aus der Metagenom-Bibliothek Met. 8 isoliert und verleiht *P. putida* KT2440 Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität. Es wurde mittels des Wachstum-basierten Screening auf Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität identifiziert. Zur näheren Charakterisierung wurde das Insert des Plasmids vollständig sequenziert. Die ermittelte Insertgröße beträgt 6586 bp und kodiert für einen unvollständigen und 4 vollständige ORFs (Abb. 16). Der unvollständige ORF (*orf1*) kodiert für eine Aminosäuresequenz mit 65 % Identität zu einer Dehydrogenase aus *Rubrivivax gelatinosus*. Die anderen 4 ORFs haben Ähnlichkeit zu Proteinen aus *Polaromonas naphthalenivorans*. So kodiert *orf2* für einen putativen Transkriptionsregulator, *orf4* für ein Protein mit unbekannter Funktion und *orf5* für einen mutmaßlichen Sigmafaktor mit jeweils 60 % Übereinstimmung. Der dritte ORF im Insert wurde mit *bfdM* bezeichnet, da er für eine putative Benzoylformiatdecarboxylase kodiert und dem Plasmid die entsprechende Aktivität vermittelt (Accession No. AM_284968). Das entsprechende Enzym BfdM besitzt 72 % Homologie zu einer putativen Benzoylformiatdecarboxylase aus *Polaromonas naphthalenivorans*. Die Gensequenz der BfdM besteht aus 1608 bp und die Proteinsequenz dementsprechend aus 536 Aminosäuren.

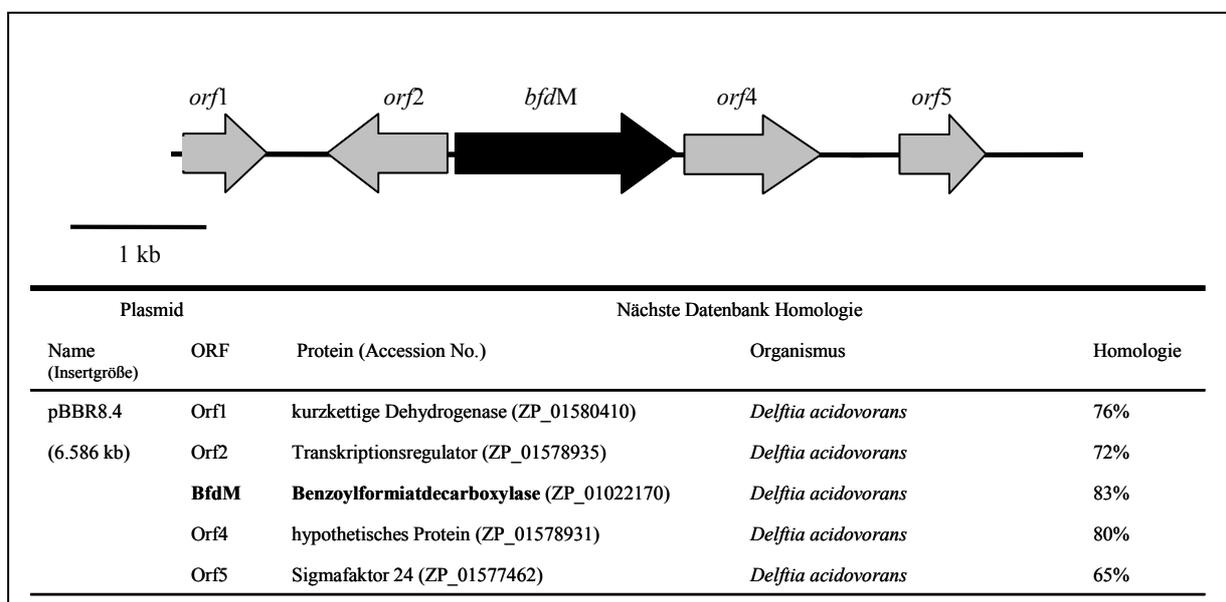


Abb. 16: Organisation der ORFs im Insert des Plasmids pBRR8.4, welches Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität vermittelt und Datenbank-Homologe. Das Plasmid pBRR8.4 trägt metagenomische DNA isoliert aus einer Bodenprobe und verleiht *P. putida* KT2440 Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität. Dargestellt ist die Verteilung der identifizierten ORFs der inserierten metagenomischen DNA und deren Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen, für die sie kodieren. Der ORF, der für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität kodiert, ist als schwarzer Pfeil abgebildet. Unvollständige Pfeile zeigen unvollständige ORFs.

Die BFD von *Polaromonas naphthalenivorans* ist bisher nicht charakterisiert und wurde während der Sequenzierung des Stammes *P. naphthalenivorans* CJ2T identifiziert (Jeon *et al.*, 2004). *P. naphthalenivorans* CJ2T wurde aus einem mit Kohleteer kontaminierten Grund eines Süßgewässers isoliert und besitzt die Fähigkeit, auf dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Naphthalin als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Seit kurzem existieren jedoch Sequenzdaten von zwei bisher nicht vollständig sequenzierten Bakterien. Es handelt sich um *Comamonas testosteroni* KF-1 (Accession No. NZ_AAUIJ000000000) und *Delftia acidovorans* SPH-1 (Accession No. NZ_AAVD000000000). Zu deren putativen BFDs weist BfdM eine Homologie von 80 % (*Comamonas testosteroni* KF-1) und 83 % (*Delftia acidovorans* SPH-1) auf. Beide gehören, wie *P. naphthalenivorans* CJ2T, zur Familie *Comamonadaceae* und sind am bakteriellen Abbau des Tensides LAS (Lineares Alkylbenzolsulfonat) involviert (Schleheck *et al.*, 2004).

Mit Hilfe des neu etablierten Selektionssystems konnte eine Benzoylformiat-decarboxylase (BfdM) aus dem Metagenom isoliert werden.

3.7 Analyse der Primärstrukturen der neu identifizierten Benzoylformiat-decarboxylasen

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Katalyse von Benzoylformiat zu Benzaldehyd konnten mit BfdB, BfdC und BfdM drei neue Benzoylformiatdecarboxylasen durch Selektion identifiziert werden. Die neuen Benzoylformiatdecarboxylasen wurden untereinander und mit der bereits sehr gut charakterisierten BFD (MdlC) aus *P. putida* ATCC12633 (Hasson *et al.*, 1998; Polovnikova *et al.*, 2003) und der BFD aus *P. aeruginosa* bezüglich der Primärstruktur verglichen. BfdB und BfdC stammen ebenso wie MdlC aus *P. putida* ATCC12633, weswegen MdlC auch alternativ als BfdA bezeichnet werden kann. BfdM stammt aus einer Metagenom-Bibliothek, die aus einer Bodenprobe von einem landwirtschaftlich genutzten Acker isoliert wurde. BfdB und BfdC besitzen eine Übereinstimmung von 99 %, sowohl auf DNA- wie auf Proteinebene. Lediglich die letzten 9 Aminosäuren am C-terminus unterscheiden die beiden Enzyme. Phylogenetisch gesehen sind beide der BFD aus *P. aeruginosa* am nächsten (Homologie: 83 %). Zur BfdA (MdlC) weisen beide eine Identität von 63 % auf. Die Identität zwischen BfdM und BfdA liegt bei 42 % und BfdM zeigt den größten Verwandtschaftsgrad (83 %) zur einer bisher nicht charakterisierten BFD aus *Delftia*

acidovorans SPH-1. In Abb. 17 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der neu identifizierten Enzyme mit den Benzoylformiatdecarboxylasen aus *P. putida* ATCC12633 (BfdA) und *P. aeruginosa* abgebildet.

BFDA Pp	1	MAS-----VHGTTVEELRRQGLDITVFGNPGSNELPFLKDFPEDFRYILALQEACVVGADGYAQAASRKBAFINLH*
BFD Bp	1	MKT-----VHGATYDILROHGLTTIFGNPGSNELPFLKCFPEDFRYILGLHEGAVVGMADGYALASGQPTFVNLH
BFD C Pp	1	MKT-----VHGATYDILROHGLTTIFGNPGSNELPFLKCFPEDFRYILGLHEGAVVGMADGYALASGQPTFVNLH
BFD Pa	1	MKT-----VHGATYDILROHGLTTIFGNPGSNELPFLKCFPEDFRYILGLHEGAVVGMADGYALASGQPTFVNLH
BFD M	1	MQETTPQNPAASFIVRHAVIDLRLQGLMTRIFGNPGSTELPLFRDYPEDFSYVVLGLQEAVVGMADGYAQAATRRASFVNLH
BFDA Pp	71	SAAGTGNMGALSNAWNNSHSPILVITAGQQRAMIGVEALLTNVDAANLPRPLVKWSYEPASAAEVEPHAMSRAIHMAMAP
BFD Bp	71	AAAGTGNMGALTNAWYSHSPLVITAGQQVRSMI GVEAMLANVDAALPKPLVKWSHEPATAQDVPRALSCAIHTANLPP
BFD C Pp	71	AAAGTGNMGALTNAWYSHSPLVITAGQQVRSMI GVEAMLANVDAALPKPLVKWSHEPATAQDVPRALSCAIHTANLPP
BFD Pa	71	AAAGTGNMGALTNAWYSHSPLVITAGQQVRSMI GVEAMLANVDAALPKPLVKWSHEPATAQDVPRALSCAIHTANLPP
BFD M	81	SAAGVGHAMANLFTAFKNRTPMVIITAGQQARSILQDFPELHNSQAALPKPEYVKWSCEPARAEDVQALARAYYIAMQEP
BFDA Pp	151	QGPVYLSIPYDDWDKADDPQSHHLFDRHVS SVRLNDQDLDIIVKALNSASNPATVLPDVAANANADCVMLAERLKAP
BFD Bp	151	RGPVYVSLPYDDWACEAPSGVEHLARROVSSAGLSPAQLOHLCERLAAARNPVLVLPDVGSAANGLAVQLAEKLRMP
BFD C Pp	151	RGPVYVSLPYDDWACEAPSGVEHLARROVSSAGLSPAQLOHLCERLAAARNPVLVLPDVGSAANGLAVQLAEKLRMP
BFD Pa	151	RAPVYVLSIPYDDWAQAPAGVEHLAAROVSSAALBAPALLAELGERLSRSRNPLVLPDVGANANGLAVELAEKLRMP
BFD M	161	RGPVVLSIPADDWDHPAEP---IQVREVGFSREDDRVLDIMGAALDGAAPALVVGAAVDRGAAWDVAVALAERHQAR
BFDA Pp	231	VWVAPSASRCPPPTRHACFRGLMPAGIAAISQLLEGHVVVLVIGAPVFRYHQYDFGQYLKPCSTRLLISVTCDFLEAARAPM*
BFD Bp	231	AWVAPSASRCPPPTRHACFRGVLPAAIAGISHNLAGHDLILVVGAPVFRYHQFAPGNLPAACCELLHLTCDGGEAARAPM
BFD C Pp	231	AWVAPSASRCPPPTRHACFRGVLPAAIAGISHNLAGHDLILVVGAPVFRYHQFAPGNLPAACCELLHLTCDGGEAARAPM
BFD Pa	231	AWVAPSASRCPPPTRHACFRGVLPAAIAGISRLLDGHDLILVVGAPVFRYHQFAPGDYLPACAEILVQVTCDFGEAARAPM
BFD M	237	VYVAPMSGRCSFPEDEHPLHAGFLPAMRERIVQLLDGHDVVFVGAATFTYHVEGQCPHTPEESALYQLIEDPATAAWAPV
BFDA Pp	311	GDALVGDIALTLEAVLDGVPQSVRQMP-ALPAEFPVADGG-LLRPETVFDLNLALPKDAIYVKESTSTVGAFWRRE
BFD Bp	311	GDALVGDIALTLEAVLDGVPQSVRQMP-ALPAEFPVADGG-LLRPETVFDLNLALPKDAIYVKESTSTVGAFWRRE
BFD C Pp	311	GDALVGDIALTLEAVLDGVPQSVRQMP-ALPAEFPVADGG-LLRPETVFDLNLALPKDAIYVKESTSTVGAFWRRE
BFD Pa	311	GDALVGDIALTLEAVLDGVPQSVRQMP-ALPRPALAEEGG-PLRPETVFDVIDALAPRDAIFVKESTSTVTAFWRRE
BFD M	317	GTAITGNIRLGVQELLARPAPAPPAABARRVAAPRAQPPEAGQRMVSAWAMQTLAEVRDPRSIIIVEEAPSRSSTIQAHLP
BFDA Pp	389	MREPGSYFFPAAGGLGFGLPAAVGQVLAEPGRQVIGVI GDGSANYGHTALWTAQYNIPTIFVIMNNTY GALRWFADVL
BFD Bp	389	MREPGSYFFPAAGGLGFGLPAAVGQVLAEPGRQVIGVI GDGSANYGHTALWTAQYNIPTVVFII LKNNTY GALRWFADVL
BFD C Pp	389	MREPGSYFFPAAGGLGFGLPAAVGQVLAEPGRQVIGVI GDGSANYGHTALWTAQYNIPTVVFII LKNNTY GALRWFADVL
BFD Pa	389	MREPGSYFFPAAGGLGFGLPAAVGAQLAQRQVIGVI GDGSANYGHTALWSAAQYRVPVAVFII LKNNTY GALRWFADVL
BFD M	397	LFHSATFYTMCSGGLGHSMPAGVGVALAEPAKKVIAVI GDGSSMYAIIQALWSAAQLRLIITVILKNRRAALQEFKRVF
BFDA Pp	468	---EAENVPEGLDVPGLDFRRLAKGYGVQALKADNLEQLKGSLEQALSAKGPVLI EVSTVSPVKB
BFD Bp	468	---DVNDAPGLDVPGLDFCAIARGYGVQAVHAATGSFAQAALREALESDRPVLI CAASSR----
BFD C Pp	468	---DVNDAPGLDVPGLDFCAIARGYGVQAVHAATGSFAQAALREALESDRPVLI EVPTQTIEP-
BFD Pa	468	---EVPDAPGLDVPGLDFCAIARGYVEALHAATREELEGALKHALAADRPVLI EVPTQTIEP-
BFD M	477	GYRDGKVEGTELEPDI DVFGLAKAQECDGVEVEDALQLRAVLEAAALASPREVLI VEVEVA----

Abb. 17: Sequenzvergleich von BfdA (Mdlc), BfdB, BfdC aus *Pseudomonas putida* ATCC12633 (gekennzeichnet als Pp), BFD aus *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) und BfdM isoliert aus einer Metagenom-Bibliothek. Hoch konservierte Regionen sind mit Schwarz, ähnliche Aminosäuren mit Grau hinterlegt. Aminosäuren, die das katalytische Zentrum bilden, sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Aminosäurereste, die an der Substratbindung beteiligt sind, sind durch einen Punkt (•) markiert. Die in der Box dargestellten Reste spielen eine Rolle bei der Metallion- und ThDP-Bindung.

Alle Aminosäureseitenketten, die an der Bildung des aktiven Zentrums (S26, E28, H70, H281: Positionsangaben beziehen sich auf BfdA), an der Substratbindung (S26, A460, F460) und der Bindung der Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} (Y458, G427, G429, D428, N455) involviert sind (Hasson *et al.*, 1998), sind in den neuen Enzymen, einschließlich der BfdM, ebenfalls zu finden.

Ein struktureller Unterschied zwischen der BfdM und den anderen 4 Bfds liegt im um 10 Aminosäuren verlängerten N-Terminus bei der BfdM. BfdB und BfdM besitzen zudem einen verkürzten C-Terminus.

3.8 Heterologe Expression der neuen Benzoylformiatdecarboxylasen

Für die biochemische Charakterisierung sollen die korrespondierenden Gene der drei neuen Enzyme im heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3) im pET-System unter der Kontrolle eines T7-Promotors überexprimiert und anschließend die Proteine aufgereinigt werden. Die rekombinanten Proteine sollen mit einem C-terminalen His-Tag versehen werden, wodurch eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht wird.

3.8.1 Überexpression von BfdB aus *P. putida* ATCC12633

Das Gen *bfdB* wurde vom entsprechenden Plasmid pBBRbfd+, mit den für die Klonierung in den Vektor pET22b notwendigen flankierenden Restriktionsschnittstellen, amplifiziert. Bei dieser Reaktion mit den Startermolekülen BfdBNdepET/BfdBBamHIo.StC wurde das Stoppkodon im Gen *bfdB* deletiert und die amplifizierte DNA anschließend in den Expressionsvektor pET22b kloniert. Das resultierende Plasmid pET22bfdb wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit hin überprüft. Als Expressionswirt diente *E. coli* BL21 (DE3), der mit dem Plasmid pET22bfdb transformiert wurde. Bei der Expression konnte eine zusätzliche Proteinbande mit dem kalkulierten Molekulargewicht der BfdB (ca. 54 kDa) in der SDS-Page detektiert werden (Abb. 18 A). Nach dem Zellaufschluss und der Fraktionierung in lösliche und unlösliche Proteine wurde BfdB in der unlöslichen Fraktion lokalisiert (Abb. 18 B). Dies ist ein Indiz für die Bildung von Proteinaggregaten in Form von so genannten „inclusion bodies“. In solchen Proteinaggregaten ist das Enzym inaktiv, was durch Aktivitätstests bestätigt wurde. Es wurde die Decarboxylase- und Carboligase-Aktivität in der unlöslichen und löslichen Fraktion bestimmt, jedoch konnte kein Unterschied zur negativ Kontrolle (*E. coli* BL21 (DE3) + pET22b) ermittelt werden.

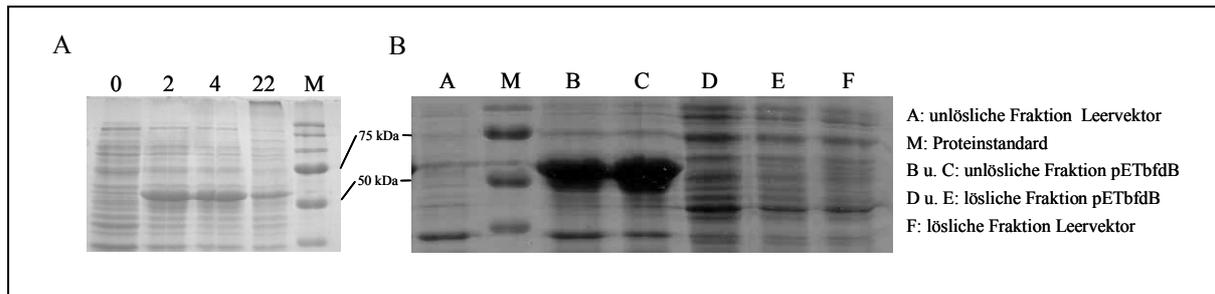


Abb. 18: SDS-PAGE Analyse der Überexpression von BfdB aus *P. putida* ATCC12633 im heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3). A: SDS-Page von Ganzzelleextrakten (GZE) von *E. coli* BL21 (DE3) pET22**bfdB** vor der Induktion (0), 2 h (2), 4 h (4) und 22 h (22) nach der Induktion mit IPTG. B: Auftragung der unlöslichen und löslichen Fraktion von GZE von *E. coli* BL21 (DE3) pET22**bfdB** und pET22b (Leervektorkontrolle) 22 h nach der Induktion mit IPTG. Das kalkulierte Molekulargewicht der BfdB beträgt ca. 54 kDa.

Um die Bildung der „inclusion bodies“ zu mindern und somit die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu erhöhen, wurde die Expression bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt (statt 37 °C bei 30 °C, 25 °C und 10 °C). Durch das Erniedrigen der Temperatur sollte die Synthese von BfdB gedrosselt und somit die Möglichkeit der korrekten Faltung des Enzyms erhöht werden. Jedoch konnte durch diese Maßnahmen die Löslichkeit von BfdB nicht erhöht und somit auch keine Aktivität nachgewiesen werden. Auch der Austausch des Expressionswirtes von *E. coli* BL21 (DE3) zu *E. coli* Rosetta™ (DE3) und *E. coli* Origami™ (DE3) führten nicht zur Erhöhung der Löslichkeit des Proteins. In dem Stamm *E. coli* Origami™ (DE3) ist die Reduktion von Cysteinen eingeschränkt, wodurch Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstruktur im Cytoplasma besser ausgebildet werden können. In *E. coli* Rosetta™ (DE3) werden in *E. coli* seltene tRNAs coexpressiert, die zu einer verbesserten Expression des Zielproteins führen sollen.

Auch die Coexpression mit diversen Chaperonen, die von der Firma Takara Bio Inc. (Nishihara *et. al.*, 2000) vertrieben werden, konnten die Bildung von Proteinaggregaten nicht verhindern. Die Umklonierung des *bfdB*-Gens unter die Kontrolle eines *lac*-Promotors in die Vektoren pBBR1MCS und pUCPKS führten zu keiner sichtbaren Expression in der SDS-PAGE und keiner detektierbaren BFD-Aktivität in *E. coli*.

Das Protein BfdB konnte somit nicht in aktiver Form im heterologen Wirt *E. coli* exprimiert werden, wodurch auch kein Enzym zur weiteren Charakterisierung gewonnen werden konnte.

3.8.2 Produktion von BfdM im heterologen Wirt *E. coli*

Über eine Standard-PCR wurde das Gen *bfdM* mittels der Primer BFDMN_{dep}ET und BFDMH_{ind}ET amplifiziert und mit entsprechenden flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen. Als Matrize diente das Plasmid pBBR8.4, welches zuvor aus einer Metagenom-Bibliothek isoliert wurde. Bei dieser Reaktion wurde das Stoppkodon deletiert und das Gen nach der Klonierung in den Vektor pET22b mit einem C-terminalen His-Tag fusioniert. Das resultierende Plasmid pET22bfdM wurde durch Sequenzierung überprüft. Der Expressionswirt *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem Plasmid transformiert. Jedoch lag das Protein wie auch im Fall der BfdB in Form von „inclusion bodies“ vor, es konnte kein aktives Enzym gebildet werden. Um die Löslichkeit von BfdM zu erhöhen wurden diverse Expressionsparameter verändert, wie die Erniedrigung der Expressionstemperatur, die Expression ohne His-Tag im Vektor pET11 (Abb. 19), ohne Induktion und unter Kontrolle des *lac*-Promotors, jedoch ohne Erfolg. Ebenfalls wurde versucht, mit dem Einsatz von Faltungshelfern der Bildung von Proteinaggregaten entgegenzuwirken. Es wurden die Chaperone der Firma Takara Bio Inc. coexprimiert, jedoch konnte kein positiver Einfluss beobachtet werden.

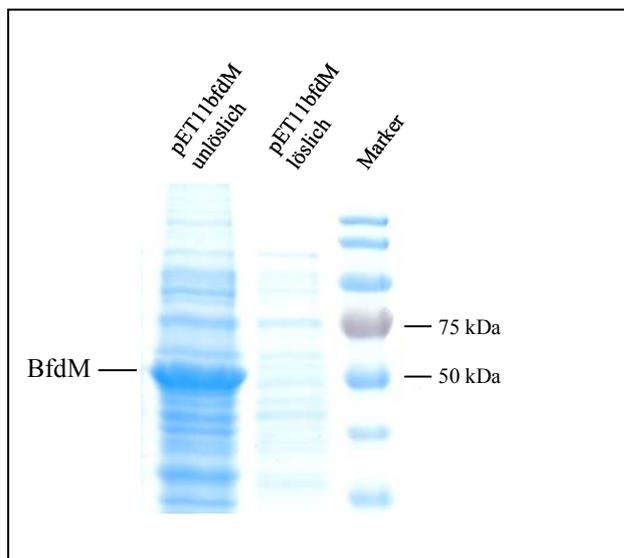


Abb. 19: SDS-PAGE Analyse der Überexpression von BfdM im heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3). Dargestellt ist die Überexpression bei 24 °C des *bfdM* Gens im Vektor pET11 ohne His-Tag. Links ist die unlösliche und in der Mitte die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses aufgetragen. Rechts ist der Standard abgebildet.

Zum anderen wurde eine von Kreuz *et al.* (2006) neu entwickelte Chaperon-Genexpressionsbank („Toolbox“) angewendet. Bei dieser „Toolbox“ handelt es sich um Faltungshelfer aus *P. aeruginosa*. Diese Chaperone sind einzeln oder in randomisierten Kombinationen auf Plasmiden kodiert und werden mit dem Zielgen coexprimiert. Die Toolbox besteht aus 45 Plasmiden mit einzelnen und 40, die eine Kombination aus 3 Chaperonen enthalten. *E. coli* BL21 (DE3) pET11bfdM wurde zufällig mit den Plasmiden der

Chaperon-Toolbox transformiert. Es wurden 800 Klone, die das Plasmid pET11bfdM und ein Chaperonplasmid enthielten, für ein Screening auf Decarboxylaseaktivität eingesetzt. Wenn *bfdM* ohne Chaperone exprimiert wird, kann keine Aktivität aufgrund der Akkumulation des Proteins nachgewiesen werden. Durch das Screening sollte überprüft werden, ob ein Chaperon aus der Toolbox in der Lage ist, die Löslichkeit von BfdM zu erhöhen und somit zu einem aktiven Enzym führt. Das Screening wurde im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt (Kap. 2.19.10). Die Klone wurden 2 Tage bei 25 °C in 1,2 ml eines selbst induzierenden Mediums unter Selektionsdruck angezogen. In diesem Medium wird die Expression durch den Verbrauch von Glucose und durch den Beginn der Verstoffwechslung von Lactose induziert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und mit dem Enzym Lysozym aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wurde die unlösliche von der löslichen Fraktion getrennt, wobei letztere im gekoppelten Decarboxylase-Assay eingesetzt wurde. Im Gegensatz zum Standardassay wurde die Enzymlösung mit dem Substrat Benzoylformiat vorinkubiert und die Assaykomponenten konzentrierter eingesetzt, wohingegen der Anteil der Enzymlösung erhöht wurde. Es wurde keine Kinetik, sondern eine Endpunkt-Bestimmung durchgeführt, wobei die NADH-Abnahme photometrisch überprüft wurde. Bei Decarboxylase-Aktivität sollte die Absorption nach 2 min stark, bei fehlender Aktivität nur leicht abfallen oder konstant bleiben. Unter den 800 getesteten Klonen konnten jedoch keine Klone mit Decarboxylase-Aktivität nachgewiesen werden. Der Einsatz der Chaperon-Toolbox führte somit nicht zur Expression einer aktiven BfdM. Das Enzym BfdM konnte nicht überexprimiert werden, wodurch eine nachfolgende Charakterisierung nicht möglich ist.

3.8.3 Überexpression von BfdC im heterologen Wirt *E. coli*

Das *bfdC* Gen wurde über eine Standard-PCR mit den Startermolekülen BFDCNdepET und BFDCHindpET amplifiziert und über die eingefügten flankierenden Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pET22b kloniert. Es entstand das Konstrukt pET22bfdC. Bei der Expression wird das korrespondierende Enzym BfdC mit einem C-terminalen His-Tag versehen. Als Expressionswirt dient *E. coli* BL21 (DE3), welcher mit dem Plasmid pET22bfdC transformiert wurde. Nach der Expression für 16 h nach Induktion mit IPTG bei 37 °C wurden die Zellen aufgeschlossen und in lösliche und unlösliche Bestandteile fraktioniert. Durch SDS-PAGE-Analyse wurde das Protein BfdC in der unlöslichen Fraktion detektiert. Dies spricht für eine Akkumulation des Enzyms in Proteinaggregaten und somit für ein inaktiv exprimiertes BfdC. Dieses Problem wurde auch nicht durch Senken der

Expressionstemperatur auf 30 °C, 25 °C oder 10 °C gelöst. Mit Hilfe des Einsatzes von Faltungshelfern sollte die Bildung von so genannten „inclusion bodies“ reduziert und von löslichen aktiven BfdC erzielt werden. Die Chaperon-Gene sind auf einen separaten Plasmid kodiert, die mit dem Zielgen coexprimiert werden. Es handelt sich um 6 verschiedene Faltungshelfer Gene (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES*, *groEL* und *tif*) die von der Firma Takara Bio Inc. auf Plasmiden in unterschiedlicher Kombination vertrieben werden. Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Expressionsplasmid pET22bfdC wurde jeweils mit drei Plasmiden (pGro7, pKJE7 und pG-Tf2), die Chaperon-Gene tragen, transformiert und die Expression bei 25 °C durchgeführt. In allen drei Ansätzen konnte nach Zellaufschluss und Fraktionierung Decarboxylase-Aktivität in der löslichen Fraktion festgestellt werden, was für die Expression eines funktionsfähigen Enzyms sprach (Abb. 20). Die höchste Enzymaktivität wurde im Ansatz mit dem Plasmid pG-Tf2 detektiert, durch das die Chaperon-Gene *groES*, *groEL* und *tif* coexprimiert werden. Durch die SDS-PAGE Analyse konnte der erhöhte Anteil des Zielproteins durch die Coexpression der Faltungshelfer in der löslichen Fraktion nicht eindeutig bestätigt werden, da der Anteil noch so gering war, dass keine eindeutige Proteinbande sichtbar war und der größte Teil der aktiven BfdC noch als Proteinaggregat vorlag (Abb. 20). Zudem weisen die exprimierten Chaperon-Gene *groEL* und *tif* und deren Produkte eine ähnliche Größe wie das Zielprotein auf (Tf: 56 kDa, GroEL: 60 kDa, BfdC ca. 54 kDa), wodurch sich die Erhöhung der Löslichkeit von BfdC nur durch das Detektieren von Aktivität in der löslichen Fraktion eindeutig bestimmen lässt. BfdC kann somit in aktiver Form exprimiert werden, womit eine Reinigung über den C-terminal fusionierten His-Tag möglich ist.

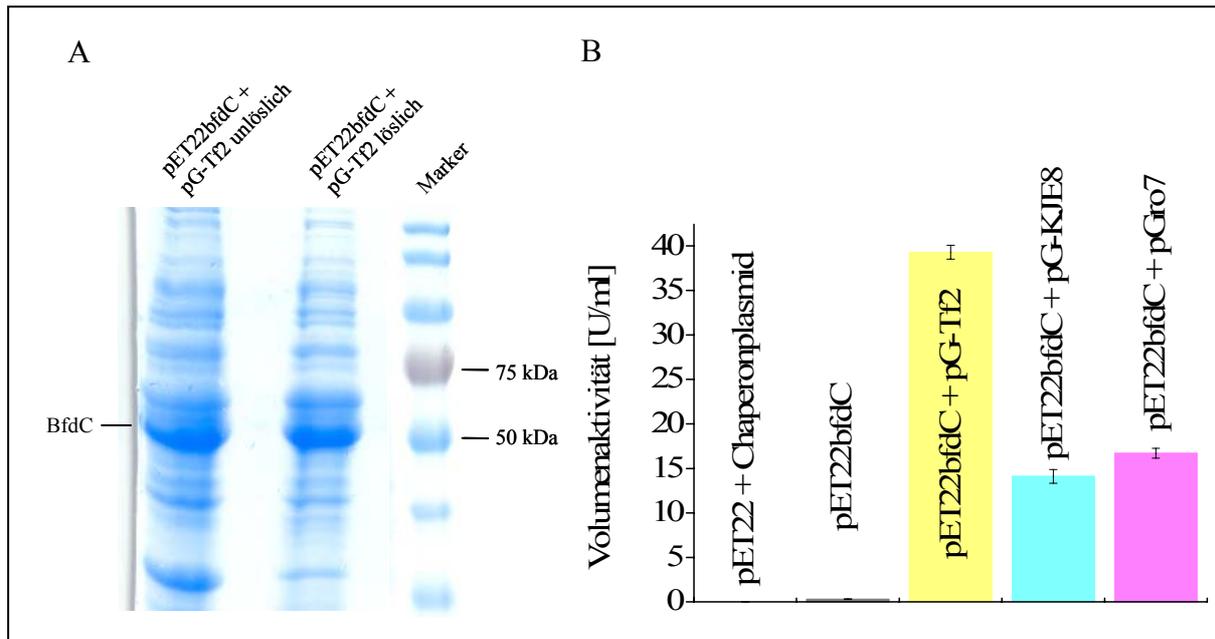


Abb. 20: SDS-PAGE Analyse der Expression von BfdC mit Chaperonen und Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung. A: Auftragung von unlöslichem und löslichem GZE der Coexpression des *bfdC* Gens mit den auf dem Plasmid pG-Tf2 kodierten Chaperon-Genen in *E. coli* BL21 (DE3). B: Decarboxylaseassays von den löslichen Fraktionen des GZE der Expression von *bfdC* ohne und mit verschiedenen coexprimierten Chaperon-Genen. Zudem wurde die Expression des Vektor pET22+ Chaperonplasmid (pG-Tf2, pG-KJE8 und pGro7) als Negativkontrolle mitgetestet.

Weder die BfdB aus *P. putida* ATCC12633 noch die aus einer Metagenom-Bibliothek isolierte BfdM konnten im heterologen Wirt *E. coli* erfolgreich überexprimiert werden. Somit ist eine weitere Charakterisierung beider Enzyme zur Zeit nicht möglich. Dagegen konnte die BfdC mit Hilfe von Faltungshelfern in aktiver Form exprimiert werden und kann nun über einem C-terminal fusionierten His-Tag aufgereinigt werden.

3.9 Aufreinigung der BfdC mittels Affinitätschromatographie

Zur weiteren Charakterisierung soll die BfdC über den zuvor fusionierten His-Tag aufgereinigt werden. Zuerst wurde die BfdC nach erfolgreicher Expression mit Hilfe von Faltungshelfern im kleineren Volumen über 2 ml Ni²⁺-NTA-Säulen aufgereinigt. Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt. Im Eluat waren noch Rückstände eines Chaperonproteins in der SDS-PAGE sichtbar. Das gereinigte Protein besitzt eine Volumenaktivität von 14 U/ml und eine spezifische Aktivität von 6,5 U/mg.

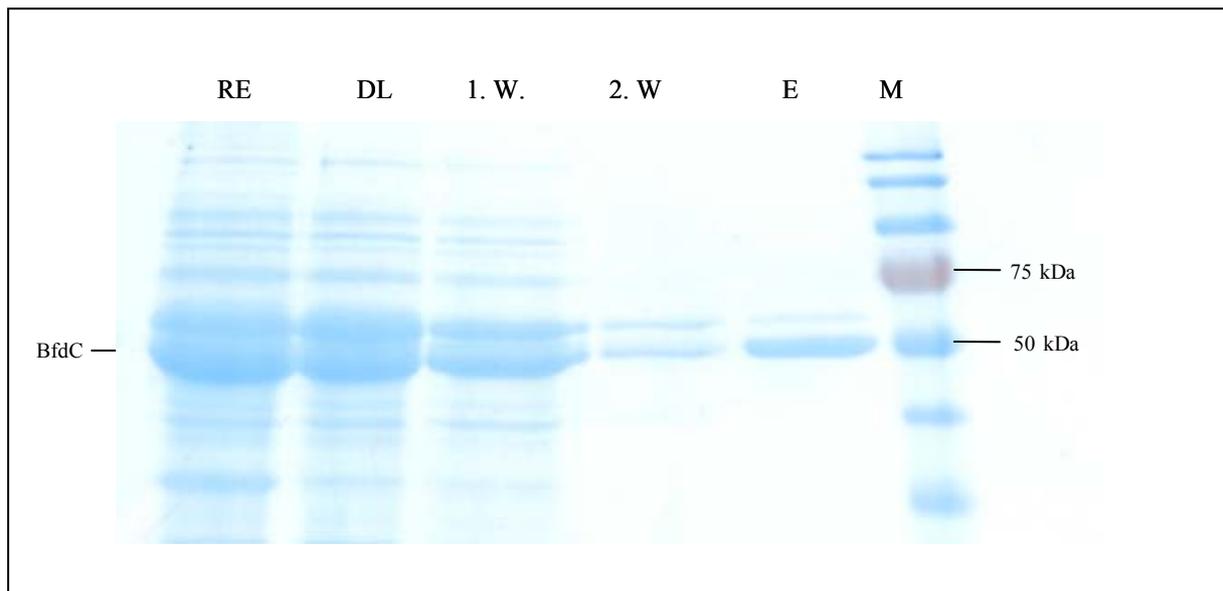


Abb. 21: SDS-PAGE Analyse der Reinigung von BfdC über eine Ni²⁺-NTA-Säule. Auf dem SDS-Gel wurden Rohextrakt (RE), Durchlauf (DL), 1. Waschschrift (1. W), 2. Waschschrift (2. W) und Eluat aufgetragen. Es wurden Volumina der Fraktionen eingesetzt, die einer O.D.₅₈₀ = 0,15 des Ausgangszellextraktes entsprachen.

Nach der erfolgreichen Reinigung von BfdC in kleinen Volumina (100 ml Ausgangskultur), erfolgte nun die Aufreinigung im größeren Maßstab (3 l Ausgangskultur). Über den C-terminalen His-Tag konnte die BfdC in einem Schritt mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatografie (IMAC) aufgereinigt werden (Kap. 2.18). Das BfdC-haltige Eluat wurde mit Hilfe einer Sephadex G-25-Säule entsalzt. Nach Reinigung und Entsalzung betrug die Ausbeute 48,8 % und die BfdC wies eine spezifische Aktivität von 57,5 U/mg auf (Tab. 8). Jedoch wurde keine vollständige Homogenität von BfdC durch die Aufreinigung erreicht (Abb. 22). Um es stabil bei -20 °C zu lagern wurde das Protein mit geringen Aktivitätsverlust (5 – 10 %) lyophilisiert. Es wurden 647 mg Lyophilisat der aufgereinigten BfdC gewonnen. Reinigung, Entsalzung und Lyophilisierung wurden nach dem von Iding *et al.* (2000) veröffentlichten Protokoll für die *P. putida* BfdA (MdlC) durchgeführt.

Tab. 9: Ausbeute bei der Reinigung der BfdC. Die Reinigung erfolgte mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie. Das enzymhaltige Eluat wurde anschließend mittels einer Sephadex G-25-Säule entsalzt. Es wurden etwa 30 g Zellen Feuchtgewicht eingesetzt. Die Ausbeute wurde anhand der Gesamtaktivitäten des Rohextraktes und des Eluats der G25-Säule berechnet.

Fraktion	Volumen-aktivität [U/ml]	Proteinmenge [mg]	Gesamtaktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	121,3	3003,3	13345,7	4,4	100
Ni ²⁺ -NTA Eluat	51,4	194,6	10789,8	55,5	80,8
G-25 Eluat	21	113,4	6516,7	57,5	48,8

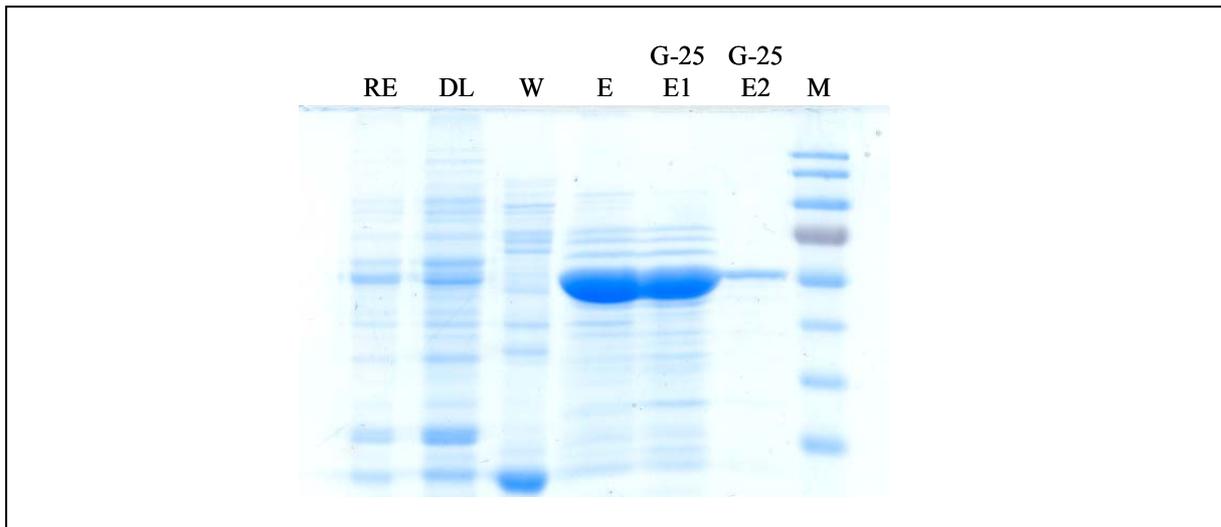


Abb. 22: SDS-PAGE Analyse der Reinigung der BfdC mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie und Sephadex G-25. Es wurden Rohextrakt (RE), Durchlauf (DL), Waschschrift (W), Eluat der Ni²⁺-NTA Aufreinigung (E), Eluat der Fraktionen 29 – 59 (G-25 E1) und der Fraktionen 62 – 70 (G-25 E2) nach der Entsalzung über die G25 Säule Es wurde jeweils 15 µg Protein pro Fraktion aufgetragen.

Die BfdC aus *P. putida* ATCC 12633 konnte mittels eines C-terminal fusionierten His-Tags erfolgreich über immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) isoliert werden.

3.10 Biochemische Charakterisierung der BfdC aus *P. putida* ATCC12633

3.10.1 Bestimmung der kinetischen Konstanten der BfdC

Benzoylformiat wird von der BfdC zu Benzaldehyd und Kohlendioxid decarboxyliert. Für diese Reaktion sollten nun die kinetischen Konstanten in Form der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) bestimmt werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird durch eine vollständige Auslastung bzw. Sättigung des Katalysators erreicht. Das gesamte Enzym liegt dabei im Gleichgewicht als Enzym-Substrat-Komplex vor und die Reaktionsgeschwindigkeit kann dann durch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr gesteigert werden. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) ist ein Maß für die Substrataffinität. Der K_m -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Ein niedriger K_m -Wert bedeutet eine hohe Affinität, während ein hoher K_m -Wert auf eine niedrige Affinität zum Substrat hinweist.

Für die Bestimmung von V_{\max} und K_m wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (V) der Decarboxylierung von Benzoylformiat mit Hilfe des gekoppelten Enzymtests bestimmt (Kap. 2.19.9). Die erhaltene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (V) wurde über der Substratkonzentration $[S]$ nach Michaelis-Menten aufgetragen und V_{\max} und K_m bestimmt (Abb. 23).

Für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) wurde ein Wert von 78,5 U/mg ermittelt. Der V_{\max} -Wert für die BfdC liegt deutlich niedriger als der V_{\max} -Wert der BfdA (340 U/mg) von *P. putida* ATCC12633. Jedoch besitzt BfdC mit einem K_m -Wert von 0,3 mM eine höhere Substrataffinität als die BfdA, die einen K_m -Wert von 0,7 mM hat (Iding *et al.*, 2000).

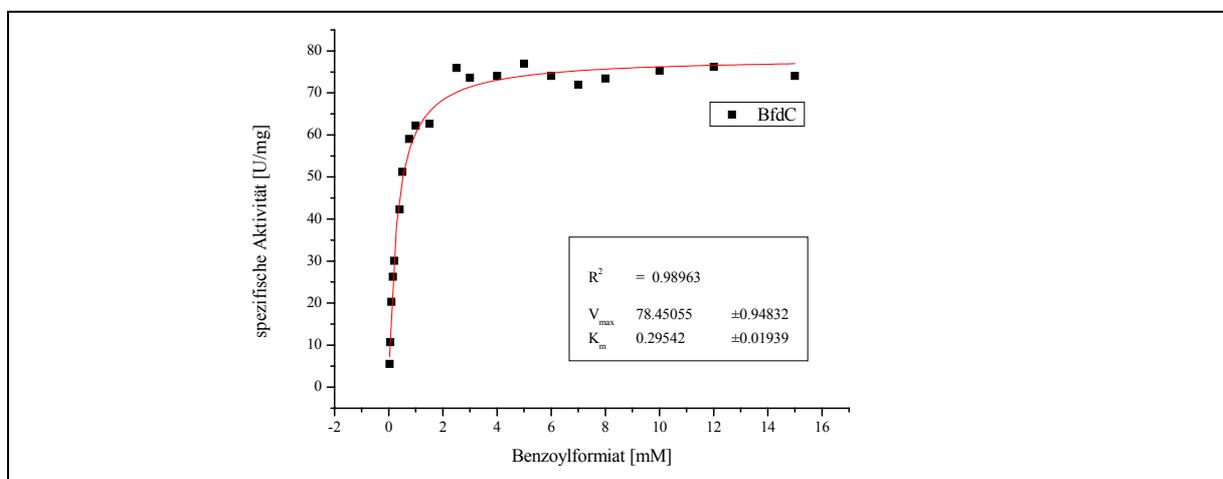


Abb. 23: Bestimmung der kinetischen Konstanten V_{\max} und K_m der BfdC mittels des gekoppelten Enzymtests.

3.10.2 Bestimmung des pH-Optimums der BfdC bei der Decarboxylierung

Die Decarboxylierungs-Reaktion besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen Protonierungs- und Deprotonierungsschritten, welche die pH-Abhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität beeinflussen (McLeish *et al.*, 2004). Die pH-Abhängigkeit wurde mit dem direkten Enzymtest in dem Bereich zwischen pH 3 und pH 8 bestimmt (Kap. 2.19.3).

Das pH-Optimum der Decarboxylase-Aktivität der BfdC liegt zwischen pH 6 und pH 6,5 (Abb. 24). In den Bereich zwischen pH 4 und pH 7 liegt die relative Volumenaktivität bei über 75 %. In dem pH-Bereich ≤ 4 und ≥ 7 ist ein starker Abfall der Aktivität erkennbar, wobei sie im sauren Bereich rapide abnimmt (pH 3: ca. 4 %). Die Ergebnisse der Abhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität der BfdC vom pH-Wert entspricht den Werten der BfdA, die ebenfalls ihr pH-Optimum zwischen pH 6 und pH 6,5 besitzt.

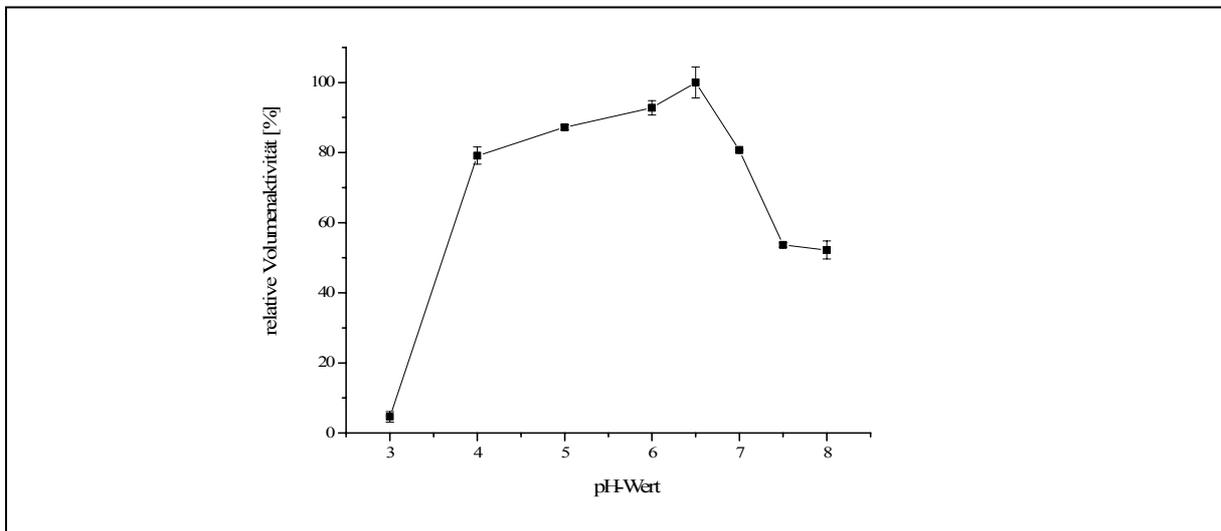


Abb. 24: Abhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität der BfdC vom pH-Wert. Die Aktivität wurde mit dem direkten Enzymtest bestimmt.

3.10.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der BfdC

Die Enzymstabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes spielt bei Synthesen, die über mehrere Stunden oder Tage betrieben werden, eine entscheidende Rolle. Die Stabilität der BfdC für die pH-Werte 5, 6,5, 7,5 und 8 wurde über mehrere Tage analysiert. Die Decarboxylase-Aktivität wurde über den gekoppelten Aktivitätstest bestimmt. Die Aktivität der Ausgangsenzymlösung wurde zuvor bestimmt und gleich 100 % gesetzt. Die Restaktivität der BfdC für die jeweiligen pH-Werte wurde dann über einen längeren Zeitraum ermittelt (Abb. 25).

Bei pH 6,5 ist die BfdC relativ stabil und weist nach 120 h einen Aktivitätsverlust von ca. 15 % auf. Im pH-Bereich 7,5 und 8 ist die Aktivität nach 20 h bereits um ca. 40 % zurückgegangen. Etwas stabiler scheint die BfdC im sauren Bereich zu sein. Bei pH 5 besitzt sie nach 120 h noch ca. 70 % ihrer Ausgangsaktivität. Insgesamt weist die BfdC im gemessenen pH-Bereich eine hohe Stabilität auf, wie es auch für die BfdA postuliert wird (Iding *et al.*, 2000).

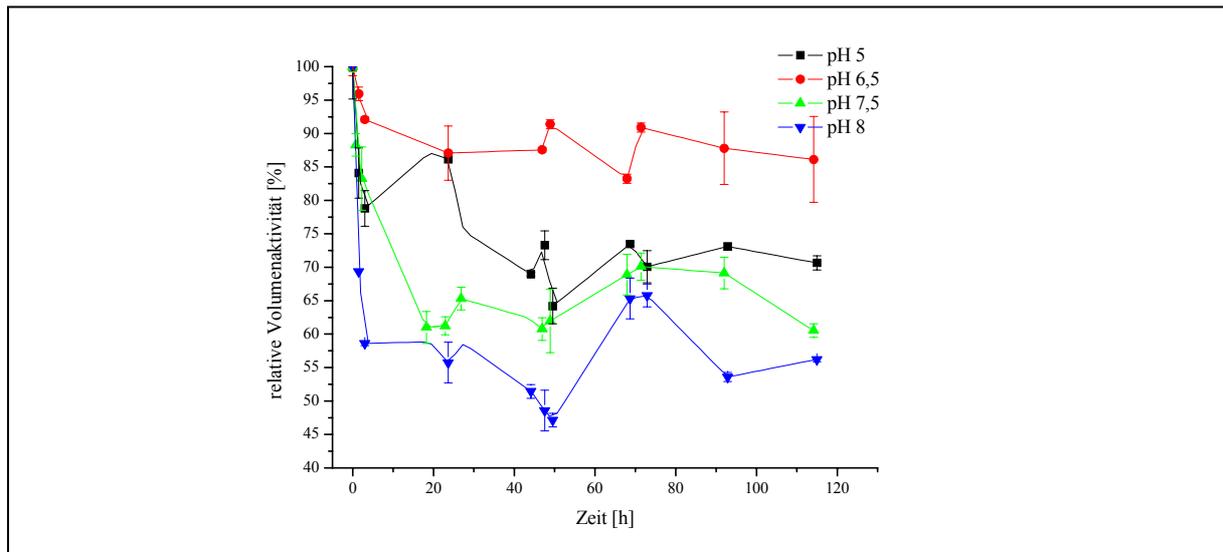


Abb. 25: Stabilität der BfdC in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Abnahme der relativen Volumenaktivität wurde über die Zeit bestimmt.

3.10.4 Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der BfdC

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität wurde ein direkter Enzymtest verwendet, bei dem die Abnahme des Benzoylformiats in der Lösung direkt verfolgt wird. Mit ansteigender Temperatur nahm die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Decarboxylierung exponentiell zu (Abb. 26). Durch die Erhöhung der Temperatur von 33 °C auf 73 °C wurde die Aktivität um den Faktor 14 erhöht. Jedoch konnte aufgrund messtechnischer Gründe (Temperierung des Photometers) kein Temperaturmaximum bestimmt werden. Die höchste Decarboxylase-Aktivität wurde bei 73,3 °C gemessen.

Aus dem linearen Bereich der Temperaturabhängigkeit der BfdC kann die Aktivierungsenergie E_a für die Decarboxylierung ermittelt werden (Abb. 27). Unter der Aktivierungsenergie E_a versteht man den Energiebetrag, der notwendig ist, damit der Übergangszustand der Enzymkatalyse erreicht wird.

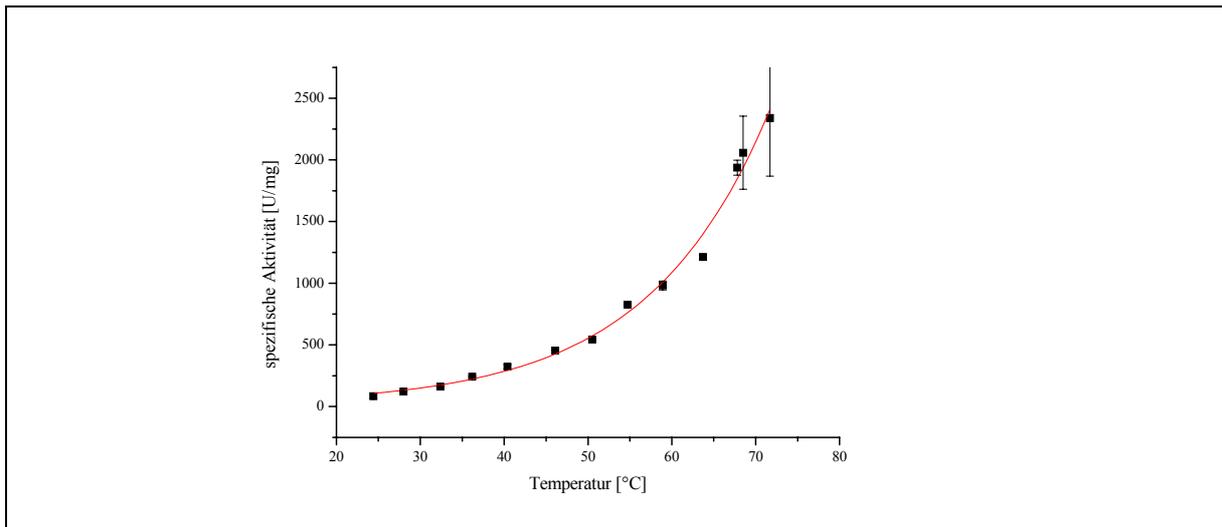


Abb. 26: Temperaturabhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität der BfdC. Es wurde der direkte Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität verwendet.

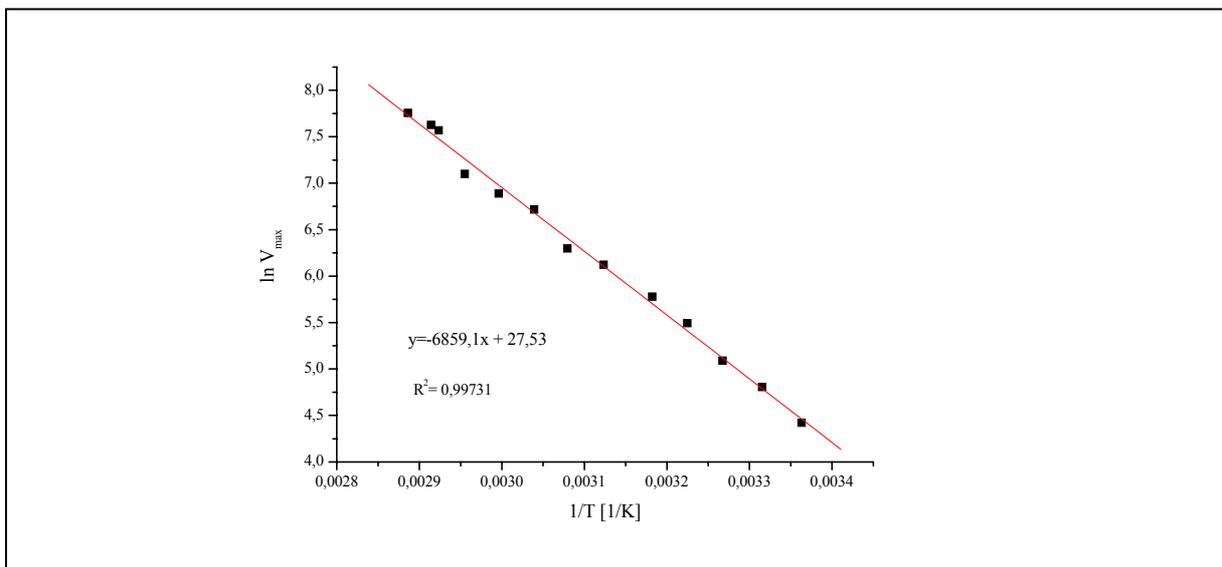


Abb. 27: Bestimmung der Aktivierungsenergie der BfdC für die Decarboxylierung von Benzoylformiat nach Arrhenius. Es wurde $\ln V_{\max}$ über $1/T$ aufgetragen und die Steigung der Ausgleichsgerade bestimmt.

Aus der Steigung der Geraden im Arrhenius-Plot, die durch Auftragen von $\ln V_{\max}$ gegen $1/T$ erhalten wurde, wurde die Aktivierungsenergie bestimmt. Die errechnete Aktivierungsenergie der BfdC für die enzymatische Decarboxylierung von Benzoylformiat beträgt 57 kJ/mol. Die BfdA besitzt eine Aktivierungsenergie von nur 38 kJ/mol (Iding *et al.*, 2000).

3.10.5 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der BfdC

Zur Untersuchung der Stabilität der BfdC bei verschiedenen Temperaturen wurde die BfdC über mehrere Stunden bei 22 °C, 33,5 °C und 55,5 °C inkubiert. In Abb. 28 A sind die Ergebnisse der Testreihe dargestellt. Bei der Inkubation der BfdC bei den Temperaturen von 22 °C und 33 °C sind über 120 h kaum Aktivitätseinbußen ersichtliche. Dagegen nimmt die Aktivität bei der Inkubation bei 50 °C drastisch ab und ist nach 20 h um über die Hälfte gesunken.

Für einen genaueren Vergleich der Stabilität der Enzyme bezüglich der Temperatur wurde die Halbwertszeit $\tau_{0,5}$ der thermischen Inaktivierung bestimmt. Die Halbwertszeit $\tau_{0,5}$ ist als der Zeitpunkt definiert, nach der das Enzym nur noch die Hälfte seiner Ausgangsaktivität besitzt und wird nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\tau_{0,5} = \ln 2 / k_{\text{deact}}$$

Die Deaktivierungsgeschwindigkeit k_{deact} wird durch die Auftragung vom natürlichen Logarithmus der relativen Volumenaktivität über die Zeit bestimmt und wird durch die Steigung der Ausgleichsgeraden ermittelt (Abb. 28 B).

Bei den Temperaturen von 22 °C und 33,5 °C ist die Deaktivierungsgeschwindigkeit der BfdC sehr gering, wodurch auch sehr hohe Halbwertszeiten von 608 h bei 22 °C und sogar 700 h bei 33,5 °C ermittelt wurden. Die berechneten k_{deact} -Werte sind bei den beiden Temperaturen jedoch so gering, dass schon kleinste Messfehler die Halbwertszeit der BfdC stark schwanken lassen. Jedenfalls ist die BfdC bei beiden Temperaturen sehr stabil. Instabil ist die BfdC dagegen bei 53,5 °C, wobei die Hälfte der Ausgangsaktivität schon nach 14,5 h erreicht ist.

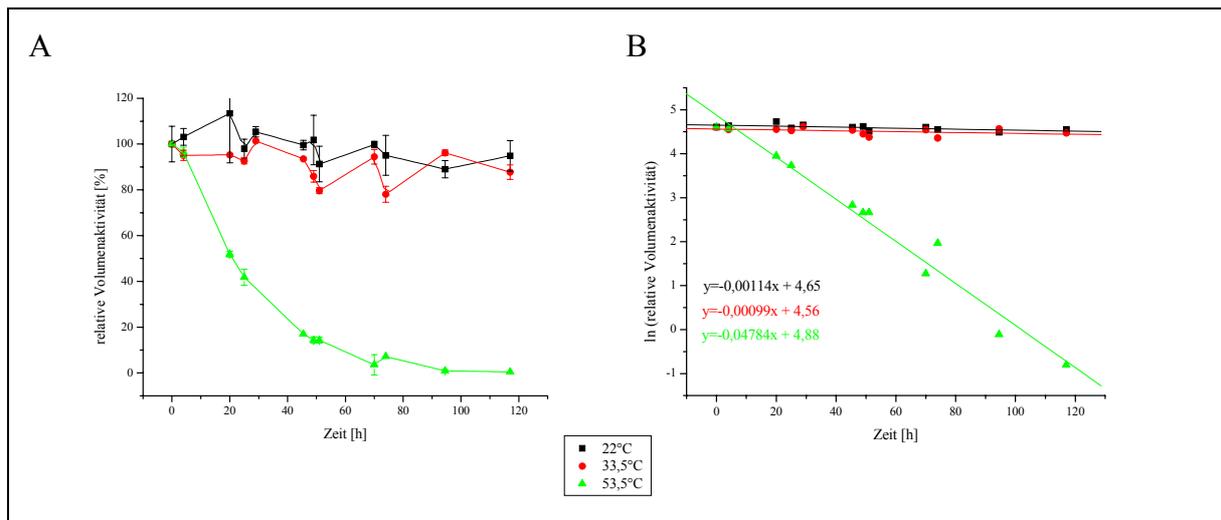


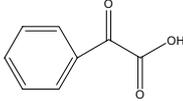
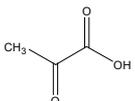
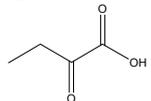
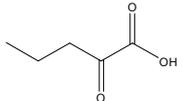
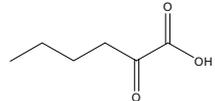
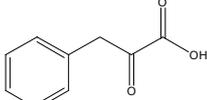
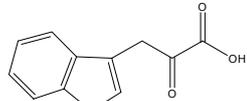
Abb. 28: BfdC-Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur und Ermittlung der Halbwertszeit der thermischen Inaktivierung. A: Auftragung der relativen Volumenaktivität der BfdC über die Zeit nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. B: Bestimmung der Deaktivierungsgeschwindigkeit k_{deact} der BfdC bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Deaktivierungsgeschwindigkeit k_{deact} wird durch die Steigung der Ausgleichsgeraden bestimmt, aus der sich dann die Halbwertszeit in Abhängigkeit von der Temperatur der BfdC ermitteln lässt.

3.10.6 Das Substratspektrum der Decarboxylase-Reaktion von BfdC

Es ist bekannt, dass die BfdA aus *P. putida* ATCC12633 neben aromatischen 2-Ketosäuren (Hegemann, 1970) auch aliphatische 2-Ketosäuren decarboxyliert (Iding *et al.*, 2000). Das Substratspektrum der BfdC wurde ebenfalls bezüglich der Decarboxylierung von ausgewählten Substraten überprüft, was im Vergleich mit der bereits bekannten BfdA in Tabelle 9 dargestellt ist. Zuvor konnte für die BfdC bereits die Aktivität gegenüber dem Substrat Benzoylformiat gezeigt werden. Benzoylformiat wird von der BfdC mit der höchsten Aktivität von den getesteten Substraten umgesetzt. Von den aliphatischen 2-Ketosäuren wurden Pyruvatsäure, 2-Ketobuttersäure, 2-Ketovaleriansäure und 2-Ketocaprinsäure als Substrate getestet. Des Weiteren wurden 3-Phenylpyruvatsäure und 3-Indolpyruvatsäure als Substrate für die von der BfdC katalysierte Decarboxylierung eingesetzt. Jedoch konnte für diese beiden Substrate keine Aktivität ermittelt werden.

Vor allem gegenüber dem Substrat Pyruvatsäure zeigt BfdC eine höhere Aktivität als die BfdA. Die BfdA setzt dieses Substrat nicht um. Allerdings ist die relative Aktivität mit 2,2 % (Pyruvatsäure) recht gering im Vergleich zu Benzoylformiat (100 %). Das Substrat 2-Ketocaprinsäure wird im Vergleich zur relativen Aktivität besser von der BfdC umgesetzt. Jedoch ist die absolute Aktivität der BfdC (3,4 U/mg) niedriger als bei der BfdA (6,9 U/mg).

Tab. 10: Substratspektrum der BfdC und BfdA für die Decarboxylasereaktion. Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten und relativen Aktivitäten, wobei die Aktivität gegenüber Benzoylformiat gleich 100 % gesetzt wurde.

Substrat	spezifische Aktivität BfdC [U/mg]	relative Aktivität BfdC [%]	spezifische Aktivität BfdA [U/mg]	relative Aktivität BfdA [%]
 Benzoylformiat	48,5	100	250,3	100
 Pyruvat (Brenztraubensäure, 2-Ketopropionsäure)	1	2,2	0	0
 2-Ketobuttersäure (2-Ketobutansäure)	1	2,2	3,3	1,3
 2-Ketovaleriansäure (2-Ketopentansäure)	0,3	0,4	1,2	0,5
 2-Ketocaprinsäure (2-Ketohexansäure)	3,4	6,7	6,9	2,8
 3-Phenylpyruvat	-	-	-	-
 3-Indolpyruvat	-	-	-	-

3.11 Untersuchung der Carboligase-Aktivität der BfdC aus *P. putida* ATCC12633

Anhand von Rohextrakten konnte eine Carboligase-Aktivität der BfdC gegenüber den Substraten Acetaldehyd und Benzaldehyd nachgewiesen werden. Nun sollte anhand der gereinigten BfdC das Substratspektrum der Carboligase-Reaktion durch einen Plattentest und mittels GC/MS und chiraler HPLC die Chemo- und Enantioselektivität bestimmt werden.

3.11.1 Substratspektrum der Carboligase-Reaktion der BfdC

Zur Bestimmung des Substratspektrums der Carboligase-Reaktion der BfdC wurden die aliphatischen Aldehyde Acetaldehyd, Propanal und Dimethoxyacetaldehyd und die aromatischen Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd getestet. Zum einen wurden die aliphatischen und aromatischen Aldehyde einzeln zur Bestimmung des Selbstligationspotential und zum anderen Aldehyde gemischt eingesetzt. Falls beim gemischten Ansatz die Färbung stärker ist als im Selbstligationsansatz ist bevorzugt ein gemischtes Produkt entstanden.

Die Ergebnisse zur Bestimmung des Substratspektrums der BfdC im Vergleich zur BfdA durch den TTC-Test (Kap. 2.20.3) sind in Tabelle 10 dargestellt. Im TTC-Test reduziert das Produkt der Carboligation den Farbstoff TTC, was zu einem sichtbaren Farbumschlag von Farblos zu Rot führt (Breuer *et al.*, 2002). Dieser Assay wurde von der Arbeitsgruppe Pohl, Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität auf die getesteten Substrate übertragen (unveröffentlicht). Der einzige sichtbare Unterschied zwischen BfdC und BfdA ist, dass BfdC das substituierte aromatische Benzaldehyd, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd besser für eine gemischte Ligation mit Acetaldehyd verwenden kann als BfdA (Abb. 29). In alle anderen Testreihen zeigen BfdA und BfdC die gleichen Ergebnisse (ohne Abb.). So ist bei der BfdC eine sehr geringe Bildung von Acetoin aus dem Substrat Acetaldehyd, geringe Benzoinbildung aus Benzaldehyd und kaum Ligation von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd detektierbar. Alle anderen Produkte werden nicht gebildet.

Tab. 11: Übersicht über das Carboligation-Substratspektrum der BfdA und BfdC (Auswertung der TTC-Test-Reihe)

Substrat	BfdA	BfdC
Acetaldehyd	+	+
Propanal	-	-
Dimethoxyacetaldehyd	-	-
Benzaldehyd	+	+
3,5-Dimethoxybenzaldehyd	+	+
Acetaldehyd + Benzaldehyd	++	++
Propanal + Benzaldehyd	-	-
Dimethoxyacetaldehyd + Benzaldehyd	-	-
Acetaldehyd + 3,5-Dimethoxybenzaldehyd	+	++
Propanal + 3,5-Dimethoxybenzaldehyd	-	-
Dimethoxyacetaldehyd + 3,5-Dimethoxybenzaldehyd	-	-

-: keine Aktivität; +: schwache Aktivität; ++: Aktivität

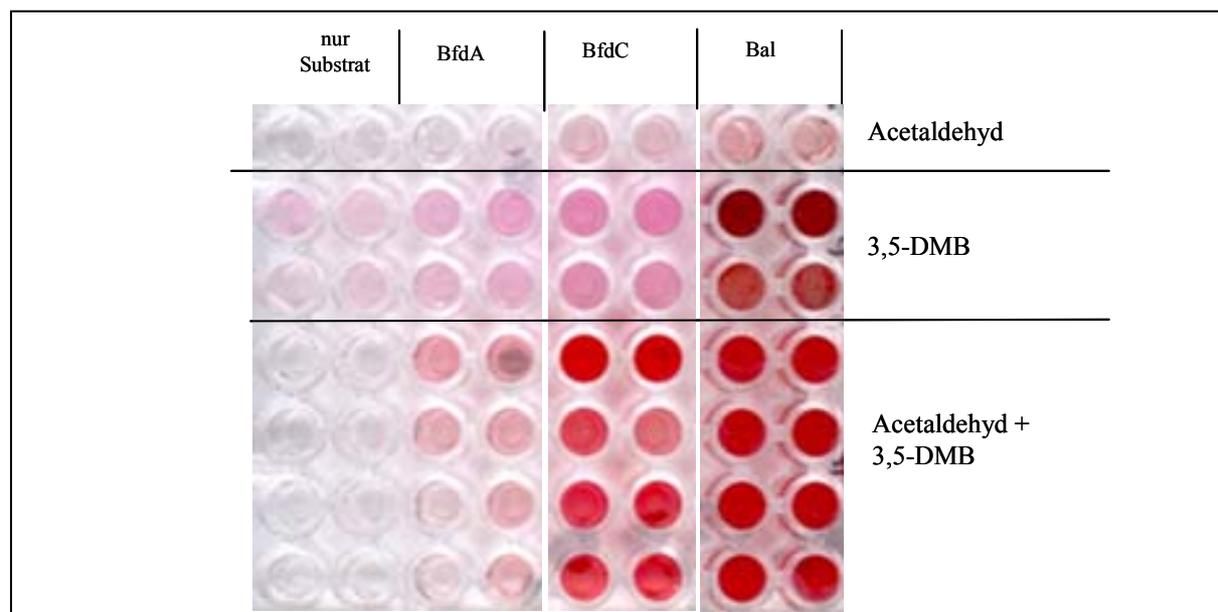


Abb. 29: TTC-Test zur Bestimmung des Substratspektrums der Carboligase-Reaktion der BfdC. Es wurden die Enzyme BfdA, BfdC und Benzaldehydlyase aus *P. fluorescens* (Bal), als positiv Kontrolle, bezüglich ihrer C-C Knüpfung gegenüber den Substraten Acetaldehyd, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (3,5-DMB) und gemischten Ansatz Acetaldehyd + 3,5-DMB getestet. Es wurde in jedem Ansatz jeweils 18 mM des Substrates eingesetzt. Je stärker die rote Färbung desto mehr Ligationsprodukt wurde gebildet. BfdC bildet eindeutig, im Gegensatz zu BfdA, ein gemischtes Ligationsprodukt.

3.11.2 Bestimmung der Chemo- und Enantioselektivität der Carboligation der BfdC

Die Analyse der Bildung von C-C Bindungen durch die BfdC erfolgte mittels GC/MS und chiraler HPLC durch die Arbeitsgruppe Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg. Es wurde die Ligation der gemischten Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd und die Selbstligation von Benzaldehyd untersucht.

Bei der Carboligation von Acetaldehyd mit Benzaldehyd konnten die Produkte 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP) und geringe Mengen Phenylacetylcarbinol (PAC) nachgewiesen werden (Abb. 30). Es handelt sich bei dem 2-HPP um das (*S*)-Enantiomer, welches mit einem Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess, *ee*) von 80 % gebildet wird. Der Umsatz der Reaktion betrug 85 %. Die Enantioselektivität von PAC konnte aufgrund der geringen Menge nicht bestimmt werden.

Bei der Carboligation von Benzaldehyd durch die BfdC wurde (*R*)-Benzoin mit 99 % *ee* gebildet. Der Umsatz der Reaktion lag bei 25 %. BfdC ist also bei der Synthese von Benzoin höchst selektiv.

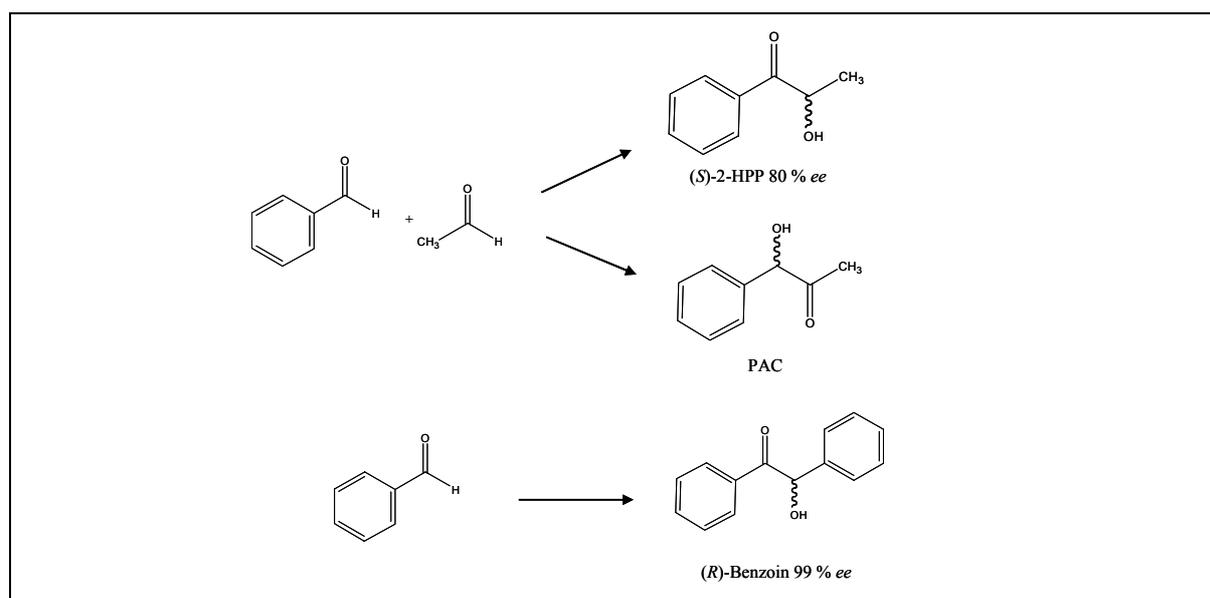


Abb. 30: Analyse der Carboligation von Benzaldehyd mit Acetaldehyd und der Selbstligation von Benzaldehyd durch die BfdC. Es wurden die Produkte (*S*)-2-Hydroxypropiophenon (2-HPP), Phenylacetylcarbinol (PAC) und (*R*)-Benzoin nachgewiesen.

BfdC besitzt die Fähigkeit, das substituierte aromatische Benzaldehyd 3,5-Dimethoxybenzaldehyd in der gemischten Ligation mit Acetaldehyd zu verknüpfen. Die Selbstligationsreaktion von Benzaldehyd findet enantioselektiv statt (99 % *ee*)

4. Diskussion

Die Biokatalyse gewinnt in der chemischen Industrie immer mehr an Bedeutung. Eine wichtige Reaktion in der synthetischen organischen Chemie ist die enantioselektive Bildung von C-C-Bindungen (Faber & Kroutil, 2005). ThDP-abhängige Enzyme können in der chemoenzymatischen Synthese für die Bildung von aliphatischen und aromatischen Verbindungen genutzt werden, die als Vorstufen in der organischen Synthese dienen (Abb. 5). Solche interessanten Synthons stellen die chiralen 2-Hydroxyketone dar (Dünelmann *et al.*, 2004). Das bekannteste Verfahren, indem 2-Hydroxyketone als Vorstufe eingesetzt werden, ist die industrielle Produktion von (*L*)-Ephedrin, einem Wirkstoff in Husten- und Asthmaarzneimitteln (Hildebrandt & Klavehn, 1930). (*L*)-Ephedrin wird durch reduktive Aminierung des 2-Hydroxyketons (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) hergestellt. Das (*R*)-PAC wird durch eine Nebenreaktion des ThDP-abhängigen Enzyms Pyruvatdecarboxylase (PDC) aus Acetaldehyd und Benzaldehyd synthetisiert. Weitere ThDP-abhängige Enzyme, die Carboligase-Aktivität besitzen und die Produktion von 2-Hydroxyketonen katalysieren, sind Benzaldehydlyase (BAL) und Benzoylformiatdecarboxylase (BFD). Die BAL aus *P. fluorescens* und die BFD aus *P. putida* ATCC12633 bilden aus Acetaldehyd und Benzaldehyd das zur PAC tautomere Produkt 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP), wobei die BAL das (*R*)-Enantiomer synthetisiert und BFD das (*S*)-Enantiomer (Pohl *et al.*, 2002). Nur die BFD aus *P. putida* ATCC12633 zeigt von den genannten Enzymen eine (*S*)-selektive Katalyse bezüglich der Carboligation. Jedoch weist die Carboligase-Aktivität der BFD ein enges Substratspektrum auf. Vor allem bei der Katalyse von 2-HPP mit funktionellen Seitenketten, bezüglich Selektivität und Umsatz gelangt die BFD aus *P. putida* an ihre Grenzen (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000). Jedoch sind gerade diese Synthons attraktiv, da sie Folgereaktionen ermöglichen. Deshalb sind neue BFDs von Interesse, welche die Bildung von substituierten 2-Hydroxyketonen ermöglichen. Eine bedeutsame Quelle für neue Biokatalysatoren und somit auch neue BFDs stellt der Metagenomansatz dar (Lorenz & Eck, 2005). Jedoch benötigt dieser Ansatz effiziente „High-throughput“-Screening (HTS) Systeme für die Identifizierung der gesuchten Enzyme. Selektionssysteme, in denen entsprechende Enzym-Aktivität an das Überleben des betreffenden Klons geknüpft ist, bieten eine attraktive Möglichkeit. Sie bieten einen sehr hohen Durchsatz und sind im Vergleich zu anderen „HTS“-Ansätzen relativ kostengünstig und mit relativ geringem Arbeitsaufwand durchführbar. Um das Spektrum an neuen BFDs zu erweitern und um das enorme Potential der bakteriellen Diversität an neuen Biokatalysatoren durch den Metagenomansatz zu nutzen,

sollte in dieser Arbeit ein auf Selektion basiertes Screeningsystem entwickelt werden. Anhand des auf Wachstum basierten Screenings sollten aus konstruierten Genom- und Metagenom-Bibliotheken neue BFDs identifiziert, isoliert, charakterisiert und auf ihr biotechnologisches Potential hin untersucht werden.

4.1 Entwicklung und Etablierung des Wachstum-basierten Selektionssystems

Für das Wachstum-basierte-Screeningsystem sollte als Substrat für die BFD-vermittelte Decarboxylierung Benzoylformiat als alleinige Kohlenstoffquelle (C-Quelle) eingesetzt werden. Der für das Selektionssystem gesuchte Stamm sollte deshalb in der Lage sein, das Produkt der Decarboxylierung, Benzaldehyd, als alleinige C-Quelle zu nutzen, jedoch nicht das Substrat Benzoylformiat. Das Wachstum des Stammes auf Benzoylformiat als einzige C-Quelle sollte nur dann möglich sein, wenn Gene, die für BFD-Aktivität kodieren, *in trans* exprimiert werden. In Frage kommende Stämme sollten deshalb eine Benzaldehyddehydrogenase und den β -Ketoacidat-Stoffwechselweg besitzen (Abb. 9). Der aus der Decarboxylierung von Benzoylformiat entstandene Benzaldehyd würde dann über den β -Ketoacidatweg zu Succinyl- und Acetyl-CoA verstoffwechselt werden, welches daraufhin in den Citrat-Zyklus gelangt und als Energiequelle dient.

Der Stamm *P. putida* ATCC12633 besitzt eine Benzaldehyddehydrogenase und den β -Ketoacidatweg. Jedoch besitzt dieser Stamm ein Gen (*mdlC*), welches eine BFD kodiert und kann somit auf Benzoylformiat als alleinige C-Quelle wachsen. Dies sollte jedoch nicht mehr möglich sein, wenn das *mdlC*-Gen inaktiviert wurde. Um das Gen auszuschalten, wurde eine Gentamycin-Resistenz-Kassette (ΩGm^r) durch homologe Rekombination in das *mdlC*-Gen inseriert. Durch die Inserierung der ΩGm^r -Kassette ist die Expression einer aktiven BFD nicht mehr möglich und somit auch kein Wachstum der Mutante auf Benzoylformiat als alleinige C-Quelle. Die erfolgreiche Integration der Resistenz-Kassette in das *mdlC*-Gen konnte durch PCR bestätigt werden. Die *mdlC*-defiziente Mutante wird als *P. putida* ATCC12633 ΔmdlC bezeichnet. Überraschenderweise konnte trotz erfolgreicher Inserierung der Resistenzkassette *P. putida* ATCC12633 ΔmdlC auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als einziger C-Quelle wachsen (Kap. 3.1.1).

Im Genom von *P. putida* ATCC12633 scheint neben dem *mdlC*-Gen noch mindestens ein anderes Gen lokalisiert zu sein, welches für BFD-Aktivität kodiert. Es kommt nicht selten vor, dass im Genom von Bakterien zwei oder mehr Gene für dieselbe Enzym-Aktivität kodieren. Im Laufe der Evolution können Gene dupliziert oder durch horizontalen Gen-Transfer zwischen verschiedenen Bakterienspezies ins Genom integriert werden und somit

mehrfach im Genom vorkommen. Auch ein bisher unbekannter Abbauweg für Benzoylformiat könnte für das Wachstum der Mutante auf dem Selektionsmedium in Betracht gezogen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse eignet sich die Mutante *P. putida* ATCC12633 Δ *mdlC* daher nicht wie geplant als Selektionsstamm.

Deshalb wurden durch Datenbankanalyse zwei Stämme identifiziert, die als Wirte im Wachstum-basierten Selektionssystem in Frage kommen. Es handelt sich dabei um die Stämme *P. putida* KT2440 und *P. putida* DSM50198 (Kap. 3.1.2). Beiden fehlt die BFD, aber sie verfügen über eine Benzaldehyddehydrogenase und den β -Ketoacid-Stoffwechselweg. *P. putida* KT2440 ist vollständig sequenziert (Nelson *et al.*, 2002) und metabolisiert eine große Anzahl an aromatischen Verbindungen (Jimenez *et al.*, 2002). *P. putida* DSM50198 fehlt das Mandelat-Operon und wurde für Untersuchungen zur Isolierung des Mandelatoperons aus *P. putida* ATCC12633 verwendet (Tsou *et al.*, 1990).

Beide Stämme können auf Medium mit Benzoylformiat als alleinige C-Quelle nicht wachsen und erfüllen in dieser Hinsicht die Anforderung für das Wachstum-basierte Selektionssystem. Ein Wachstum der Stämme auf Benzaldehyd als alleinige C-Quelle wurde aufgrund der Toxizität von Benzaldehyd für die Zellen nicht durchgeführt. Die Konzentration von Benzaldehyd, wenn es als Substrat eingesetzt wird, ist weitaus größer als die Menge, die kontinuierlich durch den Enzym-katalysierten Abbau von Benzoylformiat in den Zellen entsteht.

Mit dem Klonieren von Genen, die für Benzoylformiatdecarboxylase-Aktivität kodieren, in die Stämme *P. putida* KT2440 und *P. putida* DSM50198, wurde die Funktionalität bezüglich der Identifizierung neuer BFDs in dem Wachstum-basierten-Screeningsystem untersucht. Es wurden die Gene der BFD von *P. putida* ATCC12633 und *P. aeruginosa* PAO1 erfolgreich kloniert und beide Stämme konnten auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als alleinige C-Quelle wachsen (Kap. 3.1.3).

Somit liegen mit *P. putida* KT2440 und *P. putida* DSM50198 zwei Stämme vor, die als Wirt im Wachstum-basierten Selektionssystem für die Identifizierung von BFD-Aktivität aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken eingesetzt werden können. Jedoch sollte der Stamm *P. putida* KT2440 aufgrund seiner sehr gut charakterisierten genetischen Eigenschaften den Vorzug für den Einsatz im Wachstum-basierten Selektionssystem erhalten. So besitzt der Stamm KT2440 keine Restriktionsendonukleasen, ist ein guter Rezipient für transferierte Gene, fungiert jedoch nicht als Donor für die eingefügte DNA und sein unspezifisches Gen-Expressionssystem erlaubt die Expression von Genen eines weiten Bereichs von verschiedenen Bakterien (Timmis, 2002). Ein breites Spektrum an verschiedenen genetischen „Tools“ für die

Analyse und Manipulation dieses Stammes sowohl für den Einsatz als Expressionswirt rekombinater Gene von anderen Bodenorganismen wurde bereits entwickelt und angewendet (Mermod *et al.*, 1986; Herrero *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1990; de Lorenzo & Timmis, 1994).

4.2 Identifizierung neuer BFDs im Genom von *P. putida* ATCC12633

Von den *P. putida* Stämmen ATCC12633 und ATCC12633 Δmdc wurden „small-insert“ Genom-Bibliotheken erstellt. Jede einzelne Bibliothek besteht aus ca. 4000 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von ca. 5 kb. Dies entspricht in etwa einer 4-fachen Abdeckung des jeweiligen Genoms. Anhand der Genom-Bibliotheken sollte zum einen das Wachstum-basierte Selektionssystem bezüglich der Detektion von BFD-Aktivität in DNA-Bibliotheken getestet und zum anderen unbekannte BFDs identifiziert werden. Auf deren Präsenz lässt sich aufgrund des Wachstums der Insertionsmutante *P. putida* ATCC12633 Δmdc im Selektionsmedium schließen (Kap. 3.1.1 und 4.1).

Zur Identifizierung von BFD-Aktivität wurde die Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633 in den Selektionsstamm *P. putida* KT2440 transferiert und auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als alleinige C-Quelle angezogen. Ein Wachstum von *P. putida* KT2440 ist nur möglich, wenn BFD-Aktivität durch die klonierte Bibliothek vermittelt wird. Es konnte ein Klon isoliert werden, der BFD-Aktivität aufwies (Kap. 3.3.2). Das Plasmid pBBRbfd+, auf dem die putative BFD lokalisiert ist, wurde sequenziert und es konnte ein neues Gen, welches Homologien zu bekannten BFDs aufweist, identifiziert werden. Das neue für BFD-Aktivität kodierende Gen wurde als *bfdB* bezeichnet (Accession No. AM_284966). Es ist das zweite in *P. putida* ATCC12633 identifizierte BFD-Gen und es entstammt nicht dem Mandelato-peron, weswegen eine Nomenklatur mit „mdl“ nicht verwendet wurde. Aufgrund des Vorkommens mehrerer Gene für die BFD-Aktivität in *P. putida* ATCC12633 wird das *mdc*-Gen in dieser Arbeit alternativ auch als *bfdA*-Gen und das entsprechende Genprodukt als BfdA bezeichnet. Darüber hinaus konnten noch weitere ORFs im Insert des Plasmid pBBRbfd+ identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Gene, die für folgende putative Proteine kodieren: Ketosäuredehydrogenase E1- α -Untereinheit (BkdA1), Transkriptionsregulator (BkdR), α/β Hydrolase (Orf3), Glutaminsynthetase (Orf4) und Benzoatdioxygenase (BenC) (Abb. 13). Alle identifizierten Proteine weisen eine hohe Homologie zu entsprechenden Proteinen in *P. putida* auf. Die neu identifizierte BfdB weist jedoch mit 83 % den höchsten Homologie-Wert zur BFD von *P. aeruginosa* PAO1 auf. Die Übereinstimmung zur BfdA (Mdc) beträgt 63 %.

Beim Screening der Genom-Bibliothek der Insertionsmutante *P. putida* ATCC12633 Δmdc im Selektionssystem konnte ebenfalls ein positiver Klon identifiziert werden (Kap. 3.3.2). Die Sequenzierung des isolierten Plasmids pBBR60106 zeigt ebenfalls eine Ähnlichkeit zu bekannten BFDs auf. Es handelt sich dabei um die dritte BFD des Stammes *P. putida* ATCC12633 und wurde als BfdC bezeichnet (Accession No. AM_284967). BfdC besitzt eine 99 %ige Übereinstimmung mit BfdB, lediglich die letzten 9 Aminosäuren sind unterschiedlich, wobei BfdB um 3 Aminosäuren verkürzt ist. Dieser hohe Homologie-Wert besteht auch auf DNA-Ebene. Beide Gene (*bfdB* und *bfdC*) sind jedoch an unterschiedlichen Regionen im Genom von *P. putida* ATCC12633 lokalisiert, was durch die unterschiedlichen flankierenden Bereiche der Gene ersichtlich wird. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass es sich um dasselbe Gen handelt. So wird *bfdC* von einem putativen LysR-Regulator (*orf1*) und einem mutmaßlichen MFS („major facilitator superfamily) Transporter (*orf3*), wobei es sich mutmaßlich um einen Benzoat Transporter handelt, flankiert (Abb. 14). Die Homologie der BfdC zur BfdA liegt bei 63 % und zur BFD aus *P. aeruginosa* bei 83 %.

Die Gene stromabwärts und –aufwärts von *bfdC* ähneln stark der genomischen Region, die *mdc* aus *P. aeruginosa* PAO1 umgibt (Abb. 31). Sowohl der MFS Transporter, als auch der putative LysR-Transkriptionsregulator sind in derselben Orientierung kodiert. Des Weiteren befinden sich in unmittelbarer Nähe von *mdc* im Genom von *P. aeruginosa* weitere Gene, die am Abbau von aromatischen Verbindungen involviert sind, darunter Enzyme für die Degradation von Vanillat (Stover *et al.*, 2000). Ob sich die genomische Region um *bfdC* in *P. putida* ATCC12633 ähnlich gestaltet, oder die drei identifizierten ORFs die Ausnahme darstellen, kann aufgrund des geringen Sequenzbereichs (ca. 3 kb), der gegeben ist, nicht prognostiziert werden.

Hingegen scheint *bfdB* eher aus einer Genduplikation entstanden zu sein. Dafür spricht, dass die Genomregion die *bfdB* umgibt, keine Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Regionen von identifizierten BFD Genen in veröffentlichten bakteriellen Genomen aufweist (Abb. 31). Allers Voraussicht nach entstand *bfdB* wahrscheinlich durch eine Genduplikation von *bfdC*. Dafür spricht die beinahe identische DNA- und Aminosäuresequenz, lediglich der C-Terminus unterscheidet beide Enzyme voneinander. Der C-Terminus von BfdB ist um drei Aminosäuren verkürzt und die letzten 6 Aminosäuren sind im Vergleich zum C-Terminus von BfdC unterschiedlich. Der C-Terminus könnte durch die Duplikation und Inserierung ins Genom verändert worden sein.

Im Gegensatz zu *bfdB* und *bfdC* ist *bfdA* (*mdc*) von *P. putida* ATCC12633 eindeutig in einem Operon oder Cluster, dem Mandelatooperon organisiert (Tsou *et al.*, 1990). Alle in

diesem Operon enthaltenen Gene sind am Abbau von Mandelsäure zu Benzoesäure beteiligt und in unmittelbarer Nachbarschaft im Genom lokalisiert. Obwohl beschrieben ist, dass mehrere verschiedene Bakterien in der Lage sind, auf Mandelsäure als einziger C-Quelle zu wachsen (Fewson, 1988), sind bisher kaum Sequenzdaten veröffentlicht, in denen eine BFD ebenfalls in einem solchen Mandelatoperon oder ähnlicher genomischer Region lokalisiert ist. Lediglich in *Burkholderia xenovorans* ist die BFD anscheinend noch mit der (S)-Mandelatdehydrogenase (MdlB) und Mandelatracemase (MdlA) in einem Mandelatoperon organisiert (Accession No. NC_007951). In *P. stutzeri* scheint das BFD Gen in einer ähnliche Konstellation im Genom vorzuliegen, zumindest ist eine Benzaldehyddehydrogenase und eine (S)-Mandelatdehydrogenase in unmittelbarer Nähe zur BFD im Genom lokalisiert (Accession No. EF_419244).

Häufig ist das BFD-Gen in einer Region organisiert, wie sie für *P. aeruginosa* und für die *bfdC* von *P. putida* beschrieben ist (Abb. 31). So wird das Gen, welches für BFD-Aktivität kodiert, stromaufwärts und –abwärts von einem Benzoattransporter und einem LysR-Regulator flankiert, die zudem auch immer dieselbe Orientierung aufweisen. Der LysR-Regulator tritt in den meisten Genomen in direkter Nachbarschaft zur BFD auf. Häufig ist dann auch stromaufwärts zum BFD-Gen eine Aldehyddehydrogenase (ADH) lokalisiert (Abb. 31). Diese Anordnung der das BFD-Gen umgebenden Region tritt vor allem häufig bei *Burkholderiaceae* auf (Abb. 31). Aufgrund fehlender Übereinstimmung im Vergleich mit anderen, das BFD-Gen umgebenden Regionen, scheint das BFD-Gen auch oft an beliebiger Stelle ins Genom der Bakterien inseriert zu sein, wie es bei *bfdB* der Fall ist.

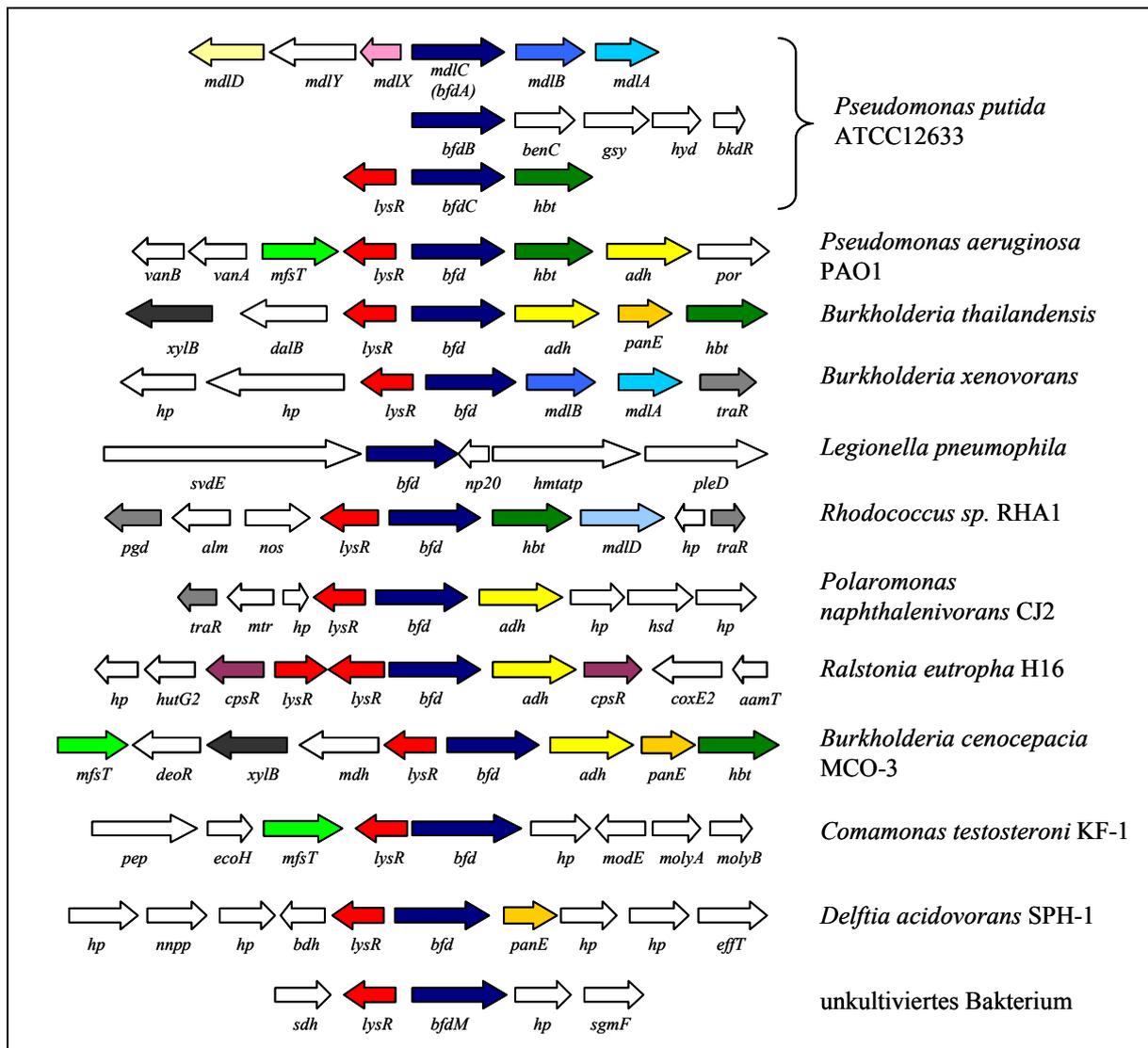


Abb. 31: Schematische Darstellung der BFD umgebenden Genomregion einiger ausgewählter Bakterien. Nur einmal vorkommende Gene und hypothetische Proteine sind als weiße Pfeile dargestellt. Mehrmals vorkommende Genfamilien sind farbig abgebildet, wobei jeweils dieselbe Farbe das entsprechende Gen in allen Genomen repräsentiert. Das BFD-Gen ist durch einen dunkelblauen Pfeil dargestellt. Die Daten zur Erstellung der Genomregion stammen vom IMG-System (<http://img.jgi.doe.gov>; Markowitz *et al.*, 2006).

(hp: hypothetisches Protein; sdh: putative kurzkettenige Dehydrogenase; lysR: putativer LysR Regulator; sgmF: putativer Sigmafaktor; nnpp: putative Nukleotid-Pyrophosphorylase; hhd: putative Hydroxy-butyrat-Dehydrogenase; panE: 2-Dehydropantoat-2-Reduktase; effT: putativer Efflux Transporter; pep: putative Peptidase; ecoH: putative kurzkettenige Enolyl-CoA-Hydratase; mfsT: putativer MFS-Transporter; modE: putativer Transkriptions Regulator ModE Familie; molyA: Molybdän ABC Transporter Untereinheit; molyB: Molybdän ABC Transporter Untereinheit; deoR: Transkriptions Regulator; xylB: Xylulokinase; mdh: putative Mannitol Dehydrogenase; adh: putative Aldehyd-Dehydrogenase; hbt: putativer Hydroxybenzoat-Transporter; hutG2: N-Formylglutamate-Amino-Hydratase; cpsR: extra Cytoplasmatischer Rezeptor; coxE2: coxE2 Protein; aamT: putative Aminosäuren-Acetyl-Transferasen; traR: Transkriptions Regulator; mtr: putative Methyl-Transferase; hsd: putative alpha-Hydroxysäure-Dehydrogenase; pgd: putative Phosphoglycerat-Dehydrogenase; alm: putative Alkanal-Monooxygenase; nos: putative Stickoxid-Synthase-Oxygenase; mdlA: Mandelat-Racemase; mdlB: (S)-Mandelat-Dehydrogenase; mdlC: Benzoylformiatdecarboxylase; mdlD: Benzaldehyddehydrogenase; mdlY: Mandelamid-Hydrolase; mdlX: putativer Transkriptionsregulator; svdE: konserviertes Gen; np20: Transkriptions-Regulator; hmtatp: Schwermetall Transport ATPase; pleD: Sensor Histidin-Kinase; dalB: Manitol-Dehydrogenase; vanA: Vanillat-Demethyl-Oxygenase Untereinheit; vanB: Vanillat-Demethyl-Oxygenase Untereinheit; por: Porin; benC: Benzoat-Dioxygenase; gsy: Glutamat-Synthase; hyd: α/β -Hydrolase; bkdR: Ketosäure-Dehydrogenase E1-Untereinheit.)

4.3 Konstruktion von Metagenom-Bibliotheken und Screening auf BFD-Aktivität

Es gibt viele Methoden, um Biokatalysatoren mit neuen Eigenschaften, z. B. die Katalyse einer bestimmten Reaktion, zu erhalten. Eine Methode mit großem Potential ist der Metagenomansatz. Durch den Metagenomansatz kann theoretisch die gesamte mikrobielle Population eines Habitats erschlossen werden, und mit ihr die enorme Vielfalt an biotechnologischer Information, die durch die Mikroorganismen beherbergt wird. Beim Metagenomansatz erfolgt die Isolierung der genomischen DNA der in einer Umweltprobe enthaltenen Mikroorganismen direkt ohne vorherige Kultivierung der Mikroorganismen. Die aus der Umweltprobe isolierte genomische DNA wird als Metagenom oder metagenomische DNA bezeichnet (Handelsman *et al.*, 1998). Die hier verwendete metagenomische DNA zur Erstellung von Metagenom-Bibliotheken wurde durch die Methode der direkten Lyse der Bakterien *in situ* gewonnen. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe DNA-Ausbeute und die relativ schnelle Durchführbarkeit. Nachteilig ist, dass die erhaltenen DNA-Fragmente, bedingt durch Scherkräfte, recht klein sind (1 kb – 50 kb). Da ausschließlich nur so genannte „small-insert“-Bibliotheken erstellt werden sollten und somit kleine Fragmente gewünscht waren, hatte dieser Nachteil keinen Einfluss auf das Vorhaben. Die Entscheidung für „small-insert“-Metagenom-Bibliotheken fiel aufgrund der Tatsache, dass die gesuchte Enzymaktivität (BFD-Aktivität) nur durch ein Gen kodiert wird. Bei „large-insert“-Bibliotheken besteht aufgrund der Größe des eingefügten Segments die Gefahr, dass gesuchte Gene nicht oder nur schwach exprimiert und deshalb nicht detektiert werden können. Der Grund dafür ist die oft mangelnde Erkennung des natürlichen Promotors durch dem in der Regel heterologen Wirt. Bei „small-insert“-Bibliotheken hingegen wird die Expression durch starke, vektorkodierte Promotoren vermittelt.

Die Bibliotheken wurden in dem „broad-host-range“-Vektor pBBR1MCS erstellt. Der Vektor repliziert unter anderem in *E. coli* und *P. putida* und besitzt eine Mobilisierungsregion (*mob*), wodurch ein Plasmidtransfer zwischen *E. coli* und *P. putida* durch Konjugation möglich ist. Durch diese Bedingungen konnten die Bibliotheken in *E. coli* erstellt und zum Screening im Wachstum-basierten Selektionssystem in *P. putida* übertragen werden.

Als Umweltprobe, aus der die metagenomische DNA isoliert wurde, diente Bodenmaterial von einem landwirtschaftlich genutzten Acker in der Nähe von Jülich. Hintergrund dieser Wahl der Umweltprobe war, dass in der Landwirtschaft aromatische Verbindungen als Pflanzenschutzmittel Anwendung finden (z. B. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D); Abb. 32). Folglich besteht die Möglichkeit, dass sich in landwirtschaftlich genutzten Böden

Bakterien anreichern, die diese aromatischen Verbindungen abbauen und zu deren Repertoire auch ein BFD-Gen zählt.

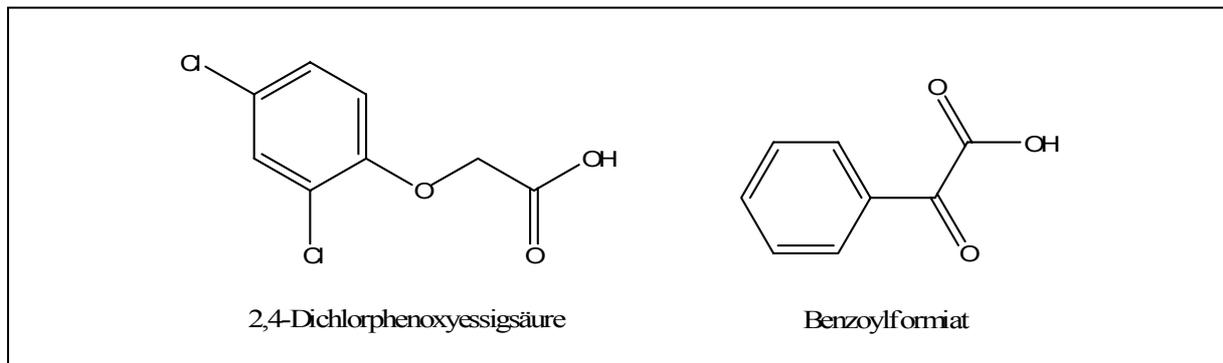


Abb. 32: 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure und Benzoylformiat.

Es wurden zwei unterschiedliche Metagenom-Bibliotheken aus der Umweltprobe angelegt. Bei der einen wurde die metagenomische DNA direkt aus der Bodenprobe isoliert und daraus die Bibliothek generiert. Bei der anderen erfolgte vor der Isolierung eine so genannte Anreicherungskultur. Darunter versteht man eine Vorselektionierung und Anreicherung der Mikroben mit der gesuchten Eigenschaft. Dadurch wird zwar die Wahrscheinlichkeit erhöht einen positiven Klon zu identifizieren, jedoch sinkt die mikrobielle Diversität stark und entspricht somit eher dem Kultivierungsansatz als dem Metagenomansatz. Aus der Anreicherungskultur wurde dann die genomische DNA mittels direkter Lyse isoliert (Kap. 2.5.3).

Eine Herausforderung beim Metagenomansatz besteht darin, geeignete Bibliotheken zu konstruieren. Viele Faktoren spielen dabei eine Rolle, vor allem aber die Qualität der isolierten metagenomischen DNA bezüglich Reinheit hat einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der konstruierten Bibliothek. So ist die isolierte DNA mit polyphenolischen Verbindungen, Humin- und Flavinsäuren kontaminiert, wodurch enzymatische Modifikationen wie Restriktion und Ligation stark beeinträchtigt werden (Tsai & Olsen, 1992). Diese Verbindungen sind schwierig durch Reinigungen zu entfernen und wenn, ist dies mit starken Einbußen bezüglich dem DNA-Gehalt verknüpft. Auch in dieser Arbeit war es manchmal ein Problem, Metagenom-Bibliotheken zu generieren. Entweder enthielten die Bibliotheken nur einige wenige Klone oder einen hohen Leervektoranteil. Die wahrscheinlichste Ursache ist die Restkontamination der gereinigten metagenomischen DNA. So konnten nur wenige Bibliotheken konstruiert werden, bei denen der Anteil an Vektoren mit inserierter metagenomischer DNA über 50 % lag (Tab. 8). Die zahlreichen Bibliotheken, die nicht mehr als einige hundert Klone aufwiesen, sind nicht aufgelistet. Insgesamt bestehen

die in Tabelle 8 aufgelisteten Bibliotheken aus ungefähr 154000 Klonen, wovon schätzungsweise aber nur 48000 (31 %) inserierte metagenomische DNA aufwiesen.

Die erwähnten Bibliotheken wurden alle in *E. coli* DH5 α generiert und dann mittels triparentaler Konjugation in den Selektionsstamm *P. putida* KT2440 transferiert. Dieser Stamm wächst nur auf dem Selektionsmedium mit Benzoylformiat als einzige C-Quelle, wenn BFD-Aktivität über die klonierte Metagenom-Bibliothek vermittelt wird. Ebenfalls wurde getestet, die Metagenom-Bibliothek durch Elektroporation der Ligationsansätze direkt in *P. putida* KT2440 zu transferieren. Jedoch war die Elektroporations-Effizienz sehr gering, wodurch sich die Konstruktion der Bibliothek in *E. coli* und anschließender Transfer in *P. putida* als am Effektivsten erwies. Zudem kann für weitere Screenings nach anderen Enzymaktivitäten auf die erstellten Bibliotheken zurückgegriffen werden, wogegen beim direkten Ansatz bei nicht detektierter BFD-Aktivität die Bibliothek nicht erhalten bleibt.

Insgesamt konnte beim Durchmustern der Metagenom-Bibliotheken im Wachstum-basierten Selektionssystem ein Klon mit BFD-Aktivität identifiziert werden (Kap. 3.5.2). Die Sequenzbestimmung des Inserts des entsprechenden Plasmids führte zur Identifizierung eines ORFs, der für eine BFD kodiert, und als *bfdM* bezeichnet wurde (Accession No. AM_284968). Das abgeleitete Protein besitzt eine 72 %ige Übereinstimmung zu einer Aminosäuresequenz einer putativen BFD von *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2T, einem Naphthalin-abbauenden Stamm (Jeon *et al.*, 2004). Die ebenfalls identifizierte DNA-Region stromabwärts und –aufwärts von *bfdM* zeigt ebenso Ähnlichkeiten zu Genen dieses Gram-negativen Bakteriums, welche für ein Transkriptions-regulierendes Protein (LysR-Regulator) und einen putativen Sigma-Faktor kodieren (Abb. 16). Jedoch entspricht die DNA-Region, welche die *bfdM* umgibt, nicht genau dem Bereich, an dem die putative BFD im Genom von *P. naphthalenivorans* CJ2T lokalisiert ist. So ist nur der mutmaßliche LysR-Regulator stromabwärts der BFD an identischer Position und Orientierung im Verhältnis zum BFD-Gen vorzufinden. Die anderen identifizierten Gene sind im Genom von *P. naphthalenivorans* CJ2T nicht in unmittelbarer Nähe zur BFD angeordnet.

Seit Kurzem existieren jedoch von zwei noch nicht vollständig sequenzierten Bakterien Sequenzdaten, zu deren putativen BFDs *BfdM* eine höhere Homologie aufweist. Bei den Bakterien handelt es sich zum einen um *Comamonas testosteroni* KF-1 und zum anderen um *Delftia acidovorans* SPH-1. Zur mutmaßlichen BFD aus *C. testosteroni* KF-1 besteht eine 80 %ige und zur BFD aus *D. acidovorans* SPH-1 sogar eine 83 %ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene. Jedoch besteht ein großer Unterschied zwischen dem putativen BFD-Gen in *C. testosteroni* KF-1 und *bfdM*. Das BFD-Gen in *C. testosteroni* KF-1 ist ca. 300 bp länger

als *bfdM*, was in etwa 100 Aminosäuren in der Primärstruktur entspricht. Diese 100 zusätzlichen Aminosäuren bilden den N-Terminus der putativen BFD.

Die anderen, im Insert identifizierten Gene weisen zwar auch zu Genen aus *C. testosteroni* KF-1 und *D. acidovorans* SPH-1 die größte Homologie bezüglich Aminosäuresequenz auf (zwischen 60 % und 80 %), aber beim Vergleich zu der BFD umgebenden Region der beiden Stämme mit dem die *BfdM* umgebenden Bereich ist wiederum nur der stromabwärts zum BFD-Gen lokalisierte LysR-Regulator konserviert. Bei *C. testosteroni* KF-1 ist es zusätzlich noch das stromaufwärts an *bfdM* grenzende Gen, welches für ein uncharakterisiertes Protein kodiert. Alle anderen Gene sind in anderen Bereichen im Genom lokalisiert.

C. testosteroni KF-1 und *D. acidovorans* SPH-1 sind Gram-negative β -Proteobakterien, die am bakteriellen Abbau des kommerziellen Tensides LAS (Lineares Alkylbenzolsulfonat) beteiligt sind. Dabei dienen ihnen die durch Abbau von LAS durch andere Bakterien anfallenden Sulfophenylcarboxylat (SPC) als C- und Energiequelle (Schleheck *et al.*, 2004). Ein anderer *D. acidovorans* Stamm (*D. acidovorans* MC1) ist in der Lage, das zuvor bereits erwähnte Herbizid, 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) zu metabolisieren (Müller & Babel, 2003). Daraus kann geschlossen werden dass die Wahl der Bodenprobe bezüglich der Identifizierung von neuen BFDs die richtige war.

C. testosteroni KF-1, *D. acidovorans* SPH-1 und *P. naphthalenivorans* CJ2T gehören alle drei zur Familie der *Comamonadaceae*, woraus sich schließen lässt, dass *bfdM* aus einen Organismus stammt, der vermutlich dieser Familie zuordnen ist und ebenfalls befähigt ist, aromatische Verbindungen als alleinige C-Quelle zu nutzen.

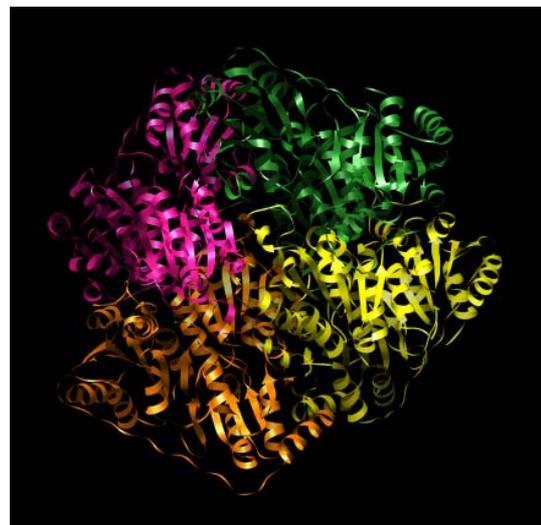
4.4 Vergleich der Primärstruktur der neu identifizierten BFDs mit der BFD aus *P. putida* ATCC12633

Für die drei neu identifizierten Benzoylformiatdecarboxylasen konnte aufgrund der Detektierung im Wachstum-basierten Selektionssystem die Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Benzoylformiat gezeigt werden. Die drei neuen BFDs wurden mit der Primärstruktur der *BfdA* (MdlC) aus *P. putida* ATCC12633 verglichen, da sie die erste isolierte BFD (Tsou *et al.*, 1990) und detailliert bezüglich Struktur und Katalyse untersucht wurde (Hasson *et al.*, 1998; Iding *et al.*, 2000; Polovnikova *et al.*, 2003; McLeish *et al.*, 2004). Für die *BfdC* konnte ein Strukturmodell dargestellt werden (Abb. 33). Es ist anhand der relativ hohen Homologie bezüglich der Primärstruktur wahrscheinlich, dass alle drei neuen BFDs, wie die *BfdA* ein Homotetramer aus vier identischen Untereinheiten bilden und die Untereinheit aus jeweils drei Domänen aufgebaut ist, der N-terminalen, der mittleren β -Domäne und der C-terminalen

γ -Domäne. Während die α -Domäne den Pyrimidinring des Cofaktors ThDP bindet, bindet die γ -Domäne den Diphosphatrest des ThDP über den zweiten Cofaktor, dem zweiwertigen Magnesiumion (Mg^{2+}). Dies wird durch das Vorkommen aller an der Cofaktorbinding beteiligten Aminosäuren an der entsprechenden Position in der Primärstruktur der drei neuen BFDs bestätigt. Die BFD besitzt vier aktive Zentren, die aus Interaktion der α -Domäne eines Monomers mit der γ -Domäne einer benachbarten Untereinheit gebildet wird. Die β -Domäne sorgt dabei für den intermolekularen Kontakt zweier Dimere zum Homotetramer, wodurch die in der β -Domäne lokalisierten Aminosäuren weniger stark konserviert scheinen als die am aktiven Zentrum beteiligten der α -Domäne und γ -Domäne (Abb. 17). Diese beschriebene Struktur für die BFD scheint aufgrund der konservierten Aminosäuren und der Tatsache, dass trotz geringer Ähnlichkeiten der Primärsequenzen mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen die Struktur immer identisch ist (Arjunan *et al.*, 1996; Drobritzsch *et al.*, 1998; Mosbacher *et al.*, 2005), auch auf die drei neu identifizierten BFDs zu zutreffen.

Neben den Aminosäurenresten, die an der Cofaktorbinding von ThDP und Mg^{2+} in BfdA beteiligt sind (Y458, G427, G429, D428, N455), sind auch die Aminosäureseitenketten für die Substratbinding (S26, A460, F464), in allen drei neuen BFDs an entsprechenden Positionen in der Primärstruktur konserviert. Gleiches gilt auch für die vier an der Katalyse beteiligten Aminosäuren (S26, E28, H70, H281).

Abb. 33: Modell des Homotetramers der BfdC. Die BfdC besteht aus vier identischen Untereinheiten. Das Modell ähnelt stark dem Homotetramer der BfdA aus *P. putida* ATCC12633 (Abb. 3). Die Struktur wurde durch den Server Swiss-Model berechnet (Schwede *et al.*, 2003) und mit Hilfe des Programms UCSF Chimera dargestellt (Pettersen *et al.*, 2004).



Der Vergleich der Primärstruktur lässt vermuten, dass alle drei neuen BFDs die gleichen Reaktionsmechanismen wie die BfdA haben, jedoch besteht die Möglichkeit unterschiedlicher Decarboxylase- und Carboligaseeigenschaften, wie Substratspektrum oder Enantioselektivität,

die durch die nicht homologen Bereiche stark beeinflusst werden können. So konnte durch gerichtete Evolution eine Variante der BfdA erzeugt werden, die *ortho* substituierte Benzaldehyde als Donorsubstrate akzeptiert (Lingen *et al.*, 2003). Die dafür verantwortliche Mutation liegt außerhalb des katalytischen Zentrums.

4.5 Produktion der neuen Benzoylformiatdecarboxylasen

Dass die neuen BFDs Decarboxylase-Aktivität besitzen, konnte aufgrund der Aktivitätsbasierten Identifizierung gezeigt werden. Um Aufschluss über das genaue Katalysepotential zu erhalten, wurden die jeweiligen Gene mittels des auf der T7-Polymerase basierenden pET-Expressionssystem (Novagen, Madison, USA) im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert (Kap. 3.8), um ausreichend Protein für anschließende Untersuchungen zu erhalten. Eine Expression der Gene mit den identifizierten Plasmiden in dem Stamm, der zur Isolation der BFDs genutzt wurde, würde zu keiner quantitativen Expression führen, die für die darauf folgenden Analysen erforderlich ist. Für die Reinigung über eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie wurden die Proteine mit einem C-terminalen His-Tag fusioniert, da der C-Terminus bei Strukturhomologen Proteinen frei liegt und diese bereits über einen C-terminalen His-Tag erfolgreich aufgereinigt werden konnten (Iding *et al.*, 2000; Janzen, 2002; Siegert *et al.*, 2005).

Jedoch kam es bei der Expression der neuen BFDs zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten im Cytoplasma, sogenannten „inclusion bodies“. In solchen Proteinakkumulationen liegt das Enzym in inaktiver Form vor. „Inclusion bodies“ können vor allem durch zu hohe Konzentrationen des Zielproteins in der Zelle, langsame Faltungsprozesse oder Fehlfaltungen und zu geringe Proteinstabilität verursacht werden (Baneyx & Mujacic, 2004). Bei zu hoher Konzentration von Faltungsintermediaten interagieren diese über die hydrophoben Bereiche miteinander und durch fehlende Chaperone (Faltungshelfer), die mit den hydrophoben Bereichen der Polypeptidketten des zu faltenden Proteins wechselwirken, entstehen unlösliche Aggregate (Sorensen & Mortensen, 2005). Eine Methode zur Erhöhung der Löslichkeit der exprimierten Proteine und die damit verbundene Reduktion der Akkumulation ist das Reduzieren der Temperatur, bei der die Expression des entsprechenden Gens durchgeführt wird (Sorensen & Mortensen, 2005). Auch in dieser Arbeit wurde diese Strategie verfolgt, führte aber nicht zu einer Abnahme der gebildeten „inclusion bodies“ und somit auch nicht zur Expression eines aktiven Enzyms. Um den an das Protein fusionierten His-Tag als Ursache für die Bildung von Proteinaggregaten auszuschließen,

wurde die Expression auch ohne His-Tag durchgeführt. Dies führte jedoch zu keiner Verbesserung der Löslichkeit des Proteins.

Eine weitere Strategie, die zu einer Erhöhung der Löslichkeit des exprimierten Proteins führen kann, ist die Coexpression von Chaperonen, die eine korrekte Faltung des Proteins vermitteln können. Bei kleinen Proteinen, die weniger als 100 Aminosäuren besitzen oder solchen, die nur aus einer Domäne bestehen, erfolgt die Faltung meist spontan und die native Konformation wird ohne Hilfe erlangt (Baneyx & Mujacic, 2004). Andere Proteine können ihre native Form jedoch nicht ohne Hilfe einnehmen und sind auf spezifische Chaperone angewiesen, die im heterologen Wirt entweder nicht existieren oder in nicht ausreichender Menge zur Verfügung stehen (Schlieker *et al.*, 2002). Molekulare Chaperone verhindern dabei die Akkumulation mit anderen Proteinen, indem sie an das Protein binden und so die hydrophoben Polypeptidketten vor der Interaktion mit anderen Proteinen schützen. Später geben sie sie wieder an die Umgebung ab oder leiten sie an nachgeschaltete Chaperone weiter (Deuerling *et al.*, 1999). Andere Chaperone sind in der Lage, kleinere entstandene Akkumulationen von Proteinen aufzulösen (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001).

Die Löslichkeit der BFDs sollte durch die Coexpression eines Sets an Chaperonen, die durch die Firma TaKaRa Bio Inc., Japan (Nishihara *et al.*, 2000) vertrieben wird, erhöht werden. Es handelt sich dabei um 6 verschiedene Faltungshelfer kodierende Gene (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES*, *groEL* und *tif*), die in unterschiedlichen Kombinationen auf Plasmiden vorhanden sind und mit dem Zielgen coexprimiert werden können. Während bei BfdB und BfdM kein aktives Protein durch die Coexpression verschiedener Kombinationen der Chaperone erzielt werden konnte, führte die Coexpression bei BfdC zu aktivem Enzym. Die höchste Aktivität wurde durch die Coexpression der Chaperon Gene *groES*, *groEL* und *tif* erlangt (Abb. 20). Die Gene *groES* und *groEL* kodieren für die Faltungshelfer GroES und GroEL, die aktiv an der Proteinfaltung beteiligt sind, während *tif* für den Triggerfaktor kodiert, der zu den Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen zählt (PPIasen). Der Triggerfaktor bindet nahe am Peptidausgang von Ribosomen an die Polypeptidkette und sorgt dafür, dass das neu gebildete Protein in der richtigen Konformation synthetisiert wird.

BfdC konnte durch die Coexpressionen von Chaperonen aktiv exprimiert werden, während BfdB und BfdM weiter inaktiv in Form von „inclusion bodies“ vorlagen. Da BfdB und BfdC beinahe identisch sind (99 % Homologie), wurde deshalb verstärkt versucht, BfdM in Lösung zu bringen. Dies sollte ebenfalls durch Coexpression von Chaperonen erfolgen, jedoch wurde diesmal eine Chaperon „Toolbox“ angewendet, die aus Chaperon-Genen von *P. aeruginosa* besteht. Diese „Toolbox“ besteht aus 40 einzelnen und über 40 verschiedenen Kombinationen

von Chaperonen und wurde von Kreuz *et al.* (2006) entwickelt. Die „Toolbox“ wurde anhand eines „high-throughput“-Screening getestet, indem durch die coexprimierten Chaperone aktive BfdM detektiert werden sollten. Jedoch konnte auch hier keine aktive BfdM produziert werden (Kap. 3.8.2).

Trotz der Änderung vieler Expressionsparameter, wie z. B. das Herabsetzen der Transkriptionsrate oder den Einsatz spezieller *E. coli*-Expressionsstämme (z. B. *E. coli* Origami™), konnte kein lösliches BfdM produziert werden. Als Alternative scheint nur ein anderer Expressionswirt als *E. coli* in Frage zu kommen. Es bietet sich ein *Pseudomonas*-Stamm an, da in *P. putida* schon BfdM-Aktivität aufgrund des Wachstums des Selektionsstammes detektiert werden konnte. Jedoch besteht ein Unterschied bezüglich der Enzymmengen, die bei der Selektion benötigt werden und die für biochemische Charakterisierungen des Enzyms notwendig sind: meist können schon geringe Mengen an aktivem Enzym für das Wachstum des Bakteriums auf dem Selektionsmedium ausreichen.

Im Gegensatz zu BfdB konnte durch die Coexpression von Chaperonen BfdC aktiv produziert werden, obwohl sich die beiden Enzyme nur bezüglich der letzten 9 Aminosäuren am C-Terminus unterscheiden. Auch BfdM konnte nicht in löslicher Form exprimiert werden, weist ebenfalls einen zu BfdC unterschiedlichen C-Terminus auf und ist wie der C-Terminus von BfdB im Vergleich zur BfdC um einige Aminosäuren verkürzt (Abb. 34). Daraus kann man schließen, dass der C-Terminus eine entscheidende Rolle bezüglich der Proteinfaltung spielt und somit Einfluss auf die Akkumulation der Proteine bei der Expression hat. Bestätigt wird die These durch die Diplomarbeit von Spinrath (2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus BfdB und dem C-Terminus von der BFD aus *P. aeruginosa* PAO1 ein aktives Fusionprotein erstellt. Dieses konstruierte Protein entspricht in etwa der BfdC.

Die Coexpression der Faltungsmodulatoren führte zwar zur einer Reduktion der „inclusion bodie“-Bildung und damit zu aktiver BfdC, jedoch scheint ein großer Teil des Proteins immer noch akkumuliert vorzuliegen, wie es durch SDS-PAGE-Analysen dokumentiert wird (Abb. 20). Im Gegensatz dazu bildet BfdA keine Proteinakkumulationen und liegt vollständig in löslicher Form vor (ohne Abb.). Wenn der C-Terminus eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung von BFDs spielt, scheint der C-Terminus der BfdA eine optimale Faltung in *E. coli* zu vermitteln. Eventuell ist es möglich, durch Austausch der C-terminalen Sequenz der „inclusion bodies“ bildenden BFDs hin zu einem C-Terminus, der dem der BfdA entspricht, diese Enzyme in aktiver Form zu exprimieren.

BfdA	Pp	ALS	AKG	PV	LIE	VST	TV	SP	VKB
BfdB	Pp	ALES	DRPV	LICA	ASSR	----			
BfdC	Pp	ALES	DRPV	LIEV	PTQT	IEP-			
Bfd	Pa	ALA	ADRPV	LIEV	PTQT	IEP-			
BfdM		AIAS	PRPV	LVE	VEVA	-----			

Abb. 34: Vergleich des C-Terminus verschiedener BFDs. Der C-Terminus scheint Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins bei der Überexpression zu nehmen. BfdA lässt sich ohne weiteres überexprimieren und liegt in löslicher Form vor. Bei der Überexpression von Bfd aus *P. aeruginosa* wird auch lösliches Protein gebildet, jedoch ist die Proteinakkumulation sehr hoch. BfdC kann nur durch Coexpression von Chaperonen in löslicher Form produziert werden. BfdB und BfdM liegen bei der Überexpression ausschließlich als „inclusion bodies“ vor.

BfdC konnte durch Coexpression von Chaperonen in löslicher Form exprimiert werden und konnte in einem Schritt nach den Bedingungen, die für die BfdA gelten, über den fusionierten His-Tag mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden (Kap. 3.9). Jedoch konnte keine vollständige Homogenität von BfdC nach der Aufreinigung erreicht werden (Abb. 22). Eine Optimierung der Aufreinigungsbedingungen könnte zur Homogenität des Produktes führen. Vermutlich sind die coexprimierten Chaperon-Gene für die unvollständige Homogenität der BfdC verantwortlich, wofür eine in der SDS-PAGE-Analyse identifizierte Bande in der Größe der Chaperone GroEL oder Tf (60 bzw. 56 kDa) spricht (Abb. 22). Diese konnten beim Waschschrift nicht vollständig entfernt werden, eventuell durch noch bestehende Bindungen zwischen Chaperon und Zielprotein. Dennoch konnte die BfdC mit einem angemessenen Aktivitätsverlust von knapp 50 % erfolgreich aufgereinigt werden und genug Protein für die anschließende biochemische Charakterisierung gewonnen werden.

4.6 Das katalytische Potenzial der BfdC

Die BfdC aus *P. putida* ATCC12633 zeigt ähnliche katalytische Eigenschaften wie die BfdA (MdlC) aus demselben Organismus. Es wurden verschiedene katalytische Parameter bestimmt, darunter die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}), Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und ein Substratspektrum bezüglich der Decarboxylase-Aktivität. Die ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit für BfdC ist mit 78,5 U/mg deutlich geringer als V_{\max} für die BfdA (340 U/mg; Iding, 1998). Dies entspricht in etwa nur 23 % der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der BfdA. Ein ähnlicher Wert ist auch für die BFD aus

P. aeruginosa beschrieben (Wendorff, 2006), zu der BfdC mit 83 % den höchsten Homologie-Wert aufweist. Die entsprechend höhere Aktivität der BfdA könnte durch die niedrigere Aktivierungsenergie der BfdA begründet sein (Tab. 11). Dagegen besitzt die BfdC eine höhere Affinität zum Substrat Benzoylformiat als die BfdA (Tab. 11), was durch den niedrigeren K_m -Wert beschrieben wird. Andere katalytische Parameter, soweit sie bestimmt wurden, sind in etwa identisch (Tab. 11).

Tab. 12: Übersicht einiger kinetischer Parameter von BfdC und BfdA. Die Daten für die BfdA entstammen der Arbeit von Iding *et al.*, 2000.

Parameter	BfdC	BfdA
K_m [mM Benzoylformiat]	0,3	0,7
V_{max} [U/mg]	78,5	340
pH-Optimum	6 – 6,5	6,2
Aktivierungsenergie [kJ/mol]	57	38

Bezüglich des Substratspektrums der Decarboxylase-Reaktion liegt die Präferenz der BfdC von den getesteten Substraten klar bei Benzoylformiat. Zwar wurden einige aliphatische 2-Ketosäuren ebenfalls decarboxyliert, jedoch ist die Aktivität deutlich geringer als im Vergleich zu dem Substrat Benzoylformiat (Tab. 9). So werden für das am zweitbesten katalysierte Substrat 2-Ketocaprinsäure (2-Hexansäure) gerade mal 6,7 % der relativen Aktivität, die BfdC zu Benzoylformiat hat, erreicht. Ein wesentlicher Unterschied zum Substratspektrum der BfdA besteht darin, dass die BfdC Pyruvat besser umsetzen kann als die BfdA (Iding, 1998; Siegert *et al.* 2005). Die anderen 2-Ketosäuren werden nur im Vergleich zur relativen Aktivität durch die BfdC besser umgesetzt. Die absolute Aktivität bei den aliphatischen 2-Ketosäuren, außer Pyruvat, ist bei der BfdC geringer als bei der BfdA.

Genaue Aussagen können jedoch nicht getroffen werden, da die Messungen bei einer einzigen Substratkonzentration durchgeführt wurden und diese aller Voraussicht nach nicht der optimalen Konzentration entspricht. Dadurch kann eine Inhibierung des Enzyms durch Substratüberschuss vorliegen oder auch durch zu geringe Substratkonzentrationen nicht die optimale Sättigung erzielt worden sein. Das untersuchte Spektrum sollte demnach nur Hinweise bezüglich des bevorzugten Substrates liefern.

Wie die BfdA, weist auch die BfdC in einer Nebenreaktion die Bildung von C-C-Bindungen auf. Zur Bestimmung des Substratspektrums der Carboligase-Reaktion der BfdC wurden die aliphatischen Aldehyde Acetaldehyd, Propanal und Dimethoxyacetaldehyd und die aromatischen Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd getestet. Auch bei der Bildung

von C-C-Bindungen zeigen BfdA und BfdC ähnliche katalytische Eigenschaften. So wird auch durch die BfdC die Carboligation von Acetaldehyd mit Benzaldehyd zu 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP) katalysiert. Dabei wird, wie auch bei der BfdA, das (*S*)-Enantiomer im Überschuss mit einem *ee* von 80 % gebildet. Die BfdA besitzt bei gleicher Substratkonzentration (60 mM Acetaldehyd, 20 mM Benzaldehyd) einen *ee* von 89 % (Iding *et al.*, 2000). Bei der BfdA ist die chirale Induktion von dem Donorsubstrat Benzaldehyd abhängig. Bei 1 mM Benzaldehyd steigert sich der *ee* bezüglich der Bildung des (*S*)-HPP auf 95 % (Iding *et al.*, 2000). Durch Optimierungen der Reaktionsbedingungen könnte evtl. auch die Enantioselektivität der BfdC erhöht werden.

Bei der Selbstligation von Benzaldehyd sind der Umsatz (25 % nach 10 d) und der *ee* (99 %) zwischen BfdA und BfdB vergleichbar (Iding *et al.*, 2000). In beiden Fällen wird das (*R*)-Enantiomer von Benzoin gebildet.

Ein Unterschied des Katalysepotentials zwischen BfdA und BfdC besteht bei der gemischten Carboligation von Acetaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd. Iding und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass der Umsatz dieser Reaktion durch die BfdA nur bei 11 % liegt. Die BfdC setzt die gemischte Ligation mit Acetaldehyd und dem substituierten Benzaldehyd wesentlich besser um als BfdA. Bei BfdA wird bei dieser Reaktion kaum Produkt gebildet, wogegen bei der BfdC ein deutlicher Umsatz im TTC-Test zu erkennen ist (Abb. 29). Im TTC-Test reduziert das Produkt der Carboligation den Farbstoff TTC, was zu einem sichtbaren Farbumschlag von Farblos zu Rot führt (Breuer *et al.*, 2002). Dieser Assay wurde von der Arbeitsgruppe Pohl, Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf auf die getesteten Substrate übertragen (unveröffentlicht).

Ob es sich bei der durch die BfdC katalysierten gemischten Ligation mit Acetaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd bei dem entstehenden Produkt um das PAC- oder das HPP-Analogon handelt, geht nicht aus dem TTC-Test hervor. Dafür sind analytische Methoden notwendig, die bisher jedoch noch nicht durchgeführt werden konnten. Bei der gemischten Ligation mit Acetaldehyd und Benzaldehyd war 2-HPP das Vorzugsprodukt. Daraus kann geschlossen werden, dass aller Wahrscheinlichkeit nach auch in diesem Fall der substituierte Aromat als Donor eingesetzt und das HPP-Analogon gebildet wird. Zudem wird dann aller Voraussicht nach auch das entsprechende (*S*)-Enantiomer gebildet. Dies ist bei der katalytisch sehr ähnlichen BfdA der Fall, bei der aus dieser Reaktion das (*S*)-Enantiomer mit einem *ee* von 99 % hervorgeht (Iding *et al.*, 2000). Jedoch besteht aber auch die Möglichkeit, dass durch die Substitution die Chemo- und Enantioselektivität verändert und das zum HPP tautomere PAC-Analogon gebildet wird.

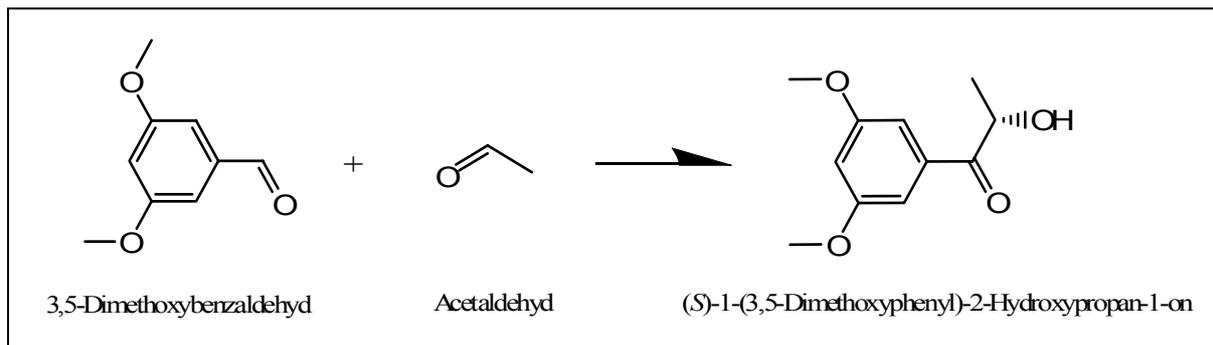


Abb. 35: Mutmaßliche Katalyse durch die BfdC der gemischten Ligation von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und Acetaldehyd zum (S)-Enantiomer des HPP-Analogon.

Sollte das (S)-Enantiomer des HPP-Analogon (1-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-Hydroxypropan-1-on) gebildet werden (Abb. 35), könnte die BfdC ein für die organische Chemie interessantes Synthon bilden. Vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass die BAL nur die Synthese des (R)-Enantiomers katalysiert und die BfdA ein deutlich schlechteren Umsatz bezüglich dieser Reaktion zu haben scheint. Somit könnte die BfdC das Produktspektrum, welches bisher durch die ThDP-abhängigen Enzyme PDC, BfdA und BAL beschrieben ist (Pohl *et al.*, 2002), ergänzen und sogar um ein chirales Hydroxyketon mit funktionellen Seitenketten erweitern, durch das Folgereaktionen ermöglicht werden.

4.7 Identifizierung weiterer Enzym-Aktivitäten mit Hilfe des Selektionssystems

Außer zur Identifizierung von BFD-Aktivität könnte das entwickelte Selektionssystem auch zur Identifizierung weiterer Enzym-Aktivitäten angewendet werden, bei denen als Produkt Benzaldehyd entsteht. Dieser Benzaldehyd kann dann von dem *P. putida*-Stamm als einzige C- und Energie-Quelle genutzt werden und die gesuchte Enzym-Aktivität durch das Wachstum des Stammes detektiert werden. Benzaldehyd ist ein Zwischenprodukt vieler Stoffwechselwege. So entsteht es nicht nur beim Mandelat-Abbauweg, sondern auch beim Abbau von Phenylalanin (Lapadatescu *et al.*, 2000), im Veratrylalkohol Stoffwechselweg (Jensen *et al.*, 1994), beim Toluolabbau (Panke *et al.*, 1998) und während der Cyanogenese in Pflanzen (Fechter & Griengl, 2004).

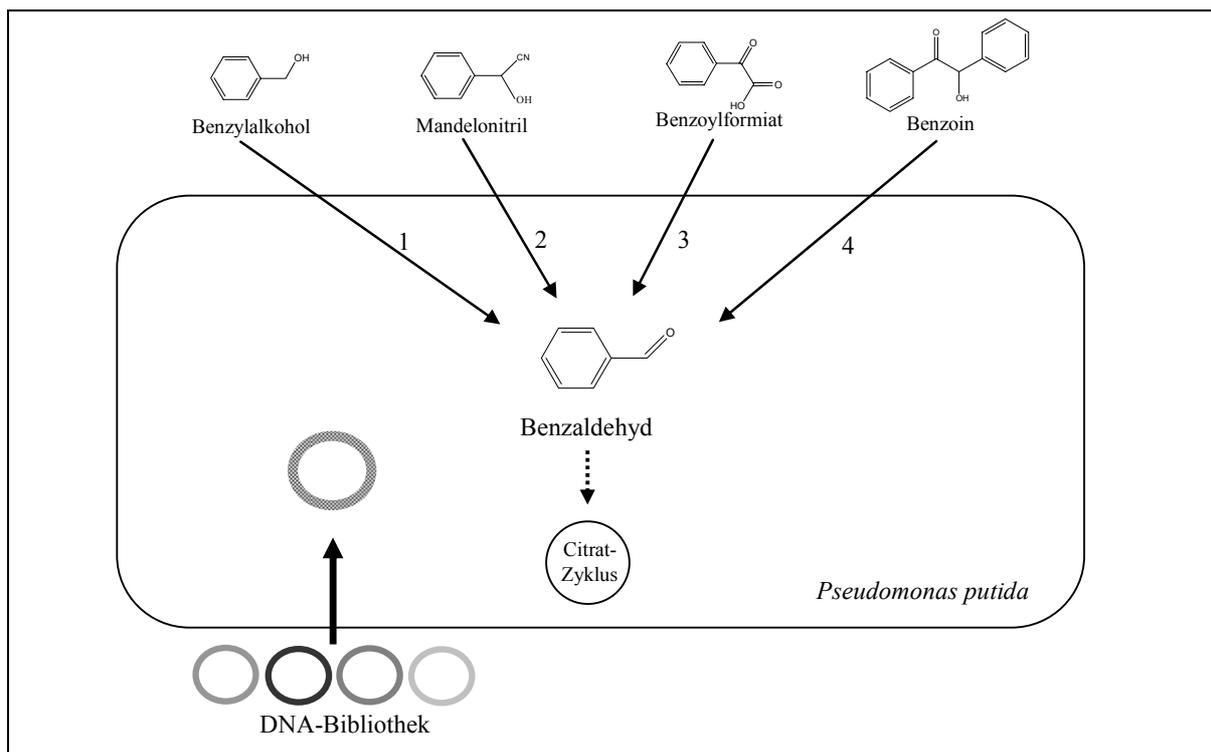


Abb. 36: Möglichkeiten des Wachstum-basierten Selektionssystems zur Identifizierung von Enzym-Aktivitäten durch Einsatz von verschiedenen Substraten als einzige C-Quelle. Wachstum des Stammes ist nur möglich, wenn die gesuchte Aktivität durch klonierte Genom- oder Metagenom-DNA-Bibliotheken komplementiert und Benzaldehyd gebildet wird. Ein Screening auf folgende Enzyme ist mit dem System möglich: Benzylalkoholdehydrogenase (1), Hydroxynitrillyasen (2), Benzoylformiatdecarboxylase (3), Benzaldehydlyase (4)

Theoretisch ist es möglich mit dem Wachstum-basierten-Selektionssystem ein breites Spektrum an verschiedenen Enzymen zu identifizieren. Darunter sind die für die Industrie interessanten Benzaldehydlyasen, Benzoylformiatdecarboxylasen (Pohl *et al.*, 2002), Hydroxynitrillyasen (Fechter & Griengl, 2004) und Benzylalkoholdehydrogenasen, welche alle Benzaldehyd durch die Konversion von Benzoin, Benzoylformiat, Mandelonitril oder Benzylalkohol bilden (Abb. 36).

Da die meisten Enzyme auch die Rückreaktion katalysieren, kann die Methode auch verwendet werden, um Enzyme zu identifizieren, die Benzaldehyd als Substrat nutzen. Benzaldehyd dient in der organischen Chemie als Vorstufe für die Synthese von chiralen Synthons, wie Mandelonitril oder Ephedrin. Wenn die identifizierten Enzyme zusätzlich noch eine geringe Substratspezifität aufweisen, könnte anhand von neu entdeckten Biokatalysatoren durch das Wachstum-basierte Selektionssystem ein enorm breites synthetisches Substratspektrum erschlossen werden.

Erste Versuche wurden durchgeführt, um anhand des Wachstum-basierten Selektionssystems Benzaldehydlyase (BAL)-Aktivität zu identifizieren (Kap. 3.2). Benzaldehydlyase ist ein

ThDP-abhängiges Enzym und katalysiert die Knüpfung und Spaltung von C-C-Bindungen. So katalysiert die BAL die für die Industrie interessante Bildung von Benzoin oder 2-Hydroxyketonen.

4.8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein effizientes Selektionssystem entwickelt werden, mit dem es möglich ist, für die weiße Biotechnologie interessante Biokatalysatoren aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken zu identifizieren und zu isolieren. Diese Methode ist direkt an die Aktivität der entsprechenden Enzyme geknüpft, wodurch funktionale Enzyme aus sehr großen Bibliotheken identifiziert werden können. Ebenfalls kann die Aktivität von putativen Enzymkodierenden ORFs aus zahlreichen Genom- und Metagenom-Sequenzierungs-Projekten experimentell nachgewiesen werden. Des Weiteren kann das System bei der Methode der „gerichteten Evolution“ angewendet werden. Hier kann es für eine Vorauswahl von aktiven Varianten dienen. Auch kann das System so modifiziert werden, dass die Selektion auf die gesuchte Reaktion hin erfolgt.

Bisher konnte das Wachstum-basierte Selektionssystem exemplarisch erfolgreich zur Identifizierung von neuen Benzoylformiatdecarboxylasen angewendet werden. Das System könnte auch für die Suche anderer Enzyme Anwendung finden (Kap. 4.7, Abb. 36). Eine Voraussetzung ist, dass die gesuchten Enzyme Benzaldehyd als Produkt bilden, welches dann durch den Selektionsstamm weiter metabolisiert werden kann. Da die meisten Enzyme auch die Rückreaktion katalysieren, kann das System auch zur Identifizierung von Enzymen angewendet werden, die Benzaldehyd als Substrat nutzen. Benzaldehyd dient in vielen chemischen Synthesen als Vorstufe von chiralen Synthons. Anhand des Wachstum-basierten Screeningsystems können somit Enzyme identifiziert werden, die ein großes synthetisches Spektrum für die chemische Industrie erschließen.

Mit Hilfe des Wachstum-basierten Selektionssystems konnten drei neue aktive BFDs aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken isoliert werden (BfdB, BfdC und BfdM), wovon eine bereits in *E. coli* produziert und charakterisiert werden konnte (BfdC). Die anderen beiden konnten aufgrund der Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten in *E. coli* nicht in aktiver Form exprimiert werden. Vor allem BfdM scheint wegen seiner relativ geringen Homologie zu der bisher am ausführlichsten charakterisierten BfdA (MdlC) ein interessantes Enzym zu sein. Es wurden verschiedene Methoden zur Hemmung der Bildung von Proteinaggregaten eingesetzt, jedoch ohne Erfolg. Eine Methode, die bisher nicht durchgeführt wurde und zum möglichen Erfolg führen könnte, ist die Verlagerung der Produktion in einen anderen

Expressionswirt, wie *P. aeruginosa* (Rosenau & Jaeger, 2004). Eine sehr interessante Methode wäre sicherlich auch die Veränderung des C-Terminus des Enzyms durch „gerichtete Evolution“. Der C-Terminus scheint eine bedeutende Rolle bezüglich der Proteinakkumulation zu spielen. Eine Veränderung des C-Terminus von BfdM könnte somit zu einer Verringerung der Akkumulation führen und somit zur Produktion von löslichen und aktiven Enzym.

Dagegen konnte BfdC in ausreichender Menge für biochemische Charakterisierungen produziert werden. Sie zeigt sowohl Decarboxylase- als auch Carboligase-Aktivität. Während bei der Decarboxylierung das Substratspektrum dem der BfdA (MdlC) stark ähnelt, so scheint bezüglich der Carboligation ein wesentlicher Unterschied zu bestehen. Im TTC-Test konnte bei der BfdC die gemischte Ligation von Acetaldehyd mit dem substituierten Aromat 3,5-Dimethoxybenzaldehyd beobachtet werden. Eine genauere Analyse der Reaktion durch GC/MS und chiraler HPLC steht jedoch noch aus, welche Aufschluß geben würde, welches Produkt aus dieser gemischten Ligation hervorgeht. Wenn man die Untersuchungen bezüglich der gemischten Ligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd in Betracht zieht, dann sollte das (*S*)-Enantiomer des HPP-Analogons gebildet werden. Falls das (*S*)-HPP-Analogon gebildet wird, so würde die BfdC das Produktspektrum an chiralen Hydroxyketonen erweitern, da dieses bisher nicht oder nur unzureichend durch die Katalyse der ThDP-abhängigen Enzyme PDC, BfdA und BAL zur Verfügung steht. Da es sich um ein chirales Hydroxyketon mit funktionellen Seitenketten handelt, durch die Folgereaktionen ermöglicht werden, stellt es für die chemische Industrie ein interessantes Produkt dar. Des Weiteren wäre es von Interesse, ob die BfdC weitere substituierte Aromaten, wie z. B. *ortho* substituierten Benzaldehyd, umsetzen kann. Die BfdA (MdlC) zum Vergleich akzeptiert dieses Benzaldehyd-Derivat nicht als Donor (Iding *et al.*, 2000), wodurch die Produktpalette an chiralen Hydroxyketonen durch BfdC erweitert werden könnte.

5. Zusammenfassung

Chirale 2-Hydroxyketone sind wichtige Vorstufen in der organischen Synthese (Dünkelmann *et al.*, 2004). Das ThDP-abhängige Enzym Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida* ATCC12633 ist als einziges bekanntes Enzym zur (*S*)-selektiven Katalyse von 2-Hydroxyketonen mittels Carboligase-Aktivität befähigt (Pohl *et al.*, 2002; 2004). Jedoch weist es ein enges Substratspektrum bezüglich Acylakzeptor und Donoraldehyd auf (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Wachstum-basiertes Selektionssystem entwickelt und etabliert, mit dem es möglich ist, neue BFDs aus Genom- und Metagenom-Bibliotheken zu identifizieren. Besonders der Metagenomansatz birgt ein enormes Potential an bisher unbekannter genetischer Information und somit an neuen Enzymen, die industriell genutzt werden können (Lorenz & Eck, 2005). Anhand des neuen Selektionssystems ist es möglich, DNA-Bibliotheken auf effektive Art und Weise auf BFD-Aktivität zu durchmustern.

Dies konnte durch die Identifizierung von drei neuen BFDs (BfdB, BfdC und BfdM) exemplarisch demonstriert werden. BfdB und BfdC stammen aus einer Genom-Bibliothek von *P. putida* ATCC12633, während BfdM aus einer Metagenom-Bibliothek isoliert wurde. BfdC konnte erfolgreich in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Es besitzt trotz einer moderaten Homologie (63 %) ähnliche katalytische Eigenschaften wie die bereits ausführlich charakterisierte BfdA (MdlC) aus *P. putida* ATCC12633. So konnte für die BfdC sowohl Decarboxylase- als auch Carboligase-Aktivität nachgewiesen werden. Bei der Carboligation wird, wie bei der BfdA, aus Acetaldehyd und Benzaldehyd das (*S*)-2-HPP gebildet. Jedoch ist die Stereoselektivität der BfdC (*ee* 80 %) bei gleicher Substratkonzentration niedriger als bei der BfdA (*ee* 89 %; Iding *et al.*, 2000). Ein Unterschied besteht bei der gemischten Carboligation von Acetaldehyd und substituierten Benzaldehyd. So setzt die in dieser Arbeit identifizierte BfdC die Ligation von Acetaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd wesentlich besser um als BfdA. Die BfdC könnte somit das Produktspektrum an 2-Hydroxyketonen, welches bislang durch die ThDP-abhängigen Enzyme PDC, BAL und BfdA gebildet wird (Pohl *et al.*, 2002), erweitern und Synthons für die organische Chemie zur Verfügung stellen. Das Selektionssystem konnte erfolgreich zur Identifizierung von neuen BFDs angewendet werden. Zudem ist auch eine Anwendung zur Identifizierung anderer relevanter Enzym-Klassen denkbar, durch die ein großes Spektrum an interessanten Vorstufen für die chemische Industrie erschlossen werden kann.

6. Summary

Chiral 2-hydroxy ketones are versatile building blocks for a variety of different fine chemicals in organic synthesis (Dünelmann *et al.*, 2004). To date, only the thiamine-diphosphate dependent benzoylformate decarboxylase (BFD) from *Pseudomonas putida* ATCC12633 is capable of (*S*)-selective catalysis of 2-hydroxy ketones by carboligation (Pohl *et al.*, 2002; 2004). However, the BFD shows a narrow substrate specificity towards acceptor- and donor-aldehyde (Dünnwald *et al.*, 2000; Iding *et al.*, 2000).

In the present work, a growth-dependent selection system for the identification of new BFDs in genome- and metagenome-libraries was constructed and established. The metagenome approach holds an enormous potential of unknown genetic information and new enzymes for industrial applications (Lorenz & Eck, 2005). Using this novel system, screening of DNA libraries for BFD activity is highly efficient, now.

This efficiency could be demonstrated by the identification of three novel BFDs (BfdB, BfdC and BfdM). BfdB and BfdC originating from a chromosomal library of *P. putida* ATCC12633 and BfdM from an environmental DNA library. BfdC was successfully expressed in *E. coli* and purified. In spite of moderate homology (63 %), BfdC exhibits similar catalytic features as the well-known BfdA (MdlC) from *P. putida* ATCC12633. It was possible to proof decarboxylase and carboligase activities of BfdC. During carboligation reaction BfdC forms (*S*)-2-hydroxypropiophenone ((*S*)-2-HPP) from acetaldehyde and benzaldehyde, similar to BfdA. However, BfdC shows lower stereo-selectivity (*ee* 80 %) than BfdA (*ee* 89 %; Iding *et al.*, 2000) at same substrate concentrations. In addition, both enzymes differ in efficiency of the mixed carboligation of acetaldehyde and substituted benzaldehyde and with respect to their product spectrum. BfdC, which was discovered in this work, catalyzes the ligation of acetaldehyde and 3,5-dimethoxybenzaldehyde more efficiently than BfdA. Thus, BfdC could extend the product spectrum of 2-hydroxy ketones, which are provided so far by the thiamine diphosphate dependent enzymes PDC, BAL and BfdA (Pohl *et al.*, 2002) and yield interesting synthons for organic chemistry.

The developed screening system was successfully used for the identification of novel BFDs. Furthermore, the identification of other relevant enzyme-classes is possible. Thus, a large spectrum of interesting precursors for chemical industry can be provided.

7. Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Amann, R.L., Ludwig, W., & Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D., & Jordan, F. (1996) Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **256**: 590-600.
- Baker, K., Bleczinski, C., Lin, H., Salazar-Jimenez, G., Sengupta, D., Krane, S., & Cornish, V.W. (2002) Chemical complementation: a reaction-independent genetic assay for enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16537-16542.
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**: 1399-1408.
- Barrowman, M.M., & Fewson, C.A. (1885) Phenylglyoxylate decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr Microbiol* **12**: 235-240.
- Barrowman, M.M., Harnett, W., Scott, A.J., Fewson, C.A., & Kusel, J.R. (1986) Immunological comparison of microbial TPP-dependent non-oxidative alpha-keto acid decarboxylases. *FEMS Microbiol Lett* **34**: 57-60.
- Bell, P.J., Sunna, A., Gibbs, M.D., Curach, N.C., Nevalainen, H., & Bergquist, P.L. (2002) Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology* **148**: 2283-2291.
- Ben-Zvi, A.P., & Goloubinoff, P. (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol* **135**: 84-93.
- Berry, A.E., Chiochini, C., Selby, T., Sosio, M., & Wellington, E.M. (2003) Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 15-20.
- Berzelius, J.J. (1836) Considerations respecting a new power which acts in the formation of organic bodies. *Edinburgh New Philosophical Journal* **21**: 223-228.
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H., & Schmid, R.D. (2003) Directed evolution of a bacterial alpha-amylase: toward enhanced pH-performance and higher specific activity. *Protein Sci* **12**: 2141-2149.
- Birnboim, H.C., & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Boesten, W.H.J., Moody, H.M., & Roos, E.C. (1996) Process for recovery of ampicillin from enzymatic acylation of 6-aminopenicillanic acid. Chemform: WO9630376
- Bornscheuer, U.T., & Kazlauskas, R.J. (2004) Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**: 6032-6040.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Breuer, M., Pohl, M., Hauer, B., & Lingn, B. (2002) High-throughput assay of (R)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase. *Anal Bioanal Chem* **374**: 1069-1073.
- Breves, R., Maurer, K.H., Eck, J., Lorenz, P., & Zinke, H. (2003) New Glycosyl Hydrolases. PCT Patent application: WO03/054177
- Buchner, E. (1897) Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber Dtsch Chem Ges* **30**: 117-124.
- Carboni-Oerlemans, C., Dominguez de Maria, P., Tuin, B., Bargeman, G., van der Meer, A., & van Gemert, R. (2006) Hydrolase-catalysed synthesis of peroxycarboxylic acids: Biocatalytic promiscuity for practical applications. *J Biotechnol* **126**: 140-151.
- Cho, C.M., Mulchandani, A., & Chen, W. (2004) Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4681-4685.

- Cottrell, M.T., Moore, J.A., & Kirchman, D.L. (1999)** Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2553-2557.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P., & Simonet, P. (2001)** Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol* **3**: 431-439.
- Cowan, D.A. (2000)** Microbial genomes--the untapped resource. *Trends Biotechnol* **18**: 14-16.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K.N. (1990)** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
- de Lorenzo, V., & Timmis, K.N. (1994)** Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. In *Methods in Enzymology*. Clark, V.L., and Bavoil, P.M. (eds). Orlando: Academic Press: 386-405.
- Demir, A.S., Dünnwald, T., Iding, H., Pohl, M., & Müller, M. (1999)** Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase. *Tetrahedron: Asymmetry* **10**: 4769-4774.
- Demir, A.S., Sesenoglu, Ö., Eren, E., Hosrik, B., Pohl, M., Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., Dünkemann, P., & Müller, M. (2002)** Enantioselective synthesis of α -hydroxy ketones via benzaldehyde lyase catalyzed C-C bond formation. *Adv Synth Catal* **344**: 96-103.
- Deng, C., & Chen, R.R. (2004)** A pH-sensitive assay for galactosyltransferase. *Anal Biochem* **330**: 219-226.
- DeSantis, G., Zhu, Z., Greenberg, W.A., Wong, K., Chaplin, J., Hanson, S.R., Farwell, B., Nicholson, L.W., Rand, C.L., Weiner, D.P., Robertson, D.E., & Burk, M.J. (2002)** An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J Am Chem Soc* **124**: 9024-9025.
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., & Bukau, B. (1999)** Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**: 693-696.
- Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G., & Lu, G.G. (1998)** High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* – Implication for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J Biol Chem* **273**: 20196-20204.
- Drauz, K.H., Eils, S., & Schwarm, M. (2002)** Synthesis and production of enantiomerically pure amino acids. *Chimica Oggi* **20**: 15-21.
- Drepper, T., Gross, S., Yakunin, A.F., Hallenbeck, P.C., Masepohl, B., & Klipp, W. (2003)** Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **149**: 2203-2212.
- Duggleby, R.G., Pang, S.S., Yu, H., & Guddat, L.W. (2003)** Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *Eur J Biochem* **270**: 2895-2904.
- Dumont, M.G., & Murrell, J.C. (2005)** Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol* **3**: 499-504.
- Dünkemann, P., Pohl, M., & Müller, M. (2004)** Enantiomerically pure 2-hydroxy carbonyl compounds through enzymatic C-C bond formation. *Chemistry today*: 24-28.
- Dünnwald, T., Demir, A.S., Siegert, P., Pohl, M., & Müller, M. (2000)** Enantioselective synthesis of (S)-2-hydroxypropanone derivatives by benzoylformate decarboxylase catalyzed C-C bond formation. *Eur J Org Chem*: 2161-2170.
- Faber, K., & Kroutil, W. (2005)** New enzymes for biotransformations. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 181-187.
- Fang, Q.K., Han, Z.Y., Grover, P., Kessler, D., Senanayake, C.H., & Wald, S.A. (2000)** Rapid access to enantiopure bupropion and its major metabolite by stereospecific nucleophilic substitution on α -ketotriflate. *Tetrahedron* **11**: 3659-3663.
- Fechter, M.H., & Griengl, H. (2004)** Hydroxynitrile lyases: biological sources and application as biocatalysts. *Food Technol Biotechnol* **42**: 287-294.
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H., & Zinke, H. (2004)** Der Einfluß der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Ing Tech* **76**: 307-312.
- Fewson, C.A. (1988)** Microbial metabolism of mandelate: a microcosm of diversity. *FEMS Microbiol Rev* **4**: 85-110.

- Figurski, D.H., & Helinski, D.R. (1979)** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 1648-1652.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., & Janssen, D.B. (2003)** Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**: 153-163.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., & Janssen, D.B. (2004)** Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol* **6**: 948-958.
- Gala, D., DiBenedetto, D.J., Clark, J.E., Murphy, B.L., Schumacher, D.P., & Steinman, M. (1996)** Preparations of Antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative Chromatographic Resolution, and Total Asymmetric Synthesis via Enzymatic Preparation of Chiral α -Hydroxy Arylketones. *Tetrahedron Letters* **37**: 611-614.
- Gamper, M., Ganter, B., Polito, M.R., & Haas, D. (1992)** RNA processing modulates the expression of the arcDABC operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **226**: 943-957.
- Gay-Lussac, J.L. (1810)** Extrait d'une memoire sur la fermentation. *Ann Chim* **76**: 245-259.
- Goddard, J.P., & Reymond, J.L. (2004)** Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 314-322.
- Gonzalez, B., & Vicuna, R. (1989)** Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PPI-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *J Bacteriol* **171**: 2401-2405.
- Guo, F., Zhang, D., Kahyaoglu, A., Farid, R.S., & Jordan, F. (1998)** Is a hydrophobic amino acid required to maintain the reactive V conformation of thiamin at the active center of thiamin diphosphate-requiring enzymes? Experimental and computational studies of isoleucine 415 of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **37**: 13379-13391.
- Gupta, R., Beg, Q.K., & Lorenz, P. (2002)** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 15-32.
- Hall, T.A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hancock, S.M., Vaughan, M.D., & Withers, S.G. (2006)** Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 509-519.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., & Goodman, R.M. (1998)** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**: R245-249.
- Harris, J.K., Kelley, S.T., & Pace, N.R. (2004)** New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* **70**: 845-849.
- Hasson, M.S., Muscate, A., McLeish, M.J., Polovnikova, L.S., Gerlt, J.A., Kenyon, G.L., Petsko, G.A., & Ringe, D. (1998)** The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 Å resolution: diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry* **37**: 9918-9930.
- Hawkins, C.F., Borges, A., & Perham, R.N. (1989)** A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett* **255**: 77-82.
- Hegeman, G.D. (1966a)** Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type. *J Bacteriol* **91**: 1140-1154.
- Hegeman, G.D. (1966b)** Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. II. Isolation and properties of blocked mutants. *J Bacteriol* **91**: 1155-1160.
- Hegeman, G.D., Rosenberg, E.Y., & Kenyon, G.L. (1970)** Mandelic acid racemase from *Pseudomonas putida*. Purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* **9**: 4029-4036.
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., & Gottschalk, G. (1999)** Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3901-3907.
- Henne, A., Schmitz, R.A., Bomeke, M., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2000)** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3113-3116.

- Henning, H., Leggewie, C., Pohl, M., Müller, M., Eggert, T., & Jaeger, K.-E. (2006) Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7510-7517.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., & Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.
- Hildebrandt, G., & Klavehn, W. (1930) Verfahren zur Herstellung von 1-L-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol. *Knoll AG Chemische Fabriken in Ludwigshafen* Ger. Patent DE 548459
- Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S.T., & Nelson, E.B. (2000) Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol* **15**: 25-36.
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V., & Morgan, A.F. (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**: 73-102.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., & Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**: 4765-4774.
- Iding, H. (1998) Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der Benzoylformiat-decarboxylase aus *Pseudomonas putida*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Iding, H., Dunnwald, T., Greiner, L., Liese, A., Müller, M., Siegert, P., Grotzinger, J., Demir, A.S., & Pohl, M. (2000) Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *Chemistry* **6**: 1483-1495.
- Jaeger, K.-E., & Eggert, T. (2004) Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 305-313.
- Janzen, E. (2002) Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*. Biochemische Charakterisierung und die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Jensen, K.A., Evans, K.M., Kirk, T.K., & Hammel, K.E. (1994) Biosynthetic Pathway for Veratryl Alcohol in the Ligninolytic Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 709-714.
- Jeon, C.O., Park, W., Ghiorse, W.C., & Madsen, E.L. (2004) *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 93-97.
- Jimenez, J.I., Minambres, B., Garcia, J.L., & Diaz, E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 824-841.
- Jordan, F. (2003) Current mechanistic understanding of thiamine diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Nat Prod Rep* **20**: 184-201
- Jordan, F., Nemeria, N.S., Zhang, S., Yan, Y., Arjunan, P., & Furey, W. (2003) Dual catalytic apparatus of the thiamin diphosphate coenzyme: acid-base via the 1',4'-iminopyrimidine tautomer along with its electrophilic role. *J Am Chem Soc* **125**: 12732-12738.
- Takeya, H., Morishita, M., Koshino, H., Morita, T., Kobayashi, K., & Osada, H. (1999) Cytoxazone: A Novel Cytokine Modulator Containing a 2-Oxazolidinone Ring Produced by *Streptomyces* sp. *J Org Chem* **64**: 1052-1053.
- Kaplan, D.L., Dordick, J.S., Gross, R.A., & Swift, G. (1998) Enzymes in polymer science: an introduction. *Am Chem Soc Symp Ser* **684**: 2-16.
- Kihumbu, D., Stillger, T., Hummel, W., & Liese, A. (2002) Enzymatic Synthesis of all Stereoisomers of 1- Phenylpropane-1,2-diol. *Tetrahedron: Asymmetry* **13**: 1069-1072.
- Kitazaki, T., Tasaka, A., Tamura, N., Matsushita, Y., Hosono, H., Hayashi, R., Okonogi, K., & Itoh, K. (1999) Optically active antifungal azoles. VIII. Synthesis and antifungal activity of 1-[(1R,2R)-2-(2,4-difluoro- and 2-fluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]- 3-(4-substituted phenyl)-2(1H,3H)-imidazolones and 2-imidazolidinones. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **47**: 351-359.
- Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A., & Daniel, R. (2003a) Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 46-56.
- Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A., & Daniel, R. (2003b) Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1408-1416.

- Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2003c)** Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3048-3060.
- Konig, S., Svergun, D.I., Volkov, V.V., Feigin, L.A., & Koch, M.H. (1998)** Small-angle X-ray solution-scattering studies on ligand-induced subunit interactions of the thiamine diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Biochemistry* **37**: 5329-5334.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M., 2nd, & Peterson, K.M. (1994)** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, & Peterson, K.M. (1995)** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krause, L., Diaz, N.N., Bartels, D., Edwards, R.A., Puhler, A., Rohwer, F., Meyer, F., & Stoye, J. (2006)** Finding novel genes in bacterial communities isolated from the environment. *Bioinformatics* **22**: e281-289.
- Kreuz, A. (2006)** Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren aus *Pseudomonas aeruginosa*: Neue Strategien zur Optimierung mikrobieller Expressionssysteme. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Krsek, M., & Wellington, E.M. (1999)** Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Methods* **39**: 1-16.
- Kühne, W.F. (1878)** Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. *Untersuchungen an dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg* **1**: 291-326.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., & Rupp, S. (2007)** Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J Biotechnol* **127**: 575-592.
- Langer, M., Gabor, E.M., Liebeton, K., Meurer, G., Niehaus, F., Schulze, R., Eck, J., & Lorenz, P. (2006)** Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol J* **1**: 815-821.
- Lapadatescu, C., Ginies, C., Le Quere, J.L., & Bonnarme, P. (2000)** Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1517-1522.
- Leggewie, C., Henning, H., Schmeisser, C., Streit, W.R., & Jaeger, K.-E. (2006)** A novel transposon for functional expression of DNA libraries. *J Biotechnol* **123**: 281-287.
- Leuenberger, H.G., Matzinger, B., & Wirz, B. (1999)** Synthesis and metabolism of drugs by means of enzyme catalysed reactions. *Chimia* **53**: 536-540.
- Li, Y., Wexler, M., Richardson, D.J., Bond, P.L., & Johnston, A.W. (2005)** Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned trp genes. *Environ Microbiol* **7**: 1927-1936.
- Lingen, B., Kolter-Jung, D., Dünkelmann, P., Feldmann, R., Grötzinger, J., Pohl, M. & Müller, M. (2003)** Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase by directed evolution. *ChemBioChem* **4**: 721-726
- Liu, Z., Sun, Z., & Leng, Y. (2006)** Directed evolution and characterization of a novel D-pantono-hydroxylase from *Fusarium moniliforme*. *J Agric Food Chem* **54**: 5823-5830.
- Lorenz, P., & Eck, J. (2005)** Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* **3**: 510-516.
- Majernik, A., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2001)** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁽⁺⁾(Li⁽⁺⁾)/H⁽⁺⁾ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J Bacteriol* **183**: 6645-6653.
- Marchesi, J.R., & Weightman, A.J. (2003)** Diversity of alpha-halocarboxylic acid dehalogenases in bacteria isolated from a pristine soil after enrichment and selection on the herbicide 2,2-dichloropropionic acid (Dalapon). *Environ Microbiol* **5**: 48-54.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P.,**

- Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., & Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-380.
- Markowitz, V.M., Korzeniewski, F., Palaniappan, K., Szeto, E., Werner, G., Padki, A., Zhao, X., Dubchak, I., Hugenholtz, P., Anderson, I., Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., & Kyrpides, N.C. (2006) The integrated microbial genomes (IMG) system. *Nucleic Acids Res* **34**: D344-348.
- McLeish, M.J., Polovnikova, E.S., Kenyon, G.L., Bera, A.K., Anderson, N.L., & Hasson, M.S. (2004) Benzoylformate decarboxylase: lessons in enzymologie. In *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. Jordan, F., and Patel, M.S. (eds). New York: Marcel Dekker, Inc.: 131-141.
- Mermod, N., Ramos, J.L., Lehrbach, P.R., & Timmis, K.N. (1986) Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **167**: 447-454.
- Mohn, W.W., Garmendia, J., Galvao, T.C., & de Lorenzo, V. (2006) Surveying biotransformations with a la carte genetic traps: translating dehydrochlorination of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) into lacZ-based phenotypes. *Environ Microbiol* **8**: 546-555.
- Morazzoni, P., & Bombardelli, E. (1995) *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* **66**: 3-42.
- Mosbacher, T.G., Müller, M., & Schulz, G.E. (2005) Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *Febs J* **272**: 6067-6076.
- Müller, Y.A., & Schulz, G.E. (1993) Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259**: 965-967.
- Müller, R.H., & Babel, W. (2004) *Delftia acidovorans* MC1 resists high herbicide concentrations - a study of nutrient growth on (RS)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)-propionate and 2,4-dichlorophenoxy-acetate. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 622-630.
- Nagasawa, T., & Yamada, H. (1990) Application of nitrile converting enzymes for the production of useful compounds. *Pure Appl. Chem.* **62**: 1441-1444.
- Nelson, K.E., Weinell, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhoft, A., Tumbler, B., & Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C., & Minshull, J. (2002) Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat Biotechnol* **20**: 1251-1255.
- Neuberg, C., & Hirsch, J. (1921) Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carbolygase). *Biochem Z* **115**: 282-310.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., & Yura, T. (2000) Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 884-889.
- Noguchi, H., Park, J., & Takagi, T. (2006) MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. *Nucleic Acids Res* **34**: 5623-5630.
- Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., & Tsuda, M. (2007) Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 501-510.
- Palleroni, N.J. (1984) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.J., and Holt, J.G. (eds). Baltimore: William & Wilkins: 141-199.
- Panke, S., Held, M., & Wubbolts, M. (2004) Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 272-279.

- Pasteur, L. (1858)** Memoire sur la fermentation de l'acide tartarique. *C R Acad Sci (Paris)* **46**: 615-618.
- Patel, R.N. (2006)** Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for drugs. *Curr Opin Drug Discov Devel* **9**: 741-764.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., & Ferrin, T.E. (2004)** UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **25**: 1605-1612.
- Pohl, M., Lingen, B., & Müller, M. (2002)** Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C-C bond formation. *Chemistry* **8**: 5288-5295.
- Pohl, M., Sprenger, G.A., & Müller, M. (2004)** A new perspective on thiamine catalysis. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 335-342.
- Pokora, A.R., & Cyrus, W.L. (1987)** Phenolic developer resins. US patent: US 4,647,952
- Pollard, D.J., & Woodley, J.M. (2007)** Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol* **25**: 66-73.
- Polovnikova, E.S., McLeish, M.J., Sergienko, E.A., Burgner, J.T., Anderson, N.L., Bera, A.K., Jordan, F., Kenyon, G.L., & Hasson, M.S. (2003)** Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoyl-formate decarboxylase. *Biochemistry* **42**: 1820-1830.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975)** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Rappe, M.S., & Giovannoni, S.J. (2003)** The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**: 369-394.
- Rees, H.C., Grant, S., Jones, B., Grant, W.D., & Heaphy, S. (2003)** Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles* **7**: 415-421.
- Reetz, M.T. (2006)** Directed evolution of enantioselective enzymes as catalysts for organic synthesis. *Adv Catal* **49**: 1-69.
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D.U., Strompl, C., Moore, E.R., & Timmis, K.N. (2002)** Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 912-915.
- Richardson, T.H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J.M., Robertson, D.E., & Miller, C. (2002)** A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem* **277**: 26501-26507.
- Robertson, D.E., & Steer, B.A. (2004)** Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 141-149.
- Robertson, D.E., Chaplin, J.A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D.P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L.A., Tan, X., Snead, M.A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P.L., Burk, M.J., & Short, J.M. (2004)** Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2429-2436.
- Rondon, M.R., Goodman, R.M., & Handelsman, J. (1999)** The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol* **17**: 403-409.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., & Goodman, R.M. (2000)** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2541-2547.
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., & Harry, M. (2001)** Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl Soil Ecol* **18**: 47-60.
- Rosenau, F., & Jaeger, K.-E. (2004)** Overexpression and secretion of *Pseudomonas* lipases. In *Pseudomonas*, Vol. 3. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers: 491-508.
- Rossello-Mora, R., & Amann, R. (2001)** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39-67.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H.A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Schenk, G., Duggleby, R.G., & Nixon, P.F. (1998)** Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* **30**: 1297-1318.
- Schepens, H., Erickson, B., Mahnke, H., Vink, E., van Lelyveld, P., Hudson, I., Huttner, J., Staer, K., Jenseit, W., Riese, J., Wolf, O., Patel, M., & Gillespie, I. (2003)** White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future. EuropaBio, Brussels:
http://www.mckinsey.com/client-service/chemicals/pdf/BioVision_Booklet_final.pdf
- Schleheck, D., Knepper, T.P., Fischer, K., & Cook, A.M. (2004)** Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4053-4063.
- Schlieker, C., Bukau, B., & Mogk, A. (2002)** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* **96**: 13-21.
- Schloss, P.D., & Handelsman, J. (2004)** Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 686-691.
- Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.-E., & Streit, W.R. (2003)** Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7298-7309.
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J.B., & Buhler, B. (2002)** The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 359-366.
- Schmidt, T.M., DeLong, E.F., & Pace, N.R. (1991)** Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* **173**: 4371-4378.
- Schoerken, U., & Sprenger, G.A. (1998)** Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim Biophys Acta* **1385**: 229-243.
- Schulze, B., Broxterman, R., Shoemaker, H., & Boesten, W.H.J. (1998)** Review of biocatalysis in the production of chiral fine chemicals. *spec Chem* **18**: 244-246.
- Schütz, A., Golbik, R., Tittmann, K., Svergun, D.I., Koch, M.H., Hübner, G., & König, S. (2003)** Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic pathway. *Eur J Biochem* **270**: 2322-2331.
- Schwede T., Kopp J., Guex N., & Peitsch M.C. (2003)** SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nuc Acids Res* **31**: 3381-3385.
- Sebat, J.L., Colwell, F.S., & Crawford, R.L. (2003)** Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4927-4934.
- Shin, W., Pletcher, J., Blank, G., & Sax, M. (1977)** Ring stacking interactions between thiamin and planar molecules as seen in the crystal structure of a thiamin picolonate dihydrate complex. *J Am Chem Soc* **99**: 3491-3499.
- Siegert, P., McLeish, M.J., Baumann, M., Iding, H., Kneen, M.M., Kenyon, G.L., & Pohl, M. (2005)** Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Protein Eng Des Sel* **18**: 345-357.
- Simon, R., Prier, U., & Pühler, A. (1983)** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., & Puhler, A. (1986)** Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**: 640-659.
- Soetaert, W., & Vandamme, E. (2006)** The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol J* **1**: 756-769.
- Sorensen, H.P., & Mortensen, K.K. (2005)** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **4**: 1.
- Spinrath, A. (2006)** Gerichtete Evolution von Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen mit Hilfe von DNA-Shuffling. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Sriprapundh, D., Vieille, C., & Zeikus, J.G. (2003)** Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng* **16**: 683-690.
- Stackebrandt, E., Liesack, W., & Goebel, B.M. (1993)** Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J* **7**: 232-236.
- Staley, J.T., & Konopka, A. (1985)** Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic

microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321-346.

Stanier, R.Y., & Ornston, L.N. (1973) The beta-ketoadipate pathway. *Adv Microb Physiol* **9**: 89-151.

Stein, J.L., Marsh, T.L., Wu, K.Y., Shizuya, H., & DeLong, E.F. (1996) Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J Bacteriol* **178**: 591-599.

Stephens, D.E., Rumbold, K., Permaul, K., Prior, B.A., & Singh, S. (2007) Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. *J Biotechnol* **127**: 348-354.

Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A., & Lewis, K. (2000) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1433-1437.

Stillger, T. (2004) Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn

Streit, W.R., & Schmitz, R.A. (2004) Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* **7**: 492-498.

Studier, F.W., & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.

Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**: 37-44.

Terao, Y., Miyamoto, K., & Ohta, H. (2006) Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 647-653.

Timmis, K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* **4**: 779-781.

Tittmann, K., Golbik, R., Ghisla, S., & Hubner, G. (2000) Mechanism of elementary catalytic steps of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry* **39**: 10747-10754.

Torsvik, V., & Goksoyr, J. (1978) Determination of bacterial DNA in soil. *Soil Biol Biochem* **10**: 7-12.

Torsvik, V., Ovreas, L., & Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**: 1064-1066.

Trevors, J.T., & van Elsas, J.D. (1995) Nucleic Acids in the environment: Methods and Applications. Berlin, Heidelberg, New York: Springer

Tsai, Y.L., & Olson, B.H. (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2292-2295.

Tsou, A.Y., Ransom, S.C., Gerlt, J.A., Buechter, D.D., Babbitt, P.C., & Kenyon, G.L. (1990) Mandelate pathway of *Pseudomonas putida*: sequence relationships involving mandelate racemase, (S)-mandelate dehydrogenase, and benzoylformate decarboxylase and expression of benzoylformate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**: 9856-9862.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., & Banfield, J.F. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**: 37-43.

Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., & Watanabe, K. (2005) Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol* **23**: 88-93.

Ulber, R., & Soyecz, K. (2004) 5000 Jahre Biotechnologie. *Chem Unserer Zeit* **38**: 172-180.

van Sint Fiet, S., van Beilen, J.B., & Witholt, B. (2006) Selection of biocatalysts for chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1693-1698.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Neelson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., & Smith, H.O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.

Verseck, S., Liebeton, K., & Eck, J. (2005) Nitrile Hydratases from metagenome libraries. PCT Patent application: WO2005/090595

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.-E., & Streit, W.R. (2003) Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6235-6242.

Wackett, L.P. (2004) Novel biocatalysis by database mining. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 280-284.

Ward, B.B. (2002) How many species of prokaryotes are there? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10234-10236.

Weiss, P.M., Garcia, G.A., Kenyon, G.L., Cleland, W.W., & Cook, P.F. (1988) Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using ¹³C and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry* **27**: 2197-2205.

Wendorff, M. (2006) Neue Benzoylformiat-decarboxylasen für die Biokatalyse. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Wexler, M., Bond, P.L., Richardson, D.J., & Johnston, A.W. (2005) A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ Microbiol* **7**: 1917-1926.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., & Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6578-6583.

Wilcocks, R., Ward, O.P., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y., & Prosen, E. (1992) Acyloin formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1699-1704.

Wong, T.S., Arnold, F.H., & Schwanberg, U. (2004) Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng* **85**: 351-358.

Zhou, J., Bruns, M.A., & Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316-322.

8. Anhang

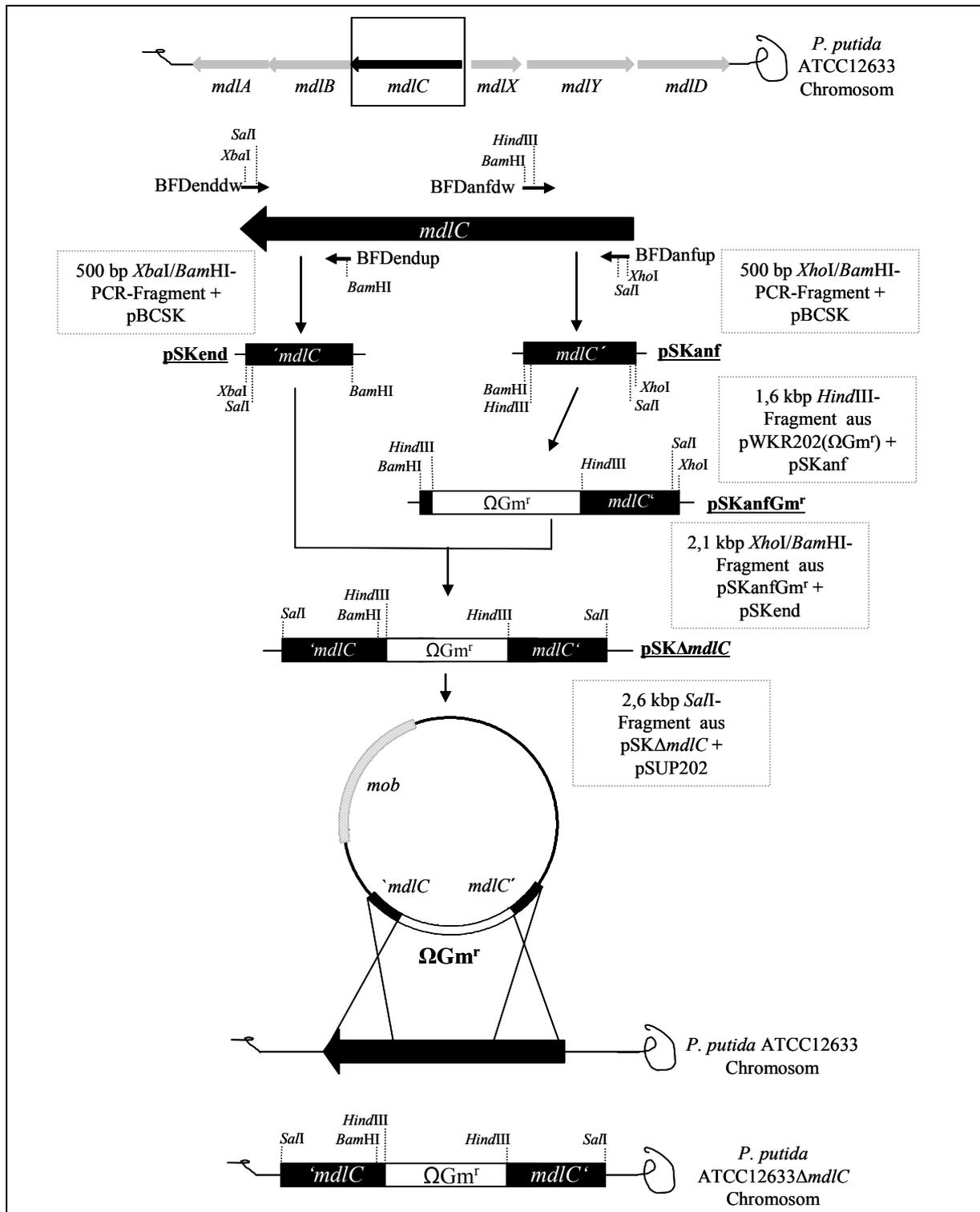


Abb. 37: Konstruktion des BFD-defizienten Stamm *Pseudomonas putida* Δ *mdlC*. Zunächst wurden 500 bp Fragmente vom Anfang (*mdlC'*) und Ende (*'mdlC*) des *mdlC*-Gens amplifiziert und über die jeweils inserierten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBCSK kloniert. Die aus dem Plasmid pWKR202 isolierte Ω Gm^r-Kassette wurde über die *Hind*III-Schnittstellen in das *mdlC*-Anfangs-Fragment in das Plasmid pSKanf kloniert. Durch die Hydrolyse dieses Konstruktes mit den Enzymen *Xho*I und *Bam*HI und anschließender Klonierung über diese Erkennungssequenzen in das Plasmid pSKend entstand das zur Deletion des *mdlC*-Gens geeignete Fragment. Dieses wurde über *Sal*I-Schnittstellen in den Suizidvektor pSUP202 eingefügt. Die Erzeugung der Mutante *P. putida* Δ *mdlC* erfolgte über homologe Rekombination.

DNA-Sequenz: *bfdB* (Accession No. AM284966)

```

1 atgaaaactg ttcacggcgc cacttacgac attcttcgcc agcatggcct gaccaccatc
61 ttcggcaacc ccggctccaa cgagctgccg tttctcaagg gcttcccgga ggatttccgc
121 tacatcctcg gcctgcacga aggcgccgtg gtcggcatgg ccgatggcta cgcactggcc
181 agcggccagc ccaccttcgt caacctgcac gcggctgccg gtaccggcaa tggatggggc
241 gccctcacca atgcctggta ctgcacagc ccgctgggta ttaccgccgg ccagcaggtg
301 cgctcgatga tcgggggtgga agcgatgctg gccaatgtcg atgccgcaca gctgcccagg
361 ccaactggtca agtggagcca cgagcccgtc accgcgcagg acgtgcccgc gccctgagc
421 caggcgatcc acaccgcaa cttgccacca cgcgggccgg tgtacgtgtc gatcccctat
481 gacgactggg cgtgcgaagc gccaaagcgg gtcgagcacc tggcacggcg ccaggtgagc
541 agtgccgggc tgccgtcgcc tgcgcagctg cagcacctgt gcgaacgcct ggcagcggcg
601 cgcaaccggg tgctggtgct gggcccggat gtcgatggca gcgccgcaa tggcctggct
661 gtgcagttgg ccgagaagct gcgcatgccg gcctgggtcg cgccttcggc gtcgcgctgc
721 ccgttcccca ctccggatgc gtgcttccgc ggggttttgc cggcagccat tgccggcatc
781 agccacaatt tggccgggca cgacctgatc cttgtgggtg gggctccggg gttccgctac
841 caccagttcg ccccaggcaa ctacctgccg gccggctgcg agctgctgca cctgacctgt
901 gaccggggcg aagcggcgcg cgcgccatg ggcgacgccc tggtcggcga cattgcgctt
961 accctcgagg ccgtgctgga cggcgtgccg cagagcgtgc ggcagatgcc caccgctttg
1021 cctgctgctg aaccggtgge ggatgacggg ggcctggtgc gccctgaaac agtgttcgac
1081 ctgctcaacg ccctggcgcc caaggacgcc atctacgtca aggagtccac ctctaccgtg
1141 ggtgcgttct ggcgcgcgct ggaaatgcgt gagccgggca gttatttctt ccccgcagcc
1201 ggtggcctgg gttttggcct gccagcagcc gtaggcgtgc agctggcatc gcctggccgg
1261 caggtgatcg gcgtgatcgg cgacggctcg gccactatg gcataccgc gttgtggacc
1321 gccgcgaat acaacatccc ggtggtgttc atcatctca agaacggca ctacggcgca
1381 ttgcgctggt tcgccgatgt gctcgacgtc aacgatgcgc ccgggctgga cgtgctggc
1441 ctggacttct gcgccatcgc ccgtggctat ggcgtgcagg cggtgcatgc ggccactggc
1501 agcgccttcg cccaggcctt gcgtgaagcg ctggagagcg accggccagt gctgatctgc
1561 gcggcgagca gccgctga

```

Aminosäuresequenz: *BfdB* (Accession No. CAK95976)

```

1 mktvhgatyd ilrqhgltti fgnpgsnelp flkgfpedfr yilglhegav vgmadgyala
61 sqqptfvnlh aaagtgnmgm altnawyshs plvitagqqv rsmigveaml anvdaaqlpk
121 plvkwshepa taqdvprals qaihtanlpp rgpvvvsipy ddwaceapsv vhlarrqvs
181 saglpspaql qhlcerlaaa rnpvlvlgpd vdgsaangla vqlaeklrmp awvapsasrc
241 pfptrhacfr gvlpaaiaqi shnlaghdli lvvgapvfry hqfapgnylp agcellhltc
301 dpgeaarapm gdalvgdial tleavldgvp qsvrqmptal paaepvaddg gllrpetvfd
361 llnalapkda iyvkeststv gafwrrvemr epgsyffpaa gglgfglpaa vgvqlaspgr
421 qvigvigdgs anygitalwt aaqynipvvf iilkngtyga lrwfadvldv ndapgladvpg
481 ldfcairygy gvqavhaatg safaqalrea lesdrpvlic aassr

```

DNA-Sequenz: *bfdC* (Accession No. AM284967)

```

1 atgaaaactg ttcacggcgc cacttacgac attcttcgcc agcatggcct gaccaccatc
61 ttcggcaacc ccggctccaa cgagctgccg tttctcaagg gcttcccgga ggatttccgc
121 tacatcctcg gcctgcacga aggcgccgtg gtcggcatgg ccgatggcta cgcactggcc
181 agcggccagc ccaccttcgt caacctgcac gcggctgccg gtaccggcaa tggatggggc
241 gccctcacca atgcctggta ctgcacagc ccgctgggta ttaccgccgg ccagcaggtg
301 cgctcgatga tcgggggtgga agcgatgctg gccaatgtcg atgccgcaca gctgcccagg
361 ccaactggtca agtggagcca cgagcccgtc accgcgcagg acgtgcccgc gccctgagc
421 caggcgatcc acaccgcaa cttgccacca cgcgggccgg tgtacgtgtc gatcccctat
481 gacgactggg cgtgcgaagc gccaaagcgg gtcgagcacc tggcacggcg ccaggtgagc
541 agtgccgggc tgccgtcgcc tgcgcagctg cagcacctgt gcgaacgcct ggcagcggcg
601 cgcaaccggg tgctggtgct gggcccggat gtcgatggca gcgccgcaa tggcctggct
661 gtgcagttgg ccgagaagct gcgcatgccg gcctgggtcg cgccttcggc gtcgcgctgc
721 ccgttcccca ctccggatgc gtgcttccgc ggggttttgc cggcagccat tgccggcatc
781 agccacaatt tggccgggca cgacctgatc cttgtgggtg gggctccggg gttccgctac
841 caccagttcg ccccaggcaa ctacctgccg gccggctgcg agctgctgca cctgacctgt
901 gaccggggcg aagcggcgcg cgcgccatg ggcgacgccc tggtcggcga cattgcgctt
961 accctcgagg ccgtgctgga cggcgtgccg cagagcgtgc ggcagatgcc caccgctttg

```

1021 cctgctgctg aaccggtggc ggatgacggt ggcctggtgc gccctgaaac agtgttcgac
 1081 ctgctcaacg ccctggcgcc caaggacgcc atctacgtca aggagtccac ctctaccgtg
 1141 ggtgcttctt ggcgcccgcg ggaaatgcgt gagccgggca gttatttctt ccccgcagcc
 1201 ggtggcctgg gttttggcct gccagcagcc gtaggcgtgc agctggcatc gcctggccgg
 1261 caggtgatcg gcgtgatcgg cgacggctcg gccaaactatg gcatcaccgc gttgtggacc
 1321 gccgcgcaat acaacatccc ggtggtggtc atcatcctca agaacggcac ctacggcgca
 1381 ttgctgctgt tcgcccgatgt gctcgacgtc aacgatgcgc ccgggctgga cgtgcctggc
 1441 ctggacttct gcgccatcgc ccgtggctat ggcgtgcagg cggtgcatgc ggccactggc
 1501 agcgcccttcg cccaggcctt gcgtgaagcg ctggagagcg accggccagt gctgatcga
 1561 gtgccgaccc agaccatcga gccctga

Proteinsequenz: BfdC (Accession No. CAK95977)

1 mktvhgatyd ilrqhgltti fgnpgsnelp flkgfpedfr yilglhegav vgmadgyala
 61 sgqptfvnlh aaagtgnmg altnawysht plvitagqqv rsmigveaml anvdaaqlpk
 121 plvkwshcpa taqdvprals qaihtanlpp rgpvvvsipy ddwaceapsg vehlarrqvs
 181 saglpspaql qhlcerlaaa rnpvvlvgpd vdgsaangla vqlaeklrmp awvapsasrc
 241 pfptrhacfr gvlpaaiagi shnlaghdli lvvgapvfry hqfapgnylp agcellhlhc
 301 dpgeaarapm gdalvgdial tleavldgvp qsvrqmptal paaepvaddg gllrpetvfd
 361 llnalapkda iyvkeststv gafwrrvemr epgsyffpaa gglgfglpaa vgvqlaspgr
 421 qvigvigdgs anygitalwt aaqynipvvf iilkngtyga lrwfadvldv ndapgladvp
 481 ldfcaiarqy gvqavhaatg safaaqalrea lesdrpvlie vptqtiep

DNA-Sequenz: *bfdM* (Accession No. AM284968)

1 atgcaagaga caacccccca gaatcccgtt tcggtcaccg tccgccatgc ggtgatagac
 61 ctgctgcgcc agctcggcat gacgcgcatt ttcggcaacc ccggtcgcac cgagctgccg
 121 ctgtttcgcg actaccccga ggatttttcc tatgtgctgg gcctgcagga ggccgtggtc
 181 gttggcatgg ccgacggcta cgcccaggcc acgcgcccgc cgagcttcgt gaacctgcat
 241 tcggccgcgg gcgtgggcca tgcgatggcc aacatcttca ccgcgttcaa gaaccgcacg
 301 ccgatggtga tcaccgcggg ccagcaggcg cgctcgatcc tgcagttcga tccgttctcg
 361 cactcgaacc aggcgcccga gctgcccagg ccctatgtca aatggagctg cgagccggcg
 421 cgcgcccgaag acgtgcccga ggcgctggcg ccgcctattt acatcgccat gcaggagccg
 481 cgcggcccgg tgctggtgtc gattcccgcc gatgattggg accaccggc cgagccatc
 541 caggtgcgtg aagtgcgctt cgaaagccgg cccgatccac gcgtgctcga catgatcgg
 601 gcggcgctcg acggcgcgcg cgcgcccggc ctggctgctg gcgcccggc ggaccgcggc
 661 gcggcctggg acgcggtcgt ggccctggcc gaacgccacc aggcgcccgt ctatgtcgcg
 721 cccatgtcgg ggcgctgcag ctttcccga gaccaccgc tgttcgcccg cttcctgccc
 781 gcgatgcgcg aacgcacgtt gcaattgctc ggcgaccacg acgtggtggt cgccgtggg
 841 gcggcgacgt tcacctacca tgtcgaaggc caggcccgc acattcccga gggctcggcg
 901 ttgtaccagc tgatcgagga cccggcgatc gccgcctggg cgcctcggg cacggcgacc
 961 atcggcaaca tccgcctggg cgtgcaggaa ctgctggcgc ggcccgcgcc ggcccgcgc
 1021 gcggcgcccg caaggcgcgt tgccgcgccg cgtgcccagc caccggaagc cggccagcgc
 1081 atgtcggtcg cctgggcgat gcagacgctg gctgaagtgc gcgaccggcg cagcatcatc
 1141 gtcgaggagg cgccgagttc gcgctcgacc atacaggccc acctgccgat cttccattcg
 1201 gccacgttct acaccatgtg cagcggcggc ctgggccaca gcatgcccgc gggcgtggg
 1261 gtggcgctgg ccgaaccggc gaagaaagtc attgcccgtg tcggcgacgg ctcgagcatg
 1321 tacgcgatcc aggcgctgtg ggcgcccggc cagctgcggc tgccgatcac cttcgtgatt
 1381 ctcaagaacc ggcgctacgc ggcgctgcag gaattcgcca aggtgttcgg ctaccgcgac
 1441 ggcgagaaag tcgaaggcac ggagctgccc gacatcgatt tcgtggccct gcccaaggcc
 1501 caggcgtcgc acggcgtgca tgtggaagac gcgctgcagt tgccgcccgt gctcgaggcg
 1561 gcgatcgcgt cgccgcccgc cgtgctcgtc gaagtcgaag tggcctga

Proteinsequenz: BfdM (Accession No. CAK95978)

1 mqettpqnpa sftvrhavid llrqlgmtri fgnpgstelp lfrdypedfs yvlglqeavv
 61 vgmadgyaqa ttrasfvnlh saagvghama niftafknrt pmvitagqqa rsilqfdpfl
 121 hsnqaaelpk pyvkwscpa raedvpqala rayyiamqep rgpvlvsipa ddwdhpaepi
 181 qvrevgefesr pdprvldmig aaldrarapa lvvgaavdrq aawdavvala erhqarvyva
 241 pmsgrcsfpe dhplfagflp amrerivqll gdhdvfvavg aatftyhveg qgphipegsa
 301 lyqliedpai aawapvgtat ignirlgvqe llarpapapr aaparrvaap raqppeagqr

361 msvawamqtl aevrdprsii veeapssrst iqahlpifhs atfytmcsgg lghsmpagvg
 421 valaepakkv iavigdgssm yaiqalwsaa qlrlpitfvi lknrryaalq efakvfgyrd
 481 gekvegtelp didfvglaka qgcdgvhved alqlravlea aiasprpvlv eveva

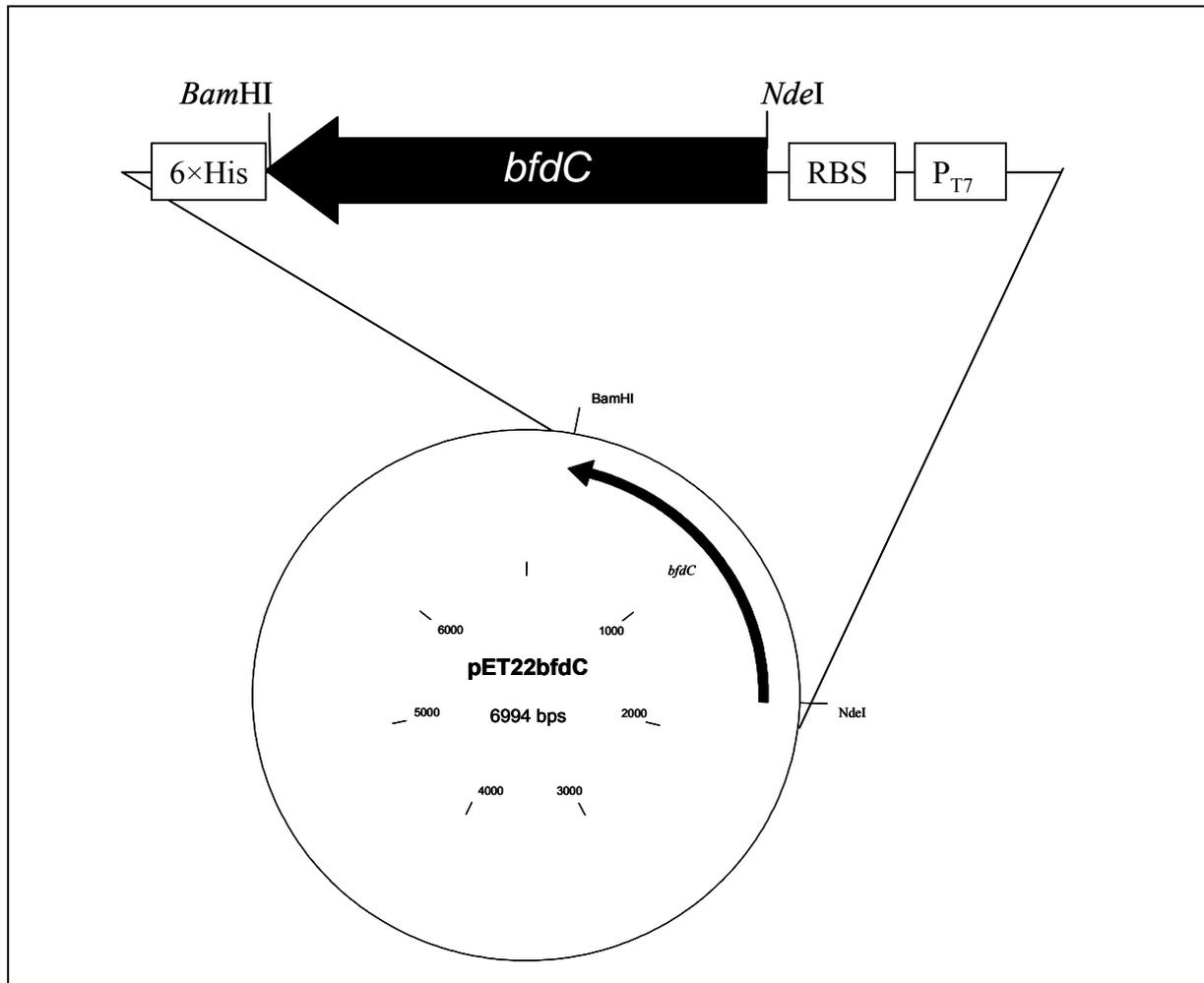


Abb. 38: Karte des rekombinanten Plasmid pET22bfdC. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7}: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindestelle; 6xHis: His-Tag kodierender Bereich

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf,