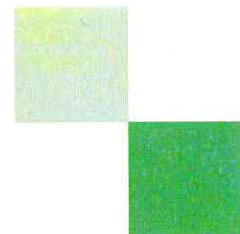




UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Dissertation 06/2005

**Enantioselektive Verwertung von Phenoxyalkanoat-
Herbiziden durch Bakterien – Eine Charakterisierung der
Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes**

Anne Westendorf

ISSN 1860-0387

**Enantioselektive Verwertung von Phenoxyalkanoat-
Herbiziden durch Bakterien – Eine Charakterisierung der
Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Diplom-Biochemikerin Anne Westendorf,

geboren am 21.05.1978 im Ostseebad Kühlungsborn

Dekan: Prof. Dr. Kurt Eger

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Babel

Prof. Dr. Jan R. Andreesen

Prof. Dr. Walter Reinecke

Tag der Verteidigung: 11.03.2005

Bibliographische Beschreibung

Anne Westendorf

Enantioselektive Verwertung von Phenoxyalkanoat-Herbiziden durch Bakterien - Biochemische Charakterisierung der Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes

Universität Leipzig, Dissertation, 37 Abbildungen, 28 Tabellen, 10 Gleichungen, 169 Literaturstellen

Referat

In den letzten Jahren wurde eine Menge über den enzymatischen Hintergrund des Phenoxyalkanoat-Abbaus durch Bakterien bekannt. Es sind sowohl Stämme mit hoher Spezifität für Phenoxyacetate, wie *Ralstonia eutropha* JMP134 (Pieper et al., 1988) und *Delftia acidovorans* P4a (Hoffmann et al., 1996, 2003), oder für Phenoxybutyrate, wie *Aureobacterium* sp. K2-17 und *Rhodococcus erythropolis* K2-3 (Mertink et al., 1998; Sträuber et al., 2003), als auch solche mit breiterem Herbizidverwertungsspektrum wie *Sphingobium herbicidovorans* MH (Horvath et al., 1990; Zipper et al., 1996), *Rhodoferax* sp. P230 (Ehrig et al., 1998) und *Delftia acidovorans* MC1 (Müller et al., 1999) gefunden und charakterisiert worden. Letztere drei Stämme sind Objekt der vorliegenden Untersuchungen. In diesen Bakterien wurden jeweils zwei enantioselektive Phenoxyalkanoat-spaltende Enzyme gefunden. Es handelt sich um α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen, die die Spaltung der Etherbindung der Phenoxyalkanoate in die jeweiligen substituierten Phenole und 2-Oxoalkanoate katalysieren. Die Enzyme sind streng enantioselektiv, die (R)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat/ α -Ketoglutarat Dioxygenasen (RdpA) spalten die (R)-, nicht aber die (S)-Enantiomeren der 2-Phenoxypropionate, die (S)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat/ α -Ketoglutarat Dioxygenasen (SdpA) spalten analog dazu die (S)-, nicht aber die (R)-Enantiomeren. Weniger streng ist die Selektivität jedoch hinsichtlich der Alkanoat-Seitenkette und der Substituenten am aromatischen Ring. Das *rdpA*-Gen ist in den drei unterschiedlichen Stämmen identisch. Erstaunlich ist jedoch, dass die Genprodukte unterschiedliche kinetische Eigenschaften aufweisen. Als Ursache dafür konnten multiple Enzymformen nachgewiesen werden, die auf Monomere mit unterschiedlichen pI-Werten zurückgeführt werden können. Die Monomeren unterscheiden sich in ihrem Spektrum in den jeweiligen Stämmen. Wie am Beispiel von RdpA_{MC1} gezeigt, weisen die Enzymformen Unterschiede in ihren kinetischen Konstanten auf. Die *sdpA*-Gene

sind im Gegensatz dazu in den einzelnen Stämmen verschieden. Das führt zu grundsätzlich unterschiedlichen Substratverwertungsprofilen bzw. kinetischen Konstanten. Das Enzym aus MC1 zeigt gute Spaltungsaktivitäten für die (S)-Enantiomeren der Phenoxypropionate und die Phenoxyacetat-Derivate; das SdpA_{P230} setzt dagegen die Phenoxyacetate nicht um. Wie für RdpA konnten auch hier multiple Enzymformen nachgewiesen werden, die sich wiederum in ihren kinetischen Eigenschaften unterscheiden.

Die Art der Modifizierungen an den RdpA- und SdpA-Enzymen konnte bislang nicht endgültig geklärt werden. Am SdpA_{MC1} wurden Hydroxylierungen an Trp-Resten gefunden, die in Nähe zum aktiven Zentrum stehen und eher typisch für α -KG-abhängige Enzyme sind. Sie bewirken eine reversible Inaktivierung des Enzyms und sollten daher mit den hier beobachtet kinetischen Effekten weniger in Verbindung gebracht werden. Eher sind Massendifferenzen von Interesse, die auf eine Modifizierung an Cys-Resten hinweisen. Die Spezifizierung dieser Moleküle sollte weiteren Aufschluss geben, bleibt aber weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGEN	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Dioxygenasen mit Nicht-Häm-gebundenem Eisen	1
1.2 α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen	2
1.2.1 Reaktionsmechanismus	4
1.2.2 Multiple Enzymformen und α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen.....	5
1.3 Optische Aktivität und die Umwelt.....	6
1.3.1 Stereospezifische Enzyme	7
1.3.2 Mikrobieller Phenoxyalkanoat-Abbau.....	8
1.4 Problemstellung	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Mikroorganismen	11
2.2 Kultivierung	11
2.2.1 Medien.....	12
2.2.2 Batch-Kultivierung	12
2.2.3 Batch-Kultivierung genetisch veränderter Mikroorganismen.....	12
2.2.4 Fed-Batch-Kultivierung	13
2.3 Enzymreinigung.....	13
2.3.1 Zellernte und Zellaufschluss.....	13
2.3.2 Reinigung der nativen Enzyme.....	13
2.3.2.1 Protaminsulfat- und Ammoniumsulfat-Fällung	13
2.3.2.2 Ionenaustausch-Chromatographie.....	14
2.3.2.2.1 an Source30Q.....	14
2.3.2.2.2 an PBE94	14
2.3.2.3 Hydrophobe Chromatographie.....	15
2.3.2.4 Präparative Gelelektrophorese	15
2.3.2.4.1 Trennung der Rdp _{AMCI} -Enzymformen	15
2.3.2.4.2 Trennung der Sdp _{AMCI} -Enzymformen.....	16
2.3.3 Reinigung der rekombinanten Enzyme Rdp _{AMCI} -rec und Sdp _{AMCI} -rec	16
2.3.3.1 Affinitätschromatographie	16
2.3.3.2 Abspaltung der Strep-tag(II)-Sequenz	17

2.4	Aufkonzentrieren, Umpuffern und Entsalzen	17
2.4.1	Säulenchromatographisch mittel Gelfiltration	17
2.4.2	Ultrafiltration	17
2.5	Proteinbiochemische Untersuchungen	17
2.5.1	Säulenchromatographische Bestimmung der Molmasse	17
2.5.2	Bestimmung der Anzahl funktionell aktiver Zentren	18
2.5.3	Gelelektrophoretische Methoden	18
2.5.3.1	SDS-PAGE	18
2.5.3.2	Native Gelelektrophorese	19
2.5.3.2.1	Kontinuierliche Gelelektrophorese	19
2.5.3.2.2	Diskontinuierliche Gelelektrophorese	19
2.5.3.3	Peptid-Gelelektrophorese	19
2.5.3.4	2D-Gelelektrophorese	19
2.5.3.4.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	20
2.5.3.4.2	Zweite Dimension: SDS-PAGE	20
2.5.3.5	Western-Blot	21
2.5.4	Färben, Scannen und Auswerten	21
2.5.4.1	Silber-Färbung	21
2.5.4.2	Coomassie-Färbung	21
2.5.4.3	Kolloidale Coomassie-Färbung	22
2.5.4.4	Scannen und Auswerten	22
2.5.5	Enzymatischer und chemischer Verdau von Proteinen	22
2.5.6	N-terminale Sequenzierung von Proteinen und Datenbankrecherche	23
2.5.7	Massenspektrometrische Methoden	23
2.5.7.1	Identifizierung von Proteinen	23
2.5.7.2	Untersuchung von Modifizierungen	23
2.5.8	Internet-Links	24
2.6	Enzymkinetische Untersuchungen	24
2.6.1	Bestimmung der Phenoxylalkanoat-Spaltungsaktivität	24
2.6.2	Ermittlung der Extinktionskoeffizienten von DCP und MCP	25
2.6.3	Auswertung der ermittelten Daten	25
2.7	Gentechnische Arbeiten	26
2.7.1	Nährmedien für gentechnische Arbeiten	26
2.7.2	Isolation von Nukleinsäuren	26
2.7.2.1	Präparation von genomischer DNA	26
2.7.2.2	Präparation von plasmidaler DNA	27
2.7.3	Ableitung von Primern für die Gene <i>rdp</i> _{MC1} und <i>sdp</i> _{MC1}	27
2.7.4	PCR-Reaktion zur Amplifizierung der <i>rdp</i> _{MC1} - und <i>sdp</i> _{MC1} -Gene	27
2.7.5	Ligation der Gene <i>rdp</i> _{MC1} und <i>sdp</i> _{MC1} mit dem pGEMT-Vektor	28

2.7.6	Ligation der Gene <i>rdpA_{MC1}</i> und <i>sdpA_{MC1}</i> mit dem pASK-IBA7-Vektor	28
2.7.7	Übertragung der DNA durch Transformation.....	28
2.7.7.1	Transformation.....	28
2.7.7.2	Elektrotransformation	28
2.7.8	Selektion rekombinanter Klone	29
2.7.9	DNA-Sequenzierung	29
2.8	Analytik	29
2.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.8.2	Bestimmung der Phenoxyalkanoat-Konzentration	30
2.8.3	Bestimmung der α -Ketoglutarat-Konzentration	30
2.8.4	Bestimmung der optischen Dichte.....	30
2.8.5	Bestimmung von Leitfähigkeit, Sauerstoffkonzentration und pH-Wert	30
3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	Enzymreinigung.....	31
3.1.1	Reinigung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus <i>Delftia acidovorans</i> MC1.....	31
3.1.1.1	Säulenchromatographische Enzymreinigung.....	31
3.1.1.2	Gelelektrophoretische Trennung von Enzymformen	33
3.1.1.2.1	Separation der SdpA _{MC1} -Enzymformen	33
3.1.1.2.2	Separation der RdpA _{MC1} -Enzymformen.....	35
3.1.2	Reinigung der Phenoxypropionat-spaltenden Enzyme aus <i>Rhodoferrax</i> sp. P230.....	37
3.1.3	Reinigung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus <i>Sphingobium herbicidovorans</i> MH	39
3.1.4	Reinigung der rekombinanten Enzyme RdpA _{MC1} -rec und SdpA _{MC1} -rec	41
3.2	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	43
3.2.1	Primärstruktur.....	43
3.2.1.1	Primärstrukturen der RdpA- und SdpA-Enzyme aus MC1, P230 und MH	43
3.2.1.2	Sequenzvergleiche und konservierte Regionen	44
3.2.2	Sekundärstruktur.....	45
3.2.3	Physikochemische Eigenschaften und Quartärstruktur.....	47
3.2.3.1	Enzyme aus <i>Delftia acidovorans</i> MC1	47
3.2.3.1.1	Gelchromatographische Bestimmung der Molmasse	47
3.2.3.1.2	Gelelektrophoretischer Nachweis von Ladungsisomerie, Bestimmung der Molmasse und der isoelektrischen Punkte.....	48
3.2.3.1.3	Quartärstruktur der Enzyme SdpA _{MC1} und RdpA _{MC1}	50
3.2.3.2	Enzyme aus <i>Rhodoferrax</i> sp. P230 und <i>Sphingobium herbicidovorans</i> MH	53
3.2.3.2.1	Die (R)-spezifischen Enzyme	53
3.2.3.3	Die (S)-spezifischen Enzyme.....	53
3.2.3.4	Rekombinante Enzyme	56
3.2.4	Posttranslationale Modifikationen	57

3.2.4.1	Die (R)-spezifischen Enzyme	57
3.2.4.2	Das SdpA _{MCI}	57
3.3	Enzymkinetische Charakterisierung und Reaktionsmechanismus	58
3.3.1	Bestimmung der Anzahl funktionell aktiver Zentren	58
3.3.2	Substratverwertungsspektren.....	59
3.3.2.1	Die (R)-spezifischen Dioxygenasen.....	59
3.3.2.2	Die (S)-spezifischen Dioxygenasen	60
3.3.3	Enzymstabilität und Reaktionsordnung.....	61
3.3.4	Kinetische Kennlinien	64
3.3.4.1	Die Kennlinien der (S)-spezifischen Dioxygenasen	64
3.3.4.1.1	Das SdpA _{MCI}	64
3.3.4.1.2	Die Kennlinien der SdpA-Enzyme aus P230 und MH.....	67
3.3.4.2	Die Kennlinien der (R)-spezifischen Dioxygenasen.....	68
3.3.5	Kinetische Konstanten.....	70
3.3.5.1	Konstanten der (S)-spezifischen Enzyme	70
3.3.5.2	Konstanten der (R)-spezifischen Enzyme.....	72
3.3.6	Reaktionsmechanismus	74
4	DISKUSSION.....	77
4.1	Enzymausstattung	77
4.2	Proteinbiochemie	81
4.2.1	Sequenzanalyse.....	81
4.2.2	Multiple Enzymformen.....	83
4.3	Klassifizierung der Enzyme.....	86
4.4	Reaktionsmechanismus und Enzymstabilität	87
4.5	Enzymkinetik	90
4.5.1	Kinetische Kennlinien und Kooperativität	90
4.5.2	Posttranslationale Modifizierung und Enzymkinetik.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	LITERATUR.....	99

Abkürzungen

α -KG	α -Ketoglutarat
Akt.	Aktivität
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BNPS	3-Bromo-3-Methyl-2-(2-nitrophenylmercapto)-3H-indol
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonat
CHAPS	3-[(3-Choramidopropyl)-dimethylammino]-1-propanesulfonate
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyacetat
2,4-DB	4-(2,4-Dichlorphenoxy)butyrat
DCP	2,4-Dichlorphenol
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoynukleosidtriphosphat
(R,S)-DP	(R,S)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	Funktion
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>ion exchange chromatography</i>
IKA	Inkubationsansatz
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thio galactopyranosid
k_{kat}	Wechselzahl
K_i	Inhibitionskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
k_x	Geschwindigkeitskonstanten
Koeff.	Koeffizient
MALDI	<i>matrix assisted laser desorbtion ionization</i>
MC1	<i>Delftia acidovorans</i> MC1
MCP	4-Chlor-2-methylphenol

MCPA	4-Chlor-2-methylphenoxyacetat
MCPB	4-Chlor-2-methylphenoxybutyrat
(R,S)-MCP	(R,S)-2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)propionat
MH	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> MH
MM	Molmasse
MS	Massenspektrometrie
OD	optische Dichte
P230	<i>Rhodospirillum rubrum</i> sp. P230
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
PYE	<i>peptone yeast extract</i>
R ²	Korrelationskoeffizient
RdpA	(R)-DP/α-KG-Dioxygenase
rel. spez. Akt.	relative spezifische Aktivität
R _f	Wanderungsgeschwindigkeit
rpm	<i>rounds per minute</i>
SdpA	(S)-DP/α-KG-Dioxygenase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TauD	Taurin/α-KG-Dioxygenase
TCA	Trichloracetat
Temed	N'N'N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TfdA	2,4-D/α-KG-Dioxygenase
TfdB	Dichlorphenol-Hydroxylase
TfdC	Dichlorcatechol-1,2-Dioxygenase
TfdD	Chlormuconatcycloisomerase
TfdK	2,4-D-Transportprotein
Tris	Tri(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid

1 Einleitung

In der Agrarwirtschaft werden Phenoxalkanoat-Herbizide zur Bekämpfung von dikotyledonen Unkräutern eingesetzt, womit sie zum Schutz von monocotyledonen Kultur- und Nutzpflanzen beitragen. Phenoxalkanoate imitieren die Wirkung pflanzlicher Auxine und verursachen auf diese Weise ein unkontrolliertes Wachstum, das zu einer abnormen Entwicklung von zweikeimblättrigen Pflanzen und letztendlich zu deren Absterben führt (Loos, 1975). Wird maßvoll mit diesen Verbindungen umgegangen, ist das Potential zur Entgiftung in biologischen Systemen so groß, dass die Stoffe nicht zum umweltpolitischen Problem werden. Phenoxalkanoate sind biologisch abbaubar; das latente Potential zum Abbau ist in Mikroorganismen verpackt. Spezifiziert bedeutet dies, dass Enzyme an der Degradation von Phenoxalkanoaten beteiligt sind. Dafür kommen Mono- und Dioxygenasen in Frage.

1.1 Dioxygenasen mit Nicht-Häm-gebundenem Eisen

Dioxygenasen sind Enzyme, die beide Atome des Sauerstoffmoleküls in das Substrat einbauen. Erscheinen die beiden Sauerstoffatome dabei im selben Produkt, so spricht man von einer intramolekularen Dioxygenase. Analog werden die Sauerstoffatome bei intermolekularen Dioxygenasen in zwei verschiedenen Reaktionsprodukten wiedergefunden. Dioxygenasen lassen sich nicht nur anhand dieses Merkmals unterscheiden, sondern können basierend auf der unterschiedlichen Koordination des Metallions im aktiven Zentrum des Enzyms in drei Gruppen unterteilen werden: 1.) Häm-kordiniertes Metallion, 2.) Nicht-Häm-kordiniertes Metallion und 3.) Eisen-Schwefel-Cluster.

Im folgendem sollen Dioxygenasen mit einem Nicht-Häm-kordiniertem Metallion im aktiven Zentrum näher betrachtet werden. Diese Gruppe der Dioxygenasen ist, wie auch die durch sie katalysierten Reaktionen, sehr vielfältig. Sie spalten aromatische Ringstrukturen, oxidieren ungesättigte Fettsäuren, schließen Ringstrukturen, spalten Ether-Bindungen und vieles mehr. In diese Gruppe gehören sowohl die Lipxygenase (Nelson et al., 1994), die Isopenicillin-N-Synthase (Baldwin et al., 1991) als auch die α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Prescott et al., 1993), die Catechol-Dioxygenasen und die Rieske-Oxygenasen. Innerhalb dieser Gruppe sind die Metallionen wiederum in sehr unterschiedlichen räumlichen Anordnungen koordiniert: bei den intradiolisch spaltenden Catechol-Dioxygenasen (Fe(III)-Ion über 2 Tyr und 2 His, [Ohlendorf et al., 1988/94]) trigonal bipyramidal, im Falle der extradiolisch spaltenden Catechol-Dioxygenasen (Fe(II)-Ion, selten auch Mn(II), [Que et al., 1981; Bold et al., 1995; Whiting et al., 1996] über 2 His, Glu, [Han et al., 1995; Senda et al., 1996]) in Form

einer quadratischen Pyramide und in der Anordnung eines verzerrten Oktaeders bei der Lipxygenase (Fe(III) über 3 His, Ile-CO₂⁻ und Asn, [Boyington et al. 1990; Minor et al., 1996]) der Isopenicillin-N-synthase (Fe(II) über 2 His und Asp, Gln, [Roach et al., 1995a]) und den α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Fe(II) über 2 His und Asp, [Hegg et al., 1999; Elkins et al., 2002]). Bei all diesen Enzymen ist das Metallion im aktiven Zentrum so koordiniert, dass mindestens eine der vier Bindungsstellen frei oder mit Lösungsmittel (H₂O) besetzt ist, also frei verfügbar für die Substratbindung bleibt. Dies ist ein großer Unterschied zu den Häm-Dioxygenasen, bei denen das Eisen über alle vier Bindungsstellen komplexiert ist, und sollte ein entscheidender Grund für die Vielfältigkeit der Reaktionsmechanismen in der Gruppe der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen darstellen (Que und Ho, 1996). Der Angriff des Sauerstoffs auf das Substrat kann sowohl elektrophil (intradiolische Catechol-Dioxygenasen), nucleophil (extradiolische Catechol-Dioxygenasen) als auch radikalisch erfolgen (Lipxygenase [de Groot et al., 1973; Egmond et al., 1977]).

1.2 α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen

Die α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen bilden die größte Gruppe der Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen (Hegg et al., 1999). Es handelt sich um intermolekulare Dioxygenasen. Sie katalysieren Reaktionen nach dem in Gleichung 1 dargestellten allgemeinen Mechanismus:



Gleichung 1: Allgemeiner Reaktionsmechanismus von durch α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen katalysierte Reaktionen, S: Substrat, SO: Produkt

Dioxygenasen dieser Familie sind in vielen Bereichen anzutreffen, sie katalysieren die posttranslationale Hydroxylierung von Aminosäure-Seitenketten während der Collagensynthese (Prolyl-4-Hydroxylase [Hutton et al., 1966; Kivirikko und Prockop, 1967], Lysyl-Hydroxylase [Hausmann, 1967; Kivirikko und Prockop, 1972], Aspartyl-Hydroxylase [Korith et al., 1994]), die Umsetzung von Thymin zu 5-Hydroxymethyl-uracil im Pyrimidin-Stoffwechsel (Thymin-7-Hydroxylase [Abbot et al., 1967]), den oxidativen Ringschluss von Proclavaminat in der Biosynthese von Clavaminat (Clavaminat-Synthase [Salowe et al., 1990]), die Spaltung der Phenoxyalkanoaten an der Etherbindung (2,4-Dichlorphenoxyacetat-Dioxygenase [Fukumori und Hausinger, 1993b]), die Hydroxylierung von ϵ -N-Trimethyl-L-Lysin und die Umwandlung von γ -Butyrobetain zu L-Carnitin im Carnitinstoffwechsel (ϵ -N-Trimethyl-L-Lysin-Hydroxylase [Hulse et al., 1978], γ -Butyrobetain-Hydroxylase [Lindstedt et al., 1970/77]), die Reparatur von DNA durch die oxidative Entgiftung alkylierter Basen (AlkB [Aravind und Koonin, 2001]) und vieles mehr. Aufgrund der katalysierten Reaktionen

unterteilten deCarolus und deLuca (1994) die Familie der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen in die Untergruppen Hydroxylasen, Hydroxylasen/Epoxidasen, Cyclasen, Desaturasen und Ring-Expandasen.

Eine weitere Klassifizierung der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen nimmt Hogan (1999) vor. Sie unterteilte die Enzyme aufgrund von konservierten Elementen in der Primärstruktur der Proteine in drei Gruppen.

Die **Gruppe(I)**, die Isopenicillin-N-Synthase-ähnlichen Enzyme, bildet dabei die größte Gruppe dieser Dioxygenasen. Ihr gehören unter anderem Enzyme der Collagen-Biosynthese (Prolyl-4-, Aspartyl- und Lysyl-Hydroxylase), Enzyme des Gibberellin- (z.B. Gibberellin-7-Oxidase, Gibberellin-13-Oxidase oder Gibberellin-2 β -Hydroxylase [Hedden, 1997]) und des Flavon-Stoffwechsels an (Flavone-Synthase I [Britsch, 1990], Flavanol-Synthase [Holton et al., 1993], Flavanon-3-Hydroxylase [Saito et al., 1999]). Die Aminosäure-Sequenz H-X-D-X₅₅-H kann in allen diesen Dioxygenasen gefunden werden (Borovok et al., 1996) und ist daher das Charakteristikum dieser Gruppe. Es wurde gezeigt, dass die konservierten Aminosäuren in dieser Folge an der Bildung des Metallbindungs-Zentrums (Roach et al., 1995b; Vålegard et al., 1998) beteiligt sind und in Verbindung mit dem ebenfalls konservierten C-terminal davon gelegenen Sequenzabschnitt R-X-S die Bindung von α -Ketoglutarat vermitteln (Kreisberg-Zakarin et al., 1999; Lukacin und Britsch, 1997).

Die Dioxygenasen der **Gruppe(II)** zeichnen sich durch Sequenz-Ähnlichkeiten zu der 2,4-Dichlorphenoxyacetat/ α -KG Dioxygenase (TfdA) aus. Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem die Taurin/ α -KG Dioxygenase (TauD) (Eichhorn et al., 1997), die Sulfonat/ α -KG Dioxygenase (Hogan et al., 1999), die Clavaminat-Synthase (Salowe et al., 1990) und die γ -Butyrobetain-Hydroxylase (Lindstedt et al., 1970/77). Das konservierte Sequenz-Motiv dieser Gruppe lautet H-X-D-X₁₃₆₋₂₀₅-D-N-X₄-H-X₁₀-R. Dieses Motiv enthält unter anderem auch die Sequenz H-X-D, die als Bindungsstelle des Metallzentrums der Gruppe(I)-Dioxygenasen ausgemacht wurde. Diese Aminosäuren sind folglich auch in den TfdA-ähnlichen Enzymen an der Fe(II)-Bindung beteiligt (Hegg et al., 1999; Elkins et al., 2002).

Die **Gruppe(III)** der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, die bislang kleinste Gruppe, zeichnet sich durch nur geringe Homologie zu den anderen beiden Gruppen aus. Die Aminosäuren für die Fe(II)-Komplexierung (H-X-D) sind jedoch auch in dieser Gruppe konserviert. Das zuordnende Sequenz-Motiv dieser Dioxygenasen lautet H-X-D-X₃₄₋₃₈-P-G-H-X₃₆₋₆₅-H-

X₄-N-X₅-R. Mitglieder dieser Enzymgruppe sind zum Beispiel die Prolin-4-Hydroxylase (Shibasaki et al., 1999) und die Phytanoyl-CoA-Hydroxylase (Jansen et al., 1998).

Die α -KG-abhängigen Dioxygenasen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Primär-Struktur erheblich, sondern auch in ihrer Quartär-Struktur. Man findet sowohl monomere Enzyme, deren Molmassen zwischen 26 kD (Giberellin-2 β -Hydroxylase) und 56 kD (Aspartyl-Hydroxylase) liegen, als auch dimere (γ -Butyrobetain-Hydroxylase) und tetramere Proteine (Prolin-4-Hydroxylase). Die di- und tetrameren Enzyme wiederum können aus identischen (4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase [Wada et al., 1975]) oder unterschiedlichen Unter-einheiten (Prolin-4-Hydroxylase) zusammengesetzt sein. Ebenso verschieden wie das strukturelle Spektrum fallen die kinetischen Konstanten aus, so variiert der K_M-Wert für das Substrat zwischen 0,01 μ M (Prolyl-4-Hydroxylase [Kivirikko et al., 1989]) und 720 μ M (Cephalosporin-7 α -Hydroxylase [Xiao et al., 1991]), also um etwa vier Zehnerpotenzen. Für α -KG, dem zweiten Substrat, ist die Mehrzahl der Dioxygenasen hochspezifisch. Nur wenige Enzyme sind bislang bekannt, die auch andere 2-Oxosäuren als Elektronendonoren nutzen können (TfdA, 4-Hydroxypyruvat-Oxidase). Der K_M-Wert für α -KG schwankt innerhalb der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen um etwa drei Größenordnungen.

1.2.1 Reaktionsmechanismus

In Abbildung 1 ist der postulierte Reaktionsmechanismus für 2,4-Dichlorphenoxyacetat/ α -Ketoglutarat Dioxygenase (TfdA) (Hegg et al., 1999) dargestellt. Nach diesem Mechanismus binden die Substrate in der Reihenfolge α -KG, 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) und Sauerstoff. Als erstes Produkt verlässt CO₂ das aktive Zentrum; in einem weiteren Schritt werden die übrigen Produkte Dichlorphenol (DCP), Glyoxylat und Succinat freigesetzt. Die gleiche Reihenfolge der Bindung der Substrate an das Enzym wurde auch für TauD (Elkins et al., 2002) und für die Thymin-7-Hydroxylase (Holm et al., 1975) beschrieben. Eine zweite in der Literatur beschriebene Bindungsfolge lautet: α -KG, Sauerstoff und Substrat. Diese Folge der Substratbindung wurde für die Prolyl-4-Hydroxylase (Kivirikko et al., 1989), die Lysyl-Hydroxylase (Kivirikko, 1972) und die Deacetoxyvindolin-Hydroxylase (deCarolus und deLuca, 1993) postuliert. Die Ablösung der Substrate ist nicht näher untersucht worden, jedoch konnte für die Enzyme Prolyl-4-Hydroxylase (Kivirikko et al., 1989), Lysyl-Hydroxylase (Puistola et al., 1980), Thymin-7-Hydroxylase (Holme, 1975) und Deacetoxyvindolin-4-Hydroxylase (deCarolus und deLuca, 1993) mit enzymkinetischen Methoden ein *ordered*

TerTer-Mechanismus nachgewiesen werden. Die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase weist dagegen einen *ordered* BiBi-Mechanismus auf (Rundgren, 1977b).

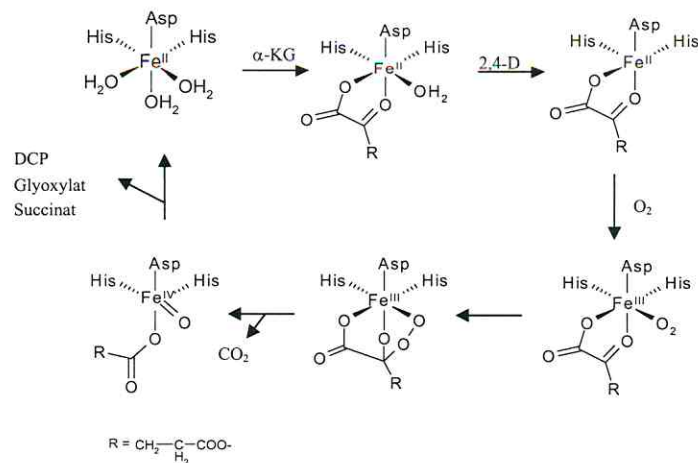


Abbildung 1: Reaktionsmechanismus des 2,4-Dichlorphenoxyacetat/ α -Ketoglutarat Dioxygenase (TfdA) nach Hegg et al. (1999)

1.2.2 Multiple Enzymformen und α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen

Das Phänomen vom Auftreten multipler Enzymformen ist seit vielen Jahren bekannt und wurde für eine Vielzahl von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren beschrieben (Shaw, 1969). Dem Vorhandensein verschiedener Formen eines Enzyms bzw. analoger Enzymreaktionen können unterschiedliche molekulare Ursachen zu Grunde liegen (Naessens und Vandamme, 2003). Es kann sich dabei um

- voneinander genetisch unabhängige Proteine
- genetische Varianten
- Heteropolymere von mindestens zwei nicht kovalent verknüpften Polypeptidketten
- Polymerisierung von identischen Untereinheiten
- posttranslationale Modifizierungen
- unterschiedliche Konformations-Zustände

handeln. Die Faktoren, die das Auftreten von Enzymformen beeinflussen, können ebenso vielfältig sein (Naessens und Vandamme, 2003):

- Art und Menge der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle
- Temperatur
- Aggregatzustand des Mediums
- Redoxverhältnisse
- Wachstumsphasen

- Einfluss von Induktoren oder Inhibitoren.

Multiple Enzymformen unterscheiden sich zumeist in ihrer zellulären Lokalisation, ihrer Regulation oder in ihrem kinetischen Verhalten. Sie bieten dem Organismus eine Möglichkeit der Feinregulation des Stoffwechsels.

1.3 Optische Aktivität und die Umwelt

Optisch aktive Moleküle sind asymmetrisch, sie sind mit ihrem Spiegelbild nicht in Deckung zu bringen, d.h. sie verhalten sich, sinnbildlich gesehen, wie die rechte zu der linken Hand. Zwei Moleküle, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten, werden als Enantiomere bezeichnet. Derartige Moleküle zeichnen sich in der Regel durch das Vorhandensein eines Kohlenstoffatoms (asymmetrisches oder chirales Zentrum) mit vier verschiedenen Substituenten unterschiedlicher räumlicher Anordnung aus. Chiralität ist in der Natur eher Regel als Ausnahme, so sind die DNA, RNA und Proteine aus chiralen Verbindungen aufgebaut. Proteine bestehen aus L-Aminosäuren, DNA und RNA aus den D-Enantiomeren der Desoxyribose und Ribose.

Reine Enantiomere chiraler Verbindungen haben identische physikochemische Eigenschaften (diskutiert in Eliel und Wilen, 1994), können sich jedoch in ihrem biochemischen Verhalten unterscheiden. Die möglichen physiologischen Wirkungen wurden vor allem im Zusammenhang mit der Anwendung von Arzneimitteln untersucht und von Ariëns (1989) wie folgt zusammengefasst:

- Stereoisomere weisen den gleichen Reaktionsmechanismus auf, unterscheiden sich aber in ihrer Affinität zum Enzym (Rezeptor)
- das inaktive Enantiomer wirkt als kompetitiver Inhibitor
- die Enantiomere haben entgegengesetzte Wirkungen (z.B. Barbiturate)
- ein Enantiomer zeigt den gewünschten physiologischen Effekt, das andere einen ungewollten (z.B. Contergan [Bentley, 1995])
- beide Enantiomere zeigen unerwünschte Nebeneffekte, aber nur eins den gewünschten Effekt
- oder, die negativen Wirkungen des aktiven Enantiomers werden durch das inaktive Stereoisomer neutralisiert.

Chiralität spielt nicht nur in der Pharmazie eine entscheidende Rolle, sondern überall dort, wo bioaktive Verbindungen genutzt werden. Chirale Pestizide wurden beispielsweise über viele Jahrzehnte in großen Mengen als Racemate auf die Felder ausgebracht. Heute schränkt man, zumindest in den industrialisierten Ländern, den Einsatz auf das wirksame Enantiomer ein. In

vielen Fällen ist die Wirkung der Herbizide auf die Pflanzen enantiospezifisch und gut untersucht (Hassal, 1990; Roberts, 1998), das Schicksal der Enantiomeren im Boden dagegen nicht. Bislang ist wenig über den enantiospezifischen Abbau von Herbiziden und dessen biochemische Hintergründe bekannt. Das Phänomen des Verschwindens eines Enantiomers oder die Verschiebung des Enantiomeren-Verhältnisses in biologischen Proben wurde jedoch schon häufig beobachtet (Zipper et al., 1998/99; Romero et al., 2000; Schulz et al., 2000; Rügge et al., 2002; Harrison et al., 2003).

1.3.1 Stereospezifische Enzyme

In Korrelation mit dem oben Gesagten schließt der Stoffwechsel von optisch aktiven Verbindungen stereoselektive Schritte, die die Aufnahme und Katalyse umfassen, mit ein. Zur Erklärung der Enantioselektivität von Enzymen wird oft das Drei-Punkte-Modell (Ogston, 1948; Easson und Stedman, 1993) genutzt. Dieses besagt, dass das aktive Enantiomer an das Enzym bindet, da die Anordnung dreier Substituenten am asymmetrischen Zentrum des Substrats komplementär zum aktiven Zentrum ist. Für das andere Enantiomer trifft dies dann nicht zu. Dieses Modell erklärt die Spezifität aber nur solange, wie vorausgesetzt wird, dass das aktive Zentrum nur von einer Seite zugänglich ist. Eine Erweiterung des Drei-Punkte-Modells wird durch die Einführung einer vierten Bindungsstelle erreicht (Mesecar und Koshland, 2000a/b). Wird z.B. das Apoenzym der Isocitrat-Dehydrogenase (in Abwesenheit von Mg^{2+}) mit seinem racemischen Substrat konfrontiert, so bindet ausschließlich L-Isocitrat, in Anwesenheit von Mg^{2+} bindet das D-Isomer. Die Kristall-Struktur des Enzyms zeigte, dass drei der vier Gruppen (das -H vom C_2 , das auf das NAD^+ übertragen wird, die $\beta-COO^-$ -Gruppe, die als CO_2 abgespalten wird und das C_3) des Isocitrates sowohl beim L- als auch beim D-Isocitrat an die gleichen Stellen des aktiven Zentrums gebunden werden. Der Bindungsort für die vierte Gruppe, dem OH-, ist im Apoenzym komplett verschieden zu dem Bindungsort im Metall-beladenen Enzym. Mit anderen Worten: es sind vier und nicht drei Punkte zur enantioselektiven Bindung nötig.

Der Abbau der Enantiomeren chiraler Verbindungen kann auf unterschiedlichem Wege erfolgen (Müller und Kohler, 2004):

- es existieren zwei enantioselektive Enzyme für die Interaktion mit der optisch aktiven Substanz
- beide Enantiomere werden vom gleichen Enzym simultan, aber mit unterschiedlichen Umsatzraten verwertet
- beide Enantiomere werden vom gleichen Enzym nacheinander verwertet

- ein Enantiomer wird enantioselektiv abgebaut, das andere durch eine Isomerase umgesetzt

1.3.2 Mikrobieller Phenoxyalkanoat-Abbau

Bekannte Vertreter der Phenoxyalkanoat-Herbizide sind die Phenoxyacetate 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) und 4-Chlor-2-methylphenoxyacetat (MCPA), die optisch aktiven Phenoxypropionate (R,S)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat ([R,S]-DP, Dichlorprop) und (R,S)-2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)propionat ([R,S]-MCP, Mecoprop) und die Phenoxybutyrate 4-(2,4-Dichlorphenoxy)butyrat (2,4-DB) und 4-(4-Chlor-2-methylphenoxy)butyrat (MCPB). Diese Herbizide sind die am häufigsten eingesetzten Unkrautbekämpfungsmittel (Worthing und Hance, 1991). Weltweit wurden 1999 allein in der Weizenproduktion etwa $15 \cdot 10^6$ kg 2,4-D verwendet; vom Mecoprop wurden allein in den USA $2,3 \cdot 10^6$ kg ausgebracht (Donaldson et al., 2002). Die Phenoxypropionate besitzen ein asymmetrisches Zentrum, d.h. sie sind chiral und es existieren je zwei Enantiomere, von denen nur die (R)-Enantiomere biologisch aktiv sind (Matell, 1953). Trotzdem werden in einigen Ländern der Welt immer noch die Racemate dieser Herbizide in der Landwirtschaft eingesetzt.

Der mikrobielle Abbau der achiralen Phenoxyacetate (2,4-D und MCPA) ist in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) gut untersucht. Zunächst werden die Phenoxyacetate von einer α -KG-abhängigen Dioxygenase (TfdA) an der Etherbindung in das substituierte Phenol (2,4-Dichlorphenol [DCP] oder 4-Chlor-2-methylphenol [MCP]) und Glyoxylat gespalten (Streber et al., 1987; Fukumori und Hausinger, 1993a/b). Im Anschluss wird das Phenol-Derivat von der Phenolhydroxylase (TfdB) zum korrespondierenden Catechol (3,5-Dichlorcatechol, 5-Chlor-3-methylcatechol) hydroxyliert (Liu und Chapman, 1984), welches dann über den modifizierten *ortho*-Weg (Reineke, 1986; Reineke und Knackmuss, 1988) weiter metabolisiert wird: Aus der Ringspaltung (Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase [TfdC], Bath et al., 1993) resultiert das Muconat (2,4-Dichlor-*cis,cis*-muconat, 4-Chlor-3-methyl-*cis,cis*-muconat), welches dechloriert und cycloisomerisiert wird (TfdD und TfdE, Kuhm et al., 1990). Im weiteren Verlauf wird der zweite Substituent abgespalten und das Kohlenstoffgerüst über 3-Ketoadipat zu Succinat und Acetyl-CoA abgebaut.

Variationen dieses Abbauweges betreffen meist die Dehalogenierungsreaktionen (Evans et al., 1971a/b). Neben α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen wurden in seltenen Fällen noch andere Enzyme gefunden, die die Spaltung der Etherbindung der Phenoxyalkansäuren katalysieren. Im Stamm *Pseudomonas cepacia* AC1100 wurde eine Monooxygenase identifiziert,

die die Spaltung von 2,4,5-Trichlorphenoxyacetat katalysiert (Xun und Wagnon, 1995). Für die Spaltung des 2,4-DB wurde in *Rhodococcus erythropolis* K2-3 ein Cytochrom P450 (Sträuber et al., 2003) gefunden.

Für die chiralen Phenoxypropionate wird ein gleicher oder zumindest sehr ähnlicher mikrobieller Abbauweg postuliert. So konnten nach der Etherspaltung zu den Phenoxyacetaten identische substituierte Phenole (DCP, MCP) nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden die Gene (*tfdB*, *tfdC*, *tfdD*) für die Enzyme des modifizierten *ortho*-Weges in den Phenoxypropionat-spaltenden Stämmen gefunden (Zipper et al., 1996; Müller et al., 2001; Smejkal et al., 2001). Versuche mit Rohextrakten haben bereits gezeigt, dass analog zum TfdA eine Stimulierung der Reaktion durch α -KG, Fe^{2+} und Ascorbat erfolgt (Müller et al., 2001), was nahe legt, dass der Reaktionsmechanismus zur Spaltung der Phenoxypropionate dem der Phenoxyacetate entspricht.

Erste Hinweise auf eine enantiospezifische Spaltung der Phenoxypropionate folgen aus Substratverwertungsprofilen und Induktionsversuchen. So wurde für *Alcaligenes denitrificans* gezeigt, dass er in der Lage ist, prototroph auf dem (R)-Enantiomer des MCP zu wachsen, (S)-MCP wird hingegen nicht verwertet (Tett et al., 1994/97). Im Falle von *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 (P230) konnte gezeigt werden, dass für die Verwertung der (R)-Enantiomere ein konstitutives Enzym verantwortlich ist. Das Enzym der (S)-Enantiomeren-Spaltung ist induzierbar (Müller et al., 2001). *Sphingobium herbicidovorans* MH (MH) ist in der Lage, beide Enantiomere der Phenoxypropionate komplett zu verwerten (Horvath et al., 1990). Induktionsversuche haben gezeigt, dass Enantiospezifität für den ersten Spaltungsschritt vorliegt, das (S)-spezifische Enzym in MH ist konstitutiv, das (R)-spezifische induzierbar (Nickel et al., 1993). Ebenso konnte eine enantiospezifische Aufnahme der Herbizide nachgewiesen werden (Zipper et al., 1998). Für *Delftia acidovorans* MC1 (MC1) konnte erstmals der Beweis für die Existenz von zwei Enzymen erbracht werden. Durch die Aufreinigung des Rohextraktes am Anionenaustauscher (*Source30Q*) konnten enantioselektive Enzyme voneinander getrennt werden, kinetische Eigenschaften blieben weitgehend offen (Müller und Babel, 1999).

1.4 Problemstellung

Es sind bislang nur wenige Stämme bekannt, die über ein breites Substratverwertungsspektrum für Phenoxalkanoate verfügen. Viele Bakterien-Stämme sind dazu in der Lage, die Phenoxacetate zu verwerten, spalten aber die Phenoxypionate und -butyrate nicht oder nur in sehr geringem Umfang. Anders ist dies bei *Delftia acidovorans* MC1, *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH, sie spalten sowohl die Phenoxacetate als auch die Enantiomere der Phenoxypionate (z.T. auch die Phenoxybutyrate).

Ziel dieser Arbeit ist es, den initialen Schritt der bakteriellen Spaltung substituierter Phenoxalkanoate biochemisch zu beschreiben. Hierzu sollen die initialen Enzyme gereinigt und proteinbiochemisch hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften, ihrer Primär- und Quartär-Struktur sowie eventueller Modifikationen untersucht werden. Die enzymkinetische Beschreibung der Enzyme soll die Aufnahme und Diskussion von Substratverwertungsspektren, kinetischer Kennlinien und Konstanten umfassen. Auf enantioselektive Eigenschaften soll eingegangen und die erhaltenen Ergebnisse sollen über die Spezies-Grenzen hinaus verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

Als Quelle zur Isolierung von *Delftia acidovorans* MC1 (Müller et al., 1999a) und *Rhodoferrax* sp. P230 (Ehrig et al., 1997) diente Herbizid-kontaminierter Bauschutt. *Sphingobium* (*Sphingomonas*) *herbicidovorans* MH (Zipper et al., 1996; Takeuchi et al., 2001) (früher *Flavobacterium*) wurde aus einer Bodenprobe isoliert (Horvath et al., 1990).

***Delftia acidovorans* MC1** (MC1) ist ein bewegliches, gramnegatives Stäbchen mit einer Länge von 3-12 µm und einem Durchmesser von 0,7-1 µm. Es ist in der Lage, die Herbizide (R,S)-DP und (R,S)-MCPD produktiv zu verwerten; er wächst prototroph auf den Herbiziden und zeigt zudem einen signifikanten MCPA- und 2,4-D-Umsatz. Im Genom von MC1 konnten die codierenden Gene (*tfdB*, *tfdC*, *tfdD*) für die Enzyme des modifizierten *ortho*-Weges nachgewiesen werden, welche plasmidal codiert sind. Untersuchungen mit *tfdA*-spezifischen Sonden zeigten dagegen kein Signal (Müller et al., 2001).

Bei ***Rhodoferrax* sp. P230** (P230) handelt es sich um einen gramnegatives, bewegliches, stäbchenförmiges Bakterium. Der Stamm P230 ist in der Lage, sowohl (R,S)-DP und (R,S)-MCPD als auch 2,4-D und MCPA zu verwerten. Prototrophes Wachstum mit Phenoxyalkanoaten als einzige Kohlenstoff und Energiequelle ist dagegen nicht möglich. Es werden unterschiedliche Vitamine (Thiamin, Biotin), besser noch Hefeextrakt für ein optimales Wachstum benötigt. Im Genom von P230 konnten die Gene (*tfdA*, *tfdB*, *tfdC*, *tfdD*) der degradativen Enzyme des *ortho*-Weges nachgewiesen werden (Müller et al., 2001).

***Sphingobium herbicidovorans* MH** (MH) weist ebenfalls eine Stäbchenform auf (Länge 1,0-2,1 µm; Durchmesser 0,4-0,7 µm) und ist in der Gram-Färbung negativ. Es ist ein unbewegliches, gelb pigmentiertes Bakterium. Der Stamm ist in der Lage, auf den Phenoxypropionaten und -acetaten zu wachsen, kann aber auch Phenoxybutyrate verwerten (Horvath et al., 1990). Auch im Genom von MH konnten die Gene *tfdB*, *tfdC* und *tfdD* nachgewiesen werden (Zipper et al., 1996).

2.2 Kultivierung

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Geräte zur Kultivierung inklusive Zubehör und alle Nährmedien wurden 20 Minuten im Autoklav bei 121°C und 1,1 kPa sterilisiert. Herbizide wurden steril filtriert (Porenweite der Filter: 0,2 µm).

2.2.1 Medien

- **Spurensalzlösung:** 71,2 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,615 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$; 0,44 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,785 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 49,8 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,252 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; pH-Wert mit 1N H_2SO_4 auf $\leq 1,5$ einstellen
- **Mineralsalzmedium:** 1/10 Spurenelementlösung (v/v); 1,523 g/l NH_4Cl ; 0,6805 g/l KH_2PO_4 ; 0,8709 g/l K_2HPO_4 ; 0,011 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; pH 8
- **Selektivagar:** 2 g/l OXOID®-Agar; 50 % Mineralsalzmedium in Wasser; 0,4 g/l (R,S)-DP; pH 8,5
- **PYE-Medium:** 3 g/l Bacto®-Pepton; 3 g/l Hefeextrakt; 1,802 g/l Fructose; pH 8,5
- **PYE-Agar:** PYE-Medium; 1,8 g/l Bacto®-Agar; pH 8,5
- **Substrat:** 20 g/l (R,S)-DP in 0,1 M NaOH
- **LB-Medium:** 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl; pH 7,0

2.2.2 Batch-Kultivierung

Die Bakterienstämme MC1, P230 und MH wurden im Batch-Verfahren in 0,5 l Kulturen in 1 l Erlenmeyerkolben rangezogen. Angeimpft wurden die Kolben jeweils mit etwa zehn Bakterienkolonien, die zuvor auf Selektivagar mit (R,S)-DP als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen wurden. Kultiviert wurde über Nacht in PYE-Medium, bei 30°C unter aeroben Bedingungen auf einer Schüttelbank (Swip SM 25 DIGI, Edmund Bühler, BRD) mit einer Frequenz von 155 rpm. Anschließend wurden zur Induktion von Enzymen des (R,S)-DP-Abbauweges 100 mg/l (R,S)-DP zugegeben. Der Abbau des Herbizides wurde mittels HPLC-Analyse (siehe Abschnitt 2.8.2) kontrolliert und die Kultur nach vollständigem Abbau der Herbizide geerntet oder im Falle von MC1 als Inokulum für eine anschließende Fed-Batch-Kultivierung eingesetzt. Die Reinheit der Kultur wurde durch Ausstriche auf PYE-Agar-Platten geprüft.

2.2.3 Batch-Kultivierung genetisch veränderter Mikroorganismen

Die Vorkultur genetisch veränderter Mikroorganismen wurde über Nacht in LB-Medium (0,05 g/l Ampicillin) (30°C, 180 rpm) im 300 ml-Maßstab angezogen. Mit diesen Bakterien wurde die Hauptkultur (LB-Medium + 0,1 g/l Ampicillin) mit einer $\text{OD}_{700} = 0,1$ angeimpft und bei 27°C und 220 rpm inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde fortwährend über die optische Dichte verfolgt. Bei einer $\text{OD}_{700} = 0,5$ wurden zur Induktion der Proteinsynthese des zu überexprimierenden Enzyms 2 ng/l Anhydrotetracyclinhydrochlorid zugesetzt. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet.

2.2.4 Fed-Batch-Kultivierung

Die Fed-Batch-Kultivierung der Hauptkultur erfolgte in einem Fermenter (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz, Typ ALGU 503) im 17 l Maßstab unter sterilen Bedingungen. Angeimpft wurde mit 2 l der Vorkultur in 15 l Mineralsalzmedium. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C, pH 8 und 800 rpm. Die Bakterienkultur wurde mit 1,5 l/h Luft belüftet. Die Spurenelementlösung wurde ständig mit einer Flussrate von 0,77 ml/h zugegeben. Die Schaumbildung wurde bei Bedarf durch Zugabe von Entschäumer (5%ige Silikon-Antischaum-Emulsion) unterdrückt. Der Biomassezuwachs sowie der Substratverbrauch wurden verfolgt, so dass der Zufluss des Substrates fortwährend dem Wachstum der Bakterien angepasst werden konnte. Ab dem vierten Tag der Kultivierung wurden täglich 8 l Bakteriensuspension geerntet und der Fermenter anschließend mit Mineralsalzmedium wieder auf 17 l aufgefüllt. Die Reinheit der Kultur wurde täglich durch Ausstriche auf PYE-Agar-Platten kontrolliert.

2.3 Enzymreinigung

2.3.1 Zellernte und Zellaufschluss

Die Ernte der Zellen erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation (Hettich Sepatech Varifuge 20RS, BRD) der Zellsuspension bei 4°C und 8875×g. Die Zellen wurden dreimal mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) gewaschen und anschließend zur Lagerung bei -20°C im gleichen Puffer aliquotiert eingefroren.

Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe der French-Pressure Cell Press Technik (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) in Tris/HCl Puffer (10 mM, pH 7,5). Die optische Dichte der Zellsuspension bei 700 nm betrug zwischen 80 und 140. Die Desintegration erfolgte über drei Passagen bei einem angelegten Druck von 20000 psi (1379 bar). Anschließend wurde der Extrakt 25 min bei 4°C und 20000×g zentrifugiert (ZK 380, Berthold Hermle GmbH & Co-Zentrifugen, Gosheim, BRD). Der Überstand stellt den Rohextrakt dar.

2.3.2 Reinigung der nativen Enzyme

2.3.2.1 Protaminsulfat- und Ammoniumsulfat-Fällung

Dem aus dem Zellaufschluss gewonnenen Rohextrakt wurde 1%ige Protaminsulfatlösung (pH 7) bis zu einer Konzentration von 0,15% zugesetzt und unter ständigem Rühren 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Bestandteile durch Zentrifugation (4°C, 20 min, 20000×g, ZK 380, Hermle, Gosheim, BRD) von der löslichen Fraktion abgetrennt. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dazu wurde unter ständigem Rühren bei 4°C festes Ammoniumsulfat bis zu einer

Konzentration von 1,25 M zugegeben. Nach 20 min wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert (4°C, 20 min, 20000×g, ZK 380, Hermle, Gosheim, BRD) und verworfen. Dem Überstand wurde wiederum festes Ammoniumsulfat zugesetzt, bis eine Konzentration von 2,5 M erreicht wurde. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in konzentrierter Form in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) aufgenommen und einer Entsalzung unterzogen (siehe 2.4.1).

2.3.2.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Die säulenchromatographischen Reinigungen erfolgten an dem GradiFrac System (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) mit der Pumpe P1 (LKB-Pumpe P-1, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden), dem Fraktionssammler (Gradi-Frac-Fraktionssammler, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) und dem UV-Detektor UV-1. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2.3.2.2.1 an *Source30Q*

Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte an einer *Source30Q* Säule (Ø 2,5 cm, Länge 14 cm, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, BRD). Die Säule wurde mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) equilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde das nicht gebundene Protein mit dem gleichen Puffer abgewaschen. Eluiert wurde das Sdp_{AMCl} mit einem linearen Gradienten von 0–0,15 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 240 ml. Es wurden Fraktionen zu 8 ml gesammelt. Das Rdp_{AMCl} wurde mit einem Gradienten von 0,15–0,4 M NaCl in Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 320 ml eluiert. Auch hier betrug die Fraktionsgröße 8 ml. Der Gradient wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers generiert. Als Puffer kamen Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) und 1 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) zum Einsatz. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Fraktionen wurden auf Enzymaktivität und Proteingehalt untersucht. Regeneriert wurde die Säule durch Waschen mit 1 M NaCl in Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) und Equilibrierung mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5).

2.3.2.2.2 an *PBE94*

Die Enzyme aus MH und P230 wurden einer Aufreinigung an dem Anionenaustauscher *PBE94* (80 ml Bettvolumen, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, BRD) unterzogen. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) equilibriert und nach Probenauftrag mit 0,1 M NaCl in Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) gewaschen. Das Protein wurde mit einem NaCl-Gradienten von 0,10–0,35 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (10 mM,

pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 800 ml eluiert. Die Flussrate betrug 1 ml/min, es wurden 8 ml-Fractionen gesammelt.

2.3.2.3 Hydrophobe Chromatographie

Die hydrophobe Chromatographie erfolgte an einer Butyl-Sepharose-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, BRD) mit einem Bettvolumen von 20 ml. Die Säule wurde für die Reinigung der Enzyme mit der jeweiligen Konzentration Ammoniumsulfat in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) equilibriert. Eluiert wurde das Protein mit den in Tabelle 1 aufgeführten Gradienten. Der Gradient wurde aus den Puffern 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) und Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) gemischt. Es wurden 8 ml-Fractionen gesammelt, die auf Enzymaktivität und Proteingehalt untersucht wurden. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Tabelle 1: Elutionsbedingungen für die (S)- und (R)-spezifischen Enzyme der Stämme MC1, MH und P230 an Butyl-Sepharose

Enzym	Ammoniumsulfatgradient
RdpA _{MC1}	1,07-0,35 M in 480 ml
RdpA _{MH}	1,125-0,45 M in 480 ml
RdpA _{P230}	1,07-0,3 M in 240 ml
SdpA _{MC1}	0,3-0 M in 300 ml
SdpA _{MH}	1,125-0,45 M in 480 ml
SdpA _{P230-1}	0,975-0 M in 360 ml
SdpA _{P230-2}	0,975-0 in 360 ml

2.3.2.4 Präparative Gelelektrophorese

Die Separation der isomeren Enzymformen des SdpA_{MC1} und des RdpA_{MC1} erfolgte mittels präparativer Elektrophorese mit der Prep Cell (Modell 491) von Bio-Rad (München, BRD). Kombiniert wurde das Gerät mit einem UV-Detektor (Modell EM-1), einem Fraktionssammler (Modell 2110), einem Flachbettschreiber (Modell 1327) und einer Econo-Pumpe (Modell EP-1), ebenfalls von der Firma Bio-Rad (München, BRD).

2.3.2.4.1 Trennung der RdpA_{MC1}-Enzymformen

Die Auftrennung der nativen RdpA_{MC1}-Enzymformen erfolgte im kontinuierlichen nativen Elektrophoresesystem. Bei dieser Methode muss auf die Vorteile eines Sammelgels verzichtet werden, daher ist es wichtig, die Proteinprobe so konzentriert wie möglich auf das Gel aufzubringen. Es wurde das Imidazol/HEPES-Puffersystem (pH 7,4) genutzt. In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung der Puffer und des Gels dargestellt. Die Abmessungen des Gels sowie die Laufbedingungen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die Elution der Enzyme erfolgte mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) und einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min. Es wurden 3 ml-Fractionen gesammelt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Gele und Puffer der kontinuierlichen Elektrophorese

Gel	5% T / 2,6% C 8,6 mM Imidazol, 7 mM HEPES, pH 7,4	
Puffer	Laufpuffer	Probenpuffer
	43 mM Imidazol 35 mM HEPES pH 7,4	4,3 mM Imidazol 3,5 mM HEPES pH 7,4 40% Glycerin (v/v) 0,02% Bromphenolblau (w/v)

2.3.2.4.2 Trennung der SdpA_{MC1}-Enzymformen

Die präparative Trennung der SdpA_{MC1}-Enzymformen erfolgte in einem diskontinuierlichem nativen Acrylamidgel unter Verwendung des Tris/Glycin-Puffersystems nach Laemmli et al. (1970). Es wurde der native Probenpuffer der Firma Invitrogen genutzt. Das Protein wurde mit Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) und einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert und in 3 ml Fraktionen aufgefangen. Die gesamte Präparation erfolgte bei einer Temperatur von 4°C.

Tabelle 3: Trennbedingungen der SdpA_{MC1}-Enzymformen mittels präparativer Elektrophorese

Sammelgel	4% T / 2% C
Sammelgelhöhe	1,5 cm
Trenngel	6% T / 2% C
Trenngelhöhe	10,3 cm
Gelröhrengroße	37 mm ID
Probenmenge	18,5 mg SdpA _{MC1} HIC
Laufbedingungen	200 V konstant
Laufzeit	ca. 48 h

2.3.3 Reinigung der rekombinanten Enzyme RdpA_{MC1}-rec und SdpA_{MC1}-rec

2.3.3.1 Affinitätschromatographie

Mittels der Affinitätschromatographie ist es möglich, markierte Proteine in einer Einschritt-reinigungsprozedur in hochreiner Form darzustellen. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, die überexprimierten Enzyme SdpA_{MC1}-rec und RdpA_{MC1}-rec, welche N-terminal um eine Strep-tag(II) Sequenz (NH₂-WSHPQFEK-COOH, Schmidt et al., 1996) verlängert wurden, aufzureinigen. Als Säulenmaterial wurde Strep-Tactin Superflow (10 ml) (Voss und Skerra, 1997) der Firma IBA (Göttingen, BRD) genutzt. Das Chromatographiematerial wurde zunächst mit Tris/HCl (100 mM, pH 8,0) equilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde das nicht spezifisch gebundene Protein mit dem gleichen Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Anschließend wurde die Säule mit Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 8,0) + 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin in Tris/HCl (100 mM, pH 8,0). Es wurden Fraktionen zu

10 ml gesammelt. Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde 1 mM HABA in Tris/HCl (100 mM, pH 8,0) verwendet.

2.3.3.2 Abspaltung der Strep-tag(II)-Sequenz

Zur Abspaltung der Strep-tag(II)-Sequenz wurde das Eluat der Affinitätsreinigung mittels Vivaspin 20 (MWCO 30000) in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) + 100 mM NaCl + 1 mM CaCl umgepuffert (siehe 2.4.2). Pro mg Fusionsprotein wurden 50 µg des proteolytischen Enzyms Faktor Xa (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, BRD) zugesetzt. Die Spaltung erfolgte über 18 h bei 13°C. Nicht gespaltenes Protein sowie die abgespaltenen Strep-tag(II)-Sequenzen wurden durch eine Passage über die Affinitätssäule mit Strep-Tactin abgetrennt.

2.4 Aufkonzentrieren, Umpuffern und Entsalzen

2.4.1 Säulenchromatographisch mittel Gelfiltration

Die Entsalzung der Proteinlösung erfolgte mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie an einer *HiPrep™* 26/10 *Desalting*-Säule (Sephadex® G-25 Fine, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, BRD). Equilibriert wurde die Säule mit dem Laufpuffer Tris/HCl (10 mM, pH 7,5). Die Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min aufgetragen und mit dem Laufpuffer in gleicher Geschwindigkeit eluiert. Es wurden Fraktionen von 10 ml Größe gesammelt. Die Fraktionen wurden auf Leitfähigkeit (2.8.5) und Proteingehalt (2.8.1) geprüft.

2.4.2 Ultrafiltration

Die Entsalzung, Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen wurde bei geringen Proteinmengen mittels Ultrafiltration erreicht. Hierzu wurden Vivaspineinheiten der Firma Vivascience (Hannover, BRD) unterschiedlichen Fassungsvermögens und einer Ausschlussgröße von 10 oder 30 kD verwendet. Die Ultrafiltration erfolgte mittels Zentrifugation im Swingout-Rotor bei 3000×g und 10°C (ZK 380, Hermle, Gosheim, BRD). Das Protein wurde mit reichlichen Mengen des jeweilig benötigten Puffers gewaschen.

2.5 Proteinbiochemische Untersuchungen

2.5.1 Säulenchromatographische Bestimmung der Molmasse

Die Molmasse (MM) der nativen Enzyme wurde mittels Größenausschlusschromatographie an der Bio-Sil™ SEC-250 Säule (300 mm×7,8 mm von Bio-Rad, München, BRD) bestimmt. Die Erstellung der Eichkurve erfolgte mit einem Standard, der fünf Komponenten enthielt: *Thyroglobin 670 kD*, *Bovin gamma globin 158 kD*, *Chicken ovalbumin 44 kD*, *Equine my-*

oglobin 17 kD, Vitamin B12 1,35 kD. Als Laufpuffer wurde 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,8) mit 0,15 M NaCl verwendet. Die Gelfiltration erfolgte an einer HPLC-Anlage (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 23°C, einem Druck von 70 bar und einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden 20 µl Probe auf die Säule aufgetragen. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Die Bestimmung der MM von Monomeren der untersuchten Enzyme erfolgte nach Denaturierung der Proteine. Dazu wurde 1% SDS (w/v) zum Protein gegeben und der Ansatz einer 10-minütigen Inkubation bei 95°C unterzogen. Dem Laufpuffer wurde 0,5% SDS (w/v) zugesetzt.

2.5.2 Bestimmung der Anzahl funktionell aktiver Zentren

Die Fraktion des funktionell aktiven Enzyms in den einzelnen Enzympräparaten wurde über die Bindung von α -KG ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass die Bindung hoch spezifisch am aktiven Zentrum erfolgt. Dazu wurde das Enzym mit einer adäquaten Menge von α -Ketoglutarat in entgastem Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) für 15 min bei 30°C unter Stickstoff-Atmosphäre und ständigem Schütteln im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, BRD) inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Ultrafiltration mittels Vivaspin 2 (Polyethersulfon, MWCO 30000, Vivascience, Hannover, BRD) bei 10°C und 3000×g (Hermle Tischzentrifuge) von der α -Ketoglutaratlösung getrennt. Nicht gebundenes α -Ketoglutarat wurde chromatographisch bestimmt (siehe 2.5.2).

2.5.3 Gelelektrophoretische Methoden

2.5.3.1 SDS-PAGE

Die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine zur Reinheitskontrolle erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen in einem 12%ige Acrylamidgel. Es wurden pro Spur 1-2 µg Protein in Probenpuffer aufgetragen. Die Stromstärke betrug 10 mA/Gel.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele und Puffer der SDS-Gelelektrophorese

Gel	Trenngel	Sammelgel
	12% T/2,67% C Tris/HCL (0,375 M, pH 8,8) 0,1% SDS (w/v) 0,05% APS (w/v) 10 µl Temed	4% T/2,67% C Tris/HCL (0,125 M, pH 6,8) 0,1% SDS (w/v) 0,05% APS (w/v) 10 µl Temed
Puffer	Laufpuffer	Probenpuffer
	2,9 g/l Tris 14,4 g/l Glycin 1,0 g/l SDS	2,0 ml Glycerol 0,5 ml 1% Bromphenolblau (w/v) 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 4,0 ml 10% SDS (w/v) mit Wasser auf 10 ml auffüllen

Standard: Mark 12™ Wide Range Protein Standard (Novex, San Diego, USA) Myosin 200 kD; β -Galactosidase 116,3 kD; Phosphorylase B 97,4 kD; Rinderserumalbumin 66,3 kD; Glutamatdehydrogenase

55,4 kD; Laktatdehydrogenase 36,5 kD; Carboanhydrase 31 kD; Trypsininhibitor 21,5 kD; Lysozym 14,4 kD; Aprotinin 6 kD; Insulin- β -Kette 3,5 kD; Insulin- α -Kette 2,5 kD

2.5.3.2 Native Gelelektrophorese

2.5.3.2.1 Kontinuierliche Gelelektrophorese

Die Auftrennung der nativen RdpA-Enzymformen erfolgte im Minigel, wie in 2.3.2.4.1 beschrieben.

2.5.3.2.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese

Um das SdpA nativ aufzutrennen, wurde das Tris/Glycin-Puffersystem benutzt. Es wurden 6% T/2% C-ige Gele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele und Puffer ist in Tabelle 4 dargestellt. SDS wurde in diesem Fall weggelassen. Die Laufbedingungen wurden nicht verändert.

Standard: *High molecular weight calibration kit* (Amersham Pharmacia, Freiburg, BRD), Thyroglobin 667 kD; Ferritin 440 kD; Katalase 232 kD; Laktatdehydrogenase 66 kD

2.5.3.3 Peptid-Gelelektrophorese

Die Peptid-Gelelektrophorese wurde, wie von Schagger und Jagow (1987) beschrieben im Tris/Tricin-Puffer durchgeführt (Tabelle 5). Die Stromstärke betrug für 0,5 h zunächst 10 mA/Gel und wurde dann für 4 h auf 20 mA/Gel erhöht.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Gels und der Puffer für die Peptidelektrophorese

Gel	Sammelgel	„Spacer“-Gel	Trenngel
	4% T / 3% C 0,75 M Tris/HCl, pH 8,45 0,25% SDS (w/v) 0,01% APS (w/v) 0,001% TEMED (v/v)	9,6% T/3% C 1 M Tris/HCl, pH 8,45 1% SDS (w/v) 0,01% APS (w/v) 0,001% TEMED (v/v)	13% T/3% C 0,82 M Tris/HCl, pH 8,45 27% Glycerin (v/v) 0,8% SDS (w/v) 0,01% APS (w/v) 0,001% TEMED (v/v)
Puffer	Anoden-Puffer	Kathodenpuffer	Proben-Puffer
	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9	0,1 M Tris 0,1 M Tricine 0,1% SDS (w/v)	0,05 M Tris/HCl, pH 6,8 0,3 M Mercaptoethanol 12% Glycerol (v/v) 4% SDS (w/v) 0,1% Coomassie-Brillant- blauG250 (w/v)

Standard: *Ultra low range standard* (Sigma, BRD), Triosephosphatisomerase 26,6 kD; Myoglobin 17 kD; α -Lactalbumin 14,2 kD; Aprotinin 6,5 kD; Insulin- β -Kette 3,5 kD; Bradykinin 1,06 kD

2.5.3.4 2D-Gelelektrophorese

Die isoelektrische Fokussierung wurde in der *IPG Phore Electrophoresis-Einheit* von Pharmacia (Uppsala, Schweden) durchgeführt, die anschließende SDS-PAGE in der Hoefer *Dalt Electrophoresis-Einheit* (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Gele wurden im *GelAir Dryer* (Bio-Rad, München, BRD) getrocknet.

2.5.3.4.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Die entsalzten Proben für die 2D-Gelelektrophorese wurden zunächst mit 10% TCA behandelt und das gefällte Protein 3mal mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Protein in 80 µl Probenpuffer aufgenommen und 10 min unter ständigem Schütteln inkubiert (1400 rpm). Nach Zugabe von 320 µl IEF-Puffer (Tabelle 6) und 5 min Inkubation wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (30 min, 10000×g, 20°C). Es wurden 350 µl des Überstandes pro *DryStrip* aufgetragen und anschließend mit 2 ml *DryStrip Cover Fluid* überschichtet.

Tabelle 6: Pufferzusammensetzung und Laufbedingungen für die IEF

Puffer	Probenpuffer		IEF-Puffer	
	250 µl IEF-Puffer 5 mg CHAPS 2,5 µl Bromphenolblau (1mg/ml)		600 mg Harnstoff 800 µl dest. Wasser 25 µl Triton X-100 6,5 µl IPG-Puffer pH 3-10 (Pharmacia) 3,5 mg DTT	
Laufbedingungen	Schritt	U [V]	t [h]	Vh
analytisch	Rehydratisierung	0	10	0
	1	500	0,01	2,5
	2	500	1	500
	3	8000	5	21250
	4	8000	10	80000
präparativ	Rehydratisierung	0	10	0
	1	500	0,01	2,5
	2	500	10	5000
	3	8000	5	21250
	4	8000	25	200000

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die *DryStrips* mit Wasser gespült und dann 15 min in 2 ml Reduktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6M Harnstoff, 30% Glycerol (v/v), 4% SDS (w/v), 2% DTE (w/v)) equilibriert. Im Anschluss wurden die *DryStrips* 15 min in 2 ml Modifizierungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6M Harnstoff, 30% Glycerol (v/v), 4% SDS (w/v), 2,5% Iodacetamid (w/v), eine Spatelspitze Bromphenolblau) inkubiert.

2.5.3.4.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte in einem großen 12%igen SDS-Gel. Die Zusammensetzung des Gels und der Puffer entspricht den Angaben in Tabelle 4. Der Lauf erfolgte bei 100 V (16-20 h) unter ständiger Kühlung durch einen externen Thermostaten bei 12°C.

2.5.3.5 Western-Blot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel 5 min in Wasser gewaschen und anschließend 10-15 min in 10 mM CAPS/NaOH-Puffer (pH 11) equilibriert. Die PVDF-Membran (Bio-Rad, USA) wurde zunächst in reinem Methanol gut befeuchtet, durch Wasserzugabe wurde der Methanolgehalt langsam verringert und anschließend wurde die Membran in CAPS/NaOH-Puffer mit 20% Methanol (v/v) equilibriert. Ebenso wurde ein Stück Filterpapier behandelt. Ein weiteres Stück Filterpapier wurde in CAPS/NaOH mit 5% Methanol (v/v) getränkt. Anschließend wurden die Komponenten sandwichartig von der Anode zur Kathode wie folgt geschichtet: Filterpapier (5% Methanol (v/v)), Gel, PVDF-Membran, Filterpapier (20% Methanol (v/v)). Der Proteintransfer erfolgte als sogenannter *semidry-blot* in einer *Trans Blot Semi-Dry Cell* (Bio-Rad, USA) für 2 h bei 2 mA/cm². Im Anschluss wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (siehe 2.5.4.2) und getrocknet.

2.5.4 Färben, Scannen und Auswerten

2.5.4.1 Silber-Färbung

Tabelle 7: Protokoll zur Herstellung und Durchführung der modifizierten Silberfärbung nach Blum et al. (1987)

Lösung	Herstellung	Färbezeit
Fixierer	50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) in Wasser	1 h
Waschlösung I	30% Ethanol (v/v) in Wasser	3 × 20 min
Thiosulfatlösung	2,5 ml 1%ige Natriumthiosulfatlösung mit Wasser auf 250 ml auffüllen	1 min
Wasser	-	3×20 s
Imprägnierer	25 ml 2%ige Silbernitratlösung und 100 µl 37%ige Formaldehydlösung mit Wasser auf 250 ml auffüllen	20 min
Wasser	-	2×2 min
Entwickler	15 g Na ₂ CO ₃ in Wasser lösen, 60 µl 37%ige Formaldehydlösung, 100 µl 1%ige Thiosulfatlösung zugeben und mit Wasser auf 250 ml auffüllen (erst kurz vor der Verwendung herstellen)	5–20 min
Wasser	-	1,5 min
Stopper	50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) in Wasser	10 min
Preservelösung	12% Glycerin (v/v) in Wasser	20 min

2.5.4.2 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden für 15 min in der Färbelösung (9% Eisessig (v/v), 45% Methanol (v/v), 0,2% Coomassie-Brillantblau G250 (w/v) in Wasser) inkubiert und anschließend durch Schütteln in der Entfärbelösung (7,5% Eisessig (v/v), 5% Methanol (v/v) in Wasser) aufbereitet. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals gewechselt.

2.5.4.3 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung (1,6% *ortho*-Phosphorsäure (v/v), 20% Methanol (v/v), 0,6 M Ammoniumsulfat, 0,08% Coomassie Brilliantblau G250) (w/v) in Wasser) geschwenkt. Anschließend wurde der Hintergrund durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wieder entfärbt.

2.5.4.4 Scannen und Auswerten

Getrocknete Gele und Blot-Membranen wurden mit einem Flachbettscanner (Powerlook 2000, Umax) eingescannt. Die erhaltenen Bitmap-Dateien wurden für die weitere Verarbeitung mit Bildauswertungssoftware im TIF-Dateiformat gespeichert. Die in der Software MagicScan 4.1 genutzten Einstellungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Einstellungen der Software MagicScan 4.1 bei der Bildaufnahme mit dem Flachbettscanner (Powerlook 2000, Umax)

Einstellung	Silber-/Coomassie-Färbung	Western Blots
Vorlage	Durchsicht	Aufsicht
Betriebsart	Graustufen/ Echtfarben	Graustufen
Auflösung	200 dpi	200 dpi
Entrastern	aus	aus
Filter	ohne Filter	ohne Filter
Lichter	0	Auto
Schatten	255	Auto
Gamma	1	Auto

2.5.5 Enzymatischer und chemischer Verdau von Proteinen

Die proteolytische Spaltung der Proteine erfolgte nach dem Protokoll von Shevchenko et al. (1996), modifiziert nach Kinter und Sherman (2000).

Tabelle 9: Arbeitsschritte zur Durchführung der enzymatischen und chemischen Spaltung von Proteinen im Gel

Schritt	Durchführung	Zeit
1	200 µl 50% Methanol (v/v), 5% Essigsäure (v/v), 45% dest. Wasser (v/v), schütteln, Überstand verwerfen	3 x 3 h
2	200 µl Acetonitril, schütteln, Überstand verwerfen	5 min
3	Vakuumzentrifugation	5 min
4	30 µl 10 mM 1,4-Dithioerythritol in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, schütteln, Überstand verwerfen	30 min
5	30 µl 100 mM Iodacetamid in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, schütteln, Überstand verwerfen	30 min
6	200 µl Acetonitril, schütteln, Überstand verwerfen	5 min
7	200 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, schütteln, Überstand verwerfen	10 min
8	200 µl Acetonitril, schütteln, Überstand verwerfen	5 min
9	Vakuumzentrifugation	5 min
10 a	Gelstück mit Enzymlösung* ¹⁻³ überschichten, 37°C	über Nacht
10 b	30 µl BNPS-Skatollösung (500 µg in 500 µl 75%ige Essigsäure), 47°C	1 h
11	+ 30 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, schütteln, Überstand sammeln	10 min

12	30 µl Extraktionspuffer, schütteln, Überstand sammeln	2 x 10 min
13	Vakuumzentrifugation bis zur Trockene	

*¹N-terminale Sequenzierung: 2,5 µg LysC/50 µl 25 mM Tris/HCl pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,05% SDS

*²MS-Analyse: 0,1 µg Trypsin/µl Ammoniumcarbonatlösung (100 mM)

*³MS-Analyse: 0,05 µg AspN/µl Ammoniumcarbonatlösung (100 mM)

N-terminale Sequenzierung: BNPS: 3-Bromo-3-methyl-2-(2-nitrophenylmercapto)-3H-indol (Sigma, BRD)

Extraktionspuffer: 10 ml Acetonitril, 5 ml dest. Wasser, 1,176 ml 85%ige Ameisensäure

2.5.6 N-terminale Sequenzierung von Proteinen und Datenbankrecherche

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen erfolgte instrumentalisiert nach dem Prinzip des Edman-Abbaus. Nach dem Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden diese ausgeschnitten und direkt auf der Membran fixiert im Proteinsequenzer (Applied Biosystems Procise 491 cLC) analysiert.

Zur Einordnung der Proteine in bestehende Enzymklassen wurde eine Datenbanksuche mit NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), die auf bakterielle Proteine beschränkt wurde, durchgeführt. Zur Suche wurde die Matrix Blosom62 verwendet.

Zum direkten Vergleich von Proteinen wurde das Programm MultAlign (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), das auf der Basis des *multiple sequence hierarchical clustering* (Corpet, 1988) basiert, genutzt.

2.5.7 Massenspektrometrische Methoden

2.5.7.1 Identifizierung von Proteinen

Zur Identifizierung von Proteinen wurden diese zunächst im Gel tryptisch verdaut (2.5.5). Anschließend wurden die Peptidgemische mittels Ziptip (Millipore, Billerica, USA) entsalzt. Das Auftragen auf die MALDI-Matrize/Target/Platte erfolgte durch Elution der Peptide aus der Gel-Matrix mit 2 µl einer Lösung aus Acetonitril (60% (v/v)), TFA (0,1% (v/v)) und CHCA (10 mg/ml) in Wasser. Die Proteinidentifizierung wurde mittels des „AP (atmospheric pressure)-MALDI/TRAP XCT“ von *Agilent Technologies* durchgeführt. Mit diesem Gerät ist es unter Einsatz einer Ionenfalle auch möglich, MS-MS-Spektren aufzunehmen. Die Auswertung erfolgte mit der Trap Software 4.2 SR1 Data Analysis v2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, BRD). Mit den erhaltenen Daten wurde dann zur Zuordnung von Peptiden eine Datenbanksuche mit MASCOT (www.matrixscience.com, (Perkins et al., 1999) durchgeführt.

2.5.7.2 Untersuchung von Modifizierungen

Die Untersuchungen zu posttranskriptionalen Modifizierungen erfolgten nach tryptischer In-Gel-Spaltung der Monomere mittels MALDI-TOF-TOF (MS/MS) Analysen mit dem 4700

Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) und ESI-qQ-TOF (MS/MS)-Analysen am Gerät QStar Pulsar von PE Sciex (Applied Biosystems).

2.5.8 Internet-Links

http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam	Ermittlung physikochemischer Eigenschaften aus der Primärstruktur
http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html	Alignment von Primärstrukturen auf der Basis von Aminosäure-Ähnlichkeiten
http://i.moltalk.org/	Alignment von Primärstrukturen auf der Basis bekannter Sekundärstrukturen
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Datenbank zur Suche nach Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen und Genen
http://www.matrixscience.com/search_form_select.html	Datenbank zur Suche nach bekannten Peptidmassen-Fingerprints von Proteinen und MS/MS-Ionen

2.6 Enzymkinetische Untersuchungen

2.6.1 Bestimmung der Phenoxyalkanoat-Spaltungsaktivität

Der Enzymtest umfasst zwei Schritte, erstens die Spaltungsreaktion und zweitens die Indikatorreaktion. Bei der Spaltung läuft folgende Reaktion ab:



In der Indikatorreaktion wird das entstandene DCP durch die Reduktion von 4-Aminoantipyrin (Emerson, 1943 und 1948) im Alkalischen und der daraus folgenden Bildung eines roten Antipyrin-Farbstoffes nachgewiesen. Die Aktivität des Enzyms wurde mit dem Spektrophotometer (U-2000 Spektrophotometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) durch Messung der 4-Aminoantipyrin-Reduktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 510 \text{ nm}$ bestimmt (Fukumori und Hausinger, 1993b).

Inkubationsansatz (IKA):

10 mM Imidazol/ HCl (pH 6,0)
 1 mM Substrat
 1 mM α -Ketoglutarat
 200 μM Ascorbinsäure
 200 μM Ammoniumeisen-(II)-sulfat
 x μl Enzymlösung

Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 30°C (RdpA) oder bei 25°C (SdpA) unter ständigem Schütteln in einem Thermomixer (Thermomixer Comfort 5355, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 20 mM EDTA-Lösung abgestoppt. Die Farbreaktion erfolgte im Testansatz nach der Modifikation von Fukumori und Hausinger (1993a).

Testansatz:

1 ml IKA

100 µl Borsäure-KCl-NaOH-Puffer (pH10)

10 µl 2%iges 4-Aminoantipyrin

10 µl 8%iges Kaliumhexacyanoferrat-(III)

Nach 5 min Reaktion wurde die Extinktion bei $\lambda = 510$ nm (U-2000 Spektrophotometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bestimmt.

Zur Ermittlung kinetischer Daten wurde der zeitliche Verlauf der Produktbildung durch das Abstoppen von vier IKA innerhalb von zwei Minuten ermittelt. Es wurden Enzymaktivitäten zwischen 2 und 5 mU eingesetzt. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass die ermittelten Umsatzraten zwischen 1 und 14 nmol/min lagen. In diesem Geschwindigkeitsbereich und dem Zeitfenster von zwei Minuten konnte eine *steady state*-Kinetik gewährleistet werden. Es wurden lineare Kurvenzüge mit einem $R^2 \geq 0,99$ erhalten.

2.6.2 Ermittlung der Extinktionskoeffizienten von DCP und MCP

Die Ermittlung der Extinktionskoeffizienten erfolgte durch die Variation der DCP- und MCP-Konzentrationen im Inkubationsansatz der Enzymbestimmungsmethode. Dieser enthielt bis auf das Enzym alle Komponenten des Inkubationsansatzes (siehe 2.6.1). Die Extinktion wurde bei 510 nm gemessen und der Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der Geraden $E_{510} = f(c\text{DCP bzw. MCP})$ bestimmt.

2.6.3 Auswertung der ermittelten Daten

Die kinetische Auswertung erfolgte über die linearisierenden Verfahren nach Lineweaver und Burk, Hanes sowie Eadie und Hofstee. Da es bei diesen Verfahren zu einer Messfehlerverzerrung kommt, wurden die Messwerte nach folgenden Kriterien gewichtet:

Lineweaver-Burk:	$x_i = 1/c_{\text{Substrat}}$	$y_i = 1/v_i$	$w_i = v_i^4$
Hanes:	$x_i = c_{\text{Substrat}}$	$y_i = c_{\text{Substrat}}/v_i$	$w_i = v_i^4/c_{\text{Substrat}}^2$
Eadie-Hofstee :	$x_i = v_i/c_{\text{Substrat}}$	$y_i = v_i$	$w_i = v_i^4 + c_{\text{Substrat}}^2$

$$\text{Anstieg} = \frac{\sum (w_i x_i y_i) * \sum w_i - \sum (w_i y_i) * \sum (w_i x_i)}{\sum (w_i x_i^2) * \sum w_i - (\sum w_i x_i)^2}$$

Gleichung 2: Gleichung zur Berechnung des gewichteten Anstiegs der Regressionsgeraden

$$\text{Abschnitt} = \frac{\sum (w_i y_i)}{\sum w_i} - \text{Anstieg} * \frac{\sum (w_i x_i)}{\sum w_i}$$

Gleichung 3: Gleichung zur Berechnung des gewichteten Abschnitts der Regressionsgeraden

Ebenfalls wurde eine Auswertung der Daten über nichtlineare Regression durchgeführt. Dabei wurden die Messwerte mit Hilfe von SigmaPlot 8 zum einen in die Michaelis-Menten-Gleichung (4) und zum anderen in die Hill-Gleichung (5) gefittet.

$$\text{a) } v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M + [S]} \quad \text{b) } v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M + \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right) * [S]}$$

Gleichung 4: Michaelis-Menten-Gleichung a) ohne und b) mit Substratüberschusshemmung

$$\text{a) } v = \frac{v_{\max} * [S]^n}{K_M + [S]^n} \quad \text{b) } v = \frac{v_{\max} * [S]^n}{K_M + \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right) * [S]^n}$$

Gleichung 5: Hill-Gleichung a) ohne und b) mit Substratüberschusshemmung

2.7 Gentechnische Arbeiten

2.7.1 Nährmedien für gentechnische Arbeiten

- **LB-Medium:** 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl; pH auf 7,0 einstellen
- **Selektivagar:** LB-Medium; 15 g/l Agar; 0,1 g/l Ampicillin; 0,004% X-Gal in DMF; 0,2 g/l IPTG
- **SOC-Medium:** 5 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Trypton; 0,6 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,203 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,02 M Glucose; pH auf 7,0 einstellen

2.7.2 Isolation von Nukleinsäuren

2.7.2.1 Präparation von genomischer DNA

Die genomische DNA von Bakterien wurde durch Hitze-Desintegration der Zellen erhalten. Dazu wurden die Zellen in sterilem Wasser suspendiert und 10 min in einem 100°C Wasserbad belassen. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert (15 min, 15000×g, 4°C). Im Überstand ist sowohl die genomische als auch die plasmidale DNA enthalten.

2.7.2.2 Präparation von plasmidaler DNA

Zur Isolation der Plasmide wurden das Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Invitex GmbH, Berlin) und das Qiagen Midi-Präparation Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Präparation erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.7.3 Ableitung von Primern für die Gene *rdpA*_{MC1} und *sdpA*_{MC1}

Die spezifischen Primerpaare für die Gene *sdpA* und *rdpA* wurden aus ihren Nukleinsäure-Sequenzen (Schleinitz et al., 2004) abgeleitet. Die Primerpaare wurden so generiert, dass die kompletten Gene amplifiziert werden. Gleichzeitig wurden den Primern Sequenzen für die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Eco31I* (GGTCTC) und *BpI* (GAAGAC) zugefügt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Primersequenzen der Gene *rdpA*_{MC1} und *sdpA*_{MC1}

Primer-Bezeichnung	Sequenz
IBA7Rf, <i>rdpA</i> forward	5' -ATGGTAGGTCTCAGCGCATGCATGCTGCACTGTCCCC-3'
IBA7Rr, <i>rdpA</i> reverse	5' -ATGGTAGGTCTCATATCAGCGCGCCGGGCGCACGCC-3'
IBA7Sf, <i>sdpA</i> forward	5' -ATGGTAGAAGACAAGCGCATGCAGACGACGCTGCAGATC-3'
IBA7Sr, <i>sdpA</i> reverse	5' -ATGGTAGAAGACAATATCACACCAGGGCGGCGCCCTCG-3'

Die über die Primer eingeführten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *Eco31I* bzw. *BpI* sind markiert.

2.7.4 PCR-Reaktion zur Amplifizierung der *rdpA*_{MC1}- und *sdpA*_{MC1}-Gene

Die Gene *rdpA*_{MC1} und *sdpA*_{MC1} wurden mit speziellen Primern (siehe 2.7.3) durch PCR aus dem Genom von *Delftia acidovorans* MC1 amplifiziert. Um eine geringe Fehlerrate bei der DNA-Synthese zu gewährleisten und eine TA-Klonierung der Produkte zu ermöglichen, wurden das *Expand Long Template* PCR-System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit einer *Proof-reading*-DNA-Polymerase eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde im 20 µl-Ansatz mit dem Multicycler PTC-200 (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Als *template* wurde 4 µl genomische oder plasmidale DNA, je 10 pmol Primer, 0,175 µM dNTP-Mix, 1 U Polymerase in 1×PCR-Puffer eingesetzt. Die PCR wurde unter den in Tabelle 11 spezifizierten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 11: PCR-Programm zur Amplifizierung der Gene *rdpA*_{MC1} und *sdpA*_{MC1}, es wurden 14 Zyklen unter Nutzung des Programmschrittes Elongation 1 und 16 Zyklen unter Verwendung von Elongation 2 durchgeführt

Programmschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96°C	3 min
Denaturierung	94°C	10 s
Anlagerung der Primer	55°C	30 s
Elongation 1	68°C	45 s
Elongation 2	68°C	45 s + 5 s/Zyklus

Die Kontrolle der PCR-Amplifikate erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (1,5% in TAE: 0,02 M TrisBase, 0,01 M Eisessig, 0,5 mM EDTA) bei einer Spannung von 100 V.

2.7.5 Ligation der Gene *rdpA_{MC1}* und *sdpA_{MC1}* mit dem pGEMT-Vektor

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden direkt unter Nutzung der überhängenden 3'-A-Enden mit dem pGEMT[®]-Vektor-System (Promega, Madison, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers kloniert. Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte bei 14°C über Nacht in einem 10 µl Ansatz. Der Ansatz enthielt Insert-DNA und Vektor-DNA im Verhältnis 1:2, sowie 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) in 1×Ligasepuffer.

2.7.6 Ligation der Gene *rdpA_{MC1}* und *sdpA_{MC1}* mit dem pASK-IBA7-Vektor

Zur Expression der Gene wurde das Plasmid pASK-IBA7 (IBA GmbH, Göttingen) benutzt. In diesem Vektor stehen die Gene unter Kontrolle des starken *tetA*-Promotors (Skerra, 1994), der eine effizient regulierbare Expression durch Induktion mittels Anhydrotetracyclin ermöglicht. Durch die Verwendung von pASK-IBA7 wird eine Strep-tag(II)-Sequenz, welche durch die Spaltung mit der Protease Faktor Xa nach Reinigung des Proteins wieder entfernt werden kann, N-terminal an das Protein synthetisiert.

Die Ligation erfolgte mit dem *Eco31I*-geschnittenen Vektor pASK-IBA7 und dem mittels *BpiI* aus dem Vektor pGEMT geschnittenen Gen nach der Vorschrift siehe 2.7.5.

2.7.7 Übertragung der DNA durch Transformation

2.7.7.1 Transformation

Zur Transformation wurden 100 µl einer Suspension des Stammes *E. coli* (Top10F-Zellen, Qiagen) mit 2 µl der ligierten Plasmid-DNA (siehe 2.7.6) vermischt. Die Probe wurde 30 min auf Eis gelagert, der Hitzeschock zur Aufnahme der DNA erfolgte für 2 min bei 42°C. Im Anschluss wurden die Zellen zur Ausprägung der vektorcodierten Antibiotika-Resistenz 60 min bei 37°C in LB-Medium inkubiert, bevor sie auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.7.7.2 Elektrotransformation

Die Elektroporation wurde mit dem Easyject Plus Elektroporator (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Informationen des Herstellers. Es wurde der Stamm Rosetta[™](DE3)pLysS (Novagene, Madison, USA) verwendet.

Die zur Elektroporation eingesetzte ligierte DNA wurde zunächst nach Marusyk und Sergeant (1980) über Mikrodialyse entsalzt, die Herstellung elektrokompeter Zellen erfolgte nach Nickoloff (1995).

Für die Elektroporation wurden 40 µl der elektrokompeter Zellen und 1 µl DNA eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte in einer 2 mm-Küvette (peqlab Biotechnologie GmbH) entsprechend dem Elektroporationsbericht (Eurogentec, 1995) bei einer Spannung von 2500 V, einer Kapazität von 40 µF, einem Widerstand von 125 Ω und einem Impuls von 5 ms. Sofort nach der Transformation erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium (2.7.1) zur Suspension. Danach wurde das Zellmaterial für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.7.8 Selektion rekombinanter Klone

Nach der Transformation wurden die Zellen auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die rekombinanten Klone wurden über blau/weiß-Selektion erfasst.

2.7.9 DNA-Sequenzierung

Die Kontroll-Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al. (1977) und wurde unter Verwendung des *ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kits* (PE Applied Biosystems) durchgeführt.

Tabelle 12: PCR-Programm (25 Zyklen) und Primersequenzen zur Sequenzierung

Programmschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96 °C	30 s
Anlagerung der Primer	55 °C	15 s
Elongation	60 °C	4 min
Primer	Sequenz	
M13 forward	5'-GACCGGCAGCAAAAT-3'	
M13 reverse	5'-GTCCTTTGTCGATACTG-3'	

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem 10 µl-Ansatz, der 2 µl *BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix* (PE Applied Biosystems), 4 µl denaturierte DNA (5 min bei 98°C), 10 pmol Primer, 2 µl 5×Puffer und 1 µl DMSO enthielt. Die Reaktion erfolgte im Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH) nach dem in Tabelle 12 aufgeführten Programm.

2.8 Analytik

2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) anhand einer Eichkurve mit Rinder Serumalbumin als Referenzprotein. Die Proben wurden entsprechend mit Wasser verdünnt und dann im Verhältnis 1:10 mit Bradfordreagenz versetzt. Nach genau 5 min Inkubation wurde die E₅₉₅ gemessen und anhand der Eichkurve die Proteinkonzentration errechnet.

2.8.2 Bestimmung der Phenoxyalkanoat-Konzentration

Die Phenoxyalkanoate wurden mit HPLC-Analyse detektiert und mit Hilfe eines Standards quantifiziert. Dazu wurden 20 µl der zu analysierenden Lösung an einer Nucleosil-100-C18-Chromatographie-Säule (250 mm × 4 mm, 5 µm Korngröße (Knauer-Säulentechnik, Berlin, BRD)) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ein 40% (v/v) Acetonitril enthaltender Phosphatpuffer (131,5 mM, pH 2,8) verwendet, mit dem die Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min kontinuierlich eluiert wurde. Detektiert wurden die Phenoxyalkansäuren bei $\lambda = 283$ nm mit einem Diodenarray-Detektor (Shimadzu, Duisburg, BRD).

2.8.3 Bestimmung der α -Ketoglutarat-Konzentration

Die α -Ketoglutaratkonzentration wurde in einer proteinfreien Lösung mittels Ionenchromatograph (DX-100) unter Verwendung der Suppressor-Technik bestimmt. Die Ionen wurden am Anionenaustauscher IonPacAS14 (Dionex) getrennt. Als Laufpuffer diente $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Puffer (5,2 mM, pH10), die Laufgeschwindigkeit betrug 2,5 ml/min. Die Ionen wurden anhand ihrer Leitfähigkeit detektiert.

2.8.4 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD_{700}) der Zellsuspension wurde am Spektrometer (U-2000 Spektrometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 700$ nm gemessen. Die Bio-

masse wurde nach folgender Formel berechnet:
$$\text{Biomasse}(\text{g/l}) \approx \frac{\text{OD}_{700}}{2}.$$

Diese Gleichung gilt dabei nur für die Voraussetzung, dass $\text{OD}_{700} \leq 0,3$. Bei Bedarf wurde die Zellsuspension entsprechend mit Wasser verdünnt.

2.8.5 Bestimmung von Leitfähigkeit, Sauerstoffkonzentration und pH-Wert

Die Leitfähigkeit von Lösungen wurde mit Hilfe des Leitfähigkeitsmessgerätes LF 96 (WTW Microprocessor Conductivity Meter LF 96, 82362 Weilheim) gemessen. Anhand von Eichkurven konnte dann die Salzkonzentration in den wässrigen Lösungen ermittelt werden.

Die Sauerstoffkonzentration wurde mit dem Messgerät Multi line P4 mit der Elektrode Oxi-Cal®-SL (WTW, 82362 Weilheim) bestimmt.

Mittels des pH-Meters 765 Calimatic Knick (WTW, 82362 Weilheim) wurden die Protonenkonzentrationen in den Puffern eingestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Enzymreinigung

3.1.1 Reinigung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus *Delftia acidovorans* MC1

3.1.1.1 Säulenchromatographische Enzymreinigung

Vor dem Einsatz der chromatographischen Trennmethode wurden die Nukleinsäuren mittels 0,15%ger Protaminsulfat-Fällung aus dem Rohextrakt entfernt. Anschließend konnte mit einer Ammoniumsulfat-Fällung ein Anreicherungsfaktor von 1,5 für die Herbizidsplattsaktivität erreicht werden. Dabei präzipitierten die Enzyme für die Spaltung von (R,S)-DP, (R,S)-MCPD und 2,4-D in dem Konzentrationsbereich zwischen 1,0 und 2,5 M Ammoniumsulfat fast vollständig (Tabelle 13). Die Auftrennung des aus der Ammoniumsulfat-Fällung resultierenden Proteingemisches am Anionenaustauscher *Source30Q* führte zum Vorliegen von zwei Phenoxyalkanoat-spaltenden Fraktionen mit enantioselektiven Eigenschaften bezüglich der Phenoxypropionate (Abbildung 2).

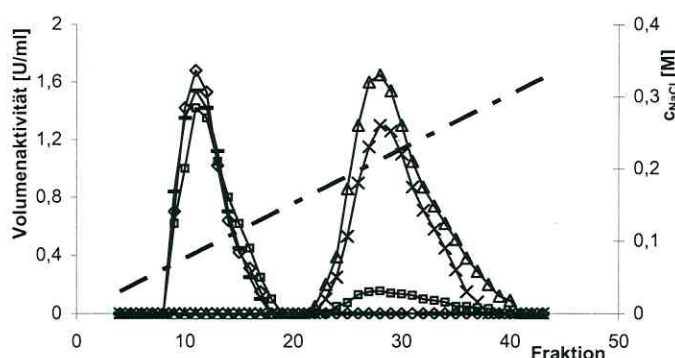


Abbildung 2: Elutionsprofil der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus *Delftia acidovorans* MC1 an *Source30Q*. (S)-DP (◊), (S)-MCPD (—), 2,4-D (□), (R)-DP (Δ), (R)-MCPD (x), NaCl (gestrichelt)

Die Proteinfraction, die bei 0,1 M NaCl von der Säule eluiert (Sdp_{MC1}), enthält die Spaltungsaktivität für die (S)-Enantiomeren der Phenoxypropionate sowie etwa 90% der 2,4-D-Spaltungsaktivität. Bei einer Salzkonzentration von 0,2 M NaCl wird die zweite Enzymfraction (Rdp_{MC1}) von der Säule gewaschen. Sie enthält das Enzym zur Metabolisierung der (R)-Enantiomeren der Phenoxypropionate und daneben noch etwa 10% der Spaltungsaktivität für 2,4-D. An dem Ionenaustauscher *Source30Q* konnte eine Anreicherung von rund 2,5 für die Spaltungsaktivitäten des Rdp_{MC1} und von 7,5 für das Sdp_{MC1} erreicht werden. Bei diesem Reinigungsschritt gingen 40% bzw. 45% der Enzymaktivitäten verloren.

Mittels hydrophober Chromatographie an Butyl-Sepharose konnte das Enzym Sdp_{AMCI} (Elution zwischen 0,43 und 0,38 M (NH₄)₂SO₄; Abbildung 3A) auf das 38-fache und das Enzym Rdp_{AMCI} (Elution zwischen 0,85 und 0,8 M (NH₄)₂SO₄, Abbildung 3B) auf das 5,6-fache der ursprünglichen spezifischen Aktivität angereichert werden. Die Enzymausbeute lag für beide Dioxygenasen bei 40% (Tabelle 13).

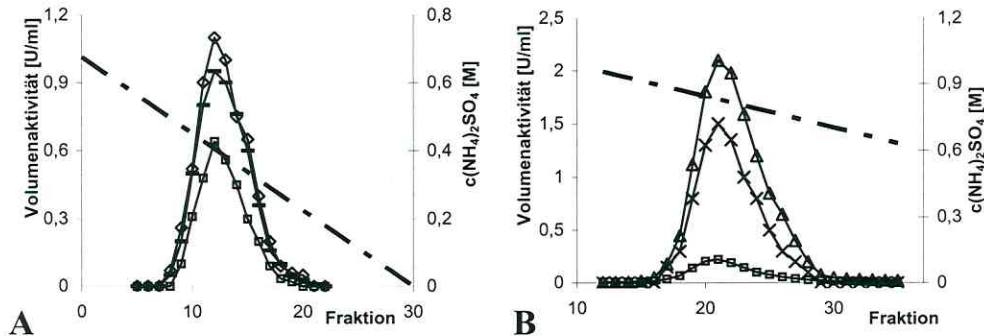


Abbildung 3: Elutionsprofil des Sdp_{AMCI} (A) und Rdp_{AMCI} (B) an Butyl-Sepharose (S)-DP (◇), (S)-MCPP (—), 2,4-D (□), (R)-DP (Δ), (R)-MCPP (x), (NH₄)₂SO₄ (gestrichelt)

Im Anschluss an die hydrophobe Chromatographie wurde das Rdp_{AMCI} mittels Größenausschluss-Chromatographie entsalzt und an dem Anionenaustauscher *PBE94* gereinigt. Bei diesem Reinigungsschritt konnte nochmals eine Anreicherung des Enzyms um den Faktor 2 erreicht werden. Enzymaktivität ging nicht verloren.

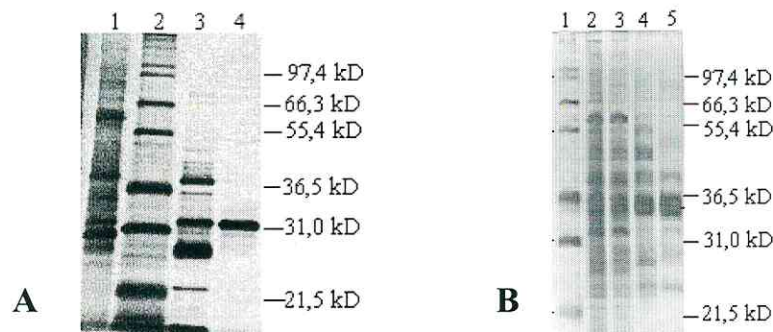


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Darstellung der säulenchromatographischen Reinigung von Sdp_{AMCI} und Rdp_{AMCI}. A: Sdp_{AMCI} 1: Rohextrakt, 2: Standard, 3: IEX (*Source30Q*), 4: HIC, B: Rdp_{AMCI} 1: Standard, 2: Rohextrakt, 3: IEX (*Source30Q*), 4: HIC, 5: IEX (*PBE94*)

In Abbildungen 4A+B sind die Anreicherungen der Dioxygenasen anhand der Auftrennung der Präparate im Acrylamidgel dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Sdp_{AMCI} nach der hydrophoben Chromatographie nahezu 100%ig rein ist. Für das Rdp_{AMCI} konnte nach der Anionenaustausch-Chromatographie an *PBE94* eine ausreichende Reinheit erzielt werden.

Tabelle 13: Dokumentation der Reinigung des SdpA_{MCI} und RdpA_{MCI} aus *Delftia acidovorans* MCI, die Ermittlung der spezifischen Aktivitäten erfolgte unter Einsatz von 1 mM (R)-DP, (R)-MCPP, MCPA bzw. 2,4-D oder 0,5 mM (S)-DP bzw. (S)-MCPP

Reinigungs-schritt	Substrat	rel. Prote-in-gehalt [%]	spez. Ak-tivität [U/mg]	Gesamt-aktivität [U]	Anrei-cherung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	(R)-DP	100	0,238	156	1	100
	(R)-MCPP		0,166	109	1	100
	2,4-D		0,09	59	1	100
	MCPA		0,128	83	1	100
	(S)-DP		0,158	103	1	100
	(S)-MCPP		0,129	85	1	100
Ammonium-sulfat-Fäl-lung	(R)-DP	88	0,347	151	1,5	97
	2,4-D		0,133	57	1,5	97
	(S)-DP		0,221	100	1,4	97
IEX RdpA _{MCI} (Source30Q)	(R)-DP	24	0,584	91	2,5	58
	2,4-D		0,067	10	0,7	18
	(S)-DP		-	-	-	-
HIC RdpA _{MCI}	(R)-DP	8	1,333	67	5,6	43
	2,4-D		0,072	2	0,8	4
	(S)-DP		-	-	-	-
IEX RdpA _{MCI} (PBE94)	(R)-DP	3	2,803	62,4	11,8	40
	2,4-D		0,421	1,8	4,7	3
	(S)-DP		-	-	-	-
IEX SdpA _{MCI} (Source30Q)	(R)-DP	6	-	-	-	-
	2,4-D		0,586	24	6,5	41
	(S)-DP		1,169	48	7,4	46
HIC SdpA _{MCI}	(R)-DP	1	-	-	-	-
	2,4-D		2,76	17	31	28
	(S)-DP		6,064	41	39	40

3.1.1.2 Gelelektrophoretische Trennung von Enzymformen

3.1.1.2.1 Separation der SdpA_{MCI}-Enzymformen

Durch die säulenchromatographische Reinigung des SdpA_{MCI} erhält man bei hoher Anreicherung ein offensichtlich reines Präparat (Abbildung 4A). Ergebnisse aus weiteren analytischen Verfahren (2D-, native Gelelektrophorese) zeigen aber, dass eine Auftrennung in multiple Enzymformen möglich ist. So konnten im SdpA_{MCI}-Präparat nach HIC bis zu drei Formen der (S)-spezifischen Dioxygenase nachgewiesen werden (Abbildung 6A). Zwei der drei Enzymformen konnten mit Hilfe der präparativen Gelelektrophorese voneinander separiert werden. In Abbildung 5 ist die Elution sowohl des Proteins als auch der Enzymaktivität zu sehen. Man kann deutlich die Auftrennung des HIC-Präparates in einen Proteinpeak mit Ausbildung einer Schulter erkennen. Nach Analyse der gesammelten Fraktionen im analytischen nativen Gel wurden die Fraktionen so vereinigt, dass zwei Präparate, in denen jeweils eines der nativen Proteine stark angereichert vorliegt, gewonnen wurden (Abbildung 6A). Unter denaturieren-

den Bedingungen erscheinen beide Präparate wieder als homogene Proteinbande bei 32 kD (Abbildung 6B).

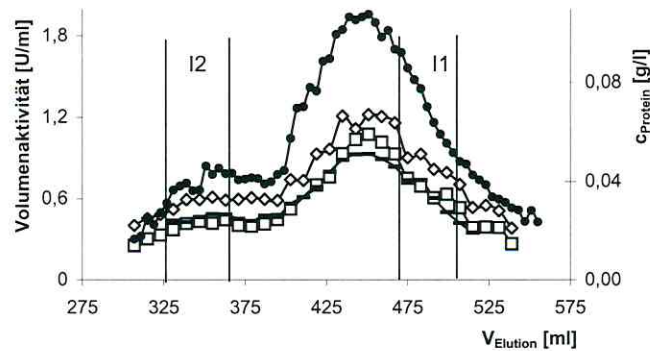


Abbildung 5: Elutionsprofil der SdpA_{MCI}-Enzymformen aus dem präparativen Gel (S)-DP (◇), (S)-MCPP (—), 2,4-D multipliziert mit 2 (□), Protein (●), die Bereiche I1 und I2 kennzeichnen die vereinigten Fraktionen

Nach diesem Reinigungsschritt konnten nur noch 50% des eingesetzten Proteins wiedergefunden werden, von dem etwa 18% der gereinigten Enzymform SdpA_{MCI}-I2 und 35% der gereinigten Enzymform SdpA_{MCI}-I1 zugeordnet werden konnten. Damit liegt das Verhältnis von I2 zu I1 bei etwa 1:2. Von der Gesamtzymaktivität konnten ebenfalls nur 50% wiedergefunden werden (Tabelle 14).

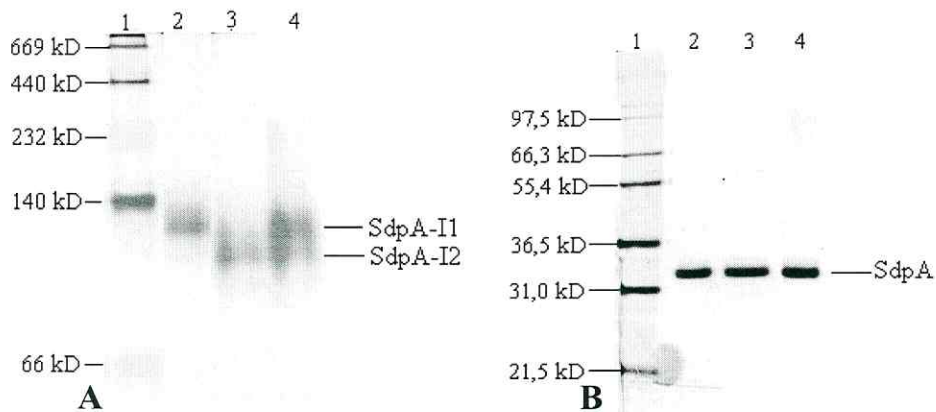


Abbildung 6: Kontrollgele der Separation der SdpA_{MCI}-Enzymformen **A:** nativ 1: Standard, 2: SdpA_{MCI}-I2, 3: SdpA_{MCI}-I1, 4: SdpA_{MCI} (HIC), **B:** denaturierend 1: Standard, 2: SdpA_{MCI}-I1, 3: SdpA_{MCI}-I2, 4: SdpA_{MCI} (HIC)

Dabei ist die Spaltungsaktivität für die untersuchten Herbizide gleichermaßen verloren gegangen. Eine weitere Anreicherung der Enzymaktivität war durch diesen Reinigungsschritt nicht mehr möglich. Die gereinigten Präparate wurden im Folgenden sowohl kinetisch als auch proteinbiochemisch charakterisiert.

Tabelle 14: Reinigungsprotokoll der Sdp_{AMC1}-Enzymformen an der präparativen Elektrophorese, die Ermittlung der spezifischen Aktivitäten erfolgte unter Einsatz von 1 mM MCPA bzw. 2,4-D oder 0,5 mM (S)-DP bzw. (S)-MCPP

Enzympräparat	Herbizid	Spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [fach]	Gesamtaktivität [%]
HIC				
Sdp_{AMC1}	<i>(S)</i> -DP	7,96	1	100
	<i>(S)</i> -MCPP	7,13	1	100
	2,4-D	4,45	1	100
	MCPA	6,81	1	100
Präparative Elektrophorese				
Sdp_{AMC1}-I1	<i>(S)</i> -DP	10,76	1,35	15,7
	<i>(S)</i> -MCPP	9,85	1,38	13,5
	2,4-D	4,49	1,01	14,6
	MCPA	8,04	1,18	14,3
Sdp_{AMC1}-I2	<i>(S)</i> -DP	6,60	0,83	7,4
	<i>(S)</i> -MCPP	6,61	0,93	5,0
	2,4-D	3,93	0,88	7,7
	MCPA	5,99	0,88	7,9

3.1.1.2.2 Separation der Rdp_{AMC1}-Enzymformen

Nach der klassischen Reinigung des Rdp_{AMC1} mittels säulenchromatographischer Techniken erhält man ein Enzympräparat, welches drei native Enzymformen der Dioxygenase enthält (Abbildung 8A). Wie beim Sdp_{AMC1} wurde versucht, diese Enzymformen mittels präparativer Elektrophorese voneinander zu trennen. Abbildung 7 zeigt das Elutionsprofil der Enzymaktivität und des Proteins aus dem Acrylamidgel.

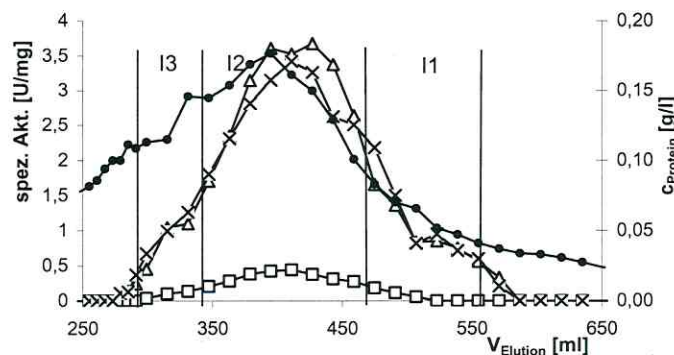


Abbildung 7: Elutionsprofil der Rdp_{AMC1}-Enzymformen aus dem präparativen Gel (R)-DP (Δ), (R)-MCPP (x), 2,4-D (□), Protein (●), die Bereiche I1, I2 und I3 markieren die vereinigten Fraktionen

Es ist ein mehrphasiger Verlauf in der Elution der Enzymaktivität zu erkennen, der als Anhaltspunkt für die Vereinigung der Fraktionen zur Gewinnung der einzelnen Enzymformen genutzt wurde. In Abbildung 8A sind die jeweiligen Rdp_{AMC1}-Präparate, die unter nativen Bedingungen im Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, zu sehen. Es wird deutlich, dass es gelungen ist, die Enzymformen Rdp_{AMC1}-I1 und -I3 zumindest in angereicherter Form dar-

zustellen, denn es sind immer noch Anteile der Enzymform I2 in beiden Präparaten vorhanden. Bei der zweiten Proteinbande in der Spur 2 (Präparat RdpA_{MCI}-I3) handelt es sich um die 1,2-Catechol-Dioxygenase (Identifizierung mittels MS-Fingerprint), die unter den gewählten Bedingungen nicht quantitativ vom RdpA_{MCI} zu trennen war. Ein Anreicherungspräparat RdpA_{MCI}-I2 konnte nicht gewonnen werden.

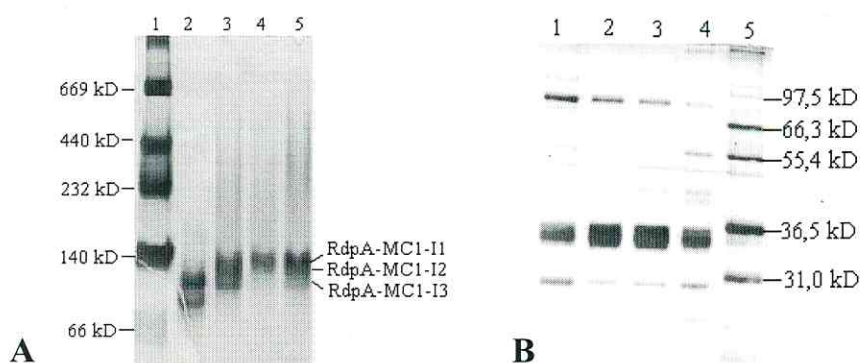


Abbildung 8: Gelelektrophoretische Auftrennung der RdpA-Enzymformen im Acrylamidgel A: native Bedingungen 1: Standard, 2: RdpA_{MCI}-I3, 3: RdpA_{MCI}-I2, 4: RdpA_{MCI}-I1, 5: RdpA_{MCI}-IEX (PBE94) **B: denaturierend** 1: RdpA_{MCI}-I3, 2: RdpA_{MCI}-I2, 3: RdpA_{MCI}-I1, 4: RdpA_{MCI}-IEX (PBE94), 5: Standard

Bei den RdpA_{MCI}-Präparaten handelt es sich nicht um reine Enzyme. Neben den verschiedenen Enzymformen sind noch weitere Fremdproteine in den Fraktionen enthalten, wie die Auftrennung im SDS-Gel (Abbildung 8B) zeigt. Die präparative Elektrophorese brachte keine weitere Anreicherung der RdpA-Spaltungsaktivitäten (Tabelle 15). Es konnten 69% der Enzymaktivität und des Proteins wiedergefunden werden, von denen 50% in den Präparaten RdpA_{MCI}-I1 und -I3 vereinigt wurden.

Tabelle 15: Reinigungsprotokoll der RdpA_{MCI}-Enzymformen an der präparativen Elektrophorese

Tabelle 15: Reinigungsprotokoll der RdpA _{MCI} -Enzymformen an der präparativen Elektrophorese				
Enzympräparat	Herbizid	Spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [-fach]	Gesamtaktivität [%]
IEX (PBE94)				
RdpA _{MCI}	(R)-DP	2,80	1	100
	(R)-MCPP	2,02	1	100
	2,4-D	0,42	1	100
	MCPA	0,32	1	100
Präparative Elektrophorese				
RdpA _{MCI} -I1	(R)-DP	2,99	1,01	21,4
	(R)-MCPP	1,345	0,67	14,2
	2,4-D	0,51	1,21	25,8
	MCPA	0,40	1,25	26,5
RdpA _{MCI} -I3	(R)-DP	2,09	0,75	9,1
	(R)-MCPP	1,54	0,77	9,3
	2,4-D	0,42	1	12,1
	MCPA	0,34	1,2	14,5

3.1.2 Reinigung der Phenoxypropionat-spaltenden Enzyme aus *Rhodoferrax* sp. P230

Die Biomasse, die zur Gewinnung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus *Rhodoferrax* sp. P230 (P230) eingesetzt wurde, wurde durch Batch-Kultivierung erzeugt. Auf die Behandlung des Rohextraktes mit Protaminsulfat-Fällung sowie auf eine Ammoniumsulfat-Fällung wurde in diesem Fall verzichtet, da durch diese beiden Schritte bereits bis zu 60% der (S)-spezifischen Enzymaktivität verloren gehen (Ruhland, 2003).

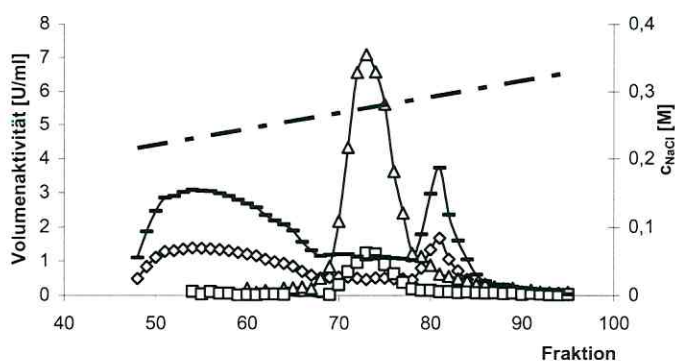


Abbildung 9: Elutionsprofil der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus P230 an PBE94 (S)-DP*10 (◇), (S)-MCP*10 (—), 2,4-D (□), (R)-DP (Δ), NaCl (gestrichelt)

Nach der Passage des Rohextraktes über den Ionenaustauscher PBE94 lagen drei Phenoxyalkanoat-spaltende Fraktionen vor (Ruhland, 2003), eine mit hoher (R)-spezifischer Aktivität ($\text{RdpA}_{\text{P230}}$), die bei einer NaCl-Konzentration von 0,28 M von der Säule eluiert, und in der Lage ist, sowohl die (R)-Enantiomere der Phenoxypropionate, als auch die Phenoxyacetate zu spalten, und zwei Fraktionen mit (S)-spezifischer Aktivität, von denen eine bei 0,23 M ($\text{SdpA}_{\text{P230-1}}$) und die andere bei einer NaCl-Konzentration von 0,29 M ($\text{SdpA}_{\text{P230-2}}$) eluiert (Abbildung 9). Die (S)-spezifischen Fraktionen enthalten die Spaltungsaktivitäten für die (S)-Enantiomere der substituierten 2-Phenoxypropionate und, durch eine offensichtliche Überlagerung mit dem $\text{RdpA}_{\text{P230}}$ im Elutionsprofil, gewisse Anteile der Spaltungsaktivität für die Phenoxyacetate und (R)-Enantiomere der Phenoxypropionate (Tabelle 16, Abbildung 11A). Die Trennung der Proteine am Ionenaustauscher ging mit einem Verlust von (R)-spezifischer Spaltungsaktivität von etwa 20% und von (S)-spezifischer Spaltungsaktivität von 30% einher. Es konnte eine Anreicherung des $\text{RdpA}_{\text{P230}}$ um das 17-fache und der (S)-spezifischen Dioxygenasen um das 9-fache erreicht werden. Mit der sich anschließenden Reinigung an Butyl-Sepharose wurde eine weitere Anreicherung der Dioxygenasen aus P230 möglich. Das $\text{RdpA}_{\text{P230}}$ eluiert bei einer Salzkonzentration von 0,73 M Ammoniumsulfat.

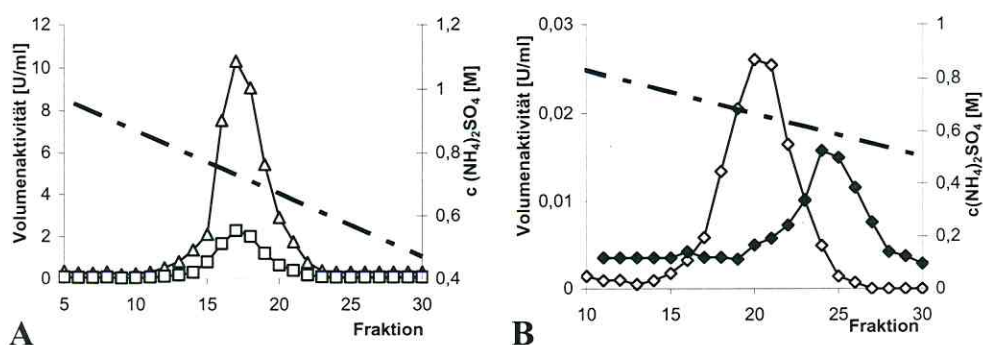


Abbildung 10: Elutionsprofile der Enzyme aus P230 an Butyl-Sepharose A: RdpA_{P230}, B: (S)-spezifische Enzyme, Substrat: (S)-DP 2,4-D (□), (R)-DP (Δ), SdpA_{P230}-1 (◇), SdpA_{P230}-2 (◆) (NH₄)₂SO₄ (gestrichelt)

Es wurde - bei einem Aktivitätsverlust von ca. 40% - auf das 50-fache der Aktivität des Rohextraktes angereichert. Von der (S)-spezifischen Spaltungsaktivität gehen an der hydrophoben Chromatographiesäule 83% der aufgetragenen Aktivität verloren. Dennoch ist bei diesem

Tabelle 16: Dokumentation der Reinigung der (S)- und (R)-spezifischen Dioxygenasen aus *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 Die Ermittlung der spezifischen Aktivitäten erfolgte unter Einsatz von 1 mM (R)-DP, (R)-MCPP, MCPA bzw. 2,4-D oder 0,5 mM (S)-DP bzw. (S)-MCPP

Reinigungs-schritt	Substrat	rel. Protein-gehalt [%]	spez. Aktivität [U/mg]	Gesamt-aktivität [U]	Anrei-cherung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	(R)-DP	100	0,161	136,5	1	100
	(R)-MCPP		0,12	101,2	1	100
	2,4-D		0,034	31,5	1	100
	MCPA		0,036	33,4	1	100
	(S)-DP		0,03	21,2	1	100
	(S)-MCPP		0,05	41,5	1	100
IEX RdpA _{P230} (PBE94)	(R)-DP	5	2,843	111,3	17,6	82
	2,4-D		0,6	23,4	16,1	75
	(S)-DP		0,027	1,1	1,1	5
HIC RdpA _{P230}	(R)-DP	1,2	8,369	82,5	52	60
	2,4-D		1,856	18,3	50	58
	(S)-DP		-	-	-	-
IEX SdpA _{P230} -1 (PBE94)	(R)-DP	5	-	-	-	-
	2,4-D		-	-	-	-
	(S)-DP		0,467	17,6	9,5	43
HIC SdpA _{P230} -1	(R)-DP	0,4	-	-	-	-
	2,4-D		-	-	-	-
	(S)-DP		0,463	1,6	18,5	8
IEX SdpA _{P230} -2 (PBE94)	(R)-DP	3	1,676	36	10,4	26
	2,4-D		0,339	7,3	9,1	23
	(S)-DP		0,252	5,4	10,1	26
HIC SdpA _{P230} -2	(R)-DP	0,3	-	-	-	-
	2,4-D		-	-	-	-
	(S)-DP		0,438	1	17,5	5

Schritt noch eine Anreicherung erreicht worden; das SdpA_{P230-1} wurde auf das 19-fache und das SdpA_{P230-2} auf das 25-fache des Rohextraktes angereichert. Die Enzympräparate enthalten in dieser Reinigungsstufe noch erhebliche Mengen Fremdprotein, dennoch wurden keine Reinigungsschritte durchgeführt, da ansonsten die Enzymausbeute für weiterführende Untersuchungen zu klein geworden wäre. Abbildung 11A und Tabelle 16 dokumentieren den Reinigungserfolg.

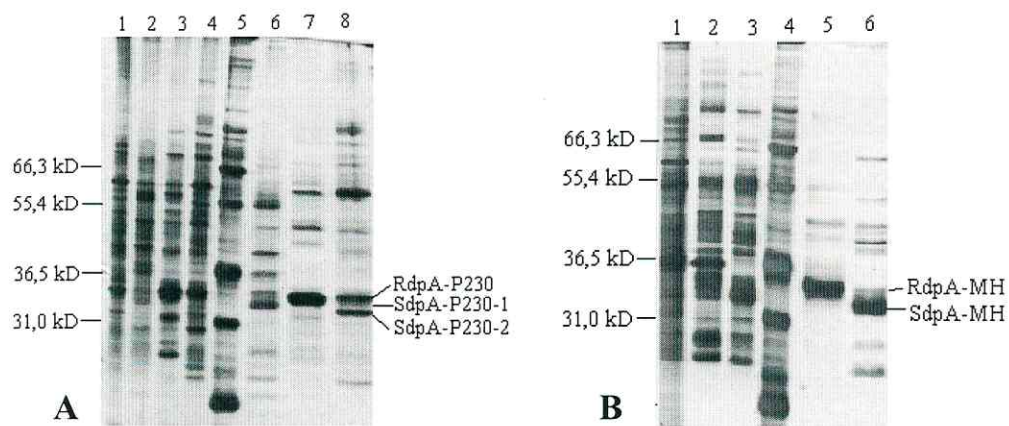


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Darstellung der säulenchromatographischen Reinigung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus A: P230 1: Rohextrakt, 2: IEX-SdpA_{P230-1}, 3: IEX-RdpA_{P230}, 4: IEX-SdpA_{P230-2}, 5: Standard, 6: HIC-SdpA_{P230-1}, 7: HIC-RdpA_{P230}, 8: HIC-SdpA_{P230-2} **B: MH (R,S)-DP-induziert** 1: Rohextrakt, 2: IEX-RdpA_{MH}, 3: IEX-SdpA_{MH}, 4: Standard, 5: HIC-RdpA_{MH}, 6: HIC-SdpA_{MH}

Aus P230 konnten drei Phenoxyalkanoat-spaltende Enzyme gereinigt werden, ein (R)-spezifisches Enzym mit Spaltungsaktivitäten für die (R)-Enantiomeren der Phenoxypropionate und für die Phenoxyacetate sowie zwei (S)-spezifische Enzyme, die jeweils nur die (S)-Enantiomere des Dichlorprop und Mecoprop spalten.

3.1.3 Reinigung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus *Sphingobium herbicidovorans* MH

Biomasse von *Sphingobium herbicidovorans* MH (MH), die mit unterschiedlichen Herbiziden induziert wurde, zeigt beim Reinigungsschritt an PBE94 unterschiedliche Elutionsprofile für die Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme. Werden die Herbizid-spaltenden Enzyme nach Wachstum der MH-Zellen auf PYE (über Nacht) mit einem Gemisch aus (R,S)-DP/2,4-DB (5:1) induziert, so erhält man nach Auftrennung des Rohextraktes am Ionenaustauscher drei Proteinfractionen, die sich durch unterschiedliche Substratverwertungsspektren auszeichnen (Abbildung 12A). Bei einer Salzkonzentration von 0,27 M NaCl eluiert zuerst eine Enzymfraktion vom Säulenmaterial, die sowohl die (S)-Enantiomere der 2-Phenoxypropionate, die

Phenoxyacetate, als auch die Phenoxybutyrate spaltet. Dieses Enzym wird vom zweiten Aktivitätspeak des Profils stark überlagert. Als zweites eluiert ein Enzym von der Säule (0,28 M NaCl), das neben den (R)-Enantiomeren der 2-Phenoxypropionate auch Phenoxyacetate als Substrate akzeptiert: das RdpA_{MH}. Nach dem RdpA_{MH} eluiert (0,3 M NaCl) wiederum ein (S)-spezifisches Enzym (SdpA_{MH}), welches die Herbizide (S)-DP und (S)-MCP, aber auch 2,4-D und MCPA spaltet. Phenoxybutyrat wird von diesem Enzym nicht umgesetzt.

Konfrontiert man die MH-Zellen nur mit dem Herbizid (R,S)-DP, so können am Ionenaustauscher nur noch zwei Proteinspezies separiert werden. Die Proteinfraction, welche unter

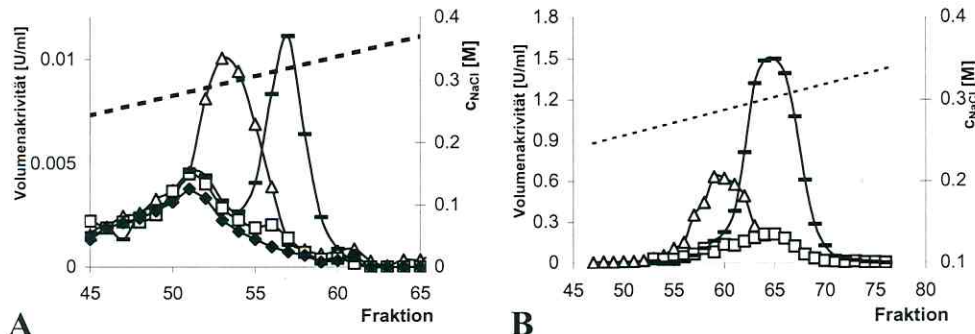


Abbildung 12: Elutionsprofil der Phenoxyalkanoat-Spaltungsaktivitäten aus MH an *PBE94* A: (R,S)-DP/2,4-DB-konfrontierte Zellen, B: (R,S)-DP-konfrontierte Zellen. (S)-DP (◇), (S)-MCP (△), 2,4-D (□), (R,S)-DP (Δ), 2,4-DB (◆), NaCl (gestrichelt)

anderem die Spaltungsaktivität für das 2,4-DB enthält, kann in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Da die Enzymaktivitäten bei nur mit (R,S)-DP induzierten Proteinen deutlich über denen von (R,S)-DP/2,4-DB induzierten liegen (Faktor 100) und aus den mit 2,4-DB-konfrontierten Zellen nicht genügend Enzym für kinetische und proteinbiochemische Untersuchungen gewonnen werden kann, wurde im folgenden nur mit den (R,S)-DP-induzierten Proteinen weitergearbeitet.

An Butyl-Sepharose konnte hier eine weitere Anreicherung der (S)-und (R)-spezifischen Enzyme erreicht werden. So konnte das RdpA_{MH} in diesem Reinigungsschritt auf das 44-fache des Rohextraktes angereichert werden. Bei der Reinigung gingen allerdings etwa 85% der Enzymaktivität verloren. Das (S)-spezifische Enzym wurde 11-fach angereichert; es gingen über 90% der Spaltungsaktivität verloren. Abbildung 11B zeigt die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Reinigungsschritte und veranschaulicht so den Reinigungserfolg. Das Reinigungsprotokoll dieses Schrittes ist der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Dokumentation der Reinigung der (S)- und (R)-spezifischen Dioxygenasen aus *Sphingobium herbicidovorans* MH, die Ermittlung der spezifischen Aktivitäten erfolgte unter Einsatz von 1 mM (R)-DP, (R)-MCP, MCPA bzw. 2,4-D oder 0,5 mM (S)-DP bzw. (S)-MCP

Reinigungs-schritt	Substrat	rel. Protein-gehalt [%]	spez. Aktivität [U/mg]	Gesamt-aktivität [U]	Anrei-cherung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	(R)-DP	100	0,04	33,99	1	100
	(R)-MCP		0,038	31,34	1	100
	2,4-D		0,016	13,2	1	100
	MCPA		0,034	28,04	1	100
	(S)-DP		0,135	111,34	1	100
	(S)-MCP		0,231	190,51	1	100
IEX Rdp _{A_{MH}} (PBE94)	(R)-DP	3	0,87	24,57	22	75
	2,4-D		0,851	2,40	5,3	18
	(S)-DP		0,313	8,84	2,3	8
HIC Rdp _{A_{MH}}	(R)-DP	0,3	1,757	4,5	44	14
	2,4-D		0,201	0,515	13	4
	(S)-DP		-	-	-	-
IEX Sdp _{A_{MH}} (PBE94)	(R)-DP	4	0,163	5,97	4	18
	2,4-D		0,112	4,10	7	31
	(S)-DP		1,76	64,47	13	58
HIC Sdp _{A_{MH}}	(R)-DP	0,7	-	-	-	-
	2,4-D		0,085	0,49	5,3	3,74
	(S)-DP		1,532	8,89	11,4	8

3.1.4 Reinigung der rekombinanten Enzyme Rdp_{A_{MC1}}-rec und Sdp_{A_{MC1}}-rec

Die Reinigung der rekombinanten Enzyme erfolgte an Strep-Tactin, einer Affinitätsmatrix. Die Enzyme konnten auf diese Weise in einer Einschrittprozedur bis zur Homogenität angereichert werden (Abbildung 13). Das Rdp_{A_{MC1}}-rec wurde 117-fach angereichert, das Sdp_{A_{MC1}}-rec 46-fach (Tabelle 18); bis zu 35% der eingesetzten Enzymaktivität gingen

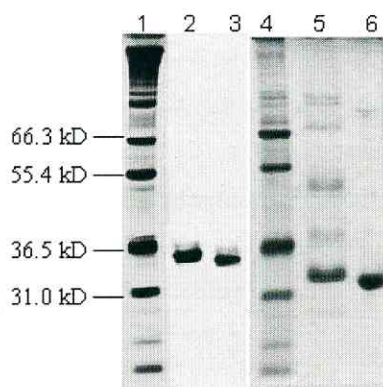


Abbildung 13: Elektrophoretische Auftrennung der gereinigten rekombinanten Enzyme Rdp_{A_{MC1}}-rec und Sdp_{A_{MC1}}-rec unter denaturierenden Bedingungen. 1+4: Standard, 2: Rdp_{A_{MC1}}-rec-tag, 3: Rdp_{A_{MC1}}-rec, 5: Sdp_{A_{MC1}}-rec-tag, 6: Sdp_{A_{MC1}}-rec

verloren. Bei beiden Enzymen wurde eine Aktivitätssteigerung durch die Abspaltung des Strep-tag(II) beobachtet. Die Ausbeute der überexprimierten Proteine Rdp_{MC1-rec} und Sdp_{MC1-rec} war allerdings nur gering. Im Falle des Rdp_{MC1-rec} konnte im Rohextrakt des Überexpressionsstammes nur etwa die Hälfte der im Rohextrakt von MC1 gefundenen Enzymaktivität nachgewiesen werden. Für das Sdp_{MC1-rec} war sie doppelt so hoch wie im Wildtyp.

Tabelle 18: Reinigungsprotokoll für die Gewinnung der rekombinanten Enzyme Rdp_{MC1-rec} und Sdp_{MC1-rec}

Fraktion	Substrat	spez. Akt. [U/mg]	Anreicherung [-fold]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	<i>(R)</i> -DP	0,1061	1	100
	<i>2,4-D</i>	0,011	1	100
Rdp_{MC1-rec}-tag	<i>(R)</i> -DP	9,868	93	51
	<i>2,4-D</i>	1,015	92	50
Rdp_{MC1-rec}	<i>(S)</i> -DP	11,66	110	65
	<i>2,4-D</i>	1,287	117	65
Rohextrakt	<i>(S)</i> -DP	0,527	1	100
	<i>2,4-D</i>	0,164	1	100
Sdp_{MC1-rec}-tag	<i>(S)</i> -DP	17,63	33	53
	<i>2,4-D</i>	6,1	37	55
Sdp_{MC1-rec}	<i>(S)</i> -DP	21,97	42	67
	<i>2,4-D</i>	7,591	46	64

3.2 Proteinbiochemische Charakterisierung

3.2.1 Primärstruktur

3.2.1.1 Primärstrukturen der RdpA- und SdpA-Enzyme aus MC1, P230 und MH

Die Primärstrukturen der RdpA- und SdpA-Enzyme aus *Delftia acidovorans* MC1, *Rhodoferrax* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH wurden aus den Sequenzdaten der betreffenden Gene hergeleitet. Um die Gene fassen zu können, wurden Primer aus den mittels Edman-Abbau gewonnenen N-terminalen bzw. internen Aminosäuresequenzen (Tabelle 19) abgeleitet¹⁾. Mit Hilfe der von den RdpA_{MC1}-Aminosäuresequenzen abgeleiteten Primern war es möglich, das *rdpA*-Gen in *Delftia acidovorans* MC1 zu finden und zu sequenzieren.

Tabelle 19: Sequenzdaten des RdpA- und des SdpA-Enzyme (ermittelt mittels Edman-Abbau), die N-Termini sind kursiv, unsichere Aminosäuren in Klammern dargestellt. Unterstrichene Aminosäuren wurden zur Primer-Herleitung genutzt

Protein	Sequenz	Primer
RdpA _{MC1}	<i>MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGV</i>	
	SIEGYEVQMIRREANESGRVIGDDXHTXIIX	
	ETLSPT <u>MQATIE</u> GLN	3'-ACGTYCGNTGNTAICTYCC-5'
	NEILDAFH <u>TYQVIY</u> FPGQAITNEQHIAFSR	5'-GCITTYCAYACNTAYCAGGT-3'
SdpA _{MC1}	<i>MQTTLOITPTGATLGATVTGVHLAT</i>	5'-ATGTCARACIACICTGCARATYC-3'
	LGHVQQAGSAYT	3'-GTACANGTYGTYCGNCC-5'
	<i>TIRRI(R)Q)SPAFSIAPLNATFGAVVTGVXLA</i>	5'-GGNGCNGTNGTNACNGG-3'
SdpA _{P230-1}	TMALPLVVEAS	
	KSLIG(N)(S) <u>AHAIPG</u>	5'-GCNCAYGCNATHCCNGG-3'
	DAVLWNR	5'-GAYGCNGTNYTNTGGGAYAA-3'

Identische *rdpA*-Gene konnten auf dieser Basis auch in den Stämmen *Rhodoferrax* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH nachgewiesen werden. Für das RdpA_{P230} konnte die Übereinstimmung der Primärstruktur des Enzyms mit dem RdpA_{MC1} auch auf Proteinebene mittels Spaltmustervergleichs nach tryptischem Verdau erbracht werden (Ruhland, 2003). Die abgeleiteten Primer des SdpA_{MC1} ermöglichten gleichermaßen die Sequenzierung des *sdpA*-Gens in MC1. In MH und P230 konnten dagegen, anders als beim RdpA, keine identischen *sdpA*-Gene gefunden werden. Das *sdpA*_{MH} konnte unter Nutzung von Sequenzdaten von MC1 gefasst und sequenziert werden. Für P230 stehen der Nachweis und die Identifizierung der Gene für die (S)-spezifischen Enzyme bislang noch aus (A. Götz, persönliche Mitteilung).

¹⁾ Aminosäuresequenzierung, 2D-Gelelektrophorese und Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. D. Benndorf (UFZ, Leipzig). Das Enzympräparat SdpA_{P230-1} wurde im Rahmen der Diplomarbeit von A. Götz (UFZ, Leipzig) gewonnen. Die Primer sowie die Nukleinsäuresequenzen für die Enzyme aus MC1 wurden von K.M. Schleinitz (UFZ, Leipzig) im Rahmen einer Promotion erarbeitet. Die Primer des SdpA_{P230-1} wurden von Dr. S. Kleinstüber (UFZ, Leipzig) entwickelt. Die Nukleinsäuresequenzen der Dioxygenasen aus MH wurden von T.A. Müller (EAWAG, Dübendorf) im Rahmen einer Promotion ermittelt.

Die Tabelle 20 fasst die aus den Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Primärstrukturen der α -KG-abhängigen Phenoxypionat-spaltenden Dioxygenasen zusammen.

Tabelle 20: Aminosäuresequenzen der Phenoxypionat-spaltenden Dioxygenasen¹⁾ aus MC1, MH, P230

Protein	Aminosäuresequenz
RdpA_{MC1} (Q8KSD1)	MHAALSPLSQ RFERIAVQPL TGVLGAEITG VDLREPLDDS TWNEILDAFH TYQVIYFPGQ AITNEQHIAF SRRFGPVDPV PLLKSIEGYP EVQMIRREAN
RdpA_{P230} (Q8KSC9)	ESGRVIGDDW HTDSTFLDAP PAAVVMRAID VPEHGGDTGF LSMYTAWETL SPTMQATIEG LNVVHSATRV FGSLYQAQNR RFSNTSVKVM DVDAGDRETV
RdpA_{MH} (Q8KSC8)	HPLVVTHTPGS GRKGLYVNQV YCQRIEGMTD AESKPLLQFL YEHATRFDFDFT CRVRWKKDQV LVWDNLCTMH RAVPDYAGKF RYLTRTTVGG VRPAR
SdpA_{MC1} (Q8KSD0)	MQTTLQITPT GATLGATVTG VHLATLDDAG FAALHAAWLQ HALLIFPGQH LSNDQQITFA KRFGAIERIG GGDIVAISNV KADGTVRQHS PAEWDDMMKV IVGNMAWHAD STYMPVMAQG AVFSAEVVPA VGGRTCFADM RAAVDALDEA TRALVHQRSA RHSLVYSQSK LGHVQQAGSA YIGYGMDDTA TPLRPLVKVH PETGRPSLLI GRHAHAIPGM DAAESERFLE GLVDWACQAP RVHAHQWAAG DVVVWDNRCL LHRAEPWDFK LPRVMWHSRL AGRPETEGAA LV
SdpA_{MH} (Q700X4)	MSPAFDIAPL DATFGAVVTG VKLADLDDAG WLDLQAAWLE YALLVFPDQH LTREQQIAFA RRFGLPEFEM AAISNVRPDG SLRVESDNDD MMKILKGNMG WHADSTYMPV QAKGAVFSAE VVPSVGGQTG FADMRAAYDA LDEDLKARVE TLQARHSLHY SQSKLGHQTK AADGEYSYG LHDGPVPLRP LVKIH PETGR KSLLIGRHAH AIPGLEPAES ERLQLQLIDF ACQPPRIYHH DWAPGDAVLW DNRCLLHQAT PWDMTQKRIM WHSRIAGDPA SETALAH
SdpA_{P230-1} SdpA_{P230-2}	TIRRRIR(Q) SPA FSIAPLNATF GAVVTGVXL A GNMGWHADST YMPVQAK AAYDALDEDL KAR TMALPLVVEA S KSLLIG(N) HAH AIPGLEPAES ERLQLQLID FACQPPRIY HHDWAPGDAV LWDNR

3.2.1.2 Sequenzvergleiche und konservierte Regionen

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Phenoxypionat-spaltenden Enzyme mit bereits bekannten Sequenzen anderer α -Ketoglutarat-abhängiger Dioxygenasen zeigt eine hohe Ähnlichkeiten zu bekannten 2,4-Dichlorphenoxycetat- (TfdA) und Taurin-Dioxygenasen (TauD). So weist das RdpA eine Sequenzidentität von 39% (55% Ähnlichkeit) mit TauD und von 32% (47% Ähnlichkeit) mit TfdA aus *Ralstonia eutropha* JMP134 auf. Sequenzvergleiche mit dem SdpA_{MC1} zeigen eine 29%ige Identität (47% Ähnlichkeit) zum TauD und eine 35%ige Identität (50% Ähnlichkeit) zum TfdA aus dem Stamm JMP134. Die (S)-spezifische Dioxygenase aus MH zeigt sowohl zum TauD als auch zum TfdA aus JMP134 eine 40%ige Identität (56% Ähnlichkeit). Ein Vergleich der bekannten Sequenzen der Phenoxypionat-spaltenden Dioxygenasen zueinander und zum TauD ist in Abbildung 15 zu sehen. RdpA ist in seiner Primärstruktur zu nur etwa 28% identisch und zu nur 47% ähnlich mit den beiden (S)-spezifischen Dioxygenasen aus MC1 und MH, die zueinander wiederum nur zu 60% identisch und zu 70% ähnlich sind. Allen untersuchten Enzymen ist allerdings das Motiv H-X-D-X₁₃₆₋₂₀₅-D-N-X₄-H-X₁₀-R gemeinsam, das Merkmal der Gruppe(II) der α -KG-abhängigen

Dioxygenasen. Alle Aminosäuren, die in TfdA und TauD zur Bindung des Fe(II) und des α -KG identifiziert wurden, finden sich auch in den RdpA- und SdpA-Proteinen aus MC1 und MH als konservierte Regionen wieder. Die Aminosäuren, die zur Substratbindung in TauD identifiziert wurden, sind dagegen in den bekannten RdpA- und SdpA-Sequenzen wenig bis nicht konserviert. Die Primärstruktur des SdpA_{P230} ist bislang nicht vollständig bekannt, so dass zu diesem Enzym keine Aussage gemacht werden kann.

3.2.2 Sekundärstruktur

Die Erkenntnisse zur Sekundärstruktur der untersuchten Enzyme beruhen auf dem Vergleich der Primärstrukturen mit der Aminosäuresequenz des TauD unter Einbeziehung der 3D-Struktur dieses Proteins. Für dieses Enzym ist die 3D-Struktur aus Röntgenkristallstrukturanalysen bekannt. Dies steht für die Enzyme RdpA und SdpA noch aus. Es ist jedoch bereits gelungen das RdpA_{rec} zu kristallisieren (in Kooperation mit Prof. N. Sträter, BBZ, Leipzig) (Abbildung 14).

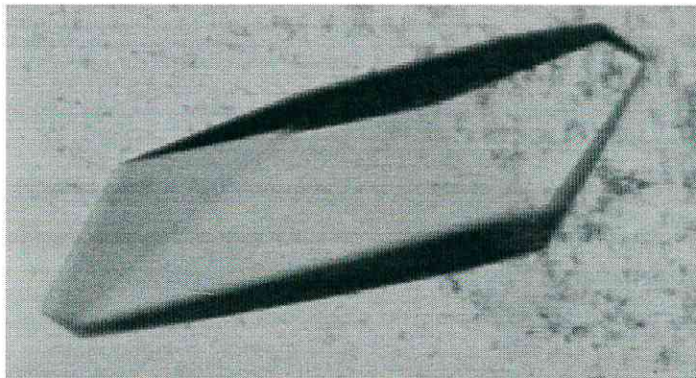


Abbildung 14: Proteinkristall des RdpA_{MC1-rec}, die Kristallisations-Bedingungen waren: Einsatz von 12% Polyethylenglycol 3350 als Fällungsreagenz, pH 7,0, 19°C

In Abbildung 15 ist das Sekundärstruktur-basierende Alignment der RdpA- und SdpA-Enzyme der drei Stämme mit dem TauD aus *E. coli* zu sehen. Es ist zu entnehmen, dass sich die Aminosäuresequenzen der Phenoxypropionat-spaltenden Enzyme gut mit der Primär- und Sekundärstruktur des TauD decken. Viele der konservierten und fast alle der hoch konservierten Aminosäuren der Proteine sind in den periodischen Elementen wie α -Helices und β -Faltblättern zu finden. Die Aminosäureabschnitte mit geringerer Übereinstimmung der Primärstrukturen, wo zur besseren Anpassung der Aminosäuresequenz an die Sekundärstruktur des TauD Lücken in diese eingeführt werden mussten, sind zumeist in den nichtperiodischen Sekundärstruktur-Elementen (*coils, turns*) zu finden. Durch Modellierung der Aminosäure-

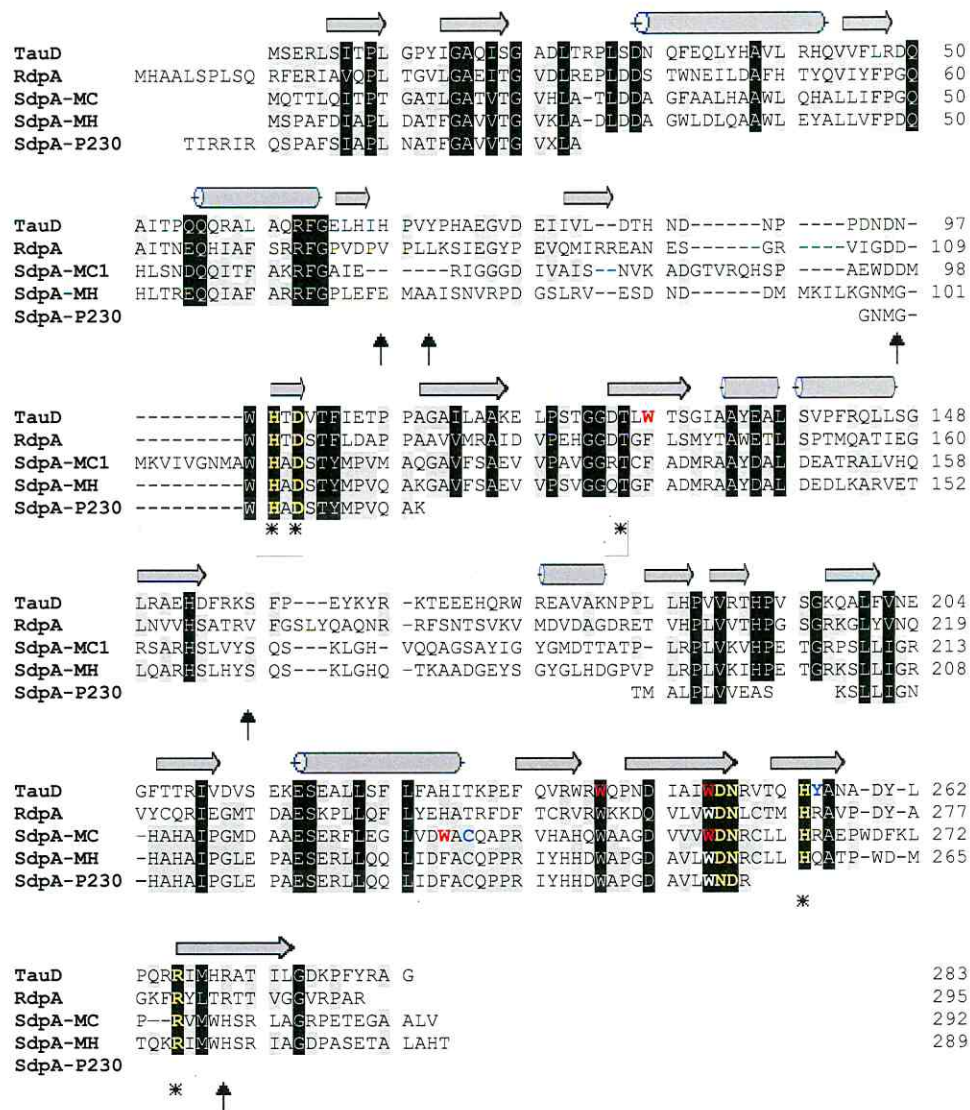


Abbildung 15: Sekundärstruktur-basierendes Alignment der Primärstrukturen vom RdpA, SdpA_{MC1}, SdpA_{MH} und SdpA_{P230}-1 in Relation zur bekannten Sekundärstruktur des TauD, α -Helices sind als waagrecht liegende, graue Zylinder, β -Faltblätter als graue Pfeile dargestellt. Hochkonservierte Aminosäuren (100-80%) sind schwarz, konservierte Aminosäuren (60-80%) grau unterlegt. Das Sequenzmotiv der Gruppe(II) Dioxxygenasen ist gelb hervorgehoben. Mit Sternchen markierte Aminosäuren sind im TauD an der Fe(II)- und α -KG-Bindung, mit Pfeil markierte Reste an der Taurinbindung (Substrat) beteiligt. Für die roten Tryptophanreste sind Oxydationen gefunden worden; für die blauen Aminosäurereste wurden Modifikationen nachgewiesen.

sequenzen des RdpA und des SdpA_{MC1} in die 3D-Struktur des TfdA und TauD konnte eine sehr gute Übereinstimmung der Sekundärstrukturen der Enzyme gezeigt werden (K.M. Schleinitz, persönliche Mitteilung). Das Protein besteht danach aus 17 β -Faltblättern, von denen 8 das *jellyroll*-Motiv bilden, und aus 6 α -Helices. Der Aminosäuresequenz-Abschnitt Glu66-Val79 wurde im TauD als Substratbindetasche identifiziert. In diesem Bereich sind wenige bis keine Homologien zu den Phenoxypropionat-spaltenden Enzymen zu finden.

3.2.3 Physikochemische Eigenschaften und Quartärstruktur

3.2.3.1 Enzyme aus *Delfia acidovorans* MC1

Das RdpA_{MC1} besteht aus 295 Aminosäuren, die aus der Primärstruktur errechnete Molmasse des Enzyms beträgt 33,2 kD, der pI des Proteins ergibt sich zu 6,06. Die Molmasse des 292 Aminosäuren umfassenden SdpA_{MC1} ist 32,7 kD, der pI wurde mit 6,45 berechnet.

3.2.3.1.1 Gelchromatographische Bestimmung der Molmasse

Die säulenchromatographische Auftrennung des SdpA_{MC1}-Präparates (HIC) an BioSil™ ist in Abbildung 16 zu sehen. Unter nativen Bedingungen wird das im SDS-PAGE homogen erscheinende Enzympräparat in drei Proteinpeaks (63 kD, 23,7 kD, 4,5 kD) fraktioniert. Für das 23,7 kD-Protein konnte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Die Proteine der Peaks 1 und 3 lagen nur in sehr geringen Konzentrationen vor; für sie konnte keine katalytische Aktivität gezeigt werden. Die Auftrennung der gleichen Enzymprobe unter denaturierenden Bedingungen zeigt ein ähnliches Bild. Wieder sind drei Proteinpeaks zu erkennen, deren Massen sich jedoch aufgrund der veränderten Trennbedingungen leicht zu höheren Massen verschoben haben. Am Elutionsprofil ändert die Anwesenheit von SDS jedoch nichts Grundsätzliches. Als Ergebnis der Gelfiltration bleibt also festzuhalten: das SdpA_{MC1} erscheint unter den gewählten Bedingungen zum überwiegenden Teil als monomeres Protein der Masse 23,7 kD. Eine definitive Aussage über das Vorhandensein eines geringen Anteils eines Homodimers der Masse 63 kD kann wegen der fehlenden Zuordnung von Enzymaktivität zu diesem Proteinpeak nicht gemacht werden. Da Fremd-Proteine in der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung dieser Proteinpräparation nicht vorhanden waren (Abbildung 4A), ist die Zuordnung des 63 kD-Peaks zu einem Dimer jedoch eher wahrscheinlich. Durch die gelchromatographische Trennung der Proteine des RdpA_{MC1}-Präparates unter nativen Bedingungen konnten drei Peaks voneinander separiert werden, von denen nur dem Protein mit der Masse 108 kD katalytische Aktivität zugeordnet werden konnte. Die Proteine der Massen 162 kD und 5,9 kD

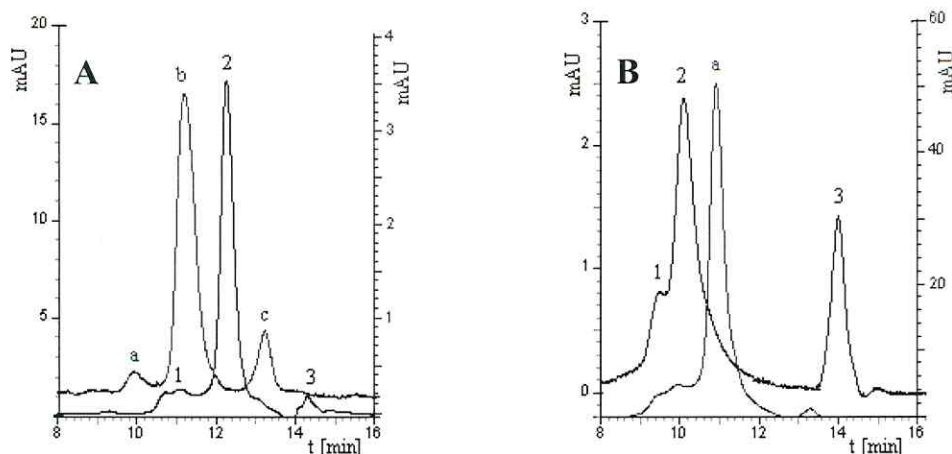


Abbildung 16: Elutionsprofile des (S)- und (R)-spezifischen Präparates an BioSilTM (Gelfiltration) unter nativen sowie denaturierenden (1% SDS) und reduzierenden (1% Mercaptoethanol) Bedingungen **A:** SdpA_{MC1}, nativ: 1: 63 kD; 2: 23,7 kD; 3: 4,5 kD; denaturierend: a: 72 kD; b: 33 kD; c: 5,6 kD; **B:** RdpA_{MC1} nativ: 1: 161,7 kD; 2: 108,2 kD; 3: 5,9 kD; denaturierend: a: 37 kD

weisen keine Spaltungsaktivität auf. Hier sollte es sich um die Verunreinigungen des (R)-spezifischen Präparates mit anderen Proteinen handeln, die in Abbildung 4B zusehen sind. Bei der Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen verschwindet das Protein der Masse 108 kD und ein neuer Proteinpeak mit der Masse 37 kD erscheint. Dieses Resultat lässt auf eine homotrimere Erscheinungsform des RdpA_{MC1} schließen.

3.2.3.1.2 Gelelektrophoretischer Nachweis von Ladungsisomerie, Bestimmung der Molmasse und der isoelektrischen Punkte

Die Auftrennungen der (R)- und (S)-spezifischen Präparate unter denaturierenden Bedingungen sind bereits in den Abbildungen 4A+B dargestellt. Unter Verwendung des Standards und der R_F -Werte der Proteine wurden die Molmassen der monomeren Enzyme von 32,1 kD für das SdpA_{MC1} und von 34,7 kD für das RdpA_{MC1} ermittelt.

Die elektrophoretischen Auftrennungen der RdpA_{MC1}- und SdpA_{MC1}-Präparate nach der hydrophoben Chromatographie unter nativen Bedingungen zeigen nicht wie erwartet eine homogene Bande im Acrylamidgel. Vielmehr können sowohl für SdpA_{MC1} als auch für RdpA_{MC1} drei Proteinbanden (I1, I2, I3) aufgelöst werden. Mittels massenspektrometrischer Analyse sind diese jeweils eindeutig den betreffenden Enzymen zuzuordnen. Zur Ermittlung der Molmasse der nativen Enzymformen und zur Charakterisierung der Art der Beziehung zwischen den Enzymformen wurden Gele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration eingesetzt und der Trennverlauf graphisch ausgewertet.

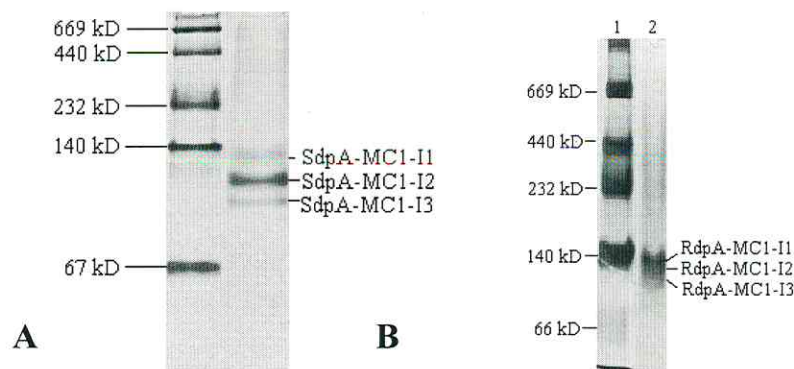


Abbildung 17: Native gelelektrophoretische Auftrennung der Enzympräparate aus MC1 A: SdpA_{MC1}, B: RdpA_{MC1}

Abbildung 18 zeigt die Auftragung $\lg(100 \cdot R_f) = f(c_{\text{Acrylamid}})$. Erscheinen die Plots unterschiedlicher Proteine in dieser Darstellungsform als zueinander parallele Geraden, so handelt es sich bei diesen Proteinen um Ladungsisomere. Die Parallelität der Geraden ist sowohl für das SdpA_{MC1} als auch für das RdpA_{MC1} gezeigt, wodurch bewiesen wurde, dass es sich bei den Enzymformen um Ladungsisomere handelt. Die Molmassen wurden unter diesen Bedingungen für das SdpA_{MC1} mit 63 kD und für das RdpA_{MC1} mit 113 kD bestimmt. Für das RdpA_{MC1} stimmen die gelelektrophoretisch und säulenchromatographisch ermittelten Molmassen des nativen Proteins überein. Für SdpA_{MC1} ist dies nicht der Fall: das Vorliegen unterschiedlicher Ionenstärken bei den unterschiedlichen Auftrennungen könnte ein Grund dafür

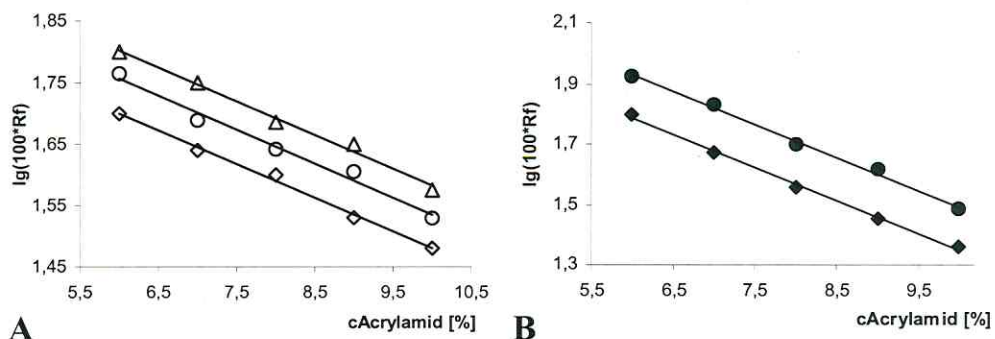


Abbildung 18: Graphische Auswertung der Proteinlaufstrecken im Acrylamidgel unter nativen Bedingungen A: SdpA_{MC1}-I1 (◇), SdpA_{MC1}-I2 (○), SdpA_{MC1}-I3 (Δ), B: RdpA_{MC1}-I1 (◆), RdpA_{MC1}-I2 (●)

sein. Zur Ermittlung der isoelektrischen Punkte der Enzyme wurden die Proteinpräparate 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 19). Im 2D-Gel erscheint das SdpA_{MC1} wiederum nicht als homogener Spot. Vielmehr erscheinen drei Spots, die nach massenspektrometrischer Analyse dem (S)-spezifischen Enzym zugeordnet werden können. Wie schon bei den nativen Enzymformen handelt es sich auch bei den Monomeren (S1, S2, S3) um Ladungsisomere gleicher Masse. Die Molmassen der Monomere wurden auf 32,5 kD bestimmt, die pI-

Werte liegen zwischen 6,16 und 6,35. Analog zum SdpA_{MC1} ergibt sich das Bild für das RdpA_{MC1}: es konnten mindestens drei ladungsisomere Monomere (R1, R2, R3) mit einer Molmasse von 35,8 kD nachgewiesen werden. Die isoelektrischen Punkte der Proteine liegen zwischen 5,8 und 5,9.

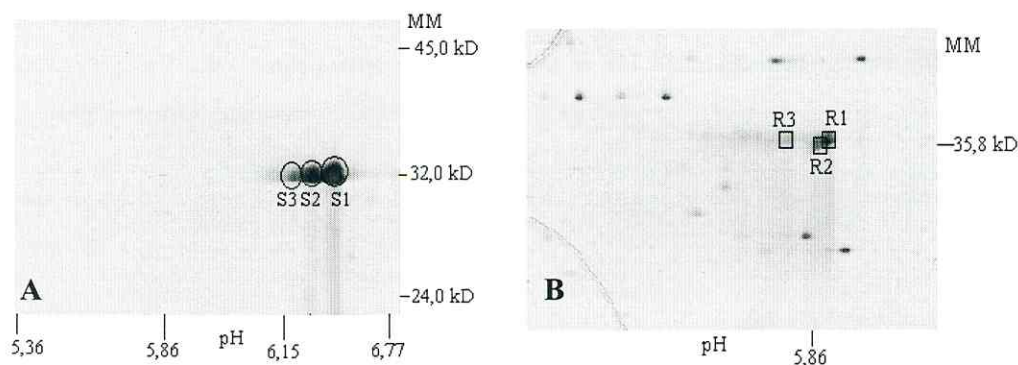


Abbildung 19: 2D-Gelelektrophoretische Auftrennung der SdpA_{MC1}- (A) und RdpA_{MC1}-Präparate (B)

3.2.3.1.3 Quartärstruktur der Enzyme SdpA_{MC1} und RdpA_{MC1}

Anhand der oben ausgeführten Untersuchungen deutet sich schon eine Menge zur Quartärstruktur der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen aus MC1 an. Vom SdpA_{MC1} wissen wir, dass es sich um ein dimeres Protein mit einer Molmasse von 63 kD handelt. Es konnten drei native Enzyme (SdpA_{MC1}-I1, -I2, -I3) nachgewiesen werden, die sich wiederum aus Kombinationen von drei ladungsisomeren Monomeren (S1, S2, S3) zusammensetzen. Das RdpA_{MC1} stellt ein trimeres Protein der Molmasse 108 kD dar. Von diesem Enzym wurden ebenfalls verschiedene native Enzymformen (RdpA_{MC1}-I1, -I2, -I3) nachgewiesen, die sich wiederum aus mindestens drei ladungsisomeren monomeren Proteinen (R1, R2, R3) zusammensetzen.

Das Auffinden von drei unterschiedlichen Monomeren ergibt für ein dimeres Protein (SdpA_{MC1}) sechs Kombinationsmöglichkeiten und damit sechs theoretische native Enzymformen (S1S1, S1S2, S1S3, S2S2, S2S3, S3S3). Tatsächlich konnten aber nur drei Enzymformen für das SdpA_{MC1} gefunden werden. Die theoretische Anzahl für ein trimeres Protein (RdpA_{MC1}) liegt sogar bei zehn, eindeutig nachgewiesen werden konnten jedoch ebenfalls nur drei native RdpA_{MC1}-Formen. Um Aussagen zur tatsächlichen Kombination von Monomeren im oligomeren Protein machen zu können, mussten die Enzymformen voneinander getrennt (3.1.1.2) und anschließend separat analysiert werden.

Für das SdpA_{MC1} ist es gelungen, zwei der drei nativen Enzymformen mittels präparativer Gelelektrophorese (3.1.1.2.1) voneinander zu trennen. Diese Enzympräparate wurden 2D-

gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 20) und anschließend densitometrisch ausgewertet. Das Enzympräparat SdpA_{MCI}-I1 besteht zu 86% aus dem Monomer S1, zu 12% aus S2 und zur 2% aus S3. Rein rechnerisch (siehe unten) ergibt sich aus diesen Daten und den theoretisch möglichen Monomeren-Kombinationen ein Enzymgemisch bestehend aus 76% des Dimers S1S1 und 20% des Dimers S1S2 (Abbildung 21). Der Anteil der anderen theoretischen Dimere beträgt jeweils 1%, ist also vernachlässigbar klein.



Abbildung 20: Ausschnitte aus den 2D-Gelen zur Auftrennung der (S)-spezifischen Enzymformen A: SdpA_{MCI}-I1, B: SdpA_{MCI}-I2

Im Enzympräparat SdpA_{MCI}-I2 stellt sich die Situation folgendermaßen dar: entsprechend der Analyse besteht das Präparat zu 48% aus dem Monomer S1, zu 37% aus S2 und zu 15% aus S3. Für dieses Präparat ergibt sich demnach eine Zusammensetzung von 74% S1S2 und 22% S1S3. Wiederum liegen die anderen theoretisch abgeleiteten dimeren Proteine nur in vernachlässigbar kleinen Anteilen im Gemisch vor. Nach dieser Auswertung wird offensichtlich, dass mit der präparativen Elektrophorese keine Trennung der Enzymformen, sondern lediglich eine Anreicherung erreicht werden konnte.

Die dritte native Enzymform des SdpA_{MCI} ist bei der Reinigung verlorengegangen, sollte aber nach den vorliegenden Ergebnissen aus den Monomeren S1 und S3 zusammengesetzt sein.

Berechnung der Dimeren-Zusammensetzung: Die SdpA_{MCI}-Proteine, die nach Auftrennung im Acrylamidgel unter nativen Bedingungen in einer Proteinbande vorliegen, zeichnen sich durch identische Trenneigenschaften aus. In einer Bande können also nicht gleichzeitig die basischste und sauerste Variante des nativen Proteins vorliegen. Basische Proteine sind während der Elektrophorese weniger geladen als saure (pH 8,8), zeichnen sich also bei identischer Masse durch ein langsames Laufverhalten aus. Aus diesem Grund sollten im Präparat SdpA_{MCI}-I2 überwiegend saure Dimere vorhanden sein, das Vorhandensein von signifikanten Mengen des sauren Dimers S1S1 ist damit ausgeschlossen. Das Präparat-I2 setzt sich also wie folgt zusammen:

$$b(S1+S2) + c(S1+S3) + d(S2+S2) + e(S2+S3) + f(S3+S3) = 50\%$$

$$S1 + S2 + S3 = 100\%$$

womit sich für die Monomere im Zusammenhang mit dem ermittelten Monomerenverhältnis folgende Beziehungen ergeben:

$$(1) \quad S1 = 48\% = b + c$$

$$(2) \quad S2 = 37\% = b + 2d + e$$

$$(3) \quad S3 = 15\% = c + e + 2f$$

Durch Einsetzen der Gleichung (1) in (2) und anschließende Subtraktion von der Gleichung (3) ergibt sich:

$$(4) \quad 2\% = d + e + f$$

Damit ist die Summe der Anteile der dimeren Proteine S2S2, S2S3 und S3S3 kleiner als 2% und kann vernachlässigt werden. Aus den nun stark vereinfachten Gleichungen (1), (2) und (3) kann nun auf das Vorhandensein von $74 \pm 2\%$ des Dimers S1S2 und $22 \pm 2\%$ des Dimers S1S3 geschlossen werden.

In analoger Weise lässt sich auch die Zusammensetzung anderer Präparate berechnen.

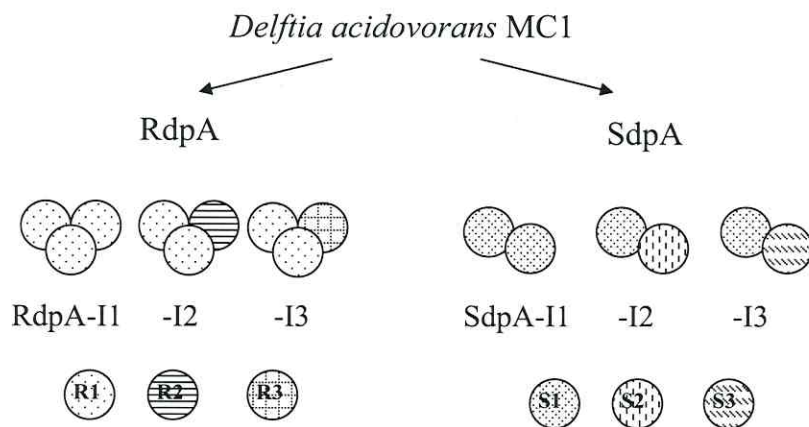


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Enzymausstattung von *Delftia acidovorans* MC1

Für das RdpA_{MC1} ist es nicht gelungen, die nativen Enzymformen so voneinander zu trennen (3.1.1.2.2), dass eine sichere Aussage zu den Kombinationen der Untereinheiten im trimeren Protein gemacht werden kann. Sicher ist jedoch, dass das Monomer R1, wie beim SdpA_{MC1}, die dominierende Form ist; die Proteine R2 und R3 kommen in wesentlich geringeren Konzentrationen vor. Aus diesem Grund liegt die Annahme nahe, dass das RdpA_{MC1} die Zusammensetzung wie in Abbildung 21 dargestellt aufweist. Eine solche Kombination würde auch die im Gegensatz zum SdpA_{MC1} relativ schlechtere Trennbarkeit der Enzymformen erklären, da der Einfluss der dritten Untereinheit mit deren leicht niedrigeren pI ziemlich gering ist.

3.2.3.2 Enzyme aus *Rhodferax* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH

3.2.3.2.1 Die (R)-spezifischen Enzyme

Wie bereits oben erwähnt wurde, konnte in allen drei untersuchten Stämmen eine identische Primärstruktur für das RdpA nachgewiesen werden. Physikochemische Eigenschaften wie Molmasse und isoelektrischer Punkt sollten sich für das RdpA der verschiedenen Stämme also nicht unterscheiden. Die Molmasse der (R)-spezifischen monomeren Enzyme konnte für alle drei Stämme im SDS-Gel mit 34,7 kD bestimmt werden. Mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie wurde eine Molmasse des nativen RdpA_{P230} von 106 kD und des denaturierten Proteins von 39,7 kD bestimmt. Es handelt sich also wie beim RdpA_{MC1} um ein trimeres Protein (Ruhland, 2003). Eine 2D-gelelektrophoretische Auftrennung des RdpA_{P230} ist in Abbildung 22 zu sehen. Man kann deutlich das Vorhandensein verschiedener Spots erkennen, von denen die markanten über MS-Fingerprintanalyse eindeutig dem RdpA zugeordnet werden konnten. Das Erscheinungsbild des RdpA_{P230} im 2D-Gel weicht, trotz der gleichen Primärstruktur, von dem des RdpA_{MC1} stark ab. Konnten für das RdpA_{MC1} eine Hauptform (R1) und mehrere mengenmäßig weniger stark vertretene monomere Nebenformen (R2, R3) nachgewiesen werden, so sind es für das RdpA_{P230} drei Hauptformen und eine zahlenmäßig nicht eindeutig bestimmte Anzahl von Nebenformen. Auch in der elektrophoretischen Auftrennung

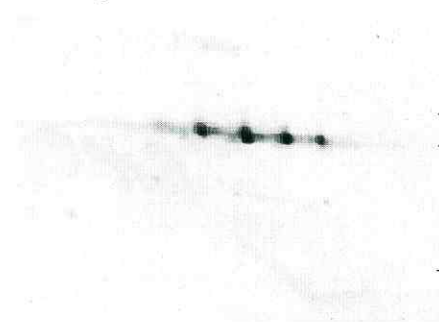


Tabelle 21: Rf-Werte der RdpA- Enzyme nativ:
5% T/2,67% C, denaturierend: 12% T/2,67% C, es wurde die stärkste Bande zugrunde gelegt

Enzym	nativ	denaturierend
RdpA-rec	0,690	0,538
RdpA _{MC1}	0,685	0,531
RdpA _{P230}	0,655	0,533
RdpA _{MH}	0,687	0,535

Abbildung 22: 2D-gelelektrophoretische Auftrennung des RdpA_{P230} (Ausschnitt)

unter nativen Bedingungen unterscheiden sich die RdpA-Enzyme aus P230 und MC1, die Hauptform des P230 besitzt einen signifikant niedrigeren Rf-Wert als die des RdpA_{MC1} (Tabelle 21). Für das native RdpA_{MH} wurde der gleiche Rf-Wert im 5%igen Acrylamidgel bestimmt wie für das Enzym aus MC1. 2D-Gelelektrophoretische Auftrennungen liegen hier nicht vor.

3.2.3.3 Die (S)-spezifischen Enzyme

Die SdpA-Enzyme der drei Stämme MC1, P230 und MH unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur erheblich (3.2.1.2), es handelt sich also um komplett unterschiedliche Proteine.

Aus dem Stamm *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 konnten zwei (S)-spezifische Enzyme gereinigt werden. Mittels SDS-PAGE wurde die Molmasse des SdpA_{P230-1}-Monomers auf 33,3 kD und die des SdpA_{P230-2} auf 32,4 kD bestimmt. Die Molmasse der nativen Enzyme konnte nicht ermittelt werden, da keine reinen Enzympräparate vorlagen. In der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung werden die im SDS-Gel homogenen Proteinbanden beider (S)-spezifischer Enzyme aus P230 in mehrere Proteinfractionen getrennt (Abbildung 23).

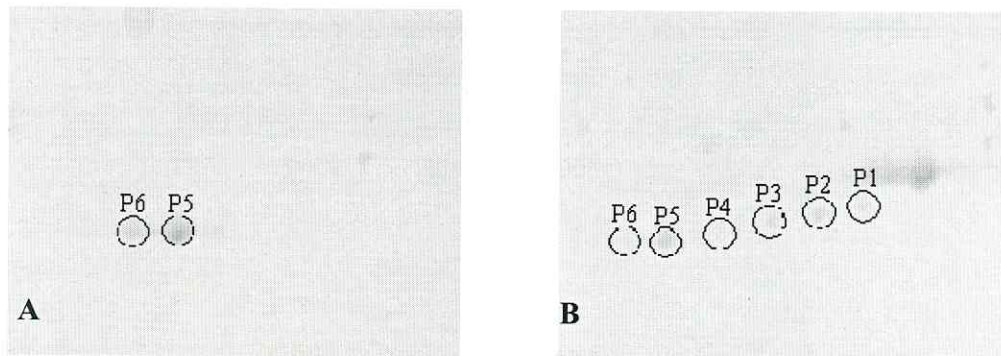


Abbildung 23: 2D-Gelelektrophoretische Auftrennung des SdpA_{P230-1} (A) und SdpA_{P230-2} (B) (Ausschnitte)

Das SdpA_{P230-1} ist ein oligomeres Enzym, das sich aus Kombinationen von zwei Untereinheiten (P5, P6) zusammensetzt. Das Monomer P5 dominiert in dem untersuchten Enzympräparat. Das Enzym SdpA_{P230-2} ist ebenfalls ein oligomeres Enzym, es besteht aus Kombinationen der monomeren Formen P1-6, die Anzahl der Untereinheiten des nativen Enzyms ist nicht bekannt. Auch in diesem Präparat dominiert das Monomer P5. Der Massenunterschied zwischen P1 (32,4 kD; pI 5,8) und P6 (32,2 kD; pI 5,3) beträgt 0,2 kD, die isoelektrischen Punkte der Monomere liegen innerhalb von 0,5 pH-Einheiten. Alle sechs Untereinheiten der (S)-spezifischen Enzyme des P230 zeigen nach tryptischem Verdau und MS-Analyse das gleiche Peptidspaltungsmuster (Abbildungen 24A+B), ebenso identisch sind die Fragmentierungsmuster der Peptide (Abbildungen 24C+D). Die Monomere (P1-6) des SdpA_{P230} sollten sich also durch identische Primärstrukturen auszeichnen. Durch Datenbankrecherche konnte aufgrund des Peptidmustervergleiches mit bereits bekannten Proteinen eine hohe Ähnlichkeit zum SdpA_{MH} festgestellt werden. Peptide, die den Aminosäuresequenzen von 97-113, 136-148, 208-222, 223-236 und 237-253 des SdpA aus MH entsprechen, konnten ebenfalls im tryptischen Verdau der P230-Enzyme gefunden. Trotzdem sind die SdpA-Enzyme aus MH und P230 nicht identisch, wie aus den mittels Edman-Abbau gewonnenen Sequenzen deutlich wird (Tabelle 20).

Das denaturierte Protein SdpA_{MH} besitzt eine Molmasse von 32,2 kD (SDS-PAGE).

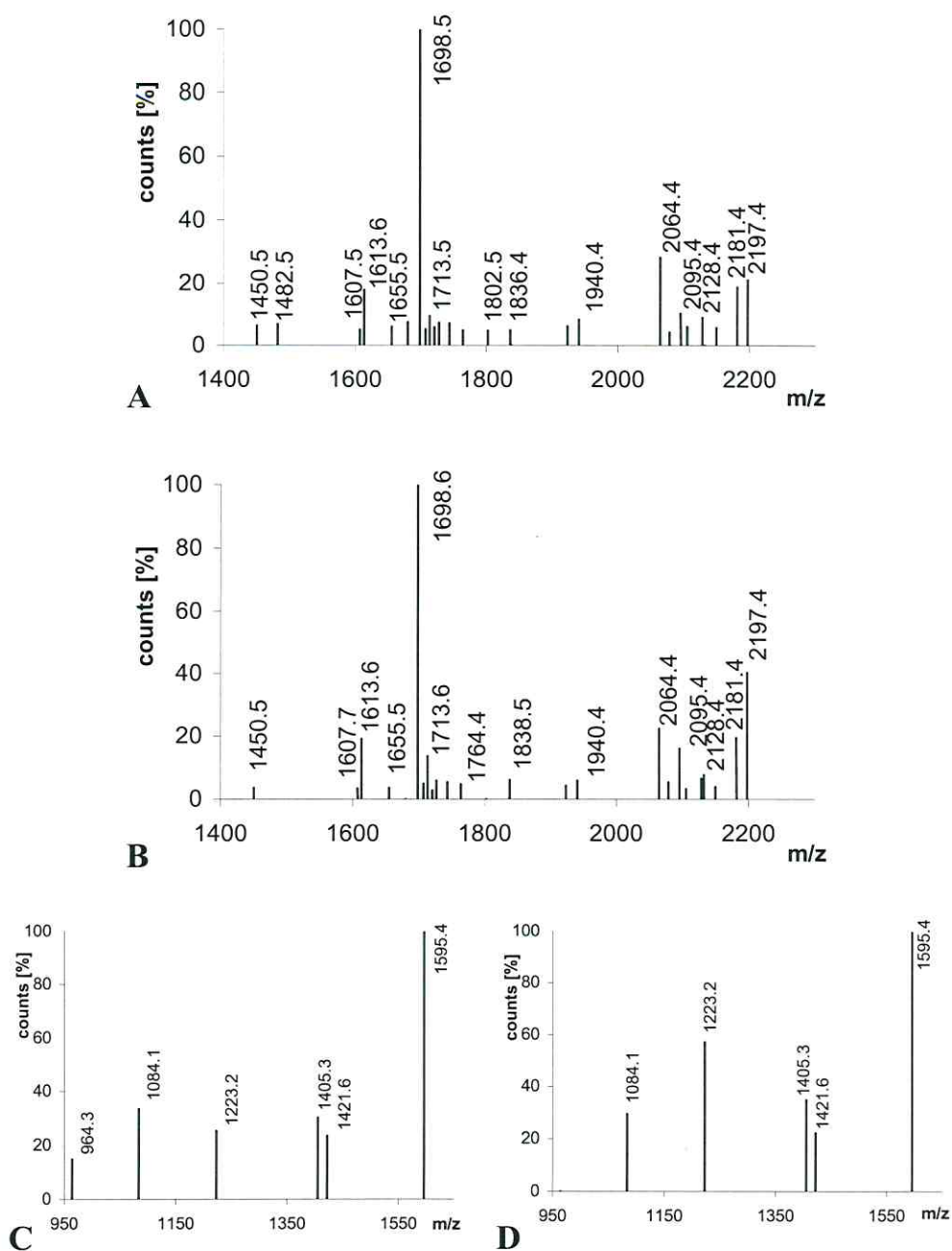


Abbildung 24: Massenspektrometrische Analysen der SdpA_{P230}-Monomere (tryptischer Verdau). A: Peptidspaltmuster vom SdpA_{P230}-P1 (MS-1), B: Peptidspaltmuster vom SdpA_{P230}-P6 (MS-1) C: Fragmentierungsmuster des 1613,6 Peptides des SdpA_{P230}-P1 (MS-2), D: Fragmentierungsmuster des 1613,6 Peptides des SdpA_{P230}-P6 (MS-2) werden.

3.2.3.4 Rekombinante Enzyme

Die überexprimierten Proteine RdpA_{MC1-rec} und SdpA_{MC1-rec} zeigen nach Auftrennung im Acrylamidgel sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen jeweils nur eine Proteinbande, was auf das Vorhandensein nur einer Enzymform schließen lässt. Das SdpA_{MC1-rec} entspricht dabei dem SdpA_{MC1-I1} (Abbildung 25B), die Enzymform SdpA_{MC1-I2} ist in diesem Präparat nicht detektierbar. Das rekombinante RdpA besitzt den gleichen R_F-Wert wie die Hauptbande des RdpA_{MC1} (Abbildung 25A).

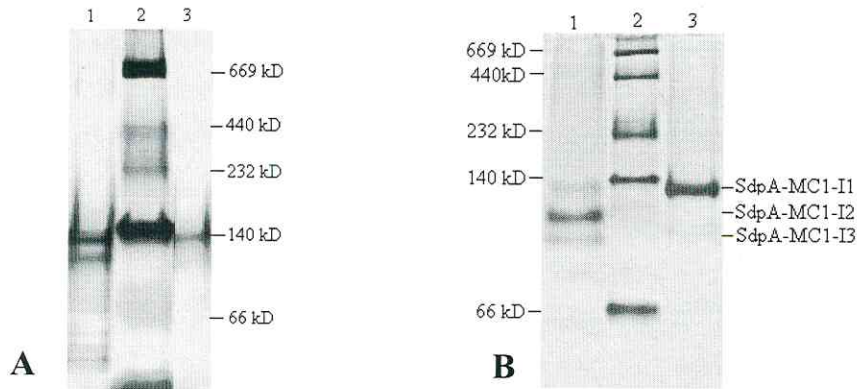


Abbildung 25: Native gelelektrophoretische Auftrennung A: des nativen (Spur 1) und des rekombinanten RdpA_{MC1} (Spur 3), B: des nativen (Spur 1) und rekombinanten SdpA_{MC1} (Spur 3)

Mittels 2D-Gelelektrophorese lassen sich die rekombinanten Enzympräparate in mehrere Spots auftrennen (Abbildung 26). Das rekombinante RdpA liefert das gleiche Bild, wie das native Enzym, drei monomere Formen konnten nachgewiesen werden. Auch für das SdpA_{MC1-rec} wurden die drei Monomeren S1, S2 und S3 gefunden. Das Monomerenverhältnis des Enzyms entspricht dem des SdpA_{MC1-I2}, dementsprechend sollte das rekombinante SdpA_{MC1} zu 74% aus dem Dimer S1S2 und zu 22% des Dimers S1S3 zusammengesetzt sein. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen aus der nativen Gelelektrophorese, wonach die Zusammensetzung analog dem SdpA_{MC1-I1} sein müsste, also dem Dimer S1S1 entspräche.

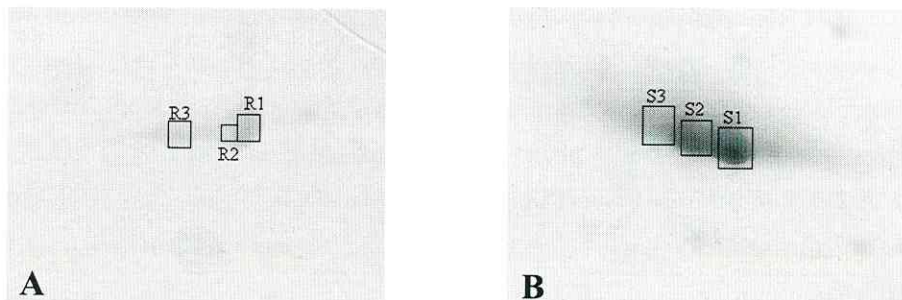


Abbildung 26: 2D-gelelektrophoretische Auftrennung der rekombinanten Enzyme RdpA_{MC1-rec} (A) und SdpA_{MC1-rec} (B)

3.2.4 Posttranslationale Modifikationen

Sowohl für die RdpA- als auch für die SdpA-Enzyme der Bakterienstämme MC1, P230 und MH konnten unterschiedliche Enzymformen mit identischen Aminosäuresequenzen gezeigt werden. Der Unterschied zwischen den Enzymformen ist also in einer posttranslationalen Modifizierung zu suchen.

3.2.4.1 Die (R)-spezifischen Enzyme

Für die drei RdpA-Proteine der untersuchten Stämme konnten ladungsisomere Monomere mit gleicher Masse nachgewiesen werden. Eine posttranslationale Modifizierung der Primärsequenz hat eine Änderung der Gesamtladung, nicht aber der Molmasse des Enzyms bewirkt, ist also eine kleine geladene Gruppe oder bindet an eine geladene Gruppe des Enzyms. Die Aminosäurebereiche 1-24, 43-72, 85-109 und 147-162 wurden per Edman-Abbau eindeutig sequenziert. Es wurden keine zweifelhaften Aminosäure-Peaks und damit potentielle Modifizierungen gefunden. Durch MS-Analysen konnte eine Sequenzabdeckung von 73% erreicht werden, aber auch mit dieser Methode wurden keine Modifizierungen am Protein identifiziert. Nicht gefunden wurden bei MS-Analysen die Aminosäuresequenzen 12-14, 35-72, 96-104, 253-256, und 272-295.

3.2.4.2 Das SdpA_{MC1}

Vom SdpA_{MC1} wurden ebenfalls ladungsisomere Monomere mit gleicher Masse nachgewiesen, die das Produkt einer posttranslationalen Modifizierung sein müssen, da nur ein *sdpA*-Gen in MC1 gefunden wurde. Mittels Aminosäuresequenzierung durch Edman-Abbau konnte eine Modifizierung an den Peptiden 1-24 und 170-182 ausgeschlossen werden. Durch MS-Analyse des tryptischen Verdaus ist es gelungen, eine 92%ige Sequenzabdeckung des Proteins zu erreichen. Die Sequenzbereiche 82-87, 135-141, 213-227 und 274-279 wurden nicht gefunden. Bei der Analyse der Peptid-Massen (1677,73 D; 1813,72 D und 1975,85 D), die von den theoretisch erwarteten abwichen, wurden Oxidationen an Trp235 und Trp255 nachgewiesen. Ebenso wurde eine Modifikation mit der Masse 209 am Cys237 gefunden. Bei der Modifikation mit der Masse 209 handelt es sich um eine untypische Modifizierung, die bisher nicht beschrieben ist. Die Struktur und die Elementar-Zusammensetzung dieser Masse sind nicht bekannt. Aus den Isotopenmustern kann man schlussfolgern, dass keine Halogenatome an der Bildung dieser Masse beteiligt sind, sie sollte nur aus den Elementen C, H, O, N und S bestehen.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen zur Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. R. Hoffmann (BBZ, Leipzig) durchgeführt.

3.3 Enzymkinetische Charakterisierung und Reaktionsmechanismus

3.3.1 Bestimmung der Anzahl funktionell aktiver Zentren

Die Anzahl funktionell aktiver Zentren wurde über deren α -KG-Bindevermögen ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass pro funktionell aktivem Zentrum genau ein α -KG-Molekül bindet. Zentren, die nicht zur Katalyse der Reaktion beitragen, binden kein α -KG.

Tabelle 22: Spezifische Aktivität [U/mg] vom rekombinanten RdpA und des systematisch inaktivierten Enzyms, RdpA (0.797 μ M) wurde zum einen durch Inkubation mit unterschiedlichen Mengen DEPC (DEPC-1 = 0.266 μ M, DEPC-2 = 0.531 μ M) und zum anderen durch Temperatureinwirkung inaktiviert

<i>Substrat</i>	RdpA	RdpA + DEPC-1	RdpA + DEPC-2	RdpA + 10 min 35°C
<i>(R)-DP</i>	11,66	4,62	0,715	3,83
<i>(R)-MCP</i>	8,62	3,74	0,464	2,93
<i>2,4-D</i>	1,29	0,55	0,048	0,45
<i>MCPA</i>	1,1	0,46	0,069	0,41

Zum Nachweis einer direkten Korrelation zwischen der Anzahl von funktionell aktiven Zentren, also der spezifischen Aktivität, und dem Vermögen, α -KG zu binden, wurden Enzympräparate systematisch durch die Zugabe von Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem Reagenz, das spezifisch His-Reste modifiziert, inaktiviert (Tabelle 22). Die Zugabe von 33% DEPC der Molarität des RdpA zum Enzym resultiert im Verlust von 60% der spezifischen Aktivität, d.h. nur 40% der aktiven Zentren sollten den enzymatischen Umsatz noch katalysieren. Verdoppelt man die Menge des zugegebenen DEPC (67% der Molarität des RdpA), so wird ein Aktivitätsverlust von 94% beobachtet. Der Aktivitätsverlust durch die Zugabe von DEPC ist nicht stöchiometrisch. Es wird mehr Enzym inaktiviert als erwartet, d.h., allein durch die Einwirkung der Inkubationsbedingungen auf das Enzym muss bereits 30% der Spaltungsaktivität verlorengehen.

In Abbildung 27 konnte gezeigt werden, dass sich ein Verlust von Enzymaktivität direkt proportional zur Verringerung der α -KG-Bindekapazität verhält. Völlig aktives Enzym zeigt im linearen Plot einen Anstieg von 1,03; bei Einsatz des zu 60% inaktivierten RdpA-Präparates beträgt der Anstieg der Geraden 0,46, etwa 43% des völlig aktiven Enzyms. Eine ähnlich hohe Korrelation wurde bei Inaktivierung durch Temperatur beobachtet: eine Inaktivierung um 67% hatte eine Verminderung der α -KG-Bindung von 66% zur Folge. Beim vergleichweisen Einsatz von Rinderserumalbumin konnte keine α -KG-Bindung nachgewiesen werden. Die direkte Korrelation zwischen α -KG-Bindung und Enzymaktivität wurde genutzt, um Anteile

von aktivem Enzym in den jeweiligen Präparaten zu ermitteln. Dies ist ein wichtiges Kriterium, um die Wechselzahl exakt bestimmen zu können.

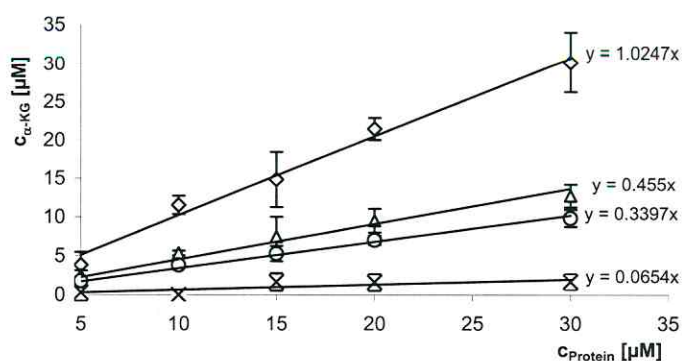


Abbildung 27: Beziehung zwischen α -KG-Bindung und eingesetzter Proteinmenge, Enzymaktivität für Enzympräparate mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität RdpA (◇), RdpA + DEPC-1 (Δ), RdpA + DEPC-2 (x) und RdpA + Temperatur (○)

In Tabelle 23 sind die über die α -KG-Bindung ermittelten Anteile von aktivem Enzym in den Enzympräparaten zusammengefasst.

Tabelle 23: Prozentuale Anteile an aktivem Enzym in verschiedenen Enzympräparaten von RdpA und SdpA

Enzym	[%]	Enzym	[%]	Enzym	[%]
RdpA _{MC1-rec}	98	SdpA _{MC1-rec}	89	SdpA _{P230-1}	5
RdpA _{MC1}	21	SdpA _{MC1}	70	SdpA _{P230-1}	8
RdpA _{P230}	55	SdpA _{MC1-I1}	40	SdpA _{MH}	11
RdpA _{MH}	9	SdpA _{MC1-I2}	35		

3.3.2 Substratverwertungsspektren

Bei der Reinigung der Phenoxypropionat-spaltenden Enzyme aus den Stämmen *Delfia acidovorans* MC1, *Rhodospirillum* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH konnten Enzyme mit unterschiedlichen Substrat- und Enantiospezifitäten voneinander getrennt werden. Alle drei Stämme besitzen sowohl ein (R)- als auch ein (S)-spezifisches Enzym.

3.3.2.1 Die (R)-spezifischen Dioxygenasen

Die (R)-spezifischen Enzyme aller drei Stämme, einschließlich des rekombinanten RdpA_{MC1-rec} sind hochspezifisch für die (R)-Enantiomere der 2-Phenoxypropionate; (S)-Enantiomere werden nicht umgesetzt. Die betreffenden Enzyme spalten zu einem gewissen Maße aber auch Phenoxyacetate; Phenoxybutyrate werden nicht gespalten (Tabelle 24). Die höheren Umsatzraten für die 2-Phenoxypropionate im Vergleich zu den Phenoxyacetaten, wobei die 2,4-Dichlor-substituierten Verbindungen wiederum schneller gespalten werden als die 4-Chlor-2-methyl-Verbindungen, sind ebenfalls allen RdpA-Enzymen gemeinsam. Unabhän-

gig von diesen grundsätzlichen Aktivitätskriterien wird die Aktivität von den Substituenten beeinflusst. 2,4-dichlorierte Derivate werden mit höherer Rate gespalten als 4-Chlor-2-methyl-Derivate. Unsubstituierte Phenoxyalkanoate sind schlechte Substrate, so werden Substrate ohne Substituenten nicht oder nur sehr schlecht (Phenoxyacetat) umgesetzt, Substrate ohne Chlor an Position 4 des aromatischen Ringes werden ebenfalls nur sehr schlecht verwertet. Die Abwesenheit eines Substituenten an der Position 2 hat dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Spaltbarkeit der Verbindung. 3-Phenoxypropionat wird nicht umgesetzt.

Tabelle 24: Relative spezifische Aktivitäten der RdpA-Enzyme (nach HIC) aus MC1, P230 und MH sowie des RdpA_{MC1-rec} für verschiedene Phenoxyalkanoate Alle Herbizide außer den (S)-Enantiomeren wurden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, (S)-Enantiomere lagen in einer Konzentration von 0,5 mM, α -KG von 1 mM im Reaktionsansatz vor. Die Aktivität für (R)-DP wurde eins gesetzt.

<i>Substrat</i>	RdpA_{MC1}	RdpA_{P230}	RdpA_{MH}	RdpA_{MC1-rec}
<i>(R)-DP</i>	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>(R)-MCP</i>	0,72	0,73	0,73	0,73
<i>(S)-DP</i>	-	-	-	-
<i>(S)-MCP</i>	-	-	-	-
<i>2,4-D</i>	0,15	0,27	0,12	0,11
<i>MCPA</i>	0,11	0,23	0,08	0,09
<i>2,4-DB</i>	-	-	-	-
<i>MCPB</i>	-	-	-	-
<i>Phenoxyacetat</i>	0,02	0,01	0,01	0,01
<i>3-Phenoxypropionat</i>	-	-	-	-
<i>(R,S)-2-(4-Chlorphenoxy)propionat</i>	0,51	0,50	0,48	0,50
<i>(R,S)-2-(m-Chlorphenoxy)propionat</i>	0,06	0,09	0,06	0,07

Obwohl sich die Enzyme der drei Stämme in ihrer Primärstruktur nicht unterscheiden, zeigen sie signifikante Unterschiede in den Aktivitäten zur Spaltung der Phenoxyacetate. Die RdpA-Enzyme aus MC1, MH und das rekombinante RdpA spalten die Phenoxyacetate mit 10-15% der Aktivität für (R)-DP. Das RdpA_{P230} weist unter Substratsättigung jedoch die doppelte Umsatzrate, nämlich etwa 25% auf.

Für das zweite Substrat, das α -KG, zeigen alle RdpA-Enzyme eine hohe Spezifität, andere α -Ketosäuren, z.B. Pyruvat, α -Ketobutyrat oder α -Ketovalerat, dienen nicht als Substrate.

3.3.2.2 Die (S)-spezifischen Dioxygenasen

Die Substratverwertungsspektren der (S)-spezifischen Enzyme sind sehr unterschiedlich. Allen untersuchten SdpA-Enzymen gemeinsam ist, dass sie bevorzugt (S)-Enantiomere der 2-Phenoxypropionate, nicht aber 3-Phenoxypropionate spalten (Tabelle 25). SdpA_{MC1} spaltet (S)-DP bei Substratsättigung mit einer höheren Umsatzrate als (S)-MCP, bei den SdpA-Enzymen aus P230 und MH ist es genau umgekehrt. Das SdpA_{MC1} spaltet auch Phenoxyace-

tat-Derivate mit hoher Rate: 2,4-D wird mit 35% und MCPA sogar mit 45% der Spaltaktivität für (S)-DP umgesetzt. Auch das SdpA-Enzym aus MH ist in der Lage, die Phenoxyacetate als Substrate zu verwerten, die relativen Spaltungsaktivitäten liegen zwischen 17 und 28%. Im Gegensatz zu den RdpA-Enzymen werden im Falle der Phenoxyacetate die 4-Chlor-2-methyl-substituierten Herbizide besser umgesetzt als die 2,4-dichlorierten Substrate. Die Phenoxyacetate werden im Gegensatz zu SdpA_{MC1} und SdpA_{P230} von den SdpA-Enzymen aus P230 nicht gespalten. Unsubstituierte Herbizide werden von allen betrachteten SdpA-Enzymen nur in sehr geringem Umfang umgesetzt.

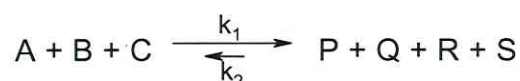
Tabelle 25: Relative Spaltaktivitäten der SdpA-Enzyme (HIC) aus MC1, P230 und MH sowie des SdpA_{MC1}-rec bezüglich des Phenoxalkanoats Alle Herbizide außer den (S)-Enantiomeren wurden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, (S)-Enantiomere lagen in einer Konzentration von 0,5 mM, α -KG von 1 mM im Reaktionsansatz vor. *p*-CPP = (R,S)-2-(4-Chlorphenoxy)propionat; *m*-CPP = (R,S)-2-(*m*-Chlorphenoxy)-propionat, 3-PP = 3-Phenoxypropionat. Die Aktivität für (S)-DP wurde 1 gesetzt.

Substrat	SdpA _{MC1}	SdpA _{P230-1}	SdpA _{P230-2}	SdpA _{MH}	SdpA _{MC1-rec}
(R)-DP	-	-	-	-	-
(R)-MCP	-	-	-	-	-
(S)-DP	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
(S)-MCP	0,52	2,60	2,26	2,31	0,50
2,4-D	0,35	-	-	0,17	0,35
MCPA	0,45	-	-	0,28	0,48
2,4-DB	-	-	-	-	-
MCPB	-	-	-	-	-
Phenoxyacetat	0,04	-	-	0,01	0,04
3-PP	-	-	-	-	-
<i>p</i> -CPP	0,53	0,29	0,25	0,17	0,54
<i>m</i> -CPP	0,28	0,67	0,65	-	0,30

Auffällig ist, dass die SdpA-Enzyme aus P230 im Gegensatz zu den SdpA-Enzymen aus MC1, MH und den RdpA-Enzymen, monosubstituierte Substrate mit Chlor in *meta*-Position am aromatischen Ring besser spalten können, als solche mit Chlor-Substituenten in *para*-Position. Andere α -Ketosäuren als α -Ketoglutarat dienen in allen untersuchten SdpA-Enzymen wiederum nicht als Substrat.

3.3.3 Enzymstabilität und Reaktionsordnung

Bei der untersuchten Enzymreaktion handelt es sich um eine Mehrsubstratreaktion vom Typ:



Gleichung 6: Allgemeine Reaktionsgleichung Phenoxypionat-spaltender Enzyme A: Phenoxalkanoat, B: α -Ketoglutarat, C: O₂, P: 2,4-Dichlorphenol (DCP) bzw. 2-Methyl-4-chlorphenol (MCP), Q: 2-Oxoalkanoat, R: CO₂, S: Succinat

Es konnten für die untersuchten Enzyme nur die Hin-, nicht aber die Rückreaktionen nachgewiesen werden; k_2 ist also für diesen enzymatischen Umsatz sehr klein. Die Größen der Geschwindigkeitskonstanten sind bei Mehrsubstratreaktionen zumeist von der Änderung der Konzentrationen aller Ausgangsstoffe oder Produkte abhängig. Die Geschwindigkeitsgleichung für die Hinreaktion ist in Gleichung 7 dargestellt.

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = -\frac{d[C]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{d[Q]}{dt} = \frac{d[R]}{dt} = \frac{d[S]}{dt} = k_1[A][B][C] = k_1[A]^3 = k_1[B]^3 = k_1[C]^3$$

Gleichung 7: Geschwindigkeitsgleichung für die Hinreaktion Phenoxalkanoat-spaltender Enzyme A: Phenoxalkanoat B: α -Ketoglutarat, C: O_2 , P: DCP bzw. MCP, Q: 2-Oxoalkanoat, R: CO_2 , S: Succinat

Die Hinreaktion ist eine Reaktion dritter Ordnung, bei der die Geschwindigkeitskonstante bestimmt werden kann, wenn die Umsatzgeschwindigkeit v und die zeitlichen Änderungen der Konzentration aller drei Ausgangsstoffe (A, B, C) bekannt sind. Da die Ausgangsstoffe in einem stöchiometrischen Verhältnis von eins umgesetzt werden, ist der Betrag der zeitlichen Abnahme der Konzentrationen für alle drei Ausgangsstoffe identisch, es muss also nur der Umsatz eines Stoffes verfolgt werden.

Für die Ermittlung von kinetischen Konstanten unter Verwendung der Gesetzmäßigkeiten von Einsubstratreaktionen ist es notwendig, eine Reaktion erster Ordnung vorliegen zu haben, d.h. die Umsatzrate muss und darf nur von der Konzentration eines Ausgangsstoffes abhängig sein. Um dies in Näherung zu erreichen, wurden die Konzentrationen von zwei Reaktionspartnern so gewählt, dass sie sich während der Reaktion praktisch nicht ändern. Sie wurden deshalb so gewählt, dass im Reaktionsansatz, je nach Experiment, ein großer Überschuss von zwei Reaktanten vorlag, so dass sich während des Umsatzes nur die Konzentration eines Ausgangsstoffes merklich ändert. Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich eine stark vereinfachte Geschwindigkeitsgleichung, die *pseudo-erster* Ordnung ist (Gleichung 8).

$$v = k_1[A][B]_0[C]_0 = k_1[A]$$

Gleichung 8: Geschwindigkeitsgleichung *pseudo-erster* Ordnung für die Reaktion Phenoxypionat-spaltender Enzyme A: Phenoxalkanoat, B: α -Ketoglutarat, C: O_2 , P: DCP bzw. MCP, Q: 2-Oxoalkanoat, R: CO_2 , S: Succinat

Eine Reaktionskinetik nach Gleichung 8 lässt sich durch halblogarithmische Auftragung linearisieren (Gleichung 9).

$$-\int_{A_0}^{A_t} \frac{d[A]}{[A]} = \int_{t_0}^t k_1 dt \quad \ln[A] = \ln[A]_0 - k_1 t$$

Gleichung 9: Herleitung der integrierten Form der vereinfachten Geschwindigkeitsgleichung

In Abbildung 28A ist der zeitliche Verlauf der DCP-Bildung bei der Spaltung der Enantiomeren des Dichlorprop durch die Enzyme RdpA_{MC1} und SdpA_{MC1} dargestellt. In den ersten Mi-

nuten nimmt die DCP-Konzentration zunächst bei beiden Enzymen linear zu, dann wird die Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme kleiner und sinkt schließlich fast auf Null ab. Ein vollständiger Umsatz des Substrates wurde nicht erreicht. Dieser Verlauf der Produktbildung ist für alle eingesetzten Substratkonzentrationen zu beobachten. Nach 2000-4000 Umsätzen am aktiven Zentrum verliert das Enzym komplett seine Aktivität. Ein Inaktivierungseffekt durch Verdünnung als Grund für den Verlust von Enzymaktivität kann ausgeschlossen werden, da der Kurvenverlauf unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration auftrat. Ebenso konnte eine Verknappung von Substraten wie Sauerstoff und α -KG als Inaktivierungsgrund ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führt zu einer Kurve mit analogem Verlauf; wieder nimmt die DCP-Konzentration zunächst linear zu und bleibt dann nach etwa 2000-4000 Umsätzen pro aktivem Zentrum im Ansatz konstant. Eine Verknappung an Ascorbat kann aufgrund dieser Erkenntnis ausgeschlossen werden, da erstens Ascorbat im Überschuss (200 μ M) im Reaktionsansatz vorlag, und zweitens eine Ascorbat-Oxidation zeitabhängig und unabhängig von der Substratkonzentration sein sollte. Der Einsatz von einer höheren Substratkonzentration führt jedoch zu einem schnelleren Umsatz und damit zu einer kürzeren Zeit bis zum Erreichen der Inaktivierung des Enzyms.

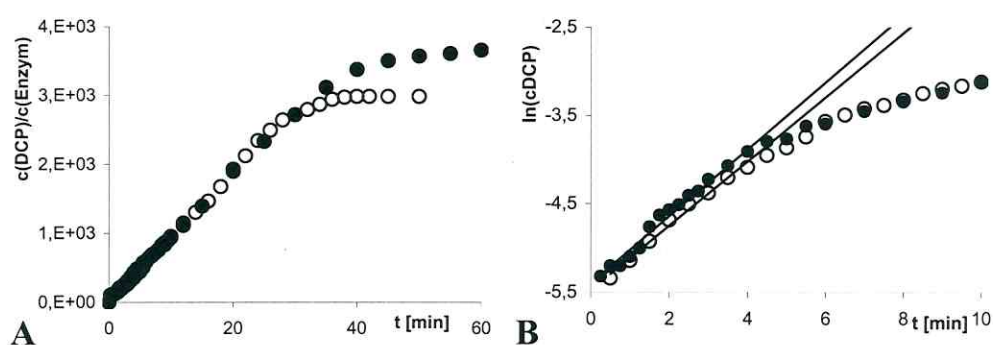


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung (DCP) beim enzymatischen Umsatz von (R)-DP durch RdpA_{MCI} (○) und von (S)-DP durch SdpA (●). A: $c(\text{DCP}) = f(t)$, B: $\ln(c\text{DCP}) = f(t)$ es wurden 10 μ M Dichlorprop, 1 mM α -KG, 200 μ M Fe(II) und 200 μ M Ascorbat eingesetzt, die eingesetzten Enzyme entsprachen dem Reinheitsgrad nach HIC, 1,7 mg/l RdpA_{MCI}, 1,5 mg/l SdpA_{MCI} (die Enzymmenge wurde durch ihr α -KG-Bindevermögen bestimmt), die Sauerstoffkonzentration nahm während der Reaktion von 1 mM auf 0,8 mM ab.

Die lineare Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit in den ersten Minuten deutet eigentlich auf eine Reaktion nullter Ordnung hin, die Umsatzrate des Enzyms scheint unabhängig von der Substratkonzentration. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine Erhöhung der Substratkonzentration im Testansatz führt auch zur Erhöhung der Umsatzraten. Der Anstieg der Kurve kann somit also nicht wirklich linearer Natur sein, vielmehr handelt es sich, da lediglich 1%

des Substrates umgesetzt wurde, um einen kleinen Ausschnitt einer hyperbolen Produktbildungskurve erster Ordnung.

Für die Reaktionen des RdpA_{MCI} und des SdpA_{MCI} konnte die Reaktion *pseudo-erster* Ordnung nur wenige Minuten gewährleistet werden (Abbildung 28B). Bereits nach vier Minuten blieb die Geschwindigkeitskonstante nicht mehr konstant, sondern nahm für beide Enzyme über die Zeit stark ab, bis die Reaktion zum Erliegen kam. Die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion (k_1) konnte in den ersten vier Minuten der Reaktion für das RdpA_{MCI} auf $0,36 \text{ min}^{-1}$ und für das SdpA_{MCI} auf $0,38 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden.

3.3.4 Kinetische Kennlinien

3.3.4.1 Die Kennlinien der (S)-spezifischen Dioxygenasen

3.3.4.1.1 Das SdpA_{MCI}

Das säulenchromatographisch gereinigte SdpA_{MCI} (HIC) zeichnet sich hinsichtlich der eingesetzten Herbizide (S)-(DP), (S)-MCPP, 2,4-D und MCPA durch komplexe kinetische Kennlinien aus (Abbildung 29). Die Zunahme der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration erfolgt deutlich zweiphasig und zeigt im Falle der Phenoxypropionate eine ausgeprägte Substratüberschusshemmung. Bei dem Einsatz von Phenoxyacetaten als Substrat konnten im untersuchten Konzentrationsbereich dagegen keine derartigen Hemmungseffekte beobachtet werden. Die Ursache der komplexen Kinetik eines solchen Enzympräparates ist im Vorhandensein von multiplen Enzymformen begründet, die sich in ihren kinetischen Parametern unterscheiden.

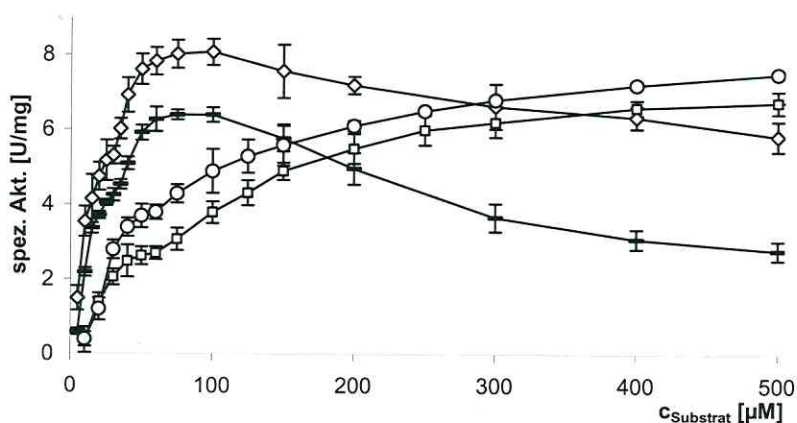


Abbildung 29: Kinetische Kennlinien des SdpA_{MCI} für die Substrate (S)-DP(◇), (S)-MCPP (□), 2,4-D (△) und MCPA (○)

Die Abbildungen 30A und B zeigen die kinetischen Kennlinien der voneinander getrennten Enzymformen des SdpA_{MC1} am Beispiel der Phenoxypionate (Phenoxyacetate sind hier nicht dargestellt, zeigen aber das gleiche Bild). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Kinetiken der beiden Enzympräparate sowohl in ihrem Anstieg als auch in ihrer Umsatzgeschwindigkeit signifikant voneinander unterscheiden. Die Zunahme der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration erfolgt in beiden Fällen stetig, eine Zweiphasigkeit kann nicht beobachtet werden. Wiederum zeigt sich für die Phenoxypionate eine Substratüberschusshemmung. Die Kennlinien des rekombinanten SdpA_{MC1}, die zum Vergleich angeführt wurden, decken sich für alle Herbizide gut mit denen der Enzymform SdpA_{MC1}-II. Linearisierende Verfahren zur Auswertung der Kennlinien sind in den Abbildungen 30C und D exemplarisch für das rekombinante SdpA_{MC1} dargestellt. Die kinetischen Kennlinien zeigen in beiden Darstellungsformen, sowohl im Lineweaver-Burk- als auch im Hill-Plot, keine durchgängigen Geraden über den Konzentrationsbereich, was auf ein Abweichen von der Michaelis-Menten-Kinetik hindeutet. In der Lineweaver-Burk-Darstellung (Abbildung 30C) ist ein vierphasiges Verhalten für den (S)-DP Umsatz zu erkennen. Bei kleinen Substratkonzentrationen fällt die Kurve zunächst mit einem geringen Anstieg ab, gefolgt wird diese Phase von einem steileren Abfall der Kurve. Anschließend, bei relativ hohen Substratkonzentrationen flacht die Kurve ab, so dass kaum noch ein Anstieg zu verzeichnen ist. Durch die einsetzende Substratüberschusshemmung steigt die Kurve dann bei sehr hohen Substratkonzentrationen wieder steil an. Der Hill-Plot ist gleichermaßen komplex. Linearität, wie für eine Michaelis-Menten-Kinetik relevant, ist hier nicht erfüllt (Abbildung 30D). Vielmehr zeigt sich das Bild eines kooperativen Enzyms mit sigmoidaler Kinetik. Einen ähnlichen Kurvenverlauf kann man auch bei entsprechender Darstellung der kinetischen Daten der SdpA_{MC1}-Enzymformen für alle entsprechenden Herbizide feststellen. Der Tatsache einer offensichtlichen Kooperativität der Enzymreaktion folgend, erhält man eine bessere Angleichung der Daten, wenn man den Formalismus für eine sigmoidale Kinetik zugrunde legt anstatt den für einen hyperbolen Kurvenzug (Abbildung 30E).

Betrachtet man die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit des SdpA_{MC1} von den anderen an der Reaktion beteiligten Substraten bzw. Reaktionskomponenten (Abbildung 30F), so ist festzustellen, dass der Kurvenverlauf auch bei Einsatz des HIC-Präparates, d.h. des Enzymformen-Gemisches, stetig und ohne die Ausprägung von Plateaus verläuft. Für Sauerstoff beobachtet man eine leichte Substratüberschuss-Hemmung. Dieser Effekt wurde im Falle von α -KG bzw. Fe(II) nicht festgestellt. Eine Behandlung der Daten mit verschiedenen Modellen zeigt wiederum, dass die Abhängigkeit von der Konzentration eher sigmoidal als hyperbol ist.

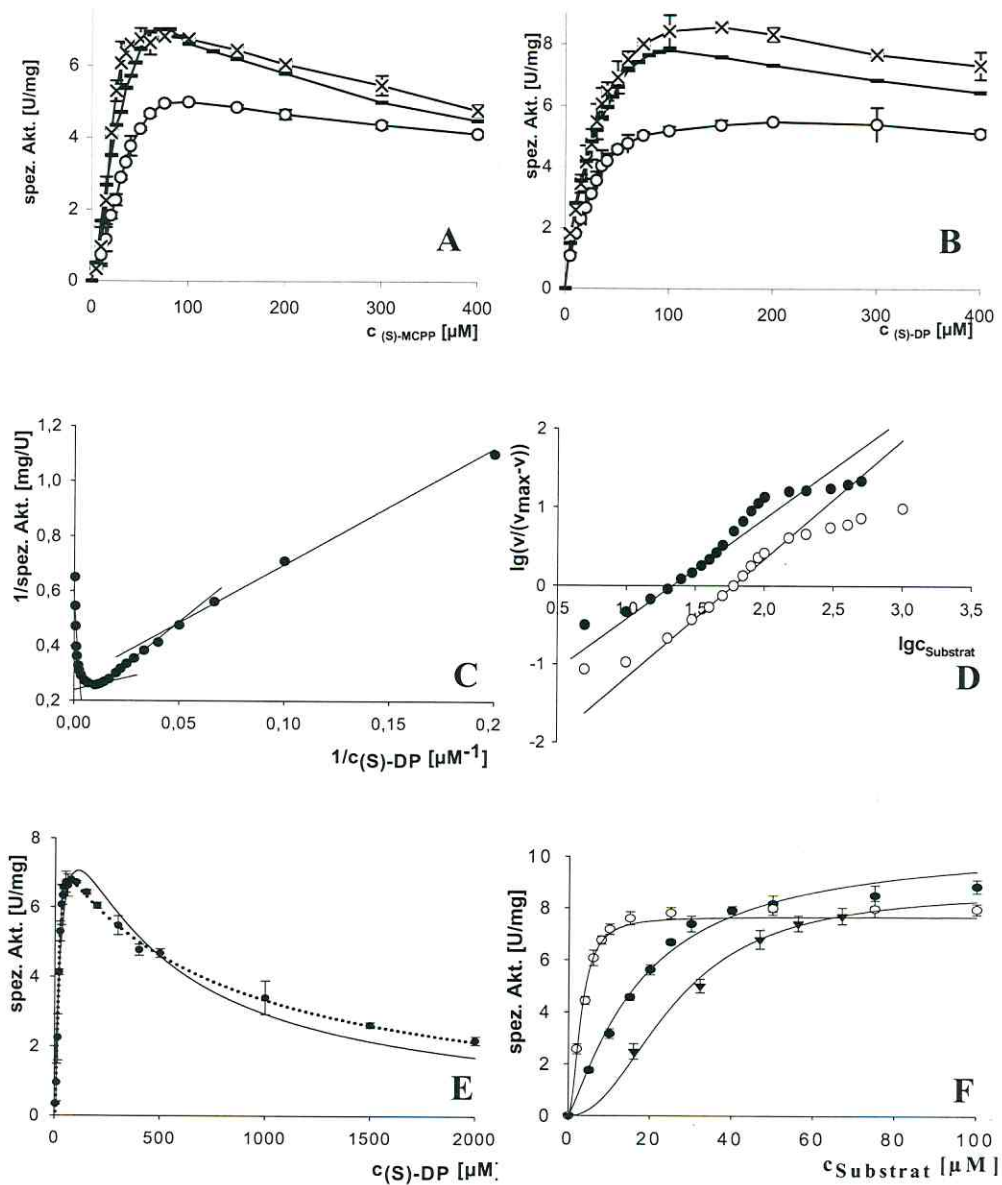


Abbildung 30: Kinetische Darstellungsformen von Messdaten A: Kinetische Kennlinien der Sdp_{AMCI}-I1 (x), -I2 (o) und Sdp_{AMCI}-rec (—) in Abhängigkeit von der (S)-MCP-Konzentration, B: Kinetische Kennlinien der Sdp_{AMCI}-I1 (x), -I2 (o) und Sdp_{AMCI}-rec (—) in Abhängigkeit von der (S)-DP-Konzentration, C: Lineweaver-Burk-Darstellung der Kennlinien des Sdp_{AMCI}-rec (•), D: Hill-Diagramm der Kennlinien des Sdp_{AMCI}-rec (•) und Rdp_{AMCI}-rec (o), E: Abhängigkeiten der Enzymaktivität des Sdp_{AMCI}-rec von der (S)-DP-Konzentration, gestrichelt: sigmoidaler Plot, durchgezogene Linie: hyperboler Plot, F: Abhängigkeiten der Enzymaktivität des Sdp_{AMCI}-rec von der Sauerstoff-(○), α-KG- (●) und Fe(II)-Konzentration (▼).

3.3.4.1.2 Die Kennlinien der SdpA-Enzyme aus P230 und MH

Für (S)-DP als Substrat weisen die kinetischen Kennlinien der beiden (S)-spezifischen Enzyme aus *Rhodoferrax* sp. P230 im Gegensatz zu dem entsprechenden Enzym aus *Delftia acidovorans* MC1 (SdpA_{MC1}) keine Plateaubildung auf. Die Umsatzgeschwindigkeiten steigen stetig und zeichnen sich bei erhöhten Substratkonzentrationen durch eine Überschusshemmung aus (Abbildung 31A). Im Verlauf der Kennlinien ist deutlich zu erkennen, dass sich die beiden Enzyme durch unterschiedliche kinetische Parameter auszeichnen. Mit (S)-DP als Substrat wurde für beide Enzyme eine sigmoidale Abhängigkeit gefunden.

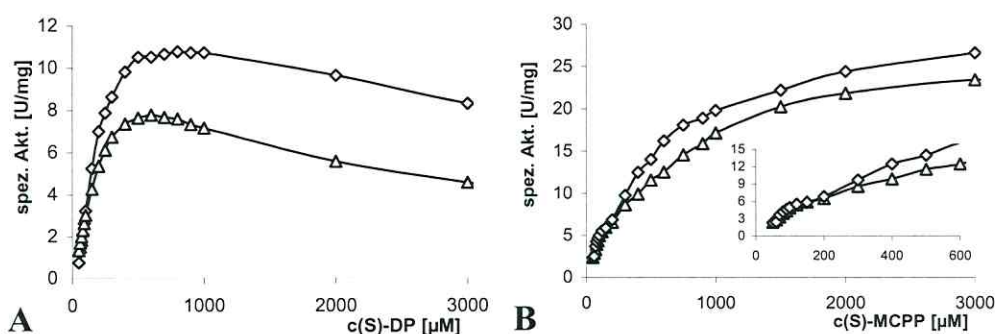


Abbildung 31: Kinetische Kennlinien der (S)-spezifischen Enzyme aus *Rhodoferrax* sp. P230 A: (S)-DP, B: (S)-MCP, $\text{SdpA}_{\text{P230-1}}$ ($\diamond$), $\text{SdpA}_{\text{P230-2}}$ ($\triangle$) multipliziert mit 2

Beim Umsatz von (S)-MCP deutet sich dagegen ein zweiphasiger Verlauf in den kinetischen Kennlinien an, wie aus der größeren Auflösung deutlich wird (Abbildung 31B). Bei einer Substratkonzentration von 90-150 μM ist hier ein ausgeprägtes Plateau zu erkennen. Im Falle des Methyl-Chlor-Derivates der Phenoxypropionate kommt es im untersuchten Bereich zu keiner Substratüberschusshemmung. Für beide Phenoxypropionate weist das $\text{SdpA}_{\text{P230-1}}$ im Vergleich zum $\text{SdpA}_{\text{P230-2}}$ die höheren Umsatzraten auf.

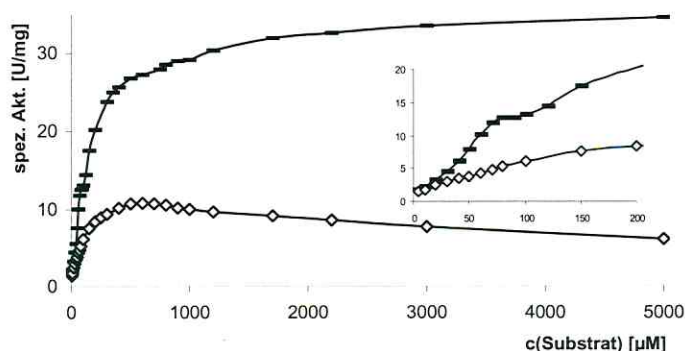


Abbildung 32: Kinetische Kennlinien des SdpA aus *Sphingobium herbicidovorans* MH (S)-DP ($\diamond$), (S)-MCP ($\triangle$)

Die Kennlinien des SdpA_{MH} verhalten sich sehr ähnlich zu denen aus P230. Im Falle von (S)-DP ist ein stetiger Anstieg gefolgt von einem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten. Mit (S)-MCPD als Substrat ist der Anstieg der Umsatzraten von einem Plateau unterbrochen, dies wird wiederum durch eine erhöhte Auflösung deutlich (Abbildung 32), Substratüberschusshemmung wurde nicht beobachtet. Für keines der Herbizide war ein sigmoidaler Kurvenverlauf eindeutig nachzuweisen.

3.3.4.2 Die Kennlinien der (R)-spezifischen Dioxygenasen

In Abbildung 33A sind die Kennlinien der RdpA-Enzyme bezüglich des (R)-DP dargestellt. Die nativen Enzyme aus MC1, P230 und MH zeichnen sich allesamt durch einen zweiphasigen Anstieg aus. Bei einer (R)-DP-Konzentration zwischen 25-60 μM kommt es zu einer Plateau-Bildung. Die Kennlinien des RdpA_{MC1} stimmen sehr gut mit der des RdpA_{MH} überein. Die Umsatzraten des rekombinanten Proteins steigen im Gegensatz zu den nativen Enzymen stetig an. Die Kennlinien bezüglich des (R)-MCPD (Daten nicht dargestellt) verhalten sich analog zu dem für (R)-DP dargestellten Bild. Für keines der Herbizide konnte im untersuchten Bereich eine Substratüberschusshemmung nachgewiesen werden.

Wie für die SdpA-Enzyme konnte auch für die RdpA-Enzyme ein sigmoidaler Kurvenverlauf nachgewiesen werden, was in den Abbildungen 30D-F exemplarisch für das RdpA_{MC1-rec} dargestellt wurde. Die (R)-spezifischen Enzymformen aus MC1 konnten zwar nicht komplett voneinander getrennt und in reiner Form dargestellt werden, aber es ist gelungen, Anreicherungspräparate von den RdpA_{MC1}-Enzymformen I1 und I3 zu erhalten. Die kinetischen Kennlinien dieser Formen bezüglich des (R)-DP und des 2,4-D sind in den Abbildungen 33C und D zu sehen. Es ist zu bemerken, dass die Kennlinien nicht stetig, sondern unter Ausbildung eines Plateaus ansteigen. Wie bei dem RdpA_{MC1}-Präparat nach HIC kann auch für die Enzymformen keine Substratüberschusshemmung nachgewiesen werden.

In Abbildung 33B sind die Abhängigkeiten der Umsatzraten der RdpA-Enzyme aus MC1, P230, MH und des rekombinanten RdpA von der 2,4-D-Konzentration dargestellt. Sowohl für das RdpA_{P230} als auch für das rekombinante RdpA kann deutlich eine stetige Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit mit steigender 2,4-D-Konzentration konstatiert werden. Die Kinetiken der Enzyme aus MC1 und MH weisen im Gegensatz dazu im Bereich von 250–400 μM 2,4-D ein deutlich ausgeprägtes Plateau auf, die Kennlinien der beiden Enzyme sind fast identisch. Die Kinetiken des MCPA-Umsatzes (nicht dargestellt) zeigen ein ähnliches Bild wie die der 2,4-D-Spaltung. Für Sauerstoff, α -KG und Fe(II) wurden ebenso wie bei den SdpA-Enzymen stetige sigmoidale Kurvenverläufe gefunden (nicht dargestellt).

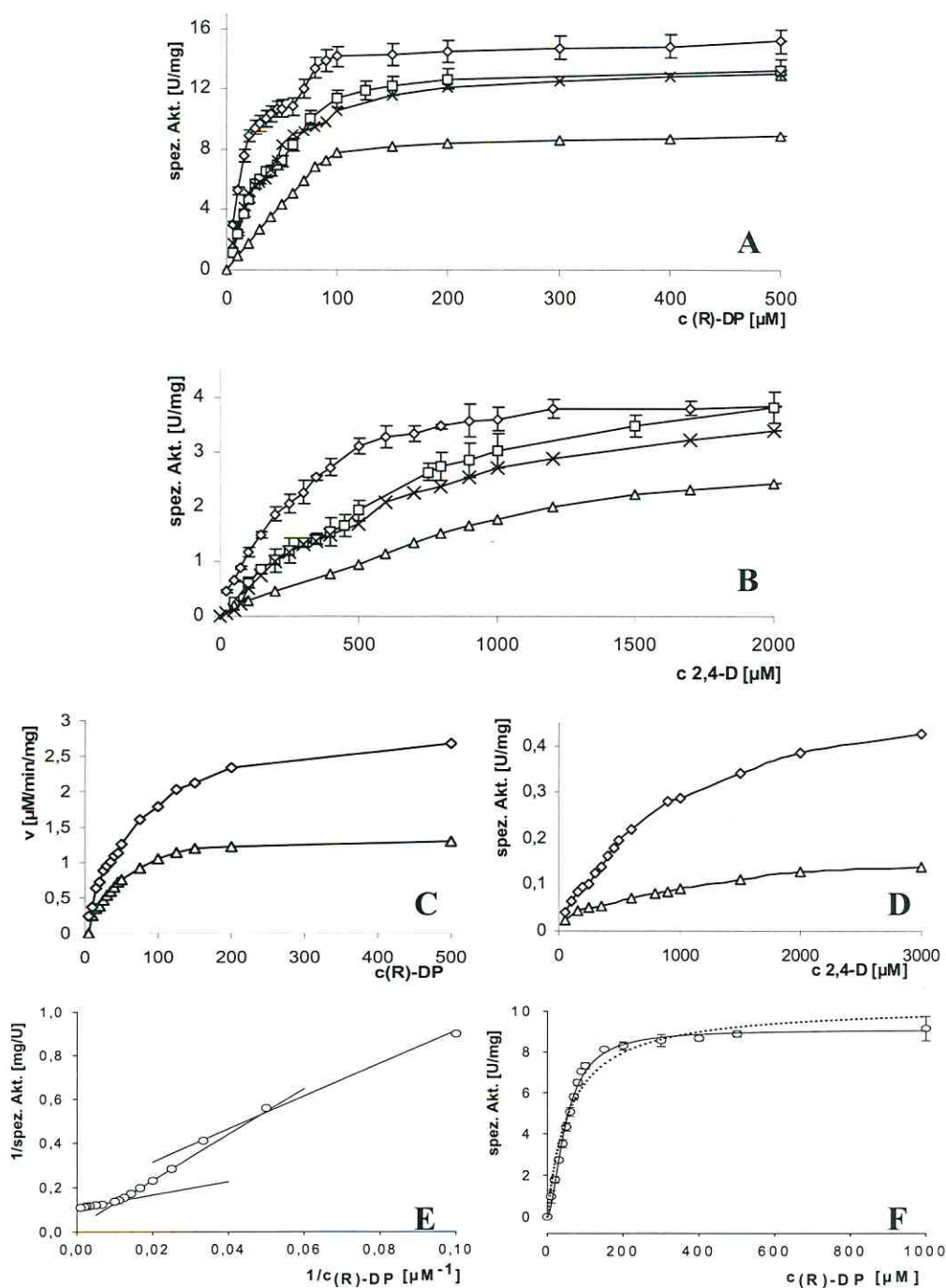


Abbildung 33: Kinetische Kennlinien der RdpA_{MCI}- (□), RdpA_{P230}- (◇) und RdpA_{MH}-Enzymformgemische (x) sowie des RdpA_{MCI}-rec (Δ) für (R)-DP (A) und 2,4-D (B) (Umsatzgeschwindigkeiten mal zwei für MCI, MH und rec); Kinetische Kennlinien der RdpA-Enzymformen I1 (◇) und I2 (Δ) bezüglich (R)-DP (C) und 2,4-D (D), E: Lineweaver-Burk-Darstellung der kinetischen Daten des RdpA_{MCI}-rec (o), F: kinetische Kennlinie des RdpA_{MCI}-rec (o) mit hyperbolem Plot (gepunktete Linie) und sigmoidalem Plot (durchgezogene Linie)

3.3.5 Kinetische Konstanten

Der K_M -Wert charakterisiert die Substratkonzentration, bei der das Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Er ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zu einem Substrat. Je kleiner der K_M -Wert ist, desto affiner ist das Enzym für den Reaktionspartner. k_{kat} gibt die Anzahl der Substratumsätze pro aktiven Zentrums im Enzym in einer bestimmten Zeiteinheit an. Je größer k_{kat} ist, desto schneller wird ein Stoff von dem Protein umgesetzt. Der Quotient aus k_{kat} und K_M wird als katalytische Effizienz bezeichnet und gilt als Maß der Substratspezifität. Hohe Werte sind ein Hinweis auf eine hohe Substratspezifität des Enzyms.

3.3.5.1 Konstanten der (S)-spezifischen Enzyme

In Tabelle 26 wurden die kinetischen Konstanten der SdpA-Proteine zusammengefasst. Die Konstanten sind hierbei als apparente Werte zu verstehen; sie wurden wegen der teilweise unsteten Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit (3.3.4.1) mit steigender Substratkonzentration, d.h. wegen des Auftretens von Plateaus, als „*Overall Kinetik*“ bestimmt und spiegeln daher die Summe der Eigenschaften der Enzymformen im Gemisch wider.

So unterschiedlich die SdpA-Enzyme in ihren Substratverwertungsspektren (3.3.2.2) und kinetischen Kennlinien (3.3.4.1) sind, so verschieden stellen sich auch ihre kinetischen Konstanten dar. Die Herbizide (S)-DP und (S)-MCPD werden von den Enzymen aus MC1 und MH mit jeweils in etwa identischen K_M -Werten gebunden. Die K_M -Werte des Enzyms aus MH sind allerdings etwa 5mal so hoch, wie die des Stammes MC1. Im Gegensatz dazu werden diese beiden Herbizide von den (S)-spezifischen Enzymen des P230 mit stark unterschiedlichen Affinitäten gebunden, der K_M -Wert für (S)-DP ist mit 200 μM etwa 3,6mal kleiner als der für (S)-MCPD. Die Phenoxyacetat-Derivate werden von den SdpA-Enzymen aus MC1 und MH ebenfalls gespalten, dabei sind die K_M -Werte des SdpA_{MC1} wie schon für die Phenoxypropionate gesehen, etwa 5mal niedriger als beim SdpA_{MH}. Bemerkenswert ist, dass die Enzyme aus dem Stamm P230 Phenoxyacetate nicht umsetzen können. Nach dieser Übersicht zeigt das SdpA_{MC1} für alle Herbizide die höchsten Affinitäten. Die beiden (S)-spezifischen Enzyme aus P230 unterscheiden sich in ihren Affinitäten zu den Herbiziden kaum. Bei den Wechselzahlen zeigt sich ein anderes Bild. Sind die Affinitäten der SdpA_{P230}-Enzyme zu den jeweiligen Herbiziden noch nahezu identisch, so unterscheiden sich ihre Wechselzahlen signifikant voneinander. Das SdpA_{P230-1} setzt die beiden Phenoxypropionat-Herbizide mit der doppelten Geschwindigkeit um wie das SdpA_{P230-2}. Während die SdpA-Enzyme aus P230 und MH das (S)-MCPD mit etwa 2,5fach höheren Wechselzahlen umsetzen als das (S)-DP, ist dies beim SdpA_{MC1} genau umgekehrt. Die höchsten Umsatzraten für das

(S)-Enantiomer des 2,4-Dichlorphenoxypropionates werden vom SdpA_{MC1} erreicht, für das (S)-MCPD jedoch von den Enzymen aus P230 und MH. Die Phenoxyacetate werden vom SdpA_{MC1} mit höheren Wechselzahlen gespalten als vom SdpA_{MH}.

Des Weiteren unterscheiden sich die (S)-spezifischen Enzyme der drei Stämme durch ein unterschiedliches Verhalten bei hohen Substratkonzentrationen. Im Falle vom (S)-MCPD ist das Enzym aus MC1 das einzige, das sich im untersuchten Konzentrationsbereich durch Hemmkinetiken auszeichnet. Für (S)-DP zeigen dagegen alle untersuchten Enzyme eine Hemmkinetik, wobei das SdpA_{MC1} den niedrigsten K_i für dieses Herbizid aufweist. Die Hemmkonstanten der anderen Enzyme liegen über denen des SdpA_{MC1}.

Die Affinitäten gegenüber dem zweiten Substrat, dem α -KG, sind bei den verschiedenen Enzymen nahezu identisch und liegen bei 18 μ M. Der K_M -Wert für den Sauerstoff wurde nur für das SdpA_{MC1} bestimmt, dieser liegt bei 29 μ M, hier beobachtet man eine Überschusshemmung mit einem K_i -Wert von etwa 4500 μ M. Dies sollte aber keine Rolle spielen, da wässrige Lösungen bei 30°C bereits bei einem Sauerstoffgehalt von 2000 μ M gesättigt sind.

Für das SdpA_{MC1} ist es gelungen, das Enzymformengemisch aufzulösen und einzelne Enzymformen voneinander zu trennen und zu analysieren. Diese zeigen kinetische Kennlinien mit signifikant unterschiedlichem Verlauf (3.3.4.1.1), und folglich unterscheiden sich die kinetischen Konstanten. Generell ist zu bemerken, dass sich dabei Unterschiede in den Affinitäten der Enzyme zu den Substraten geringer bemerkbar machen, als dies für die Umsatzraten festgestellt wird. Die Enzymform SdpA_{MC1}-I1 zeichnet sich für alle Substrate durch niedrigere K_M -Werte aus als die Form-I2. Die Unterschiede zwischen den Affinitäten liegen bei 25% für die Phenoxyacetate und bei 40% für das (S)-MCPD (Tabelle 26). Die Affinität zu den Substraten sinkt für beide Enzymformen in der Reihenfolge (S)-MCPD > (S)-DP > MCPA > 2,4-D. Damit binden 1.) die Phenoxypropionate affiner an das aktive Zentrum als die Phenoxyacetate und 2.) die 4-Chlor-2-methyl-Derivate besser als die 2,4-Dichlor-substituierten Verbindungen.

Die Umsatzraten des SdpA_{MC1}-I1 liegen ebenso wie die Affinitäten allesamt über denen der Form-I2, wobei die Unterschiede zwischen 20 und 100% liegen. Obwohl die Enzyme für (S)-DP einen höheren K_M -Wert als für (S)-MCPD aufweisen, wird dieses Substrat von beiden Enzymen mit der größten Umsatzrate gespalten, gefolgt von (S)-MCPD, MCPA und 2,4-D. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Enzymformen des MC1 zeigt sich beim Vergleich der k_{kat}/K_M -Werte. Dabei erkennt man, dass die Form I1 das Substrat (S)-MCPD nur mit 66% der relativen katalytischen Effizienz wie für das (S)-DP umgesetzt. Für I2 sind dagegen die katal-

lytischen Effizienzen für beide Herbizide identisch; damit ist das (S)-Mecoprop für das SdpA_{MC1}-I2 ein kinetisch besseres Substrat als für I1. Ein ähnliches Profil ergibt sich für die Substrate 2,4-D und MCPA. Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die Enzymform I1 sich also durch eine hohe Spezifität für das (S)-DP auszeichnet, die Form I2 weist eher ein breites Substratverwertungsspektrum auf.

Unterschiede in den beiden Enzymformen zeigen sich auch bei der Substratüberschusshemmung, die im Falle von I2 ausgeprägter ist (Tabelle 26). Für das (S)-MCPA unterscheiden sich die Substrathemmkonstanten kaum und für die Phenoxyacetate konnten keine nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Ergebnisse in den Enzymformen von SdpA_{MC1} mit denen des rekombinanten SdpA_{MC1}-rec, so zeigt sich, dass diese für I1 sowohl hinsichtlich der kinetischen Kennlinien als auch Konstanten mit dem überexprimierten Enzym am ähnlichsten sind.

3.3.5.2 Konstanten der (R)-spezifischen Enzyme

Die RdpA-Proteine der drei untersuchten Stämme, einschließlich des rekombinanten RdpA zeichnen sich durch eine identische Primärstruktur aus, was die Annahme nahelegt, dass sich die Enzyme aus kinetischer Sicht ebenfalls identisch verhalten sollten. Dies ist jedoch nicht durchgängig der Fall. Zwar erwiesen sich die RdpA-Enzyme aus MC1 und MH als kinetisch identisch, die kinetischen Parameter des Enzyms aus P230 und des rekombinanten RdpA weichen jedoch von denen des RdpA_{MC1} und RdpA_{MH} signifikant ab (Tabelle 27). Das RdpA_{P230} zeichnet sich für alle getesteten Herbizide durch höhere Affinitäten und auch höhere Wechselzahlen aus. Die K_M -Werte sind dabei zwischen 30 und 60% niedriger als die korrespondierenden des RdpA_{MC1}, die Wechselzahlen übersteigen die des RdpA_{MC1} um das 1,4-3fache. Der Vergleich zum rekombinanten RdpA zeigt, dass das Enzym aus P230 auch hier hinsichtlich K_M als auch k_{kat} besser ist.

Allen untersuchten RdpA-Enzymen ist gemeinsam, dass die Affinitäten zu den Herbiziden und die Wechselzahlen der Spaltung in der Reihenfolge (R)-DP > (R)-MCPA > MCPA > 2,4-D sinken. Bei Betrachtung der katalytischen Effizienz zeigt sich ein homogenes Bild für die Phenoxypionate derart, dass (R)-MCPA durch die RdpA aller drei Stämme nur etwa 0,4mal so effizient gespalten wie (R)-DP. Letztere Enzyme spalten die Phenoxyacetate nur mit etwa 1% der Effizienz für (R)-DP, das RdpA_{P230} noch mit 2,5%. Schaut man auf die

Tabelle 26: Kinetische Konstanten der (S)-spezifischen Enzyme aus MCI, P230 und MH Die Konstanten wurden aus dem sigmoidalem Plot berechnet. - = nicht aufgetreten

Enzym	Substrat	spez. Akt. [U/mg]	rel. spez. Akt.	K _M [μM]	k _{kat} [min ⁻¹]	k _{kat} /K _M [μM ⁻¹ · min ⁻¹]	rel. K _M /k _{kat}	Hill-Koeff.	K _i [μM]
SdpA _{MCI-rec}	(S)-DP	22 ± 1	1	21 ± 2	704 ± 32	33,5	1	1,28	1250 ± 126
	(S)-MCPP	11 ± 2	0,5	18 ± 4	352 ± 64	19,6	0,59	2,88	782 ± 40
	2,4-D	7,6 ± 0,7	0,35	85 ± 8	243 ± 23	2,9	0,09	1,36	-
	MCPA	11,1 ± 1,9	0,48	47 ± 5	355 ± 61	7,6	0,23	1,66	-
SdpA _{MCI}	(S)-DP	19 ± 2	1	33 ± 3	607 ± 64	18,4	1	1,27	867 ± 130
	(S)-MCPP	9,9 ± 1,5	0,52	25 ± 5	316 ± 48	12,6	0,68	1,22	1145 ± 54
	2,4-D	6,7 ± 1,8	0,35	107 ± 12	213 ± 58	2	0,11	1,01	-
	MCPA	8,6 ± 3	0,45	47 ± 5	276 ± 96	5,9	0,32	1,05	-
SdpA _{MCI-II}	(S)-DP	23,9 ± 3,1	1	26 ± 2	765 ± 99	29,4	1	1,25	1290 ± 94
	(S)-MCPP	10,8 ± 2,4	0,45	18 ± 2,5	347 ± 77	19,3	0,66	3,49	1064 ± 130
	2,4-D	7,7 ± 0,4	0,32	94 ± 15	245 ± 13	2,6	0,09	1,28	-
	MCPA	10,7 ± 1,5	0,45	39 ± 5	341 ± 48	8,7	0,3	1,4	-
SdpA _{MCI-I2}	(S)-DP	11,6 ± 1	1	36 ± 5	371 ± 32	10,3	1	1,31	802 ± 60
	(S)-MCPP	8,6 ± 1,6	0,74	29 ± 2	275 ± 51	9,5	0,92	2,13	1103 ± 131
	2,4-D	5,1 ± 0,5	0,44	125 ± 6	164 ± 16	1,3	0,13	1,29	-
	MCPA	5,9 ± 1,4	0,51	51 ± 7	188 ± 45	3,7	0,36	1,31	-
SdpA _{P230-1}	(S)-DP	13,2 ± 3	1	192 ± 6	440 ± 100	2,3	1	1,85	4950 ± 344
	(S)-MCPP	34,4 ± 8	2,6	735 ± 47	1146 ± 266	1,6	0,7	1	-
	2,4-D	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCPA	-	-	-	-	-	-	-	-
SdpA _{P230-2}	(S)-DP	6,3 ± 1,1	1	230 ± 60	204 ± 36	0,89	1	1,42	1644 ± 66
	(S)-MCPP	14,2 ± 2,3	2,26	712 ± 89	454 ± 75	0,64	0,72	1	-
	2,4-D	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCPA	-	-	-	-	-	-	-	-
SdpA _{MH}	(S)-DP	15 ± 1,7	1	151 ± 28	480 ± 54	3,18	1	1	3055 ± 479
	(S)-MCPP	34,6 ± 5,6	2,31	154 ± 8	1107 ± 179	7,19	2,26	1	-
	2,4-D	2,9 ± 0,4	0,17	570 ± 64	93 ± 13	0,16	0,05	1	-
	MCPA	4,2 ± 1	0,28	302 ± 39	134 ± 32	0,44	0,14	1	-

absoluten Werte, so wird offensichtlich, dass die Phenoxypropionate von RdpA_{P230} etwa doppelt, die Phenoxyacetate sogar 8mal so effizient gespalten werden wie durch die RdpA-Enzyme aus MC1 und MH. Die Affinitäten der RdpA-Enzyme zu dem zweiten Substrat, dem α -KG, sind in allen drei Stämmen wiederum gleich; der K_M -Wert beträgt auch hier etwa 18 μ M. Die Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration wurde nur für das RdpA_{MC1} untersucht, der K_M -Wert liegt bei 400 μ M.

Die angereicherten Enzymformen I1 und I3 des RdpA_{MC1} zeichnen sich durch identische K_M -Werte aus. Auch die relativen katalytischen Effizienzen verhalten sich zueinander sehr ähnlich. Absolute Wechselzahlen konnten aufgrund von zu geringen Proteinmengen nicht ermittelt werden.

3.3.6 Reaktionsmechanismus

Zur Ermittlung der Reaktionsmechanismen der Enzyme SdpA_{MC1} und RdpA_{MC1} wurden Zweisubstratkinetiken unter Variation der Substrate α -KG und Herbizid durchgeführt.

Die Primärauftragung der gewichteten Messdaten des Umsatzes von (S)-DP durch SdpA_{MC1} bei Anwesenheit verschiedener α -KG-Konzentrationen ist in Abbildung 34 dargestellt. Diese zeigt, dass sowohl mit steigender (S)-DP- als auch α -KG-Konzentration die Umsatzgeschwindigkeit zunimmt.

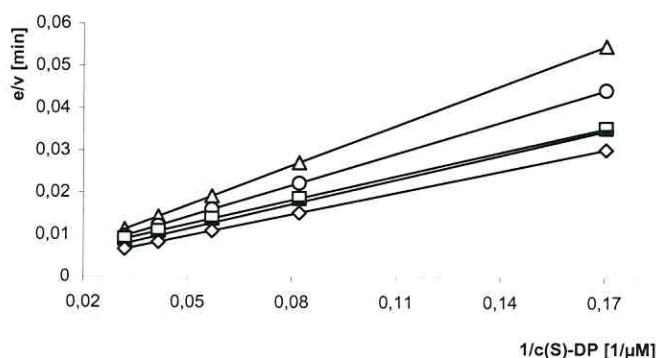


Abbildung 34: Primärauftragung des Umsatzes von (S)-DP durch SdpA_{MC1} bei Anwesenheit verschiedener α -KG-Konzentrationen (1 μ M ($\diamond$), 2,5 μ M ($\rightarrow$), 5 μ M ($\square$), 7,5 μ M ($\circ$) und 10 μ M ($\triangle$)) nach Lineweaver-Burk (gewichtete Werte)

Die aus der Primärdarstellung ($\frac{e}{v} = m \frac{1}{c_{\text{Substrat}}} + n$) gewonnenen Anstiege (m) und Abschnitte

(n) wurden dann in Abhängigkeit zur Konzentration des α -KG dargestellt (Abbildung 35A und B). Aus den Anstiegen und Abschnitten der so entstandenen Kurvenzüge konnten die so genannten Dalziel-Koeffizienten Φ_0 , Φ_1 , Φ_2 und Φ_{12} ermittelt werden (Tabelle 28).

Tabelle 27 Kinetische Konstanten der (R)-spezifischen Enzyme aus MCI, P230 und MH Die Konstanten wurden aus dem sigmoidalem Plot berechnet.

Enzym	Substrat	spez. Akt. [U/mg]	rel. spez. Akt.	K _M [μM]	k _{kat} [min ⁻¹]	k _{kat} /K _M [μM ⁻¹ · min ⁻¹]	rel. K _M /k _{kat}	Hill-Koeff.
Rdp_{AMCI-rec}	(R)-DP	11,7 ± 2,1	1	49 ± 3	410 ± 73	8,4	1	1,7
	(R)-MCPP	8,6 ± 1,8	0,73	59 ± 2	301 ± 63	5,1	0,61	1,7
	2,4-D	1,3 ± 0,2	0,11	904 ± 40	46 ± 7	0,05	0,006	1,34
	MCPA	1,1 ± 0,3	0,09	510 ± 50	39 ± 10	0,08	0,009	1
Rdp_{AMCI}	(R)-DP	13,9 ± 1,7	1	37 ± 5	487 ± 60	13,16	1	1,7
	(R)-MCPP	10 ± 1,3	0,72	64 ± 7	350 ± 46	5,47	0,42	1,6
	2,4-D	2,1 ± 0,2	0,15	900 ± 86	74 ± 7	0,08	0,006	1,2
	MCPA	1,6 ± 0,2	0,11	540 ± 63	56 ± 7	0,1	0,008	0,98
Rdp_{AMCI-II}	(R)-DP	n.b.	1	60 ± 12	n.b.	n.b.	1	n.b.
	(R)-MCPP	n.b.	0,69	78 ± 15	n.b.	n.b.	0,53	n.b.
	2,4-D	n.b.	0,15	935 ± 123	n.b.	n.b.	1,2	n.b.
	MCPA	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Rdp_{AMCI-I3}	(R)-DP	n.b.	1	63 ± 18	n.b.	n.b.	1	n.b.
	(R)-MCPP	n.b.	0,45	81 ± 21	n.b.	n.b.	0,45	n.b.
	2,4-D	n.b.	0,1	935 ± 80	n.b.	n.b.	1,3	n.b.
	MCPA	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Rdp_{AP230}	(R)-DP	15,9 ± 1,3	1	19 ± 3	557 ± 46	29,32	1	1,55
	(R)-MCPP	11,7 ± 1,0	0,73	35 ± 2	410 ± 35	11,7	0,4	1,8
	2,4-D	4,2 ± 0,5	0,27	237 ± 15	147 ± 17	0,62	0,021	1,38
	MCPA	3,7 ± 0,3	0,23	164 ± 11	130 ± 11	0,79	0,025	1,04
Rdp_{AMH}	(R)-DP	13,8 ± 2,1	1	39 ± 3	483 ± 74	12,71	1	1,6
	(R)-MCPP	10,1 ± 1,5	0,73	58 ± 9	354 ± 53	5,8	0,46	1,3
	2,4-D	2,2 ± 0,8	0,12	634 ± 27	77 ± 28	0,12	0,009	1,2
	MCPA	1,8 ± 0,6	0,08	480 ± 25	63 ± 21	0,13	0,01	0,99

n.b.: nicht bestimmt

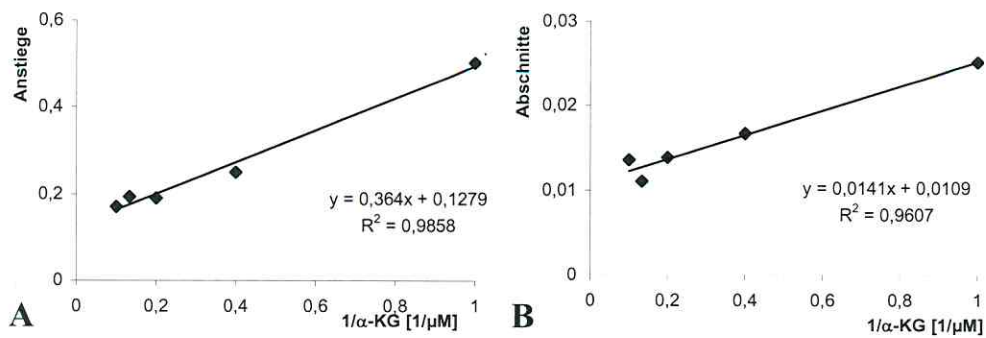


Abbildung 35: Sekundärauftragungen: Anstiege (A) und Abschnitte (B) der Primärauftragung gegen die reziproke α -KG-Konzentration

Mit Hilfe der Dalziel-Koeffizienten und der Gleichung 10 lässt sich dann der Reaktionsmechanismus berechnen:

$$\frac{\Phi_1 \cdot \Phi_2}{\Phi_{12} \cdot \Phi_0} \leq 1$$

Gleichung 10: Term zur Ermittlung des Reaktionsmechanismus bei Mehrsubstratreaktionen

Tabelle 28: Dalziel-Koeffizienten der Phenoxypropionat-spaltenden Enzyme aus *Delftia acidovorans* MC1

	Φ_0 [min^{-1}]	Φ_1 [$\mu\text{M} \cdot \text{min}$]	Φ_2 [$\mu\text{M} \cdot \text{min}$]	Φ_{12} [$\mu\text{M}^2 \cdot \text{min}$]
Rdp_{AMC1}	0,020	0,526	0,021	0,712
Sdp_{AMC1}	0,011	0,128	0,014	0,364

Das Ergebnis der Gleichung 10 ist sowohl für das Rdp_{AMC1} als auch das Sdp_{AMC1} kleiner als 1, was ein starker Hinweis auf das Vorliegen eines *ordered* BiBi-Mechanismus in Bezug auf die Bindung der Herbizide und α -KG ist. Ein *ordered* BiBi-Mechanismus bedeutet, dass Substratbindung und Produktablösung am aktiven Zentrum in einer definierten Reihenfolge ablaufen, Variationen sind nicht möglich. Weitere Beweise für diesen Mechanismus konnten nicht erbracht werden, da keine Produkthemmung auftrat, womit ausschließlich für die Bindung der Substrate, nicht aber für die Ablösung der Produkte ein *ordered*-Mechanismus nachgewiesen wurde. Eine experimentelle Einbeziehung der Sauerstoffkonzentration, dem dritten Substrat der Enzyme aus MC1, hat nicht stattgefunden. Aber auch dieses Substrat sollte in einem *ordered*-Mechanismus gebunden werden, so dass von einem *ordered* TerTer-Mechanismus für die Substratbindung wahrscheinlich ist.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die initialen Enzyme des Phenoxalkanoat-Abbaus der Bakterienstämme *Delftia acidovorans* MC1, *Rhodoferrax* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH sowohl proteinbiochemisch als auch enzymkinetisch charakterisiert. Es konnten Erkenntnisse über den enantioselektiven Abbau der 2-Phenoxypropionate und ein erster Einblick in die Struktur-Funktionsbeziehungen dieser Proteine gewonnen werden.

4.1 Enzymausstattung

Bei der Suche nach Phenoxalkanoat-spaltenden Enzymen in den Stämmen MC1, P230 und MH wurde sich auf α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen konzentriert, da Hinweise auf solche Enzymaktivitäten schon vorlagen (Nickel et al., 1997; Müller et al., 2001). Nach Monooxygenase-Aktivität, wie sie z.B. für die Phenoxybutyrat- (Sträuber et al., 2003) und 2,4,5-Trichlorphenoxyacetatspaltung (Xun und Wagnon, 1995) beschrieben wurden, wurde nicht gesucht. Alle drei untersuchten Stämme sind zur kompletten Spaltung der (R,S)-Enantiomere der Phenoxypropionate (R,S)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat (2,4-DP) und (R,S)-2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)propionat (MCP) als auch zur Spaltung der Phenoxyacetate 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) und 4-Chlor-2-methylphenoxyacetat (MCPA) (Ehrig et al., 1997, Müller et al., 1999a) in der Lage. Der Stamm MH kann zusätzlich noch die Phenoxybutyrate verwerten (Horvath et al., 1990).

Trotz Verwertung derselben Herbizide unterscheiden sich die drei Stämme doch erheblich in ihren jeweiligen Abbauraten. So wird das (R,S)-DP vom Stamm MC1 mit der dreifachen Geschwindigkeit wie vom Stamm P230 abgebaut (Müller et al., 2001). Besonders deutliche Unterschiede sind auch in der Verwertung der Phenoxyacetate zu erkennen. MH spaltet das 2,4-D mit der gleichen Geschwindigkeit wie das (R,S)-DP (Horvath et al., 1990), während MC1 dieses Herbizid nur mit 1/5, P230 sogar nur mit 1/7 der Geschwindigkeit der (R,S)-DP-Spaltung umsetzt (Müller et al., 2001). Auch für den Abbau der anderen Herbizide wurden signifikante Unterschiede gefunden. Die Ursache für das unterschiedliche Abbauverhalten der Stämme sollte das Resultat unterschiedlicher Enzyme für die Verwertung der Phenoxalkanoate sein. Da im Genom aller drei Stämme die Gene des kompletten modifizierten *ortho*-Weges sowie zu einem Teil die Enzyme selbst nachgewiesen werden konnten (Zipper et al., 1996; Müller et al., 2001; Smejkal et al., 2001), sollte der Unterschied vor allem im ersten Schritt der Phenoxalkanoat-Verwertung zu finden sein.

Wie aus Induktionsversuchen, insbesondere mit den Stämmen P230 und MH, bekannt ist, erfolgt die Spaltung der Phenoxypionate in den drei untersuchten Stämmen enantiospezifisch. Das heißt, es gibt je ein Enzym für die Spaltung der (R)-Enantiomere und eins für die der (S)-Enantiomere (Nickel et al., 1993; Zipper et al., 1998; Müller und Babel, 1999b; Müller et al., 2001). Tatsächlich ist es gelungen, diese enantioselektiven Enzyme aus allen Stämmen zu reinigen und zu charakterisieren.

Die (R)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat/ α -Ketoglutarat Dioxygenasen aus MC1 (RdpA_{MC1}), P230 (RdpA_{P230}) und MH (RdpA_{MH}) sind einander sehr ähnlich. Sie sind hoch affin für (R)-Enantiomere der Phenoxypionate und spalten diese mit hohen Umsatzraten. Phenoxycetate stellen dagegen wesentlich schlechtere Substrate dar. Sie werden lediglich mit 10-20% der Spaltungsaktivität des (R)-DP umgesetzt, die K_M -Werte sind hoch.

Die (S)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat/ α -Ketoglutarat Dioxygenasen (SdpA) dieser Stämme unterscheiden sich dagegen stark. Aus *Delftia acidovorans* MC1 konnte mit säulenchromatographischen Techniken eine zur Spaltung der (S)-Phenoxypionaten befähigte Dioxygenase gereinigt werden: das SdpA_{MC1}. Dieses Enzym ist in der Lage, neben dem (S)-DP und (S)-MCPD auch die Phenoxycetate 2,4-D und MCPA in erheblichem Umfang (35-45% der (S)-DP-Spaltungsaktivität) umzusetzen. Im Gegensatz dazu wurden aus *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 zwei (S)-spezifische Enzyme (SdpA_{P230-1}, SdpA_{P230-2}) gereinigt, die den Umsatz der (S)-Phenoxypionate, nicht aber den der Phenoxycetate katalysieren. Die beiden SdpA-Enzyme aus P230 sind in ihren Substratverwertungsspektren identisch, unterscheiden sich aber in ihren Umsatzraten. *Sphingobium herbicidovorans* MH exprimiert ebenfalls zwei (S)-spezifische Enzyme, die sich im Gegensatz zu den Enzymen aus P230 im Substratverwertungsspektrum unterscheiden. Eines der Proteine setzt die (S)-Phenoxypionate und die Phenoxycetate (17-28% der (S)-DP-Spaltungsaktivität) um, und das andere verwertet neben den genannten Substraten zusätzlich die Phenoxibutyrate. Allen (S)-spezifischen Enzymen ist gemeinsam, dass sie die (S)-Phenoxypionate 2,4-DP und MCPD spalten. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem bevorzugten Substrat. Wird das (S)-DP vom SdpA_{MC1} mit der höchsten Rate umgesetzt, so spalten die (S)-spezifischen Enzyme aus P230 und MH dieses Substrat mit wesentlich kleineren Raten als das (S)-MCPD.

Die gemessenen Enzymaktivitäten erklären jedoch keineswegs die beschriebenen Abbauraten der Bakterienkulturen. Für MH wurde in Abbauversuchen gefunden, dass die Herbizide (R,S)-DP und 2,4-D mit ähnlichen Geschwindigkeiten umgesetzt werden (Horvath et al., 1990). Im Rohextrakt dieser Zellen wurde aber 10mal mehr Spaltungsaktivität für die Pheno-

xypropionate als für das 2,4-D nachgewiesen. Eine ähnliche Diskrepanz wurde für den (R,S)-DP- und (R,S)-MCP-Abbau entdeckt, obwohl die MH-Zellen das Mecoprop mit nur 80% der Umsatzrate des Dichlorprop spalten, weist der Rohextrakt der Zellen 1,5mal mehr Spaltungsaktivität für das Mecoprop als für das Dichlorprop auf (3.1.3). Auch für *Delftia acidovorans* MC1 und *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 geben die im Rohextrakt gefundenen Enzymaktivitäten die Abbauraten der intakten Zellen (Müller et al., 2001) nicht wider. Das Verhältnis der Spaltungsaktivitäten der (R)- zu den (S)-Enantiomeren ist in den intakten MC1-Zellen mit 4 etwa 2,7mal so hoch wie im Rohextrakt. Eine Bakterienkultur von P230 spaltet die (R)-Enantiomeren des 2,4-DP mit wesentlich höheren Raten als das (S)-DP. Im Rohextrakt der Zellen wurde jedoch signifikant mehr Spaltungsaktivität für das (S)-Enantiomer des Dichlorprop gefunden. Die Gründe für die Unterschiede zwischen den Abbaupotenzialen der intakten Zellen und der Rohextrakte können vielfältig sein, als Hauptursache werden jedoch die Aktivitätsverluste angesehen. Das TfdA aus *Delftia acidovorans* P4a zeigt ohne Zusatz von Ascorbat, Eisen(II) und 2,4-D im Aufschlusspuffer hohe Aktivitätsverluste (Reinhold, 1998). Aufgrund der Instabilität des TfdA aus *Ralstonia eutropha* JMP 134 wurden Aktivitätsbestimmungen nur mit ganzen Zellen vorgenommen (Pieper et al., 1988). Für überexprimiertes TfdA aus *Ralstonia eutropha* JMP134 wurde eine hohe Instabilität aufgrund von Proteolyse beschrieben (Fukumori und Hausinger, 1993b). Proteolytische Prozesse können jedoch für die Enzyme aus P230 (Ruhland, 2003) und MC1 (Westendorf et al., 2003) als Grund für Aktivitätsverluste ausgeschlossen werden, da die Zugabe von Proteaseinhibitoren nicht zu erhöhten Enzymaktivitäten führte. Die von der Substratspaltung entkoppelte oxidative Decarboxylierung des α -KG führt beim TfdA und TauD zu einem starken aber reversiblen Aktivitätsverlust (Liu et al., 2001; Ryle et al., 2003a). Ein solcher Effekt könnte beim Zellaufschluss auftreten und Einfluss auf die Spaltungsaktivitäten nehmen. Auch anderweitige Gründe wie kurze Halbwertszeiten der Proteine in der Zelle, irreversible Schädigungen des Proteins usw. können extreme Aktivitätsverluste verursachen, ja sogar die Gefahr des totalen Verlustes von Enzymaktivitäten bergen. So legen die Abbauraten der MH-Zellen das Vorhandensein eines weiteren Enzyms mit hoher Spaltungsaktivität für das 2,4-D - ähnlich dem TfdA - nahe. Ein TfdA-Protein konnte aber nicht gereinigt werden, auch im Genom konnte ein *tfdA*-Gen nicht nachgewiesen werden (Zipper et al., 1996). Im Gegensatz zum MH wurde mit Primern von konservierten Regionen des *tfdA* in P230 ein Amplifikat erhalten (Ehrig et al., 1997), aber auch aus diesem Stamm konnte ein solches Enzym nicht gereinigt werden. Weitere Gründe

für Unterschiede in dem Spaltvermögen ganzer Zellen und dem Rohextrakt können unterschiedliche Reaktionsbedingungen sein. In der Zelle liegen die Substrate nicht in sättigenden Konzentrationen vor. Die Enzyme konkurrieren miteinander und mit dem weiteren Stoffwechsel um die Substrate (O'Brien et al., 2003). Hier spielen vor allem Effekte im Zusammenhang mit der Bereitstellung und Regeneration von α -Ketoglutarat (α -KG) eine Rolle (Müller und Babel, 2000). Aber auch die Enzyme selbst unterliegen regulatorischen Einflüssen. So konnte für MC1 gezeigt werden, dass bei hohen stationären (R,S)-DP-Konzentrationen der Gehalt des SdpA in der Zelle abnimmt (Benndorf et al., 2004). Als einen weiteren Grund für die unterschiedlichen Substratverwertungspotenziale intakter Zellen und deren Rohextrakte seien hier Induktionsphänomene angeführt; nicht alle Enzyme sind konstitutiv wie die RdpA-Proteine aus P230 und MC1 sowie die SdpA-Enzyme aus MC1 und MH, vielmehr wurde für die (S)-spezifischen Enzyme aus P230 und dem RdpA_{MH} eine Induzierbarkeit nachgewiesen (Nickel et al., 1997; Müller et al., 2001). Ebenso konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es auch im Stamm MH ein induzierbares (S)-spezifisches Enzym gibt.

Die Unterschiede der Verwertungseigenschaften der Stämme und der Enzymaktivitäten im Rohextrakt müssen nicht zwangsläufig auf Aktivitätsverluste zurückzuführen sein. Das Problem der Substrataufnahme darf ebenfalls nicht unberücksichtigt bleiben. Für 2,4-D ist bei *Ralstonia eutropha* JMP134 gezeigt worden, dass ein Transportprotein, TfdK, im Operon der 2,4-D-Degradation integriert ist. Dieses Gen gehört in die Superfamilie der MFS (*major facilitator superfamily*)-Transporter, es ordnet sich in die Untergruppe der aromatischen Säure/H⁺ Symporter ein (Pao et al., 1998). Eine Eliminierung dieses Gens führt im obigen Stamm zu einer Beeinträchtigung der 2,4-D-Aufnahme bei kleinen Konzentrationen, bei höheren spielt dies offensichtlich keine Rolle mehr (Leveau et al., 1998). Zur Ergänzung dazu wurden Phänomene aktiven Transports auch für MH beschrieben, hier mit deutlich enantioselektiven Eigenschaften unterlegt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Anwesenheit von 2,4-D beispielsweise die Induktion dieser Proteine und damit eine Aufnahme unterdrückt wird (Zipper et al., 1998). Versuche mit ¹⁴C-markiertem 2,4-D zeigen auch für MC1 eine aktive Aufnahme und Aufnahmekinetiken, die in Abhängigkeit von den Wachstumssubstraten (2,4-DP, 2,4-D) und anderen Kultivierungsbedingungen (pH) sehr unterschiedlich verlaufen, d.h. stark auf eine Rolle solcher Prozesse für die Herbizidverwertung hinweisen (D. Hoffmann und R.H. Müller, persönliche Mitteilung).

4.2 Proteinbiochemie

Die RdpA-Proteine der Stämme MC1, P230 und MH sind Produkte ein und desselben Gens, dem *rdpA* (Schleinitz et al., 2004). Die Molmasse des nativen Proteins wurde mit 113 kD bestimmt, die des denaturierten mit 35,8 kD, was für eine trimere Struktur des Proteins spricht. Ein trimeres Protein ist in der Natur selten, da es unsymmetrisch ist, und wurde bislang in der Gruppe der α -KG-abhängigen Dioxygenasen nicht beschrieben, obwohl die Gruppe ansonsten sehr heterogen in ihrer Quartär-Struktur ist (1.2). Bei dem SdpA_{MC1} handelt es sich im Gegensatz zum RdpA um ein dimeres Protein, die Molmasse eines Monomers beträgt 32,5 kD. Die Quartär-Strukturen der (S)-spezifischen Enzyme aus P230 (MM eines Monomers: 32,2-32,4 kD) und MH (MM eines Monomers: 32,2 kD) konnten bislang nicht aufgeklärt werden, da keine reinen Präparate gewonnen werden konnten.

4.2.1 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der RdpA- und SdpA-Proteine aus MC1 und MH zeigen nur wenig Sequenzidentitäten (30-40%) und Ähnlichkeiten (etwa 50%) zu TfdA- und TauD-Enzymen. Der Vergleich der RdpA und SdpA-Aminosäuresequenzen ergibt etwa das gleiche Bild (28% Identität, 47% Ähnlichkeit). Untereinander sind die (S)-spezifischen Enzyme jedoch zu 60% identisch und zu 70% ähnlich. Die Verwandtschaftsverhältnisse einiger Phenoxyalkanoat-spaltender Enzyme sind in Abbildung 36 dargestellt. Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass die RdpA- und SdpA-Enzyme der drei Stämme phylogenetisch verschiedene Zweige innerhalb der Gruppe(II) der α -KG-abhängigen Dioxygenasen bilden, die Verwandtschaft ist eher entfernt. Die RdpA-Enzyme bilden einen Zweig mit dem TauD aus *E. coli*, während die (S)-spezifischen Enzyme aus MC1 und MH verwandtschaftlich den TfdA-Proteinen näher stehen, aber trotzdem doch so verschieden von den 2,4-D-spaltenden Enzymen sind, dass diese einen eigenen Tochterstrang bilden. Die Zuordnung in einen gemeinsamen Strang legt einen gemeinsamen genetischen Ursprung nahe, wie er zu einem für die Isoenzyme der Clavaminate-Synthase und zum anderen für die Enzyme Deacetoxycephalosporin-C-Synthase und Deacetylcephalosporin-C-Synthase beschrieben wurde (Marsh et al., 1992). Demnach sollten die SdpA-Proteine aus MC1 und MH einst identisch gewesen sein und hätten sich dann durch unterschiedliche Evolutionsbedingungen voneinander entfernt. Die Zuordnung zu einem separaten Strang ist jedoch nicht eindeutig. Die Nutzung anderer Programme zur Erstellung von Verwandtschaftsbäumen ordnen TfdA- und SdpA-Proteine in den gleichen Zweig. Aufgrund von zu wenig Sequenzdaten derartiger Enzyme kann zur Zeit keine eindeutige Zuordnung zu Enzymfamilien vorgenommen werden (Schleinitz et al., 2004). Die Ähnlichkeit zwischen den

TfdA- und SdpA-Proteinen wird auch auf enzymkinetischer Ebene deutlich. Beide Enzyme spalten Phenoxyacetate sowie die (S)-Enantiomere der Phenoxypionate, die (R)-Enantiomere dienen nicht als Substrat (Nickel et al., 1997; Saari et al., 1998; Müller und Babel, 1999).

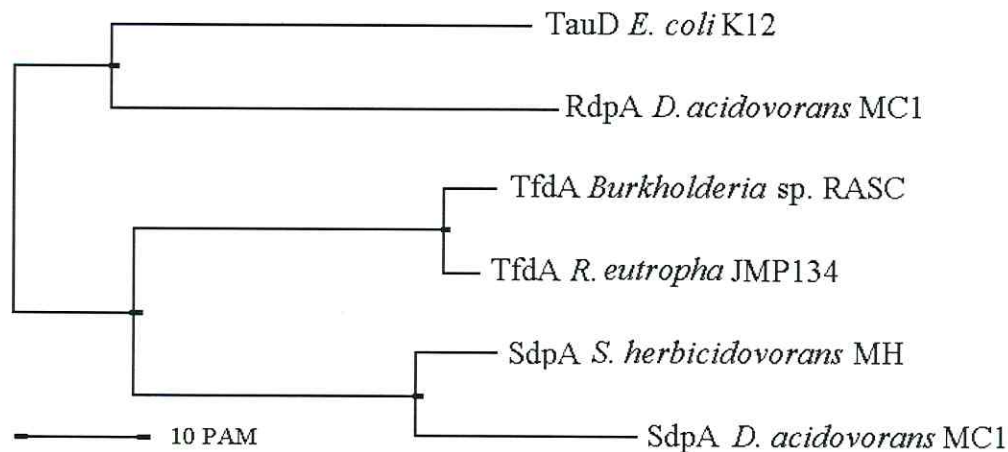


Abbildung 36: Verwandtschaftsbaum ausgesuchter Phenoxymethyltransferase-Enzyme TauD: *E. coli* K12-NP_414902; TfdA: *R. eutropha* JMP134-P10088; *Burkholderia* sp. RASC-Q45423; SdpA: *S. herbicidovorans* MH-Q700X4; *D. acidovorans* MC1-Q8KSD0; RdpA: *D. acidovorans* MC1-Q8KSD1

Die Primärstrukturen der RdpA- und SdpA-Enzyme enthalten wichtige Strukturelemente von α -KG-abhängigen Dioxygenasen. So konnte das Motiv der Gruppe(II)-Dioxygenasen, H-X-D-X₁₃₆₋₂₀₅-D-N-X₄-H-X₁₀-R, in allen Aminosäuresequenzen gefunden werden. Alle Aminosäuren, die im TauD für die Fe(II)-Koordination und Bindung des α -KG identifiziert wurden (Abbildung 15), wurden ebenfalls in den Phenoxymethyltransferase-Enzymen aus MC1, P230 und MH nachgewiesen; sie gehören zu den hochkonservierten Regionen in den Primärstrukturen aller Enzyme der Gruppe 1.14.11.- (Roach et al., 1995a; Hogan et al., 2000; Aravind und Koonin, 2001; Clifton et al., 2001; Elkins et al., 2002). Die Aminosäuren, die das eigentliche Substrat am aktiven Zentrum binden, sind dagegen sehr unterschiedlich. Im TfdA wurden Arg278, His214, Ser117, Lys95 und Lys71 durch spezifische Mutagenese als 2,4-D-bindende Reste identifiziert (Dunning-Hotopp und Hausinger, 2002; Elkins et al., 2002). Von diesen ist lediglich Ser117 in den RdpA- und SdpA-Enzymen konserviert. Das Prolin wird von der Prolin-3-Hydroxylase mit den Resten Arg95, Arg97, Arg122 und His43 gebunden (Clifton et al., 2002). Keine dieser Aminosäuren ist in den untersuchten Sequenzen zu finden. Taurin wird von TauD über die Reste Tyr73, Asn95, Ser158, Arg270 und His70 im aktiven Zentrum ausgerichtet (Elkins et al., 2002). Von diesen Aminosäuren sind Arg270 im RdpA und Ser158 in den (S)-spezifischen Enzymen aus M1 und MH konserviert.

Aus der Primärstruktur können mit Hilfe von Modellierungs-Programmen erste Hinweise für die Sekundärstruktur der Proteine abgeleitet werden, indem versucht wird, die Aminosäuresequenz mit einer bereits bekannten Sekundärstruktur eines verwandten Proteins abzugleichen. Mit Hilfe dieser Methode ist es bereits gelungen, die Sekundärstruktur des TauD vorherzusagen. Hierzu wurde die Aminosäuresequenz, die nur zu etwa 8% mit der der Clavaminat-Synthase übereinstimmt, in die Sekundärstruktur der Clavaminat-Synthase gefittet. Die so erhaltene 3D-Struktur stimmt zu 84% mit der der Clacaminat-Synthase überein (O'Brien et al., 2003) und entspricht zu über 90% der Realität, wie nach Röntgenkristall-Strukturuntersuchungen deutlich wurde (Elkins et al., 2002). Auf die gleiche Art und Weise konnte die Sekundärstruktur der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus MC1, P230 und MH vorhergesagt werden. Es wurde das für α -KG-abhängige Dioxygenasen typische *jelly-roll*-Motiv erhalten. Die für die Katalyse essentiellen Reste in den gleichen Strukturelementen wie im TauD.

4.2.2 Multiple Enzymformen

Proteom-Untersuchungen an *Delftia acidovorans* MC1 nach Wachstum auf (R,S)-DP als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zeigen das Vorhandensein von multiplen Enzymformen für eine Vielzahl von Proteinen (Benndorf et al., 2004). Bei vielen handelt es sich dabei um Ladungsisomere mit gleicher Masse. So wurden vom TfdB drei Formen, vom TfdD vier Formen und vom Ef Tu (Elongationsfaktor Tu) drei Formen nachgewiesen. Es konnten auch Enzymformen gefunden werden, die sich nur in ihrer Masse, nicht aber im pI unterscheiden. Ein Beispiel hierfür ist das TfdC_{II}. Auch echte Isoenzyme, Produkte unterschiedlicher Gene, wurden nachgewiesen (TfdC_I und TfdC_{II}). Es ist auffällig, dass von fast allen Enzymen des modifizierten *ortho*-Weges mehrere Enzymformen gefunden wurden. Und so überrascht es nicht, dass auch vom RdpA_{MC1} und vom SdpA_{MC1} nach Auftrennung im 2D-Gel multiple Enzymformen nachgewiesen werden konnten. Gründe für das Auftreten von Enzymformen sind in der Einleitung beschrieben. Da in MC1 jeweils nur ein Gen für das SdpA und RdpA nachgewiesen werden konnte (Schleinitz et al., 2004), handelt es sich bei den Enzymformen nicht um echte Isoenzyme, vielmehr zeichnen sie sich durch eine identische Primärstruktur aus. Unterschiede sind in einer posttranslationalen Modifizierung zu suchen. Als typische Modifizierungen an α -KG-abhängigen Dioxygenasen wurden Hydroxylierungen an Tryptophanresten beschrieben (Liu et al., 2001; Ryle et al., 2003a). An den Tryptophanen 235 und 255 des SdpA_{MC1} konnten Massen-shifts von +16 nachgewiesen werden. Eine solche Massenzunahme korrespondiert mit einer Oxidation des Aminosäurerestes zum Oxindolylalanin (An-

derson et al., 2002) oder einer Hydroxylierung am Benzolring des Trp, nicht aber mit einer Hydroxylierung zum 3-Hydroxyindolylalanin. Diese Modifizierung hätte eine Massenzunahme von 18 zur Folge. Eine genauere Analyse der Modifikation an den Tryptophanen im SdpA_{MC1} wurde nicht durchgeführt, so dass eine eindeutige Zuordnung der Massenzunahme zu einer Struktur nicht vorgenommen werden kann. Die Modifikationen an Trp235 und Trp255 sind in keinem Fall die Ursache für das Auftreten verschiedener Spots im 2D-Gel, da erstens eine Hydroxylierung oder Oxidation von Trp-Resten nicht zur Veränderung von Nettoladungen führt und zweitens die Modifikationen in den Proteinen aller Spots nachgewiesen werden konnten. Für TauD wurde eine Hydroxylierung des Tyr73 im TauD beschrieben. Diese Aminosäure liegt komplexiert mit dem Eisen(III) als Catecholderivat im aktiven Zentrum des Enzyms vor (Ryle et al., 2003a/b). Solche Art Modifikation wurde in den untersuchten RdpA- und SdpA-Enzymen nicht nachgewiesen, würde aber auch nicht zu einer Auftrennung der Proteinspezies in der isoelektrischen Fokussierung führen. Der Verlust einer Aminosäure am C- oder N-Terminus könnte ebenfalls zu einem veränderten pI-Wert führen, konnte aber durch massenspektrometrische Analyse der Proteinspots im vorliegenden Falle ausgeschlossen werden. Im SdpA_{MC1} konnte aber eine Modifikation mit der Masse 209 am Cys237 nachgewiesen werden. Die chemische Struktur dieses Derivates konnte bislang nicht ermittelt werden; diese Massendifferenz kann bekannten Strukturen nicht zugeordnet werden. Aus den Isotopenmustern des betreffenden Peptides wird jedoch ersichtlich, dass Halogene kein Bestandteil der Modifizierung sind, also dass unmittelbare Reaktionsprodukte nicht involviert wurden. Ein weiterer Grund, der gegen eine von Metaboliten des Phenoxyalkanoat-Abbaus abgeleitete Modifizierung spricht, ist die Tatsache, dass die rekombinanten Enzyme bei Auftrennung im 2D-Gel ebenfalls in mehrere Spots separiert wurden und die überexprimierenden Zellen jedoch nie mit den Herbiziden in Berührung gekommen sind. Auch findet man die verschiedenen SdpA_{MC1}- und RdpA_{MC1}-Monomere nach Wachstum von MC1 auf Komplexmedium (Benndorf et al., 2004). Aufgrund der ungeraden Masse von 209 wird wahrscheinlich, dass z.B. eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen Bestandteil der gesuchten Verbindung ist. Doch selbst die Modifikation am Cys237 sollte nicht der Grund für das Auftreten von isomeren Monomeren im 2D-Gel sein, da ein Peptid mit diesem Charakteristikum nach isoelektrischer Fokussierung in keinem der Proteinspots, sondern nur nach im Lösungsverdau mit Trypsin nachgewiesen werden konnte. Proteine liegen im 2D-Gel komplett reduziert vor. Da dies im tryptischen Verdau in Lösung durch das Vorhandensein von 50mal mehr Protein in der Ausgangslösung nicht hundertprozentig gewährleistet werden kann, liegt die Annahme nahe, dass das 209er Molekül durch eine Disulfidbrücke an das Cystein gebunden ist. Weitere

Untersuchungen sind dazu aber noch nötig. Ein weiterer Hinweis für die Bindung des Derivates über eine Disulfidbrücke ist die Nicht-Auffindbarkeit einer solchen Modifikation am RdpA_{MC1}. Dieses Protein konnte mit einer Sequenzabdeckung von über 85% analysiert werden. Ein Unterschied zwischen den im 2D-Gel auftretenden Proteinformen wurde jedoch nicht gefunden. Untersuchungen unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden bislang nicht vorgenommen.

Das Vorliegen von isomeren Monomeren sowohl bei den in *E. coli* überexprimierten als auch bei den nativen Phenoxalkanoat-spaltenden Enzymen aus MC1 legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Modifikationen um einen generellen Mechanismus für α -KG-abhängige Enzyme handelt. So konnte für die Thymin-7-Hydroxylase eine Reaktionsmechanismusbedingte Modifizierung nachgewiesen werden, Substratanaloga werden zu Verbindungen oxidiert, die irreversibel am aktiven Zentrum des Enzyms binden (Thornburg, 1989; Thornburg und Stubbe, 1993; Lai et al., 1995). *E. coli* ist der Träger von *tauD*, einem Gen, das die α -KG-abhängige Taurin-Dioxygenase codiert, und sollte bei Vorliegen eines allgemeinen Modifizierungsmechanismus für solche Enzyme auch in der Lage sein, die Phenoxalkanoat-spaltenden Enzyme zu modifizieren. Bei einer MC1 spezifischen Modifizierung wäre dies nicht der Fall. Führt man diese Überlegung zu Ende, dann sollten alle α -KG-abhängigen Dioxygenasen modifiziert vorliegen, für die RdpA-Proteine aus P230 und MH ist dies auch der Fall. Ebenso wurden bereits von den SdpA-Proteinen aus P230 isomere Monomere gefunden. Auch von der γ -Butyrobetain-Hydroxylase konnten ladungsisomere Monomere nachgewiesen werden. Für eine Vielzahl von α -KG-abhängigen Dioxygenasen wurde jedoch keine isoelektrische Fokussierung durchgeführt, weshalb eine zu frühe Generalisierung nicht gerechtfertigt ist.

Auch für das RdpA-Enzym aus P230 wurden multiple Enzymformen nachgewiesen. Diese weichen trotz der gleichen Nukleinsäuresequenz im Gen von denen des RdpA_{MC1} ab. Gründe hierfür sind nicht bekannt.

Die beiden SdpA-Enzymfraktionen, die aus dem Stamm P230 voneinander getrennt werden konnten, sind nicht Isoenzyme im Sinne der Definition, sondern erwiesen sich ebenfalls als multiple Enzymformen. Da sie die gleichen Peptidspaltungsmuster aufweisen, kann angenommen werden, dass sie sich durch identische Primärstrukturen auszeichnen. Die Auftrennung der beiden SdpA_{P230}-Enzyme im 2D-Gel zeigt mehrere, zum Teil identische Spots (Abbildung 23), aus denen nochmals deutlich wird, dass die Zusammensetzung der Oligomere zum Teil aus den gleichen Untereinheiten resultiert. Die verschiedenen monomeren For-

men der Enzyme unterscheiden sich wieder signifikant in ihren isoelektrischen Punkten, in ihren Molmassen jedoch nur unwesentlich. Auch für diese Proteine konnte die Art der Modifizierung bislang nicht aufgeklärt werden. In der Literatur wurden bisher keine derartigen Phänomene im Zusammenhang mit Phenoxyalkanoat-spaltenden oder α -KG-abhängigen Dioxygenasen beschrieben. Es können also keine Analogien zu bereits Bekanntem gezogen werden.

Detaillierte Untersuchungen zur Verschiebung des Enzymformen-Verhältnisses liegen nicht vor. Bekannt ist aber, dass die Verhältnisse der Enzymformen des TfdD und Ef Tu nicht konstant, sondern variabel sind und mit sich ändernden Wachstumsbedingungen variieren (Bennendorf et al., 2004).

4.3 Klassifizierung der Enzyme

Die untersuchten Enzyme katalysieren Reaktionen, die nach dem Schema in Abbildung 37 verlaufen. Es handelt sich somit um Oxidoreduktasen, da der Carbonylkohlenstoff des α -KG sowie der über die Etherbindung an den Aromaten gebundene Kohlenstoff der Seitenkette des Phenoxyalkanoates oxidiert werden, während der molekulare Sauerstoff reduziert wird (Fukumori und Hausinger, 1993b).

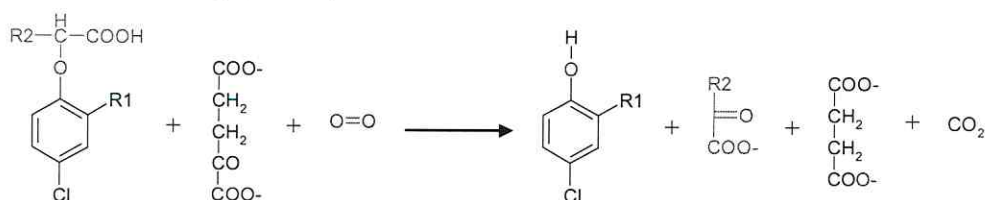


Abbildung 37: Reaktionsgleichung der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus MC1, P230 und MH R1:
-Cl oder -CH₃, R2: -H oder -CH₃,

Des Weiteren sind die Enzyme in die Subklasse 14 einzuordnen, da für die Reaktion zwei Elektronendonoren notwendig sind: α -KG und Phenoxyalkanoat. Die weitere Unterteilung führt zur Sub-Subklasse 11, charakterisiert durch den Einsatz von α -KG als einer der Elektronendonoren sowie durch den Einbau von je einem Atom Sauerstoff in jeden der Donoren. Diese Charakteristika treffen für die hier behandelte Reaktion zu: α -KG ist für die Enzymreaktion essentiell (Nickel et al., 1997; Müller et al., 2001) und der Sauerstoff ist sowohl im substituierten Phenol als auch im Succinat wiederzufinden (Que und Ho, 1996). Die EC-Nummer lautet also für die untersuchten Enzyme 1.14.11.-. Seriennummern wurden noch nicht vergeben. Andere Enzyme, die dieser Enzymklasse zuzuordnen sind, wären z.B. die γ -Butyrobetain-Hydroxylase (EC 1.14.11.1), die Taurin-Dioxygenase (EC 1.14.11.17) und die

Clavaminat-Synthase (EC 1.14.11.21). Allen Enzymen dieser Klasse ist gemeinsam, dass neben den beiden Substraten auch Eisen(II) essentiell für die Reaktion ist und dass Ascorbat den enzymatischen Umsatz stimuliert.

α -KG-abhängige Dioxygenasen sind Enzyme mit Nicht-Häm-gebundenem Eisen und wurden von deCarolus und deLuca (1994) aufgrund ihrer katalysierten Reaktionen in die Untergruppen Hydroxylasen, Hydroxylasen/Epoxidasen, Cyclasen, Desaturasen und Ring-Expandasen unterteilt. Mechanistisch ähnelt die von Phenoxalkanoat-spaltenden Enzymen katalysierte Reaktion der der Hydroxylasen, die Enzyme koppeln die oxidative Decarboxylierung des α -KG mit der Hydroxylierung des Seitenkettenkohlenstoffatoms, das über die Etherbindung mit dem Aromaten verbunden ist. Das entstandene Hemiacetal zerfällt dann spontan in Dichlorphenol und im Falle der Phenoxyacetate in Glyoxylat (Fukumori und Hausinger, 1993b) bzw. im Falle von Phenoxypropionaten in Pyruvat.

Die Phenoxalkanoat-spaltenden Enzyme aus den drei Stämmen können aufgrund vom konservierten Sequenzmotiv H-X-D-X₁₃₆₋₂₀₅-D-N-X₄-H-X₁₀-R (Hogan, 1999), das in allen gereinigten und charakterisierten Enzymen aus MC1, P230 und MH gefunden werden konnte, der Gruppe(II) der α -KG-abhängigen Dioxygenasen zugeordnet werden. Ihr Reaktionsmechanismus ist denen der Hydroxylasen sehr ähnlich.

4.4 Reaktionsmechanismus und Enzymstabilität

Die Enzymreaktionen, die von α -KG-abhängigen Enzymen katalysiert werden, sind sehr vielfältig, trotzdem zeichnen sie sich alle durch einen sehr ähnlichen Reaktionsmechanismus aus. Eisen(II)-Ionen sind für die katalytische Aktivität essentiell. Diese werden im aktiven Zentrum von zwei Histidin-Resten und einer Carboxygruppe, entweder vom Glutamat oder vom Aspartat (Hegg et al., 1999; Clifton et al., 2001; Aravind und Koonin, 2001; Elkins et al., 2002), koordiniert. Daran beteiligt sind Aminosäuren, die sich in dem hochkonservierten Sequenzmotiv H-X-D-X₁₃₆₋₂₀₅-D-N-X₄-H-X₁₀-R wiederfinden (Hogan et al., 1999). Dieses Motiv findet sich auch bei den RdpA- und SdpA-Enzymen aus MC1, P230 und MH (3.2.1.2). Für die Aminosäuren H-X-D konnte für andere Enzyme dieser Gruppe eine direkte Beteiligung an der Bildung des Eisen(II)-Zentrums gezeigt werden (Hegg et al., 1999; Elkins et al., 2002). Im Zusammenhang der Sequenzdaten der Proteine mit kinetischen Eigenschaften kann eine analoge Organisation der aktiven Zentren der Phenoxalkanoat-spaltenden Enzyme aller untersuchten Stämme zu den TauD- und TfdA-Proteinen nahegelegt werden. Wie alle α -KG-abhängigen Dioxygenasen benötigen auch die untersuchten RdpA- und SdpA-Enzyme Eisen(II)-Ionen für ihre katalytische Aktivität. Für die enantioselektiven Enzyme aus MC1

konnte eine hemmende Wirkung durch Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem spezifischen His-Modifizierungsreagenz, nachgewiesen werden (Westendorf et al., 2003). Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich bei einem mit DEPC behandelten Enzym dessen α -KG-Bindekapazität verringert (3.3.1), womit ein direkter Zusammenhang zwischen den His-Resten, der Enzymaktivität, der α -KG-Bindung und somit dem aktiven Zentrum des Enzyms hergestellt werden konnte. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf einen TfdA- und TauD-ähnlichen Reaktionsmechanismus liefert eine Nebenreaktion des Enzyms, die Selbsthydroxylierung. Werden α -KG-abhängige Enzyme mit α -KG und Sauerstoff inkubiert, kommt es zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima der Proteine. Ursache für diesen Effekt ist die Hydroxylierung von Aminosäureseitenketten nahe der aktiven Zentren. So wurde im TfdA Trp112 hydroxyliert (Liu et al., 2001), im TauD wurden Hydroxylgruppen an den Trp128, Trp240 und Trp248 nachgewiesen. Ebenfalls findet man in diesem Enzym Tyr256 hydroxyliert vorliegend (Elkins et al., 2002; Ryle et al., 2003). Für das SdpA_{MC1} wurde das gleichermaßen beobachtet; hier finden sich Hydroxylierungen an Trp235 und Trp255, abgeleitet aus MS-MS-Spektren mit Massenshift von +16.

Enzymkinetische Untersuchungen an α -KG-abhängigen Enzymen zeigen einen *ordered* Mechanismus für den Substratumsatz (Holme, 1975; Rundgren, 1977b; Myllylä et al., 1977; Puistola et al., 1980; Kivirikko et al., 1989; de Carolis und de Luca, 1993). In dieser Arbeit konnte ein solcher Mechanismus auch für die Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus MC1 (zumindest für die Substratanlagerung) gezeigt werden. Die Bindung der Substrate und die Ablösung der Produkte erfolgt in einer festgelegten Reihenfolge. Wie bereits in der Einleitung erläutert (1.2.1), existieren zwei grundsätzliche Vorstellungen über die Reihenfolge der Anlagerung der Substrate. Entweder binden sie in der Folge: α -KG, O₂, Substrat (Kivirikko, 1972; Kivirikko et al., 1989; deCarolis und deLuca, 1993) oder in der Folge: α -KG, Substrat, O₂ (Holm et al., 1975; Hegg et al., 1999; Elkins et al., 2002; Price et al., 2003). Anhand der vorliegenden Daten kann keine definitive Aussage zur Abfolge der Substratbindung am aktiven Zentrum gemacht werden. Das würde detailliertere Studien erfordern. Wegen der sehr ähnlichen Reaktion zum TfdA ist eine Bindung in der Reihe: α -KG, Phenoxyalkanoat und Sauerstoff als wahrscheinlich anzunehmen. Aufgrund der kinetischen Konstanten ist auch die zweite Bindungsreihenfolge nicht auszuschließen. Die multiplen Enzymformen des SdpA_{MC1} zeichnen sich durch identische K_M-Werte bezüglich der Substrate α -KG und Sauerstoff aus, die Affinitätskonstanten bezüglich der Phenoxyalkanoate sind jedoch deutlich verschieden

(3.3.5.1). Außerdem unterscheiden sich die Enzymformen in der Modifizierung der Primärstruktur (3.2.3.1). Diese Modifizierung macht sich in ihrem Einfluss auf die kinetischen Konstanten hinsichtlich der Herbizid-Substrate bemerkbar, nicht aber auf die von Sauerstoff und α -KG. Unterstellt man eine Konformationsänderung des Enzyms während der Reaktion (Sami et al., 1997; Vålegard et al., 1998; Zhang et al., 2000; Clifton et al., 2001; O'Brien et al., 2003) und korreliert das mit dem kinetischen Verhalten der Enzymformen, so legt das die Bindung der Substrate α -KG und Sauerstoff vor dem Herbizid nahe. Mechanistisch wäre das so zu verstehen, dass erst die Herbizid-Bindung zu solchen Änderungen im aktiven Zentrum führt, dass die Reaktion durch die Modifizierung moduliert wird. Zur endgültigen Klärung der Bindungsreihenfolge der Substrate und des Reaktionsmechanismus bedarf es noch einiger Untersuchungen. Für TauD jedoch konnte eine Taurin-induzierte Konformationsänderung bereits nachgewiesen werden (O'Brien et al., 2003).

Für α -KG-abhängige Dioxygenasen konnte eine hohe, eng mit dem Reaktionsmechanismus verknüpfte Inaktivierungsrate gezeigt werden. Diese Inaktivierungen können sowohl reversibel als auch irreversibel sein. So wurde für TfdA gezeigt, dass die Inaktivierung des Enzyms durch die Anwesenheit von Ascorbat stark verlangsamt wird. Ascorbat übernimmt wahrscheinlich die Rolle eines Antioxidants und reduziert bereits oxidierte Eisen-Zentren (Saari und Hausinger, 1998). Ein solcher Inaktivierungsschutz konnte auch für andere Enzyme dieser Gruppe nachgewiesen werden. So verlangsamte sich der Aktivitätsverlust des TauD durch Zugabe von Ascorbat um 35% (Ryle et al., 2003a) und bei der Clavaminat-Synthase um 40% (Salowe et al., 1990). Es wurden aktive Sauerstoffspezies postuliert (Siegel, 1983), um die Inaktivierung der Enzyme zu erklären. Entsprechend bestätigt werden konnte dies durch Stabilisierung der Aktivität nach Zugabe von Katalase (Salowe et al., 1990). Auch die Selbsthydroxylierung kann zu einer reversible Inaktivierung des Enzyms führen, durch den Einsatz starker Reduktionsmittel (Dithionit) kann bis zu 60% der Enzymaktivität von TfdA, die so vermindert war, zurück gewonnen werden (Liu et al., 2001). In dieser Selbsthydroxylierung wird ein Schutzmechanismus des Proteins gesehen, der das Enzym vor irreversiblen Inaktivierungen wie z.B. einem Bruch der Peptidkette schützen soll (Liu et al., 2001; Ryle et al., 2003a/b). Von irreversiblen Inaktivierungen α -KG-abhängiger Dioxygenasen wurde bereits berichtet (Que und Ho, 1996; Solomon et al., 2000), molekulare Details sind jedoch nicht bekannt. Ein Erklärungsversuch geht von der Reaktion des Enzyms mit Substratanaloga aus, die durch ihren enzymatischen Umsatz irreversibel an das aktive Zentrum binden. So konnte

dem 5-Ethynyluracil eine solche Rolle beim Umsatz durch die Thymin-7-Hydroxylase zugewiesen werden (Thornburg, 1989; Thornburg und Stubbe, 1993; Lai et al., 1995), analoges konnte für das Phenylpropionylat beim Umsatz durch TfdA gezeigt werden (Dunning-Hotopp und Hausinger, 2002).

Starke Aktivitätsverluste während der Reaktion konnten auch für die Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus MC1, P230 und MH nachgewiesen werden. Bei Lagerung der Enzympräparate über einen langen Zeitraum hinweg wurden keine oder nur geringe Aktivitätsverluste festgestellt (Westendorf et al., 2003; Ruhland 2003). Erst im Verlauf des enzymatischen Umsatzes wurden z.T. dramatische Inaktivierungskinetiken verzeichnet. Die Auswertung solcher Inaktivierungsprofile zeigt, dass es nach 2000-4000 Umsätzen am katalytischen Zentrum zum kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität kommt. Diese Inaktivierung ist nicht durch den Einsatz von Ascorbat zu verhindern; stärkere Reduktionsmittel sowie der Einsatz von Katalase wurden nicht getestet. Möglicherweise ist dies auch Ausdruck der oben genannten Selbsthydroxylierung, die in Anwesenheit von α -KG und Sauerstoff innerhalb von einigen Minuten (30 min laut Liu et al., 2001) stattfindet. Auch für das SdpA_{MC1} konnten hydroxylierte Proteinspezies nachgewiesen werden (3.2.4.2). Da kinetische Messungen jedoch innerhalb von zwei Minuten durchgeführt werden, bleibt der Einfluss dieses Effektes auf die kinetischen Kennlinien und Konstanten klein.

4.5 Enzymkinetik

4.5.1 Kinetische Kennlinien und Kooperativität

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme (RdpA_{MC1}, RdpA_{MC1-rec}, RdpA_{P230}, RdpA_{MH}, SdpA_{MC1}, SdpA_{MC1-rec}, SdpA_{P230-1}, SdpA_{P230-2}, SdpA_{MH}) wurden Abweichungen der Enzymkinetiken vom Michaelis-Menten-Verhalten nachgewiesen. Die Enzympräparate zeigten zum Teil eine Plateaubildung (Reinigungsstufe HIC) und alle zeichneten sich durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf aus. Gründe für das Auftreten von Michaelis-Menten-Verhalten-abweichenden Kennlinien können sein:

- die Enzympräparation besteht aus Isoenzymen
- es existieren alternative Reaktionswege
- das Substrat verändert seine Eigenschaften (z.B. durch Micellenbildung)
- es sind Metallionen-Substrat-Komplexe an der Reaktion beteiligt
- es kommt zur Isomerisierung oder Inaktivierung des Enzyms
- die Enzympräparation enthält verschiedene aktive Spezies, die z.B. durch Proteolyse oder Modifikation entstanden sind

- das vorliegende Enzym verhält sich kooperativ

Einige der hier aufgeführten Faktoren konnten für die untersuchten Enzyme ausgeschlossen werden. Die Anwesenheit von echten Isoenzymen kann als Ursache für die abweichenden Kinetiken ausgeschlossen werden, da zumindest bei MC1 jeweils nur ein Gen für RdpA und SdpA gefunden werden konnte (Schleinitz et al., 2004). Alternative Reaktionswege wurden bei Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzymen als auch bei anderen α -KG-abhängigen Dioxygenasen bisher nicht beschrieben und sind aufgrund von Untersuchungen zur Reaktions-Stöchiometrie auch nicht zu vermuten (Salowe et al., 1990; Eichhorn et al., 1997; Fukumori und Hausinger, 1993b; Müller et al., 2001; Poh et al., 2001). Bis zum heutigen Tag wurden viele enzymkinetische Untersuchungen mit den Substraten 2,4-D, MCPA, den Enantiomeren des 2,4-DP und des MCPP sowie 2,4-DB und MCPB durchgeführt. Die erhaltenen Kennlinien entsprachen dabei immer einer Michaelis-Menten-Kinetik (Fukumori und Hausinger, 1993b; Suwa et al., 1996; Saari et al., 1998; Hogan, 1999; Poh et al., 2001); über davon abweichende Enzymkinetiken wurde nichts berichtet. Daraus kann geschlossen werden, dass die Substrateigenschaften während der Reaktion konstant bleiben und somit nicht der Grund für die beobachteten sigmoidalen Kurvenverläufe sind. Für Enzymreaktionen, bei denen Metallionen-Substrat-Komplexe an der Reaktion beteiligt sind, wurden des öfteren sigmoidale Kurvenverläufe beobachtet. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das ATP, das nur in komplexierter Form mit einem Metall(II)-Ion (MeATP^{2-} -Komplex) von Kinasen als Substrat verwendet wird. Hierbei liefert die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP-Konzentration einen sigmoidalen Kurvenzug (Sabater und Delafuente, 1975; Koland und Hammes, 1986; Porter et al., 1988; Podesta und Plaxton, 1991; Onozuka und Nosaka, 2003). Auch für die Spaltung von Phenoxyalkanoaten sind zweiwertige Metallionen, nämlich das Eisen(II), unerlässlich. Den sigmoidalen Kurvenverlauf bedingen sie jedoch nicht, da offensichtlich keine Substrat/Eisen(II)-Komplexe gebildet werden, Eisen(II) liegt im Enzym koordiniert gebunden vor.

Während des enzymatischen Umsatzes kommt es bei den untersuchten Enzymen zu einem starken Aktivitätsverlust. Nach durchschnittlich 2000 bis 4000 Umsätzen verliert ein aktives Zentrum seine katalytische Aktivität (3.3.3). Da während der Aufnahme der kinetischen Kennlinien nicht mehr als 600 Umsätze pro aktivem Zentrum vermessen wurden, ist der Einfluss der Enzyminaktivierung auf den Kurvenverlauf zwar gering, aber nicht total zu vernachlässigen.

Ein weiterer Grund für das Abweichen von einer Michaelis-Menten-Kinetik ist die Anwesenheit verschieden aktiver Enzymspezies. Multiple Enzymformen konnten für die beiden Enzy-

me aus MC1 eindeutig nachgewiesen werden. Das Gemisch aus diesen Enzymformen liefert eine Kennlinie, deren Anstieg durch ein Plateau unterbrochen ist. Nach Trennung der Enzymformen löst sich die komplexe Kinetik auf und die Kennlinien verlaufen stetig, folgen aber nicht der Michaelis-Menten-Gleichung. Enzymkinetische Untersuchungen zeigten tatsächlich unterschiedliche kinetische Konstanten für die einzelnen Enzymformen. Die Anwesenheit von multiplen Enzymformen mit verschiedenen Aktivitäten äußert sich also im Auftreten von Plateaus in der kinetischen Kennlinie, bedingt aber nicht den sigmoidalen Kurvenverlauf. Proteolytische Prozesse als Ursache für das Auftreten von multiplen Enzymformen konnten durch Einsatz von Proteaseinhibitoren ausgeschlossen werden. Die Formen sollten also aufgrund des Vorhandenseins von jeweils nur einem Gen das Produkt einer posttranslationalen Modifizierung sein.

Kooperativität ist die häufigste Ursache für das Auftreten von Kurvenverläufen, die verschieden von den hyperbolen Kurvenzügen nach Michaelis-Menten sind. Zur Erklärung des Phänomens der Kooperativität wurden zwei Modelle entwickelt: das Symmetrie-Modell (Monod et al., 1965) und das sequenzielle Modell (Koshland et al., 1966). Beiden Modellen ist gemeinsam, dass sie ein oligomeres, zumindest jedoch ein dimeres Protein voraussetzen. Die Monomere dieses Proteins können in zwei Konformationszuständen existieren: einer R- und einer T-Form, die sich in ihren kinetischen Eigenschaften unterscheiden. Die R-Form kann sich in die T-Form umwandeln. Beim Symmetrie-Modell passiert die Umwandlung mit allen Monomeren gleichzeitig, die Symmetrie des Moleküls bleibt erhalten. Beim sequenziellen Modell geschieht die Umwandlung der Monomeren nacheinander. Es sind sowohl positive als auch negative Kooperationen denkbar. Nach neueren Untersuchungen bleibt die Kooperativität jedoch nicht mehr nur oligomeren Proteinen vorbehalten, auch für monomere Proteine wurde sie jüngst nachgewiesen (Kamata et al., 2004). Die kinetischen Kennlinien von kooperativen Enzymen sind sigmoidal. Es kann aber auch zur Ausbildung von Plateaus kommen, wenn es sich z.B. um negative Kooperation handelt (Conway und Koshland, 1968), oder es aber nach dem sequenziellen-Modell von Koshland et al. (1966) zu Stabilisierung von intermediären Konformationszuständen kommt. Beide Fälle der Plateaubildung wurden bereits beobachtet. So binden die Substrate der Glycerol-3-Phosphat-Cytidyltransferase durch das Auftreten von negativer Kooperativität an die erste Untereinheit mit einer 150fach höheren Affinität als an die zweite, die Bindungskurven der Substrate sind biphasisch (Sanker et al., 2001). Die Kennlinie der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase weist für das Phosphoenolpyruvat ein Plateau bei halbmaximaler Umsatzrate auf, welches mit der Stabilisierung der Konformation erklärt wird, bei der sich die eine Hälfte der Untereinheiten in der R-, die andere in der T-

Form befindet (Corwin und Fanning, 1968). Sigmoide Kennlinien sowohl mit als auch ohne Plateaubildung wurden für die Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme aus MC1, P230 und MH nachgewiesen. Die Plateaus werden in diesen Fällen nicht durch Kooperativität verursacht, da nach Separation der multiplen Enzymformen des Enzympräparates die Kennlinien stetig verlaufen. Das Auftreten des sigmoiden Verlaufs kommt dagegen mit großer Wahrscheinlichkeit durch kooperative Interaktionen zustande. Bislang wurde ein solches Phänomen für diese und auch andere α -KG-abhängigen Enzyme nicht definitiv beschrieben. Betrachtet man aber bereits veröffentlichte Kennlinien unter dem Aspekt der Sigmoidität, so zeigt sich, dass z.B. die kinetischen Daten der Sulfonat/ α -KG-Dioxygenase (Hogan, 1999) bezüglich des Substrates Taurocholat besser einen sigmoidalen als einen hyperbolen Kurvenzug beschreiben. Der Hill-Koeffizient beträgt etwa 1,5. Ebenso kann ein sigmoidaler Kurvenverlauf aus den Daten für die Spaltung von (R)-DP durch den Rohextrakt von *Alcaligenes denitrificans* (Saari et al., 1999) abgeleitet werden. Für verschiedene α -KG-abhängige Dioxygenasen sind Substrat-induzierte Konformationsänderungen bekannt (Sami et al., 1997; Vålegard et al., 1998; Zhang et al., 2000; Clifton et al., 2001; O'Brien et al., 2003). So wurde gefunden, dass der C-Terminus während der Reaktion über den aktiven Spalt klappt und diesen so vor Lösungsmittelmolekülen abschirmt. TauD wurde als Tetramer kristallisiert und es konnte gezeigt werden, dass in einer solchen Anordnung nur drei der Monomere in der Lage sind, das Taurin zu binden. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen den Konformationsänderungen der Proteine und den kinetischen Kennlinien besteht, ist nicht geklärt.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzymen handelt es sich um di- und trimere Proteine, und trotz dieser Tatsache tritt Kooperativität auf. Für höher aggregierte symmetrische Proteine wurde ein solches Verhalten oft nachgewiesen (Hämoglobin-Homotetramer [Perutz, 1970], Aspartat-Transcarbamylase-Homohexamer [Van Vliet et al., 1991], Aspartokinase-Homotetramer [Janin und Cohen, 1969], Homoserindehydrogenase-Homotetramer [Janin und Cohen, 1969], Phosphofruktokinase-Homotetramer [Badul, 1979]). Bei kleineren Proteinen kommt kooperatives Verhalten eher selten vor, wurde aber auch schon beschrieben (Glucokinase-Monomer [Kamata et al., 2004], Catechol-1,2-Dioxygenase-Homodimer, Homotrimer [Briganti et al., 2000]). Interessanterweise handelt es sich bei den SdpA_{MC1}-Enzymformen I2 und I3 nicht um Homodimere, sondern um Heterodimere. Für solche Proteine wurde nach meiner Literaturrecherche noch keine Kooperativität nachgewiesen. Für die untersuchten Enzyme der drei Stämme konnte positive homotrope Kooperativität gezeigt werden. Das kooperative Verhalten der Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme ist im Ge-

gensatz zu anderen kooperativen Enzymen nicht sehr ausgeprägt. Die Hill-Koeffizienten liegen für alle getesteten Herbizide im Bereich zwischen 1 und 1,8, die einzige Ausnahme bilden hierbei die SdpA_{MC1}-Enzyme bezüglich des (S)-MCPP. Für dieses Substrat ist der Hill-Koeffizient bei der Enzymform I2 2 und bei I1 sogar 3,5.

4.5.2 Posttranslationale Modifizierung und Enzymkinetik

Die RdpA- und SdpA-Enzyme reagieren sehr empfindlich auf Änderungen im pH-Wert (Westendorf, 2001), bereits kleine Änderungen in der Protonen-Konzentration haben eine signifikante Änderung der Umsatzraten zur Folge. Nur durch exakte Einstellungen des pH-Wertes war es möglich, reproduzierbare Messdaten zu bekommen. Um die kinetischen Konstanten genau bestimmen zu können, wurden die Enzymkonzentrationen so gewählt, dass die Umsatzraten zwischen 1 und 14 nmol/min lagen. Auf diese Weise wurden über die ersten 2 Minuten lineare Produktbildungskurven mit einem Regressionskoeffizient von >0,99 erhalten. Die kinetischen Daten der Herbizid-spaltenden Enzyme dieser Arbeit wurden auf zwei voneinander unabhängigen Wegen ausgewertet: Zum einen mit linearisierenden Verfahren inklusive der manuellen Wichtung der Werte, zum anderen durch eine Computer-gestützte Auswertung der nicht linearisierten kinetischen Kennlinien. Beide Verfahren liefern sehr ähnliche kinetische Konstanten, deren Standardabweichung etwa 15% beträgt.

Alle Phenoxyalkanoat-spaltenden Enzyme der Stämme MC1 (Westendorf et al., 2003), P230 (Ruhland, 2003) und MH sind enantiospezifisch, sie spalten entweder die (R)- oder die (S)-Enantiomeren der Phenoxypropionate. Die (R)-spezifischen Enzyme der drei Stämme und des rekombinanten RdpA zeichnen sich durch identische Primärstrukturen aus (Schleinitz et al., 2004), trotzdem unterscheiden sich die Proteine in ihren kinetischen Kennlinien und Konstanten signifikant (Tabelle 27). Die RdpA-Enzyme aus MC1 und MH sind einander sehr ähnlich. Sie zeigen fast identische Kennlinien bezüglich der Phenoxyalkanoate, ihre kinetischen Konstanten stimmen überein und sie zeigen das gleiche Laufverhalten im nativen Gel. Dem gegenüber steht das RdpA_{MC1}-rec. Dieses Enzym zeigt trotz einer identischen Primärstruktur, den gleichen R_F-Werten und demselben Spotmuster nach Auftrennung im 2D-Gel wie das RdpA_{MC1} von diesem Enzym abweichende Kennlinien und Wechselzahlen. Die Kennlinien sind stetig und nicht, wie bei MC1 und MH durch ein Plateau unterbrochen, was auf das Vorhandensein einer dominanten nativen Enzymform hindeutet. Ein weiteres Indiz hierfür ist das Auftreten nur einer RdpA-Proteinbande nach nativer Auftrennung im Acrylamidgel. Die K_M-Werte des RdpA_{MC1} sind mit denen des rekombinanten Enzyms identisch, die Wechselzahlen

liegen jedoch deutlich darüber. All dies lässt den Schluss zu, dass die Modifizierungen, die die Auftrennung der Monomere im 2D-Gel bedingen, nicht mit den Eigenschaften, die zur Trennung im nativen Acrylamidgel führen, korrelieren und keinen Einfluss auf die kinetischen Konstanten und Kennlinien haben, da diese sowohl im rekombinanten als auch nativen RdpA nachgewiesen wurden.

Das RdpA aus P230 weist ebenfalls eine identische Primärstruktur zum RdpA_{MC1} auf, zeichnet sich jedoch durch einen signifikant kleineren R_F -Wert aus. Verschieden ist auch das Spotmuster nach der Auftrennung im 2D-Gel. Dieses Enzym muss demnach eine andere posttranslationale Modifizierung aufweisen als das RdpA_{MC1}. Dieses zeigt sich auch in den kinetischen Parametern. Die Kennlinien bei variabler Phenoxyacetat-Konzentration sind stetig, und für alle Herbizide ergeben sich deutlich niedrigere K_M -Werte sowie höhere Wechselzahlen als für RdpA_{MC1}. Diese Art der Modifizierung führt also zu gesteigerten katalytischen Eigenschaften des Enzyms, der Effizienzkoeffizient ist für die (R)-Enantiomere der Phenoxypionate etwa zwei- bis dreimal so hoch wie für RdpA_{MC1}, für die Phenoxyacetate sogar 8mal so hoch. Zusammengefasst ist festzustellen: die Modifikationen am *rdpA*-Genprodukt steigern die Umsatzraten der Enzyme bezüglich aller Herbizid-Substrate, die Affinität aber erhöht sich nur für die Phenoxyacetate. Das führt zu einer Verschiebung des Substratverwertungsspektrums. Der Rohextrakt von P230 enthält etwa doppelt soviel 2,4-D-Spaltungsaktivität bezüglich der (R)-DP-Spaltung wie der von MC1. Im Gegensatz zum MC1-Rohextrakt sind in diesem aber keine 2,4-D-spaltenden (S)-spezifischen Enzyme enthalten. Ebenso konnten keine TfdA-Proteine nachgewiesen werden. P230 muss also das gesamte 2,4-D über RdpA_{P230} umsetzen.

Die nativen Enzymformen des SdpA_{MC1} gehen ebenfalls auf posttranslationale modifizierte Monomere mit identischen Aminosäuresequenzen zurück. Diese Enzymformen unterscheiden sich sowohl im Verhältnis der Monomere zueinander als auch in ihren kinetischen Kennlinien und Parametern. Interessanterweise wurden auch für das rekombinante SdpA_{MC1} unterschiedliche Monomere nachgewiesen, die in ihren Eigenschaften mit denen der nativen Proteine übereinstimmen. Das Verhältnis der Monomere im rekombinanten Protein ist identisch mit dem der nativen Enzymform SdpA_{MC1}-I2, das kinetische Verhalten bezüglich der Herbizide und das Laufverhalten im nativen Acrylamidgel entspricht aber dem des Proteins SdpA_{MC1}-I1. Damit zeigt sich analog wie für RdpA, dass aus den verschiedenen Trenneigenschaften im 2D-Gel nicht auf das kinetische Verhalten der Proteine geschlossen werden kann. Für die Eigenschaften, die zur Trennung der Proteinformen im nativen Acrylamidgel führen, trifft dies eher zu. Die Modifizierung am SdpA_{MC1} führt wiederum zu deutlichen Veränderungen der

Substratverwertungseigenschaften, d.h. letztlich ändert sich das Substratverwertungsspektrum (Tabelle 26).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stellen einen ersten Beitrag zum Verständnis der enantioselektiven Spaltung von Phenoxyalkansäuren dar. Durch die Aufklärung der 3D-Struktur der (S)- und (R)-spezifischen Enzyme sollte es möglich sein, einen tiefen Einblick in Struktur-Funktions-Beziehungen zu erlangen. Der molekulare Hintergrund der Enantioselektivität der Enzyme sollte sich offenbaren. Ebenso sollte der Vergleich der 3D-Strukturen der RdpA- und SdpA-Enzyme sowohl der multiplen Enzymformen als auch der einzelnen Stämme untereinander einerseits zum Verständnis der molekularen Ursachen verschiedener Substratverwertungsprofile beitragen und andererseits Einblicke in Möglichkeiten der Regulation der Enzymaktivitäten liefern.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die initialen Enzyme des Phenoxyalkanoat-Abbaus, die α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen darstellen, aus den Bakterienstämmen *Delftia acidovorans* MC1, *Rhodospirillum rubrum* sp. P230 und *Sphingobium herbicidovorans* MH gereinigt und sowohl proteinbiochemisch als auch enzymkinetisch charakterisiert.

Alle drei untersuchten Stämme sind zur kompletten Spaltung der (R,S)-Enantiomere der 2-Phenoxypropionate (R,S)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionat (2,4-DP) und (R,S)-2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)propionat (MCP) sowie zur Spaltung der Phenoxyacetate 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) und 4-Chlor-2-methylphenoxyacetat (MCPA) (Ehrig et al., 1997, Müller et al., 1999a) in der Lage. Der Stamm MH kann zusätzlich noch die Phenoxybutyrate 2,4-Dichlorphenoxybutyrat (2,4-DB) und 4-Chlor-2-methylphenoxybutyrat (MCPB) verwerten (Zipper et al., 1996).

Die Spaltung der 2-Phenoxypropionate erfolgt in den drei untersuchten Stämmen enantioselektiv, das heißt, es gibt je ein Enzym für die Spaltung der (R)-Enantiomere und für die der (S)-Enantiomere. Die (R)-DP/ α -Ketoglutarat Dioxygenase (RdpA) katalysiert die Spaltung der (R)-Enantiomere der 2-Phenoxypropionate und setzt mit geringerer Aktivität auch die Phenoxyacetate um. Dieses Enzym ist in allen drei Stämmen auf das gleiche Gen zurückzuführen (Schleinitz et al., 2004).

Das (S)-spezifische Enzym, (S)-DP/ α -KG Dioxygenase (SdpA), setzt prinzipiell die (S)-Enantiomere der 2-Phenoxypropionate um. Es unterscheidet sich jedoch in den einzelnen Stämmen deutlich, insofern es sich hier um unterschiedliche Proteine handelt, die von verschiedenen Genen codiert werden. Das Enzym aus MC1 setzt neben (S)-DP und (S)-MCP auch die entsprechenden Phenoxyacetat-Derivate mit deutlicher Aktivität um. Im Stamm MH konnten sogar zwei verschiedene SdpA-Enzyme nachgewiesen werden, die neben den (S)-2-Phenoxypropionaten ebenfalls Phenoxyacetate und in einem Fall sogar noch die entsprechenden Phenoxybutyrat-Derivate umsetzen können. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die SdpA-Aktivität im Stamm P230 allein auf die Spaltung der (S)-2-Phenoxypropionate.

Die (R)-spezifischen Enzyme sind oligomere Proteine, die sich aus Monomere mit einer Molmasse von etwa 35,8 kD zusammensetzen. Für die RdpA-Proteine aus MC1 und P230 zeigt sich eine trimere Struktur. Darüber hinaus konnten für die Monomeren ladungsisomere Formen nachgewiesen werden. Diese sind offensichtlich das Produkt einer posttranslationalen Modifizierung; die Art der Modifikation ist noch unbekannt. Das native Enzym aus MC1 setzt

sich aus unterschiedlichen Monomeren zusammen. Unter nativen Bedingungen können drei Enzymformen, die sich in ihren pI-Werten unterscheiden, nachgewiesen und teilweise voneinander getrennt werden.

Das SdpA_{MC1} ist ein dimeres Protein mit einer Molmasse von 64 kD. Es wurden drei native ladungsisomere Proteinformen (I1, I2, I3) dieses Enzyms nachgewiesen, die sich aus drei ladungsisomeren Monomeren (S1, S2, S3) zusammensetzen. Der Nachweis der Existenz der Dimere S1S1 (I1), S1S2 (I2) und S1S3 (I3) konnte erbracht werden. Am SdpA_{MC1} wurden Hydroxylierungen an Trp235 und Trp255 sowie eine zusätzliche Masse von 209 am Cys237 nachgewiesen.

Das (S)-spezifische Enzym aus P230 ist ein oligomeres Protein, das sich aus Monomeren von etwa 32,3 kD ableitet. Es konnten zwei native Enzymformen mit gleicher Primärstruktur und sechs ladungsisomere Monomere nachgewiesen werden.

Die Molmasse eines Monomers des SdpA_{MH} beträgt 32,2 kD. Auch bei diesem Enzym handelt es sich um ein oligomeres Protein. Der endgültige Nachweis von multiplen Enzymformen steht noch aus.

Durch kinetische und proteinbiochemische Untersuchungen sowohl an den nativen als auch an rekombinanten Enzymen konnte der Einfluss der Modifizierung auf die kinetischen Konstanten gezeigt werden. Diese führt zu veränderten kinetischen Eigenschaften, wobei unterschiedliche Modifizierungen auch unterschiedliche Effekte bewirken, wie in den einzelnen Stämmen deutlich wird. Die (R)-spezifischen Dioxygenasen zeichnen sich durch identische Primärstrukturen aus, trotzdem unterscheiden sich die einzelnen Proteine deutlich in ihrem kinetischen Verhalten. Dies zeigt sich besonders klar bei der Spaltung der Phenoxyacetate: 2,4-D und das MCPA werden durch RdpA_{P230} mit einem bis zu 8mal höheren k_{kat}/K_M -Quotienten umgesetzt als durch RdpA_{MC1}.

Auch die SdpA_{MC1}-Enzymformen besitzen die gleiche Aminosäuresequenz. Proteinchemisch unterscheiden sie sich lediglich durch eine bislang nicht identifizierte Modifizierung. Diese hat kinetische Effekte zur Folge: Die Enzymformen unterscheiden sich signifikant in ihren Wechselzahlen bezüglich der Herbizid-Substrate. Ähnliches zeigt sich auch für die Enzymformen des SdpA_{P230}.

6 Literatur

- Abbott M.T., Schandl E.K., Lee R.F., Parker T.S., Midgett R.J.: Cofactor requirements of thymine 7-hydroxylase. *Biochim Biophys Acta* 132 (1967), 525-528
- Anderson L.B., Maderia M., Ouellette A.J.A., Putman-Evans C., Higgins L.A., Krick T., MacCoss M.J., Lim H., Yates III J.R., Barry B.A.: Posttranslational modifications in the CP43 subunit of photosystem II. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99 (2002), 14676-14681
- Aravind L., Koonin E.V.: The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol.* 2 (2001), 1-8
- Ariëns E.J.: Racemates - an impediment in the use of drugs and agrochemicals. Krstulovic Am. Chiral separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester (1989), 31-68
- Babul J.: Significance of phosphofructokinase allostery: The *Escherichia coli* isozymes. *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago)* 12 (1979), 611-616
- Baldwin J.E., Bradley M., Abbott S.D., Adlington R.M.: New penicillins from isopenicillin N synthase. *Tetrahedron* 47 (1991), 5309-5328
- Bath M.A., Ishida T., Horiike K., Vaidyanathan C.S., Nozaki M.: Purification of 3,5-dichlorocatechol-1,2-dioxygenase, a nonheme iron dioxygenase and a key enzyme in the biodegradation of a herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (1993), 738-746
- Benndorf D., Davidson I., Babel W.: Regulation of catabolic enzymes during long-term exposure of *Delftia acidovorans* MC1 to chlorophenoxy herbicides. *Microbiology* 150 (2004), 1005-1014
- Bentley R.: From optical activity in quartz to chiral drugs: molecular handedness in biology and medicine. *Perspect. Biol. Med.* 38 (1995), 188-229
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (1987), 93-99
- Boldt Y.R., Sadowsky M.J., Ellis L.B., Que L. Jr, Wackett L.P.: A manganese-dependent dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family. *J. Bacteriol.* 177 (1995), 1225-1232
- Borovok I., Landman O., Kreisberg-Zakarin R., Aharonowitz Y., Cohen G.: Ferrous active site of isopenicillin-N-synthase: genetic sequence analysis of the endogenous ligands. *Biochemistry* 35 (1996), 1981-1987
- Boyington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M.: Crystallization and preliminary x-ray analysis of soybean lipoxygenase-1, a non-heme iron-containing dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 12771-12773
- Briganti F., Pessione E., Giunta C., Mazzoli R., Scozzafava A.: Purification and catalytic properties of two catechol 1,2-dioxygenase isozymes from benzoate-grown cells of *Acinetobacter radioresistens*. *J. Protein Chem.* 19 (2000), 709-716

- Britsch L.: Purification and characterization of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase. *Arch. Biochem. Biophys.* 282 (1990), 152-160
- Clifton I.J., Hsueh L.C., Baldwin J.E., Harlos K., Schofield C.J.: Structure of prolin 3-hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 268 (2001), 6625-6636
- deCarolus E., deLuca V.: Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 5504-5511
- deCarolus E., deLuca V.: 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization. *Phytochemistry* 36 (1994), 1093-1107
- Conway A., Koshland D.E. Jr.: Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 7 (1968), 4011-4023
- Corpet F.: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 25 (1988) 10881-10890
- Corwin L.M., Fanning G.R.: Studies of parameters affecting the allosteric nature of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243 (1968), 3517-3525
- Cosper N.J., Stalhandske C.M.V., Saari R.E., Hausinger R.P., Scott R.A.: X-ray absorption spectroscopic analysis of Fe(II) and Cu(II) forms of a herbicide-degrading α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999), 122-129
- Donaldson D., Kiely T., Grube A.: 1998 and 1999 market estimates. EPA Pesticides industry sales and usage. EPA, Washington, D.C. (2002), 1-32
- Dunning Hotopp J.C., Hausinger R.P.: Probing the 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase substrate-binding site by site-directed mutagenesis and mechanism-based inactivation. *Biochemistry* 41 (2002), 9787-9794
- Easson L.H., Stedman E.: Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem. J.* 27 (1933), 1257-1266
- Egmond MR., Fasella PM., Veldink GA., Vliegthart JF., Boldingh J.: On the mechanism of action of soybean lipoxygenase-1. A stopped-flow kinetic study of the formation and conversion of yellow and purple enzyme species. *Eur. J. Biochem.* 76 (1977), 469-479
- Ehrig A., Müller R.H., Babel W.: Isolation of phenoxy herbicide-degrading *Rhododerax* species from contaminated building material. *Acta Biotechnol.* 17 (1997), 351-356
- Eliel E.L., Wilen S.H.: Stereochemistry of organic compounds. Wiley, New York (1994)
- Elkins J.M., Ryle M.J., Clifton I.J., Dunning Hotopp J.C., Lloyd J.S., Burzlaff N.I., Baldwin J.E., Hausinger R.P., Roach P.L.: X-ray structure of *Escherichia coli* Taurine/ α -ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates. *Biochemistry* 41 (2002), 5185-5192

- Emerson, E.J.: The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds. *Org. Chem.*, 8 (1943), 417-419
- Emerson, E.J., Kenneth, K.: The condensation of aminoantipyrine VI. A study of the effect of excess base on the reaction of aminoantipyrine with phenolic compounds in the presence of oxidizing agents. *Org. Chem.*, 13 (1948), 532-534
- Evans W.C., Smith B.S.W., Moss P., Fernley H.N.: Bacterial metabolism of 4-chlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122 (1971a), 509-517
- Evans W.C., Smith B.S.W., Farnley H.N., Davies J.I.: Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122 (1971b), 543-551
- Fukumori F., Hausinger R.P.: *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 "2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase" is an α -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *J. Bacteriol.* 175 (1993a), 2083-2086
- Fukumori F., Hausinger R.P.: Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268 (1993b), 24311-24317
- deGroot J.J., Garssen G.J., Vliegthart J.F., Boldingh J.: The detection of linoleic acid radicals in the anaerobic reaction of lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 326 (1973), 279-284
- Griggs D.L., Hedden P., Lazarus C.M.: Partial purification of two gibberellin 2 β -hydroxylases from cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 30 (1991), 2507-2512
- Han S., Eltis L.D., Timmis K.N., Muchmore S.W., Bolin J.T.: Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading *pseudomonad*. *Science* 270 (1995), 976-980
- Harrison I., Williams G.M., Carlick C.A.: Enantioselective biodegradation of mecoprop in aerobic and anaerobic microcosms. *Chemosphere* 53 (2003), 539-549
- Hassal K.A.: The biochemistry and uses of pesticides. VHC Weinheim (1990)
- Hausmann E.: Cofactor requirements for the enzymatic hydroxylation of lysine in a polypeptide precursor of collagen. *Biochim. Biophys. Acta* 133 (1967), 591-593
- Hedden P.: The oxidases of gibberellin biosynthesis: Their function and mechanism. *Physiol. Planta* 101 (1997), 709-719
- Hegg E.L., Whiting A.K., Saari R.E., McCracken J., Hausinger R.P., Que L. Jr.: Herbicide-degrading α -keto acid-dependent enzyme TfdA: metal coordination environment and mechanistic insights. *Biochemistry* 38 (1999), 16714-16726
- Hoffmann D., Müller R.H., Kiesel B., Babel W.: Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium capable of growing on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid. *Acta Biotechnol.* 16 (1996), 121-131

- Hoffmann D., Kleinstaub S., Müller R.H., Babel W.: A transposon encoding the complete 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid degrading pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. Microbiol. 149 (2003), 2545-2556
- Hogan D.A.: Characterization and function of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase and related enzymes. Ph.D. thesis, Michigan State University, East Lansing, MI (1999)
- Hogan D.A., Smith S.R., Saari E.A., McCracken J., Hausinger R.P.: Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase. J. Biol. Chem. 275 (2000), 12400-12409
- Holme E.: A kinetic study of thymine 7-hydroxylase from *neurospora crassa*. Biochemistry 14 (1975), 4999-5003
- Holton T.A., Brugliera F., Tanaka Y.: Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. Plant J. 4 (1993), 1003-1010
- Horvath M., Ditzelmüller G., Loidl M., Streichbier F.: Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 (1990), 213-216
- Hulse J.D., Ellis S.R., Henderson L.M.: Carnitine biosynthesis. beta-Hydroxylation of trimethyllysine by an α -ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. J. Biol. Chem. 253 (1978), 1654-1659
- Hutton J.J. Jr., Trappel A.L., Udenfriend S.: Requirements for α -ketoglutarate, ferrous ion and ascorbate by collagen proline hydroxylase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24 (1966), 179-184
- Janin J., Cohen G.N.: The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K 12. A study of the allosteric equilibrium. Eur. J. Biochem. 11 (1969), 520-529
- Jansen G.A., Mihalik S.J., Watkins P.A., Jakobs C., Moser H.W., Wanders R.J.: Characterization of Phytanoyl-coenzym A hydroxylase in human liver and activity measurements in patient with peroxisomal disorders. Clin. Chim. Acta 271 (1998), 203-211
- Kamata K., Mitsuya M., Nishimura T., Eiki J., Nagata Y.: Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. Structure (Camb). 12 (2004), 429-438
- Kinter M., Sherman N.E.: Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley- Interscience, New York (2000)
- Kivirikko K.I., Prockop D.J.: Hydroxylation of proline in synthetic polypeptides with purified procollagen hydroxylase. J. Biol. Chem. 242 (1967), 4007-4012
- Kivirikko K.I., Prockop D.J.: Partial purification and characterization of procollagen lysine hydroxylase from chick embryos. Biochim. Biophys. Acta 258 (1972), 366-379

Literatur

- Kivirikko K.I., Myllylä R., Pihlajaniemi T.: Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *FASEB J.* 3 (1989), 1609-1617
- Koland J.G., Hammes G.G.: Steady state kinetic studies of purified yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 5936-5942
- Korioth F., Gieffers C., Frey J.: Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl- β -hydroxylase. *Gene* 150 (1994), 395-399
- Koshland D.E. Jr., Nemethy G., Filmer D.: Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5 (1966), 365-85
- Kreisberg-Zakarin R., Borovok I., Yanko M., Aharonowitz Y., Cohen G.: Recent advances in the structure and function of isopenicillin N synthase. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75 (1999), 33-39
- Kuhm A.E., Schlömann M., Knackmuss H.J., Pieper D.H.: Purification and characterization of dichloromuconate cycloisomerase from *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Biochem. J.* 266 (1990), 877-883
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227 (1970), 679-690
- Lai M., Wu W., Stubbe J.A.: Characterization of a novel, stable norcaradiene adduct resulting from inactivation of thymine hydroxylase by 5-ethynyluracil. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995), 5023-5030
- Leveau J.H., Zehnder A.J., van der Meer J.R.: The *tfdK* gene product facilitates uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 180 (1998), 2237-2243
- Lindblad B., Lindstedt G., Lindstedt S., Rundgren M.: Purification and some properties of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (I). *J. Biol. Chem.* 252 (1977), 5073-84
- Lindstedt G., Lindstedt S.: Cofactor requirements of γ -butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 245 (1970), 4178-4180
- Lindstedt G., Lindstedt S., Nordin I.: Purification and properties of gamma-butyrobetaine hydroxylase from *Pseudomonas* sp AK 1. *Biochemistry* 16 (1977), 2181-2188
- Lindstedt S., Nordin I.: Multiple forms of gamma-butyrobetaine hydroxylase (EC 1.14.11.1). *Biochem. J.* 223 (1984), 119-127
- Liu T., Chapman P.J.: Purification and properties of a plasmid-encoded 2,4-dichlorophenol hydroxylase. *FEBS Lett.* 173 (1984), 314-318
- Liu A., Ho R.Y., Que L. Jr., Ryle M.J., Phinney B.S., Hausinger R.P.: Alternative reactivity of an alpha-ketoglutarate-dependent iron(II) oxygenase: enzyme self-hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001), 5126-5127

- Loos M.A.: Phenoxyalkanoic acids. Herbicides: chemistry, degradation and mode of action. (Eds.: Kearney P.C., Kaufman D.D.), 1, Marcel Dekker, New York (1975), 2-101
- Lukacin R., Britsch L.: Identification of strictly conserved histidin and arginine residues a part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase. Eur. J. Biochem. 249 (1997), 748-757
- Marsh E.N., Chang M.D., Townsend C.A.: Two isozymes of clavamate synthase central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. Biochemistry 31 (1992), 12648-12657
- Marusyk R., Sergeant A.: A simple method for dialysis of small-volume samples. Anal. Biochem. 105 (1980), 403-404
- Matell M.: Stereochemical studies on plant growth regulators. VII Optically active α -(2-methyl-4-chlorophenoxy)-propionic acid and α -(2,4-dichlorophenoxy)-*n*-butyric acid and their steric relations. Ark Kemi 6 (1953), 365-373
- Mertink H., Müller R.H., Babel W.: Etherolytic cleavage of 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid and 4-(4-chloro-2-methylphenoxy)butyric acid by species of *Rhodococcus* and *Aureobacterium* isolated from an alkaline environment. J Basic Microbiol. 38 (1998), 257-267
- Mesecar A.D., Koshland D.E. Jr.: A new model for protein stereospecificity. Nature 403 (2000a), 614-615
- Mesecar A.D., Koshland D.E. Jr.: Sites of binding and orientation in a four-location model for protein stereospecificity. IUBMB Life 49 (2000b), 457-466
- Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J.T., Walter R., Axelrod B.: Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. Biochemistry 35 (1996), 10687-10701
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P.: On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12 (1965), 88-118
- Morillo E., Perez-Martinez J.I., Gines J.M.: Leaching of 2,4-D from a soil in the presence of β -cyclodextrin: laboratory columns experiments. Chemosphere 44 (2001), 1065-1069
- Müller R.H., Simon D., Große H.J., and Babel W.: Substrate inhibition under stationary growth conditions-nutristat experiments with *Ralstonia eutropha* JMP 134 during growth on phenol and 2,4-dichlorophenoxyacetate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 (1997), 648-655
- Müller R.H., Jorks S., Kleinstüber S., Babel W.: *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. Microbiol. Res. 154 (1999), 241-246
- Müller R.H., Babel W.: Separation of two dichlorprop/ α -ketoglutarate dioxygenases with enantiospecific properties from *Comamonas acidovorans* MC1. Acta Biotechnol. 19 (1999), 349-355

- Müller R.H., Babel W.: A theoretical study on the metabolic requirements resulting from α -ketoglutarate-dependent cleavage of phenoxyalkanoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 339-344
- Müller R.H., Kleinsteuber S., Babel W.: Physiological and genetic characterization of two bacterial strains utilizing phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. *Microbiol. Res.* 156 (2001), 121-131
- Müller T.A., Kohler H.P.E.: Chirality of pollutants-effects on metabolism and fate. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004), 300-316
- Myllylä R., Tuderman L., Kivirikko K.I.: Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 2. Kinetic analysis of the reaction sequence. *Eur. J. Biochem.* 80 (1977), 349-357
- Naessens M., Vandamme E.J.: Multiple forms of microbial enzymes. *Biotech. Lett.* 25 (2003), 1119-1124
- Nelson M.J., Cowling R.A., Seitz S.P.: Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipooxygenase. *Biochemistry* 33 (1994), 4966-4973
- Nickel K., Suter M.J.F., Kohler H.P.E.: Involvement of two α -ketoglutarate-dependent dioxygenase in enantioselective degradation of (R)- and (S)-mecoprop by *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *J. Bacteriol.* 179 (1997), 6674-6679
- Nickoloff J.A.: *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Humana Press. Totowa, New Jersey (1995)
- O'Brien J.R., Schuller D.J., Yang V.S., Dillard B.D., Lanzilotta W.N.: Substrate-induced conformational changes in *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase and insight into the oligomeric structure. *Biochemistry* 42 (2003), 5547-5554
- Ogston A.G.: Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature* 162 (1948), 963
- Ohlendorf D.H., Lipscomb J.D., Weber P.C.: Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Nature* 336 (1988), 403-405
- Ohlendorf D.H., Orville A.M., Lipscomb J.D.: Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å resolution. *J Mol Biol.* 244 (1994), 586-608
- Onozuka M., Nosaka K.: Steady-state kinetics and mutational studies of recombinant human thiamin pyrophosphokinase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 49 (2003), 156-62
- Pao S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr.: Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998), 1-34
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S.: Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20 (1999), 3551-3567

- Perutz M.: Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228 (1970), 726-739
- Pieper D.H., Reineke W., Engesser K.H., Knackmuss H.J.: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch. Microbiol.* 151 (1988), 365-371
- Podesta F.E, Plaxton W.C.: Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor oil seeds. *Biochem. J.* 279 (1991), 495-501
- Poh R., Xia X., Bruce I.J., Smith A.R.W.: 2,4-dichlorophenoxyacetate/alpha-ketoglutarate dioxygenases from *Burkholderia cepacia* 2a and *Ralstonia eutropha* JMP134. *Microbios* 105, (2001), 43-63
- Porter F.D., Li Y.S., Deuel T.F.: Purification and characterization of a phosphatidylinositol-4-kinase from bovine uteri. *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 8989-8995
- Prescott A.G.: A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). *J. Exp. Bot.* 44 (1993), 849-861
- Price J.C., Barr E.W., Tirupati B., Bollinger J.M. Jr., Krebs C.: The first direct characterization of a high-valent iron intermediate in the reaction of an alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase: a high-spin Fe(IV) complex in taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42 (2003), 7497-7508
- Proda A.G., Airoidi C.: Adsorption and preconcentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on chemically modified silica gel surface. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001), 1028-1030
- Puistola U., Turpeenniemi-Hujanen T.M., Myllylä R., Kivirikko K.I.: Studies on the lysyl hydroxylase reaction. II. Inhibition kinetics and the reaction mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 611 (1980), 51-60
- Que L. Jr., Widom J., Crawford R.L.: 3,4-Dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase. A manganese(II) dioxygenase from *Bacillus brevis*. *J. Biol. Chem.* 256 (1981), 10941-10944
- Que L. Jr., Ho R.Y.N.: Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chem. Rev.* 96 (1996), 2607-2624
- Reinhold P.: Biologische Charakterisierung der Substratspezifität der 2,4-Dichlorphenoxyalkansäure-spaltenden Dioxygenasen alkaliphiler Bakterien. Diplomarbeit an der Universität Leipzig (1998)
- Roach P.L., Clifton I.J., Fulop V., Harlos K., Barton G.J., Hajdu J., Andersson I., Schofield C.J., Baldwin J.E.: Crystal structure of isopenicillin-N-synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature* 375 (6533) (1995a), 700-704
- Roach P.L., Clifton I.J., Hensgens C.M.H., Shibata N., Schofield C.J., Hajdu J., Baldwin J.E.: Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* 387 (1995b), 827-830

Literatur

- Roberts T.: Metabolic pathway of agrochemicals. Part I: Herbicides and plant growth regulators. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1998), 75-77
- Romero E., Matallo M.B., Pena A., Sanchez-Rasero F., Schmitt-Kopplin Ph., Dios G.: Dissipation of racemic mecoprop and dichlorprop and their pure R-enantiomers in three calcareous soils with and without peat addition. *Environ. Pollution* 111 (2001), 209-215
- Reineke W.: Construction of bacterial strains with novel degradative capabilities for chloroaromatics. *J. Basic Microbiol.* 26 (1986), 551-567
- Reineke W., Knackmuss H.-J.: Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* 42 (1988), 263-287
- Rundgren M.: Multiple forms of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (II). *J. Biol. Chem.* 252 (1977a), 5085-5093
- Rundgren M.: Steady-state kinetics of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from human liver (III). *J. Biol. Chem.* 252 (1977b), 5094-5099.
- Ruhland S.: Reinigung und Charakterisierung von Dioxygenasen mit enantioselektiven Eigenschaften zur etherolytischen Spaltung racemischer Phenoxalkanoatherbizide. Diplomarbeit, Universität Jena (2003)
- Rügge K., Juhler R.K., Broholm M.M., Bjerg P.L.: Degradation of the (R)- and (S)-enantiomers of the herbicides MCPP and dichlorprop in a continuous field-injection experiment. *Water Research* 36 (2002), 4160-4164
- Ryle M.J., Liu A., Muthukumaran R.B., Ho R.Y., Koehntop K.D., McCracken J., Que L. Jr., Hausinger R.P.: O₂- and α -ketoglutarate-dependent tyrosyl radical formation in TauD, an α -keto acid-dependent non-heme iron dioxygenase. *Biochemistry* 42 (2003a), 1854-1862
- Ryle M.J., Koehntop K.D., Liu A., Que Jr. L., Hausinger R.P.: Interconversion of two oxidized forms of Taurine/ α -ketoglutarate dioxygenase, a non-heme iron hydroxylase: Evidence for bicarbonate binding. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100 (2003b), 3790-3795
- Saari R.E., Hausinger R.P.: Ascorbic acid-dependent turnover and reactivation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase using thiophenoxyacetic acid. *Biochemistry* 37 (1998), 3035-3042
- Saari R.E., Hogan D.A., Hausinger R.P.: Stereospecific degradation of the herbicide dichlorprop. *J. Molec. Catalysis B Enzymatic* 6 (1999), 421-428
- Sabater B., Delafuente G.: Kinetic properties and related changes of molecular weight in a fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta.* 377 (1975), 258-270
- Saito K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y., Yamazaki M.: Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens*. *Plant J.* 17 (1999), 181-189

- Salowe S.P., Marsh E.N., Townsend C.A.: Purification and characterization of clavamate synthase from *Streptomyces clavuligerus*: an unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. *Biochemistry* 29 (1990), 6499-6508
- Sami M., Brown T.J., Roach P.L., Schofield C.J., Baldwin J.E.: Glutamine-330 is not essential for activity in isopenicillin N synthase from *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* 405 (1997), 191-194
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74 (1977), 5463-5467
- Sanker S., Campbell H.A., Kent C.: Negative cooperativity of substrate binding but not enzyme activity in wild-type and mutant forms of CTP: glycerol-3-phosphate-cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 37922-37928
- Schägger H., von Jagow G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 (1987), 368-379
- Schleinitz K.M., Kleinstein S., Vallaey S., Babel W.: The genetic background of 2,4-dichlorophenoxypropionate cleavage in *Delftia acidovorans* MC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004), 5357-5365
- Schmidt T.G.M., Koepke J., Frank R., Skerra A.: Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255 (1996), 753-766
- Schulz S., Dong W., Groth U., Cook A.M.: Enantiomeric degradation of 2-(4-sulfophenyl)butyrate via 4-sulfocatechol in *Delftia acidovorans* SPB1. *Applied Environ. Microbiol.* 66 (2000), 1905-1910
- Senda T., Sugiyama K., Narita H., Yamamoto T., Kimbara K., Fukuda M., Sato M., Yano K., Mitsui Y.: Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J Mol Biol.* 255 (1996), 735-752
- Shaw C.R.: Isoenzymes: classification, frequency, and significance. *Int.Rev. Cytol.* 25 (1969), 297-332
- Shibasaki T., Mori H., Chiba S., Ozaki A.: Microbial prolin-4-hydroxylase screening and gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999), 4025-4031
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68 (1996), 850-858
- Siegel B.: α -Ketoglutarate dependent dioxygenases: A mechanism for prolyl hydroxylase action. *Bioorganic Chemistry* 8 (1979), 219-226
- Skerra A.: Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151 (1994), 131-135

Smejkal C.W., Vallaey T., Seymour F.A., Burton S.K., Lappin-Scott H.M.: Characterization of (R/S)-mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid]-degrading *Alkaligenes* sp. CS1 and *Ralstonia* sp. CS2 from agricultural soils. *Environ. Microbiol.* 3 (2001), 288-293

Solomon E.I., Brunold T.C., Davis M.I., Kemsley J.N., Lee S.K., Lehnert N., Neese F., Skulan A.J., Yang Y.S., Zhou J.: Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem. Rev.* 100 (2000), 235-350

Sträuber H., Müller R.H., Babel W.: Evidence of cytochrome P450-catalyzed cleavage of the ether bond of phenoxybutyrate herbicides in *Rhodococcus erythropolis* K2-3. *Biodegradation.* 14 (2003), 41-50

Streber W.R., Timmis K.N., Zenk M.H.: Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alkaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169 (1987), 2950-2955

Takeuchi M., Hamana K., Hiraishi A.: Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001), 1405-1417

Tett V.A., Willetts A.J., Lappin-Scott H.M.: Enantioselective degradation of the herbicide mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid] by mixed and pure bacterial cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14 (1994), 191-200

Tett V.A., Willetts A.J., Lappin-Scott H.M.: Biodegradation of the chlorophenoxy herbicide (R)-(+)-mecoprop by *Alcaligenes denitrificans*. *Biodegradation* 8 (1997), 43-52

Thornburg L.D.: Mechanism-based inhibition of thymine hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989), 7632-7633

Thornburg L.D., Stubbe J.: Mechanism-based inactivation of thymine hydroxylase, an alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, by 5-ethynyluracil. *Biochemistry* 32 (1993), 14034-14042

Van Vliet F., Xi X.G., De Staercke C., de Wannemaeker B., Jacobs A., Cherfils J., Ladjimi M.M., Herve G., Cunin R.: Heterotropic interactions in aspartate transcarbamoylase: turning allosteric ATP activation into inhibition as a consequence of a single tyrosine to phenylalanine mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 9180-9183

Vålegård K., van Scheltinga A.C.Z., Lloyd M.D., Hara T., Ramaswamy S., Perrakis A., Thompson A., Lee H.J., Baldwin J.E., Schofield C.J., Hajdu J., Andersson I.: Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* 394 (1998), 805-809

Voss S., Skerra A.: Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10 (1997), 975-982

Wada G.H., Fellman J.H., Fujita T.S., Roth E.S.: Purification and properties of avian liver *p*-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 250 (1975), 6720-6726

- Westendorf A.: Reinigung und Charakterisierung der Phenoxyalkanoat [Dichlorprop]/ α -Ketoglutarat-Dioxygenase aus *Delftia acidovorans* MC1 unter Berücksichtigung enantioselektiver Eigenschaften. Diplomarbeit, Universität Leipzig (2001)
- Westendorf A., Benndorf D., Müller R.H., Babel W.: The two enantiospecific dichlorprop/ α -ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 – protein and sequence data of RdpA and SdpA. *Microbiol. Res.* 157 (2002), 331-336
- Westendorf, A., Müller, R.H., Babel, W.: Purification and characterization of the enantio-specific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. *Acta Biotechnol.* 23 (2003), 3-17
- Whiting A.K., Boldt Y.R., Hendrich M.P., Wackett L.P., Que L. Jr.: Manganese(II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2. *Biochemistry* 35 (1996), 160-170
- Whiting A.K., Que, L: Metal Coordination Environment of a Cu(II)-Substituted α -Ketoacid-dependent Dioxygenase that degrades the Herbicide 2,4-D. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997), 3413-3414
- Worthing G.M., Hance R.J.: The pesticide manual - a world compendium, 9th edn. The British Crop Council, Farnham (1991)
- Xiao X.F., Wolfe S., Demain A.L.: Purification and characterization of cephalosporin-7- α -hydroxylase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem. J.* 280 (1991), 471-474
- Xun L., Wagon K.B.: Purification and properties of component B of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetate oxygenase from *Pseudomonas cepacia* AC110. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995), 3499-3502
- Zhang Z., Ren J., Stammers D.K., Baldwin J.E., Harlos K., Schofield C.J.: Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000), 127-33
- Zipper C., Nickel K., Angst W., Kohler H.P.E.: Complete microbial degradation of both enantiomers of the chiral herbicide mecoprop [(R,S)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propionic acid] in an enantioselective manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996), 4318-4322
- Zipper C., Bunk M., Zehnder A.J.B., Kohler H.P.E.: Enantioselective Uptake and Degradation of the Chiral Herbicide Dichlorprop [(R,S)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)propionic acid] by *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *J. Bacteriol.* 180 (1998), 3368-3374
- Zipper C., Bollinger C., Fleischmann T., Suter M.J.F., Angst W., Müller M.D., Kohler H.P.E.: Fate of the herbicides mecoprop, dichlorprop, and 2,4-D in aerobic and anaerobic sewage sludge as determined by laboratory batch studies and enantiomer-specific analysis. *Biodegradation* 10 (1999), 271-278

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. W. Babel ganz herzlich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seinem Department und die lehrreichen Diskussionen bedanken.

Ein ganz besonders großer Dank gebührt Dr. R. H. Müller für seine exzellente Betreuung. Die ständige Hinterfragung von Ergebnissen, die Formulierung von Thesen, die Diskussion von Problemen und die ständige Motivierung führten zu einem schnellen Fortschreiten der Arbeiten. Danke auch für die Möglichkeit zur selbstständigen Arbeitsweise.

Dr. D. Benndorf möchte ich für seine unkomplizierte und kompetente Hilfe bei den protein-biochemischen Methoden und seine unendlichen Fragen zu den Hintergründen danken und Frau Chr. Schumann danke ich für die experimentelle Durchführung der 2D-Gelelektrophoresen.

Für die massenspektrometrischen Analysen, ohne die die Ergebnisse zu posttranslationalen Modifizierung nicht vorlägen, danke ich Prof. R. Hoffmann und Dipl. Chem. T. Langrock.

Ein großes Dankeschön geht an Dipl.-Ing. H. J. Große, Dr. D. Hoffmann, M. Neytshev, Dr. T. Pribyl, C. Schumann und Dr. H. Sträuber, ohne die das Arbeiten bestimmt nur halb soviel Spaß gemacht hätte, danke für die Ratschläge, Tipps und Tricks, die meine Forschung voranbrachten, für das tolle Arbeitsklima usw..

Den zahlreichen Praktikanten und Diplomanden, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben sei hiermit auch gedankt.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der UMB und des UBZ für alle gewährten Hilfen und Diskussionen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „Enantioselektive Verwertung von Phenoxalkanoat-Herbiziden durch Bakterien - Biochemische Charakterisierung der Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus den Werken sinngemäß oder wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Leipzig, Oktober 2004

Anne Westendorf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anne Westendorf
Wohnort: Strasse des 18. Okt. 29/809, 04103 Leipzig
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984-1990 Fritz-Reuter-POS, Ostseebad Kühlungsborn
1990-1996 Fritz-Reuter-Gymnasium, **Abitur**, Ostseebad Kühlungsborn

Studium

Okt. 1996-Sept. 1998 Grundstudium der Fachrichtung Biochemie an der Universität Potsdam, **Vordiplom**
Okt. 1998-März 2001 Hauptstudium der Fachrichtung Biochemie an der Universität Leipzig, **Diplom**
Sep. 2000-März 2001 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: „Reinigung und Charakterisierung der Phenoxyalkanoat [Dichlorprop]/ α -Ketoglutarat-Dioxygenase aus *Delftia acidovorans* MC1 unter Berücksichtigung enantioselektiver Eigenschaften“ am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Promotion

Juni 2001-Mai 2004 Doktorandin im Department Umweltmikrobiologie, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.
Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit zum Thema: „Enantioselektive Verwertung von Phenoxyalkanoat-Herbiziden durch Bakterien - Biochemische Charakterisierung der Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes“ unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Babel.

UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Internet: www.ufz.de